



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

## Modifikation des $Ca_v1.2$ -Kalziumkanals durch die SNAP-tag- und HA-tag-Technologie

Sophie Blatt

Vollständiger Abdruck der von der

Fakultät für Medizin

der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann  
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. St. Engelhardt

Die Dissertation wurde am 03.02.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.04.2015 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>EINLEITUNG .....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1      | SPANNUNGSABHÄNGIGE KALZIUMKANÄLE .....  | 2         |
| 1.1.1    | <i>Elektrophysiologische Einteilung: HVA und LVA</i> .....                          | 2         |
| 1.1.2    | <i>Phylogenetische Gliederung – die Ca<sub>v</sub>-Familien</i> .....               | 4         |
| 1.1.3    | <i>Struktur eines HVA L-Typ Kalziumkanals</i> .....                                 | 5         |
| 1.1.4    | <i>Besonderheiten des herzspezifischen HVA Ca<sub>v</sub>1.2 L-Typ Kanals</i> ..... | 9         |
| 1.2      | MUSKELKONTRAKTION IM HERZEN.....  | 10        |
| 1.2.1    | <i>Erregungsbildungs- und -leitungssystem</i> .....                                 | 11        |
| 1.2.2    | <i>Aufbau der Muskelfasern</i> .....  | 11        |
| 1.2.3    | <i>Querbrückenzyklus</i> .....  | 12        |
| 1.2.4    | <i>Die elektromechanische Kopplung</i> .....  | 12        |
| 1.3      | METHODEN DER IN VIVO ZELLDETEKTION .....  | 15        |
| 1.3.1    | <i>HA-tag</i> .....   | 16        |
| 1.3.2    | <i>Fluoreszenzgekoppelte Enzymreaktion der SNAP-tag-Technologie</i> .....           | 16        |
| 1.4      | GENTARGETING ÜBER DEN ROSA26-LOCUS.....   | 19        |
| <b>2</b> | <b>FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>  | <b>21</b> |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL .....</b>   | <b>23</b> |
| 3.1      | CHEMIKALIEN .....   | 23        |
| 3.2      | ENZYME .....  | 24        |
| 3.3      | OLIGONUKLEOTIDE .....   | 25        |
| 3.4      | ANTIKÖRPER.....   | 27        |
| 3.5      | GERÄTE .....  | 27        |
| 3.6      | EINMALMATERIAL.....   | 28        |
| <b>4</b> | <b>METHODEN.....</b>  | <b>29</b> |
| 4.1      | BAKTERIENKULTUR.....  | 29        |
| 4.1.1    | <i>Plasmide</i> .....   | 29        |
| 4.1.2    | <i>Bakterienstämme</i> .....  | 33        |
| 4.1.3    | <i>Herstellung elektrokompetenter Zellen</i> .....                                  | 33        |
| 4.1.4    | <i>Herstellung chemisch kompetenter Bakterien</i> .....                             | 35        |
| 4.1.5    | <i>Transformation von Bakterien</i> .....   | 35        |
| 4.1.6    | <i>Kultivierung</i> .....   | 37        |
| 4.1.7    | <i>Medien</i> .....   | 37        |
| 4.2      | MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....   | 38        |
| 4.2.1    | <i>Amplifizierung von DNS</i> .....   | 38        |
| 4.2.2    | <i>Gelelektrophorese</i> .....  | 40        |
| 4.2.3    | <i>Elektroelution</i> .....   | 42        |
| 4.2.4    | <i>QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)</i> .....                                   | 43        |
| 4.2.5    | <i>Alkohol-Fällung</i> .....  | 43        |
| 4.2.6    | <i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i> .....                             | 44        |
| 4.2.7    | <i>Sequenzanalyse von DNS</i> .....   | 45        |
| 4.3      | ENZYMATISCHE MODIFIKATION VON NUKLEINSÄUREN .....                                   | 45        |
| 4.3.1    | <i>Restriktionsverdau</i> .....   | 45        |
| 4.3.2    | <i>Dephosphorylierung von DNS (CIP)</i> .....                                       | 45        |
| 4.3.3    | <i>Ligation</i> .....   | 46        |
| 4.4      | PRÄPARATION VON PLASMID-DNS AUS BAKTERIENKULTUREN (E.COLI).....                     | 47        |
| 4.4.1    | <i>Minipräparation</i> .....  | 47        |
| 4.4.2    | <i>Maxipräparations-Kit von Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden)</i> .....                  | 48        |
| 4.4.3    | <i>Speed-vac</i> .....  | 49        |
| 4.5      | ZELLKULTUR .....  | 50        |
| 4.5.1    | <i>HEK-Zellen</i> .....   | 50        |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 4.5.2    | Medien.....   | 50         |
| 4.5.3    | Transfektion von HEK293T-Zellen.....                          | 51         |
| 4.5.4    | Auftauen eines HEK293T-Gefrierstock.....                      | 52         |
| 4.5.5    | Kultivierung und Passagieren von HEK293T-Zellen.....          | 53         |
| 4.5.6    | Herstellen eines Gefrierstocks der HEK293T-Kultur.....        | 54         |
| 4.6      | BIOCHEMISCHE METHODEN ZUR PROTEINGEWINNUNG.....               | 54         |
| 4.6.1    | Ernten von HEK293T-Zellen.....                                | 54         |
| 4.6.2    | SDS-Aufschluss.....   | 55         |
| 4.6.3    | Membranproteinpräparation aus HEK293T-Zellen.....             | 55         |
| 4.6.4    | Quantitative Proteinbestimmung.....                           | 56         |
| 4.6.5    | Western-Blot.....   | 56         |
| 4.7      | DETEKTION VON ZELLSTRUKTUREN.....                             | 61         |
| 4.7.1    | Zellkernfärbung.....  | 61         |
| 4.7.2    | Immunofluoreszenz.....  | 62         |
| <b>5</b> | <b>ERGEBNISSE .....</b>                                       | <b>65</b>  |
| 5.1      | pcDNA3-KONSTRUKTE .....                                       | 65         |
| 5.1.1    | Herstellung des pcDNA3-SNAP-LK1-HA-Konstrukts .....           | 65         |
| 5.1.2    | Überprüfung des cDNS-Konstrukts .....                         | 69         |
| 5.1.3    | Expression in HEK293T-Zellen .....                            | 70         |
| 5.1.4    | Proteingewinnung und Detektion.....                           | 70         |
| 5.2      | KONTROLLPLASMID.....  | 78         |
| 5.2.1    | Strategie des pcDNA3-LK1-HA-Plasmids.....                     | 78         |
| 5.2.2    | Überprüfung der Sequenz .....                                 | 79         |
| 5.2.3    | Expression des Kontrollplasmids in HEK293T-Zellen .....       | 80         |
| 5.2.4    | Proteingewinnung und Detektion.....                           | 80         |
| 5.3      | GENTARGETINGSTRATEGIE.....                                    | 87         |
| 5.3.1    | Herstellung des CTV-SNAP-Ca <sub>v</sub> 1.2-HA-Vektors ..... | 88         |
| 5.3.2    | Überprüfung des Gentargetingkonstrukts.....                   | 91         |
| 5.4      | ES-ZELL-SCREENING .....                                       | 92         |
| 5.4.1    | Anpassen der etablierten Screening-Strategie.....             | 92         |
| 5.4.2    | Überprüfen des Screening-Vectors .....                        | 94         |
| <b>6</b> | <b>DISKUSSION .....</b>                                       | <b>95</b>  |
| 6.1      | HA-TAG .....  | 96         |
| 6.2      | SNAP-TAG .....  | 101        |
| 6.2.1    | Integration am N-Terminus .....                               | 101        |
| 6.2.2    | Alternative Integration am C-Terminus .....                   | 103        |
| 6.3      | ROLLE DES L-TYP-KALZIUMKANALS IN DER PATHOPHYSIOLOGIE .....   | 105        |
| 6.4      | AUSBlick.....   | 107        |
| <b>7</b> | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>                                  | <b>109</b> |
| <b>8</b> | <b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>                              | <b>111</b> |
| <b>9</b> | <b>ANHANG .....</b>   | <b>119</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| A                                | Adenin   |
| ADP                              | Adenosin-5'-diphosphat   |
| AGT                              | O <sup>6</sup> -Alkylguanin-DNS-Alkyltransferase                                   |
| AID                              | α-interaction domain   |
| AKAP                             | PKA-Ankerprotein   |
| Amp                              | Ampicillin   |
| AP                               | Aktionspotenzial   |
| ATP                              | Adenosin-5'-triphosphat  |
| AV                               | atrioventrikular   |
| BCA                              | Bicinochoninsäure  |
| BID                              | β-interaction domain   |
| β-ME                             | B-Mercaptoethanol  |
| bp                               | Basenpaar  |
| BSA                              | Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)  |
| BTZ                              | Benzothiazepine  |
| c                                | Konzentration  |
| C                                | Cytosin  |
| Ca <sup>2+</sup>                 | Kalziumionen   |
| Ca <sup>2+</sup> /CaM            | Kalzium-Calmodulin-Komplex   |
| [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> | Intrazelluläre Kalziumkonzentration  |
| cAMP                             | Zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat   |
| Ca <sub>v</sub>                  | Spannungsabhängiger Kalziumkanal   |
| CDF                              | Ca <sup>2+</sup> abhängige Fazilitierung (Ca <sup>2+</sup> dependent facilitation) |
| CDI                              | Ca <sup>2+</sup> abhängige Inaktivierung (Ca <sup>2+</sup> dependent inactivation) |
| CIP                              | Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (calf intestine phosphatase)                 |
| DHP                              | Dihydropyridine  |
| DMEM                             | Dulbecco's Modified Eagle Medium   |
| DMSO                             | Dimethylsulfoxid   |
| DNS                              | Desoxyribonukleinsäure   |
| dNTP                             | 2'-Desoxyribonuklein-5'-triphosphat  |
| E. coli                          | Escherichia coli   |
| ECL                              | Detektionsreagenz (enhanced chemiluminescence)                                     |
| EF-Zellen                        | Embryonale Fibroblasten („Feederzellen“)   |
| ES-Zellen                        | Embryonale Stammzellen   |
| F                                | Farad (Kapazität)  |
| g                                | Gramm  |
| G                                | Guanin   |
| G418                             | Geneticin  |
| h                                | Stunde   |
| HEK                              | Humane embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney cells)                      |
| HVA                              | Bei großer Spannung aktiviert (high voltage activated)                             |
| kb                               | Kilobasen  |
| l                                | Liter  |
| LB                               | Lysogeny broth   |



|               |   |
|---------------|---|
| LIF           | Leukämie inhibierender Faktor                                     |
| LVA           | Bei geringer Spannung aktiviert (low voltage activated)           |
| μ             | Mikro (10 <sup>-6</sup> )   |
| m             | Milli (10 <sup>-3</sup> )   |
| m, cm, mm, nm | Meter, Centimeter, Millimeter, Nanometer                          |
| MCS           | Multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)                |
| MAPK          | Mitogen aktivierte Proteinkinase                                  |
| min           | Minuten   |
| ml            | Milliliter  |
| M             | Mol   |
| n             | Nano (10 <sup>-9</sup> )  |
| NCX           | Natrium-Kalzium-Austauscher                                       |
| OD            | Optische Dichte   |
| PAA           | Phenylalkylamine  |
| pBI           | pBluescript   |
| PBS           | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung                                |
| PCR           | Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)              |
| PKA           | Proteinkinase A   |
| rpm           | Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)                   |
| RT            | Raumtemperatur  |
| RYR           | Ryanodinrezeptor  |
| Sek, ms       | Sekunden, Millisekunden   |
| SERKA         | Sarkoendoplasmatische Retikulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase          |
| SDS           | Sodium dodecyl sulfate  |
| SR            | Sarkoplasmatisches Retikulum                                      |
| T             | Thymin  |
| TBS           | Tris-Borat-NaCl-Puffer  |
| TGA; TAA      | Stopcodon   |
| TEMED         | N,N,N',N'-Tetramethyldiamin                                       |
| U             | Einheit (unit)  |
| ü.N.          | Über Nacht  |
| UV            | Ultraviolettes Licht  |
| V             | Volt  |
| VDI           | Spannungsabhängige Inaktivierung (voltage dependent inactivation) |
| WT            | Wildtyp   |

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abb. 1 Übersicht über die Familie der spannungsabhängigen Kalziumkanäle .....                             | 5  |
| Abb. 2 L-Typ-Kalziumkanal des Skelettmuskels .....  | 8  |
| Abb. 3 Elektromechanische Kopplung einer Herzmuskelzelle .....  | 14 |
| Abb. 4 SNAP-tag-Technologie .....   | 18 |
| Abb. 5 pBluescript II KS (+/-) Plasmidvektor .....  | 30 |
| Abb. 6 pcDNA3-Vektor .....  | 31 |
| Abb. 7 Aufbau des CTV-Targeting Vektors .....   | 32 |
| Abb. 8 Integration der MluI-Schnittstelle in LK1 (2669) .....   | 66 |
| Abb. 9 Auszug aus der Sequenzanalyse des HA-tags .....  | 67 |
| Abb. 10 Schematische Darstellung der Konstruktion des cDNA-Plasmids .....                                 | 68 |
| Abb. 11 Restriktionsanalyse des pcDNA3-Vektors .....  | 69 |
| Abb. 12 Auszug aus der Sequenzanalyse: Kozak-Sequenz gefolgt von Start-ATG, Beginn der SNAP-Sequenz ..... | 69 |
| Abb. 13 SDS-Tris-Aufschluss – Detektion der Ca <sub>v</sub> 1.2-Untereinheit .....                        | 71 |
| Abb. 14 SDS-Tris-Aufschluss – Detektion der Ca <sub>v</sub> β <sub>2</sub> -Untereinheit .....            | 71 |
| Abb. 15 SDS-Tris-Aufschluss – Detektion der HA-tag .....  | 72 |
| Abb. 16 Membranpräparation – Detektion des Ca <sub>v</sub> 1.2-Kanals .....                               | 73 |
| Abb. 17 Membranpräparation – Detektion des HA-tag .....   | 73 |
| Abb. 18 Permeabilisierung und Färbungsskizze - Immunfluoreszenz-Detektion .....                           | 75 |
| Abb. 19 Isotypen-Kontrolle (IgG), Wildtyp und pcDNA3-SNAP-LK1-HA- Konstrukt .....                         | 76 |
| Abb. 20 Ohne primären Antikörper, Wildtyp und pcDNA3-SNAP-LK1-HA- Konstrukt .....                         | 76 |
| Abb. 21 Anti-HA-tag Antikörper (Abcam), Wildtyp .....   | 77 |
| Abb. 22 Anti-HA-tag Antikörper (Abcam), pcDNA3-SNAP-LK1-HA .....  | 78 |
| Abb. 23 Restriktionsverdau des pcDNA3-LK1-HA-Plasmids .....   | 79 |
| Abb. 24 Auszug aus der Sequenzanalyse des Kontrollplasmids .....  | 80 |
| Abb. 25 Western Blot des Kontrollvektors, Anti-Ca <sub>v</sub> 1.2-Antikörper .....                       | 82 |
| Abb. 26 Western Blot des Kontrollvektors, Anti-Ca <sub>v</sub> β <sub>2</sub> -Antikörper .....           | 82 |
| Abb. 27 Western Blot des Kontrollvektors, Anti-HA-Antikörper .....  | 83 |
| Abb. 28 Isotypen-Kontrolle (IgG), Kontrollvektor und Wildtyp .....  | 84 |
| Abb. 29 Ohne primären Antikörper, Kontrollvektor und Wildtyp .....  | 85 |
| Abb. 30 Anti-HA-tag Antikörper (Abcam), Wildtyp .....   | 86 |
| Abb. 31 Anti-HA-tag Antikörper (Abcam), Kontrollplasmid .....   | 87 |
| Abb. 32 Schematische Darstellung der Klonierung des SNAP-Ca <sub>v</sub> 1.2-HA-Targetingvektors ...      | 90 |
| Abb. 33 Restriktionsverdau des Targetingvektors CTV-SNAP-Ca <sub>v</sub> 1.2-HA .....                     | 91 |
| Abb. 34 Sequenzanalyse des CTV-SNAP-Ca <sub>v</sub> 1.2-HA-Vektors .....                                  | 91 |
| Abb. 35 Schematische Darstellung der Konstruktion des Screeningvektors .....                              | 93 |
| Abb. 36 Screeningvektor - PCR .....   | 94 |

## Tabellenverzeichnis

|   |     |
|---|-----|
| Tabelle 1 Einteilung der Ca <sup>2+</sup> -Kanäle (Catterall, 2000; Ertel et al, 2000; Moosmang et al, 2005)<br>..... | 4   |
| Tabelle 2 Antikörperkombinationen - Immunfluoreszenz.....   | 74  |
| Tabelle 3 Kanalerkrankungen der Ca <sub>v</sub> 1-Familie (Bidaud & Lory, 2011; Stockner & Koschak,<br>2012).....     | 106 |

## 1 Einleitung

Schon vor 130 Jahren entdeckte Sidney Ringer die zentrale Bedeutung der Kalziumionen für die Kontraktilität des Herzmuskels. Unter Versuchsbedingungen löste der hohe Gehalt an Kalziumionen im Londoner Leitungswasser eine Ventrikelkontraktion aus (Ringer, 1883). Nach dem heutigen Wissensstand ist es wenig überraschend, dass die isolierten Ventrikel *in vitro* zu arbeiten begannen. Als Botenstoffe übermitteln Kalziumionen intrazelluläre Signale, die für Kontraktion, Transmitter- und Hormonausschüttung sowie Stoffwechselfunktionen, Zellproliferation und Apoptose verantwortlich sind (Bers, 2008; Carafoli, 2002; Hofmann et al, 1994). Die Wirkungsweise der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ist vielfältig und beschränkt sich nicht nur auf das Vermitteln von Signalen, die von extrazellulär an eine Zelle herangetragen werden (*second messenger*).  $\text{Ca}^{2+}$  selbst kann weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern freisetzen, die als drittes Glied in der Kaskade als Signalübermittler wirken (*third messenger*). Darüber hinaus kann Kalzium seine Wirkung auch direkt im extrazellulären Milieu auf die Zelle ausüben (*first messenger*)(Carafoli, 2002). So unterschiedlich die Wirkung von Kalzium ist, so divergent sind die Signaltransduktionsstrategien. Da Kalzium unter anderem konträre Reaktionen wie Proliferation und programmierten Zelltod (Apoptose) in der Zelle auslösen kann, ist nicht allein der Konzentrationsanstieg entscheidend, sondern auch die weiteren Prozesse, die in der Zelle gleichzeitig ablaufen.

Unter Ruhebedingungen liegt die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration bei 10 - 100 nM. Dieser niedrige Gehalt an Kalziumionen gewährleistet, dass minimale Änderungen der Ionenkonzentration wirkungsvoll  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalwege aktivieren. Wird eine erregbare Zelle stimuliert, kann die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration je nach Zelltyp um mehrere  $\mu\text{M}$  ansteigen (Bootman & Berridge, 1995). Als Reservoir für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen dienen der Extrazellularraum und spezielle intrazelluläre Speicher wie das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) und die Mitochondrien (Bers, 2002). Da geladene Teilchen nicht in der Lage sind, die Phospholipid-Doppelschicht zu passieren, sind für die Freisetzung der Ionen Kalziumkanäle nötig. Die treibende Kraft für den Einstrom der Ionen aus dem Extrazellularraum ist der 20.000 - fache Konzentrationsgradient, der über der Zellmembran herrscht. Im Gegensatz zu der verhältnismäßig geringen Anzahl an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in der Zelle (<100 nM) weist das

Interstitium eine Kalziumionenkonzentration von etwa 2 mM auf. Die Aufrechterhaltung dieses Konzentrationsunterschiedes ist eine enorme Lebens- und Energieaufgabe der Zellen (Clapham, 2007).

Veränderungen in der Struktur der Kalziumkanäle können zu einer Vielzahl von Erkrankungen führen. Bereits in den 90er Jahren wurde erstmals der Phänotyp des Timothy-Syndroms beschrieben. Diese Multiorganerkrankung beruht auf einer einfachen Punktmutation in einem Kalziumkanal. Aus den frühen klinischen Berichten geht hervor, dass die Erkrankung neben einem Long-QT-Syndrom auch ein Zusammenwachsen der Finger (Syndaktylie) aufweist, einen frühen Tod zur Folge hat und beide Geschlechter gleichermaßen betrifft (Marks et al, 1995a; Marks et al, 1995b).

## **1.1 Spannungsabhängige Kalziumkanäle**

Spannungsabhängige Kalziumkanäle (*voltage gated calcium channels*, VGCC) ermöglichen als Antwort auf eine Membrandepolarisation eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zelle. Herrscht ein Ruhepotential von etwa  $-90$  mV, sind die Kanäle überwiegend geschlossen. Die Aktivität der Kanäle wird durch die Spannungsdifferenz über die Membran maßgeblich reguliert und wird durch weitere Botenstoffe wie Inositoltrisphosphat ( $\text{IP}_3$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  (*Ca<sup>2+</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup> release*) sowie Phosphorylierung modifiziert (Clapham, 2007; Hofmann et al, 1994).

### **1.1.1 Elektrophysiologische Einteilung: HVA und LVA**

In elektrophysiologischen Arbeiten wurden die spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in HVA- (*high voltage activated*) und LVA- (*low voltage activated*) Kanäle eingeteilt (Hofmann et al, 1994). HVA-Kalziumkanäle werden bei hohen Spannungen aktiviert und können anhand spezifischer Antagonisten in L-, N-, P-, Q- und R-Kanäle weiter untergliedert werden (Ertel et al, 2000). LVA-Kanäle hingegen öffnen sich schon bei niedrigeren Membranpotentialen von

etwa -70 mV bis -60 mV. Zudem weisen sie eine geringere Leitfähigkeit und schnellere Inaktivierung auf. Die LVA-Kalziumkanäle sind unempfindlich gegenüber jeglichen Antagonisten und werden auch als T-Typ-Kanäle (*transient kinetics*) bezeichnet (Perez-Reyes, 2003). Eine Übersicht über die spannungsabhängigen Kalziumkanäle ist in Tabelle 1 dargestellt.

L-Typ-Kanäle (*long lasting*: lange Porenöffnungszeit) finden sich in Herz-, Skelett- und glatter Muskulatur, sowie in endokrinen Zellen, Neuronen, Fibroblasten, Nierenzellen und in der Retina (Hofmann et al, 1994; Shaltiel et al, 2012). Als HVA-Kanäle sind für ihre Aktivierung hohe Spannungen notwendig. Neben einer langen Porenöffnungszeit ist die langsame, spannungsabhängige Inaktivierung der Kanäle charakteristisch. L-Typ-Kanäle reagieren sensitiv auf Antagonisten wie Dihydropyridine (DHP), Phenylalkylamine (PAA) und Benzothiazepine (BTZ) (Hofmann et al, 1994). Die Aktivität wird außerdem durch cAMP-abhängige Phosphorylierungsschritte reguliert (Catterall, 2000). Eine wesentliche Bedeutung hat der Ca<sub>v</sub>1.2 Kalziumkanal im Herzmuskel als Vermittler der Erregungs-Kontraktions-Kopplung (Hofmann et al, 1994). In anderen Geweben trägt dieser zudem zur Erregungs-Sekretions- und Erregungs-Transkriptions-Kopplung bei (Hofmann et al, 2013).

Eine dritte Kategorie von Kalziumkanälen stellen die N-Typ-Kanäle (*non-L-Type* oder *neuronal*) dar. Mit ihren elektrophysiologischen Eigenschaften passen sie weder recht in die Gruppe der L-Typ- noch der T-Typ-Kanäle. Sie öffnen sich bei positiveren Potentialdifferenzen als T-Typ-Kanäle, agieren jedoch schneller als L-Typ-Kanäle. Ein wesentliches Unterscheidungskriterium ist die Insensitivität gegenüber den organischen Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Blockern (DHP, PAA, BTZ). Allein durch das Schneckengift  $\omega$ -Conotoxin GVIA kann die Aktivität gehemmt werden (Catterall, 2000).

Durch den Einsatz anderer Toxine wurden weitere Kanäle identifiziert. P-Typ-Kanäle (*purkinje neurons*) reagieren sehr sensitiv auf das Spinnengift  $\omega$ -Agatoxin IVA. In den Körnerzellen des Kleinhirns wurde ein weiterer Kalzium-Ionenstrom entdeckt. Im Vergleich zu P-Typ-Kanälen inaktiviert sich dieser schneller und wird durch das  $\omega$ -Agatoxin IVA mit geringerer Effektivität gehemmt. Der neue Kanal wurde als Q-Typ-Kanal bezeichnet. Heute ist jedoch klar, dass P- und Q-Typ-Kanäle lediglich Splicevarianten desselben Kanals sind oder mit unterschiedlichen  $\beta$ -Untereinheiten assoziiert sind. Daher erscheint die Bezeichnung als P/Q-Typ-Kanal sinnvoll. R-Typ-Kanäle (*residual*) hingegen sind wie auch T-Typ-Kanäle

resistent gegenüber allen bisher verwendeten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalantagonisten (Catterall, 2000; Ertel et al, 2000).

**Tabelle 1** Einteilung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Catterall, 2000; Ertel et al, 2000; Moosmang et al, 2005)

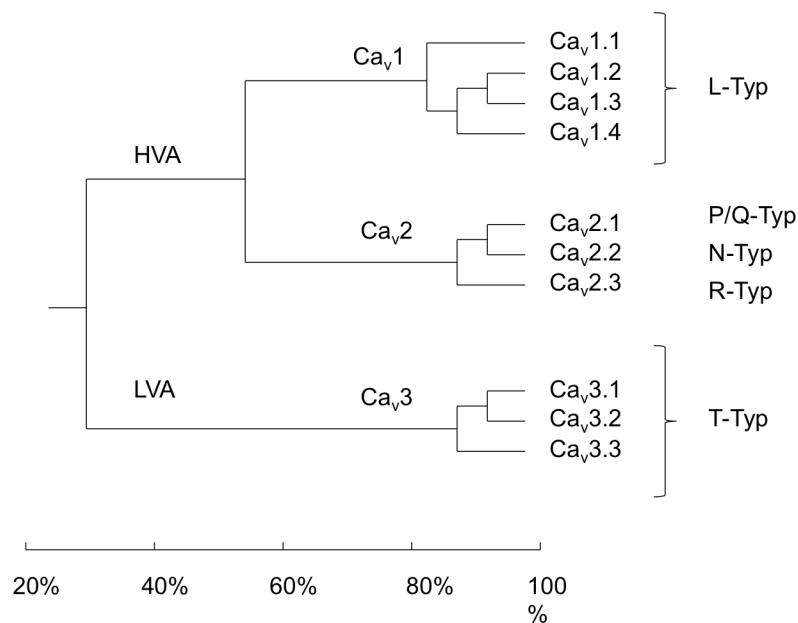
| Kalziumkanäle       |         | Lokalisation  | Antagonisten |                  |
|---------------------|---------|---|--------------|------------------|
| Ca <sub>v</sub> 1.1 | }       | L-Typ<br>Skelettmuskel, neonatale<br>Herzmuskelzellen<br>Herzmuskel, glatte Muskulatur,<br>Pankreas, Nebenniere, Neurone<br>Gehirn, Pankreas, Niere, Ovar,<br>Cochlea<br>Retina | }            | DHP, PAA,<br>BTZ |
| Ca <sub>v</sub> 1.2 |         |   |              |                  |
| Ca <sub>v</sub> 1.3 |         |   |              |                  |
| Ca <sub>v</sub> 1.4 |         |   |              |                  |
| Ca <sub>v</sub> 2.1 | P/Q-Typ | terminale Nervenendigungen,<br>Dendriten  | }            | ω-Agatoxin IVA   |
| Ca <sub>v</sub> 2.2 | N-Typ   | terminale Nervenendigungen,<br>Dendriten  |              | ω-CTx-GVIA       |
| Ca <sub>v</sub> 2.3 | R-Typ   | Zellkörper, terminale<br>Nervenendigungen, Dendriten  |              |                  |
| Ca <sub>v</sub> 3.1 | }       | T-Typ<br>Neurone, Herzmuskel,<br>Skelettmuskel<br>Neurone, Herzmuskel<br>Skelettmuskel  | }            | keine            |
| Ca <sub>v</sub> 3.2 |         |   |              |                  |
| Ca <sub>v</sub> 3.3 |         |   |              |                  |

### 1.1.2 Phylogenetische Gliederung – die Ca<sub>v</sub>-Familien

Neben der elektrophysiologischen Einteilung können die verschiedenen Subtypen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle anhand ihrer membranständigen  $\alpha_1$ -Untereinheit noch weiter unterteilt werden. Insgesamt existieren zehn verschiedene Gene für die  $\alpha_1$ -Untereinheiten, die in drei Familien (Ca<sub>v</sub>1, Ca<sub>v</sub>2, Ca<sub>v</sub>3) zu gruppieren sind. Die Mitglieder der Kanal-Familien ähneln sich in strukturellen und funktionellen Eigenschaften. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen, ergibt sich aus der Ähnlichkeit der Primärstruktur der einzelnen Kanäle eine phylogenetische Hierarchie (siehe Abb. 1). Innerhalb einer Familie sind die Aminosäuresequenzen zu 70%

identisch. Die Ähnlichkeit zwischen den  $Ca_v1$ -,  $Ca_v2$ - und  $Ca_v3$ -Kanälen beträgt jedoch weniger als 40% (Ertel et al, 2000).

Durch weitere Isotypen der anderen Kanaluntereinheiten wird eine noch größere Diversität der spannungsabhängigen Kalziumkanäle erreicht. Unterschieden werden vier Gene der  $\beta$ -Untereinheit, die durch alternatives Spleißen noch weiter variiert werden können. Ebenfalls existieren vier Gene für  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten. Für die  $\gamma$ -Untereinheiten sind bis heute 8 verschiedene Gene entdeckt. Jedoch konnten bisher nur zwei dieser Genprodukte eine Rolle als Kanaluntereinheit zugesprochen werden (Catterall, 2000; Hofmann et al, 2013).



**Abb. 1** Übersicht über die Familie der spannungsabhängigen Kalziumkanäle (modifiziert nach Ertel, 2000)

### 1.1.3 Struktur eines HVA L-Typ Kalziumkanals

Strukturell wurden Kalziumkanäle als heteromultimere Proteine charakterisiert, die aus vier bis fünf Untereinheiten bestehen. Die porenbildende  $\alpha_1$ -Untereinheit (117-240 kDa) sitzt membranständig und ist mit der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit (170 kDa) verknüpft. Darüber hinaus gehört zu dem Kanalkomplex eine intrazellulär gelegene  $\beta$ -Untereinheit (54 kDa) (Catterall, 2000; Hofmann et al, 2013). Die transmembranäre  $\gamma$ -Untereinheit (32 kDa) wurde als fünfte Untereinheit der  $Ca_v1.1$ -Kalziumkanäle isoliert. Die T-Typ-Kalziumkanäle stellen insofern



einen Ausnahme da, da sie nur aus der porenbildenden  $\alpha_1$ -Untereinheit zu bestehen scheinen (Hofmann et al, 2013).

Im Folgenden wird exemplarisch der biochemische Aufbau eines HVA-L-Typ-Kalziumkanals beschrieben.

### $\alpha_1$ -Untereinheit

Die Aminosäuresequenz der  $\alpha_1$ -Untereinheit ist in vier sich wiederholende Domänen (I-IV) unterteilt. Jede dieser Domänen besitzt sechs Segmente (S1-S6), die in die Zellmembran integriert sind (Catterall, 2000). Mit Ausnahme des amphiphilen S4-Segments sind die Segmente hydrophob. Die einzelnen Segmente sind über intra- bzw. extrazellulär gelegene Aminosäureketten miteinander verbunden. Einzig das extrazellulär gelegene Verbindungsstück zwischen den Segmenten S5 und S6 ist teilweise in die Membran integriert. Dieses Zwischenstück bildet zusammen mit den umgebenden Segmenten S5 und S6 die Pore (Hofmann et al, 1994). Die äußere Öffnung der Pore ist sehr eng und dient dank des hohen Gehalts an Glutamat als Selektivitätsfilter für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Der innere Abschluss der Pore wird durch das Segment S6 gebildet und ist gleichzeitig auch die Bindungsstelle für  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Antagonisten (Catterall, 2000). Über das Segment S6 der Domäne IV wird die hochspezifische Inhibition des Kalziumkanals durch DHP vermittelt. Eng benachbart findet sich auch die Erkennungssequenz für den Kanalantagonist PAA (Schuster et al, 1996). Das S4-Segment jeder Domäne dient als Spannungssensor, der sich durch einen hohen Anteil an den positiv geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin auszeichnet (Dolphin, 2006). Abhängig vom herrschenden elektrischen Feld dreht sich dieses Segment durch eine Konformationsänderung nach außen und gibt die Pore frei (Catterall, 2000).

### $\beta$ -Untereinheit

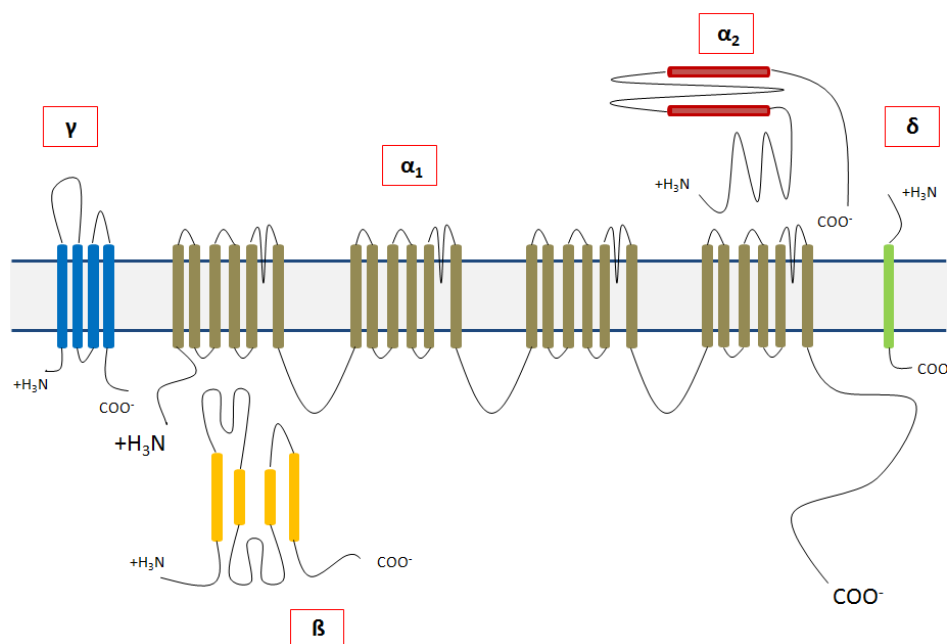
Die  $\beta$ -Untereinheit zeigt in ihrer Sekundärstruktur einen  $\alpha$ -helikalen Aufbau und findet sich an die  $\alpha_1$ -Untereinheit assoziiert im intrazellulären Kompartiment (Buraei & Yang, 2010; Hullin et al, 1992). Vier  $\text{Ca}_v\beta$ -Gene konnten bisher identifiziert werden, die im Menschen auf jeweils unterschiedlichen Chromosomen codiert sind und in verschiedenen Geweben exprimiert werden. Darüber hinaus existieren jeweils noch Splicevarianten der einzelnen

Untereinheiten (Dolphin, 2003; Hofmann et al, 2013). Im Skelettmuskel wird lediglich die  $\beta_{1a}$ -Untereinheit gebildet. Im Herzmuskel finden sich die Untereinheiten  $\beta_{1b}$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_3$  (Hofmann et al, 1994; Hofmann et al, 2013; Hullin et al, 1992). Um die Expression der  $\alpha$ -Untereinheit zu beeinflussen, muss innerhalb der  $\beta$ -Untereinheit eine 41-Aminosäure-lange Sequenz als  $\beta$ -*interaction domain* (BID) vorhanden sein. Diese bindet an eine 18-Aminosäure-lange  $\alpha_1$ -*interaction domain* (AID), die sich im intrazellulär gelegenen Linker zwischen den Domänen I und II der  $\alpha_1$ -Untereinheit des HVA-Kanals befindet (De Waard et al, 1994). Diese Interaktion ist durch eine große Affinität gekennzeichnet und ist entscheidend für das *Trafficking* der Kalziumkanäle. In Knock-out-Experimenten der  $\beta_1$ -Untereinheit, die im Skelettmuskel als  $\beta_{1a}$ - und im Herzen bzw. Gehirn als  $\beta_{1b}$ -Untereinheit exprimiert wird, zeigen alle Versuchstiere einen letalen Phänotyp (Dolphin, 2003). Die  $\beta_2$ -Untereinheit im Herzen agiert als eine membranassoziierte Guanylatkinase (Chernyavskaya et al, 2012). Die Rolle der  $\beta_2$ -Untereinheit in kardialen Myozyten ist jedoch abhängig vom Alter der Versuchstiere signifikant unterschiedlich. So versterben  $\beta_2$ -Knock-out-Tiere bereits *in utero* an struktureller und funktioneller Herzinsuffizienz. Die Unterdrückung der myokardialen  $\beta_2$ -Untereinheit in adulten Versuchstieren hingegen reduziert zwar den Kalziumstrom, bedingt jedoch keinen letalen Phänotyp (Meissner et al, 2011; Weissgerber et al, 2006). In gleicher Weise sind auch  $\beta_3$ -Knock-out-Tiere lebensfähig. In späteren Studien konnte gezeigt werden, dass in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas spannungsabhängige L-Typ-Kalziumkanäle mit der  $\beta_3$ -Untereinheit assoziiert sind. In Knock-out-Experimenten wurde nachgewiesen, dass eine physiologische Koexpression beider Kanaluntereinheiten lediglich die Bildung des *second messengers* Inositoltriphosphat, und damit die Insulinfreisetzung hemmend beeinflusst. Die Aktivität der Kalziumkanals bleibt unbeeinträchtigt (Berggren et al, 2004). Zu erwähnen ist, dass die  $\beta_3$ - und  $\beta_4$ -Untereinheiten unabhängig von ihrer Funktion als Kanaluntereinheit weitere Proteine in der Zelle sowie die Transkription beeinflussen können (Hofmann et al, 2013).

### $\alpha_2$ / $\delta$ - und $\gamma$ -Untereinheit

Nachdem gezeigt wurde, dass nicht nur im Skelettmuskel, sondern auch in Kombination mit L-Typ-Kanälen des Herzens und P/Q-Typ-Kanälen die  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit isoliert werden kann, geht man davon aus, dass alle HVA-Kanäle mit dieser Untereinheit assoziiert sind (Dolphin, 2006). Der Komplex aus  $\alpha_2$ - und  $\delta$ -Untereinheit ist im gleichen Gen kodiert (Catterall, 2000).

Das Vorläuferprotein wird posttranslational in die beiden Untereinheiten  $\alpha_2$  und  $\delta$  gespalten (Dolphin, 2009). Insgesamt wurden bisher vier Gene identifiziert (Klugbauer et al, 2003).  $\alpha_2/\delta$ -1 ist einerseits im Skelett- und Herzmuskel zu finden. Andererseits wird diese Untereinheit in den meisten Neuronen exprimiert.  $\alpha_2/\delta$ -2 und  $\alpha_2/\delta$ -3 wird sowohl im zentralen als auch peripheren Nervensystem gefunden. Die  $\alpha_2/\delta$ -4-Untereinheit hingegen ist hauptsächlich in endokrinen Gewebe und nur zu einem geringen Teil auch im Gehirn lokalisiert (Dolphin, 2013). Die 3' gelegene  $\delta$ -Untereinheit ist in der Membran verankert und über Disulfidbrücken mit der  $\alpha_2$ -Untereinheit verbunden. Die  $\alpha_2$ -Untereinheit liegt völlig im Extrazellularraum (Catterall, 2000). Wiederum transmembranär ist die  $\gamma$ -Untereinheit, die mit ihren vier Segmenten in der Zellmembran lokalisiert ist. Analysen ergaben, dass die  $\gamma$ -Untereinheit lediglich in L-Typ-Kanälen, die aus Skelettmuskel gewonnen wurden, koexprimiert war. Insgesamt sind acht Genorte für diese Untereinheit bekannt. Im Vergleich zur  $\beta$ -Koexpression zeigt die Koexpression der  $\alpha_2\delta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten einen sehr viel geringeren Effekt auf die Kanalaktivität. In N-, P-, Q-Typ-Kanälen sowie L-Typ-Kanälen in Neuronen wird der Komplex lediglich aus  $\alpha_1$ -,  $\beta$ - und  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten zusammengesetzt (Catterall, 2000; Catterall et al, 2007). Darüberhinaus ist die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit Angriffspunkt in der Schmerztherapie des neuropathischen Schmerzes. Auch der  $\gamma$ -Untereinheit wird eine Rolle unabhängig des Kalziumkanals zugesprochen als Regulatorprotein des AMPA-Rezeptors (Hofmann et al, 2013).



**Abb. 2** L-Typ-Kalziumkanal des Skelettmuskels  
(modifiziert nach Catterall, 2000)

#### 1.1.4 Besonderheiten des herzspezifischen HVA $\text{Ca}_v1.2$ L-Typ Kanals

Für den Anstieg der Kalziumkonzentration im Rahmen der elektromechanischen Kopplung ist hauptsächlich der  $\text{Ca}_v1.2$ -Kalziumkanal verantwortlich, der Gegenstand dieser Arbeit ist. Daher beschränkt sich die folgende Erläuterung zu herzspezifischen Eigenschaften auf L-Typ Kalzium-Kanäle.

Im Herzen sind L-Typ Kalziumkanäle aus den Untereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\beta$  und  $\alpha_2/\delta$  zusammengesetzt. In potentiell gefährlichen Situationen werden Stresskaskaden im Körper ausgelöst, die auch eine Auswirkung auf die Kontraktilität des Herzens haben. In der *fight or flight*-Reaktion wird aus sympathischen Nervenendigungen und aus dem Nebennierenmark Noradrenalin bzw. Adrenalin freigesetzt, die an  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren im Herzen binden. Diese Rezeptoren aktivieren intrazellulär über ein rezeptorgekoppeltes G-Protein den cAMP/PKA-Signalweg aus, der in einem 3- bis 7-fachen Anstieg des Kalziumeinstromes und damit zu einer Steigerung der Inotropie führt (Emrick et al, 2010; Robison et al, 1968; Schultz et al, 1994). Hierfür ist entscheidend, dass die Proteinkinase A (PKA) nahe bei dem entsprechenden L-Typ-Kalziumkanal lokalisiert und durch PKA-Ankerproteine (AKAPs) in der Membran befestigt ist (Altier et al, 2002).

