

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik für Anaesthesiologie
Klinikum rechts der Isar

Ligandengesteuerte Stabilisierung des Kaliumkanals Kir2.1 als neuer pharmakogenetischer Ansatz zur Inhibition von Neuronen

Eva Sabine Auffenberg

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

| | |
|--------------------------|--|
| Vorsitzende(r): | Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny |
| Prüfer der Dissertation: | 1. apl. Prof. G. K. Rammes, Ph.D. 2. Univ.-Prof. Dr. St. Engelhardt |

Die Dissertation wurde am 31.07.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 15.07.2015 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | Membranpotential und zelluläre Erregbarkeit | 1 |
| 1.2 | Ionenkanäle | 3 |
| 1.2.1 | Kaliumkanäle | 3 |
| 1.2.2 | Die Familie der einwärtsgerichtenden Kaliumkanäle (Kir-Kanäle) | 5 |
| 1.2.3 | Der Kaliumkanal Kir2.1 | 8 |
| 1.3 | DD-Tag und Shield-1: Eine pharmakologisch-molekularbiologische Methode zur Liganden- gesteuerten Proteinstabilisierung | 10 |
| 1.4 | Molekularbiologische und pharmakogenetische Methoden zur reversiblen Inaktivierung von Neuronen und Neuronengruppen („neuronal silencing“) | 12 |
| 1.4.1 | Optogenetik..... | 13 |
| 1.4.2 | Zelluläre Hyperpolarisation mit Hilfe modifizierter muskarinischer Acetylcholinrezeptoren: | 13 |
| 1.4.3 | Ivermectin-sensitiver Chlorid-Kanal | 13 |
| 1.4.4 | Überexpression des Kir2.1-Kanals | 14 |
| 2 | Fragestellung und Zielsetzung..... | 15 |
| 3 | Material und Methoden | 17 |
| 3.1 | Verwendete Plasmide | 17 |
| 3.1.1 | pBluescript II KS+ (Stratagene) | 17 |
| 3.1.2 | pcDNA3.1 (Invitrogen)..... | 17 |
| 3.1.3 | pIRES2-EGFP (Clontech)..... | 17 |
| 3.1.4 | STOP-eGFP-ROSA26TV und CTV (beide Addgene) | 18 |
| 3.2 | Bakterienkultur..... | 19 |
| 3.2.1 | Verwendete Bakterienstämme | 19 |
| 3.2.2 | Kultivierung | 19 |
| 3.2.3 | Transformation..... | 20 |
| 3.3 | Molekularbiologische Methoden | 21 |
| 3.3.1 | Vervielfältigung von DNA mittels Polymerasekettenreaktion | 21 |
| 3.3.1.1 | Verwendete Polymerasen | 22 |
| 3.3.2 | Isolierung von Nukleinsäuren..... | 23 |
| 3.3.2.1 | Isolierung von Plasmid-DNA | 23 |
| 3.3.3 | Gelelektrophorese..... | 24 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|--|----|
| 3.3.4 | Reinigung von Nukleinsäuren..... | 26 |
| 3.3.5 | Quantifizierung von Nukleinsäuren..... | 27 |
| 3.3.6 | Enzymatische Modifikation von DNA..... | 27 |
| 3.3.6.1 | Restriktionsverdau..... | 27 |
| 3.3.6.2 | Dephosphorylierung..... | 28 |
| 3.3.6.3 | Ligation..... | 28 |
| 3.3.7 | Sequenzierung von DNA..... | 29 |
| 3.4 | Zellkultur..... | 29 |
| 3.4.1 | Kultivierung von HEK293T-Zellen und Aufrechterhaltung der Zelllinie..... | 29 |
| 3.4.2 | Transiente Transfektion..... | 31 |
| 3.4.3 | Ernte der Zellen..... | 31 |
| 3.4.4 | Beschichtung von Deckgläschen mit Polylysin..... | 32 |
| 3.4.5 | Fixierung der Zellen..... | 32 |
| 3.4.6 | Fluoreszenzmikroskopie von HEK293T-Zellen..... | 32 |
| 3.5 | Biochemische Methoden..... | 33 |
| 3.5.1 | Proteingewinnung aus HEK293T-Zellen..... | 33 |
| 3.5.2 | Quantitative Proteinbestimmung..... | 33 |
| 3.5.3 | Western Blot-Analyse..... | 34 |
| 3.6 | Elektrophysiologische Methoden..... | 37 |
| 3.6.1 | Versuchsaufbau und verwendete Geräte..... | 37 |
| 3.6.2 | Verwendete Zellen, Vorbereitung der Zellen..... | 38 |
| 3.6.3 | Patch Clamp-Experimente zur Einzelzelleitung..... | 38 |
| 3.6.4 | Auswertung der Daten aus den elektrophysiologischen Experimenten..... | 39 |
| 4 | Ergebnisse..... | 40 |
| 4.1 | Hergestellte Vektorkonstrukte..... | 40 |
| 4.1.1 | Expressionsplasmide für <i>in vitro</i> -Versuche..... | 40 |
| 4.1.1.1 | DD-ZsGreen1-Kir2.1 in pcDNA 3.1..... | 41 |
| 4.1.1.2 | DD-Kir2.1 in pcDNA3.1..... | 41 |
| 4.1.1.3 | DD-Kir2.1 in pIRES2-EGFP..... | 42 |
| 4.1.2 | Gentargeting-Vektoren..... | 43 |
| 4.1.3 | Vektor für den Virus-vermittelten Gentransfer..... | 45 |
| 4.2 | Etablierung der Shield-1-Technik in HEK293T-Zellen..... | 46 |
| 4.2.1 | Nachweis mittels Western Blot..... | 46 |
| 4.2.2 | Nachweis mittels Fluoreszenzmikroskopie..... | 47 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----|--|----|
| 4.3 | Elektrophysiologische Untersuchung der Shield-1-Technik..... | 50 |
| 5 | Diskussion..... | 52 |
| 5.1 | Etablierung der Methode <i>in vitro</i> | 52 |
| 5.2 | Ausblick und Überprüfung der Methode <i>in vivo</i> | 54 |
| 5.3 | Vorteile und Limitationen des DD-Kir2.1-Fusionsproteins..... | 56 |
| 6 | Zusammenfassung..... | 58 |
| 7 | Literaturverzeichnis..... | 59 |
| 8 | Anhang..... | 63 |
| 8.1 | Antikörper | 63 |
| 8.2 | Enzyme | 63 |
| 8.3 | Oligonukleotide | 64 |
| 8.4 | Chemikalien und Verbrauchsmaterialien..... | 65 |
| 8.5 | Geräte..... | 67 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1-1 Schematische Darstellung des Ablaufs eines Aktionspotentials | 3 |
| Abbildung 1-2: Kristallstrukturanalyse eines Kir-Kanals als Tetramer | 5 |
| Abbildung 1-3: IV-Kennlinie stark einwärtsgleichrichtender Kaliumkanäle | 5 |
| Abbildung 1-4: Phylogenetischer Stammbaum der Kir-Kanäle: | 6 |
| Abbildung 1-5: Schematische Darstellung einer Untereinheit des Kir-Kanals: | 7 |
| Abbildung 1-6 Struktur des Stabilisierungsliganden Shield-1 | 11 |
| Abbildung 1-7: Schematische Darstellung der Funktionsweise des DD-Tags | 12 |
| Abbildung 2-1 Übersicht über die Hypothese: | 15 |
| Abbildung 3-1 Darstellung des Plasmids pBluescript II KS+ | 17 |
| Abbildung 3-2 Darstellung des Plasmids pcDNA3.1 | 17 |
| Abbildung 3-3 Darstellung des Plasmids pIRES2-EGFP | 18 |
| Abbildung 3-4 Darstellung der Gentergeting-Vektoren CTV und STOP-eGFP-ROSA26TV | 18 |
| Abbildung 4-1 Übersichtsdarstellung der Klonierungsstrategie | 40 |
| Abbildung 4-2 Schematische Darstellung des Vektors DD-ZsGreen1-Kir2.1 in pcDNA3.1 | 41 |
| Abbildung 4-3 Restriktionsverdau der Klonierung DD-ZsGreen1 in pcDNA3.1: | 41 |
| Abbildung 4-4 Schematische Darstellung des Vektors DD-Kir2.1 in pcDNA3.1 | 42 |
| Abbildung 4-5 Restriktionsanalyse des Plasmids DD-Kir2.1 in pcDNA3.1: | 42 |
| Abbildung 4-6 Schematische Darstellung des Vektors DD-Kir2.1 in pIRES2-EGFP | 43 |
| Abbildung 4-7: Gelelektrophorese der Klonierung der Konstrukts DD-Kir2.1 in pIRES: | 43 |
| Abbildung 4-8 Zwischenklonierung des Inserts DD-Kir2.1 in pBluescript II KS+ | 44 |
| Abbildung 4-9 Schematische Darstellung des Gentergetingvektors DD-Kir2.1 in CTV | 44 |
| Abbildung 4-10 Restriktionsverdau der Klonierung der Gentergetingvektoren | 45 |
| Abbildung 4-11 Ausschnitt der Sequenzierung des DD-Kir2.1-Konstrukts in den CTV-Vektor | 45 |
| Abbildung 4-12 Schematische Darstellung des Vektors für viralen Gentransfer mittels AAV 8 | 46 |
| Abbildung 4-13: Western Blot-Analyse | 47 |
| Abbildung 4-14: Fluoreszenzmikroskopie nicht transfizierter HEK293T-Zellen | 48 |
| Abbildung 4-15 Fluoreszenzmikroskopie transfizierter HEK293T-Zellen | 48 |
| Abbildung 4-16: Fluoreszenzmikroskopie transfizierter HEK293T-Zellen | 49 |
| Abbildung 4-17: Fluoreszenzmikroskopie transfizierter HEK293T-Zellen | 49 |
| Abbildung 4-18: Fluoreszenzmikroskopie transfizierter HEK293T-Zellen | 50 |
| Abbildung 4-19 Ruhemembranpotential von transfizierten Zellen | 51 |