Eine Besonderheit des ventrikulären, myokardialen Aktionspotentials ist die Plateauphase, die durch ein temporäres Gleichgewicht zwischen dem Einstrom der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und dem Ausstrom von  $\text{K}^+$ -Ionen entsteht. Die Inaktivierung der HVA-Kalziumkanäle wird durch Spannung und überwiegend durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen selbst vermittelt. Die Inaktivierung der Kalziumkanäle dient auch als Schutz der Zelle vor Überladung mit Kalziumionen, die Arrhythmien und den programmierten Zelltod auslösen können.  $\text{Ca}^{2+}$  vermittelt über Calmodulin außerdem eine Fazilitierung des Kalzium-Einwärtsstroms im Herzmuskel. Fazilitierung ist ein Beispiel eines positiven Feedback-Mechanismus, der eine längere und häufigere Porenöffnung möglich macht (Bers, 2008; Blaich et al, 2010).

Die Expression der  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanäle wird durch  $\beta$ -adrenerge Hormone reguliert (Fan et al, 2000; Maki et al, 1996). Auffällig sind geschlechterspezifische Unterschiede in der Funktionalität des Herzens. Ein möglicher Hintergrund wurde in Studien über den positiven Einfluss von Testosteron auf die Expression des myokardialen L-Typ-Kalziumkanals aufgezeigt (Golden et

al, 2004). Darüber hinaus ist auch der Kalziumeinstrom selbst in der Lage autoregulatorisch die Anzahl der Kalziumkanäle zu steigern (Davidoff et al, 1997). Bereits in der Embryogenese spielt der  $Ca_v1.2$ -Kanal eine wesentliche Rolle für die korrekte Entwicklung des Herzens. In  $Ca_v1.2$ -Knock-out-Experimenten versterben die Mäuse bereits vor dem Tag 14.5 p.c. (post coitum). Zuvor am Tag 11 p.c. jedoch konnten nicht nur in Wildtypmäusen sondern auch in heterozygot als auch homozygot  $Ca_v1.2$ -defizienten Mäusen identische Herzfrequenzen nachgewiesen werden. Da diese Ergebniss auch unter Unterdrückung der  $Ca_v1.3$ -Expression reproduzierbar war und die Kinetik des Kalziumstromes nicht einem  $Ca_v1.1$ -Kanal zuschreibbar war, wurde ein L-Typ-ähnlicher Kanal verantwortlich gemacht (Seisenberger et al, 2000). In späteren Publikationen wird eine funktionell relevante  $Ca_v1.2$ -Expression ab dem Tag 14 p.c. postuliert. Bis zu diesem Zeitpunkt erfolgt kompensatorisch zusätzlich die Expression von  $Ca_v1.1$  und  $Ca_v1.3$  (Klugbauer et al, 2002; Xu et al, 2003). Blockt man den Kalziumstrom in embryonalen Herzen resultieren schwebende Fehlbildungen wie ein stark dilatierter linker Ventrikel (Moosmang et al, 2005). Desweiteren konnte in Zebrafischversuchen gezeigt werden, dass die im Herzen überwiegend gebildete  $\beta_2$ -Untereinheit entscheidend die zelluläre Proliferationsrate sowie den Zusammenhalt der Myozyten bedingt. Eine Unterdrückung dieser Untereinheit führt zum Tod der Versuchstiere durch Herzversagen (Chernyavskaya et al, 2012). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Mutation der Aminosäure Isoleucin zu Glutamin an der ersten Position des regulatorischen IQ-Motifs des  $Ca^{2+}$ -Kanals in adulten Mäusen eine dilatative Kardiomyopathie zur Folge hat und letal endet (Blaich et al, 2012a).

## **1.2 Muskelkontraktion im Herzen**

Der Herzmuskel gehört zusammen mit der Skelettmuskulatur zur quergestreiften Muskulatur. Im Gegensatz zur Skelettmuskulatur jedoch verlaufen die Muskeluntereinheiten nicht exakt parallel. Dadurch passt sich der Herzmuskel an die Anforderungen an, als kleiner, kurzer Muskel eine sehr große Druck- und Volumenarbeit leisten zu können. Des Weiteren unterscheidet sich die Initiation der Kontraktion in einigen Punkten von der des Skelettmuskels. Im folgenden Kapitel wird der Aufbau einer Herzmuskelzelle und ihre Erregung bis hin zur Kontraktion beschrieben.

### 1.2.1 Erregungsbildungs- und -leitungssystem

Für eine optimale Pumpfunktion des Herzens ist eine koordinierte Kontraktion des Hohlorgans von entscheidender Bedeutung. Eine nahezu synchrone Erregung der einzelnen Ventrikelzellen wird durch ein komplexes Erregungsbildungs- und -leitungssystem gewährleistet. Als Taktgeber im Herzen fungiert der im rechten Vorhof gelegene Sinusknoten. Mit einer Ruhfrequenz von etwa 70 Schlägen/min depolarisieren die Zellen und leiten die Erregung auf die Vorhöfe und den Atrioventrikular-Knoten (AV-Knoten) über. Dieser verzögert kurz die Erregungsweiterleitung. Dadurch ist die Vorhof- und Ventrikelkontraktion zeitlich versetzt. Dies ermöglicht, dass die Vorhofkontraktion in der letzten Phase der Diastole die Füllung des Ventrikels unterstützt bevor dieser durch die weitergeleiteten Signale ebenfalls kontrahiert und das Blut in den Kreislauf auswirft (Systole). Über den AV-Knoten wird die Erregung an das His-Bündel auf die Tawara-Schenkel übertragen und gelangt über eine Vielzahl von Purkinje-Fasern an die Effektoren: die Herzmuskelzellen. Die einzelnen Herzmuskelzellen selbst sind über *Gap Junctions* elektrisch miteinander gekoppelt und können ein Aktionspotential direkt an die Nachbarzelle weiterleiten. Somit agiert der Herzmuskel als ein funktionelles Synzytium (Bers, 2008).

### 1.2.2 Aufbau der Muskelfasern

Die funktionelle Einheit des Muskels ist das Sarkomer (Länge: 2-2.5  $\mu\text{m}$ ). Hauptbestandteile des Sarkomers sind die Myofilamente Myosin, Aktin und Titin, die in einer speziellen, symmetrischen Anordnung vorliegen. Im Querschnitt wird ein dickes Myosinfilament von sechs dünnen, aktin-haltigen Filamenten umgeben. Titin dient als elastisches Element in diesem Gefüge und hält die Myofilamente zusammen. Während der Muskelkontraktion gleiten die Filamente aneinander vorbei und verkürzen hierdurch die Sarkomerlänge (Huxley, 2000). Durch die Serie an Sarkomeren, die hintereinander aufgereiht sind, addieren sich die minimalen Verkürzungseffekte zu einer sichtbaren Kontraktion des Muskels. Die Energie für die Muskelarbeit wird durch die Hydrolyse von ATP durch das katalytische Zentrum des Enzyms Myosin bereitgestellt (Holmes, 1997).

### 1.2.3 Querbrückenzyklus

Die Energie für die Muskelarbeit wird in Form von ATP (Adenosintriphosphat) bereitgestellt. Das dicke Filament Myosin besitzt in der Kopfreion ein Enzym, welches ATP-Moleküle im Kontraktionsprozess in ADP (Adenosindiphosphat) und freie Phosphat-Ionen hydrolysiert. Der Hebelarm des Myosins wird hierbei vom Aktinfilament gelöst, um 30-35° neu ausgerichtet und lagert sich erneut an (Holmes, 1997). Erst durch die Bindung eines weiteren ATP kann der Myosinkopf wieder gelöst werden und ein weiterer Querbrückenzyklus stattfinden. Pro Zyklus gleiten die Filamente um 5-10 nm gegengleich aneinander vorbei. Da bei ausreichenden ATP-Konzentrationen nicht kontinuierlich der Kontraktionsprozess ablaufen darf, gibt es einen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Regulationsmechanismus, der die Bindung des Myosinkopfes an das Aktinfilament verhindert. Ein Komplex aus Troponin T, Troponin I, Troponin C und Tropomyosin bedeckt die Bindungsstelle bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ( $10^{-7}$  mol/l). Steigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf etwa  $10^{-6}$ - $10^{-5}$  mol/l an, bindet  $\text{Ca}^{2+}$  an Troponin C. Hierdurch wird eine Konformationsänderung ausgelöst, welche die Interaktionsstelle zwischen Aktin und Myosin freigibt. Der Querbrückenzyklus kann nun beginnen. Bei sinkender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist dieser Vorgang reversibel.

### 1.2.4 Die elektromechanische Kopplung

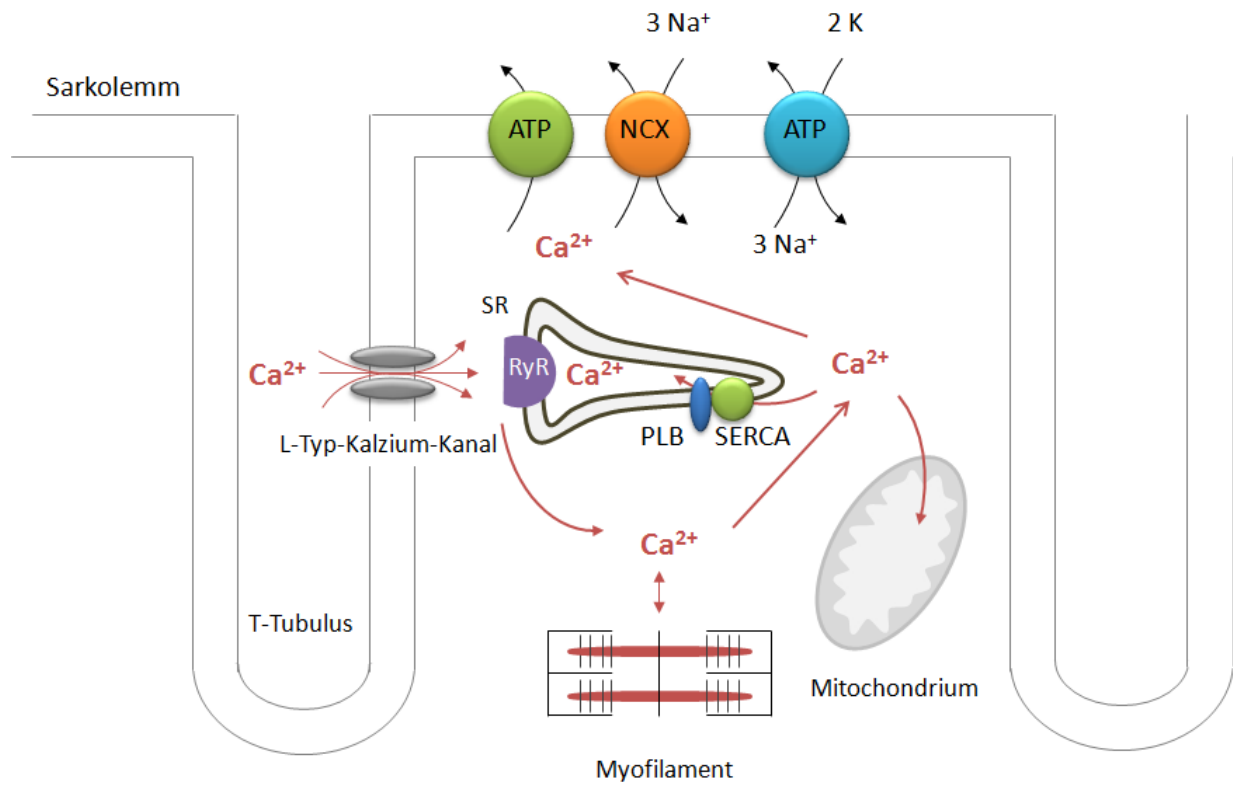
Als elektromechanische Kopplung wird die Abfolge von Erregung der Muskelzelle über die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  im Zellinneren bis hin zur Kontraktion des Muskels bezeichnet (siehe Abb. 3). Das notwendige Kalzium stammt aus intrazellulären Speichern und dem Extrazellularraum. Erreicht ein Aktionspotential die Herzmuskelzelle, werden spannungsabhängige L-Typ-Kalziumkanäle in der Membran geöffnet. Die L-Typ-Kanäle sind in den T-Tubuli des Sarkolemms lokalisiert und somit in unmittelbarer Nähe zu den Ryanodinrezeptoren (RyR) in der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) (Sipido et al, 1995). An diesen „Kreuzungen“ (*junctions*) befinden sich 10-25 L-Typ Kalziumkanäle gegenüber von 100-200 Ryanodinrezeptoren. Etwa 20 000 solcher  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalübertragungskomplexe gibt es pro Zelle, die alle simultan durch ein Aktionspotential

aktiviert werden (Bers, 2002; Bers, 2008). Sind die L-Typ-Kalziumkanäle offen, strömen, dem Konzentrations- und Spannungsgefälle folgend,  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen von außen in die Zelle ein. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden im Zellinneren an Ryanodinrezeptoren vom Typ 2 (RyR2), die in die SR-Membran integriert sind, und aktivieren diese.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die im SR gespeichert sind, gelangen nun in das Zytoplasma und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration steigt auf  $10^{-6}$ - $10^{-5}$  mol/l (*Ca<sup>2+</sup> induced Ca<sup>2+</sup> release*). Der überwiegende Teil des freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$  stammt aus dem SR. Die genauen Anteile variieren zwischen 70-90%, abhängig von der Spezies (Bers, 2008; Flucher & Franzini-Armstrong, 1996). Calmodulin wird durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert und inaktiviert den L-Typ-Kanal über Bindung an den C-Terminus (Zuhlke et al, 1999). Für die Relaxierung des Muskels wird die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration über vier Mechanismen wiederum auf den Ausgangswert gesenkt. Kontinuierlich transportiert der ATP-abhängige Ionentransporter SERCA (Sarkoendoplasmatische Retikulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase) das Kalzium wieder in das SR. Über einen Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) gelangen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Austausch gegen  $\text{Na}^+$ -Ionen im stöchiometrischen Verhältnis 1:3 wieder in den extrazellulären Raum. Die dritte Methode stellt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einwärtstransporter der Mitochondrien dar. Zusätzlich pumpt eine  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase im Sarkolemm der Zelle weitere Ionen wieder aus der Zelle. Sobald wieder die Ausgangskonzentration erreicht wird, erschlafft der Muskel. Die Anteile der vier Wege variieren zwischen den verschiedenen Organismen (Bers, 2002).

Sowohl über Amplitude und Dauer des Kalziumeinstroms als auch über die Sensitivität der Myofibrillen gegenüber Kalzium wird die Muskelkontraktilität reguliert. Je nach Überlappungsgrad ist die Zusammenarbeit von Myosin- und Aktinfilamenten unterschiedlich effektiv. Bei einer Sarkomerlänge von 2,2  $\mu\text{m}$  gilt die Interaktion als optimal und die größte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität ist gegeben (Gordon et al, 1966). Diese Eigenschaft ist im Frank-Starling-Mechanismus beschrieben. In jeder Diastole füllt sich der Ventrikel mit Blut. Hierdurch wird die Wand, also die Myofibrillen, gedehnt und möglichst optimal ausgerichtet. Unter azidoten Bedingungen, erhöhter Phosphat- oder Magnesiumkonzentration in der Zelle, sinkt hingegen die Empfindlichkeit gegenüber Kalzium (Bers, 2002). Ein weiterer Regulationsmechanismus ergibt sich durch den endogenen Inhibitor der SERCA2: Phospholamban (PLB). Unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation wird Phospholamban phosphoryliert und somit die hemmende Wirkung auf die SERCA2 aufgehoben. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität der SERCA2 ist hierdurch gesteigert und ermöglicht einen schnellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in das Sarkoplasmatische Retikulum. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -



Konzentration im Sarkoplasma sinkt, und eine Entspannung des Muskels ist möglich (Brittsan & Kranias, 2000; Tada & Katz, 1982).



**Abb. 3** Elektromechanische Kopplung einer Herzmuskelzelle

RyR (Ryanodinrezeptor), PLB (Phospholamban), NCX (Natrium-Kalzium-Austauscher, SR (Sarkoplasmatisches Retikulum) (modifiziert nach Bers, 2002)

### **1.3 Methoden der *in vivo* Zelldetektion**

Um die Funktion und Lokalisation von Proteinen zu studieren, ist es wichtig, diese im Gewebe sichtbar machen zu können. Im Laufe der Jahre wurden viele verschiedene Techniken entwickelt, um Zielproteine sowohl *in vitro* als auch *in vivo* verfolgen zu können. Eine Fusion des Zielproteins mit einem weiteren Protein (*tag*), welches die Charakterisierung erleichtert, wurde erstmals von J. Beckwith 1980 beschrieben (Shuman et al, 1980). Mittlerweile gehört eine Vielzahl von *tags* zur täglichen Routine der Zellbiologie. Des Weiteren haben die Fluoreszenzmikroskopie und die Entdeckung autofluoreszierender Proteine die Erforschung der Proteinfunktion revolutioniert. Erstmals war es möglich „live“ Konformationsänderungen, Protein-Protein-Interaktionen, dynamische Prozesse und die Proteinlokalisierung innerhalb der Zelle zu beobachten. Jedoch gibt es zwei entscheidende Nachteile der autofluoreszierenden Proteine. Jedes Fluorochrom hat spezifische Eigenschaften wie Photostabilität, optimale Exzitations- und Emissionswellenlänge. Diese Eigenschaften treffen jedoch nicht unbedingt die notwendigen Versuchsbedingungen. Das zweite Problem besteht in der Größe der Proteine. Mit einer molekularen Masse >25 kDa ist es fraglich, ob nach Fusion des Fluorochroms mit dem Zielprotein die Funktion des Zielproteins nicht beeinträchtigt wird (Keppler et al, 2004b). Eine Variante ist, das Zielprotein mit einem zusätzlichen Protein (*tag*) zu fusionieren, welches als Marker dient und wiederum über Antikörper detektiert werden kann (Gronemeyer et al, 2006). Wesentliche Eigenschaften eines *tag* sind die minimale Interaktion mit der Tertiärstruktur des Zielproteins, ein breites Anwendungsgebiet und eine einfache Integration in den DNS-Vektor (Terpe, 2003). Derzeit steht eine neue Technik zur Verfügung, die ein kleineres Fusionsprotein, den SNAP-tag, verwendet (Keppler et al, 2004b). Die SNAP-tag-Technologie wurde bisher erfolgreich in Zellkulturarbeiten eingesetzt, in denen Kernstrukturen, Membranen und Mikrotubuli markiert wurden. Außerdem konnten Zusammenschlüsse von G-Protein gekoppelten Rezeptoren visualisiert und  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in Zellen gemessen werden. Zudem erwies sich die Methode als geeignet, um in Zebrafisch-Embryonen zelluläre Proteine direkt darzustellen (Campos et al, 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Zielprotein, der  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanal, mit zwei unterschiedlichen Detektionsmarkern versehen: dem HA-Tag und dem SNAP-tag. Der so markierte Kanal kann

über die homologe Rekombination in das murine Genom eingeschleust werden und steht für die unterschiedlichen Detektionsmöglichkeiten *in vivo* zur Verfügung.

### 1.3.1 HA-tag

Der HA-tag ist für die *in vitro*- und *in vivo*-Detektion von membranständigen Proteinen ein geeignetes Werkzeug und hat sich für diese Anwendung vielfältig bewährt. In verschiedenen Arbeiten wurde der HA-tag bereits zur Untersuchung des *Trafficking*-Verhaltens von Kanälen eingesetzt. C. Altier et al. sowie Di Biase et al. zeigten, dass die Integrations des HA-Proteins bezüglich der Expression der Kanäle unproblematisch ist und die Zielstrukturen gut zu detektieren sind (Altier et al, 2002; Di Biase et al, 2011).

Der HA-tag stammt von dem Hämagglutinin (HA) des humanen Influenzavirus ab. Dieses ist ein Oberflächen-Glykoprotein und essentiell für die Infektiosität des Virus. Für den Einsatz als Epitop-tag werden lediglich neun Aminosäuren verwendet und in die Sequenz des Expressionsvektors eingebaut. Für die Detektion steht eine Vielzahl von kommerziell erhältlichen Antikörpern zur Verfügung. Dieser *tag* vereinfacht die Detektion, Isolation und Aufreinigung von Proteinen. Um die Expression des Ca<sub>v</sub>1.2-Kanals auf der Zelloberfläche zu erforschen, wurde der HA-tag in einem Forschungsprojekt von C. Altier et al. an der extrazellulär gelegenen S5-Schleife der Domäne II exprimiert. Die zusätzlichen 27 Nukleotide beeinträchtigten die Funktion des Kanals nicht (Altier et al, 2002). An gleicher Position wurde der HA-Tag im Rahmen dieser Arbeit in das Exon 14 des Ca<sub>v</sub>1.2 –Kanals integriert und somit an der Verbindungsschleife zwischen den Segmenten S5 und S6 der Domäne II eingebaut. An dieser Position ist der HA-Tag extrazellulär lokalisiert.

### 1.3.2 Fluoreszenzgekoppelte Enzymreaktion der SNAP-tag-Technologie

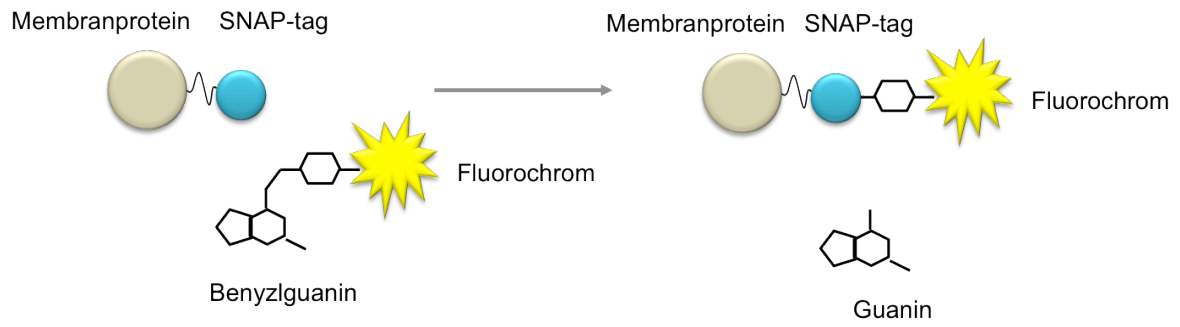
Das SNAP-Protein ist ein Derivat der O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNS-Alkyltransferase (AGT). Dieses Enzym findet sich ubiquitär in allen Säugerzellen und gehört funktionell zu den DNS-Reparatur-Enzymen. In seiner physiologischen Funktion erkennt das Enzym alkylierte

Guanin-Basen in der DNS. Es interagiert mit seinen Substraten in einer stabilen und kovalenten Bindung. In einer irreversiblen Reaktion wird die Alkylgruppe auf einen reaktiven Cysteinrest des AGT übertragen, wodurch sich eine reparierte DNS und eine alkylierte AGT ergeben. Nicht nur reine O<sup>6</sup>-Alkylguanine, sondern auch Derivate mit Benzylringen werden von der AGT als Substrate erkannt (Keppler et al, 2003). Eingesetzt werden Abkömmlinge des Benzylguanins oder des Benzylchloropyrimidins, die über eine Aminogruppe mit einem Fluoreszenzfarbstoff verbunden sind. Reagiert die AGT mit dem Substrat wird das Guanin beziehungsweise das Chloropyrimidin freigesetzt und das angehängte Fluorochrom über die Benzylgruppe an den SNAP-tag kovalent gebunden. Hierdurch wird das Zielprotein für die Detektion in der Fluoreszenzmikroskopie markiert. Eine Besonderheit der Substrate ist ihre Zellwandpermeabilität. Dadurch ist keine Beschränkung der SNAP-tag-Detektion durch die Zellkompartimente gegeben, sondern auch intrazelluläre Proteine können aufgespürt werden. Neben der Lokalisierung des Zielproteins können auch dessen Reaktion auf pharmakologische Änderungen in der Zelle verfolgt werden. Diese Technik ist sowohl für *in vivo*- als auch *in vitro*-Versuche geeignet (Campos et al, 2011; Keppler et al, 2004a).

Ausgehend von der humanen AGT (hAGT) wurden einige Aminosäuremutationen des 20 kDa große SNAP-Protein verändert. Daraus resultierte eine 20-fach höhere Aktivität gegenüber dem Substrat Benzylguanin (BG). Unter physiologischen Umständen wird die O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNS-Alkyltransferase nach Übertragung des Alkylrests auf ihren Cysteinrest degradiert. In Experimenten konnte gezeigt werden, dass das AGT-Fluorochrom-Fusionsprotein trotz Abnahme des Signals noch über etliche Stunden in lebenden Zellen detektiert werden kann. Das mutierte AGT-Enzym kann ebenso in Zellen angewendet werden, die eine endogene AGT exprimieren. Da die 20-fach höhere Aktivität des modifizierten Enzyms überwiegt, wird hauptsächlich das Zielprotein dargestellt (Keppler et al, 2004b). Zudem wurde ein Inhibitor der endogenen hAGT entwickelt, die die veränderte hAGT nicht beeinflusst (Juillerat et al, 2005).

Integriert am 5'-terminalen Ende der Ca<sub>v</sub>1.2-Kanalsequenz wird das Protein N-terminal im intrazellulären Kompartiment exprimiert. Die Auswertung des Labelings wird an konfokalen Lasermikroskopen vorgenommen. Dank einer großen Bandbreite an unterschiedlich fluoreszierenden Substraten kann bei fast jeder erwünschten Wellenlänge detektiert werden

(Campos et al, 2011). Die Gensequenz des Enzyms wird im pSNAP (m) Vektor (NEB) bereitgestellt und von NEB kommerziell vertrieben.



**Abb. 4** SNAP-tag-Technologie

#### **1.4 GenTargeting über den Rosa26-Locus**

Die Maus ist seit langem ein wertvoller Modellorganismus der Grundlagenforschung. Gezielt können endogene Gene verändert und die resultierenden Auswirkungen auf den Phänotyp studiert werden. In transgenen Mäusen wird ein modifiziertes Gen in den Organismus eingebracht und überexprimiert. Da die Injektion von DNS in den Pronukleus einer befruchteten Eizelle mit einigen Nachteilen verbunden ist, gibt es alternativ die Möglichkeit, gezielt embryonale Stammzellen (ES-Zellen) durch homologe Rekombination genetisch zu verändern. Die Expressionskassette wird hierbei sowohl 5' als auch 3' mit einer Sequenz versehen, die homolog zur endogenen Zielsequenz im Mausgenom ist. Der entsprechend konstruierte Gentargeting-Vektor wird durch Elektroporation in die ES-Zellen einschleust. Nach Positivselektion der ES-Zellen, die den Targetingvektor aufgenommen haben, werden diese schließlich in Blastozysten injiziert und somit chimäre, gemischtzellige Mäuse generiert. Ein großer Vorteil dieser Technik ist ihre Einfachheit und Effektivität. Das eingeschleuste Protein wird, unabhängig von dem Abschalten spezifischer Gene, in großen Mengen überall synthetisiert (Irion et al, 2007). Dieses gezielte Integrieren einer DNS-Sequenz mittels homologer Rekombination wird als *Gene-Targeting* bezeichnet. *Gene-Trapping* hingegen beruht auf einer zufälligen Insertion der DNS in das Zielgenom.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete CTV-Vektor (Addgene), auch bekannt unter den Namen CAG-Stop-EGFP-ROSA TV oder CAG-SERTV-7, wird für die Überexpression von cDNS im transgenen Mausmodell verwendet (Xiao et al, 2007). Dieses Plasmid ist eine Weiterentwicklung des ROSA26-1 Plasmids, das von Dr. Philippe Soriano im Fred Hutchinson Cancer Research Center erstmals für ein Gen-Targeting eingesetzt wurde (Friedrich & Soriano, 1991). ROSA steht hierbei für den Aufbau des retroviralen *Genetrap*, über den der Locus auf dem Chromosom 6 im murinen Genom identifiziert wurde: *reverse orientation splice acceptor  $\beta$ -gal*. Es stellte sich rasch heraus, dass eine homologe Rekombination in den ROSA26-Locus mit hoher Frequenz möglich ist und die Genprodukte in allen bisher untersuchten Geweben exprimiert werden. Die Entdeckung des ROSA26-Locus ermöglicht zwei Methoden, transgene Mäuse herzustellen: Zum einen kann der ROSA26-Promoter für

die Expression der DNS verwendet werden. Je nach Gewebe und erwünschtem Effekt kann jedoch eine zu geringe Transkriptionsrate resultieren. Zum anderen besteht die Möglichkeit einen starken, exogenen Promoter wie beispielsweise den CAG-Promoter im CTV-Vektor *upstream* der Zielsequenz zu integrieren. Mehr als 130 Knock-In-Mäuse wurden bislang auf diese Weise erfolgreich gezüchtet. Wichtig ist hierbei die Integration der Nukleotidsequenz in das erste Intron des Locus im Bereich einer XbaI-Restriktionsschnittstelle. Die eigentliche Funktion des ROSA26-Gens ist bislang nicht bekannt (Casola, 2010). Dank der geflochtenen Neo-Stop-Kassette im CTV-Vektor kann mit Hilfe von gewebe- bzw. entwicklungspezifischen transgenen Cre-Mäusen die Transkription des Zielprodukts gezielt initiiert werden. Erst durch Expression einer Cre-Rekombinase wird die Neo-Stop-Kassette entfernt und die Synthese des Zielproduktes beginnt. In der MLC2A-Mauslinie wird dieses Enzym unter Kontrolle des Promoters der Myosin-Leichtkette im Herzmuskel exprimiert. So kann eine gewebespezifische Synthese des eigenen Zielproteins gewährleistet werden (Wegener et al, 2002).

## 2 Fragestellung und Zielsetzung

Einige  $Ca_v1.x$ -assoziierten Erkrankungen und physiologischen Fehlfunktionen konnten bereits detektiert und auf Grundlage von biochemischen, elektrophysiologischen und pharmakologischen Versuchen beschrieben werden (Stockner & Koschak, 2012). Als Standardmodell zur Untersuchung der Physiologie und der Pathophysiologie wird die Maus (*mus musculus*) in den Biowissenschaften verwendet.

Ziel dieser Arbeit war es, einen detektierbaren  $Ca_v1.2$ -L-Typ-Kalziumkanal zu konstruieren, der Studien nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* ermöglicht. Obwohl zahlreiche Forschungsarbeiten zu diesem Kanal publiziert wurden, beruhen die Ergebnisse weitgehend auf Untersuchungen in der Zellkultur oder auf Analysen von einzelnen Geweben. Für ein tiefergehendes Verständnis der Bedeutung und der Funktion des  $Ca_v1.2$ -Kanals im Rahmen der Entwicklung und im Zusammenhang des ganzen Organismus ist ein *in vivo*-Modell essentiell, mit welchem zeitgenau Veränderungen überwacht und externe Einflüsse nachverfolgt werden können. Ein besonderes Augenmerk im Rahmen dieser Arbeit lag dabei auf der Analyse des *Trafficking*-Verhaltens des  $Ca_v1.2$ -Kanals. Hierfür sollte der L-Typ-Kalziumkanal molekularbiologisch um zwei unterschiedliche Detektionsmarker erweitert werden und mit Hilfe des CTV-Vektors in das murine Genom integriert werden. In Kombination mit einer Mauslinie, die im Herzmuskel die Cre-Rekombinase exprimiert, würde die Expression des konstruierten Kalziumkanals induziert. Eine Motivation der intensiven Forschung am  $Ca_v1.2$ -Kanal ist unter anderem seine Rolle als Ursprungspunkt verschiedener Krankheiten wie beispielsweise dem Timothy-Syndrom. Dieses zeigt auf, dass der  $Ca_v1.2$ -Kanal nicht nur im Herzen, sondern auch in der Gehirnentwicklung und im Rahmen von autistischen Krankheitsbildern eine bedeutende Rolle spielt.

Um die genaue Lokalisation des Kanals *in vivo* darstellen zu können, sollte N-terminal, und damit intrazellulär gelegen, der SNAP-tag eingefügt werden. Die Sequenz des HA-tag sollte so in die Nukleotidsequenz integriert werden, dass das HA-Protein zwischen den Segmenten S5 und S6 der Domäne II des  $Ca_v1.2$ -Kanals exprimiert wird und extrazellulär liegt.

In HEK293T-Zellversuchen sollte überprüft werden, ob und inwiefern die Veränderung der Kanalsequenz mit dem HA- und dem SNAP-Protein die Expression in der Zellmembran



beeinflusst. Hierfür sollte ein Kanal konstruiert werden, der einerseits nur um den HA-tag erweitert wird und ein Kanal, der beide Detektionsmarker enthält.

Für die Stammzellkultur des SNAP-HA-Ca<sub>v</sub>1.2-Kanals wurde ein Gentergeting-Konstrukt auf Basis des CTV-Vektors generiert, das mittels homologer Rekombination die modifizierte Kanal-DNS in das murine Genom integrieren soll. Für die Überprüfung der Richtigkeit der homologen Rekombination in embryonale Stammzellen der *mus musculus* sollte eine PCR-Screeningmethode etabliert werden.

### 3 Material

#### 3.1 Chemikalien

| Chemikalien                                | Firma           |
|--|-----------------|
| Agarose LE                                 | Biozym          |
| Ampicillin                                 | Sigma-Aldrich   |
| Ammoniumacetat                             | Roth, Karlsruhe |
| BCA Protein Assay, Pierce                  | Thermo Fisher   |
| Bromophenolblau                            | Roth            |
| BSA  | Roth            |
| Calpain Inhibitor I                        | Roche           |
| Calpain Inhibitor II                       | Roche           |
| Fluorescent Mounting Medium                | Dako            |
| DMEM                                       | Invitrogen      |
| DMSO                                       | Roth            |
| ECL  | Perkin Elmer    |
| EDTA                                       | Roth            |
| Ethanol                                    | Roth            |
| Ethidiumbromid                             | Sigma-Aldrich   |
| FBS  | Invitrogen      |
| Geneticin (G418)                           | Invitrogen      |
| Isopropanol                                | Roth            |
| kb-Leiter                                  | Roche           |
| Lipofectamin 2000                          | Invitrogen      |
| Lysozym                                    | Roche           |
| Methanol                                   | Roche           |
| $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME)    | Roth            |
| Metafectene Pro                            | Biontex         |
| Natriumchlorid                             | Roth            |
| Natriumacetat                              | Roth            |
| Quantum286                                 | PAA             |
| OptiMEM reduced Serum Medium with GlutaMAX | Invitrogen      |
| OptiMEM reduced Serum Medium               | Invitrogen      |
| Penicillin/Strepomycin 100x                | Invitrogen      |
| Phenol-Chloroform                          | Roth            |
| PMSF                                       | Fluka           |
| Polyacrylamid (PAGE)                       | Roth            |
| TritonX-100                                | Sigma-Aldrich   |
| Trypsin/EDTA 10x                           | Invitrogen      |
| Tween 20                                   | Roth            |

### 3.2 Enzyme

#### Restriktionsenzyme

| Name    | Restriktionssequenz (5'→3') | Firma                     |
|---------|-----------------------------|---------------------------|
| Ascl    | GG/CGCGCC                   | New England Biolabs (NEB) |
| BamHI   | GGA/TCC                     | NEB                       |
| BspHI   | TCA/TGA                     | NEB                       |
| BstII   | G/GTNACC                    | NEB                       |
| Clal    | AT/CGAT                     | NEB                       |
| MluI    | A/CGCGT                     | NEB                       |
| NheI-HF | G/CTAGC                     | NEB                       |
| SacI-HF | GAGCT/C                     | NEB                       |
| SacII   | CCGC/GG                     | NEB                       |
| Sall-HF | G/TCGAC                     | NEB                       |
| SgfI    | GCGAT/CGC                   | Promega                   |
| SpeI    | A/CTAGT                     | NEB                       |
| PvuI-HF | CGA/TCG                     | NEB                       |

#### weitere Enzyme

| Name                                      | Firma   | Verwendung                  |
|---|---------|-----------------------------|
| CIP ( <i>cal</i> f intestine phosphatase) | NEB     | Dephosphorylierung von cDNS |
| Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase     | NEB     | PCR                         |
| Pfu Ultra                                 | Agilent | QuikChange II Mutagenese    |
| T4 Ligase                                 | NEB     | Ligation von DNS            |

### 3.3 Oligonukleotide

#### PCR-Primer

| Primer                         | Sequenz (5'→3')   | Verwendung   |
|--------------------------------|---|--|
| SB_pcDNA3_Bam_fw               | GCGATCGGATCCCCAGATATACGCGTTGACAT<br>TG                                      | pcDNA3-SNAP-<br>LK1-HA-<br>Konstrukt   |
| SB_pcDNA3_Sall_rv              | AGACCCGTCGACCTGCATCTCATCGAAGTTG   |  |
| SB_HA_Sal_Mlu_rv               | AGACCCGTCGACACGCGTAGCGTAATCTGGA<br>AATCGTATGGGTACTGCATCTCATCGAAGTTG         |  |
| SB_SNAP_NheSalRV               | AGACCCGTCGACGCTAGCTCCTGGCGCGCCTA<br>TACC                                    |  |
| SB_SNAP_NheBamFW               | GCGATCGGATCCGCTAGCGCCGCCACCATGG<br>ACAAAGACTGCG                             | CTV-Ca <sub>v</sub> 1.2-HA-<br>Konstrukt/<br>CTV-SNAP-<br>Ca <sub>v</sub> 1.2-HA-<br>Konstrukt |
| SB_Ca <sub>v</sub> 1.2_Asc_fw  | GCGATCACTAGTGGCGCGCCGCTAGCGTCAA<br>TGAAAACACGAGGATG                         |  |
| SB_Ca <sub>v</sub> _Sall_rv    | AGACCCGTCGACCTGCATCTCATCGAAATTGA<br>AC                                      |  |
| SB_Ca <sub>v</sub> 1.2_HA_rv   | AGACCCGTCGACACGCGTAGCGTAATCTGGA<br>ACATCGTATGGGTACTGCATCTCATCGAAATT<br>GAAC |  |
| SB_SNAP_stop_rv                | AGACCCGTCGACGCTAGCACCCAGCCCAGGC<br>TTG                                      | Screeningvektor  |
| SB_Ca <sub>v</sub> _SpeMlu_fw  | GCGACTACTAGTACGCGTAGGAGCACGTTTCG<br>ATAAC                                   |  |
| SB_Ca <sub>v</sub> 1.2_Asc_rv  | AGACCCGTCGACGGCGCGCCCTACAGGTTGC<br>TGACGTAGG                                |  |
| 5'UTR_SacI_2for                | GCGATCGAGCTCACACTTATTGGCCGGTGC  |  |
| 5'UTR_SacII_re                 | CCCAGACCGCGGTGTCTCACAGAACGGCCCA   |  |
| Soriano_for                    | CCTAAAGAAGAGGCTGTGCTTTGG  |  |
| Soriano_re                     | CATCAAGGAAACCCTGGACTACTG  |  |
| Rosa_Scr4_for,<br>Rosa_Scr6_re | TAGGTAGGGGATCGGGACTCT<br>CTATGAACTAATGACCCCGTAATTG                          |  |

QuikChange II-Primer

| Primer            | Sequenz (5' → 3')                    | Verwendung       |
|-------------------|--------------------------------------|------------------|
| SB_QCLK1_Mlul_fw  | CGATGAGATGCAGACGCGTAGGAGCACGTTCG     | Mlul in LK1      |
| SB_QCLK1_Mlul_rv  | CGAACGTGCTCCTACGCGTCTGCATCTCATCG     | Mlul in LK1      |
| SB_preLK1_NheI_fw | CCGAATTCGCCGCTAGCGTCAATGAGAATACGAGG  | NheI, 5' vor LK1 |
| SB_preLK1_NheI_rv | CCTCGTATTCTCATTGACGCTAGCGGCCGAATTCGG | NheI, 5' von LK1 |

Sequenzier-Primer

| Primer                        | Sequenz (5' → 3')      | Verwendung                    |
|-------------------------------|------------------------|-------------------------------|
| SB_LK1_seqfw_1                | CAGCTCATGCCAACATGAAT   | pcDNA3-Vektorkonstrukt        |
| SB_LK1_seqfw_2                | ATCTATGCCATCATCGGCCTG  | pcDNA3-Vektorkonstrukt        |
| SB_LK1_seqfw_3                | ATCTCCAAGTCGAAATTCAG   | pcDNA3-Vektorkonstrukt        |
| SB_LK1_seqfw_4                | CTGATGCTGAGAGCCTTACTTC | pcDNA3-Vektorkonstrukt        |
| SB_LK1_seqfw_5                | CCCTCATCTCCTTCGGCATCC  | pcDNA3-Vektorkonstrukt        |
| SB_LK1_seqfw_6                | TGCGGAGGTACATCCCCA     | pcDNA3-Vektorkonstrukt        |
| SB_LK1seqfw7                  | ACCTCGGAGGAGGGATTAATCC | pcDNA3-Vektorkonstrukt        |
| SB_LK1seqrv1                  | CATACACTGGAACACCGTCAAC | pcDNA3-Vektorkonstrukt        |
| SB_Ca <sub>v</sub> 1.2_seqfw1 | GAGTGGAGTATCTCTTCC     | CTV-End- und Zwischenvektoren |
| SB_Ca <sub>v</sub> 1.2_seqfw2 | CTGGACAGACGTGCTGT      | CTV-End- und Zwischenvektoren |
| SB_Ca <sub>v</sub> 1.2_seqfw3 | GTGCTGTACTGGGTCAATG    | CTV-End- und Zwischenvektoren |
| SB_Ca <sub>v</sub> 1.2_seqfw4 | CATTACAACCAGCCTCACTG   | CTV-End- und Zwischenvektoren |
| SB_Ca <sub>v</sub> 1.2_seqfw5 | GGAGAGGAAGAAGCTGGC     | CTV-End- und Zwischenvektoren |
| SB_Ca <sub>v</sub> 1.2_seqfw6 | TTTACGAGTGCTGCGAGTCCTC | CTV-End- und Zwischenvektoren |
| SB_Ca <sub>v</sub> 1.2_seqfw7 | GATGTTCGTTTCATCCTGC    | CTV-End- und Zwischenvektoren |
| SB_Ca <sub>v</sub> 1.2_seqfw8 | ACTTGATGTGGTGACCCTC    | CTV-End- und Zwischenvektoren |
| SB_Ca <sub>v</sub> 1.2_seqfw9 | GGCAACTTTCCTCAGACGTTG  | CTV-End- und Zwischenvektoren |
| SB_Ca <sub>v</sub> 1.2_sqfw10 | TCAACAGCAGCTTCCCATC    | CTV-End- und Zwischenvektoren |
| SB_Ca <sub>v</sub> 1.2_seqr1  | TAGTTGGAACCTTGGTGG     | CTV-End- und Zwischenvektoren |
| SB_Ca <sub>v</sub> 1.2_rv2    | GCTTTGGTTGCTTGTCTAA    | CTV-End- und Zwischenvektoren |

### 3.4 Antikörper

| Name, Ursprung                                  | Protein, Ursprung                                  | Verdünnung | Hersteller                       |
|---|--|------------|----------------------------------|
| Anti-Ca <sub>v</sub> 1.2, rabbit                | Ca <sub>v</sub> 1.2, mouse                         | 1:250      | Prof. Dr. F. Hofmann, TU München |
| Anti- Ca <sub>v</sub> β <sub>2v2</sub> , rabbit | Ca <sub>v</sub> β <sub>2</sub> , C-terminal, mouse | 1:200      | Prof. Dr. F. Hofmann, TU München |
| Anti-MAPK (p44/42), rabbit                      | MAPK, Ladekontrolle                                | 1:1000     | Cell Signaling Technology™       |
| HA.11, rabbit                                   | HA-tag   | 1:1000     | Covance                          |
| Anti-HA-tag, rabbit                             | HA-tag   | 1ng/μl     | Abcam                            |
| IgG Isotype control, rabbit                     | rabbit, IgG  | 1ng/μl     | Thermo Scientific                |
| Alexa Fluor 594, goat                           | Sekundärer Antikörper                              | 1:500      | Invitrogen                       |
| Alexa Fluor 594, donkey                         | Sekundärer Antikörper                              | 1:500      | Invitrogen                       |
| GAR HRP, goat                                   | Sekundärer Antikörper                              | 1:50 000   | Dianova                          |
| GAM HRP, goat                                   | Sekundärer Antikörper                              | 1:50 000   | Dianova                          |

### 3.5 Geräte

| Name                                  | Firma             |
|---------------------------------------|-------------------|
| Bakterienschüttler Certomat®R/H       | B. Braun          |
| Curix 60 Filmentwickler               | AGFA              |
| GenePulser                            | Biorad            |
| Inkubator                             | Memert            |
| Inkubator HERAcell (CO <sub>2</sub> ) | Hereaus           |
| LaminAir HB2448                       | Hereaus           |
| Leica DMI6000                         | Leica             |
| MiniProtean3Cell Gelkammer            | Biorad            |
| Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000   | Peqlab            |
| pH-Messgerät pH211                    | Hanna Instruments |
| PCR Geräte Unoll/T1 Thermocycler      | Biometra          |
| Semi-dry Blotter Multiphor II         | Pharmacia LKB     |
| Taumelmischer                         | Neolab            |
| Tischzentrifuge                       | Eppendorf         |
| Ultrazentrifuge                       | Beckmann          |
| Vakuumzentrifuge (Speed-vac)          | Bachofer          |
| Überkopfschüttler Rotator             | Neolab            |
| Wasserbäder                           | Köttermann        |

### 3.6 Einmalmaterial

| Name                               | Hersteller             |
|------------------------------------|------------------------|
| Cryovial                           | Nunc                   |
| Deckgläser 20x60mm                 | Marienfeld             |
| EP-Küvetten Klonieren (#712020)    | Peqlab                 |
| EP-Küvetten Stammzellen (#712010)  | Peqlab                 |
| Falkon 15 ml                       | Corning                |
| Falkon 50 ml                       | TPP                    |
| Hyperfilm ECL                      | GE                     |
| Immobilon-P (PVDF-Membran)         | Millipore              |
| Kulturflasche ES                   | Corning                |
| Kulturflasche HEK                  | TPP                    |
| Lab-Tek™ II, Chamber Slide™-System | Thermo Scientific/Nunc |
| Parafilm                           | Roth                   |
| Petrischalen 3 cm                  | Nunc                   |
| Pasteurpipette                     | Roth                   |
| Wellplatten (6, 24, 96)            | Corning                |
| Whatman 3 MM                       | Schleicher und Schüll  |

## 4 Methoden

### 4.1 Bakterienkultur

#### 4.1.1 Plasmide

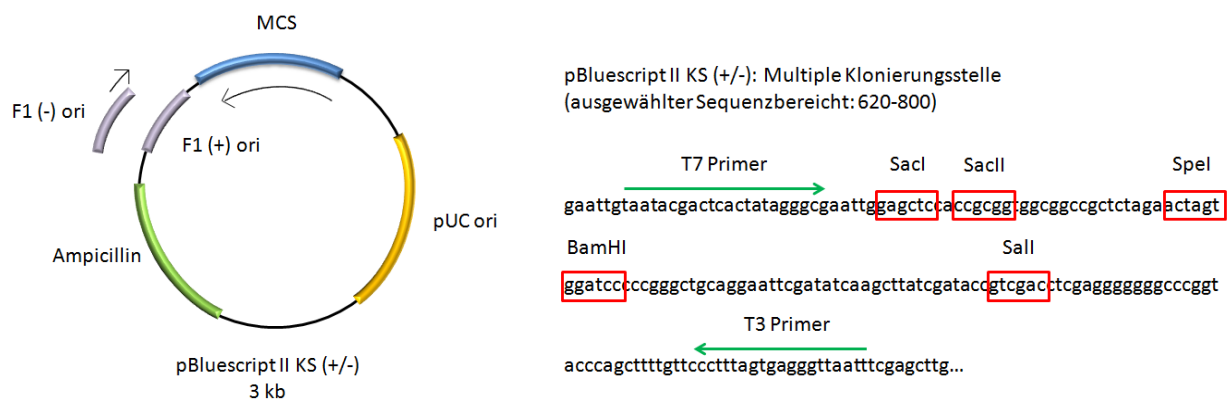
Plasmide sind ringförmige, doppelsträngige DNS-Strukturen, die in Bakterien zusätzlich zu dem linearen, chromosomalen Genmaterial vorhanden sind. Die darin abgespeicherte, genetische Information dient nicht unmittelbar den essentiellen Stoffwechselfunktionen, kann aber einen Selektionsvorteil bieten. Je nach kodierter Funktion unterscheidet man zwischen Fertilitäts-, Resistenz-, Virulenz- und metabolischen Plasmiden. In der Molekularbiologie werden Plasmide als Transportvehikel für DNS-Moleküle verwendet. Diese sogenannten Klonierungsvektoren besitzen die Eigenschaft, sich selbstständig in der Wirtszelle zu vermehren. Für bakterielle Wirtszellen sind Plasmide aus bakterienspezifischen Viren (Bakteriophagen) geeignet. Mindestbestandteile der zirkulären DNS-Moleküle sind der Replikationsstartpunkt, Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen und ein Selektionsmarker. Als Selektionsmarker dient in den verwendeten Plasmiden ein Ampicillin-Resistenzgen. Durch den Zusatz des Antibiotikums Ampicillin zu den Anzuchtmedien können vektorhaltige Zellen von vektorfreien Zellen unterschieden werden, da nur resistente Zellen in der Lage sind zu überleben. Darüber hinaus enthalten Plasmide meist eine multiple Klonierungsstelle (MCS, *multiple cloning site*), einen Polylinker, der eine Vielzahl von Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme in sich vereint.

In den Versuchen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Vektoren eingesetzt und verändert. Diese werden im folgenden Abschnitt kurz beschrieben und ihr Anwendungsgebiet erläutert.



### pBluescript II KS (+/-) (Stratagene)

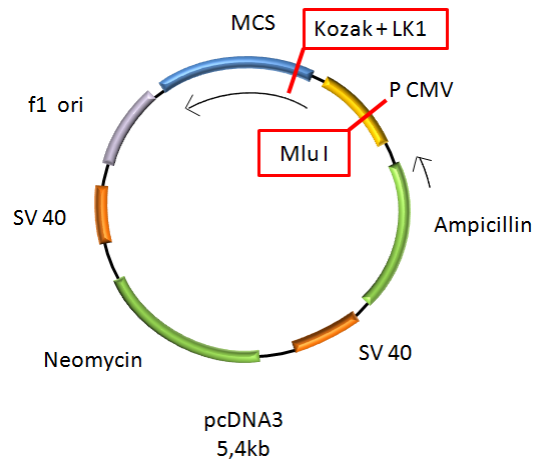
Dieses Plasmid wurde für die Klonierungen der DNS-Zwischenprodukte eingesetzt. Ausgestattet mit dem pUC-ori Replikationsstartpunkt und einem Resistenzgen für Ampicillin, kann sich die ringförmige DNS autonom in *E. coli*-Kulturen vermehren. Dank der multiplen Klonierungsstelle ist eine große Auswahl an Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme gegeben. Als Promoter stehen die T3/T7-Promotoren zur Verfügung. Der pBluescript II (KS +/-)-Vektor ist etwa 3 kb groß.



**Abb. 5** pBluescript II KS (+/-) Plasmidvektor  
verwendete Restriktionssequenzen sind rot markiert

### pcDNA3 LK1 (Welling et al, 1997)

Der pcDNA3-LK1-Vektor fand in der Überexpression der modifizierten LK1-cDNA in HEK293T-Zellen Verwendung. Dieser Vektor wurde in der Publikation von A. Welling et al. bereits beschrieben (Welling et al, 1997). Neben einer umfangreichen multiplen Klonierungsstelle und dem pUC-ori-Replikationsgen ist auch in diesem Vektor eine Ampicillinresistenz kodiert. Ein zusätzlicher SV40-Replikationsursprung garantiert die heterologe Expression in den HEK293T-Zellen, die durch den CMV-Promotor unterstützt wird. Das Plasmid pcDNA3 enthält 5,4 kb. Über die unique HindIII-Schnittstelle in der multiplen Klonierungsstelle wurde die LK1-Sequenz inklusive einer Kozaksequenz (5'-GCCGCCACC-3') in das pcDNA3-Plasmid integriert. Der Gesamtvektor erzielt dadurch eine Größe von etwa 12 kb.

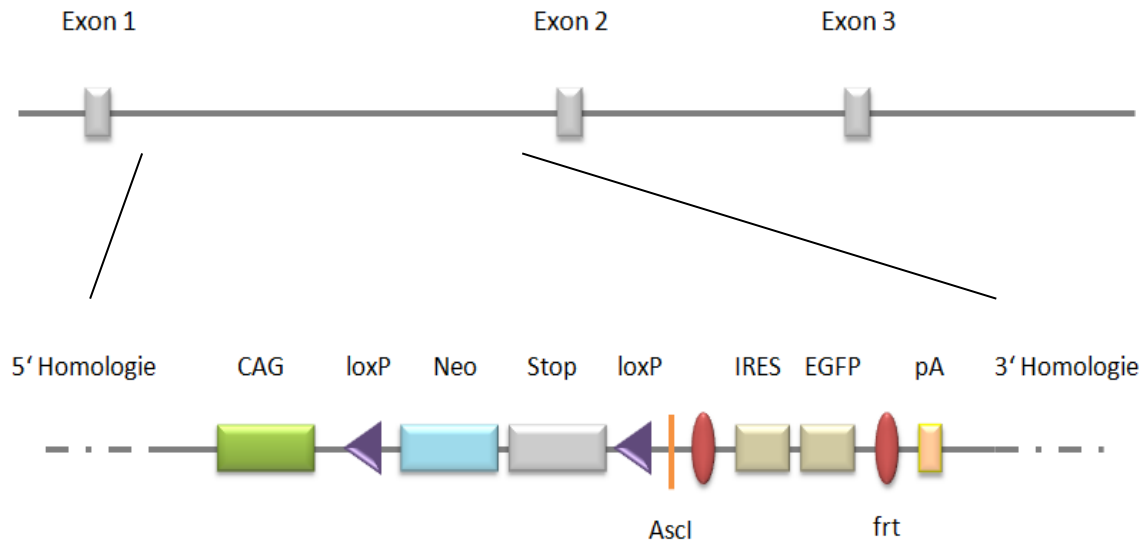


**Abb. 6** pcDNA3-Vektor  
verwendete Restriktionssequenz ist rot markiert

### CTV (Addgene)

Der CTV-Vektor, auch unter dem Namen CAG-Stop-EGFP-ROSA TV oder CAG-SERTV-7 bekannt, wird für die Überexpression von cDNA in transgenen Mausmodellen verwendet. Dieses Plasmid ist eine Weiterentwicklung des pRosa26-1 Vektors, der von Dr. Philippe Soriano im Fred Hutchinson Cancer Research Center entwickelt wurde (Friedrich & Soriano, 1991). Changchun Xiao konstruierte den CTV-Targeting-Vektor, der die jüngste Weiterentwicklung des ursprünglichen Rosa26-1-Vektors darstellt. In dem 16.1 kb langen Plasmid ist eine Ampicillin-Resistenz kodiert. Dieser enthält den CAG-Promoter des pCXN2-Vektors. Insgesamt wurde in mehreren Zwischenschritten zusätzlich der CAG-Promoter des pCXN2-Vektors zwischen den Splice Acceptor und der Neo-Stop-Kassette eingebaut (Xiao et al, 2007). Der CAG-Promotor ist eine Kombination aus einem frühen *Enhancer* des Cytomegalievirus (CMV) und dem  $\beta$ -Aktin-Promoter des Huhns. Dieser ist gut geeignet, um eine Proteinüberexpression in Säugerzellen zu generieren (Nyabi et al, 2009; Okabe et al, 1997). Anschließend folgt eine mit *loxP*-flankierte Neo-STOP-Kassette. Das Neomycin-Geneticin-Resistenzgen dient der Selektion positiver ES-Zellen. In Kombination mit der Expression einer Cre-Rekombinase wird die Neo-Stop-Kassette im Gewebe ausgeschnitten und die Expression des Zielproteins unter dem CAG-Promoter gestartet. Außerdem ist eine IRES-EGFP-Kassette, die von dem Rekombinationssystem *frt* umgeben ist, ein Splice Acceptor

(SA) und ein Polyadenylierungssignal (pA) integriert (Sasaki et al, 2006; Xiao et al, 2007). Im CTV-Vektor wird über eine artifizielle *Ascl*-Restriktionssequenz das Zielprotein in den Targeting-Vektor eingebaut. Hierdurch ist die Gensequenz 3' der *loxP*-Stellen lokalisiert. Um eine bessere Expressionsrate zu gewährleisten, wird empfohlen, eine *Kozak*-Sequenz vor das eigentliche Start-Triplett (ATG) zu inserieren.



**Abb. 7** Aufbau des CTV-Targeting Vektors

Polyadenylierungssignal (pA), *Ascl* als Insertionsstelle des Proteinsequenz, Integrationsstelle in *Rosa*-Locus auf Chr. 6 (Maus); modifiziert nach Addgene

Ein äquivalenter Bereich zum murinen *Rosa26-1*-Lokus wurde im menschlichen Genom auf Chromosom 3 gefunden. Durch den Vergleich der Nukleotidsequenzen ergab sich eine Homologie von > 85%. Analog wurde dieser Bereich als *hROSA26* benannt (Irion et al, 2007).

#### pSNAP-tag (m) (NEB)

Der pSNAP-tag(m)-Vektor trägt die 0,6 kb lange SNAP-tag-Sequenz, die in die Targetingvektoren integriert wurde. Konstruiert für die Expression des SNAP-tag in Säugerzellen bietet dieses Plasmid N- und C- terminal des SNAP-Proteins jeweils eine multiple Klonierungsstelle, über die Proteinsequenzen eingefügt und unter der Kontrolle des

T7-Promotors exprimiert werden können. Für die Selektion pSNAP-tag-haltiger Zellen ist eine Neomycin- und Ampicillin-Resistenz kodiert. Das Plasmid ist 5,8 kb lang.

#### Ca<sub>v</sub>1.2-pCAGGS (Prof. Dr. Veit Flockerzi)

Dieses Plasmid wurde mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Veit Flockerzi (Universität des Saarlandes, Homburg) zur Verfügung gestellt. In dem pCAGGS-Rückgrat wurde die Sequenz des murinen Ca<sub>v</sub>1.2-Kanals integriert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kanalsequenz über PCR-Reaktionen amplifiziert und in den CTV-Vektor eingebaut. Der murine Ca<sub>v</sub>1.2-Kanal (GenBank™ accession number: FM872412) hat eine Größe von 6,5 kb.

### **4.1.2 Bakterienstämme**

Die hergestellten Plasmide wurden in XL-1 Blue-Zellen (Stratagene) und XL-10 Gold-Zellen (Stratagene) transformiert und vervielfältigt. Beide Zellreihen stammen von dem Bakterium *E. coli* ab und sind in der Lage, fremde Plasmide aufzunehmen und zu klonieren. Die Transformationsversuche können je nach Kompetenz der Zellen entweder chemisch oder elektrisch durchgeführt werden.

### **4.1.3 Herstellung elektrokompetenter Zellen**

Für die Generierung elektrokompetenter Bakterienwirte züchtet man einen Verdünnungsausstrich der XL-1 Blue-Zellen (Stratagene) auf einer Tetracyclin-LB-Platte ü.N. bei einer Temperatur von 37°C an. Zuvor wird der Ansatz für die LB-Platten 10 Min autoklaviert und nach Abkühlen auf etwa 50°C mit 100 µl Tetracyclin (12 mg/ml) versehen. Am folgenden Tag wird eine Vorkultur (7 ml LB-Medium, ohne Antibiotikum) mit einem Klon des Verdünnungsausstriches angeimpft und wiederum über Nacht bei 37°C, 225 rpm wachsen gelassen. Am nächsten Morgen wird die Vorkultur in ein 500 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) überführt und bei 37°C, 225 rpm inkubiert. Bei einer optischen Dichte von 0,5-0,7 werden die Bakterien 30 Min auf Eis abgekühlt. Alle folgenden Schritte werden bei 4°C

auf Eis durchgeführt. Die Bakterien werden auf zwei vorgekühlte Zentrifugenbecher aufgeteilt und dreimal 15 Min lang bei 4000xg (Rotor JA 10, 4800 rpm) und 4°C abzentrifugiert. Nach jedem Zentrifugationsschritt werden die entstandenen Bakterienpellets in zunächst 230 ml und anschließend in 130 ml kaltem H<sub>2</sub>O resuspendiert. Im Anschluss an die dritte Zentrifugation werden die Pellets in je 5 ml kalter 10 %iger Glycerinlösung resuspendiert und in einem sterilen 10 ml Zentrifugenröhrchen zusammengeführt. Die Bakterien werden 150 Min in der Eppendorfzentrifuge bei 4500xg und 4°C abzentrifugiert. Daraufhin löst man die Bakterien in 2 ml kalter 10 %iger Glycerinlösung. Je 50 µl Bakterienlösung werden in vorbereitete Caps aliquotiert, auf Trockeneis schockgefroren und bei einer Temperatur von -80°C gelagert.

| Tetrazyklin-Stocklösung (12mg/ml)               |             | LB-Platten                        |                  |
|---|-------------|-----------------------------------|------------------|
| 120 mg  | Tetrazyklin | 1g                                | Trypton          |
| 10 ml   | 70% Ethanol | 0,5 g                             | Hefeextrakt      |
|   |             | 0,5 g                             | NaCl             |
|   |             | 1,5 g                             | Agar             |
|   |             | 0,1 g                             | D(+) Glucose     |
|   |             | ad 100 ml                         | H <sub>2</sub> O |
| lichtgeschützt in Alufolie,<br>bei -20°C lagern |             | lichtgeschützt in Alufolie lagern |                  |

### Kompetenzbestimmung

Der mitgelieferte pUC18-Vector wird für die Kompetenzbestimmung herangezogen. Dieses künstliche, bakterielle Plasmid umfasst lediglich 2686 bp. Dank dieser geringen Größe wird es mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit in *E.coli*-Zellen aufgenommen. 1 ng des pUC18-Vectors wird direkt ohne vorherige Fällung in die elektrokompenten Zellen elektrisch transformiert und auf einer Carbenicillinplatte in unterschiedlichen Konzentrationen wie folgt bei 37°C über Nacht ausgebracht:

2 µl Bakteriensuspension + 148 µl LB

20 µl Bakteriensuspension + 130 µl LB

200 µl Bakteriensuspension

Anschließend werden die gewachsenen Kolonien gezählt und die Kompetenz der elektrokompenten Zellen nach folgender Formel berechnet:

$$(\text{Kolonienzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor}) \times \text{Menge Vektor} = \text{Kompetenz (1}\mu\text{g Vektor)}$$

Als Verdünnungsfaktor wird das Verhältnis der eingesetzten Bakterienmenge zu dem Ausgangsvolumen eingesetzt (z.B.: 2  $\mu\text{l}$  aus 1055  $\mu\text{l}$  = 1 : 527,5). Als „Menge Vektor“ wird die Menge des Vektors auf 1  $\mu\text{g}$  hochgerechnet (z.B.: für 1 ng Vektor  $\rightarrow$  Faktor 1000)

#### 4.1.4 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Für die Herstellung chemisch kompetenter Zellen werden XL-10 Gold-Zellen (Stratagene) auf einer Tetrazyklinplatte in einem Verdünnungsausstrich aufgetragen und anschließend in 7 ml bzw. 500 ml Ampicillin-LB-Kulturen bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,3 bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Nach Zentrifugation (3000xg, 10 Min, 4°C) wird das Zellpellet in Transformation-Storage Solution (TSS) resuspendiert und als 400  $\mu\text{l}$  Aliquots bei -80°C gelagert.

| TSS-Lösung |                     |
|------------|---------------------|
| 50 ml      | PEG 3350 (40%)      |
| 10 ml      | 1 M $\text{MgCl}_2$ |
| 10 ml      | DMSO                |
| ad 2000 ml | LB-Medium           |
| pH 6,5     |                     |

#### 4.1.5 Transformation von Bakterien

Das Einbringen von fremder DNS in einen Organismus, der als Wirt dient, wird als Transformation bezeichnet. Die zirkuläre Plasmid-DNS wird meist in *E. coli*-Stämme eingeschleust, die zuvor durch DMSO-Behandlung chemisch oder elektrisch kompetent gemacht wurden. Nach der Transformation werden die Bakterien in SOC(+)-Medium

vermehrt und auf Agar-Platten (Ampicillin-haltig) über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Anschließend können Einzelklone ausgewählt und in 7 ml LB-Medien (+Amp) für 8-10 h kultiviert werden, um dann mittels alkalischer Lyse und enzymatischen Verdaus analysiert zu werden.

| SOC (-)                        |                  | SOC (+)                            |                       |
|--------------------------------|------------------|------------------------------------|-----------------------|
| 2 g                            | Trypton          | 4,8 ml                             | SOC (-)               |
| 0,5 g                          | Hefeextrakt      | 0,05 ml                            | 1 M MgCl <sub>2</sub> |
| 0,2 ml                         | 5 M NaCl         | 0,05 ml                            | 1 M MgSO <sub>4</sub> |
| 0,25 ml                        | KCl              | 0,1 ml                             | 20 % Glucose          |
| ad 1000 ml                     | H <sub>2</sub> O |                                    |                       |
| autoklaviert, bei -20°C lagern |                  | steril filtriert, bei -20°C lagern |                       |

### Elektroporation

Mit Hilfe eines Hochspannungspulses (25 kV, 25 µF, 200 Ω) wird die Zellwand der elektrokompenten *E. coli*-Stämme XL-1 Blue (Stratagene) perforiert und die Plasmid-DNS in die Zellen aufgenommen. Zuvor wird die Plasmid-DNS vorbereitet: Nach Fällung und Zentrifugation ist die Fremd-DNS entsalzt und kann transformiert werden. Hierfür werden die elektrokompenten Zellen in 50 µl Aliquots auf Eis aufgetaut und mit der präparierten DNS gemischt. Nach 1 Min Inkubationszeit auf Eis wird der Ansatz in eine Elektroporationsküvette (Peqlab) überführt und mit dem elektrischen Impuls im Elektroporator (GenePulser™, Biorad) versehen. Sofort nach erfolgreicher Elektroporation wird das Zell-DNS-Gemisch mit 1 ml SOC(+)-Medium versehen und 1h bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Anschließend werden 100 µl des Ansatzes auf Agar-Platten (Ampicillin-haltig) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### Chemische Transformation

Bei der chemischen Transformation wird die Membranpermeabilität durch Hinzufügen von DMSO (Dimethylsulfoxid) gesteigert. Die chemisch kompetenten XL-10 Gold-Zellen (Stratagene) werden auf Eis als 50 µl Aliquots aufgetaut und mit 1 µl β-Mercaptoethanol in einem auf Eis vorgekühlten Rundbodenfalkon gemischt. Nach 10 min auf Eis werden 2 µl Ligationsansatz bzw. 10-50 ng Plasmid-DNA zu den Bakterienzellen hinzugeben und weitere

30 Min auf Eis gestellt. Anschließend werden durch einen Hitzeschock von 42°C für 30 Sek (im Wasserbad) die Plasmide in die Zellen eingeschleust. Nach 2 min auf Eis werden 950 ml SOC(+) (42°C warm) zugegeben und für 1,5 h bei 37°C und 225 rpm inkubiert. 100 µl des Ansatzes werden auf Ampicillin-haltige Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 4.1.6 Kultivierung

Das Heranzüchten von *E. coli* erfolgt aerob in reichen LB-Medien (engl.: *lysogeny broth*) bei einer Temperatur von 37°C. Zur Verfügung stehen sowohl Flüssig- als auch Festmedien. Je nach Resistenzlage wird vor dem Animpfen der LB-Medien das Antibiotikum Ampicillin (c= 50 mg/ml) in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml hinzugefügt, um die erfolgreich transformierten *E. coli*-Bakterien zu selektionieren.

Um Plasmide in geringen Mengen zu extrahieren, werden 7 ml-LB-Kulturen hergestellt und mit 14 µl Ampicillin (c=50 mg/ml) versehen. Die ausgewählte Einzelkolonie der Transformations-Agarplatte wird in 7 ml-LB-Medium über Nacht bei 37°C und 225 rpm vermehrt. Anschließend kann das vervielfältigte Plasmid durch alkalische Lyse aufgereinigt werden.

Wird das Plasmid in hoher Konzentration benötigt, empfiehlt es sich, eine 7 ml LB-Vorkultur (+ Amp) in eine 100 ml LB-Kultur (+ Amp) zu überführen und ebenfalls über Nacht bei 37°C und 225 rpm zu inkubieren. Die Plasmidgewinnung erfolgt hier ebenfalls über alkalische Lyse.

#### 4.1.7 Medien

Für das Anzüchten von Bakterienklonen, die das gewünschte Plasmid tragen, können je nach weiterem Vorgehen flüssige oder feste Medien verwendet werden. Durch den Zusatz von 1,5% Agar-Agar wird das flüssige LB-Medium in ein Festmedium umgewandelt.



Zur langfristigen Aufbewahrung der positiven Bakterien werden Glycerolstocks angelegt. Im Verhältnis 1:1 wird Glycerol mit der Bakteriensuspension gemischt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

| LB-Medium                   |                  | LB-Agar (Festmedium) |                  |
|-----------------------------|------------------|----------------------|------------------|
| 10 g                        | Trypton          | 20 g                 | Trypton          |
| 5 g                         | Hefeextrakt      | 10 g                 | Hefeextrakt      |
| 5 g                         | 5 M NaCl         | 10 g                 | 5 M NaCl         |
| 1 g                         | D(+) Glucose     | 2 g                  | D(+) Glucose     |
| ad 1000 ml                  | H <sub>2</sub> O | 30 g                 | Agar             |
|                             |                  | ad 2000 ml           | H <sub>2</sub> O |
| Autoklaviert, bei RT lagern |                  | Autoklavieren        |                  |

## 4.2 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1 Amplifizierung von DNS

#### Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) wird verwendet, um DNS-Stücke exponentiell zu vermehren. Verwendet wird die PCR, um Veränderungen in der Basensequenz der DNS einzufügen oder um positive Stammzellklone zu genotypisieren. Als Ausgangsmateriel dienen jeweils DNS-Fragmente, die in den drei Schritten Denaturierung, Annealing und Elongation amplifiziert werden. Bei  $95^{\circ}\text{C}$  werden die DNS-Doppelstränge voneinander getrennt (Denaturierung), so dass in dem darauffolgenden Annealingschritt sich die Oligonukleotidprimer an die entstandenen Einzelstränge anlagern können. Die Annealing-Temperatur ist abhängig von den Schmelztemperaturen der konstruierten Primer. In dem letzten Schritt (Elongation) verlängert eine thermostabile Polymerase bei  $72^{\circ}\text{C}$  die Primer in 5'-3' Richtung gegengleich zur Template-DNS.

Durch die PCR werden neue Restriktionsstellen, Stop-Sequenzen, sowie der HA-tag in die Plasmide eingefügt. Eine wichtige Eigenschaft der ausgewählten Phusion™ High-Fidelity-

Polymerase (Finnzymes) ist die 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die eine Korrekturfunktion darstellt. Dadurch wird gewährleistet, dass eine möglichst geringe Fehlerzahl in den Amplifikationsprodukten entsteht. Pro PCR-Ansatz werden 50-100 ng DNS eingesetzt. In 10 Zyklen mit absteigenden Annealing-Temperaturen wird versucht, eine möglichst hohe Primerbindung zu erzielen. In den darauffolgenden 25-30 Zyklen werden die entstandenen Produkte bei einer optimierten Temperatur vervielfältigt.

Für das Screening der Stammzellklone wurde das PCR-Protokoll von Dr. P. M. Soriano herangezogen und modifiziert (Icahn School of Medicine at Mount Sinai: Rosa26; URL: <http://research.mssm.edu/soriano/lab/rosa26.html>, Stand: 12.12.2013, 15:38).

| Reaktionsansatz Phusion™HF-Polymerase |                               | PCR-Programm Phusion™HF-Polymerase |                |
|---------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|----------------|
| 8 µl                                  | dNTPs (1,25 mM)               | 98°C                               | 30 sec         |
| 10 µl                                 | 5x Phusion HF-Puffer          |                                    |                |
| 2,5 µl                                | Primer 1 (10 mM)              | 98°C                               | 10 sec         |
| 2,5 µl                                | Primer 2 (10 mM)              | 65°C                               | 30 sec dT -1°C |
| 0,25 µl                               | Phusion™HF Polymerase (2U/µl) | 72°C                               | 30 sec/kb      |
| x µl                                  | DNS (50-100 ng)               | 98°C                               | 10 sec         |
| ad 50 µl                              | H <sub>2</sub> O              | 55°C                               | 30 sec         |
|                                       |                               | 72°C                               | 30 sec/kb      |
|                                       |                               | 72°C                               | 5 min          |

} 10 x

} 25 x

| Reaktionsansatz GoTaq DNA Polymerase |                               | PCR-Programm GoTaq DNA Polymerase |                       |
|--------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| 8 µl                                 | dNTPs (1,25 mM)               | 95°C                              | 2 Min                 |
| 6 µl                                 | MgCl <sub>2</sub>             | 95°C                              | Pause (dNTPs + Enzym) |
| 10 µl                                | 5x GoTaq Flexi Puffer         | 95°C                              | 30 sec                |
| 2,5 µl                               | Primer 1 (10 mM)              | 60°C                              | 30 sec                |
| 2,5 µl                               | Primer 2 (10 mM)              | 72°C                              | 2 min                 |
| 0,25 µl                              | Go Taq DNA Polymerase (2U/µl) | 72°C                              | 5 min                 |
| x µl                                 | DNS (100 ng)                  |                                   |                       |

} 35x

### QuikChange II Site-Directed Mutagenese

Ziel der QuikChange II Site-Directed Mutagenese (Stratagene) ist das Einführen von Punktmutationen in DNS-Plasmide. Zwei synthetisch hergestellte Primer enthalten die

gewünschte Mutation und binden an exakt komplementäre Bereiche des DNS-Plasmids. In einer PCR-Reaktion amplifiziert die PfuUltra HF-Polymerase die zirkulären Plasmide. Diese Polymerase besitzt zwar eine geringere Effizienz im Vergleich zu anderen Polymerasen, besticht jedoch dank 3'-5' Exonukleaseaktivität (Korrekturfunktion) durch ihre sehr niedrige Fehlerrate. Als Produkte erhält man komplett synthetisierte, unmethylierte, doppelsträngige Plasmidringe. Die parentalen, methylierten Plasmide werden im Anschluss an die PCR-Reaktion durch 1 µl Restriktionsendonuklease Dnpi (10 U/µl) innerhalb 1h bei 37°C verdaut. Dadurch verbleibt im Reaktionsansatz nur die neu generierte, mutations-haltige DNS, die sofort in chemisch oder elektrisch kompetente Zellen transformiert und auf Agarplatten (+ Ampicillin) ausplattiert werden kann. Nach Vermehrung in LB-Medium wird die Plasmid-DNS durch alkalische Lyse gewonnen, um die Mutation durch eine Sequenzanalyse zu überprüfen.

| Reaktionsansatz QuikChange II |                                       | PCR-Programm Phusion™HF-Polymerase |          |
|-------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|----------|
| 1 µl                          | dNTPs (1,25 mM)                       | 95°C                               | 1 min    |
| 5 µl                          | 10x Reaction-Puffer                   |                                    |          |
| 1 µl                          | Primer 1 (125 ng/µl)                  | 95°C                               | 30 sec   |
| 1 µl                          | Primer 2 (125 ng/µl)                  | 55°C                               | 1 min    |
| 1 µl                          | PfuUltra DNA Polymerase<br>(2,5 U/µl) | 68°C                               | 1 min/kb |
| x µl                          | DNA (50-100 ng)                       | 68°C                               | 2 min    |
| ad 50 µl                      | H <sub>2</sub> O                      |                                    |          |

} 18 x

#### 4.2.2 Gelelektrophorese

##### Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese mit Agarosegelen ist eine einfache Methode um DNS-Fragmente unterschiedlicher Länge voneinander zu trennen. Das negativ geladene Phosphat-Zucker-Gerüst der DNS wandert in einem elektrischen Feld zur Anode. Die Laufgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Masse und der Konformation der DNS. Je nach Größe der aufzutrennenden DNS-Stücke wird die Konzentration des Agarosegels gewählt. Gut voneinander zu isolieren sind hierbei Fragmente zwischen 0,5 und 15 kb. Je kürzer die Fragmente sind, desto höherprozentige Gele werden verwendet, um eine möglichst saubere

und klare Trennung zu gewährleisten. Üblicherweise werden in dieser Arbeit Gele mit einer Konzentration von 0,7% benutzt. Die entsprechende Menge an Agarose (Biozym) wird in 1x TBE-Puffer bei 1000 Watt in der Mikrowelle aufgekocht und 0,8 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich) hinzugefügt. Die noch flüssige Lösung wird in einen Gelschlitten gegossen. Ein aufgesetzter Kamm sorgt für das Freihalten der Probenaschen. Für das Auftrennen der DNS-Proben wird der Gelschlitten in eine Elektrophoresekammer gesetzt und die Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Kammer ist mit 1x TBE-Puffer befüllt. Da die DNS-Lösung nahezu die gleiche Dichte wie der 1x TBE-Puffer besitzt, muss die Dichte künstlich durch einen Probenpuffer (*loading buffer*) erhöht werden. In dieser Arbeit wurde ein 6x Auftragspuffer verwendet, der zusätzlich zwei Farbmarker als Kontrolle für die Laufgeschwindigkeit enthält. Bromphenolblau wandert in etwa mit DNS-Fragmenten der Größe 10-100bp, Xylencyanol hingegen markiert DNS-Stücke von etwa 5 kb. Als Größenstandard wird 1kb DNA-Extension-ladder (Gibco-BRL) aufgetragen. Durch den Vergleich der Banden lässt sich die Größe der DNS-Fragmente abschätzen. Bei 100-200 V werden die DNS-Fragmente ausreichend aufgetrennt. Analytische Gele werden am GelBiodoc2000 (Biorad) ausgewertet und fotografisch dokumentiert. Präparative Gele werden in gleicher Weise durchgeführt. Die entstandenen Banden werden jedoch anschließend sauber mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNS durch Elektroelution oder mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen) herausgelöst.

| 10x Tris-Borat-EDTA (TBE) |                    | 6x Auftragspuffer |                               |
|---------------------------|--------------------|-------------------|-------------------------------|
| 540 g                     | Tris-HCL           | 18 g              | Ficoll Typ 400                |
| 275 g                     | Borsäure           | 1 ml              | 0,5 M EDTA pH 8,0             |
| 200 ml                    | 0,5 M EDTA, pH 8,0 | 60 ml             | 10x TBE                       |
| ad 1000 ml                | H <sub>2</sub> O   | 3 ml              | Bromophenolblau<br>(50 mg/ml) |
|                           |                    | 3 ml              | Xylencyanol FF (50 mg/ml)     |
|                           |                    | ad 100 ml         | H <sub>2</sub> O              |

### Polyacrylamidgel

Müssen kleine DNS-Fragmente einer Größe bis zu 1000 bp sauber voneinander getrennt werden, eignen sich 5% Polyacrylamidgele (PA-Gele, PAGE). Zwei Glasplatten, die durch einen Platzhalter voneinander getrennt werden, dienen als Gelapparatur. Die Probenaschen

werden durch einen Kamm ausgespart. Die Proben werden mit dem 6x Auftragspuffer versehen und in die Geltaschen aufgetragen. Für die vertikale Elektrophorese werden zunächst für 15 Min 110 V als Einlaufphase angelegt. Anschließend werden die DNS-Fragmente bei einer Spannung von 250 V für 30 Min voneinander getrennt. Das Polyacrylamidgel wird erst im Anschluss in einem Ethidiumbromidbad (15 µl Ethidiumbromid in 200 ml H<sub>2</sub>O) für 20 Min gefärbt und zweimal 15 Min mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Die Banden werden am GelBiodoc2000 (Biorad) fotografiert, aus dem Gel herausgeschnitten und über Elektroelution isoliert.

| <b>Polyacrylamid-Gel, 5%</b> |                      |
|------------------------------|----------------------|
| 3,8 ml                       | Rotiphorese®Gel 29:1 |
| ad 30 ml                     | 1x TBE               |
| 35 µl                        | TEMED                |
| 80 µl                        | APS                  |
| ad 1000 ml                   | H <sub>2</sub> O     |

### 4.2.3 Elektroelution

#### Präparation der Dialyseschläuche

Dialyseschläuche der Firma Sigma (Art. Nr. D-0405, Länge 50 feet) werden in 7 cm lange Stücke geschnitten, in 10 mM EDTA zweimal für jeweils 10 Min autoklaviert und mit bidestilliertem H<sub>2</sub>O gründlich gewaschen. Die präparierten Dialyseschläuche werden in 100% Ethanol bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

| <b>10 mM EDTA</b> |                  |
|-------------------|------------------|
| 6 ml              | 0,5 M EDTA       |
| ad 300 ml         | H <sub>2</sub> O |

#### Elektroelution

Um nach einer PCR oder einem enzymatischen Verdau die DNS sauber aufzureinigen, wird die DNS auf ein Elektrophoresegel aufgetragen und anschließend unter UV-Belichtung ausgeschnitten. Entsprechend der Größe des gewünschten DNS-Fragments, muss die

Konzentration des Gels gewählt werden. Das Gelstück wird zusammen mit 800 µl autoklaviertem 1x TBE in einen Dialyseschlauch eingebracht, der an beiden Seiten mit Klemmen verschlossen wird. Die Elutionskammer wird ebenfalls mit 1x TBE gefüllt, so dass der Schlauch und das Gelstück vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sind. Der Dialyseschlauch wird an der Kathodenseite längsparallel zu den Drähten platziert. Bei 145 mA wird das Gelfragment 1,5 h elektroeluiert. Auf Grund der starken Wärmeentwicklung muss die Kammer während der Elution auf Eis stehen. Die eluierte DNS wird anschließend mit Alkohol gefällt.

#### **4.2.4 QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen)**

Die Firma Quiagen bietet ein zeitsparendes Protokoll für die Extraktion von DNS aus Elektrophoresegelen. Pro Arbeitsdurchgang können laut Hersteller bis zu 400 mg Agarosegel in TBE-Buffer aufgereinigt werden. Das verwendete Protokoll wird von dem Hersteller Quiagen zur Verfügung gestellt.

#### **4.2.5 Alkohol-Fällung**

Befindet sich DNS in Wasser gelöst, bilden die H<sub>2</sub>O-Moleküle um das negativ geladene Molekül eine Hydrathülle aus. Das Prinzip der Alkoholfällung beruht darauf, dass die Nukleinsäure-Lösung mit einwertigen Salzen wie Natriumchlorid oder Natriumacetat versetzt wird. Die positiv geladenen Na<sup>+</sup>-Ionen fangen die negativ geladenen Phosphat-Gruppen der DNS ab und neutralisieren deren Ladung. Dadurch ist die Nukleinsäure ungeladen und nur schwer löslich. Dies bedingt, dass die DNS spontan ausfällt und durch Zentrifugation pelletiert werden kann. Mit Hilfe von Alkohol wird der DNS somit Wasser entzogen und sie wird von Salzen gereinigt. Die Alkoholfällung wird sowohl für die Aufreinigung von DNS nach der Elektroelution als auch für die Vorbereitung der elektrischen Transformation angewendet. Für die Fällung im Rahmen der alkalischen Lyse siehe Kapitel 4.4.

### Ethanol-Fällung

Für die Fällung der eluierten DNA wird entsprechend dem Volumen 1/10 5M NaCl und das 2-2,5fache Volumen an 100% Ethanol zugegeben. Für die Fällungsreaktion stehen zwei Optionen zur Verfügung: über Nacht bei -20°C oder 30 Min bei -80°C. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit 1 ml 100% Ethanol bzw. 1 ml 70% Ethanol gewaschen und jeweils 10 Min zentrifugiert (4°C, rpm<sub>max</sub>). Anschließend wird das Pellet 5 Min in der Vakuumzentrifuge (Speed-vac, Bachofer) getrocknet, um in 20 µl H<sub>2</sub>O bei 37°C gelöst zu werden.