Abbildung 5-1 Übersicht über mögliche Strategien zur Etablierung eines transgenen Tiermodells 55

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------|---|
| °C | Grad Celsius |
| A, mA, pA | Ampere, Milliampere, Pikoampere |
| AAV | Adenoassoziierter Virus, <i>adeno associated virus</i> |
| AP | Aktionspotential |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATG | Startcodon (Adenosin-Tyrosin-Guanin) |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Bp | Basenpaare |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| <i>C. elegans</i> | <i>Caenorhabditis elegans</i> |
| Ca ²⁺ | Calcium |
| CAG | <i>CMV early enhancer/chicken β actin promoter</i> |
| CaMKII | Calmodulin-Kinase II |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure, <i>complementary desoxyribonucleic acid</i> |
| CIP | alkalische Phosphatase aus Kälberdarm, <i>calf intestine alkaline phosphatase</i> |
| Cl ⁻ | Chlorid |
| C-Terminus, C-terminal | Carboxy-Terminus, Carboxy-terminal |
| CTV | CAG-STOP-eGFP-ROSA26TV-Vektor |
| Da, kDa | Dalton, Kilodalton |
| DD | destabilisierende Domäne, <i>destabilizing domain</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure, <i>desoxyribonucleic acid</i> |
| dNTP | 2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat |
| DREADD | <i>Designer receptors exclusively activated by designer drugs</i> |
| DTT | Dithiothreitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGFP | <i>enhanced green fluorescent protein</i> |
| F, μF | Farad, Mikrofarad |
| frt | Erkennungsstelle der Rekombinase Flippase, <i>flip recombinase target</i> |
| g, mg, μg, ng | Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein, <i>green fluorescent protein</i> |
| h | Stunde(n) |
| HEK | Humane embryonale Nierenzellen, <i>human embryonic kidney cells</i> |
| IHRES | interne ribosomale Eintrittsstelle, <i>internal ribosomal entry site</i> |
| K ⁺ | Kalium |
| kb | Kilobasen |
| <i>KCNJ2</i> | Gen des Kir2.1-Kanals |
| Kir | einwärtsgerichteter Kaliumkanal, <i>inwardly rectifying K⁺-channel</i> |
| l, ml, μl, nl | Liter, Milliliter, Mikroliter, Nanoliter |
| loxP | Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase |
| M, mM, μM, nM | Mol, Millimol, Mikromol, Nanomol |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Proteinkinase |
| min | Minute(n) |
| mm, nm | Millimeter, Nanometer |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------|---|
| Na ⁺ | Natrium |
| NeoR | Neomycin Resistenzgen |
| N-Terminus, N-terminal | Amino-Terminus, Aminoterminal |
| OD | optische Dichte |
| ORI | Replikationsursprung, <i>origin of replication</i> |
| PAA | Phenylalkylamin |
| pBl | pBluescript |
| PBS | Phosphat gepufferte Salzlösung, <i>phosphate buffert saline</i> |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i> |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| PIRK | <i>photoinducible inwardly rectifying potassium channel</i> |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| RMP | Ruhemembranpotential |
| RNA | Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i> |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| s, ms | Sekunde(n), Millisekunde(n) |
| SDS | Natriumdodecylsulfat, <i>sodium dodecyl sulfate</i> |
| SV40 | Promoter des Simian Virus 40 |
| TBE | Trisborat gepufferte EDTA-Lösung |
| TBS | Trisborat gepufferte Salzlösung |
| TE | Tris-EDTA-Puffer |
| TEA | Tetraethylammoniumion |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TGA | Stop-Codon (Tyrosin-Guanin-Adenosin) |
| TM | Transmembrandomäne |
| U | Einheit, <i>unit</i> |
| V, mV | Volt, Millivolt |
| W | Watt |
| WPRE | Sequenz zur posttranskriptionalen Verbesserung der Proteinexpression <i>Woodchuck Hepatitis Virus (WHP) Posttranscriptional Regulatory Element</i> |
| β-ME | β-Mercaptoethanol |
| Ω, MΩ, GΩ | Ohm, Megaohm, Gigaohm |

1 Einleitung

1.1 Membranpotential und zelluläre Erregbarkeit

Lebende Zellen sind von einer Zellmembran umgeben, die aus einer Lipiddoppelschicht besteht. Für polare Substanzen ist diese Membran undurchlässig. Um dennoch einen Austausch polarer Stoffe über die Membran zu gewährleisten, sind in die Zellmembran verschiedene Membranproteine eingelagert, zu denen eine Vielzahl an Ionenkanälen, Transportproteinen oder Pumpen gehören.