### Isopropanol-Fällung

Isopropanol fällt DNS weit effektiver als Ethanol, so dass diese Methode vor allem bei großen Volumina von Interesse ist. 0,6-0,8 Volumen Isopropanol reichen aus, um die DNS bei Raumtemperatur zu präzipitieren. Nach 15 min Zentrifugation mit 14000xg (RT) wird das entstandene Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die pelletierte DNS wird in H<sub>2</sub>O gelöst.

### Fällung vor Elektroporation

Als Vorbereitung der zu transformierenden DNS muss der Ligationsansatz möglichst frei von Salzen sein, um einen Kurzschluss während der Elektroporation zu vermeiden. 10 µl des Ligationsansatzes werden mit 5 µg tRNA, 10 µl 1 M Ammoniumacetat und 50 µl 100% Ethanol versetzt. Nach 30 Min Zentrifugation bei 14000xg (RT) wird das Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 15 µl H<sub>2</sub>O wieder gelöst.

## **4.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentrationsbestimmung von in H<sub>2</sub>O gelöster DNS erfolgte mittels Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm durch den Nanodrop®Spectrophotometer ND-1000 (Peqlab). Mit dieser Methode lässt sich auch eine Aussage über die Reinheit der Lösung

treffen. Liegt der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  zwischen 1,8 und 2,0 ist der Proteingehalt der DNS-Lösung als minimal anzusehen.

#### **4.2.7 Sequenzanalyse von DNS**

In der Sequenzanalyse wird die Basensequenz der DNS überprüft. Nach PCR- und QuikChange II-Reaktionen können nicht nur angestrebte Veränderung in der Basensequenz, sondern auch Punktmutationen auftreten. Da diese Mutationen unter Umständen die Expression des Proteins stören, muss die DNS daraufhin überprüft werden. Hierfür wird die DNS zur Sequenzierung zu der Firma MWG Eurofins (Ebersberg) versendet, die diese Überprüfung durchführt.

### **4.3 *Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren***

#### **4.3.1 Restriktionsverdau**

Eine zentrale Methode des Klonierens ist der Restriktionsverdau. Hierbei wird die DNS unter Verwendung ausgewählter Restriktionsendonukleasen, auch Restriktionsenzyme genannt, geschnitten. Diese Enzyme sind natürlich vorkommende bakterielle Enzyme, die die doppelsträngige DNS an bestimmten Basensequenzen zerschneiden. Je nach Ansatz und Schnittstellen in der verwendeten DNA ergeben sich unterschiedlich viele lineare Schnittprodukte, die anschließend in der Gelelektrophorese nach Masse aufgetrennt werden können.

#### **4.3.2 Dephosphorylierung von DNS (CIP)**

Nach Verdau der Vektor-DNS mit dem Restriktionsenzymen ist zu verhindern, dass die beiden gerade getrennten Enden sich wieder miteinander verbinden und somit der Einbau



des Inserts im Ligationsschritt verhindert wird. Eine alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP, *calf intestine alkaline phosphatase*) entfernt die Phosphate der 5'-Enden der Vektorfragmente. Das Insert hingegen bleibt unbehandelt und kann mit seinen verbleibenden Phosphatresten in die Vektor-DNS ligiert werden. Für die Dephosphorylierung wird auf 100 µl Restriktionsansatz 2 µl CIP für 2h bei 37°C gegeben.

### 4.3.3 Ligation

Ziel einer Ligation ist es, ein bestimmtes DNS-Fragment in einen bereits geöffneten Vektor zu integrieren, um das zirkuläre Plasmid anschließend in kompetente Bakterien einzuschleusen und vermehren zu lassen. Während der Ligation werden freie 5'-Phosphatgruppen mit ebenfalls freien 3'-OH-Gruppen miteinander verbunden. Die verwendete T4 Ligase (NEB) arbeitet sowohl mit glatten Enden als auch mit überhängenden Enden. Wichtig ist lediglich, dass beide zu verbindenden Fragmente zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut wurden. Um zu verhindern, dass der durch die Restriktionsenzyme linearisierte Vektor an seinen Enden selbst wieder verbunden und damit ohne Insert geschlossen wird, werden die Phosphate zuvor in einer eigenen Dephosphorylierungsreaktion entfernt (siehe 4.3.2). Für die Ligationen wurde mit einem Insert zu Vektor-Massenverhältnis von 10:1 gearbeitet. Dabei wurden stets 15 ng an Vektor eingesetzt. Entsprechend den Längen der Plasmidabschnitte, die zusammengefügt werden sollen, muss die Menge des Inserts berechnet werden.

$$\text{Menge Insert [ng]} = 10 * \text{Menge Vektor-DNS [ng]} * \frac{\text{Länge Insert-DNS [bp]}}{\text{Länge Vektor-DNS}}$$

| Ligationsansatz |                      |
|-----------------|----------------------|
| x µl            | Vektor-DNS (15 ng)   |
| siehe Gleichung | Insert-DNS           |
| 2 µl            | 10x T4 Ligase Puffer |
| 1 µl            | T4 Ligase            |
| ad 20 µl        | H <sub>2</sub> O     |

Der Ligationsansatz wird über Nacht bei 16°C im Wasserbad oder alternativ bei 4°C im Kühlschrank inkubiert und am nächsten Morgen 10 Min bei 65°C inaktiviert. Für die anschließende Transformation in kompetente Zellen gibt es zwei Optionen: chemisch oder elektrisch. Als Vorbereitung für die elektrische Transformation wird die DNS mit Ammoniumacetat und tRNA gefällt und mit 70% Ethanol gewaschen (siehe 4.2.5).

#### **4.4 Präparation von Plasmid-DNS aus Bakterienkulturen (*E.coli*)**

Nach erfolgreicher Vermehrung der fremden Plasmide in Bakterien gibt es je nach Zielsetzung unterschiedliche Methoden, die gewünschten Plasmide von den bakteriellen Anteilen zu separieren. Üblicherweise werden die Plasmide mittels alkalischer Lyse extrahiert. Während bei einer Minipräparation darauf Wert gelegt wird, in möglichst kurzer Zeit viele Ansätze mit minimalen Arbeits- und Zeitaufwand zu bearbeiten, steht bei einer Maxipräparation vor allem die möglichst saubere DNS-Aufreinigung im großen Stil im Vordergrund.

##### **4.4.1 Minipräparation**

Für eine Minipräparation werden am Tag zuvor je 7 ml LB-Medium in Kulturröhrchen überführt und autoklaviert. Jedes Röhrchen wird unmittelbar vor dem Animpfen mit dem gewünschten Bakterienklon und 14 µl Antibiotikum (Ampicillin, 50 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 225 rpm und 37°C inkubiert. Am Folgetag wird das Medium aus dem Kulturröhrchen in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 3500xg 10 Min zentrifugiert. Nach Abzentrifugieren der Bakterien werden die flüssigen Kulturbestandteile verworfen. Das Bakterienpellet wird in 250 µl alkalischem Puffer 1 resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl Puffer 2 und Mischen kommt es zur alkalischen Lyse der Bakterien. Nach 5 Min Inkubation bei Raumtemperatur sind die Bakterien lysiert. Anschließend werden 250 µl Puffer 3 hinzugegeben, der angesäuerte Ansatz gut durchgemischt und 15 Min auf Eis inkubiert.

Währenddessen fällt das Kalium-SDS mit den Bakterienproteinen in Flocken aus. Nach 15 Min Zentrifugation bei 15 000xg und 4°C ist das Kalium-SDS als Pellet am Boden des Caps sichtbar und der klare Überstand kann abgenommen und in neues Cap überführt werden. Die DNS wird mit 525 µl 100 % Isopropanol gefällt und 15 Min bei 15 000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abermals verworfen. Im Anschluss werden mit 800 µl 70% Ethanol Salz- und Isopropanolreste ausgewaschen und 5 Min bei 15 000xg und 4°C abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wird 10 Min in der Speed-vac (Bachofer) getrocknet und abschließend in 20 µl H<sub>2</sub>O gelöst

| Minipräparation-Puffer 1 (MP 1) |                       | Minipräparation-Puffer 2 (MP 2) |                  |
|---------------------------------|-----------------------|---------------------------------|------------------|
| 6,06 g                          | Tris                  | 8 g                             | NaOH-Plätzchen   |
| 3,72 g                          | EDTA H <sub>2</sub> O | 800 ml                          | H <sub>2</sub> O |
| 800 ml                          | H <sub>2</sub> O      | 100 ml                          | 10% SDS-Lösung   |
| mit HCL                         | auf pH 8,8            | ad 1000 ml                      | H <sub>2</sub> O |
| 100 mg                          | RNase A               | bei RT lagern                   |                  |
| ad 1000 ml                      | H <sub>2</sub> O      |                                 |                  |
| bei 4°C lagern                  |                       |                                 |                  |

| Minipräparation-Puffer 3 (MP 3) |                  |
|---------------------------------|------------------|
| 294,5 g                         | Kaliumacetat     |
| 500 ml                          | H <sub>2</sub> O |
| mit Eisessig                    | auf pH 5,5       |
| ad 1000 ml                      | H <sub>2</sub> O |
| bei 4°C lagern                  |                  |

#### 4.4.2 Maxipräparations-Kit von Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden)

Zunächst wird eine Vorkultur in 7ml LB-Medium mit 14 µl Ampicillin und einer Kolonie des gewünschten Klons angeimpft. Nach 2 Stunden bei 37°C, 225 rpm, haben sich die Bakterien ausreichend vermehrt, um in ein 100 ml LB-Medium mit 200 µl Ampicillin-Antibiotikum (0,2 %) überführt zu werden. Nach Inkubation der Bakterien über Nacht bei 37 °C, 225 rpm, werden von den Bakterienkulturen Glycerolstocks angelegt (siehe 4.1.7). Die restlichen Bakterien werden bei 5000xg, 4°C, 10 Min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig

abgekippt und das Bakterienpellet mit 10 ml Puffer P1 (4°C, Firma Qiagen) resuspendiert. Zur Bakteriensuspension werden 10 ml Puffer 2 (RT, Firma Qiagen) hinzugegeben, über Kopf gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend werden 10 ml Puffer 3 (4°C, Firma Qiagen) dazupipettiert und 20 Min auf Eis inkubiert. Die lysierten Bakterienbestandteile werden 30 Min lang bei 25000xg und 4°C in einer Ultrazentrifuge mit dem Rotor 45Ti abzentrifugiert.

Bevor der klare Überstand auf die Qiagen-tip 500 Säule (Qiagen) gegeben wird, wird die Säule mit 10 ml Puffer QBT (Qiagen) äquilibriert. Nach zweimaligem Waschen mit dem Puffer QC (Firma Qiagen) wird die aufgefangene Plasmid-DNS mit 15 ml Puffer QF eluiert und in einem 50 ml Falcon mit 10,5 ml vorgelegtem Isopropanol (RT) aufgefangen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (60 Min, 5000xg, 4°C) wird das Pellet nochmals mit 10 ml 70% Ethanol (4°C) gewaschen und 30 Min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wird das DNS-Pellet unter Vakuum in der Speed-vac etwa 10 Min getrocknet und in 250 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Die Konzentrationsbestimmung wird mit Hilfe des Nanodrop®Spectrophotometer ND-1000 (Peachlab) durchgeführt.

#### **4.4.3 Speed-vac**

Kleine Volumina an Flüssigkeit können innerhalb kürzester Zeit in der Speed-vac getrocknet werden. Unter Vakuum erniedrigt sich der Siedepunkt des Lösungsmittels (meist Wasser oder Ethanol) und verdampft dadurch rascher. Um zu verhindern, dass DNS-Anteile durch aufsteigende Gasblasen verloren gehen, werden die Proben gleichzeitig zentrifugiert.

## 4.5 Zellkultur

### 4.5.1 HEK-Zellen

Die HEK-Zellreihe hat ihren Ursprung in embryonalen Nierenzellen des Menschen (*human embryonic kidney cells*, HEK). In den frühen 1970er Jahren entwickelten die Wissenschaftler Alex Van der Erb und Frank Graham diese Zellreihe aus Nierenzellen gesunder Fehlgeburten, die mit dem Adenovirus 5 transfiziert wurden. Ein etwa 4,5 kb langes Stück des DNS-Genoms des humanen Adenovirus 5 wurde hierbei integriert. Eine Variante sind die HEK293T-Zellen. Durch eine neu aufgenommene, genetische Information exprimiert die 293T-Art das *SV40 Large T-Antigen*. Dieses ermöglicht die Aufnahme, Integration und DNS-Replikation von Plasmiden, die den SV40-Replikationsursprung enthalten. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendet pcDNA3-Plamid trägt diesen SV40-Replikationsursprung und ist daher für die Plasmidexpression in der HEK-Zellkultur geeignet. Die einschichtig wachsenden HEK-Zellen werden in Quantum286 (PAA) bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C gezüchtet. Unter diesen Bedingungen verdoppelt sich ihre Zellzahl etwa alle 34 h. Der Name HEK293 resultiert aus der Gegebenheit, dass dies Frank Grahams 293. Experiment mit diesen Zellen war (Graham et al, 1977).

### 4.5.2 Medien

Als Nährmedium wird Quantum286 (PAA) verwendet. Um unerwünschtes Bakterien- und Pilzwachstum zu vermeiden, wird eine Kombination aus Antibiotikum und Antimykotikum, Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep)(Invitrogen), zugefügt.

| Quantum 286 + Pen/Strep |                |
|-------------------------|----------------|
| 500 ml                  | Quantum 286    |
| 5 ml                    | 100x Pen/Strep |

Quantum286 ist ein Bicarbonat-gepuffertes Medium für Epithelzellen, welches darüber hinaus Wachstumsfaktoren, Serum, Spurenelemente und Proteine aus Hefen und Sojabohnen enthält. Die Zusätze beeinflussen den zelltypischen Metabolismus nicht.

### 4.5.3 Transfektion von HEK293T-Zellen

Um HEK293T-Zellen mit der favorisierten DNS zu transfizieren, ist eine Konfluenz der Zellen von etwa 70-80% optimal. Während des Transfektionsexperiments wird auf den Zusatz von Pen/Strep verzichtet. Um ein Plasmid in die HEK293T-Zellen einzuschleusen, muss das genetische Material die Zellmembran passieren. Lipofectamin 2000 (Invitrogen) nutzt für die Zellmembranpassage das Prinzip der Lipofektion: die cDNA wird in Liposomen verpackt und kann somit die Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran durchwandern. Da die cDNS insgesamt negativ geladen ist, werden positiv geladene Lipide verwendet, um einen Liposomen-cDNS-Komplex zu bilden. Auch Metafectene Pro (Biontex) als polykationisches Transfektionsreagenz bildet liposomale Strukturen aus und ermöglicht dadurch das Einschleusen von Plasmiden in die Zelle.

In dieser Arbeit wurde Lipofectamin 2000 (Invitrogen) für die Transfektion im Rahmen des Immunostainings verwendet. Metafectene Pro (Biontex) hingegen wurde für die Proteingewinnung aus transfizierten HEK293T-Zellen eingesetzt.

#### Metafectene Pro (Biontex)

Je nach Größe der zu transfizierenden Flaschen oder Platten müssen die DNS-, Metafectene Pro und Mediummengen angepasst werden:

| Größe              | DNS   | Metafectene | Optimem-reduced |
|--------------------|-------|-------------|-----------------|
| 75 cm <sup>2</sup> | 18 µg | 52,5 µl     | je 875 µl       |

Die entsprechende Menge DNS wird in das *OptiMEM reduced Serum Medium with GlutaMAX* (Invitrogen), ein HEPES- und Bicarbonat-gepuffertes Kulturmedium, gegeben und

vorsichtig gemischt. Der Metafectene-Ansatz wird ebenfalls in *OptiMEM reduced Serum Medium with GlutaMAX* (Invitrogen) gegeben und gemischt. Anschließend werden der DNS-Ansatz und der Metafectene-Ansatz zusammengeführt, vorsichtig vermengt und bei Raumtemperatur für 15-20 Min inkubiert. Der DNA-Lipid-Komplex wird daraufhin auf die vorbereiteten Zellen gegeben, in der Flasche durch Schwenken gleichmäßig verteilt und etwa 25 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, im Brutschrank inkubiert. Während der Transfektion wird ein antibiotikafreies Quantum286-Medium (PAA) eingesetzt.

#### Lipofectamin 2000 (Invitrogen)

Analog zur Transfektion mit Metafectene Pro (Biontex) wird im Lipofectamin 2000-Protokoll die zu transfizierende DNS-Menge, das Mediumvolumen und das eingesetzte Transfektionsreagenz an die Größe des Transfektionsgefäßes angepasst.

| Größe                     | DNS    | Lipofectamin 2000 | Optimem-reduced |
|---------------------------|--------|-------------------|-----------------|
| 2 well/ 4 cm <sup>2</sup> | 1,6 µg | 4 µl              | je 100 µl       |

Lipofectamin 2000 wurde für die Transfektion im Rahmen des Immunofluoreszenzversuches angewendet. Das maximale Volumen des 2-Well-Reagenzgefäßes umfasst 2 ml. Die DNS wurde mit *OptiMEM reduced Serum Medium with GlutaMAX* (Invitrogen) gemischt. Ebenso wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 zu *OptiMEM reduced Serum Medium with GlutaMAX* (Invitrogen) gegeben und für 5 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze vermengt und weitere 20 Min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird das Reaktionsgemisch auf die Zellen gebracht. Nach 24 h bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgt der erste Mediumwechsel. Auch die Transfektion mit Lipofectamin 2000 erfolgt im antibiotika- und antimykotikafreiem Medium.

#### **4.5.4 Auftauen eines HEK293T-Gefrierstock**

Ein Gefrierstock an HEK293T-Zellen wird rasch in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Das 1 ml Zellaliquot wird in 5 ml Quantum286 (+Pen/Strep) resuspendiert und 5 Min bei

1000 rpm (RT) zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt. Das entstandene Zellpellet wird in 1ml Quantum286 (+Pen/Strep) gelöst und in eine 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche gegeben, in der bereits 14 ml Quantum286 (+Pen/Strep) vorgelegt wurden. Durch sanfte, kreisende Bewegungen entlang der Arbeitsoberfläche werden die Zellen gleichmäßig auf dem Flaschenboden verteilt. Das Wachstum der Zellen erfolgt bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank.

#### 4.5.5 Kultivierung und Passagieren von HEK293T-Zellen

Die HEK293T-Zellen werden nach Absaugen des alten, verbrauchten Mediums zweimal mit 1x PBS gewaschen (ca. 15 ml). Um die Adhäsion der Zellen an den Flaschenboden aufzuheben, werden sie 1 Min lang mit 1x Trypsin/EDTA bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Anschluss werden die losgelösten HEK293T-Zellen mit 5 ml Quantum286 (+Pen/Strep) gespült und gegen den Flaschenboden durch auf- und abpipettieren vereinzelt. Die Zellsuspension wird bei 1000 rpm (RT) 5 Min abzentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt. Üblicherweise werden die Zellen im Verhältnis 1:3 bzw. 1:6 ausgebracht. Für ein Splitverhältnis von 1:6 wird das Zellpellet in 6 ml Medium Quantum286 (+Pen/Strep) resuspendiert. In den 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen werden 14 ml Quantum286 (+Pen/Strep) vorgelegt und 1 ml der verdünnten Zellsuspension hinzugegeben. Um die Zellen gleichmäßig auf dem Flaschenboden zu verteilen, vollführt man mit den Flaschen Bewegungen in Form einer „8“ entlang der Arbeitsfläche. Für das Wachstum der HEK293T-Zellen sind 37°C bei 5% CO<sub>2</sub> optimal.

| 1x Trypsin/EDTA                     |                  | 1x PBS, pH 7,4 |   |
|-------------------------------------|------------------|----------------|---|
| 10 ml                               | 10x Trypsin/EDTA | 40 g           | NaCl  |
| 90 ml                               | 1x PBS           | 1 g            | KCl   |
|                                     |                  | 7,2 g          | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O |
|                                     |                  | 1,2 g          | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     |
|                                     |                  | ad 5000 ml     | H <sub>2</sub> O                                    |
| steril filtrieren, bei -20°C lagern |                  | autoklavieren  |   |



#### 4.5.6 Herstellen eines Gefrierstocks der HEK293T-Kultur

HEK293T-Zellen können längerfristig in flüssigem Stickstoff in einem speziellen Gefriermedium aufbewahrt werden. Hierfür werden die HEK293T-Zellen in den Flaschen zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit 3 ml 1x Trypsin 1 min lang bei 37°C inkubiert. Daraufhin werden die Zellen in 5 ml Quantum (+Pen/Strep) gelöst und 5 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in Cryoröhrchen langsam bei -20 °C, -80°C und schlussendlich in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

##### Einfriermedium HEK293T-Zellen (10%)

|          |                                |
|----------|--------------------------------|
| 1 ml     | DMSO                           |
| Ad 10 ml | Quantum286<br>(ohne Pen/Strep) |

#### 4.6 Biochemische Methoden zur Proteingewinnung

##### 4.6.1 Ernten von HEK293T-Zellen

Um transfizierte HEK293T Zellen zu ernten, werden sie nach dem Absaugen des alten Mediums zweimal mit 20 ml kaltem 1x PBS gewaschen. Mit 5 ml 1x PBS werden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden gelöst und mit einer Stripette durch Auf- und Abpipettieren gegen den Flaschenboden weiter vereinzelt. Die Zellsuspension wird bei Raumtemperatur 5 Min mit 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für den Aufschluss der Zellen müssen diese mindestens 1 h lang bei -80°C gelagert werden.

#### 4.6.2 SDS-Aufschluss

Das bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorene HEK293T-Zellpellet wird auf Eis aufgetaut und in 1 ml warmen Tris-SDS-Puffer gelöst. Die Zellsuspension wird in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für 15 Min bei  $95^{\circ}\text{C}$  gekocht und zwischenzeitlich regelmäßig gevortext. Bei 15000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  werden die Zellbestandteile 10 Min lang abzentrifugiert und der proteinhaltige Überstand in Aliquots bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

| Tris-SDS-Puffer   |                      |
|-------------------|----------------------|
| 500 $\mu\text{l}$ | 1 M Tris (pH 7,5)    |
| 2 ml              | 10% SDS              |
| ad 10 ml          | $\text{H}_2\text{O}$ |

#### 4.6.3 Membranproteinpräparation aus HEK293T-Zellen

Das bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorene HEK-Zellpellet wird auf Eis aufgetaut, in 0,5 ml Mikrosomenpuffer A inklusive der Inhibitoren gelöst und in ein 1,5 ml Cap überführt. Das 15 ml Falcon wird nochmals mit 0,5 ml Mikrosomenpuffer A mit Inhibitoren nachgespült und zu den bereits vorgelegten 0,5 ml gelösten Zellen gemischt. Nach Aufteilen des Volumens auf zwei 1,5 ml große Caps wird jedes Cap bei maximaler Geschwindigkeit jeweils dreimal 5 Sek lang gepottert. Zwischenzeitlich werden die Caps immer wieder auf Eis gestellt. Im Anschluss werden die großen Proteine bei 3500 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , 5 Min lang abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, in ein vorgekühltes Ultrazentrifugen-Cap überführt und auf der Waage austariert. Bei 38000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  werden die Proben 45 Min zentrifugiert und anschließend die Überstände verworfen. Die Pellets werden in 150  $\mu\text{l}$  Mikrosomenpuffer A inklusive der Inhibitoren gelöst und als Aliquots bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

| Mikrosomenpuffer A |                      | Inhibitoren    |                             |
|--------------------|----------------------|----------------|-----------------------------|
| 0,5 ml             | 0,5 M EDTA           | PMSF           | 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$   |
| 2,5 ml             | 1 M Tris pH 8,0      | Calpain I      | 0,8 $\mu\text{l}/\text{ml}$ |
| ad 50 ml           | $\text{H}_2\text{O}$ | Calpain II     | 0,8 $\mu\text{l}/\text{ml}$ |
| pH 7,4 einstellen  |                      | Sigma Cocktail | 2 $\mu\text{l}/\text{ml}$   |

#### 4.6.4 Quantitative Proteinbestimmung

Zur quantitativen Bestimmung der gewonnenen Proteinkonzentrationen über SDS-Aufschluss oder Membranpräparation wird der Pierce BCA Protein Assay (Pierce, Thermo Scientific) verwendet. Zugrunde liegen hierbei zwei aufeinanderfolgende Reaktionen. Zunächst reduziert die alkalische Proteinlösung  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  (Biuret-Reaktion). Daraufhin bilden je zwei Bicinchoninsäuren (BCA) mit einem soeben entstandenen, einwertigen Kupferion einen Chelatkomplex, der der Proteinlösung einen violetten Farbton verleiht. Die Absorption bei 562 nm nimmt mit steigender Proteinkonzentration stetig zu und wird mittels eines Photometers gemessen und ausgewertet. Als Standard zur Erstellung der Kalibrierungskurve wird eine BSA- (*bovine serum albumin*) Verdünnungsreihe von 0,5 µg bis 5 µg aufgestellt. Auch die zu bestimmende Proteinlösung wird verdünnt (1:50, 1:100, 1:200). Für die BCA-Reaktion werden zu 50 µl Protein- bzw. Standardverdünnung jeweils 200 µl BCA-Reagenz hinzupipettiert. Das BCA-Reagenz setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: BCA I und BCA II im Mischverhältnis 50:1. Nach 60 Min Inkubation bei 60°C ist der Farbumschlag ins Violette zu sehen. Die Verdünnungen werden auf eine Mikrotiterplatte überführt und ihre Absorptionen bei 562 nm in einem Photometer (Titertek Multiskan MCC/340) ermittelt. Anhand der Absorption der BSA-Verdünnungen wird eine Kalibrierungskurve erstellt, mit deren Hilfe die Proteinkonzentrationen der Membranpräparation bzw. des SDS-Aufschlusses berechnet werden können.

#### 4.6.5 Western-Blot

##### Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine bilden mit der Seife SDS (Natriumdodecylsulfat, *sodium dodecyl sulfate*) einen negativ geladenen Komplex. Als Vorbereitung werden die Proben in 4x Lämmli-Puffer (DTT-haltig) 5 Min lang bei 95°C aufgeköcht. Abhängig von der gewünschten Proteinmenge, die auf das Gel aufgetragen werden soll, werden der Lämmli-Puffer und die Proteinlösung im

Verhältnis 1:3 gemischt. Das Maximalvolumen von 24 µl pro Reaktionsgefäß ist jedoch nicht zu überschreiten.

| <b>4x Probenpuffer (Lämmli)</b> |                  |
|---------------------------------|------------------|
| 200 mM                          | Tris/HCL, pH 6,7 |
| 5%                              | SDS              |
| 200 mM                          | DTT              |
| 0.04%                           | Bromophenolblau  |
| 40%                             | Glycerin         |

Durch das Kochen werden die Wasserstoffbrücken aufgespalten und die Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen der Proteine zerstört. Das hinzugefügte Dithiothreitol (DTT) reduziert die Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen. Dadurch wird die Ausbildung von Quartärstrukturen durch Protein-Protein-Interaktion verhindert. Die denaturierten Proteine unterscheiden sich nun lediglich in ihrer Größe, bei weitgehend gleichen hydrodynamischen Eigenschaften. Ein unterschiedliches Trennverhalten auf dem Gel aufgrund der Proteinfaltung ist somit ausgeschlossen. Nach dem Aufkochen der Proben werden diese abzentrifugiert und bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis gestellt.

Zunächst wird das SDS-Polyacrylamid-Elektrophoresegel (SDS-PAGE) gegossen.

| <b>4x TrisCl/SDS, pH 8,8</b> |                  | <b>4x TrisCl/SDS, pH 6,8</b> |                  |
|------------------------------|------------------|------------------------------|------------------|
| 18,2 g                       | Tris             | 3,02 g                       | Tris             |
| 0,4 g                        | SDS              | 0,2 g                        | SDS              |
| ad 80 ml                     | H <sub>2</sub> O | ad 40 ml                     | H <sub>2</sub> O |
| mit HCL                      | auf pH 8,8       | mit HCL                      | auf pH 6,8       |
| ad 100 ml                    | H <sub>2</sub> O | ad 50 ml                     | H <sub>2</sub> O |

| <b>Trenngel 10%</b> |                     | <b>Sammelgel 10%</b> |                     |
|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| 1,67 ml             | Acrylamid (29:1)    | 325 µl               | 30% Acrylamid/      |
| 1,25 ml             | 4x Tris/SDS, pH 8,8 |                      | 0,8% Bisacrylamid   |
| 2,08 ml             | H <sub>2</sub> O    | 625 µl               | 4x Tris/SDS, pH 6,8 |
| 5 µl                | TEMED               | 1, 525 ml            | H <sub>2</sub> O    |
| 12,5 µl             | APS 20%             | 3 µl                 | TEMED               |
|                     |                     | 6 µl                 | APS 20%             |

Hierfür wird die Gelkassette (Biorad) dicht aufgebaut. Das Trenngel wird zwischen die beiden Glasplatten gegossen, bis noch ca. 1,5 cm Platz bis zur oberen Glaskante frei sind. Das Gel wird mit 100%igem Ethanol überschichtet, um eine gerade Trennlinie zu erhalten. Nach 30 Min ist das Gel fest und hat eine feinmaschige Polyacrylamidmatrix ausgebildet. Der Ethanol wird abgegossen und Reste mit H<sub>2</sub>O ausgespült. Verbleibende Flüssigkeitstropfen können mit einem Filterpapier herausgesaugt werden. Daraufhin wird das Sammelgel über das bereits feste Trenngel eingegossen und der Kamm in das Gelgerüst gesteckt. Die Zinken des Kammes erzeugen die Probestaschen. Nach weiteren 30 Min ist auch das Sammelgel fest.

Das Gel wird in die MiniProtean3Cell Gelkammer (Biorad) eingespannt und die Kammer mit 1x SDS-Elektrophorese-Puffer befüllt. Hierfür wird der 10x SDS-Elektrophorese-Puffer 1:10 verdünnt (1x SDS-Elektrophorese-Puffer).

| <b>10x SDS-Elektrophorese-Puffer</b> |                  |
|--------------------------------------|------------------|
| 30,2 g                               | Tris             |
| 144 g                                | Glycin           |
| 10 g                                 | SDS              |
| ad 1000 ml                           | H <sub>2</sub> O |

Die Proteinansätze werden in die Probestaschen des Sammelgels pipettiert. Pro Gel werden einmal 6 µl Proteingrößenstandard (Precision Plus Protein Standard, Biorad) aufgetragen. Zu Beginn laufen die Proben etwa 30 Min lang bei 50 V im Sammelgel in Richtung Trenngel. Sobald sich die Lauffront, die durch den zugesetzten Farbstoff Bromphenolblau zu erkennen ist, im Trenngel befindet, werden die Proteine bei 80-150 V weiter aufgetrennt. Die Auftrennung der Proteine ist ausreichend, sobald der Proteinstandard aus dem Gel herausläuft.

#### Analyse des Western-Blots

Für die Western-Blot Analyse wird ein halbtrockenes Verfahren verwendet. Die Proteine des Trenngels werden elektrophoretisch auf eine hydrophobe Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran (Immobilon-P, Millipor, Porengröße 0,45 µm) übertragen. Pro Blot werden 10

Filterpapiere (Whatman 3 MM, neolab 190g/m<sup>2</sup>) auf das Format 8,5 x 6 cm zurechtgeschnitten.

| Anodenpuffer I, pH 10,4 |                  | Anodenpuffer II, pH 10,4 |                  |
|-------------------------|------------------|--------------------------|------------------|
| 36,3 g                  | Tris             | 3,03 g                   | Tris             |
| 100 ml                  | Methanol         | 100 ml                   | Methanol         |
| ad 1000ml               | H <sub>2</sub> O | ad 1000 ml               | H <sub>2</sub> O |
| 300 mM                  | NaCl             | 1%                       | Deoxycholat      |

| Kathodenpuffer |                  |
|----------------|------------------|
| 3,03 g         | Tris             |
| 5,2 g          | 6-N-Hexansäure   |
| 200 ml         | techn. Methanol  |
| ad 1000 ml     | H <sub>2</sub> O |

Davon werden drei Stück in den Anodenpuffer I, zwei in den Anodenpuffer II und fünf in den Kathodenpuffer gelegt. In gleicher Größe wird eine PVDF-Membran kurz in Methanol aktiviert und anschließend in den Anodenpuffer II gelegt. Auf die untere Platte der Blotkammer werden die drei mit Anodenpuffer I getränkten Filterpapiere gelegt, gefolgt von zwei Filterpapieren aus dem Anodenpuffer II. Nun wird das Gel vorsichtig von der Glasplatte gelöst und exakt auf den Papieren platziert. Nach Auflegen der PVDF-Membran werden die fünf im Kathodenpuffer getränkten Filterpapiere auf die Membran gelegt. Zu beachten ist, dass die Filterpapiere jeweils luftblasenfrei übereinander liegen. Darauf wird der Kathoden (+) Pol gesetzt und die ganze Apparatur beschwert. Pro Gel müssen 42mA (0,8 mA pro cm<sup>2</sup>) für 60-80 Min angelegt werden. Anschließend wird die Membran von Gel und Filterpapieren getrennt und der Proteinstandard und die Proteinoberseite markiert. Bevor auf dem fertigen Blot die Proteine durch Antikörper detektiert werden können, müssen die noch freien Proteinbindungsstellen der PVDF-Membran gesättigt werden. Hierfür wird eine BSA-haltige Blocking-Lösung verwendet. Hierfür wird das 10x TBS 1:10 verdünnt (1x TBS) und 0,1% Tween 20 zugegeben. Der Blot wird in der Blocking-Lösung bei 4°C über Nacht auf einem Taumelmischer (Neolab) im Kühlraum inkubiert.

| Block-Lösung |         | 10x TBS    |                  |
|--------------|---------|------------|------------------|
| 0,6 g        | BSA     | 12,1 g     | Tris             |
| 20 ml        | 1x TBST | 87,6 g     | NaCl             |
|              |         | ad 800 ml  | H <sub>2</sub> O |
|              |         | mit HCL    | auf pH 8,2       |
|              |         | ad 1000 ml | H <sub>2</sub> O |

### Immunfärbung

Die aufgetragenen Proteine werden als Antigene mittels Antikörper detektiert. Hierfür wird die PVDF-Membran nach dem Blocken kurz mit 1x TBST gewaschen. Der passende primäre Antikörper wird in 5 ml 1x TBST mit 5% BSA und 0,05% NaN<sub>3</sub> in einem 50 ml Falcon verdünnt. Die Blotmembran wird so in das Falcon gelegt, dass ihre Proteinseite zur Antikörperlösung hin gerichtet ist. Nach 1,5 h auf dem Taumelmischer (Neolab) werden die nicht gebundenen Antikörper 3x für jeweils 10 Minuten in 1x TBST mit 1% BSA abgewaschen. 2 µl des sekundären Antikörpers werden auf 10 ml 1x TBST gegeben. Der Blot wird wiederum in das antikörperhaltige Falcon eingebracht und 1 h lang im Überkopfschüttler benetzt. Für den zweiten Waschgang sind 2x je 5 Minuten in 1x TBST mit 1% BSA und 2x je 10 Min in 1x TBST vorgesehen.

### Auswertung des Western-Blots

Der sekundäre Antikörper ist mit einer Peroxidase markiert. Die Peroxidase beschleunigt die Oxidation von Luminol und löst eine Emission von elektromagnetischen Wellen aus, die mit einem Film detektiert werden kann. Für die Chemilumineszenzreaktion müssen je 1 ml Chemiluminescence Reagent und Oxidizing Reagent (Western Lightning Chemiluminescence Kit, PerkinElmer) gemischt werden. Die Membran wird mit der Proteinseite in das Lösungsgemisch gelegt und 1 Min inkubiert. Anschließend wird der Blot zügig in der Filmkassette fixiert, da die Leuchtkraft der Reagenzien nach einiger Zeit nachlässt. In der Dunkelkammer wird ein Photofilm (Hyperfilm ECL, GE) für 10 Min aufgelegt und anschließend entwickelt (Entwicklermaschine Curix 60, AGFA). Je nach Resultat, wird die Inkubationszeit des Photofilms verkürzt oder verlängert.

## **4.7 Detektion von Zellstrukturen**

Um spezifische Strukturen der HEK293T-Zellen darzustellen, stehen unterschiedliche Marker zur Verfügung. Für die Detektion intrazellulärer Moleküle werden zellmembranpermeable Substanzen eingesetzt. Daneben spielen nicht-permeable Marker in der Darstellung oberflächlicher Strukturen eine Rolle. In dieser Arbeit wurden sowohl immunologische Antikörper-Antigen-Reaktionen als auch Interkalierungen mit der DNS herangezogen, um Proteine oder DNS für die Mikroskopie sichtbar zu machen. Ein weiteres Prinzip stellt die fluoreszenzgekoppelte Enzymreaktion des SNAP-tag dar. Diese Technologie wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht für die Darstellung des spannungsabhängigen Kalziumkanals in den HEK293T-Zellen verwendet, sondern für zukünftige Versuche im Mausmodell in den Vektor integriert. Eine Erläuterung des theoretischen Hintergrunds ist unter 1.3.2 zu finden.

### **4.7.1 Zellkernfärbung**

Die Hoechst-Färbung gehört zu der Klasse der blau-fluoreszierenden Farbstoffe, die mit der kleinen Furche der doppelsträngigen DNS interkaliert. Besonders Adenin- und Thymin-reiche Sequenzen der DNS dienen als Bindestelle des Hoechst-Farbstoffs. Charakteristisch ist außerdem die Membranpermeabilität dieses Markers, wobei Hoechst 33342 im Vergleich zu anderen Hoechst-Farbstoffen etwa 10fach leichter membranpermeabel ist. In dieser Arbeit wurden die zwei Hoechst Marker 33528 und 33342 verwendet. Beide Farbstoffe werden von Licht der Wellenlänge 350 nm angeregt und emittieren daraufhin im gebundenen Zustand elektromagnetische Wellen mit einem Maximum von 461 nm. Sind die Moleküle nicht gebunden, wird Licht von 510-540 nm ausgesandt. Die Emissionen werden durch Xenon-Lampen, Mercury-Arc-Lampen oder Ultravioletten Laser detektiert.

#### Durchführung der Zellkernfärbung

Die Zellkernfarbstoffe wurden im Rahmen der Immunofluoreszenzversuche der HEK293T-Zellen eingesetzt. Für eine Darstellung der DNS in nicht permeabilisierten Zellen wurde der



Farbstoff Hoechst 33342 verwendet. In einer Verdünnung von 1:500 in einem 10% FBS haltigem PBS-Ansatz, zusammen mit dem sekundären Antikörper, wird der Farbstoff für 1h bei 37°C auf den Zellen belassen. Für permeabilisierte Zellen wird Hoechst 33528 in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt

#### **4.7.2 Immunofluoreszenz**

Werden spezifische zelluläre Strukturen mit Hilfe von Antikörpern mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, spricht man von Immunofluoreszenz. Man unterscheidet hierbei zwischen der direkten und der indirekten Immunofluoreszenz. Während bei der direkten Reaktion ein Fluorochrom-tragender Antikörper die Zielstruktur direkt erkennt, ist bei der indirekten Immunofluoreszenzmethode zunächst ein spezifischer primärer Antikörper notwendig. Dieser wird in einem zweiten Schritt von einem sekundären Antikörper erkannt. An diesen ist ein Farbstoff gekoppelt, der für die Fluoreszenzreaktion verantwortlich ist. Die verwendeten sekundären Antikörper Alexa Fluor 594 (goat) und Alexa Fluor 594 (rabbit) zeichnen sich im Vergleich zu früher angewendeten Fluoreszenzkonjugaten wie Texas Red Dye durch ein stärker fluoreszierendes Signal und eine größere Photostabilität aus. Darüberhinaus sind diese Antikörper in pH-Arbeitsbereichen zwischen pH 4-10 sehr unproblematisch einzusetzen (Panchuk-Voloshina, Haugland et al. 1999). Die Detektion der Immunreaktion wird an Fluoreszenzmikroskopen durchgeführt. Diese sind spezielle Lichtmikroskope, die Fluorochrome zunächst mit Licht anregen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Leica DMI 6000 B-Mikroskop verwendet. Die von den fluoreszierenden Stoffen emittierten Wellenlängen werden anschließend herausgefiltert und die Lokalisation des Zielproteins kann beurteilt werden.

##### Durchführung der Immunreaktion

Die Immunofluoreszenz wurde verwendet, um die Expressionslokalisierung des LK1-Ca<sub>v</sub>1.2-Kanals des Kaninchens in HEK293T-Zellen darzustellen. Dazu wurden HEK293T-Zellen auf 2-Wells (Lab-Tek™ II, Chamber Slide™-System, Thermo Scientific) ausgebracht und bis zu einer Konfluenz von 70-80% bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> herangezüchtet. Für die Transfektion der Zellen,

die das SNAP-LK1-HA-tag-Konstrukt bzw. die Wildtyp-LK1-DNS tragen, wurde das Protokoll für Lipofectamin 2000 (Invitrogen) herangezogen (siehe Kapitel 4.5.3). In beiden Ansätzen wurde jeweils die  $\beta_2$ -Untereinheit des  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals mittransfiziert.

Die transfizierten HEK293T-Zellen werden durch eine Formaldehyd-PBS-Lösung (3.7% Formaldehyd in 1x PBS +  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ ) für 15 Min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend werden die 2-Well-Platten dreimal mit PBS gewaschen. Nach diesem Schritt der Fixierung können die Zellen bis zur Färbung bei 4°C in PBS gelagert werden. Für die Darstellung intrazellulärer Proteine muss die Zellmembran für Antikörper durchgängig gemacht werden. Mit Hilfe von Saponin, einer oberflächenaktiven Substanz, wird die Membran permeabilisiert. Die Zellen werden 2h in PBS mit 0,1% Saponin und 10% FBS bei 37°C inkubiert. Der primäre Antikörper (1mg/ml) wird in PBS mit 0,1% Saponin und 10% FBS gemischt. Diese Antikörpermixtur wird über Nacht bei 4°C auf den Zellen belassen. Die Zellen werden daraufhin fünfmal mit 0,1% Saponin in PBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper und der Zellkernfärbung (Hoechst Dye 33528, 1:1000 dil.) inkubiert. Beide Reagenzien werden wiederum in PBS mit 0,1% Saponin und 10% FBS appliziert und für 1 h bei 37°C auf die Zellen gegeben.

Abschließend werden die überschüssigen sekundären Antikörper fünfmal mit 0,1% Saponin in PBS abgewaschen. Nach dem Trocknen der Objektträger können diese mit Hilfe von Fluorescent Mounting Medium (Dako) mit einem Deckglas versehen und bei 4°C lichtgeschützt in Alufolie gelagert werden. Ist keine Permeabilisierung der Membran notwendig, so werden alle Schritte ohne 0,1% Saponin durchgeführt. Die Anfärbung der Zellkern-DNS erfolgt hierbei durch Hoechst Dye 33342 (1:500 dil.).



## 5 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, einen Gargetingvektor der  $Ca_v1.2$ -Kalziumkanal-Untereinheit zu konstruieren, der mittels homologer Rekombination in das Genom einer Maus integriert werden kann. Die  $Ca_v1.2$ -Kalziumkanalsequenz des Gargetingvektors ist murinen Ursprungs. In einem Vorversuch wurde die Expression der Kalziumkanaluntereinheit im HEK293T-Modell untersucht. Im cDNA-Vektor, der in der heterologen Überexpression in HEK293T-Zellen eingesetzt wurde, wurde die  $Ca_v1.2$ -Kalziumkanalsequenz aus dem Kaninchen verwendet. Diese Splicevariante des Kalziumkanals stammt aus der glatten Muskulatur und wird kurz als *LK1* bezeichnet. Die Detektion des Kanals nach seiner Expression im Gewebe wird durch das Einfügen zweier zusätzlicher Proteine in die Aminosäuresequenz ermöglicht. Hierfür wurde die SNAP-tag- und die HA-tag-Technologie verwendet.

### 5.1 *pcDNA3-Konstrukte*

#### 5.1.1 Herstellung des *pcDNA3-SNAP-LK1-HA-Konstrukts*

Im Rahmen der Klonierungsstrategie des *pcDNA3-SNAP-LK1-HA-Konstrukts* wurden verschiedene Zwischenvektoren gebaut, in die in einzelnen Schritten neue Restriktionsschnittstellen und Proteinsequenzen eingefügt wurden. Schließlich wurde das Insert des finalen Zwischenvektors wieder in das ursprüngliche *pcDNA3*-Rückgrat zurückgesetzt. Die Strategie ist schematisch in Abb. 10 aufgezeichnet.

#### Rückgrat: 3' LK1-*pcDNA3*

Essentiell für die regelrechte Expression des *LK1-Ca<sub>v</sub>1.2*-Membranproteins in HEK293T-Zellen, ist ein fehlerfreier *pcDNA3*-Vektor. Ein Großteil der 3'-gelegenen *LK1*-Kanalsequenz bleibt unverändert. Daher ist es wichtig, sicherzustellen, dass dieser Abschnitt keine zufällig

eingefügten Mutationen aufweist. Für die abschließende Ligation (siehe 4.3.3) des modifizierten Inserts in das Rückgrat werden Mlul-Schnittstellen verwendet.

Im originalen pcDNA3-LK1-Vektor findet sich *upstream* der HindIII-Schnittstellen, über die die LK1-Sequenz (GenBank™ accession number: X55763.1) in den pcDNA3-Vektor eingebaut wurde, eine unique Mlul-Schnittstelle. Über diese und eine weitere, künstlich eingefügte Mlul-Erkennungssequenz kann das SNAP-HA-Insert in den 3'LK1-pcDNA3-Vektor zurückgesetzt werden.

Über eine QuikChange II-Reaktion mit den Primern *SB\_QCLK1\_Mlul\_fw* und *SB\_QCLK1\_Mlul\_rv* (siehe 4.2.1) wird die Sequenz für das Mlul-Enzym mittels einer stillen Mutation an der Position 2669 des LK1-Gens eingefügt (siehe Abb. 8). Dadurch wird weder der Leserahmen verschoben, noch die Aminosäureabfolge verändert. Eine unveränderte Proteintranslation und –faltung ist zu erwarten.

Im Anschluss an die QuikChange II-Reaktion wird der LK1-pcDNA3-Vektor mit dem Mlul-Enzym verdaut (siehe 4.3.1) und durch das Enzym CIP (*calf intestine alkaline phosphatase*) dephosphoryliert (siehe 4.3.2.) Das gewünschte 3'LK1-pcDNA3-Rückgrat hat eine Größe von 10 kb.

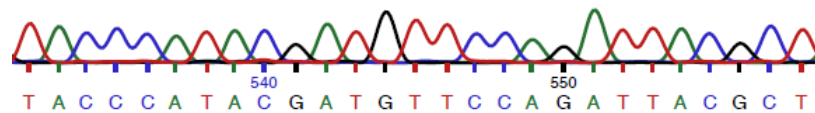


**Abb. 8** Integration der Mlul-Schnittstelle in LK1 (2669)

#### Zwischenvektor: 5'LK1-HA-pBlue

Aus dem originalen LK1-pcDNA3-Vektor wird ein 2 kb großes cDNS-Fragment über eine Mutations-PCR (Primer: *SB\_pcDNA3\_Bam\_fw*, *SB\_pcDNA3\_Sall\_rv*) herausamplifiziert (siehe 4.2.1). Hierbei werden an den Enden die Schnittstellen BamHI und Sall für die Subklonierung im pBluescript-Vektor eingefügt. Anschliessend werden in der zweiten PCR (Primer: *SB\_pcDNA3\_Bam\_fw*, *SB\_HA\_Sal\_Mlu\_rv*) die 27 Basen des HA-tags eingefügt. Für die Amplifikation des zweiten PCR-Produkts im pBluescript-Vektor werden ebenfalls die

Restriktionsschnittstellen BamHI und Sall verwendet. Das PCR-Ergebnis wurde über eine Sequenzanalyse überprüft (Primer *T3*) (siehe Abb. 9). Die Aminosäuresequenz des HA-tags ist in der Literatur beschrieben und wurde in den reversen PCR-Primer (*SB\_HA\_Sal\_Mlu\_rv*) integriert (Altier et al, 2002).



**Abb. 9** Auszug aus der Sequenzanalyse des HA-tags

Über eine weitere QuikChange II-Reaktion (Primer: *SB\_preLK1\_NheI\_fw*, *SB\_preLK1\_NheI\_rv*) wird das Start-ATG der LK1-Sequenz eliminiert und stattdessen in eine NheI-Schnittstelle umgewandelt (siehe 4.2.1). Diese neue Restriktionserkennungssequenz wird für den Einbau der SNAP-tag-Sequenz 5' vor der LK1-cDNA benötigt. Anschließend wird der 5' LK1-HA-pBlue-Vektor mit dem Enzym NheI verdaut und mit Hilfe des Enzyms CIP wiederum dephosphoryliert (siehe 4.3.1, 4.3.2).

#### Zwischenvektor: SNAP-pBluescript

Die SNAP-tag-Sequenz wird im pSNAP-tag-Vektor (NEB) zur Verfügung gestellt. Mittels einer Mutations-PCR unter Verwendung der Primer *SB\_SNAP\_NheBamFW* und *SB\_SNAP\_NheBamRV* wird das SNAP-tag-Fragment amplifiziert und Schnittstellen für die Enzyme BamHI, Sall und NheI eingefügt (siehe 4.2.1). Darüber hinaus enthält der verwendete *forward*-Primer die Kozak- und Start-ATG-Sequenz, die für die Translationsinitiation im HEK-Zellversuch nötig sind. Nach Ligation (siehe 4.3.3) des PCR-Produkts in den pBluescript-Vektor über BamHI und Sall und Subklonierung wird der Zwischenvektor SNAP-pBluescript mit NheI verdaut (siehe 4.3.1). Hierdurch erhält man das 0,6 kb große SNAP-tag-Insert.

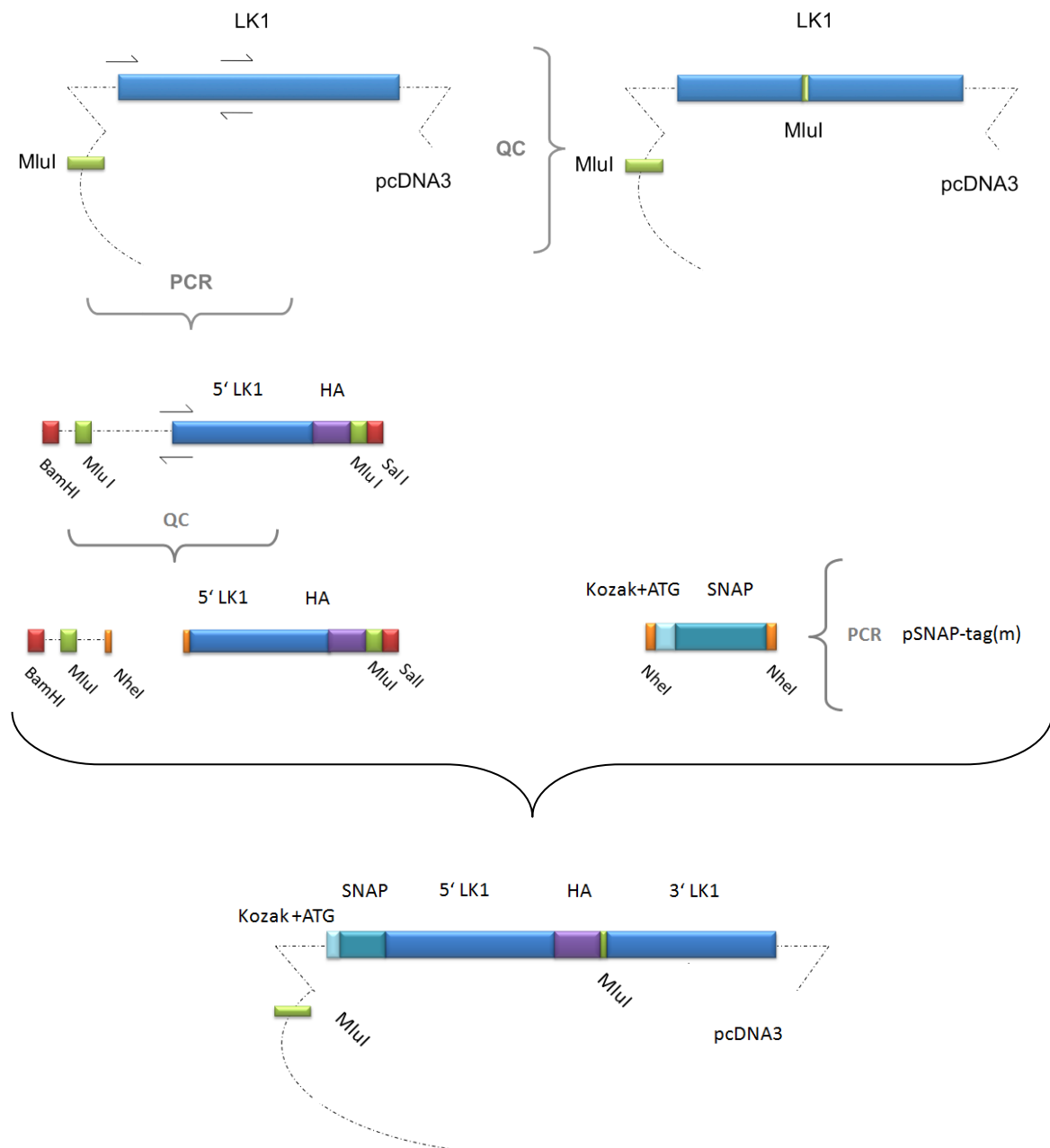
#### Zwischenvektor: SNAP-5' LK1-HA-pBlue

Das SNAP-tag-Insert wird über die NheI-Schnittstellen vor die LK1-Sequenz des 5' LK1-HA-pBlue-Vektors ligiert (siehe 4.3.3). Der entstandene finale Zwischenvektor enthält das 5' LK1-

Insert mit der Kozak-Start-ATG-Sequenz, die SNAP-tag- und die HA-tag-Sequenz. Der Zwischenvektor wird mit dem Enzym MluI verdaut (siehe 4.3.1), um die passenden überhängenden Enden für die Ligation in das 3' LK1-pcDNA3-Rückgrat zu generieren.

### Endligation des cDNS-Konstrukts

Abschließend wird das SNAP-5' LK1-HA-Insert in den 3' LK1-pcDNA3-Vektor über die MluI-Restriktionsstellen inseriert (siehe 4.3.3). Das fertige cDNS-Konstrukt hat eine Größe von 12,8 kb.

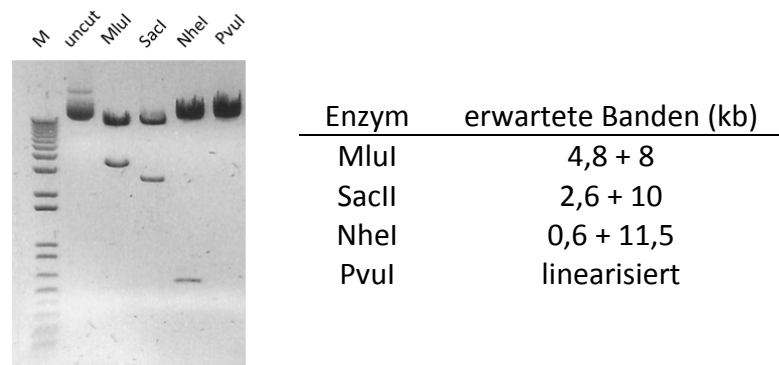


**Abb. 10** Schematische Darstellung der Konstruktion des cDNA-Plasmids

## 5.1.2 Überprüfung des cDNS-Konstrukts

### Restriktionsanalyse

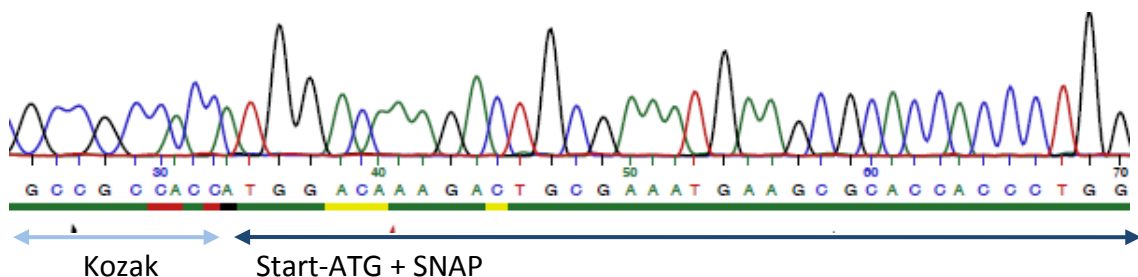
Das cDNS-Konstrukt wurde durch den Verdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen auf Richtigkeit hin untersucht (siehe 4.3.1). Die ausgewählten Enzymkombinationen ergeben spezifische Bandenmuster auf dem analytischen Gel. Hierbei konnte gezeigt werden, dass alle Bestandteile des cDNS-Vektors in der richtigen Reihenfolge eingebaut wurden.



**Abb. 11** Restriktionsanalyse des pcDNA3-Vektors  
M (Marker), uncut (unverdautes Plasmid)

### Sequenzanalyse

Neben der oben gezeigten Restriktionsanalyse wurde das cDNS-Konstrukt durch eine Sequenzanalyse überprüft (siehe 4.2.7). Diese Analyse ermöglicht die Kontrolle der Basensequenz und die Detektion von nicht beabsichtigten Mutationen. Wichtig ist, dass bestehende Mutationen keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz haben (stille Mutationen) oder den Leserahmen verschieben. All diese Voraussetzungen erfüllt der cDNS-Vektor.



**Abb. 12** Auszug aus der Sequenzanalyse: Kozak-Sequenz gefolgt von Start-ATG, Beginn der SNAP-Sequenz



### 5.1.3 Expression in HEK293T-Zellen

Das pcDNA3-SNAP-LK1-HA-Konstrukt wurde konzipiert, um die Expression des spannungsabhängigen Kalziumkanals in einem heterologen Expressionssystem (pcDNA3-Vektor in HEK293T-Zellen) zu überprüfen. 18 µg der membranständigen Untereinheit  $Ca_v1.2$  des LK1-Kanals werden zusammen mit 18 µg der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit in HEK293T-Zellen transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde Metafectene Pro (Biontex) entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet (siehe 4.5.3). Gleichzeitig wurden HEK293T-Zellen mit dem unveränderten Wildtyp-pcDNA3-LK1-Konstrukt transfiziert. Als Negativ-Kontrolle dienten untransfizierte, „leere“ HEK293T-Zellen.

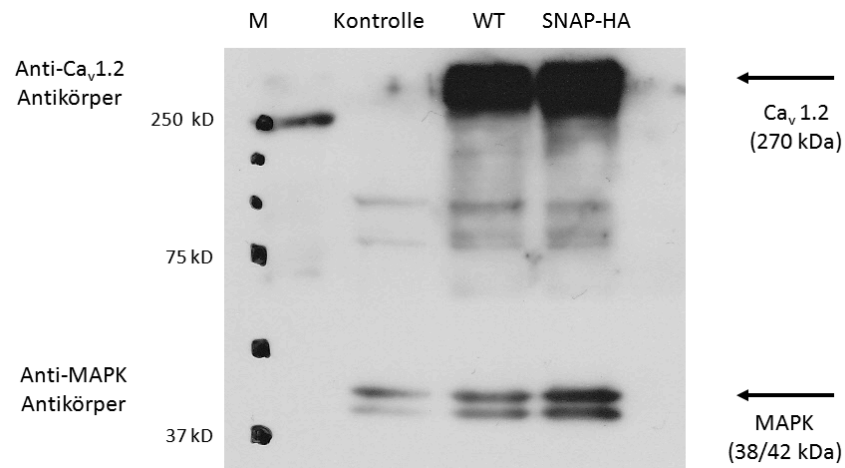
### 5.1.4 Proteingewinnung und Detektion

Nach Ernte der HEK293T-Zellen wurden die Proteine über den SDS-Tris-Aufschluss (siehe 4.6.2) und die Membranproteinreinigung (siehe 4.6.3) gewonnen. Anschließend erfolgte die qualitative Auswertung mittels Western Blot-Analyse (siehe 4.6.5). Als Standard-Expressions-Marker wurden in allen Western Blot-Versuchen die ubiquitär exprimierten Splice-Varianten der MAP-Kinase (38/42 kDa) mitdetektiert.

#### 5.1.4.1 Western-Blot-Analyse

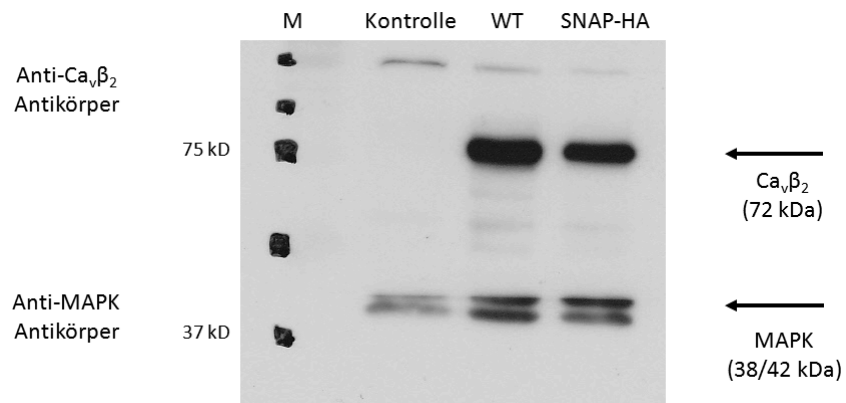
##### SDS-Tris-Aufschluss

Nach SDS-Tris-Aufschluss (siehe 4.6.2) konnten sowohl in den Transfektions-Versuchen als auch in der Negativ-Kontrolle mit dem Anti-MAPK-Antikörper (Cell Signaling Technology™) die MAP-Kinase in ihren beiden Splicevarianten (38/42 kDa) detektiert werden (siehe Abb. 13, Abb. 14, Abb. 15.) Mittels Anti- $Ca_v1.2$ -Antikörpern (Moosmang et al, 2003) wurden sowohl der unmodifizierte LK1-Kanal (270 kDa) als auch der durch SNAP-tag und HA-tag erweiterte Kalziumkanal (270 kDa) erkannt (siehe Abb. 13).



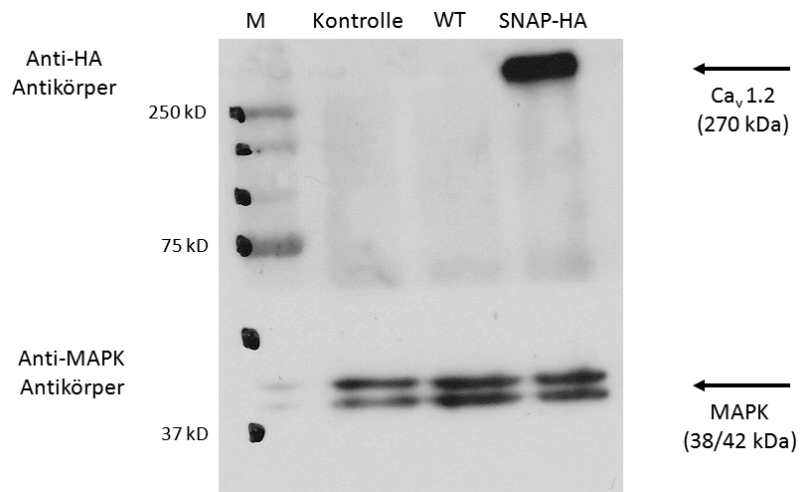
**Abb. 13** SDS-Tris-Auflösung – Detektion der Ca<sub>v</sub>1.2-Untereinheit  
M (Größenmarker), WT (Wildtyp-LK1), SNAP-HA (SNAP-LK1-HA-Konstrukt)

In einem weiteren Western Blot wurde die mittransfizierte Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Untereinheit (72 kDa) mit einem eigenen Anti-Ca<sub>v</sub>β-Antikörper (Prof. Dr. F. Hofmann, TU München) aufgespürt (siehe Abb. 14).



**Abb. 14** SDS-Tris-Auflösung – Detektion der Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Untereinheit  
M (Größenmarker), WT (Wildtyp), SNAP-HA (SNAP-LK1-HA-Konstrukt)

Wird der Anti-HA-Antikörper eingesetzt, wird nur im pcDNA3-SNAP-LK1-HA-Transfektionsansatz der Kalziumkanal detektiert. In der Negativkontrolle und in der Wildtyp-Transfektion hingegen kann keine Kanalstruktur dargestellt werden (siehe Abb. 15).

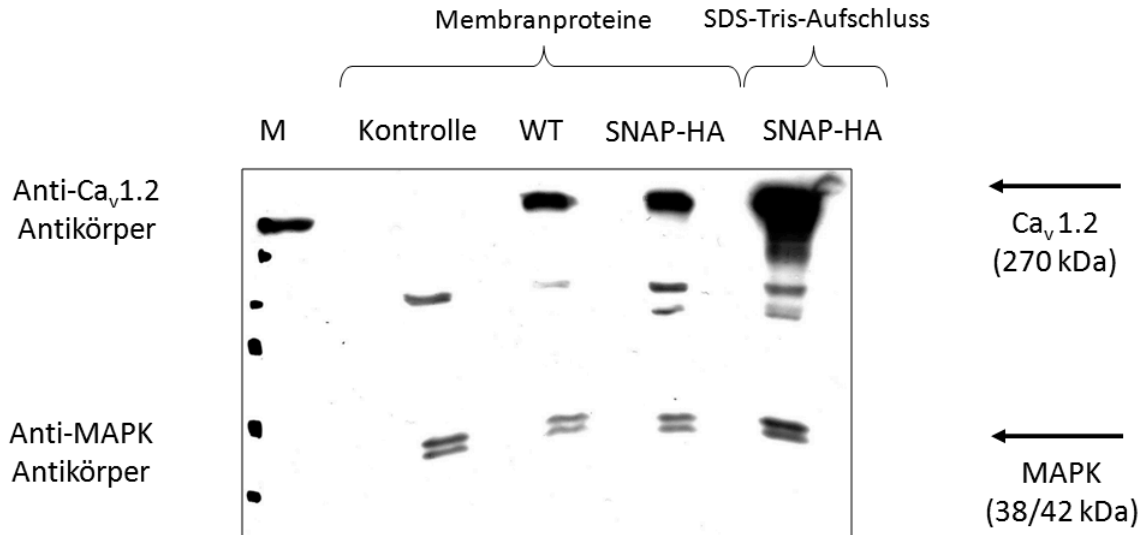


**Abb. 15** SDS-Tris-Auflösung – Detektion der HA-tag  
M (Größenmarker), WT (Wildtyp), SNAP-HA (SNAP-LK1-HA-Konstrukt)

### Membranproteinpräparation

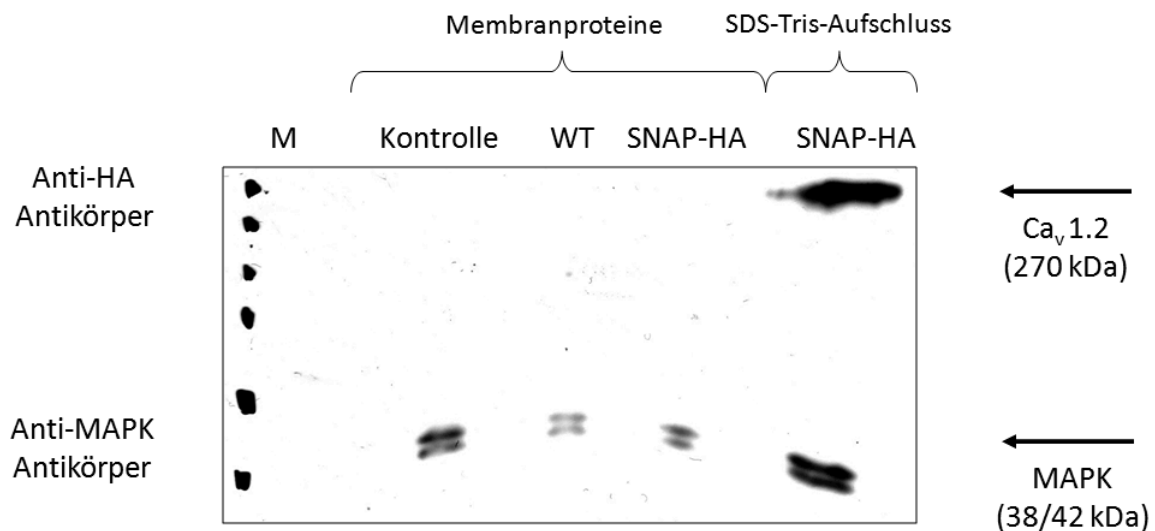
Neben dem SDS-Tris-Auflösung wurde mit der Membranproteinpräparation (siehe 4.6.3) eine weitere Methode der Proteingewinnung angewendet. Nach diesem Protokoll werden die membranständigen Proteine aus den HEK293T-Zellen extrahiert. Die Analyse erfolgt wiederum über Western Blots. Analog zum SDS-Tris-Auflösung wurden untransfizierte HEK293T-Zellen, sowie transfizierte Zellen bearbeitet (Wildtyp, pcDNA3-SNAP-LK1-HA). Zum Vergleich wurde die pcDNA3-SNAP-LK1-HA-Probe des SDS-Tris-Auflösung auf dem Western Blot mitaufgetragen (siehe 4.6.5).

In dem Wildtyp- und in dem pcDNA3-SNAP-LK1-HA-Ansatz kann unter Verwendung des  $Ca_v1.2$ -Antikörpers (Prof. Dr. F. Hofmann, TU München) der exprimierte Membrankanal detektiert werden. Die Detektion in der untransfizierten Negativ-Kontrolle hingegen ist nicht möglich (siehe Abb. 16).



**Abb. 16** Membranpräparation – Detektion des Ca<sub>v</sub>1.2-Kanals  
M (Größenmarker), WT (Wildtyp), SNAP-HA (SNAP-LK1-HA-Konstrukt)

Für die Detektion des HA-tags wurde der Antikörper gegen den HA-Tag (Covance) eingesetzt. Im Vergleich zu dem sehr deutlich positiven Ergebnis des SDS-Tris-Auflösung fällt die Detektion des HA-Proteins sowohl im Kontroll- und Wildtyp-Versuch als auch im pcDNA3-SNAP-LK1-HA-Versuch negativ aus (siehe Abb. 17).



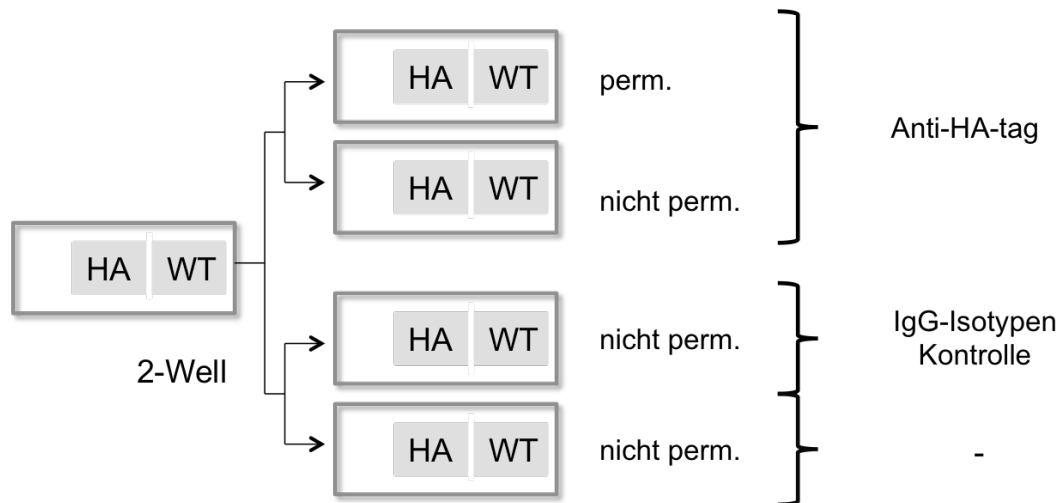
**Abb. 17** Membranpräparation – Detektion des HA-tag  
M (Größenmarker), WT (Wildtyp), SNAP-HA (SNAP-LK1-HA-Konstrukt)

#### 5.1.4.2 Immunofluoreszenzdetektion

Ergänzend wurde die Expression des LK1-Ca<sub>v</sub>1.2-Kanals in HEK293T-Zellen über eine Immunofluoreszenztechnik *in vivo* nachgewiesen (siehe 4.7). Hierfür wurden HEK293T-Zellen, bei optimaler Konfluenz von 70-80% in einem „2-Well“ Chamber Slide™-System (Thermo Scientific/Nunc) mit jeweils 1,6 µg pcDNA3-SNAP-LK1-HA-Konstrukt und 1,6 µg Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Untereinheit kotransfiziert. Als Kontrolle wurden Wildtyp pcDNA3-LK1-Plasmide mit der Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Untereinheit transfiziert. Um ein unspezifisches Hintergrundrauschen der Immunofluoreszenzdetektion aufzuspüren, wurden zwei Negativ-Kontrollen konzipiert. Zum einen wurde eine Isotypen-Kontrolle der Immunglobulinklasse IgG durchgeführt. Zum anderen wurde ein Versuchsansatz ohne ersten Antikörper belassen und nur mit dem sekundären Immunglobulin inkubiert. Als Transfektionsreagenz diente Lipofectamin 2000 (Invitrogen) gemäß Herstellerprotokoll. Nach 24h Wachstumszeit wurden die Zellen mit 3,7% Formaldehyd-PBS-Lösung fixiert. Wie im nachfolgenden Schema gezeigt (siehe Abb. 18) wurden die Zellen permeabilisiert und mit den verschiedenen primären Antikörpern inkubiert (siehe Tabelle 2). Der sekundäre Antikörper besitzt ein Emissionsspektrum im roten Wellenlängenbereich des Lichts. Zusammen mit dem sekundären Antikörper wurde der Zellkernfarbstoff Hoechst 33342 bzw. Hoechst 33528 appliziert. Die Auswertung des Versuchs erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Leica DMI 6000 B unter 200facher Vergrößerung. Die Zellansätze wurden zunächst in Durchlicht fotografiert.

**Tabelle 2** Antikörperkombinationen - Immunfluoreszenz

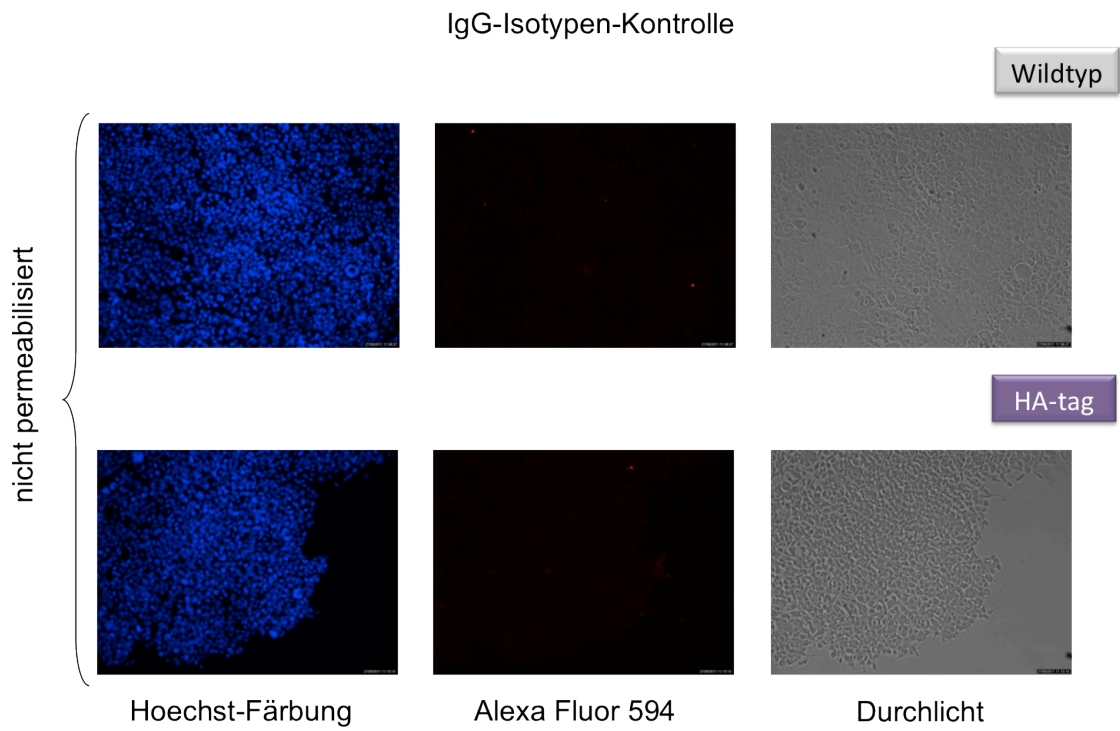
| Primärer Antikörper                            | Sekundärer Antikörper |
|--|-----------------------|
| Anti-HA-tag, rabbit (Abcam)                    | Alexa Fluor 594, goat |
| Isotyp control IgG, rabbit (Thermo Scientific) | Alexa Fluor 594, goat |
| -  | Alexa Fluor 594, goat |



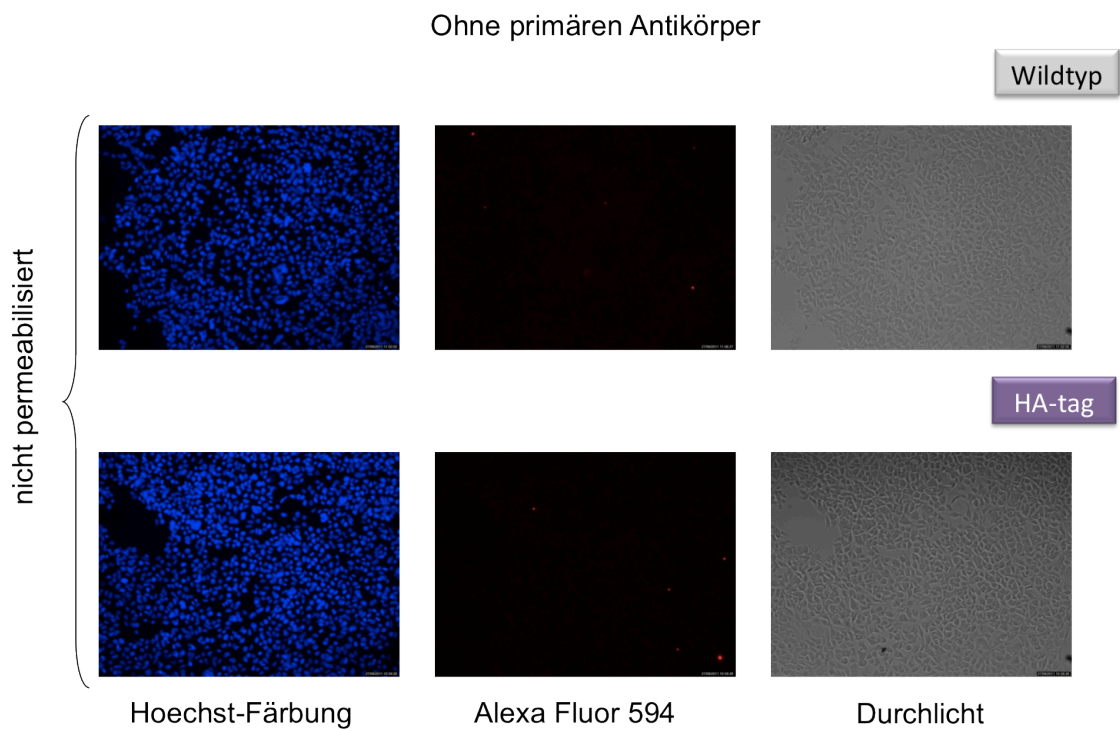
**Abb. 18** Permeabilisierung und Färbungsskizze - Immunfluoreszenz-Detektion

### Negativ-Kontrollen

Um ein unspezifisches Hintergrundrauschen der Immunfluoreszenzdetektion aufzuspüren, wurden zwei Negativ-Kontrollen entwickelt. In der Isotypen-Kontrolle (IgG) stellt der primäre Antikörper unspezifische Bindungen eines IgG-Antikörpers dar. Für die Vergleichbarkeit der Antikörper ist wichtig, dass beide denselben Ursprung haben und zur gleichen Isotypenklasse gehören. Darüber hinaus sind sie an das gleiche Fluorochrom gebunden. Zusätzlich wurde ein Versuchsansatz ohne ersten Antikörper belassen und nur mit dem sekundären Immunglobulin inkubiert. Hierdurch werden Bindungen des zweiten Antikörpers an die Zielzelle detektiert. Als Transfektionsreagenz wurde ebenfalls Lipofectamin (Invitrogen) verwendet (siehe 4.5.3). Die HEK293T-Zellen der Negativ-Kontrollen wurden im Rahmen der Fixierung nicht-permeabilisiert belassen. Die Behandlung der Zellen erfolgte analog zu der Immunfärbung. Beide Negativ-Kontrollen zeigen keine Anfärbungen von Zellstrukturen im Versuch (siehe Abb. 19, Abb. 20).



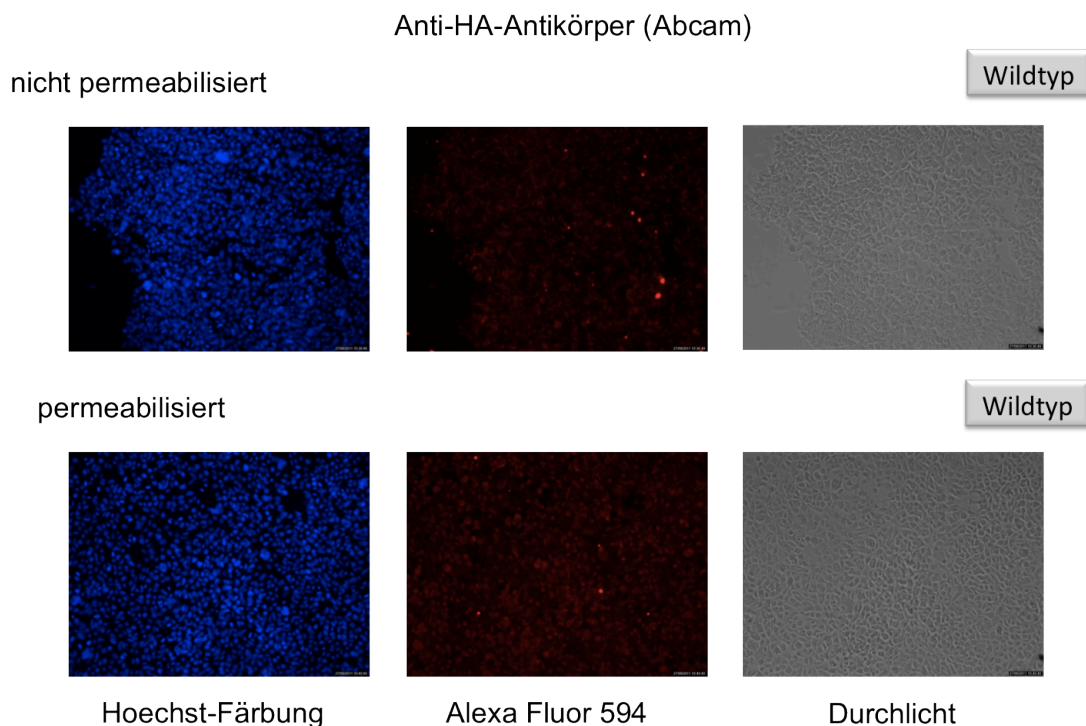
**Abb. 19** Isotypen-Kontrolle (IgG), Wildtyp und pcDNA3-SNAP-LK1-HA- Konstrukt  
200x Vergrößerung



**Abb. 20** Ohne primären Antikörper, Wildtyp und pcDNA3-SNAP-LK1-HA- Konstrukt  
200x Vergrößerung

### Wildtyp-Transfektionsansatz

Als Vergleich wurden HEK293T-Zellen mit nicht modifizierten LK1-Kanälen transfiziert (siehe 4.5.3). Diese Zellen haben keine HA-tag-Proteine exprimiert. Die Zellen wurden nach dem Fixieren wiederum in permeabilisiertem und unpermeabilisiertem Zustand untersucht (siehe 4.7.2). Im Wildtyp-Versuch kann kein HA-tag mit den primären und sekundären Antikörpern aufgespürt werden (siehe Abb. 21) .