An der Zellmembran aller lebenden Zellen besteht ein elektrisches Potential, das Membranpotential. Es ist grundlegend für die schnelle Informationsvermittlung im Nervensystem, für Muskelkontraktion sowie für transmembranäre Transportvorgänge. In Ruhe liegt das Membranpotential je nach Zellart zwischen -50 bis -90 mV (Ruhemembranpotential, RMP). Verantwortlich für diesen Potentialunterschied ist eine unterschiedliche Ionenverteilung zwischen Intra- und Extrazellularraum (siehe Tabelle 1.1):

| | extrazellulär | intrazellulär |
|-----------|---------------|---------------|
| K^+ | 5 | 140 |
| Na^+ | 145 | 5-15 |
| Ca^{2+} | 1-2 | 10^{-4} |
| Cl^- | 110 | 4-30 |

Tabelle 1.1 Verteilung der Ionenkonzentrationen intra- und extrazellulär (in mM) (Aus Klinker et al., 2005)

Diese definierte Verteilung der Ionen wird durch verschiedene Mechanismen aufrechterhalten: das Membranpotential wird beispielsweise durch die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase, einer ATP-abhängigen Ionenpumpe, die Natriumionen aus der Zelle und Kaliumionen in die Zelle transportiert, stabilisiert. Zudem weist die Membran im Ruhezustand geringe Leitfähigkeiten für Natrium- und Calciumionen auf, dagegen eine hohe Leitfähigkeit für Kaliumionen. Kalium kann also entlang seines Konzentrationsgradienten (chemischer Gradient) aus der Zelle diffundieren. Jede Ionenverschiebung an einer selektiv permeablen Membran bedeutet auch eine Ladungsverschiebung und damit eine Änderung des Potentials an dieser Membran. Damit besteht eine zweite Triebkraft, die elektrische Potentialdifferenz (elektrischer Gradient). Chemischer und elektrischer Gradient wirken einander entgegen. Sobald das elektrochemische Gleichgewicht erreicht ist, finden keine Nettotransportvorgänge mehr statt; das nun gemessene Potential bezeichnet man als das Gleichgewichtspotential des betrachteten Ions. Voraussetzung für die Einstellung des

Gleichgewichtspotentials eines Ions ist die Permeabilität der Membran für dieses Ion. Unter Ruhebedingungen ist diese nur für Kaliumionen gegeben, deshalb entspricht das Ruhemembranpotential der Zelle nahezu dem Kaliumgleichgewichtspotential.

Das Gleichgewichtspotential E_x für ein bestimmtes Ion x lässt sich durch die Nernst-Gleichung bestimmen:

$$E_x = \frac{RT}{Fz} \times \ln \frac{[x]_a}{[x]_i} \quad (V)$$

Wäre die Membran für nur dieses Ion permeabel, entspräche das hier errechnete Potential dem Membranpotential. Um die relative Permeabilität der Membran für verschiedene Ionen zu berücksichtigen, wendet man die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung an:

$$E_m = \frac{RT}{F} \times \ln \frac{P_{K^+} \times [K^+]_a + P_{Na^+} \times [Na^+]_a + P_{Cl^-} \times [Cl^-]_i}{P_{K^+} \times [K^+]_i + P_{Na^+} \times [Na^+]_i + P_{Cl^-} \times [Cl^-]_a} \quad (V)$$

Diese Gleichung nimmt idealisierte Bedingungen an und kann somit auch nur als Annäherung verstanden werden.

Erregbare Zellen besitzen die besondere Eigenschaft, die Leitfähigkeit ihrer Membran für verschiedene Ionen zu ändern, was wiederum zu Änderungen des Membranpotentials führt: Aktionspotentiale werden ausgelöst.

Eine langsame Vordepolarisation bis zu einem Schwellenwert von ca. -50 mV führt zur Aktivierung spannungsabhängiger Natriumkanäle, die Leitfähigkeit der Membran für Natrium nimmt kurzzeitig stark zu und der schnelle Natrium-Einstrom führt zur Depolarisation der Zellmembran. Durch die Depolarisation nimmt auch die Leitfähigkeit für Kalium zu, was zur anschließenden Re- und Hyperpolarisation führt, bevor die Zelle wieder ihr Ruhemembranpotential erreicht. Zur Veranschaulichung ist der Ablauf eines Aktionspotentials in Abbildung 1-1 dargestellt.

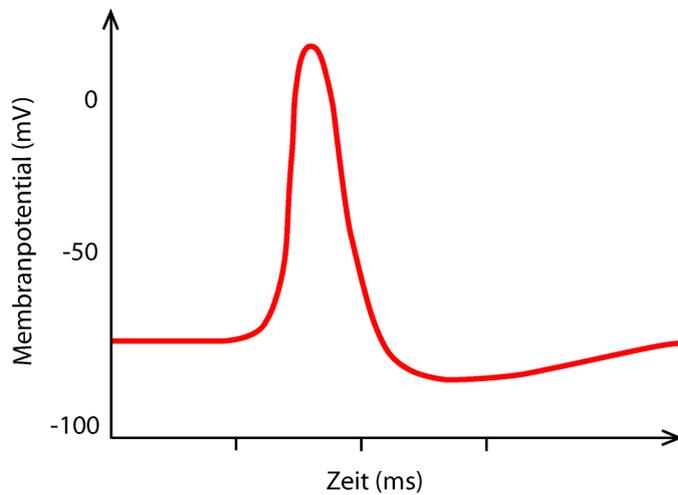


Abbildung 1-1 Schematische Darstellung des Ablaufs eines Aktionspotentials

Die Auslösung von Aktionspotentialen folgt dem „Alles-oder-nichts“-Prinzip: ist das Schwellenpotential erreicht, kommt es immer zu einem Aktionspotential, wird das Schwellenpotential nicht erreicht, wird auch kein Aktionspotential ausgelöst (Übersicht in Klinke et al., 2005).

1.2 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind porenbildende Transmembranproteine, die durch die Lipiddoppelschicht der Zellen reichen. Sie bestehen meist aus mehreren membrandurchspannenden Helices und bilden eine mit Wasser gefüllte Pore in der Zellmembran. Die Einteilung der Kanäle erfolgt aufgrund des Ions, für das sie selektiv permeabel sind, beispielsweise in Natrium-, Kalium,- oder Calciumkanäle. Die Selektivität wird bestimmt durch die jeweilige Größe und Ladung des Ions. Die Leitfähigkeit eines Kanals ist meist nicht konstant, sondern lässt sich verändern, indem die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals verändert wird. Je nach Kanal gibt es unterschiedliche Regulationsmechanismen, die die Öffnungswahrscheinlichkeit erhöhen oder herabsetzen: durch Änderung des Membranpotentials, extrazellulär bindende Liganden, intrazelluläre Metabolite oder Botenstoffe oder mechanisch, beispielsweise durch Dehnung (Übersicht in Klinke et al., 2005).

1.2.1 Kaliumkanäle

Unter allen Ionenkanälen stellt die Gruppe der Kaliumkanäle die größte und vielfältigste Gruppe dar; Kaliumkanäle werden von allen lebenden Zellen in unterschiedlicher Kombination exprimiert. Ihre

Funktionen sind die Aufrechterhaltung des Membranpotentials, die Repolarisation der Zelle während bzw. nach einem Aktionspotential, Signaltransduktion, Osmoregulation und Sekretion.

Es gibt mehr als 50 bekannte Gene, die für Kaliumkanäle codieren. Durch alternatives Spleißen, Zusammenlagerung verschiedener Untereinheiten zu einem funktionsfähigen Kanal und das Anlagern akzessorischer Proteine wird die Diversität der Kaliumkanäle nochmals deutlich erhöht (Coetzee et al., 1999; Shieh et al., 2000). Trotz dieser großen Vielfalt lassen sich strukturelle Ähnlichkeiten zwischen den Kanälen erkennen. Vor allem die Struktur der Pore der Kaliumkanäle ist in eukaryontischen und prokaryontischen Organismen konserviert (Lu, Z. et al., 2001; MacKinnon et al., 1998). Es wird postuliert, dass die Kaliumkanäle auf eine gemeinsame Urform zurückgehen (Derst et al., 1998).