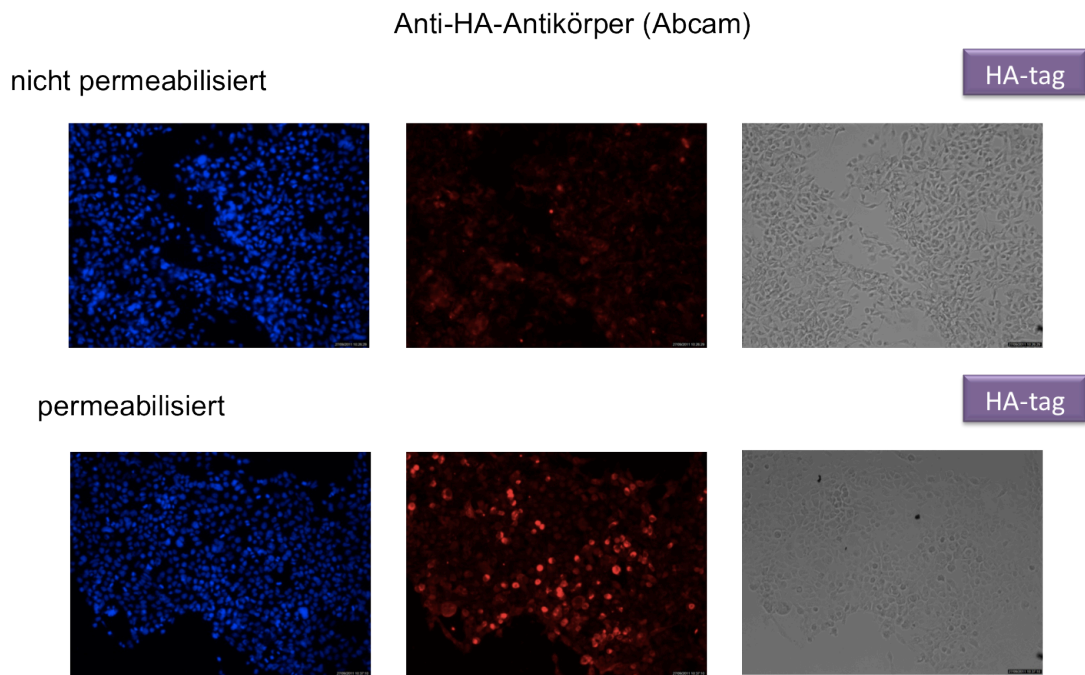


**Abb. 21** Anti-HA-tag Antikörper (Abcam), Wildtyp  
nicht permeabilisierte und permeabilisierte HEK293T-Zellen, 200x Vergrößerung

### pcDNA3-SNAP-LK1-HA-Transfektionsansatz

Die mit dem pcDNA3-SNAP-LK1-HA-Konstrukt versehenen HEK293T-Zellen wurden in gleicher Weise wie der Wildtyp-Versuch teilweise permeabilisiert. Nur im permeabilisierten Zustand ist eine deutliche Signalanhebung durch die Detektion des HA-tags zu erkennen (siehe Abb. 22).





**Abb. 22** Anti-HA-tag Antikörper (Abcam), pcDNA3-SNAP-LK1-HA nicht permeabilisierte und permeabilisierte HEK293T-Zellen, 200x Vergrößerung

## 5.2 Kontrollplasmid

Als Kontrollversuch für die Expression des LK1-Kanals in HEK293T-Zellen wurde ein weiteres Plasmid konstruiert, welches keine SNAP-tag-Sequenz trägt. Hierdurch soll untersucht werden, ob und inwiefern der SNAP-tag einen Einfluss auf die Expression des Proteins und seine Lokalisation in der Zelle hat. Der HA-tag ist weiterhin in die Sequenz integriert, um den Kanal in der Immunfluoreszenz und im Western-Blot-Versuch detektieren zu können.

### 5.2.1 Strategie des pcDNA3-LK1-HA-Plasmids

Ausgehend von der Klonierung des pcDNA3-SNAP-LK1-HA-Konstrukts konnte in wenigen Zwischenschritten das Kontrollplasmid zusammengebaut werden.

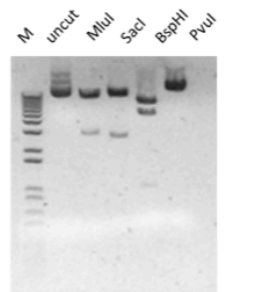
Das pcDNA3-Rückgrat nach Integration der Mlul-Schnittstelle an der Position 2669 der LK1-Sequenz wurde mit dem Mlul- und dem BamHI-Enzym verdaut (siehe 4.3.1). Hierdurch wird das unmodifizierte Insert herausgeschnitten und das pcDNA3-LK1-Rückgrat kann gewonnen und aufgereinigt werden (siehe 4.3.1). Der Zwischenvektor 5'LK1-HA-pBlue (siehe 5.1.1) wird ebenfalls mit Mlul und BamHI verdaut und im Rahmen der Elektroelution aufbereitet. Diese beiden Fragmente wurden anschließend ligiert (siehe 4.3.3). Der fertige Kontrollvektor besteht nun aus dem pcDNA3-Rückgrat mit einem um die HA-tag-Sequenz erweiterten LK1-Kanal. Das Start-ATG der LK1-Sequenz, ebenso wie die Kozak-Sequenz aus dem originalen pcDNA3-LK1-Plasmid, bleiben erhalten.

### 5.2.2 Überprüfung der Sequenz

Da der Kontrollvektor ebenfalls in HEK293T-Zellen exprimiert werden soll, ist es essentiell, den Vektor auf Punktmutationen, Insertionen sowie Deletionen hin zu überprüfen.

#### Restriktionsanalyse

Mittels der Enzyme Mlul, SacI, BspHI und PvuI wurde das fertige Plasmid verdaut und auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen (siehe 4.2.7, 0). Aus dem entstandenen Bandenmuster kann geschlossen werden, dass das Insert korrekt in das pcDNA3-Rückgrat eingebaut wurde und die entsprechenden Erkennungssequenzen der Enzyme vorhanden sind.

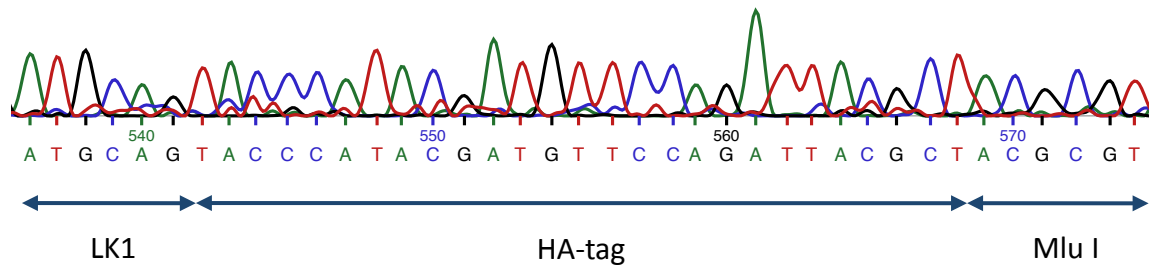


| Enzym | erwartete Banden (kb) |
|-------|-----------------------|
| Mlul  | 4 + 8                 |
| SacII | 2,8 + 10              |
| BspHI | 1 + 5 + 6,6           |
| PvuI  | linearisiert          |

**Abb. 23** Restriktionsverdau des pcDNA3-LK1-HA-Plasmids  
M (Marker), uncut (unverdautes Plasmid)

### Sequenzanalyse

Um die Expression des Proteins LK1 in HEK293T-Zellen zu ermöglichen, ist eine korrekte Basensequenz wichtig. Hierfür wurde das Kontrollplasmid pcDNA3-LK1-HA von der Firma MWG (Ebersberg) analysiert und für korrekt befunden (siehe 4.2.7).



**Abb. 24** Auszug aus der Sequenzanalyse des Kontrollplasmids  
regelrechte Insertion des HA-tag

### 5.2.3 Expression des Kontrollplasmids in HEK293T-Zellen

Analog zu dem pcDNA3-SNAP-LK1-HA-Vorversuch wurde das Kontrollplasmid in dem heterologen Expressionssystem in HEK293T-Zellen exprimiert. Je 18 µg des LK1-Kanals wurden mit je 18 µg Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Untereinheit mit Metafectene Pro (Biontexas) transfiziert. Entsprechend dem vorhergehenden Experiment wurde als Vergleichsmöglichkeit der Wildtyp-pcDNA3-LK1-Vektor transfiziert. „Leere“, das heißt untransfizierte HEK293T-Zellen stellen die Negativ-Kontrolle dar (siehe 4.5.3.).

### 5.2.4 Proteingewinnung und Detektion

24h nach der Transfektion wurden die HEK293T-Zellen geerntet und über einen SDS-Tris-Aufschluss (siehe 4.6.2) und über die Membranproteinaufreinigung (siehe 4.6.3) gewonnen. Im Western-Blot wurden die Proteine qualitativ nachgewiesen (siehe 4.6.5). Als ubiquitär exprimiertes, endogenes Enzym der HEK293T-Zellen wurden die beiden Splice-Varianten der MAP-Kinase (38/42 kDa) nachgewiesen.

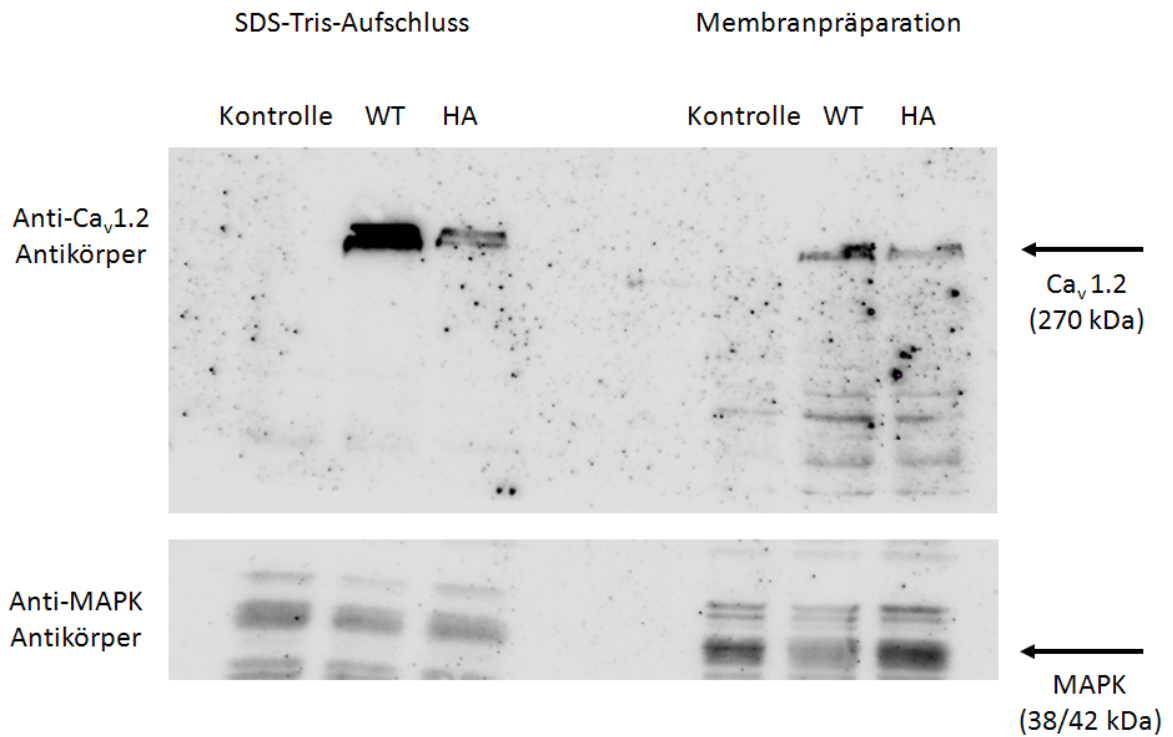
#### 5.2.4.1 Western-Blot-Analyse

##### SDS-Tris-Aufschluss

Nach SDS-Tris-Aufschluss (siehe 4.6.2) der transfizierten HEK293-Zellen wurden der  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanal inklusive des HA-tags und die  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit mit den entsprechenden Antikörpern im Western Blot detektiert (siehe Abb. 25, Abb. 26, Abb. 27). In den untransfizierten Ansätzen wurde lediglich die MAP-Kinase in ihren beiden Splice-Varianten dargestellt (siehe Abb. 25, Abb. 26, Abb. 27). Nach Transfektion des Wildtyp-Kanals konnte der Anti-HA-tag-Antikörper kein Epitop erkennen und positiv darstellen (siehe Abb. 27).

##### Membranproteinpräparation

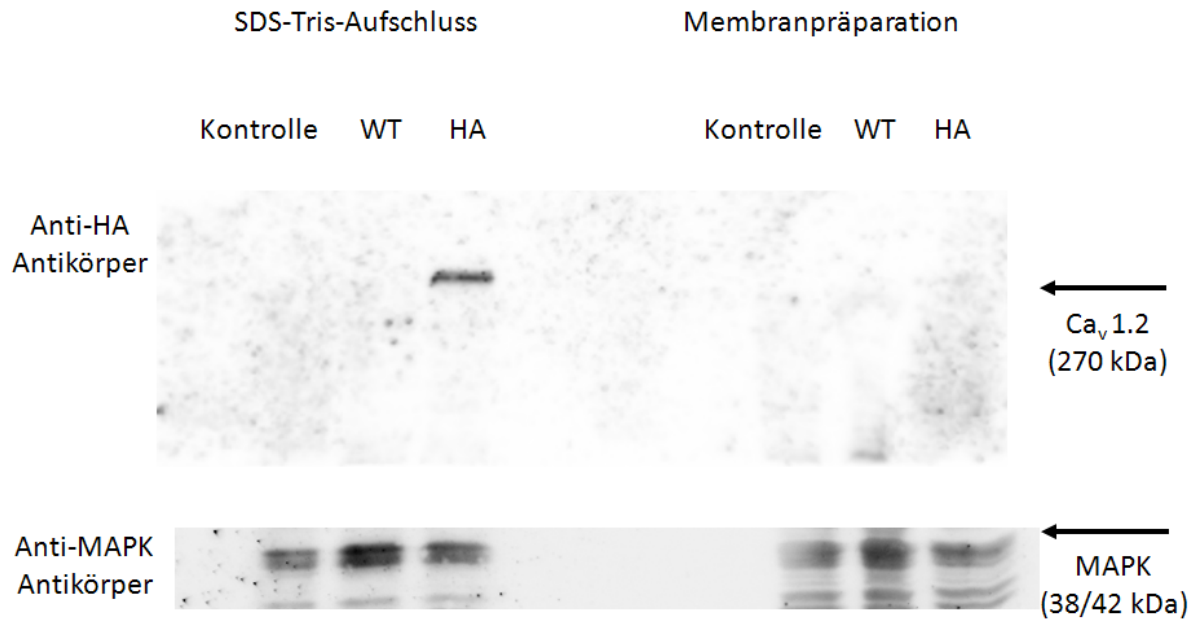
In der Membranproteinpräparation (siehe 4.6.3) wurde versucht die Membranproteine separat zu extrahieren und im Western Blot aufzuspüren (siehe 4.6.5.) Die Auswertung der Western Blots zeigt ein positives Signal unter Verwendung des  $\text{Ca}_v1.2$ -Antikörpers (siehe Abb. 25). Der Einsatz des Anti-HA-Antikörpers erzielt keine positiven Resultate (siehe Abb. 26). Die MAP-Kinase als Ladekontrolle konnte in allen Ansätzen nachgewiesen werden (siehe Abb. 25, Abb. 26, Abb. 27).



**Abb. 25** Western Blot des Kontrollvektors, Anti-Ca<sub>v</sub>1.2-Antikörper  
SDS-Tris-Auflschluss und Membranpräparation im Vergleich



**Abb. 26** Western Blot des Kontrollvektors, Anti-Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Antikörper  
SDS-Tris-Auflschluss und Membranpräparation im Vergleich



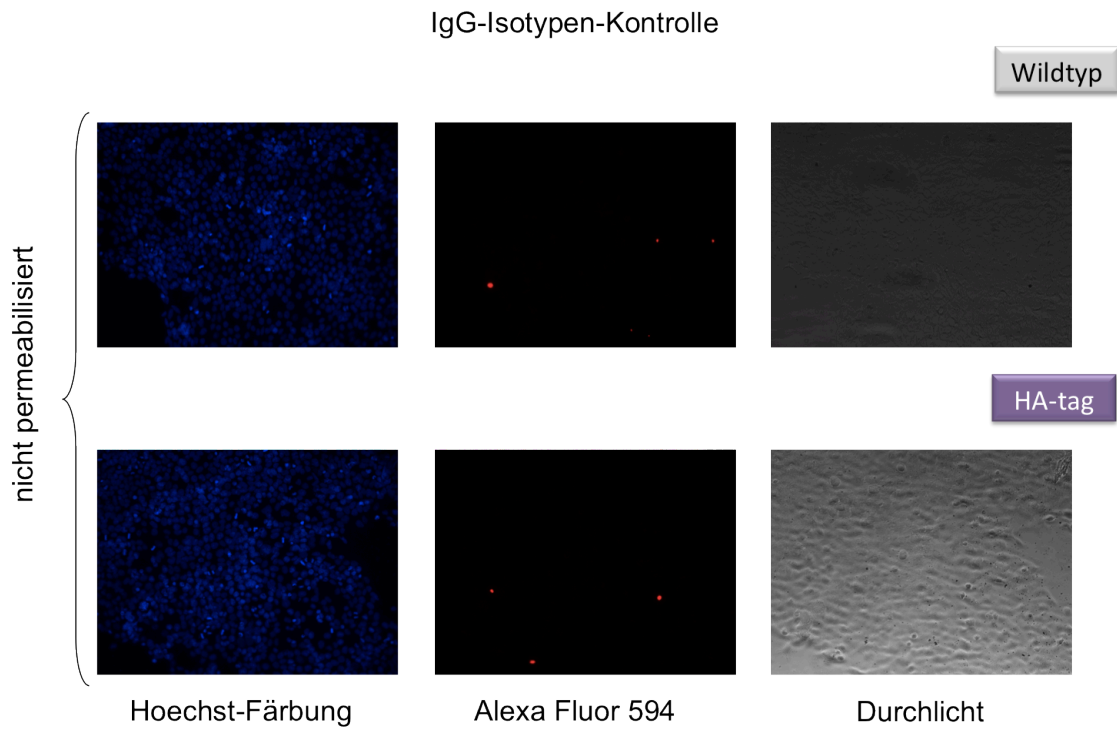
**Abb. 27** Western Blot des Kontrollvektors, Anti-HA-Antikörper  
SDS-Tris-Auflschluss und Membranpräparation im Vergleich

#### 5.2.4.2 Immunfluoreszenzdetektion

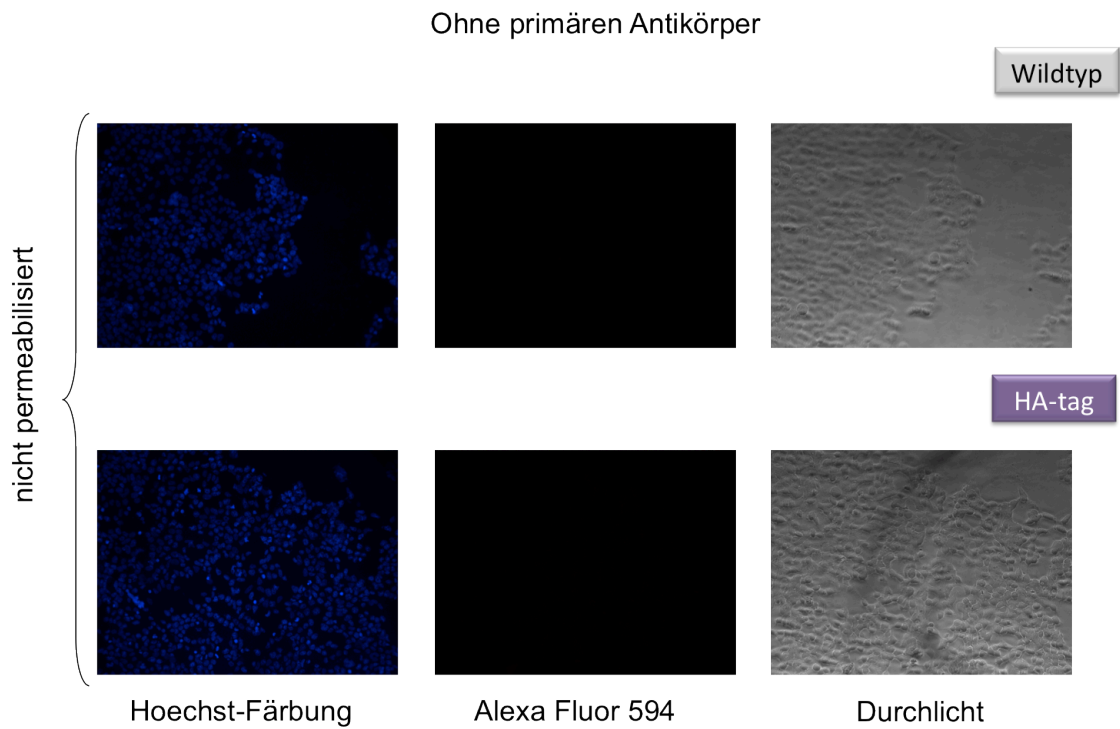
Das Kontrollplasmid wurde ebenfalls in der Immunfluoreszenztechnik untersucht (siehe 4.7.2). Um eine Vergleichbarkeit zum Vorversuch mit dem SNAP-HA-Konstrukt (siehe 5.1.4.2) zu gewährleisten, wurden die Zellen auf exakt die gleiche Art und Weise behandelt. Bei einer Konfluenz von 70-80% wurden die Zellen mit je 1,6 µg pcDNA3-LK1-HA-Konstrukt und 1,6 µg  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit mit Lipofectamin 2000 (Invitrogen) transfiziert (siehe 4.5.3). Als Negativkontrollen dienten wiederum die Isotypen-Kontrolle und ein Versuchsansatz ohne primären Antikörper (siehe Abb. 18). Nach Fixierung mit 3,7% Formaldehyd-PBS-Lösung wurde ein Versuchsansatz permeabilisiert (siehe 4.7.2). Die Übrigen blieben unpermeabilisiert. Der sekundäre Antikörper (Alexa Fluor 594, Abcam) wird im roten Wellenlängenbereich maximal angeregt und kann am Lasermikroskop detektiert werden.

### Negativ-Kontrollen

Mit Hilfe der Isotypen-Kontrolle (IgG) und des Weglassens des primären Antikörpers kann ein unspezifisches Hintergrundsignal der Immunofluoreszenz detektiert werden. In den beiden Negativ-Kontrollen sind die Zellen nicht permeabilisiert und zeigen keine signifikante Signalanhebung (siehe Abb. 28, Abb. 29).



**Abb. 28** Isotypen-Kontrolle (IgG), Kontrollvektor und Wildtyp  
200x Vergrößerung

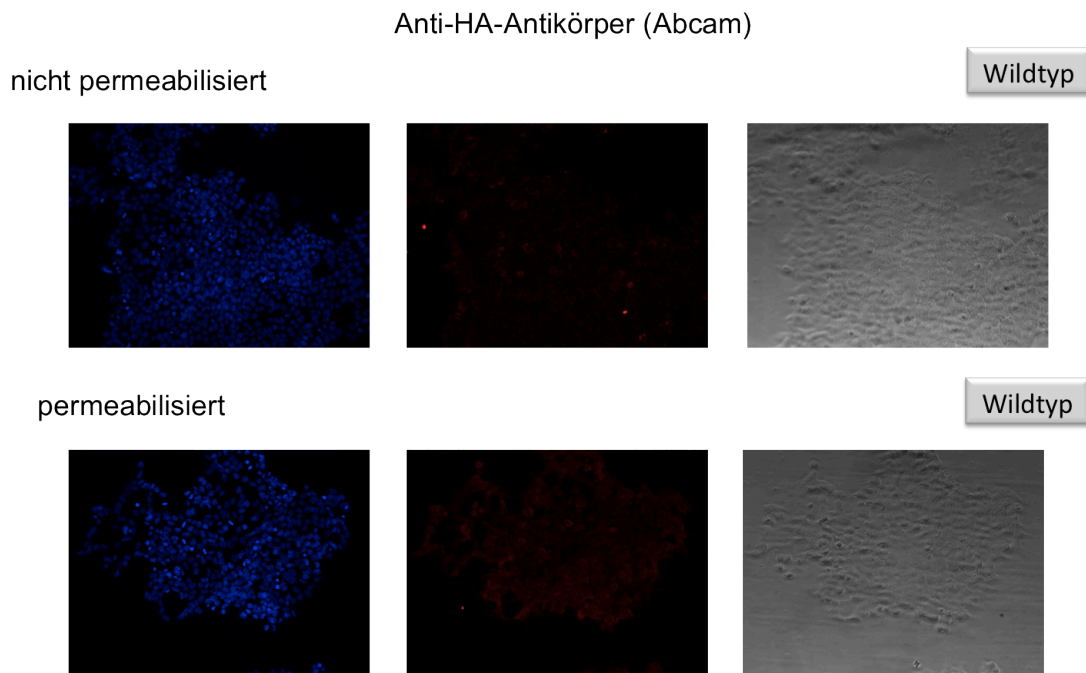


**Abb. 29** Ohne primären Antikörper, Kontrollvektor und Wildtyp  
200x Vergrößerung

### Wildtyp-Transfektionsansatz

Als Vergleichsmöglichkeit wurde wiederum der nicht-veränderte LK1-Kanal im pcDNA3-Rückgrat zusammen mit der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit transfiziert (siehe 4.5.3). Es wurden jeweils ein permeabilisierter und ein nicht permeabilisierter Versuchsansatz bearbeitet (siehe 4.7.2). In keinem der Experimente konnte eine deutliche Signalanhebung durch Detektion eines HA-tags gezeigt werden (siehe Abb. 30).

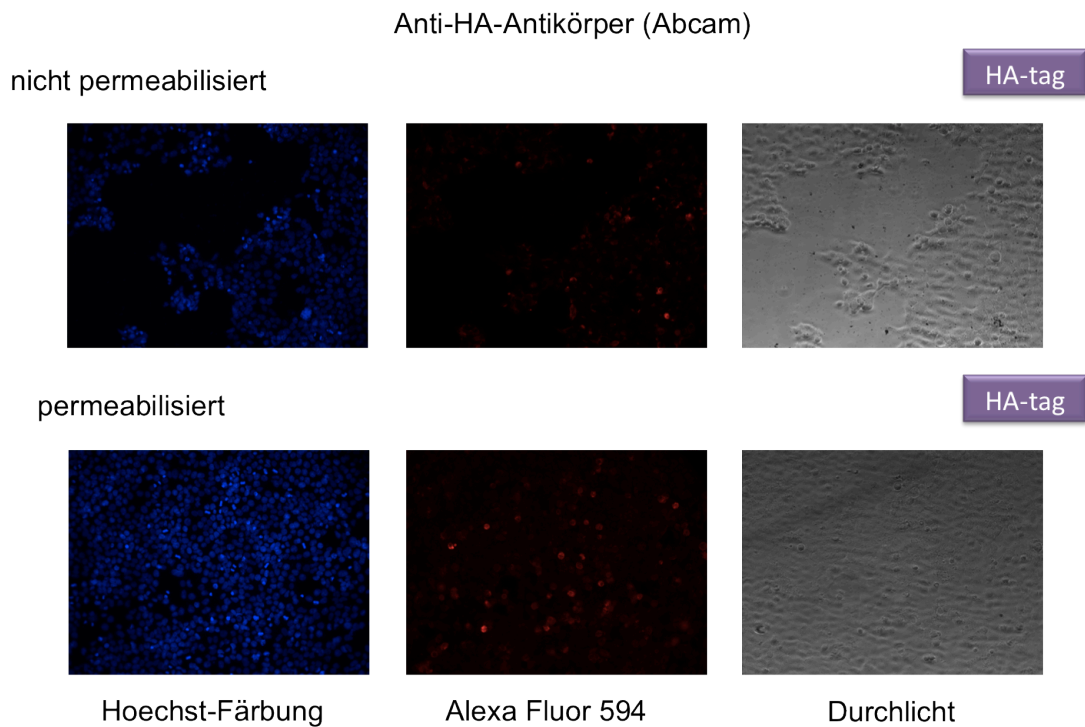




**Abb. 30** Anti-HA-tag Antikörper (Abcam), Wildtyp  
nicht permeabilisierte und permeabilisierte HEK293T-Zellen, 200x Vergrößerung

### Kontrollplasmid-Transfektionsansatz

Das Kontrollplasmid pcDNA3-LK1-HA konnte in den Immunofluoreszenzversuchen nur in der permeabilisierten Versuchsreihe durch die Antikörper aufgespürt werden. Im unpermeabilisierten Zustand jedoch zeigt sich keine signifikante Signalsteigerung (siehe Abb. 31).



**Abb. 31** Anti-HA-tag Antikörper (Abcam), Kontrollplasmid  
nicht permeabilisierte und permeabilisierte HEK293T-Zellen, 200x Vergrößerung

### 5.3 Gentargetingstrategie

Um eine genetische Veränderung in das murine Genom mittels homologer Rekombination zu integrieren, wird ein Gentargetingvektor kloniert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Rosa-CTV-Konstrukt verwendet.

Der CTV-Vektor besitzt einen 5'- und 3'-Rosa-Homologiearm, der zu definierten Sequenzen im Genom embryonaler Stammzellen komplementär ist. Über die Insertion der Expressionkassette an der AscI-Schnittstelle des CTV-Vektors ist ein passgenauer Einbau der Sequenz zwischen die 5'- und 3'-gelegenen Rosa-Homologie-Arm möglich.

### 5.3.1 Herstellung des CTV-SNAP-Ca<sub>v</sub>1.2-HA-Vektors

Die einzelnen Bestandteile des finalen Gentargetingvektors wurden im pSNAP-tag(m) (NEB), pCAGGS-Ca<sub>v</sub>1.2 (Prof. Dr. Veit Flockerzi) und CTV-Vektor (Addgene) bereitgestellt. Der verwendete Ca<sub>v</sub>1.2-Kanal hat seinen Ursprung in der Maus (*Mus musculus*) und wurde in dem pCAGGS-Rückgrat von Prof. Dr. Veit Flockerzi (Abteilung Allgemeine und Klinische Pharmakologie, Universität des Saarlandes) zur Verfügung gestellt. Die Klonierungsstrategie ist schematisch in Abb. 32 dargestellt.

#### Zwischenvektor pBlue 5'Ca<sub>v</sub>1.2-HA

Ausgehend von der Ca<sub>v</sub>1.2-Sequenz im pCAGGS-Rückgrat werden über zwei aufeinanderfolgende PCR-Reaktionen (Primer: *SB\_Ca<sub>v</sub>1.2\_Asc\_fw*, *SB\_Ca<sub>v</sub>\_Sall\_rv*, *SB\_Ca<sub>v</sub>1.2-HA\_rv*) die HA-tag-Basenabfolge sowie verschiedene Restriktionsschnittstellen eingefügt (siehe 4.2.1). Die Sall- und SpeI-Erkennungssequenz wurde für das Subklonieren im pBluescript verwendet. Für das abschließende Zusammenfügen des 5'- und 3'-Anteils des Ca<sub>v</sub>1.2-Kanals werden die Schnittstellen MluI und Sall benötigt. Durch Punktmutationen wird das Start-ATG des Kanals in eine NheI-Schnittstelle umgewandelt, ohne jedoch das Leseraster zu verschieben. Diese NheI-Sequenz dient dem Einbau der SNAP-tag-Sequenz. Abschließend wird der modifizierte Kanal in den Targetingvektor CTV über die Restriktionssequenz des AscI-Enzyms ligiert (siehe 4.3.3).

#### Zwischenvektor pBlue 3'Ca<sub>v</sub>1.2-HA

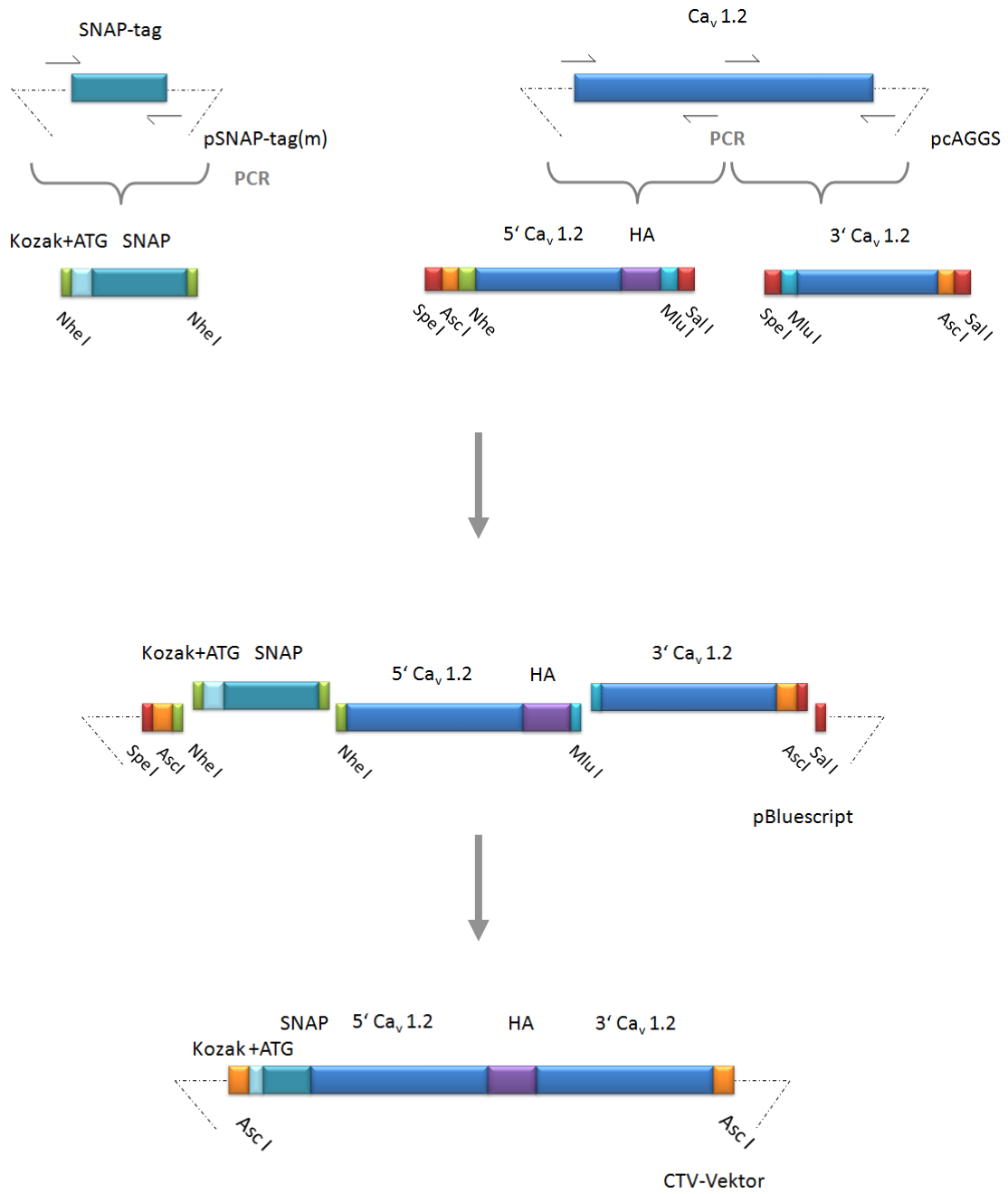
Der 3'-gelegene Abschnitt der Ca<sub>v</sub>1.2-Sequenz wird ebenfalls über eine PCR-Reaktion (Primer: *SB\_Ca<sub>v</sub>\_SpeMlu\_fw*, *SB\_Ca<sub>v</sub>1.2\_Asc\_rv*) aus dem pCAGGS-Vektor herausgelöst (siehe 4.2.1). Durch SpeI und Sall ist eine Subklonierung in pBluescript möglich. MluI sowie Sall erlauben später das Zusammensetzen der beiden Ca<sub>v</sub>1.2-Untereinheiten. Für die Endligation in den CTV-Vektor wird die 3'-gelegene AscI-Erkennungssequenz verwendet (siehe 4.3.3).

### Zwischenvektor pBlue SNAP-tag

Die SNAP-tag-Basenabfolge ist Bestandteil des pSNAP-tag(m). Durch die PCR mit den Primern *SB\_SNAP\_NheBamFw* und *SB\_SNAP\_stop\_rv* wird vor das endogene Start-ATG die Kozak-Sequenz eingefügt (siehe 4.2.1). Die Lage des reversen Primers ist hierbei so gelegt, dass das Stop-Codon nicht mehr Bestandteil des SNAP-Inserts ist. Nach Subklonierung in pBluescript unter Verwendung der Enzyme BamHI und Sall wird das SNAP-Insert mit NheI verdaut (siehe 4.3.1) und 5' vor die Ca<sub>v</sub>1.2-Sequenz ligiert (siehe 4.3.3). Das SNAP-Insert umfasst 0,6 kb.

### Gentargetingvektor CTV-SNAP-Ca<sub>v</sub>1.2-HA

Schlussendlich werden die Einzelstücke zu dem fertigen Gentargetingvektor zusammengefügt (siehe 4.3.3). Das SNAP-Insert, mit NheI verdaut, wird vor die Ca<sub>v</sub>1.2-Sequenz eingefügt. Der Zwischenvektor mit dem SNAP-5'Ca<sub>v</sub>1.2-HA-Insert wird anschließend durch die Enzyme MluI und Sall doppelverdaut (siehe 4.3.1). Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonucleasen liegen direkt benachbart, so dass das Plasmid geöffnet wird. Nach Dephosphorylierung durch das Enzym CIP (siehe 4.3.2) wird das ebenfalls mit MluI und Sall geschnittene 3'Ca<sub>v</sub>1.2-Insert hier integriert (siehe 4.3.3). Das nun komplette Insert (ca. 6,5 kb) wird mit AscI aus dem pBluescript-Rückgrat herausgeschnitten (siehe 4.3.1) und in den CTV-Vektor gesetzt (siehe 4.3.3). Das Endprodukt hat eine Größe von 21 kb.

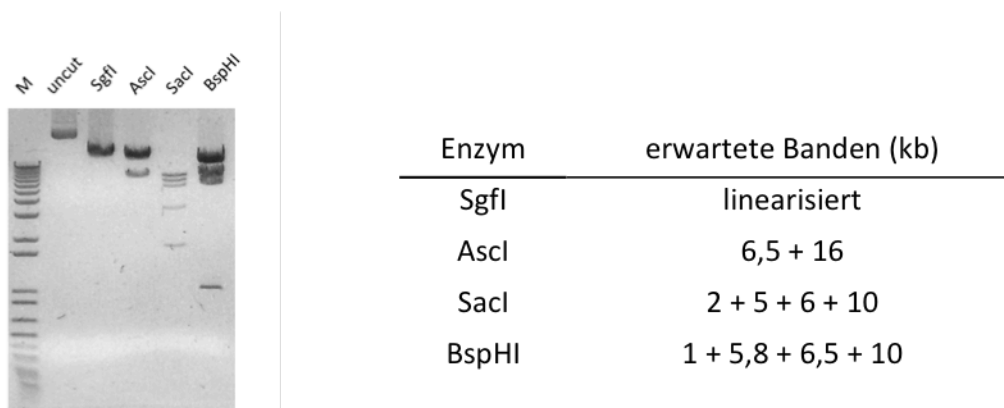


**Abb. 32** Schematische Darstellung der Klonierung des SNAP-Ca<sub>v</sub>1.2-HA-Targetingvektors

### 5.3.2 Überprüfung des Gentergingkonstrukts

#### Restriktionsanalyse

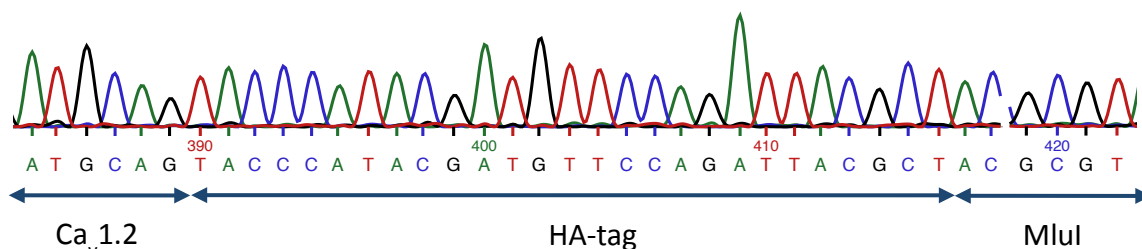
Der Gentergingvektor wurde mit verschiedenen Kombinationen von Restriktionsendonukleasen verdaut (siehe 4.2.7). Hierbei entsteht in der Agarosegelelektrophorese ein für den Vektor spezifisches Bandenmuster. Es konnte gezeigt werden, dass alle Bestandteile des CTV-SNAP-Ca<sub>v</sub>1.2-HA-Vektors korrekt eingebaut wurden.



**Abb. 33** Restriktionsverdau des Targetingvektors CTV-SNAP-Ca<sub>v</sub>1.2-HA

#### Sequenzanalyse

Zur Überprüfung der Basensequenz und zum Ausschluss von ungewollten Punktmutationen wurde neben der Restriktionsanalyse der Gentergingvektor durch eine Sequenzanalyse überprüft (siehe 4.2.7). Besonderes Augenmerk wurde auf die korrekte Sequenz des SNAP-tag und HA-tag gelegt. Außerdem wurde das Start-ATG inklusive der Kozak-Sequenz überprüft und auf Verschiebungen des Leserahmens (*frame shift*) geachtet. All diese Voraussetzungen erfüllt das CTV-SNAP-Ca<sub>v</sub>1.2-HA-Plasmid.



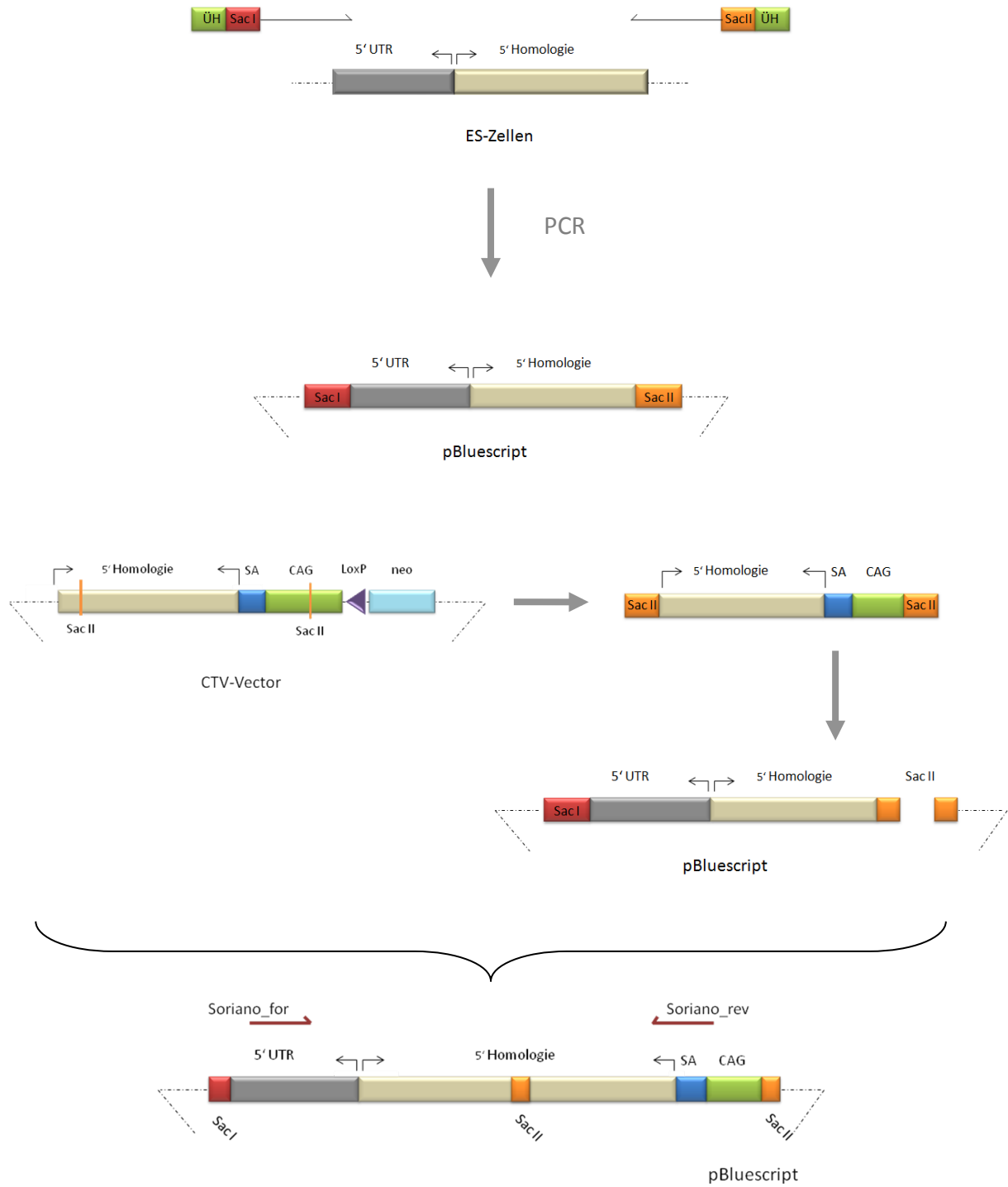
**Abb. 34** Sequenzanalyse des CTV-SNAP-Ca<sub>v</sub>1.2-HA-Vektors  
regelrechte HA-tag-Insertion

## 5.4 ES-Zell-Screening

Im Rahmen des ES-Zell-Screenings werden die embryonalen Stammzellen gesucht, die die Expressionkassette an der richtigen Stelle in ihr Genom integriert haben. Ein Überleben der Positiv-Auswahl mit Geneticin (G418) während der Selektionsphase ist nur möglich, wenn die Zellen den Gentargetingvektor, der die Selektionskassette enthält, aufgenommen haben. Die Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Geneticin (G418) ist im CTV-Vektor im Neomycin-Geneticin-Gen (Neo) codiert. Die Resistenz gegenüber G418 allein jedoch garantiert nicht die korrekte Insertion in das murine Genom. Daher müssen die Klone der Embryonalen Stammzellkultur mittels PCR-Screening überprüft werden.

### 5.4.1 Anpassen der etablierten Screening-Strategie

Dr. Philippe M. Soriano (Mount Sinai School of Medicine, New York; <http://research.mssm.edu/soriano/lab/rosa26.html>) entwickelte für das ES-Zell-Screening des Rosa26-1 Vektors ein Protokoll. Der vorwärtsgerichtete Primer (*Soriano\_for*) bindet im Bereich der 5'UTR (*untranslated region*). Dieser Abschnitt ist jedoch nicht im CTV-Vektor enthalten. Um die Screening-Strategie vorab zu testen, wurde ein eigener Screeningvektor konstruiert. Hierfür musste die 5'UTR und ein Teil des 5' Homologiebereichs aus murinen Stammzellen (bereitgestellt durch Dr. Julia Brandmayr, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Technische Universität München) extrahiert und in den Screeningvektor integriert werden. Die Klonierungsstrategie ist in Abb. 35 schematisch dargestellt. Der rückwärtsgerichtete PCR-Primer (*Soriano\_rev*) bindet in der Nähe des Splice Acceptors (SA) auf dem CTV-Vektor. Darüber hinaus wurden noch eigene PCR-Screening-Primer konstruiert, die in der 5'UTR und auf dem CAG-Promoter des CTV-Vektors binden.



**Abb. 35** Schematische Darstellung der Konstruktion des Screeningvektors



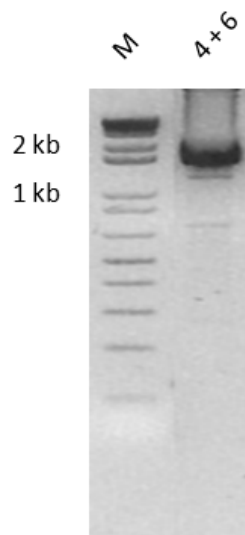
## 5.4.2 Überprüfen des Screening-Vectors

### Sequenzanalyse

Die Bindestellen der PCR-Primer (*Rosa\_Scr4\_for*, *Rosa\_Scr6\_re*) wurden durch Sequenzierung überprüft und für korrekt befunden (siehe 4.2.7).

### Test-PCR

Im Anschluss an die Klonierung des Screeningvektor wurden an diesem sogleich die PCR-Primer getestet (siehe 4.2.1). Die Primerkombination *Rosa\_Scr4\_for* und *Rosa\_Scr6\_re* ergab ein positives PCR-Produkt von etwa 1,6 kb.



**Abb. 36** Screeningvektor - PCR  
M (Marker), 4+6 (Primer: *Rosa\_Scr4\_for*, *Rosa\_Scr6\_re*)

## 6 Diskussion

Eine überlebenswichtige Aufgabe jeder Zelle ist die Aufrechterhaltung des 20 000-fachen Kalziumionengradienten über der Zellmembran, der definierte Einstrom und der Rücktransport dieser Teilchen in den Extrazellularraum (Clapham 2007). Über die Kalziumionenkonzentration im Intrazellularraum werden eine Vielzahl von wichtigen Prozessen in der Zelle kontrolliert und reguliert. Der  $Ca_v1.2$ -Kanal spielt neben weiteren HVA- und LVA-Kalziumkanälen eine entscheidende Rolle für den Einstrom von Kalziumionen in die Zelle.

Die genaue, physiologische Bedeutung des  $Ca_v1.2$ -Kanals ist bis heute nicht zufriedenstellend geklärt. In zahlreichen Experimenten wurde versucht, die Funktionalität des Kanals durch pharmakologische Inhibitoren zu unterbinden. Problematisch scheint jedoch, dass die gängigen Kalziumkanalblocker nur bedingt spezifisch und zuverlässig einen Kalziumkanal hemmen. So zeigte sich beispielsweise, dass bei Einsatz von höheren Konzentrationen auch andere spannungsabhängige Kanäle mitblockiert werden. Zudem haben die verwendeten Inhibitoren einen Effekt auf das kardiovaskuläre System, welches die Untersuchungsergebnisse verfälschen kann. Daher bietet es sich an, die erwünschten Modifikationen des Kalziumkanals auf genetischer Ebene durchzuführen. Zusätzlich zu einer gezielten Mutagenese ist die gewebespezifische Expression sinnvoll (Moosmang et al, 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das physiologische *Trafficking* des  $Ca_v1.2$ -Kalziumkanals untersucht werden. Die Kanalsequenz an sich wurde nicht verändert, jedoch um zwei Proteine erweitert. Die Integration der 27 Basen des HA-tags ermöglicht eine Darstellung des Kanals an der Oberfläche der Zelle. Das zweite hinzugefügte Protein, der SNAP-tag, wurde N-terminal an die Kalziumkanalsequenz eingefügt. Der letztere Detektionsmarker liegt somit bei membranständigen Kalziumkanälen im intrazellulären Kompartiment. Durch Einsatz membranpermeabler SNAP-Substrate ist eine intrazelluläre Detektion des Kanals möglich.

## 6.1 HA-tag

Zur Detektion des Ca<sub>v</sub>1.2-Kanals an der Oberfläche der transfizierten Zellen wurde das gut etablierte System des HA-tags verwendet. Der HA-tag gehört zu der Gruppe der Epitop-tags. Durch das Einfügen einer kurzen Aminosäuresequenz in die Sequenz des Zielproteins wird eine durch spezifische Antikörper detektierbare Struktur in einen Ionenkanal integriert. Um aussagekräftige Versuchsergebnisse zu erhalten, ist es wichtig, die korrekte Expression, Struktur und Funktion des Zielproteins unbeeinflusst zu lassen. Der Epitop-tag sollte daher in funktionell untergeordneten Regionen des Zielproteins liegen und gleichzeitig gut durch Antikörper zu erreichen sein. Darüberhinaus wird versucht, die Aminosäuresequenz möglichst kurz zu halten, um das Interaktionsrisiko zu minimieren. Die üblicherweise eingesetzten Epitop-tags sind zwischen 6 und 12 Aminosäuren lang (Maue, 2007). In der HA-Technologie dient als Antigen ein Derivat des Hämagglutinins (HA) des humanen Influenzavirus. Der HA-tag wurde im Rahmen dieser Arbeit in die Verbindungsschleife zwischen den Segmenten S5 und S6 der Domäne II eingebaut. An dieser Position ist der HA-tag in membranständigen Ca<sub>v</sub>1.2-Kanälen extrazellulär lokalisiert. Im Gegensatz zu bereits veröffentlichten Studien wurde der HA-tag ohne flankierende Aminosäuren in die Kanalsequenz integriert (Altier et al, 2002). Die Ergebnisse ermöglichen einen Rückschluss, ob die zusätzlichen Aminosäuren für eine ungestörte Expression, Funktion und Detektion notwendig sind.

Die Position des HA-tag wurde aus Arbeiten von Altier et al. übernommen. In seiner Veröffentlichung über das *Trafficking* der L-Typ-Kanäle und den Zusammenhang mit dem Proteinkinase A Verankerungsprotein 79 (*A kinase anchoring protein, AKAP79*) wurde der HA-tag in die extrazelluläre Aminosäureschleife S5-H5 der Domäne II eingebaut. Für die Integration des HA-tags wurde bei Altier et al. als auch im Rahmen dieser Arbeit eine MluI-Restriktionssequenz durch eine stille Mutation eingefügt, um eine Schnittstelle für die HA-tag-Integration zu konfigurieren. Altier et al. arbeiteten mit dem Kalziumkanal aus dem Genom der Ratte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die analoge Aminosäuresequenz des Ca<sub>v</sub>1.2-Kanals aus dem Kaninchen verwendet (GenBank™ accession number: X55763.1). Die

HA-tag-Sequenz wurde unter Beachtung des Leserasters über die M1u1-Schnittstelle direkt *in frame* in die Kanalsequenz eingefügt. Altier et al. hingegen verlängerten die 9 Aminosäuren des HA-tags (YPYDVPDYA) zu beiden Seiten, um die Aminosäureschleife zu erweitern. Seine eingefügte, artifizielle Aminosäuresequenz lautet wie folgt: TRH YPYDVPDYA VTFDEMQ (*kursiv*: HA-tag). Das HA-Protein ist somit 12 Aminosäuren weit von dem Ende des Segments S5 der Domäne II entfernt. Laut den Veröffentlichungen von Altier et al. verbessern die zusätzlichen Aminosäuren die Erreichbarkeit des HA-tags für Antikörper (Altier et al, 2002).

Nach SDS-Aufschluss ist der Kalziumkanal Ca<sub>v</sub>1.2 auf dem Western Blot sowohl im Wildtyp-, LK1-HA- als auch SNAP-LK1-HA-Ansatz mit Hilfe des Anti-Ca<sub>v</sub>1.2-Antikörpers (Prof. Dr. F. Hofmann) darzustellen (siehe Abb. 13, Abb. 25). Im SDS-Aufschluss werden die Zellen chemisch fragmentiert. Es erfolgt keine Separation der einzelnen Zellbestandteile. In der Zelllösung können mit Hilfe von Antikörpern gezielt Zellproteine dargestellt werden. So interagiert in den durchgeführten Zellkulturexperimenten der Anti-Ca<sub>v</sub>1.2-Antikörper mit dem transfizierten Kalziumkanal. Daraus lässt sich schließen, dass nicht nur die Transfektion der HEK293T-Zellen mit dem Kalziumkanal erfolgreich war, sondern auch dieser für die Detektion in ausreichenden Mengen exprimiert wird. Auch die Erweiterung des Kanals scheint die Expression des Membranproteins nicht wesentlich zu beeinflussen, da die Intensität der Signale des Wildtyp-, LK1-HA- als auch SNAP-LK1-HA-Ansatz auf dem Western Blot nicht deutlich voneinander abweichen (siehe Abb. 13, Abb. 25). Der Nachweis des Ca<sub>v</sub>1.2-Kanals durch den Anti-Ca<sub>v</sub>1.2-Antikörper gelingt ebenfalls in der Membranproteinpräparation (siehe Abb. 16, Abb. 25). Nach Extraktion von Membranfragmenten der Zellen, können auf dem Western Blot spezifisch membranständige Protein aufgespürt werden. Das positive Ergebnis durch den Anti-Ca<sub>v</sub>1.2-Antikörper zeigt, dass die exprimierten Ca<sub>v</sub>1.2-Kanäle in den HEK293T-Zellen in der Zellmembran bzw. in intrazellulären Vesikeln der HEK293T-Zellen integriert sind.

Unter Verwendung des Anti-HA-Antikörpers (Covance) im SDS-Aufschluss ist der HA-tag des LK1-HA- und SNAP-LK1-HA-Kanals darzustellen (siehe Abb. 15, Abb. 27). Die Kanaldetektion mittels Anti-HA-Antikörper in der Membranpräparation hingegen blieb erfolglos (siehe Abb. 17, Abb. 27). Dies gilt sowohl für die Erweiterung des Kanals um SNAP- und HA-tag als auch für die alleinige HA-tag-Integration. Die positive Detektion der Epitop-tags Zellen zeigt, dass

der gewählte Antikörper den HA-tag spezifisch erkennt. Voraussetzung hierfür ist der Aufschluss der HEK293T-Zellen. Da die transfizierten Kanäle in der Membranproteinpräparation jedoch durch den Anti-Ca<sub>v</sub>1.2-Antikörper (Prof. Dr. F. Hofmann) dargestellt werden können, ist ein fehlerhaftes *Trafficking* als Ursache für die fehlende Detektion der HA-Kanäle in der Membranproteinpräparation unwahrscheinlich.

Diese These wird auch durch bereits existierende Publikation über die Auswirkung des HA-tags an gewählter Position auf die Funktionalität des Kalziumkanals und das *Trafficking* unterstützt: So konnten Altier et al. in Vergleichsversuchen mit einem Wildtyp-Kalziumkanal zeigen, dass die biophysikalischen Eigenschaften durch die Verlängerung und Veränderung der Proteinsequenz nicht beeinflusst werden. Die Koexpression einer  $\beta_{1b}$ -Untereinheit verstärkt zudem den Transport und die Integration der Kalziumkanäle in die Membran um etwa das Dreifache (Altier et al, 2002; Schwake et al, 2000). Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Funktionalität eines um den HA-tag erweiterten Kanals wurden von Di Biase beschrieben. Diese Arbeitsgruppe integrierte in Anlehnung an eine Publikation von Obermair et al. und Altier et al. den HA-tag in die Aminosäureschleife des Segment S5 der Domäne II des Ca<sub>v</sub>1.2-Kanals der Ratte. Die biophysikalischen Eigenschaften und der Einbau des Kanals in die Membran wurden im Vergleich zu unmodifizierten Kanälen ebenfalls nicht beeinflusst (Di Biase et al, 2011). Eine weitere Arbeitsgruppe bezieht sich auch auf die Resultate von Altier et al. und baute den HA-tag in den Ca<sub>v</sub>1.2-Kanal der Ratte ein. Sowohl im Wildtypversuch als auch in Zellen, die Kalziumkanäle exprimieren, die die Timothy-Mutation tragen, konnte eine Oberflächenexpression des Kanals in nicht permeabilisierten Zellen mittels HA-tag gezeigt werden (Bidaud & Lory, 2011). Auch in Zusammenschau dieser Veröffentlichungen erscheint ein gestörtes *Trafficking* unwahrscheinlich.

Nachdem unter Verwendung des Anti-Ca<sub>v</sub>1.2-Antikörpers gezeigt werden konnte, dass die Integration des SNAP- und HA-Proteins die Expression und den Einbau in die Membran nicht gravierend beeinflusst, wäre eine eingeschränkte Interaktion des Anti-HA-Antikörpers mit dem HA-Epitop ein Erklärungsansatz. Erst nach Auflösen der Zelle im SDS-Aufschluss wird die Integrität der Membranproteine soweit zerstört, dass ein Detektion durch den spezifischen Anti-HA-Antikörper (Covance) möglich ist (siehe Abb. 15, Abb. 27). In einem weiteren Experiment sollte die Oberflächenexpression des um das HA-Epitop erweiterten Ca<sub>v</sub>1.2-Kanals *in vitro* in den Immunofluoreszenzversuchen untersucht werden. Hier zeigte sich,

dass in unpermeabilisierten Zellen der Nachweis des HA-tags fehlt (siehe Abb. 22, Abb. 31). In den permeabilisierten Ansätzen jedoch konnte der HA-tag durch den Anti-HA-Antikörper (Abcam) nachgewiesen werden (siehe Abb. 22, Abb. 31). Mit Hilfe des Detergenz Saponin wurden Poren in die Zellmembran eingefügt (Baumann et al, 2000; Seeman, 1967). Hierdurch gelangte der Antikörper einerseits in den Intrazellularraum und die Detektion des HA-tags in der Zelle ist möglich. Andererseits wird wiederum die Zellmembrankontinuität unterbrochen und die Erreichbarkeit des HA-tags in zellmembranständigen Kanälen erwirkt. Die behinderte Antikörper-Antigen-Interaktion erklärt auch, weshalb trotz fehlender HA-Interaktion in der Membranproteinpräparation ein positiver  $Ca_v1.2$ -Kanalnachweis in der Membran in den Western-Blot-Versuchen möglich ist. Altier et al. verbesserten die Erreichbarkeit des HA-tags durch Verlängerung der extrazellulären Schleife um zusätzliche 9 Aminosäuren. Hierbei beruft er sich auf Vorexperimente durch Schwake et al. Diese Arbeitsgruppe verwendete den HA-tag, um eine extrazellulär gelegene Aminosäureschleife eines Kaliumkanals zu markieren. Durch die Aminosäuren wird die sehr kurze Schleife vergrößert und dadurch besser für die Antikörper zugänglich (Schwake et al, 2000). Nach Integration des HA-tag in der extrazelluläre Aminosäureschleife S5-H5 der Domäne II könnte also die räumliche Struktur den Zugang zu dem Epitop für den Antikörper behindern. Während Altier et al. *Xenopus Oozyten* und den Kalziumkanal der Ratte verwendeten, dienten im Rahmen dieser Arbeit HEK293T-Zellen und der Kalziumkanal des Kaninchen als Expressionssystem (Altier et al, 2002). Daher sind die Ergebnisse nicht uneingeschränkt auf das HEK293T-Zellsystem übertragbar. Die Interaktion von HA-tag und Antikörper sollte in weiteren Experimenten überprüft werden. In Anlehnung an Altier et al. sind hierfür die eigenen DNS-Vektoren um die zusätzlichen Aminosäuren zu erweitern und die Detektierbarkeit im HEK293T-Versuch zu testen. Zudem ist zu bedenken, dass die genaue Lokalisation der HA-tragenden Kanäle in den Immunfluoreszenzversuchen nicht differenziert werden kann. Fraglich ist damit, ob ein Großteil der HA-tag-tragenden Kanäle sich im Intrazellulärraum befindet und zusätzlich zur gestörten Antigen-Antikörper-Reaktion möglicherweise ein reduziertes *Trafficking* vorliegt.

Die Spezifität der verwendeten Anti-HA-Antikörper konnten in den Negativkontrollen des Immunostainings und in den untransfizierten bzw. Wildtypversuchsreihen gezeigt werden. Vergleicht man die Negativkontrollen des Immunostainings (siehe Abb. 19 - Abb. 21, Abb. 28

- Abb. 30) mit der HA-Detektion in permeabilisierten Zellen (siehe Abb. 22, Abb. 31), zeigt sich ein deutlicher Signalunterschied. Unter Verwendung des Anti-HA-Antikörpers (Abcam) in den Negativ- und Wildtypkontrollen des Immunostainings konnte zu keiner Zeit ein Signal detektiert werden (siehe Abb. 19 - Abb. 21, Abb. 28 - Abb. 30). Dies ist zum einen auf die spezifische Interaktion des HA-Antikörpers mit dem regelrecht exprimierten HA-tag zurückzuführen. Zum anderen wird damit auch eine unspezifische Reaktion des sekundären Antikörpers (Alexa Fluor 594) mit HEK293T-Zellstrukturen ausgeschlossen. Auch in den Western Blot-Versuchen konnte unter Verwendung des Anti-HA-Antikörpers (Covance) lediglich in transfizierten Zellen nach SDS-Aufschluss ein positives Signal detektiert werden (siehe Abb. 15, Abb. 27).

Ziel war die Analyse des Traffickings an die Oberfläche der Zelle mit Hilfe des HA-tags. In den durchgeführten Versuchen zeigte sich jedoch eine gestörte Interaktion zwischen den Anti-HA-Antikörpern und den zugehörigen HA-Epitopen. Sowohl nach Transfektion des pcDNA3-SNAP-LK1-HA- als auch des pcDNA3-LK1-HA-Plasmids wurde das integrierte HA-Antigen in unpermeabilisierten Zellen von den Antikörpern nicht erkannt. Dieselben Antikörper lieferten unter gleichen Bedingungen in permeabilisierten Zellen ein sehr deutliches Signal. Gleichzeitig konnte in allen Western Blot-Versuchen der Ca<sub>v</sub>1.2-Kanal mit dem Anti-Ca<sub>v</sub>1.2-Antikörper nachgewiesen werden. Daraus ist zu schließen, dass der HA-tag nicht die Synthese des Kalziumkanals verhindert oder eine rasche Degradation initiiert. Auch das Trafficking des Kanals an die Zelloberfläche und damit den Einbau in die Zellmembran scheint nicht wesentlich beeinflusst zu sein. Zusammenfassend empfiehlt es sich in zukünftigen Versuchen den HA-tag wie Altier et al. mit flankierenden Aminosäuren zu versehen, um eine bessere Detektion zu erzielen.

## 6.2 SNAP-tag

### 6.2.1 Integration am N-Terminus

Die Technik des SNAP-tag wurde 2003 erstmals publiziert (Keppler et al, 2003). Die SNAP-Technik impliziert, dass das SNAP-Protein als O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNS-Alkyltransferase (AGT) einen Fluoreszenzfarbstoff auf einen reaktiven Cysteinrest des AGT überträgt. In den bisher veröffentlichten Publikationen wurde der SNAP-tag allerdings nie N-terminal an den intrazellulär gelegenen Teil eines Kalziumkanals angefügt. Eine N-terminale, jedoch extrazelluläre Integration des SNAP-Proteins an den GABA<sub>B1</sub>- und GABA<sub>B2</sub>- ( $\gamma$ -Aminobuttersäure)-Rezeptor veränderte die Eigenschaften sowie die Translokation des Kanals in die Membran nicht (Maurel et al, 2008).

Eine enge Kollaboration zwischen dem N-Terminus und der  $\beta$ -Untereinheit scheinen demnach eine wichtige Rolle für die Kanalfunktion zu spielen. Arbeiten von Kobrinsky et al. zeigen, dass beide, N- und C-Terminus, jeweils auf unterschiedliche Weise für die spannungs- und kalziumabhängige Inaktivierung des Kalziumkanals wichtig sind. Die spannungsabhängige Konformationsänderung des N-Terminus soll durch die  $\beta$ -Untereinheit gehemmt werden und das *Trafficking* beeinflussen. Kobrinsky et al. postulierten, dass die akzessorische  $\beta$ -Untereinheit eine Desensibilisierung des N-Terminus gegenüber Spannung induziert, die für die kalziumabhängige- (CDI) sowie die spannungsabhängige Inaktivierung (VDI) essentiell ist. Die  $\beta$ -Untereinheit verhindert demnach eine Hemmung des Kalziumkanals durch den N-Terminus (Kobrinsky et al, 2005).

Die Verlängerung des N-Terminus mit der SNAP-Sequenz birgt die Gefahr, diese physiologische Funktion und Interaktion der beiden Kanaluntereinheiten zu unterbrechen. Da keine direkt vergleichbaren Ergebnisse bezüglich eines N-terminalen Einbaus des SNAP-Proteins existieren, ist es interessant, die Auswirkungen zu untersuchen.

Um ein mögliche Auswirkung des SNAP-Tags auf die Proteinexpression und das *Trafficking* zu untersuchen wurden zwei Vektoren konstruiert. Beide enthalten den HA-tag, jedoch wurde nur einer um den SNAP-tag erweitert. Nach Transfektion der Konstrukte in HEK293T-Zellen



zeigen sich auf dem Western Blot die gleichen Ergebnisse: Nach SDS-Aufschluss werden der SNAP-LK1-HA- sowie LK1-HA-Kanal über den Anti- $\text{Ca}_v1.2$ -Antikörper und den Anti-HA-Antikörper dargestellt (siehe Abb. 13, Abb. 15, Abb. 25, Abb. 27). In der Membranproteinpräparation hingegen fehlt jedoch die HA-tag vermittelte Detektion (siehe Abb. 17, Abb. 27). Daher kann geschlossen werden, dass der SNAP-tag nicht für die fehlende HA-tag Detektion im Western Blot und in den Immunofluoreszenzversuchen verantwortlich ist. Da in beiden Versuchsansätzen der Kanal dargestellt werden kann, hemmt die Veränderung des N-Terminus auch nicht die Expression des Kanals. Zudem zeigt sich, dass die N-terminale Position des SNAP-Proteins die Integration des Kanals in die Membran nicht oder nur geringfügig beeinflusst. In Zusammenschau der Ergebnisse des Immunofluoreszenz und der Western Blot-Versuche ist ein gestörtes Trafficking zwar nicht sicher ausgeschlossen, jedoch nicht alleinig für fehlende Detektion des Kanals durch den Anti-HA-Antikörper in unversehrten Zellen verantwortlich. Wahrscheinlicher beruht wie bereits in 6.1 beschrieben, die fehlende Detektion des Kanals durch den Anti-HA-Antikörper in nicht-permeabilisierten Zellen auf einer behinderten Interaktion.

Andere Markerproteine als der SNAP-tag wurden bisher durchaus an N-terminaler Position des  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals integriert. In Immunofluoreszenzversuchen von Kepplinger et al. wurde im 5'-Bereich der humanen  $\text{Ca}_v1.2$ -Sequenz die Basenabfolge des EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) integriert, ohne eine Störung des Kanaltargetings in die Membran auszulösen (Kepplinger et al, 2000). Kobrinsky et al. fügten grün fluoreszierende Proteine (*green fluorescent protein*, GFP) sowohl N-terminal als auch C-terminal an den Kalziumkanals an. Die Erweiterung der Kanalstruktur hatte keinen Einfluss auf die Funktionalität und die Integration in die Membran (Kobrinsky et al, 2003). Auch nach Einbau des *green fluorescent protein* (GFP) an N-terminaler Stelle in den kardialen Kalziumkanal ist dieser in seinen Eigenschaften nicht von einem Wildtyp-Kanal zu unterscheiden (Gerster et al, 1999; Grabner et al, 1998). Diese Beobachtung ist insbesondere unter Berücksichtigung der Größe des GFP mit 27 kDa erstaunlich und lässt vermuten, dass der etwas kleinere SNAP-tag (20 kDa) unproblematisch in ein Zielprotein integriert werden kann. Die Erweiterung des Kalziumkanals an N-terminaler Stelle beeinträchtigt nach bisherigen Erkenntnissen weder die Funktionalität noch das Trafficking des Kanals. Eine N-terminale Integration des SNAP-tag scheint daher durchaus angebracht. Zu bedenken ist jedoch, dass Grabner et al. das GFP

nicht direkt vor die Ca<sub>v</sub>1.2-Sequenz einfügen, sondern 24 Basen als Polylinker zwischengeschaltet haben (Grabner et al, 1998). Diese zusätzlichen Aminosäuren tragen möglicherweise ebenfalls dazu bei, den Abstand zum eigentlichen Kanal zu vergrößern und dadurch die Kanalphysiologie wenig bis kaum zu beeinträchtigen.

### 6.2.2 Alternative Integration am C-Terminus

Der SNAP-tag wurde an das N-terminale Ende des Ca<sub>v</sub>1.2-Kanals integriert. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der SNAP-tag am N-Terminus die Expression, Trafficking sowie Detektion nicht wesentlich beeinflusst. Dennoch ist zu bedenken, dass die Größe des SNAP-Proteins (20 kDa) ein gewisses Protein-Protein-Interaktionspotential birgt. Als alternative Position könnte man sich das diametrale Ende des Kanals überlegen.

Die aktuelle Studienlage sieht den C-Terminus jedoch als wichtigen regulatorischen Baustein des Kalziumkanals, der bisher nur in Ansätzen verstanden ist und dessen Kenntnis noch weiterer, intensiver Forschung bedarf. Eine Integration des SNAP-tag an dieser Stelle würde somit mit großer Wahrscheinlichkeit die physiologische Regulation und Funktion des Kalziumkanals stören und die Zielsetzung – eine Analyse der normalen Verteilung und Funktion des Kanals – aufheben. Im Folgenden wird die vielfältige Wirkungsweise des C-Terminus in einem kleinem Überblick beschrieben, um die Wichtigkeit dieses Ca<sub>v</sub>1.2-Kanalabschnittes hervorzuheben.

Der C-Terminus wird anhand einer Calpain-Erkennungssequenz in zwei Abschnitte gegliedert. 3' gelegen befindet sich ein IQ- (*isoleucin-glutamin*) Motiv, an das kalziumabhängig das Protein Calmodulin (CaM) bindet und die Inaktivierung des Kanals beschleunigt (Bers, 2008). Ebenfalls soll die Inaktivierung durch den I-II-Linker des Kalziumkanals, der als Porenstopfen dient, beschleunigt werden (Kim et al, 2004). Von der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Inaktivierung (*calcium dependent inactivation*, CDI) wird ein zweiter Inaktivierungsmechanismus unterschieden: die spannungsabhängige Inaktivierung (*voltage dependent inactivation*, VDI). Kalzium vermittelt außerdem eine Fazilitierung (*calcium dependent facilitation*, CDF) des Kanals. Die Fazilitierung wird als Anpassungsmechanismus

verstanden, um bei schnellen Herzfrequenzen die geringe Öffnungsbereitschaft der Kanäle zu kompensieren. Ebenso wie bei der CDI dient auch hier Calmodulin (CaM) als Kalziumsensor (Blaich et al, 2010). Die genaue molekulare Interaktion zwischen Calmodulin und dem C-Terminus der porenbildenden  $\alpha_1$ -Unterheiten bleibt jedoch Gegenstand der aktuellen Forschung (Bodi et al, 2005). VDI, CDI und CDF werden als Teil der Autoregulation der L-Typ-Kalziumkanäle verstanden. Eine Veränderung des IQ-Motivs hebt die Regulation der CDI und CDF auf und führt im Mausmodell zur Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie mit Apoptose der Kardiomyozyten und Gewebefibrose (Blaich et al, 2012b; Bodi et al, 2005; Zuhlke et al, 1999). Neben der Kanalinaktivierung und -fazitierung durch das an das IQ-Motiv gebundene  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM, wird über die Aktivierung der MAPK-Kaskade die Expression einer Vielzahl von Genen aktiviert (Blaich et al, 2012a; Dolmetsch et al, 2001; Domes et al, 2011). Die Kanalaktivität wird zudem durch die Beweglichkeit des C-Terminus in Abhängigkeit von der herrschenden Membranspannung im Zytoplasma essentiell beeinflusst. Je nach Aktivitätszustand des Kanals (aktiv, inaktiviert, ruhend) zeigt der C-Terminus eine unterschiedliche Konformation. Kobrinsky et al. erachten es als wahrscheinlich, dass der C-Terminus durch die Bewegung mit anderen Zielproteinen interagiert und Signalkaskaden beeinflusst. Möglicherweise ermöglicht diese Eigenschaft sogar den Transport von Calmodulin von der Kanalpore zum Zielprotein CaM-aktivierte Proteinkinase (CaMK). Eine künstliche Hemmung der C-terminalen Bewegungsfreiheit resultiert in einer gestörten Kanalinaktivierung sowie einer veränderten CREB-abhängigen Transkription (Kobrinsky et al, 2003). Desweiteren ist die exakte Position des C-Terminus im Zytoplasma entscheidend für die CDI und VDI ist (Kobrinsky et al, 2005).

Der distale Anteil des C-Terminus reguliert außerdem die Transkription von Genen im Zellkern (Gomez-Ospina et al, 2006). Posttranslational findet eine funktionell wichtige Abspaltung im Bereich des C-Terminus, distal des IQ-Motivs, statt (Satin et al, 2011). Der C-terminale Rest inklusive der angehängten Proteine bleibt vermutlich mit dem Kalziumkanal assoziiert. Gomez-Ospina et al. vertreten die Meinung, dass der abgetrennte C-Terminus die Transkription im Zellkern beeinflussen kann (Gomez-Ospina et al, 2006). Experimente zeigen, dass die Translokation des C-Terminus-Rests in den Zellkern den  $\text{Ca}_v1.2$ -Promoter hemmt und damit die Expressionsrate der Kalziumkanäle herabsetzt. Dieser Mechanismus wird als Teil der Autoregulation des L-Typ-Kalziumkanals beschrieben, der unter hypertrophen

Bedingungen die  $Ca_v1.2$ -Transkriptionen enthemmt (Dolphin, 2009; Satin & Schroder, 2009; Schroder et al, 2009).

In weiteren *in vivo*-Experimenten wurde gezeigt, dass der C-Terminus zudem eine inhibitorische Sequenz enthält. Diese bindet an einen weiter proximal gelegenen Teil des C-Terminus und verhindert so wohl eine Ubiquitinylierung und somit den Abbau des Kanals (Domes et al, 2011).

Mit diesem kurzen Einblick in die noch erforschungsbedürftige Bedeutung des C-Terminus des  $Ca_v1.2$ -Kanals wird deutlich, dass eine C-terminale Intregation einer Erforschung des normalen Kalziumkanalverhaltens entgegenstehen würde.

### **6.3 Rolle des L-Typ-Kalziumkanals in der Pathophysiologie**

Spannungsabhängige Kalziumkanäle vermitteln den elektrisch gesteuerten Zutritt von Kalziumionen in eine Vielzahl von unterschiedlichen Zellen. Durch das kontrollierte Einströmen der Ionen werden zahlreiche physiologische Prozesse angestoßen und beeinflusst. Ein Einblick hierzu wurde in der Einleitung bereits wiedergegeben. Ende der 90er Jahre wurden die einzelnen Gene der Kalziumkanäle den humanen Chromosomen zugeordnet. Mit Fortschritt der Genetik und auf dem Wissen der Genlokalisierung aufbauend, konnten nach und nach einzelne Mutationen in ebendiesen Genen identifiziert und einem Phänotyp zugeordnet werden. Gewisse Erkrankungen wurden somit als „Kanalerkrankungen“ (*Channelopathies*) klassifiziert. Hierbei fasst man genaugenommen Mutationen der Kanaluntereinheiten und der regulatorischen Proteine zusammen. Nicht jede der Krankheiten ist so eindeutig auf eine genetische Ursache zurückzuführen. Grund hierfür ist, dass neben autosomal-dominanten, monogenen Erkrankungen auch solche existieren, die mit geringerer Penetranz und nur im Zusammenspiel von multiplen Faktoren auftreten. Ein klassisches Beispiel einer multifaktoriellen Erkrankung ist die Herzinsuffizienz: zwar wird dem L-Typ-Kalziumkanal eine bedeutende Rolle in der Entwicklung dieser Volkskrankheit zugeschrieben, doch ist der genaue pathophysiologische Hintergrund noch nicht bekannt (Bidaud & Lory, 2011; Bodi et al, 2005; Lory et al, 1997; Schroder et al, 1998; Stockner &

Koschak, 2012). In der unten abgebildeten Tabelle (siehe Tabelle 3) ist eine Übersicht zu den identifizierten Kanalerkrankungen der L-Typ-Kalziumkanäle aufgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem  $Ca_v1.2$ -Kanal gearbeitet. Bisher sind vier Mutationen in diesem Gen beschrieben, denen eine Erkrankung zugeordnet werden kann. Während das Timothy-Syndrom auf einer *gain of function*-Mutation beruht, zeichnet sich das Brugada-Syndrom 3 in einem Funktionsverlust (*loss of function*) des CACNA1C-Produkts aus. Ein erhöhtes Risiko für Kammerflimmern und damit assoziierten plötzlichen Herztod kennzeichnet diese Variante des Brugada-Syndroms. In neun Fällen wurde das Brugada-Syndrom auch mit einem kurzen QT-Intervall in den EKG-Aufzeichnungen beschrieben. Die vierte Erkrankung, das Frührepolarisationssyndrom (ERS), wurde bisher lediglich an einem Patienten gezeigt (Stockner & Koschak, 2012).

**Tabelle 3** Kanalerkrankungen der  $Ca_v1$ -Familie (Bidaud & Lory, 2011; Stockner & Koschak, 2012)

| Kanal     | Gen     | Kanalerkrankung   |
|-----------|---------|---|
| $Ca_v1.1$ | CACNA1S | Hypokalämische Periodische Paralyse 1 (HypoPP1)<br>Maligne Hyperthermie 5 (MHS5)  |
| $Ca_v1.2$ | CACNA1C | Timothy-Syndrom (TS)<br>Brugada-Syndrom 3 (BS3)<br>Brugada-Syndrom mit Short QT (SQT)<br>Frührepolarisationssyndrom (ERS) |
| $Ca_v1.3$ | CACNA1D | Sinusknotendysfunktion und Taubheit (SANDD)   |
| $Ca_v1.4$ | CACNA1F | Stationäre Nachtblindheit, chromosomale Zapfen-Stäbchen-Dystrophie (CORDX3)   |

## 6.4 Ausblick

Warum versucht man Kanäle bzw. Kanalerkrankungen zu erforschen? Die Gründe hierfür können in zwei Kategorien eingeteilt werden: Interesse an der Grundlagenforschung einerseits und andererseits der potentielle Nutzen für den Patienten. Durch den Vergleich von Wildtypkanälen und mutierten Kanälen hofft man den Zusammenhang zwischen molekularer Struktur und Funktion aufzudecken. Schon mehrfach ergaben sich hierdurch überraschende und faszinierende Erkenntnisse. Gleichzeitig können unter den Versuchsbedingungen auch therapeutische Ansätze geprüft und Diagnosescreenings etabliert werden. Die neuen Forschungsergebnisse zeigen, dass die Wichtigkeit von Faltung, Trafficking und Regulation der Ionenkanäle leicht unterschätzt werden.

Der L-Typ-Kalziumkanal hat bekannterweise eine physiologisch wichtige Rolle in erregbaren Geweben. Daher überrascht es, dass genetische Erkrankungen, die mit diesem Kanal assoziiert sind, eher selten auftreten. Im Mausexperiment beobachtet man, dass ein komplettes Fehlen des  $Ca_v1.2$ -Kanals zu einem letalen Ausgang mit 14.5 Tagen post coitum führt (Seisenberger et al, 2000). Es ist anzunehmen, dass auch schwerwiegende Mutationen des Kalziumkanals daher in einem letalen Phänotyp resultieren. Die bekannte *gain of function*-Mutation des Timothy-Syndroms hingegen stellt eine geringfügigere Veränderung dar, die von den Patienten im Durchschnitt etwa 2,5 Jahre überlebt wird (Splawski et al, 2004). Mit großer Wahrscheinlichkeit gibt es noch weitere kleine Mutationen, die sich im Phänotyp nur mild bis gar nicht ausprägen. Bisherige transgene Mausmodelle beruhen auf *loss of function*-Modellen. Eine Untersuchung des *gain of function*-Phänotyps im Mausmodell, wie es das Timothy-Syndrom zeigt, bedarf eines detektierbaren Vektors, der den Vergleich von Wildtypkanälen und mutierten  $Ca_v1.2$ -Kanälen ermöglicht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Modellvektoren hergestellt und getestet, die in einem solchen hierfür eingesetzt werden könnten. Für die Untersuchung des *Trafficking*-Verhaltens des  $Ca_v1.2$ -Kanals in HEK293T-Zellen wurden zwei Vektoren mit unterschiedlichen Detektionsmarkern kreiert, die die Kanaldetektion in den *in vitro*- als auch in zukünftigen *in vivo*-Versuchen ermöglichen sollen. Die ersten HEK293T-Experimente zeigten, dass der Einbau des HA- und SNAP-Proteins die Expression des Kalziumkanals nicht wesentlich beeinflusst. Für eine optimalere Interaktion zwischen dem Anti-HA-Antikörper und dem

zugehörigen Epitop, sollten neben dem HA-tag in Anlehnung an Altier et al. weitere Aminosäuren integriert werden (Altier et al, 2002). Ziel wäre eine bessere Erreichbarkeit des HA-tags. Durch eine eindeutige Detektion des Kanals könnten ein Verteilungsunterschied in der Zelle zur Wildtypexpression ausgeschlossen werden. Ausserdem ist zu überprüfen, inwieweit die N-terminale SNAP-tag-Integration das *Trafficking*-Verhalten beeinflusst. Hierbei wäre es interessant, ob ein Polylinker, wie ihn Grabner et al. beschrieben hat, zwischen der SNAP-Sequenz und dem Kanal einen Effekt auf die Expression und Funktion hat (Grabner et al, 1998). Aufgrund der derzeitigen Datenlage ist es ebenfalls sinnvoll, die positiven *Trafficking*-Effekte der  $\beta$ - und  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit auszunutzen und diese mitzutransfizieren. Damit würde man selbst im HEK293T-Modell die physiologische Zusammensetzung des heteromultimeren Kalziumkanals imitieren.