Ein funktionsfähiger Kaliumkanal besteht aus bis zu vier Untereinheiten, die sich zusammenlagern und eine Pore umgeben. Dabei kann es sich um identische (homomere) oder unterschiedliche (heteromere) Untereinheiten handeln. Allen Kaliumkanälen ist eine extrazelluläre Porenschleife, der sogenannte P-Loop, zwischen zwei transmembranären Domänen (TM) gemeinsam. In dieser Porenschleife ist ein Motiv von acht Aminosäuren konserviert, Threonin-X-X-Threonin-X-Glycin-Thyrosin-Glycin, welches für die Kaliumselektivität der Kanäle entscheidend ist (Doyle et al., 1998; Heginbotham et al., 1994; Lu, T. et al., 2001).

Die Vielzahl der verschiedenen Kaliumkanäle lässt sich unterteilen in spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_V), Calcium-abhängige Kaliumkanäle (K_{Ca}), Tandemporenkanäle (K_{2P}) und einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle (K^+ inwardly rectifying channels, Kir). K_V -Kanäle besitzen vier homologe Untereinheiten, die jeweils aus sechs Transmembrandomänen, bezeichnet als S1 bis S6, bestehen (sechs Transmembrandomänen mit einem P-Loop: 6TM/P). Die Segmente S5 und S6 bilden die Pore, zusammen mit dem dazwischenliegenden P-Loop. Segment S4 dient als Spannungssensor. Ähnlich aufgebaut sind auch die K_{Ca} -Kanäle, wobei einige der K_{Ca} -Kanäle eine zusätzliche transmembranäre Domäne besitzen. Tandemporenkanäle sind meist Dimere, sie entstehen durch Zusammenlagerung von 6TM/P- und 2TM/P- oder zwei 2TM/P-Untereinheiten (8TM/2P oder 4TM/2P). Durch die zwei P-Schleifen bilden diese Kanäle auch zwei Poren aus.

Die Kir-Kanäle sind Tetramere aus homologen 2TM/P-Untereinheiten (Übersicht in Coetzee et al., 1999). In Abbildung 1-2 ist die Struktur eines Tetramers aus Kir-Untereinheiten dargestellt.

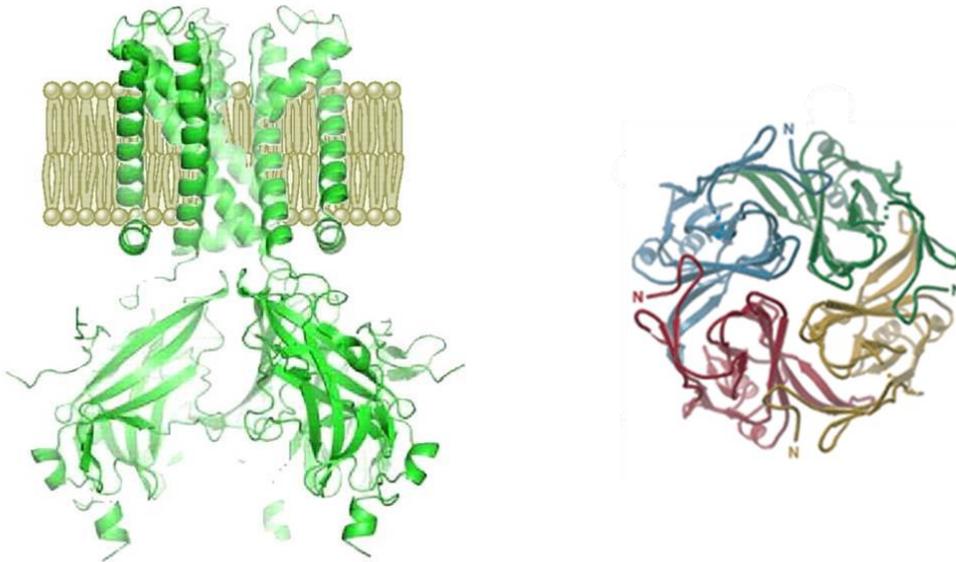


Abbildung 1-2: Kristallstrukturanalyse eines Kir-Kanals als Tetramer (Übernommen aus Hibino et al., 2010; und Pegan et al., 2005)

1.2.2 Die Familie der einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle (Kir-Kanäle)

Die einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle Kir wurden erstmals 1949 im Skelettmuskel durch B. Katz beschrieben (Katz, 1949). Dabei fiel auf, dass die Kir-Kanäle, im Gegensatz zu den schon bekannten spannungsabhängigen Kaliumkanälen, bei Werten des Membranpotentials negativer als das Kaliumgleichgewichtspotential E_K eine hohe Kaliumleitfähigkeit aufweisen, bei Werten positiver als E_K hingegen kaum noch leiten.

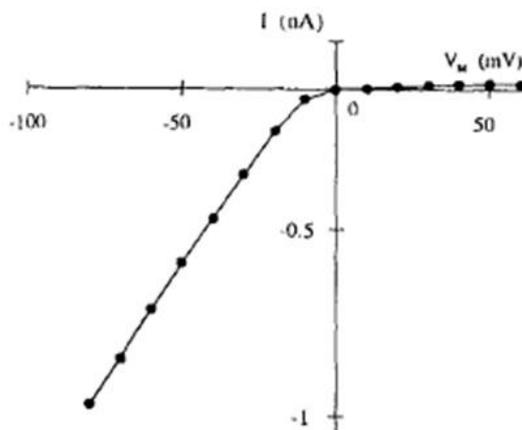


Abbildung 1-3: IV-Kennlinie stark einwärtsgleichrichtender Kaliumkanäle (Übernommen aus Lopatin et al., 1995)

Bei negativeren Werten des Membranpotentials als E_k kommt es durch die Kanäle zu einem Einwärtsstrom von Kaliumionen, was die charakteristische und namensgebende Eigenschaft der Kanäle ist: die Einwärtsgleichrichtung. Damit lassen sich auch die Hauptaufgaben der Kir-Kanäle erkennen: sie stabilisieren das Membranpotential in der Nähe des Kaliumgleichgewichtspotentials und verhindern spontane elektrische Aktivität (Übersicht in Hibino et al., 2010).

Bis heute ließen sich 15 Gene, die für Kir-Kanäle kodieren, identifizieren. Durch Sequenzvergleiche und phylogenetische Analysen wurde die Familie der Kir-Kanäle in sieben Untergruppen eingeteilt, welche man wiederum zu vier funktionellen Gruppen zusammenfassen kann: klassische Kir-Kanäle (Kir2.x), durch G-Proteine regulierte Kir-Kanäle (Kir3.x), ATP sensitive Kir-Kanäle (Kir6.x) und Kir-Kanäle zum Transport von Kaliumionen (Kir1.x, Kir4.x, Kir7.x).

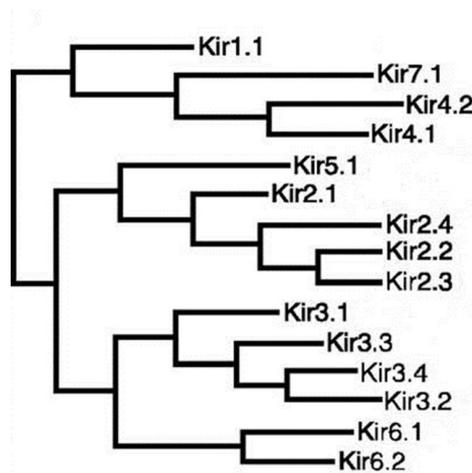


Abbildung 1-4: Phylogenetischer Stammbaum der Kir-Kanäle: Vergleich und Analyse der Aminosäuresequenzen der 15 bekannten Untereinheiten der Kir-Kanäle (Modifiziert nach Hibino et al., 2010)

So sind auch die Aufgaben dieser funktionellen Gruppen unterschiedlich. Klassische Kir-Kanäle regulieren die Erregbarkeit vor allem von Herzmuskel- und Nervenzellen, Kir6.x ist zusammen mit dem Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR) wichtig für die Regulation der Insulinsekretion in den β -Zellen des Pankreas und Kir1.x vermittelt transepithelialen Transport von Kaliumionen, beispielsweise in der Niere (Reimann et al., 1999).

1993 gelang erstmals die Sequenzierung eines Kir1.1-Kanals aus renalem Gewebe einer Ratte (Ho et al., 1993) und eines murinen Kir2.1 (Kubo et al., 1993).

Wie im oberen Abschnitt bereits beschrieben, sind auch die Kir-Kanäle aus vier Untereinheiten aufgebaut, die jeweils aus zwei membrandurchspannenden Domänen (TM1 und 2) bestehen und durch eine extrazelluläre porenbildende Schleife (P-Loop) verbunden sind.

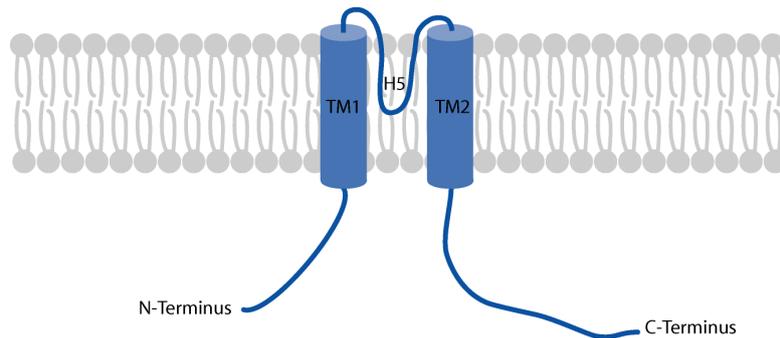


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung einer Untereinheit des Kir-Kanals: Die Untereinheit besteht aus 2 membrandurchspannenden Helices, die durch eine porenbildende Schleife (H5) verbunden sind. N- und C-Terminus liegen intrazellulär (Modifiziert nach Hibino et al., 2010).

Die Pore wird durch die TM2-Helices und die P-Schleifen der vier Untereinheiten gebildet. In Abbildung 1-5 ist der Aufbau der Untereinheit eines Kir-Kanals schematisch dargestellt.

Auch bei den Kir-Kanälen findet man, wie bei allen Kaliumkanälen, die T-X-G-Y-G Sequenz, die für die Ionenselektivität verantwortlich gemacht wird. Amino- (N-) und Carboxy (C)-Terminus liegen intrazellulär, sie lagern sich zusammen und bilden eine Verlängerung der transmembranären Pore, die sogenannte zytoplasmatische Pore (Minor et al., 1999). N- und C-Terminus beinhalten auch die Bindungsstellen für diverse Liganden zur Regulation der Kir-Kanäle. So interagiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2), ein Phospholipid der Zellmembran und intrazellulärer Botenstoff, mit C-terminal gelegenen, positiv geladenen Aminosäureresten des Kanalproteins, die in der Nähe der Zellmembran liegen. PIP_2 ist essentiell für die Funktion der Kir-Kanäle, da gezeigt werden konnte, dass in Abwesenheit von PIP_2 die Leitfähigkeit der Kir-Kanäle stark abnimmt (Hilgemann et al., 1996; Huang et al., 1998). Ebenso wird angenommen, dass G-Proteine, Protonen und ATP an der zytoplasmatischen Domäne binden (Übersicht in Nichols et al., 1997).

Die namensgebende Eigenschaft der Kanäle, die Einwärtsgleichrichtung, scheint nicht durch den Kanal an sich, sondern durch eine spannungsabhängige Interaktion von intrazellulären Magnesium (Mg^{2+})-Ionen und Polyaminen wie Spermin und Spermidin mit der Kanalpore gewährleistet zu werden, wodurch diese mechanisch blockiert wird (Ficker et al., 1994; Lopatin et al., 1994, 1995; Matsuda et al., 1987). Die Einwärtsgleichrichtung ist nicht bei allen Kanälen gleich stark ausgeprägt. Man unterscheidet zwischen starken (Kir2.x, Kir3.x), mittleren (Kir4.x) und schwachen (Kir1.1, Kir6.x) einwärtsgleichrichtenden Kanälen. Die Ursache dafür sieht man darin, dass starke Einwärtsgleichrichter wie Kir2.x und Kir3.x in der TM2-Helix an Position 172 eine negativ geladene

Aminosäure aufweisen (Aspartat), während an dieser Stelle bei schwachen Einwärtsgleichrichtern mit Asparagin eine ungeladene Aminosäure steht (Stanfield et al., 1994; Wible et al., 1994).

1.2.3 Der Kaliumkanal Kir2.1

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Kir2.1-Kanal. Dieser Kanal ist in unterschiedlichen Zellen des menschlichen Organismus verbreitet. Er findet sich in den Kardiomyozyten der Herzkammern, des Vorhofs und in Zellen der Purkinje-Fasern, allerdings nicht in Zellen von Sinus- oder AV-Knoten. In Gefäßen kommt er sowohl in Endothelzellen als auch in glatten Muskelzellen vor. In den neuronalen Zellen des Gehirns wird er global exprimiert. Auch in der Skelettmuskulatur und im juxtaglomerulären Apparat der Niere wurde der Kir2.1-Kanal nachgewiesen. Die Funktion des Kanals ist die Stabilisierung des Ruhemembranpotentials und die Regulation der Erregbarkeit der Zellen (Hibino et al., 2010).

Kir2.1 zählt zu den stark einwärtsgleichrichtenden Kanälen. Für dieses Merkmal wurden in den letzten Jahren verschiedene strukturelle Besonderheiten als Ursache postuliert: Ein Aspartat an Position 172 und ein Serin an Position 165 in der transmembranären Pore, zwei Glutamatreste an Position 224 und 299 im C-Terminus der zytoplasmatischen Domäne und der sogenannte Di-Aspartat-Cluster, bestehend aus zwei Aspartatresten an Position 255 und 259, die an der zytoplasmatischen Pore liegen. Zudem formen einige Aminosäuren im zytoplasmatischen Teil auf Seite der Zellmembran einen Ring um die Achse von transmembranärer und zytoplasmatischer Pore und bilden hier die engste Stelle der Pore. Es wird angenommen, dass diese G-Loop genannte Struktur ihre Konformation und dadurch den Durchmesser des von ihr gebildeten Rings in Anwesenheit von beispielsweise PIP_2 ändern kann. Das kann zu allosterischen Änderungen in der räumlichen Struktur des Selektivitätsfilters oder der PIP_2 -Bindungsstelle führen und dadurch Ionentransport und Leitfähigkeit des Kanals beeinflussen (Pegan et al., 2005).

Wie alle Membranproteine besitzt auch Kir2.1 C-terminal Sequenzen, die den Export des Proteins aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) regeln und N-terminal Sequenzen, die für den Export aus dem Golgi-Apparat zuständig sind. Die Aktivität der Kir2.1-Kanäle scheint zudem durch Internalisierung des Kanals kontrolliert zu werden, die durch Dynamin und Proteine der Rho-Familie (v.a RacI) vermittelt wird (Boyer et al., 2009; Leyland et al., 2004).