Anhand der Timothy-Kanalerkrankung entdeckten die Forscher, dass der  $Ca_v1.2$ -Kanal nicht nur im erregbarem Gewebe, sondern auch im Gehirn und im Immunsystem von essentieller Bedeutung ist. Die Entwicklung des zentralen Nervensystems ist bei diesen Patienten retardiert und resultiert in einer autistischen Störung. Hiervon ausgehend wurde eine Assoziation von Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single-nucleotide polymorphisms*, SNP) innerhalb des  $Ca_v1.2$ -Gens mit Autismuserkrankungen untersucht. Ein Zusammenhang mit der bipolaren Störung und der Schizophrenie konnte gezeigt werden, auch wenn der genaue pathophysiologische Hintergrund unklar bleibt (Liao & Soong, 2010). Die hohe Infektionsrate bei Timothypatienten stieß eine intensive Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Immunsystem und Kalziumkanälen an. L-Typ-Kalziumkanäle ließen sich in T-Zellen, B-Zellen, Dendritischen Zellen sowie weiteren Modulatoren des Abwehrsystems nachweisen. Doch auch hier besteht noch Forschungsbedarf (Liao & Soong, 2010). Die Timothy-mutation im Mausmodell bietet zudem einen Ansatz, therapeutische Optionen zu testen. Derzeit werden die Patienten mit dem Kalziumkanalblocker Verapamil behandelt. Der neu erforschte Zusammenhang zwischen der Aktivität des AKAP150 (*Akinase anchoring protein*) und der Inaktivierungskinetik im Rahmen des Timothysyndroms lässt auf einen neuen Ansatzpunkt für die medikamentöse Therapie hoffen (Cheng et al, 2011; Dixon et al, 2012). Roscovitine zeigte in HEK293T-Zellversuchen eine signifikante Steigerung der spannungsabhängigen Inaktivierung und damit eine Besserung des Phänotyps (Yazawa & Dolmetsch, 2013; Yazawa et al, 2011).

## 7 Zusammenfassung

L-Typ-Kalziumkanäle ermöglichen einen Einstrom von Kalziumionen, der Grundlage für jede Herzaktion ist. Die Exzitations-Kontraktions-Kopplung stellt einen zentralen Mechanismus des Herzens dar und ist somit wesentlich für die Überlebensfähigkeit des Organismus. Doch die Rolle des  $Ca_v1.2$ -Kanals geht weit über die Bedeutung im Herzen hinaus. Ein Hinweis darauf ist die *gain of function*-Mutation des Timothy-Syndroms, welche sich phänotypisch als Multiorgandysfunktion darstellt. Diese Kanalveränderungen bieten Anstoß die Verteilung und Funktion weiter zu untersuchen. Hierfür muss ein geeignetes Mausmodell geschaffen werden, an dem *in vivo*-Experimente erfolgen können. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Vektoren konstruiert, die zunächst in HEK293T-Zellen getestet wurden. Um den exprimierten Kanal detektieren zu können, wurde auf zwei verschiedene Techniken zurückgegriffen: der HA- und der SNAP-tag. Der HA-tag ist ein weit verbreitetes, gut etabliertes System, welches eine Detektion des membranständigen  $Ca_v1.2$ -Kanals an der Oberfläche der Zellen ermöglicht. Der SNAP-tag wird N-terminal inseriert, so dass er nach Expression im Intrazellulärraum liegt. Mittels membrangängiger Substrate kann der Kanal dargestellt werden. Die Wahl der Integrationsstelle des HA-tag wurde an Arbeiten von Altier et al. angelehnt (Altier et al, 2002). Jedoch wurden die analogen Sequenzen im Maus- und Kaninchen genom verwendet. Mit Hilfe von SDS-Zellaufschluss und Membranpräparation wurden sowohl der mutierte als auch der Wildtyp- $Ca_v1.2$ -Kanal im Western Blot dargestellt. Als weitere Detektionsmethode wurde die Immunofluoreszenz eingesetzt, um *in vitro* in HEK293T-Zellen die Expression und Verteilung des Kalziumkanals darzustellen. Die Ergebnisse zeigen, dass die alleinige Insertion des HA-tags ohne weitere Aminosäuren die *in vivo* Detektion durch den spezifischen Anti-HA-Antikörper weitgehend unterbindet. Die modifizierten Kalziumkanäle werden jedoch im Vergleich zu Wildtypkanälen regelrecht exprimiert. Auch die Integration des SNAP-tags scheint keine Auswirkung auf die Expression zu haben. Neben den Zellkulturvektoren wurde ein Gargetingvektor konzipiert, der um beide Epitoptags erweitert wurde. Die homologe Rekombination in ES-Zellen sollte mit Hilfe des CTV-Vektors durchgeführt werden. Für das anschließende Screening möglicher positiver Stammzellklone wurde das Protokoll von Soriano et al. modifiziert (Friedrich & Soriano, 1991). Die eigenen Screeningprimer konnten an einem Testvektor geprüft werden.





## 8 Literaturverzeichnis

Altier C, Dubel SJ, Barrere C, Jarvis SE, Stotz SC, Spaetgens RL, Scott JD, Cornet V, De Waard M, Zamponi GW, Nargeot J, Bourinet E (2002) Trafficking of L-type calcium channels mediated by the postsynaptic scaffolding protein AKAP79. *The Journal of biological chemistry* **277**: 33598-33603

Baumann E, Stoya G, Volkner A, Richter W, Lemke C, Linss W (2000) Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. *Acta histochemica* **102**: 21-35

Berggren PO, Yang SN, Murakami M, Efanov AM, Uhles S, Kohler M, Moede T, Fernstrom A, Appelskog IB, Aspinwall CA, Zaitsev SV, Larsson O, de Vargas LM, Fecher-Trost C, Weissgerber P, Ludwig A, Leibiger B, Juntti-Berggren L, Barker CJ, Gromada J, Freichel M, Leibiger IB, Flockerzi V (2004) Removal of Ca<sup>2+</sup> channel beta3 subunit enhances Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency and insulin exocytosis. *Cell* **119**: 273-284

Bers DM (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* **415**: 198-205

Bers DM (2008) Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annual review of physiology* **70**: 23-49

Bidaud I, Lory P (2011) Hallmarks of the channelopathies associated with L-type calcium channels: a focus on the Timothy mutations in Ca(v)1.2 channels. *Biochimie* **93**: 2080-2086

Blaich A, Pahlavan S, Tian Q, Oberhofer M, Poomvanicha M, Lenhardt P, Domes K, Wegener JW, Moosmang S, Ruppenthal S, Scholz A, Lipp P, Hofmann F (2012a) Mutation of the calmodulin binding motif IQ of the L-type Ca(v)1.2 Ca<sup>2+</sup> channel to EQ induces dilated cardiomyopathy and death. *The Journal of biological chemistry* **287**: 22616-22625

Blaich A, Pahlavan S, Tian Q, Oberhofer M, Poomvanicha M, Lenhardt P, Domes K, Wegener JW, Moosmang S, Ruppenthal S, Scholz A, Lipp P, Hofmann F (2012b) Mutation of the Calmodulin Binding Motif IQ of the L-type Cav1.2 Ca<sup>2+</sup> Channel to EQ Induces Dilated Cardiomyopathy and Death. *The Journal of biological chemistry* **287**: 22616-22625

Blaich A, Welling A, Fischer S, Wegener JW, Kostner K, Hofmann F, Moosmang S (2010) Facilitation of murine cardiac L-type Ca(v)1.2 channel is modulated by calmodulin kinase II-dependent phosphorylation of S1512 and S1570. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 10285-10289

Bodi I, Mikala G, Koch SE, Akhter SA, Schwartz A (2005) The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *The Journal of clinical investigation* **115**: 3306-3317

Bootman MD, Berridge MJ (1995) The elemental principles of calcium signaling. *Cell* **83**: 675-678

- Brittsan AG, Kranias EG (2000) Phospholamban and cardiac contractile function. *J Mol Cell Cardiol* **32**: 2131-2139
- Buraei Z, Yang J (2010) The ss subunit of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Physiological reviews* **90**: 1461-1506
- Campos C, Kamiya M, Banala S, Johnsson K, Gonzalez-Gaitan M (2011) Labelling cell structures and tracking cell lineage in zebrafish using SNAP-tag. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **240**: 820-827
- Carafoli E (2002) Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 1115-1122
- Casola S (2010) Mouse models for miRNA expression: the ROSA26 locus. *Methods in molecular biology* **667**: 145-163
- Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annual review of cell and developmental biology* **16**: 521-555
- Catterall WA, Cestele S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K, Scheuer T (2007) Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* **49**: 124-141
- Cheng EP, Yuan C, Navedo MF, Dixon RE, Nieves-Cintrón M, Scott JD, Santana LF (2011) Restoration of normal L-type Ca<sup>2+</sup> channel function during Timothy syndrome by ablation of an anchoring protein. *Circulation research* **109**: 255-261
- Chernyavskaya Y, Ebert AM, Milligan E, Garrity DM (2012) Voltage-gated calcium channel CACNB2 (beta2.1) protein is required in the heart for control of cell proliferation and heart tube integrity. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **241**: 648-662
- Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* **131**: 1047-1058
- Davidoff AJ, Maki TM, Ellingsen O, Marsh JD (1997) Expression of calcium channels in adult cardiac myocytes is regulated by calcium. *Journal of molecular and cellular cardiology* **29**: 1791-1803
- De Waard M, Pragnell M, Campbell KP (1994) Ca<sup>2+</sup> channel regulation by a conserved beta subunit domain. *Neuron* **13**: 495-503
- Di Biase V, Tuluc P, Campiglio M, Obermair GJ, Heine M, Flucher BE (2011) Surface traffic of dendritic CaV1.2 calcium channels in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**: 13682-13694
- Dixon RE, Cheng EP, Mercado JL, Santana LF (2012) L-type Ca<sup>2+</sup> channel function during Timothy syndrome. *Trends in cardiovascular medicine* **22**: 72-76

- Dolmetsch RE, Pajvani U, Fife K, Spotts JM, Greenberg ME (2001) Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science* **294**: 333-339
- Dolphin AC (2003) Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **35**: 599-620
- Dolphin AC (2006) A short history of voltage-gated calcium channels. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**: S56-62
- Dolphin AC (2009) Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channel subunits. *Current opinion in neurobiology* **19**: 237-244
- Dolphin AC (2013) The alpha2delta subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochimica et biophysica acta* **1828**: 1541-1549
- Domes K, Ding J, Lemke T, Blaich A, Wegener JW, Brandmayr J, Moosmang S, Hofmann F (2011) Truncation of murine CaV1.2 at Asp-1904 results in heart failure after birth. *The Journal of biological chemistry* **286**: 33863-33871
- Emrick MA, Sadilek M, Konoki K, Catterall WA (2010) Beta-adrenergic-regulated phosphorylation of the skeletal muscle Ca(V)1.1 channel in the fight-or-flight response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 18712-18717
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **25**: 533-535
- Fan IQ, Chen B, Marsh JD (2000) Transcriptional regulation of L-type calcium channel expression in cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* **32**: 1841-1849
- Flucher BE, Franzini-Armstrong C (1996) Formation of junctions involved in excitation-contraction coupling in skeletal and cardiac muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 8101-8106
- Friedrich G, Soriano P (1991) Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes & development* **5**: 1513-1523
- Gerster U, Neuhuber B, Groschner K, Striessnig J, Flucher BE (1999) Current modulation and membrane targeting of the calcium channel alpha1C subunit are independent functions of the beta subunit. *The Journal of physiology* **517 ( Pt 2)**: 353-368
- Golden KL, Marsh JD, Jiang Y (2004) Testosterone regulates mRNA levels of calcium regulatory proteins in cardiac myocytes. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* **36**: 197-202

- Gomez-Ospina N, Tsuruta F, Barreto-Chang O, Hu L, Dolmetsch R (2006) The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)1.2 encodes a transcription factor. *Cell* **127**: 591-606
- Gordon AM, Huxley AF, Julian FJ (1966) The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. *The Journal of physiology* **184**: 170-192
- Grabner M, Dirksen RT, Beam KG (1998) Tagging with green fluorescent protein reveals a distinct subcellular distribution of L-type and non-L-type Ca<sup>2+</sup> channels expressed in dysgenic myotubes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 1903-1908
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**: 59-74
- Gronemeyer T, Chidley C, Juillerat A, Heinis C, Johnsson K (2006) Directed evolution of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase for applications in protein labeling. *Protein engineering, design & selection : PEDS* **19**: 309-316
- Hofmann F, Biel M, Flockerzi V (1994) Molecular basis for Ca<sup>2+</sup> channel diversity. *Annual review of neuroscience* **17**: 399-418
- Hofmann F, Flockerzi V, Wegener JW, Kahl S (2013) L-Type CaV1.2 Calcium Channels: From in vitro Findings to in vivo Function.
- Holmes KC (1997) The swinging lever-arm hypothesis of muscle contraction. *Current biology : CB* **7**: R112-118
- Hullin R, Singer-Lahat D, Freichel M, Biel M, Dascal N, Hofmann F, Flockerzi V (1992) Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *The EMBO journal* **11**: 885-890
- Huxley AF (2000) Mechanics and models of the myosin motor. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **355**: 433-440
- Irion S, Luche H, Gadue P, Fehling HJ, Kennedy M, Keller G (2007) Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* **25**: 1477-1482
- Juillerat A, Heinis C, Sielaff I, Barnikow J, Jaccard H, Kunz B, Terskikh A, Johnsson K (2005) Engineering substrate specificity of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase for specific protein labeling in living cells. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **6**: 1263-1269
- Keppler A, Gendreizig S, Gronemeyer T, Pick H, Vogel H, Johnsson K (2003) A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nature biotechnology* **21**: 86-89

- Keppler A, Kindermann M, Gendreizig S, Pick H, Vogel H, Johnsson K (2004a) Labeling of fusion proteins of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase with small molecules in vivo and in vitro. *Methods* **32**: 437-444
- Keppler A, Pick H, Arrivoli C, Vogel H, Johnsson K (2004b) Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 9955-9959
- Kepplinger KJ, Kahr H, Forstner G, Sonnleitner M, Schindler H, Schmidt T, Groschner K, Soldatov NM, Romanin C (2000) A sequence in the carboxy-terminus of the alpha(1C) subunit important for targeting, conductance and open probability of L-type Ca(2+) channels. *FEBS letters* **477**: 161-169
- Kim J, Ghosh S, Nunziato DA, Pitt GS (2004) Identification of the components controlling inactivation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* **41**: 745-754
- Klugbauer N, Marais E, Hofmann F (2003) Calcium channel alpha2delta subunits: differential expression, function, and drug binding. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **35**: 639-647
- Klugbauer N, Welling A, Specht V, Seisenberger C, Hofmann F (2002) L-type Ca<sup>2+</sup> channels of the embryonic mouse heart. *European journal of pharmacology* **447**: 279-284
- Kobrinisky E, Schwartz E, Abernethy DR, Soldatov NM (2003) Voltage-gated mobility of the Ca<sup>2+</sup> channel cytoplasmic tails and its regulatory role. *The Journal of biological chemistry* **278**: 5021-5028
- Kobrinisky E, Tiwari S, Maltsev VA, Harry JB, Lakatta E, Abernethy DR, Soldatov NM (2005) Differential role of the alpha1C subunit tails in regulation of the Cav1.2 channel by membrane potential, beta subunits, and Ca<sup>2+</sup> ions. *The Journal of biological chemistry* **280**: 12474-12485
- Liao P, Soong TW (2010) CaV1.2 channelopathies: from arrhythmias to autism, bipolar disorder, and immunodeficiency. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **460**: 353-359
- Lory P, Ophoff RA, Nahmias J (1997) Towards a unified nomenclature describing voltage-gated calcium channel genes. *Human genetics* **100**: 149-150
- Maki T, Gruver EJ, Davidoff AJ, Izzo N, Toupin D, Colucci W, Marks AR, Marsh JD (1996) Regulation of calcium channel expression in neonatal myocytes by catecholamines. *The Journal of clinical investigation* **97**: 656-663
- Marks ML, Trippel DL, Keating MT (1995a) Long QT syndrome associated with syndactyly identified in females. *The American journal of cardiology* **76**: 744-745

Marks ML, Whisler SL, Clericuzio C, Keating M (1995b) A new form of long QT syndrome associated with syndactyly. *Journal of the American College of Cardiology* **25**: 59-64

Maue RA (2007) Understanding ion channel biology using epitope tags: progress, pitfalls, and promise. *Journal of cellular physiology* **213**: 618-625

Maurel D, Comps-Agrar L, Brock C, Rives ML, Bourrier E, Ayoub MA, Bazin H, Tinel N, Durroux T, Prezeau L, Trinquet E, Pin JP (2008) Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. *Nature methods* **5**: 561-567

Meissner M, Weissgerber P, Londono JE, Prenen J, Link S, Ruppenthal S, Molkentin JD, Lipp P, Nilius B, Freichel M, Flockerzi V (2011) Moderate calcium channel dysfunction in adult mice with inducible cardiomyocyte-specific excision of the *cacnb2* gene. *The Journal of biological chemistry* **286**: 15875-15882

Moosmang S, Kleppisch T, Wegener J, Welling A, Hofmann F (2007) Analysis of calcium channels by conditional mutagenesis. *Handbook of experimental pharmacology*: 469-490

Moosmang S, Lenhardt P, Haider N, Hofmann F, Wegener JW (2005) Mouse models to study L-type calcium channel function. *Pharmacology & therapeutics* **106**: 347-355

Moosmang S, Schulla V, Welling A, Feil R, Feil S, Wegener JW, Hofmann F, Klugbauer N (2003) Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *The EMBO journal* **22**: 6027-6034

Nyabi O, Naessens M, Haigh K, Gembarska A, Goossens S, Maetens M, De Clercq S, Drogat B, Haenebalcke L, Bartunkova S, De Vos I, De Craene B, Karimi M, Berx G, Nagy A, Hilson P, Marine JC, Haigh JJ (2009) Efficient mouse transgenesis using Gateway-compatible ROSA26 locus targeting vectors and F1 hybrid ES cells. *Nucleic acids research* **37**: e55

Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y (1997) 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS letters* **407**: 313-319

Perez-Reyes E (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiological reviews* **83**: 117-161

Ringer S (1883) A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *The Journal of physiology* **4**: 29-42 23

Robison GA, Butcher RW, Sutherland EW (1968) Cyclic AMP. *Annual review of biochemistry* **37**: 149-174

Sasaki Y, Derudder E, Hobeika E, Pelanda R, Reth M, Rajewsky K, Schmidt-Supprian M (2006) Canonical NF-kappaB activity, dispensable for B cell development, replaces BAFF-receptor signals and promotes B cell proliferation upon activation. *Immunity* **24**: 729-739

- Satin J, Schroder EA (2009) Autoregulation of cardiac L-type calcium channels. *Trends in cardiovascular medicine* **19**: 268-271
- Satin J, Schroder EA, Crump SM (2011) L-type calcium channel auto-regulation of transcription. *Cell calcium* **49**: 306-313
- Schroder E, Byse M, Satin J (2009) L-type calcium channel C terminus autoregulates transcription. *Circulation research* **104**: 1373-1381
- Schroder F, Handrock R, Beuckelmann DJ, Hirt S, Hullin R, Priebe L, Schwinger RH, Weil J, Hertz S (1998) Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle. *Circulation* **98**: 969-976
- Schultz LD, Markus HZ, Hofmann KJ, Montgomery DL, Dunwiddie CT, Kniskern PJ, Freedman RB, Ellis RW, Tuite MF (1994) Using molecular genetics to improve the production of recombinant proteins by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **721**: 148-157
- Schuster A, Lacinova L, Klugbauer N, Ito H, Birnbaumer L, Hofmann F (1996) The IVS6 segment of the L-type calcium channel is critical for the action of dihydropyridines and phenylalkylamines. *The EMBO journal* **15**: 2365-2370
- Schwake M, Pusch M, Kharkovets T, Jentsch TJ (2000) Surface expression and single channel properties of KCNQ2/KCNQ3, M-type K<sup>+</sup> channels involved in epilepsy. *The Journal of biological chemistry* **275**: 13343-13348
- Seeman P (1967) Transient holes in the erythrocyte membrane during hypotonic hemolysis and stable holes in the membrane after lysis by saponin and lysolecithin. *The Journal of cell biology* **32**: 55-70
- Seisenberger C, Specht V, Welling A, Platzer J, Pfeifer A, Kuhbandner S, Striessnig J, Klugbauer N, Feil R, Hofmann F (2000) Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type  $\alpha 1C$  (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse. *The Journal of biological chemistry* **275**: 39193-39199
- Shaltiel L, Pappas C, Fenske S, Hassan S, Gruner C, Roetzer K, Biel M, Wahl-Schott CA (2012) Complex regulation of voltage dependent activation and inactivation properties of retinal voltage gated L-type Ca<sup>2+</sup> channels Cav1.4 by Ca<sup>2+</sup> binding protein 4 (CaBP4). *J Biol Chem*
- Shuman HA, Silhavy TJ, Beckwith JR (1980) Labeling of proteins with beta-galactosidase by gene fusion. Identification of a cytoplasmic membrane component of the *Escherichia coli* maltose transport system. *The Journal of biological chemistry* **255**: 168-174
- Sipido KR, Callewaert G, Carmeliet E (1995) Inhibition and rapid recovery of Ca<sup>2+</sup> current during Ca<sup>2+</sup> release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res* **76**: 102-109



- Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K, Tager-Flusberg H, Priori SG, Sanguinetti MC, Keating MT (2004) Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* **119**: 19-31
- Stockner T, Koschak A (2012) What can naturally occurring mutations tell us about Ca(v)1.x channel function? *Biochimica et biophysica acta*
- Tada M, Katz AM (1982) Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. *Annual review of physiology* **44**: 401-423
- Terpe K (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology* **60**: 523-533
- Wegener JW, Nawrath H, Wolfsgruber W, Kuhbandner S, Werner C, Hofmann F, Feil R (2002) cGMP-dependent protein kinase I mediates the negative inotropic effect of cGMP in the murine myocardium. *Circulation research* **90**: 18-20
- Weissgerber P, Held B, Bloch W, Kaestner L, Chien KR, Fleischmann BK, Lipp P, Flockerzi V, Freichel M (2006) Reduced cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> current in Ca(V)beta2<sup>-/-</sup> embryos impairs cardiac development and contraction with secondary defects in vascular maturation. *Circulation research* **99**: 749-757
- Welling A, Ludwig A, Zimmer S, Klugbauer N, Flockerzi V, Hofmann F (1997) Alternatively spliced IS6 segments of the alpha 1C gene determine the tissue-specific dihydropyridine sensitivity of cardiac and vascular smooth muscle L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Circ Res* **81**: 526-532
- Xiao C, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, Wang J, Rajewsky N, Bender TP, Rajewsky K (2007) MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell* **131**: 146-159
- Xu M, Welling A, Papparisto S, Hofmann F, Klugbauer N (2003) Enhanced expression of L-type Cav1.3 calcium channels in murine embryonic hearts from Cav1.2-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* **278**: 40837-40841
- Yazawa M, Dolmetsch RE (2013) Modeling Timothy syndrome with iPS cells. *Journal of cardiovascular translational research* **6**: 1-9
- Yazawa M, Hsueh B, Jia X, Pasca AM, Bernstein JA, Hallmayer J, Dolmetsch RE (2011) Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. *Nature* **471**: 230-234
- Zuhlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H (1999) Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* **399**: 159-162

## 9 Anhang

### SNAP-LK1-HA-Sequenz (genomische DNS, *Oryctolagus cuniculus*)

CACNA1C Gen, X55763.1 , nt 548-2763

|     | Nhe           | Kozak  | SNAP-tag |  |
|-----|---------------|--|----------|--|
| 1   | <b>GCTAGC</b> | GCCGCCACCATGGACAAAGACTGCGAAATGAAGCGCACCACCCTGGATAGCCCT               |          |  |
| 1   |               | A S A A T M D K D C E M K R T T L D S P                              |          |  |
| 61  |               | CTGGGCAAGCTGGAAGTGTCTGGGTGCGAACAGGGCCTGCACGAGATCAAGCTGCTGGGC         |          |  |
| 21  |               | L G K L E L S G C E Q G L H E I K L L G                              |          |  |
| 121 |               | AAAGGAACATCTGCCGCCGACGCCGTGGAAGTGCCTGCCCCAGCCGCCGTGCTGGGCGGA         |          |  |
| 41  |               | K G T S A A D A V E V P A P A A V L G G                              |          |  |
| 181 |               | CCAGAGCCACTGATGCAGGCCACCGCCTGGCTCAACGCCTACTTTCACCAGCCTGAGGCC         |          |  |
| 61  |               | P E P L M Q A T A W L N A Y F H Q P E A                              |          |  |
| 241 |               | ATCGAGGAGTTCCTGTGCCAGCCCTGCACCACCCAGTGTTCAGCAGGAGAGCTTTACC           |          |  |
| 81  |               | I E E F P V P A L H H P V F Q Q E S F T                              |          |  |
| 301 |               | CGCCAGGTGCTGTGGAAACTGCTGAAAGTGGTGAAGTTCGGAGAGGTCATCAGCTACCAG         |          |  |
| 101 |               | R Q V L W K L L K V V K F G E V I S Y Q                              |          |  |
| 361 |               | CAGCTGGCCGCCCTGGCCGGCAATCCCGCCGCCACCGCCGCCGTGAAAACCGCCCTGAGC         |          |  |
| 121 |               | Q L A A L A G N P A A T A A V K T A L S                              |          |  |
| 421 |               | GGAAATCCCGTGCCATTCTGATCCCCTGCCACCGGGTGGTGTCTAGCTCTGGCGCCGTG          |          |  |
| 141 |               | G N P V P I L I P C H R V V S S S G A V                              |          |  |
| 481 |               | GGGGCTACGAGGGCGGGCTCGCCGTGAAAGAGTGGCTGCTGGCCCACGAGGGCCACAGA          |          |  |
| 161 |               | G G Y E G G L A V K E W L L A H E G H R                              |          |  |
| 541 |               | CTGGGCAAGCCTGGGCTGGGTCTGCAGGTATAGGCGGCCAGGAG <b>GCTAGC</b> GTCAATGAG |          |  |
| 181 |               | L G K P G L G P A G I G A P G A S V N E                              |          |  |
| 601 |               | AATACGAGGATGTACATTCTGAGGAAAACCACCAAGGTTCCAACCTATGGGAGCCCACGC         |          |  |
| 201 |               | N T R M Y I P E E N H Q G S N Y G S P R                              |          |  |
| 661 |               | CCAGCTCATGCCAACATGAATGCCAACGCAGCTGCGGGGCTCGCCCCTGAGCACATCCCC         |          |  |
| 221 |               | P A H A N M N A N A A A G L A P E H I P                              |          |  |
| 721 |               | ACCCAGGGGCAGCCCTGTCTGCGAGGCAGCCATCGATGCGGCCCGCAGGCCAAGCTG            |          |  |
| 241 |               | T P G A A L S W Q A A I D A A R Q A K L                              |          |  |
| 781 |               | ATGGGCAGTGCTGGCAACGCGACTATCTCCACCGTCAGCTCCACGCAGCGGAAGCGGCAG         |          |  |
| 261 |               | M G S A G N A T I S T V S S T Q R K R Q                              |          |  |
| 841 |               | CAGTATGGGAAGCCCAAGAAGCAGGGCAGCACCCTGCCACTCGCCCGCCCGTGCCTG            |          |  |
| 281 |               | Q Y G K P K K Q G S T T A T R P P R A L                              |          |  |

901 CTCTGCCTCACCCCTGAAGAACCCCATCCGGAGGGCGTGCATAAGCATCGTTCGAGTGAAAA  
301 L C L T L K N P I R R A C I S I V E W K

961 CCATTTGAAATAATTATTTTACTGACTATTTTTGCCAATTGTGTGGCCTTAGCAATCTAT  
321 P F E I I I L L T I F A N C V A L A I Y

1021 ATTCCCTTTCCAGAAGATGACTCCAATGCCACCAATTCCAACCTGGAACGAGTGGAATAT  
341 I P F P E D D S N A T N S N L E R V E Y

1081 CTCTTTCTCATAATTTTTACTGTGGAAGCATTTTTTAAAAGTAATAGCCTATGGACTTCTG  
361 L F L I I F T V E A F L K V I A Y G L L

1141 TTTCACCCCAACGCTTACCTCCGCAATGGCTGGAATTTACTAGACTTTATAATTGTGGTT  
381 F H P N A Y L R N G W N L L D F I I V V

1201 GTAGGGCTTTTTAGTGCAATTTTAGAACAAGCAACCAAAGCAGACGGGGCCAATGCCCTA  
401 V G L F S A I L E Q A T K A D G A N A L

1261 GGAGGGAAAGGGGCTGGATTTCGACGTGAAGGCGCTGAGGGCTTTCCGCGTGCTGCGCCCC  
421 G G K G A G F D V K A L R A F R V L R P

1321 CTGCGGCTGGTGTCTGGAGTCCCGAGTCTCCAGGTGGTCTTGAACCTCCATCATCAAGGCC  
441 L R L V S G V P S L Q V V L N S I I K A

1381 ATGGTCCCTCTGCTGCACATTGCCCTGCTAGTGTGTTTGTTCATCATCATCTATGCCATC  
461 M V P L L H I A L L V L F V I I I Y A I

1441 ATCGGCCTGGAGCTCTTCATGGGGAAGATGCACAAGACATGCTACAACCAGGAGGGTGTGA  
481 I G L E L F M G K M H K T C Y N Q E G V

1501 GCAGATGTCCCAGCAGAAGATGATCCTTCCCTTGTGCTCTGGAGACGGGGCCACGGGCGG  
501 A D V P A E D D P S P C A L E T G H G R

1561 CAGTGCCAGAACGGCACCGTGTGCAAGCCTGGGTGGGATGGACCCAAGCACGGCATCACC  
521 Q C Q N G T V C K P G W D G P K H G I T

1621 AACTTTGACAATTTTGCTTTTCGCCATGTTGACGGTGTTCAGTGTATCACCATGGAGGGC  
541 N F D N F A F A M L T V F Q C I T M E G

1681 TGGACCGACGTGCTGTACTGGGTCAATGATGCCGTAGGAAGGGACTGGCCCTGGATCTAT  
561 W T D V L Y W V N D A V G R D W P W I Y

1741 TTTGTTACACTAATCATCATAGGGTCATTTTTTGTACTTAACTTGGTTCTCGGTGTTCTT  
581 F V T L I I I G S F F V L N L V L G V L

1801 AGCGGAGAGTTTTCCAAAGAGAGGGAGAAGGCCAAAGCTCGGGGAGATTTCCAGAAGTTG  
601 S G E F S K E R E K A K A R G D F Q K L

1861 CGGGAGAAGCAGCAGCTGGAAGAGGACCTCAAAGGCTACCTGGACTGGATCACTCAGGCA  
621 R E K Q Q L E E D L K G Y L D W I T Q A

1921 GAAGACATCGACCCTGAGAATGAGGATGAAGGCATGGATGAGGAGAAACCCCGAAACAGA  
641 E D I D P E N E D E G M D E E K P R N R

1981 GGCCTCCAGCGGGCTTGCATGCCCAGAAGAAAGGAAGTTTGTCTGGTTTACTCACTCC  
661 G T P A G L H A Q K K G K F A W F S H S

2041 ACAGAGACCCATGTGAGCATGCCCACAAGTGAGACCGAATCTGTCAACACTGAAAACGTG  
681 T E T H V S M P T S E T E S V N T E N V

2101 GCTGGAGGTGACATCGAAGGAGAAAAGTGCAGGGGCCAGGCTGGCCCACCGGATCTCCAAG



LK1-HA-Sequenz (genomische DNS, *Oryctolagus cuniculus*)

CACNA1C Gen, X55763.1, nt 548-2763

|      | BamHI  | Kozak     | LK1  |
|------|--------|-----------|--|
| 1    | GGATCC | GCCGCCACC | ATGGTCAATGAGAATACGAGGATGTACATTTCCTGAGGAAAACCAC                 |
| 1    |        | G S A A T | M V N E N T R M Y I P E E N H                                  |
| 61   |        |           | CAAGGTTCCAACATATGGGAGCCCACGCCAGCTCATGCCAACATGAATGCCAACGCAGCT   |
| 21   |        |           | Q G S N Y G S P R P A H A N M N A N A A                        |
| 121  |        |           | GCGGGGCTCGCCCCTGAGCACATCCCCACCCAGGGGCAGCCCTGTCTTGGCAGGCAGCC    |
| 41   |        |           | A G L A P E H I P T P G A A L S W Q A A                        |
| 181  |        |           | ATCGATGCGGGCCCGCAGGCCAAGCTGATGGGCAGTGCTGGCAACGCGACTATCTCCACC   |
| 61   |        |           | I D A A R Q A K L M G S A G N A T I S T                        |
| 241  |        |           | GTCAGCTCCACGCAGCGGAAGCGGCAGCAGTATGGGAAGCCCAAGAAGCAGGGCAGCACC   |
| 81   |        |           | V S S T Q R K R Q Q Y G K P K K Q G S T                        |
| 301  |        |           | ACTGCCACTCGCCCCGCCCGTGCCCTGCTCTGCCTCACCCCTGAAGAACCCCATCCGGAGG  |
| 101  |        |           | T A T R P P R A L L C L T L K N P I R R                        |
| 361  |        |           | GCGTGCATAAGCATCGTCGAGTGGAAACCATTTGAAATAATTATTTTACTGACTATTTTT   |
| 121  |        |           | A C I S I V E W K P F E I I I L L T I F                        |
| 421  |        |           | GCCAATTGTGTGGCCTTAGCAATCTATATTCCTTTCCAGAAGATGACTCCAATGCCACC    |
| 141  |        |           | A N C V A L A I Y I P F P E D D S N A T                        |
| 481  |        |           | AATTCCAACCTGGAACGAGTGAATATCTCTTTCTCATAATTTTTACTGTGGAAGCATTT    |
| 161  |        |           | N S N L E R V E Y L F L I I F T V E A F                        |
| 541  |        |           | TTAAAAGTAATAGCCTATGGACTTCTGTTTTACCCCAACGCTTACCTCCGCAATGGCTGG   |
| 181  |        |           | L K V I A Y G L L F H P N A Y L R N G W                        |
| 601  |        |           | AATTTACTAGACTTTATAATTGTGGTTGTAGGGCTTTTTAGTGCAATTTTAGAACAAGCA   |
| 201  |        |           | N L L D F I I V V V G L F S A I L E Q A                        |
| 661  |        |           | ACCAAAGCAGACGGGGCCAATGCCCTAGGAGGGAAAGGGGCTGGATTTCGACGTGAAGGCG  |
| 221  |        |           | T K A D G A N A L G G K G A G F D V K A                        |
| 721  |        |           | CTGAGGGCTTTCCGCGTGCTGCGCCCCCTGCGGCTGGTGTCTGGAGTCCCGAGTCTCCAG   |
| 241  |        |           | L R A F R V L R P L R L V S G V P S L Q                        |
| 781  |        |           | GTGGTCCTGAACTCCATCATCAAGGCCATGGTCCCTCTGCTGCACATTGCCCTGCTAGTG   |
| 261  |        |           | V V L N S I I K A M V P L L H I A L L V                        |
| 841  |        |           | CTGTTTGTGCATCATCATCTATGCCATCATCGGCCTGGAGCTCTTCATGGGGAAAGATGCAC |
| 281  |        |           | L F V I I I Y A I I G L E L F M G K M H                        |
| 901  |        |           | AAGACATGCTACAACCAGGAGGGTGTAGCAGATGTCCCAGCAGAAGATGATCCTTCCCCT   |
| 301  |        |           | K T C Y N Q E G V A D V P A E D D P S P                        |
| 961  |        |           | TGTGCTCTGGAGACGGGCCACGGGCGGCAGTGCCAGAACGGCACCGTGTGCAAGCCTGGG   |
| 321  |        |           | C A L E T G H G R Q C Q N G T V C K P G                        |
| 1021 |        |           | TGGGATGGACCCAAGCACGGCATCACCAACTTTGACAATTTTGCTTTTCGCCATGTTGACG  |



2221 T TTCAGATCCTGACCGGGGAGGACTGGAATTCGGTGATGTATGATGGGATCATGGCTTAT  
741 F Q I L T G E D W N S V M Y D G I M A Y

2281 G GCGGCCCTCTTTTCCAGGGATGTTAGTCTGTATTTACTTCATCATCCTCTTCATCTGT  
761 G G P S F P G M L V C I Y F I I L F I C

2341 G GAAATTATATCCTACTGAATGTGTTC  
781 G N Y I L L N V F

### SNAP-Ca<sub>v</sub>1.2-HA-Sequenz (genomische DNS, Mus musculus)

#### CACNA1C Gen, FM872412, nt 4-2318

|     | Ascl | NheI | Kozak | SNAP |
|-----|------|------|-------|------|
| 1   |      |      |       |      |
| 1   |      |      |       |      |
| 61  |      |      |       |      |
| 20  |      |      |       |      |
| 121 |      |      |       |      |
| 40  |      |      |       |      |
| 181 |      |      |       |      |
| 60  |      |      |       |      |
| 241 |      |      |       |      |
| 80  |      |      |       |      |
| 301 |      |      |       |      |
| 100 |      |      |       |      |
| 361 |      |      |       |      |
| 120 |      |      |       |      |
| 421 |      |      |       |      |
| 140 |      |      |       |      |
| 481 |      |      |       |      |
| 160 |      |      |       |      |
| 541 |      |      |       |      |
| 180 |      |      |       |      |
|     |      |      |       |      |
| 601 |      |      |       |      |
| 200 |      |      |       |      |
| 661 |      |      |       |      |
| 220 |      |      |       |      |
| 721 |      |      |       |      |
| 240 |      |      |       |      |

781 CCAAGCTCATGGGCAGTGCTGGCAACGCAACCATCTCTACCGTCAGTTCCACACAGCGGA  
260 A K L M G S A G N A T I S T V S S T Q R

841 AGCGGCAGCAGTATGGGAAACCCAAGAAGCAGGGGGGCACAACCGCCACACGGCCGCCCC  
280 K R Q Q Y G K P K K Q G G T T A T R P P

901 GGGCTCTGCTGTGTCTGACCCTGAAGAACCCTATCCGGAGGGCGTGCATAAGCATTGTTG  
300 R A L L C L T L K N P I R R A C I S I V

961 AATGGAACCATTTGAAATCATTATTTTACTGACTATTTTTGCCAATTGTGTGGCCTTAG  
320 E W K P F E I I I L L T I F A N C V A L

1021 CAATCTATATTCCCTTTCCGGAAGACGACTCCAACGCCACCAACTCCAACCTGGAACGAG  
340 A I Y I P F P E D D S N A T N S N L E R

1081 TGGAGTATCTCTTCCCTCATCATTTTTTACCGTGGAAGCATTTTTTAAAAGTAATTGCCTACG  
360 V E Y L F L I I F T V E A F L K V I A Y

1141 GACTTCTCTTCCACCCCAACGCTTACCTCCGCAATGGTTGGAATTTACTGGATTTTATAA  
380 G L L F H P N A Y L R N G W N L L D F I

1201 TCGTGGTTGTAGGGCTTTTTAGTGCAATTTTAGAACAAGCAACCAAAGCTGATGGGGCCA  
400 I V V V G L F S A I L E Q A T K A D G A

1261 ATGCTCTAGGAGGGAAAGGAGCTGGATTCGACGTGAAGGCACTGAGAGCGTTCCGCGTGC  
420 N A L G G K G A G F D V K A L R A F R V

1321 TCCGTCCACTGCGGCTAGTGTCCGGAGTCCCAAGTCTCCAGGTGGTCTGAACTCCATCA  
440 L R P L R L V S G V P S L Q V V L N S I

1381 TCAAGGCCATGGTGCCTCTGCTGCACATTGCCCTTCTTGTGCTCTTCGTCATCATCATTT  
460 I K A M V P L L H I A L L V L F V I I I

1441 ATGCTATTATCGGCCTGGAGCTCTTCATGGGAAAGATGCACAAGACCTGCTACAACCAGG  
480 Y A I I G L E L F M G K M H K T C Y N Q

1501 AGGGCATAATAGATGTTCCGGCAGAAGAGGATCCTTCCCCTTGTGCTTTGGAGACAGGCC  
500 E G I I D V P A E E D P S P C A L E T G

1561 ATGGGCGACAGTGTGAGAACGGGACCGTGTGCAAACCCGGGTGGGATGGGCCCAAGCACG  
520 H G R Q C Q N G T V C K P G W D G P K H

1621 GCATCACCAACTTCGACAACCTTCGCCTTCGCCATGCTGACGGTGTCCAGTGTATCACCA  
540 G I T N F D N F A F A M L T V F Q C I T

1681 TGGAGGGCTGGACAGACGTGCTGTACTGGGTCAATGATGCCGTAGGAAGGGACTGGCCCT  
560 M E G W T D V L Y W V N D A V G R D W P

1741 GGATCTATTTTGTAACACTAATCATCATAGGGTCATTTTTTGTACTTAACTTGGTTCTCG  
580 W I Y F V T L I I I G S F F V L N L V L

1801 GTGTTCTTAGCGGGGAGTTTTCCAAAGAGAGGGAGAAAGCCAAAGCCCGAGGAGATTTC  
600 G V L S G E F S K E R E K A K A R G D F

1861 AGAAGCTTCGAGAGAAGCAGCAACTAGAAGAAGATCTCAAAGGCTACCTGGACTGGATCA  
620 Q K L R E K Q Q L E E D L K G Y L D W I

1921 CCCAGGCAGAAGACATTGACCCCGAGAATGAGGACGAGGGCATGGATGAAGACAAGCCTC  
640 T Q A E D I D P E N E D E G M D E D K P

1981 GAAACAGAGGCGCTCCAGCGGGCTTGCATGATCAGAAGAAAGGGAAGTTTGCTTGTTTA