Mit dem Kir2.1-Kanal werden aktuell zwei Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Zum einen eine Form des Short QT Syndroms (SQTS 3) und das Andersen-Tawil-Syndrom, eine Form des Long-QT-Syndroms (LQT 7) (Schulze-Bahr, 2005). Das Andersen-Syndrom ist eine seltene Erkrankung, die sowohl sporadisch als auch hereditär autosomal dominant auftritt und durch drei klinische Aspekte

gekennzeichnet ist: Arrhythmien, periodische Paralysen und Dysmorphien. Es sind über 30 verschiedene Mutationen innerhalb des Gens, das für den Kir2.1-Kanal codiert (*KCNJ2*), bekannt, die für das Andersen-Syndrom verantwortlich gemacht werden und zu einer Abnahme bzw. einem Verlust der Kanalfunktion sowie zu einem dominant negativen Effekt führen. Die Mutationen sind fast alle in der zytoplasmatischen Domäne des Kanals lokalisiert, sie behindern den Transport des Proteins zur Zellmembran oder unterbinden die Interaktion mit PIP₂. Das führt in Kardiomyozyten zu einer Verlängerung der Plateauphase des kardialen Aktionspotentials durch die verlangsamte Repolarisation, was ihren Ausdruck in einer verlängerten QT-Zeit im EKG findet (Long QT Syndrom 7). Zusätzlich ist das Ruhemembranpotential weniger stabil. Diese beiden Faktoren erhöhen das Risiko für ventrikuläre Arrhythmien und Kammerflimmern. Die periodisch auftretenden Lähmungen der Skelettmuskulatur werden dadurch erklärt, dass aufgrund der defekten Kir2.1-Kanäle das Membranpotential der Muskelzelle positiver, also depolarisiert wird, und dadurch die spannungsabhängigen Natriumkanäle inaktiviert werden, wodurch kein Aktionspotential ausgelöst werden kann (Miake et al., 2003; Plaster et al., 2001).

Beim Short QT Syndrom 3 wurde eine „missense“-Mutation an Position 172 gefunden: Aus einem Aspartat wird dadurch ein Asparagin. Das hat einen „gain of function“ zur Folge, der Kaliumeinstrom in die Zellen wird verstärkt. Dies führt zu einer beschleunigten Repolarisation von Vorhof- und Kammermyozyten und dadurch zu einer Verkürzung von Aktionspotentialdauer und QT-Zeit. Es kann zu Vorhofflimmern und Kammerflimmern kommen (Priori et al., 2005).

1.3 DD-Tag und Shield-1: Eine pharmakologisch-molekularbiologische Methode zur Liganden-gesteuerten Proteinstabilisierung

Um die Funktionen verschiedener Proteine und deren Aufgaben im komplexen Zusammenspiel *in vivo* zu verstehen, wurden in den letzten Jahren sehr unterschiedliche Methoden entwickelt. Eine wichtige Rolle spielen dabei molekulargenetische Methoden zur Regulation der Genexpression, da es dadurch möglich ist, spezifisch das Expressionslevel eines bestimmten Proteins zu manipulieren. Dazu zählt beispielsweise das Tet-System: Bei dieser Methode kann über die Zugabe von Doxycyclin die Expression des gewünschten Proteins gestartet (Tet-On) bzw. unterdrückt (Tet-Off) werden (Gossen et al., 1992; Lewandoski, 2001). Eine weitere Methode ist die RNA-Interferenz, die auch als „gene silencing“ oder Gen-Knockdown bezeichnet wird. Hierbei nutzt man einen endogenen Mechanismus eukaryotischer Zellen zur viralen Abwehr und Steuerung der Genexpression, indem man beispielsweise mittels Lentiviren RNA in die Zelle einbringt, die komplementär zu der mRNA-Sequenz des zu untersuchenden Gens ist. Über Enzymkomplexe wird die entsprechende mRNA zerstört oder die Translation blockiert (Medema, 2004; Raab et al., 2004). Nachteilig bei diesen Methoden ist die schwierige Steuerbarkeit des Ausmaßes der Gen-Stillegung und der lange Zeitraum, bis die Proteinkonzentrationen sich entsprechend ändern.

Ein anderer Ansatz, um Proteinfunktionen zu untersuchen, ist die Verwendung kleiner Proteininhibitoren oder -aktivatoren, die direkt mit den Proteinen interagieren und damit einen sehr schnellen, dosisabhängigen und reversiblen Effekt haben. Nachteile sind hier die mangelnde Spezifität, da die meisten bekannten Interaktoren nicht nur auf ein Protein spezifisch wirken, sondern auch andere beeinflussen, mangelnde Gewebepenetration, z.B. des Gehirns, oder eine Toxizität des Liganden in höheren Konzentrationen.

Die ideale Methode zur Untersuchung von Proteinfunktionen kombiniert also die Vorteile beider Ansätze, die Schnelligkeit, Reversibilität und Dosisabhängigkeit der Proteininhibitoren mit der Spezifität transgener Methoden. Banaszynski et al. stellten 2006 eine solche neuartige Methode vor. Ausgangspunkt ist das 107 Aminosäuren große Protein FKBP12 (FK605 binding protein, 12kDa), das zur Gruppe der Immophiline gehört. Die Immunsuppressiva Tacrolimus (FK506) und Rapamycin binden an FKBP12, bei Interaktion mit FK506 hemmt der Komplex Calcineurin, zusammen mit Rapamycin hemmt es mTOR (mammalian target of rapamycin).

In die Bindungstasche von FKBP12 wurde eine Punktmutation eingefügt (F36V). Es zeigte sich, dass

einige synthetische Liganden mit 1000fach höherer Affinität an die FKBP12-Mutante binden als an den Wildtyp FKBP12 (Clackson et al., 1998). Durch Einfügen einer weiteren Punktmutation in FKBP12 (L106P) wurde erreicht, dass das Protein bei Abwesenheit eines Liganden rasch degradiert. Fusioniert man nun diese FKBP12-Doppelmutante, DD-Tag genannt (destabilizing domain), N- oder C-terminal mit einem anderen Protein, so wird auch dieses schnell abgebaut (Banaszynski et al., 2006). Dieser Abbau scheint Proteasom-vermittelt zu sein, da die Blockierung des Proteasoms den Abbau der destabilisierenden Domäne und der getaggten Proteine verhindert (Banaszynski et al., 2006). Die destabilisierende Domäne wird nicht oder nicht korrekt gefaltet und daraufhin ubiquitynyliert, was wiederum zum Abbau durch das Proteasom führt (Egeler et al., 2011).

Banaszynski et al. entwickelten für den DD-Tag einen neuen synthetischen Liganden, der ebenfalls höhere Affinität zur FKBP12-Mutante hat und Zellmembranen und die Bluthirnschranke gut überwinden kann (Synthese basierend auf Holt et al., 1993; Yang et al., 2000). Die Strukturformel des Stabilisationsliganden ist in Abbildung 1-6 dargestellt.

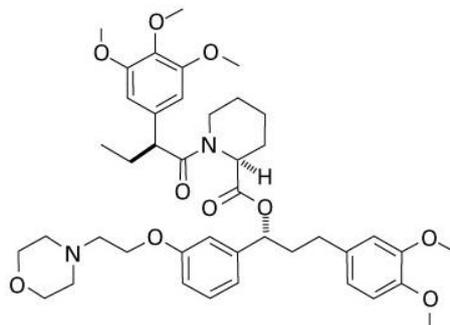


Abbildung 1-6 Struktur des Stabilisierungsliganden Shield-1 (übernommen von www.clontech.com)

Durch Zugabe dieses Liganden wird die Degradation des DD-Tags verhindert, das Protein bleibt korrekt gefaltet und stabil. Aufgrund der „schützenden“ Eigenschaft des Liganden wurde dieser als Shield-1 bezeichnet. In Abbildung 1-7 ist vereinfacht die Funktionsweise dieser Methode dargestellt.

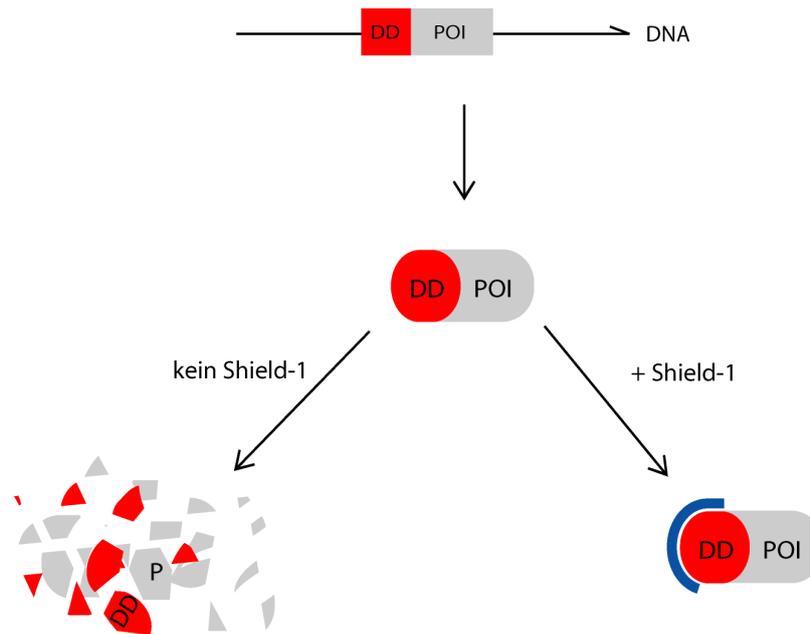


Abbildung 1-7: Schematische Darstellung der Funktionsweise des DD-Tags An das gewünschte Protein (POI, *protein of interest*) wird die destabilisierende Domäne ankloniert. Durch Zugabe des Stabilisierungsliganden Shield-1 kann das Protein stabil exprimiert werden. In Abwesenheit von Shield-1 ist das Protein instabil und wird zügig abgebaut.

Bei *in vitro* Experimenten zeigte sich, dass das mit der destabilisierenden Domäne getaggte Protein bereits 4 h nach Entfernen von Shield-1 fast vollständig degradiert ist. Bei Zugabe von Shield-1 kann man bereits nach 15 min eine erste Stabilisierung des Proteins nachweisen, mit einem Maximum nach 24 h. Die Geschwindigkeit zur Stabilisierung ist also abhängig von der Geschwindigkeit der Genexpression, die der Destabilisierung vom Abbau durch das Proteasom. Diese Methode wurde sowohl in Zellkultur als auch *in vivo* im Mausmodell bereits erfolgreich angewandt (Banaszynski et al., 2006; Banaszynski et al., 2008; Rodriguez et al., 2012; Selimyer et al., 2009).

1.4 Molekularbiologische und pharmakogenetische Methoden zur reversiblen Inaktivierung von Neuronen und Neuronengruppen („neuronal silencing“)

Um die Rolle verschiedener neuronaler Netzwerke in physiologischen Prozessen des Gehirns oder neurologischen Erkrankungen zu verstehen, benötigt man Methoden, die zu einer schnellen und reversiblen Inaktivierung von Neuronen oder Neuronengruppen führen. Solche Methoden werden unter dem Begriff „neuronal silencing“ zusammengefasst (Tervo et al., 2007). In den letzten Jahren

wurden eine Vielzahl von Methoden mit diesem Ziel, aber sehr unterschiedlichen Ansätzen entwickelt.

1.4.1 Optogenetik

Die Optogenetik ist eine Kombination optischer und molekulargenetischer Methoden. Lichtsensitive Ionenpumpen und Kanäle wie Channelrhodopsin-2 (ChR-2) oder Halorhodopsin (Np-HR) werden in Nervenzellen via molekulargenetischer Methoden zur Expression gebracht. Durch externe Lichtimpulse von definierter Wellenlänge, je nach verwendeter Ionenpumpe oder Ionenkanal, lassen sich die Kanäle und Pumpen aktivieren. Das führt, je nach verwendeter Pumpe oder Kanal zur Depolarisation und Auslösung von Aktionspotentialen (ChR-2), oder zu Hyperpolarisation und verminderter Feuerungsrate der Neuronen (Np-HR). So lassen sich Nervenzellen im Millisekunden-Bereich aktivieren oder inhibieren (Übersicht in Yizhar et al., 2011).

1.4.2 Zelluläre Hyperpolarisation mit Hilfe modifizierter muskarinerg Acetylcholinrezeptoren: DREADDs (Designer Receptors exclusively activated by designer drugs)

Ein weiterer Ansatz zur Modulation der Erregbarkeit von Nervenzellen sind sogenannte DREADDs. Hierbei handelt es sich um muskarinerge Acetylcholinrezeptoren, welche durch molekularbiologische Modifikationen insensitiv gegenüber ihrem ursprünglichen Liganden Acetylcholin sind. Aktiviert werden sie jedoch durch Bindung von Clozapin-N-Oxid (CNO), eine inerte, nicht toxische und hirngängige Substanz, die systemisch appliziert werden kann. Über viralen Gentransfer oder transgene Knock-in-Methoden werden die Rezeptoren in Neuronen exprimiert. Ein Subtyp der DREADDs, der hM4Di-Rezeptor, aktiviert nach Bindung des Liganden CNO den $G\alpha_i$ -Proteingekoppelten Signalweg der muskarinergen Acetylcholinrezeptoren und führt dadurch zu einer Hyperpolarisation der Zelle, was einer temporären, reversiblen Inhibitionen dieser Neuronen entspricht (Farrell et al., 2013).

1.4.3 Ivermectin-sensitiver Chlorid-Kanal

Ein weiteres Werkzeug ist ein ursprünglich Glutamat und Ivermectin sensitiver Chloridkanal aus *C. elegans*. Durch Modifikationen wurde seine Glutamatsensitivität verringert. Werden nun die α - und β -Untereinheit ($GluCl\alpha\beta$) des Kanals in neuronalen Zellen *in vivo* co-exprimiert, beispielsweise mit Hilfe eines viralen Gentransfers, kommt es ligandenabhängig, durch systemische Gabe von Ivermectin, zur Aktivierung des Kanals. Das führt zu einer Hyperpolarisation und verringerten Aktionspotentialfrequenz der Zellen (Lerchner et al., 2007).

1.4.4 Überexpression des Kir2.1-Kanals

Wird der unter Punkt 1.2.3 beschriebene Kir2.1-Kanal in Neuronen experimentell überexprimiert, nimmt die Feuerungsrate von Aktionspotentialen der Zellen deutlich ab, ebenfalls nimmt als Folge davon die Transmitterfreisetzung an der Synapse ab. Zudem wurde eine leichte Hyperpolarisation der Zellen beobachtet. Die elektrische Aktivität einer Zelle oder sogar eines ganzen neuronalen Netzwerkes wird auf diese Weise supprimiert (Baines et al., 2001; Burrone et al., 2002; Johns et al., 1999).

Dieses Prinzip des „neuronal silencing“ mittels des Kir 2.1-Kanals wurde auch schon *in vivo* angewandt, zum Beispiel zur Untersuchung der Entwicklung des olfaktorischen Systems (Yu et al., 2004), um kokainassoziierte Einflüsse auf den Nucleus accumbens zu verstehen (Dong et al., 2006) oder um die spinale Schmerzentstehung bei Kompression der dorsalen Nervenwurzel zu unterdrücken (Ma et al., 2010).

2 Fragestellung und Zielsetzung

Methoden zur reversiblen Inaktivierung bestimmter Neuronen und Neuronengruppen sind ein wichtiges Werkzeug der Neurowissenschaften. Sie dienen einerseits der Erforschung der komplexen Interaktion neuronaler Netzwerke und ihrer Funktion und Dynamik bei physiologischen neuronalen Prozessen. Andererseits helfen diese Methoden die Rolle unterschiedlicher Neuronengruppen bei verschiedenen pathologischen Vorgängen zu verstehen und bieten die Möglichkeit zur Etablierung von Mausmodellen für verschiedene neurologische Erkrankungen.

Hypothese:

Durch genetische Überexpression des Kir2.1-Kanals werden Neuronen hyperpolarisiert und zeigen eine deutlich verringerte Aktionspotentialrate. Koppelt man nun diesen Kanal N-terminal mit der destabilisierenden Domäne DD, so lassen sich die hyperpolarisierenden und damit „stilllegenden“ Effekte der Kir2.1-Überexpression durch Zugabe des Stabilisationsliganden Shield-1 schnell, reversibel und spezifisch steuern.

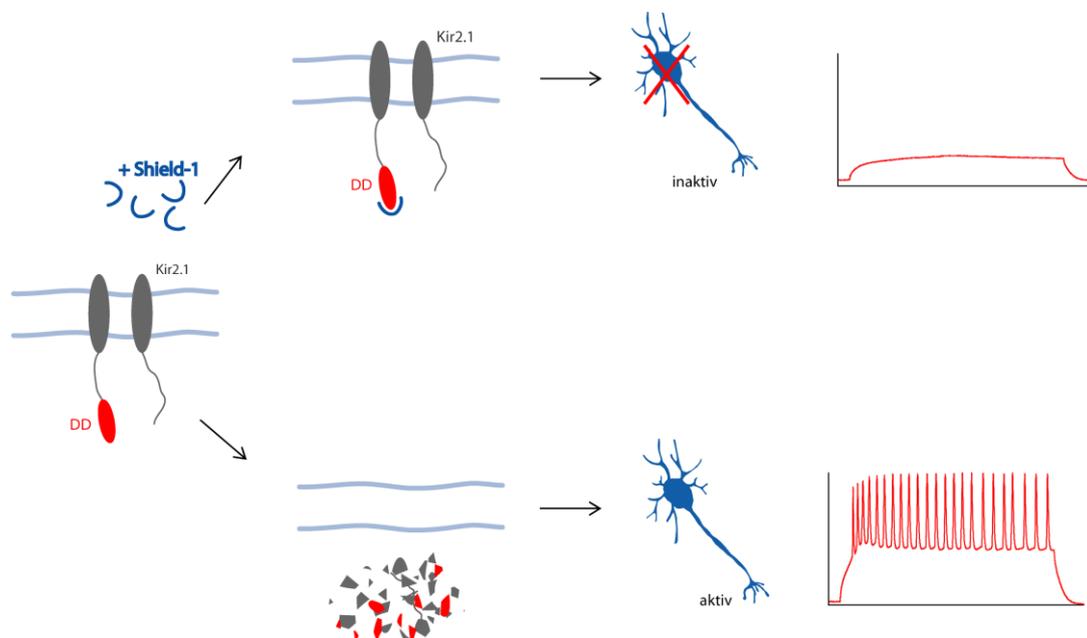


Abbildung 2-1 Übersicht über die Hypothese: Inaktivierung von Neuronen mittels eines ligandengesteuerten Kir2.1-Kanals In Anwesenheit des Liganden Shield-1 wird der Kanal Kir2.1 in der Membran überexprimiert und die Zelle elektrisch inhibiert

Wie in Abbildung 2-1 dargestellt, wird bei Abwesenheit des Liganden der getaggte Kaliumkanal schnell durch das Proteasom abgebaut und es kommt zu keiner Änderung der elektrischen Aktivität des Neurons. Wird nun der Ligand appliziert, verhindert das den Abbau des Kir2.1-Kanals, der Kanal wird in der Membran überexprimiert. Das hat eine verstärkte Hyperpolarisation der Zelle zur Folge, die Zelle wird somit inhibiert. Dieser neuartige pharmakogenetische Ansatz soll in der vorliegenden Arbeit verfolgt werden.

Daraus ergeben sich folgende Zielsetzungen für die vorliegende Arbeit:

1. Klonierung geeigneter Plasmide für *in vitro* Experimente

Der erste Schritt der vorliegenden Arbeit soll die Erstellung verschiedener Plasmide zur Überprüfung des DD-getaggten Kir2.1-Kanals *in vitro* sein. Hierfür wird der Kir2.1-Kanal N-terminal mit der Sequenz des DD-Tags ligiert. Dieses Konstrukt soll nun über Zwischenklonierungsschritte in verschiedene Plasmide eingebracht werden.

2. Überprüfung der Funktionsweise der Vektoren und Etablierung eines *in vitro* Modells

Im nächsten Schritt soll die korrekte Expression und Funktionsfähigkeit des DD-Kir2.1-Konstrukts *in vitro* überprüft werden. Zudem soll die Steuerung der Expression durch Zugabe oder Entfernen des Liganden Shield-1 getestet werden. Das erfolgt auf Proteinebene mittels Nachweis durch Western Blot-Analyse, auf zellulärer Ebene durch Fluoreszenzmikroskopie. Eine funktionelle Analyse soll mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden vorgenommen werden.

3. Herstellung von Vektoren für den Gentransfer zur Etablierung eines transgenen Tiermodells

Abschließend soll ein Gen-Targeting-Vektor zur Integrierung des Konstrukts in den ROSA26-Locus erstellt werden. Als Plasmid soll ein CTV-Vektor oder ein STOP-eGFP-ROSA26TV-Vektor verwendet werden (Klaus Rajewsky, MDC Berlin-Buch). Zudem soll ein Vektor für den Gentransfer mittels adenoassoziierten Viren (AAV) erzeugt werden, um ebenfalls die Möglichkeit des Virus-basierten Gentransfers zu haben.

Die Vektoren dienen zum einen der Überprüfung der Methode *in vivo* und sollen natürlich auch für spätere experimentelle angewandte Fragestellungen genutzt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Plasmide

Plasmide sind doppelsträngige, zirkuläre DNA-Moleküle, die in Bakterien zusätzlich zur genomischen DNA vorliegen können und unabhängig von dieser vervielfältigt werden können. In der Molekularbiologie werden Plasmide zum Einschleusen fremden Genmaterials in Organismen verwendet. Diese Plasmide haben alle einen ähnlichen Aufbau. Sie besitzen einen Replikationsstart (*origin of replication*), ein Antibiotikaresistenzgen zur Selektion und eine Klonierungsstelle (*cloning site*), die über mehrere Schnittstellen für Restriktionsenzyme zur Klonierung verfügt.

3.1.1 pBluescript II KS+ (Stratagene)

Dieses Plasmid wurde in der vorliegenden Arbeit zur Herstellung von Zwischenvektoren verwendet. Es hat eine Größe von 3,0 kb, verfügt über ein Gen zur Ampicillinresistenz, eine *multiple cloning site* und als Replikationsstart eine pUC-ori-Sequenz zur Vermehrung in *E.coli*.

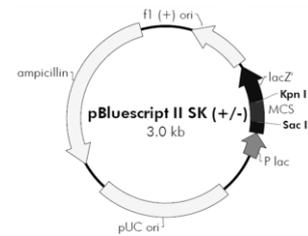


Abbildung 3-1 Darstellung des Plasmids pBluescript II KS+ (Übernommen von Agilent Technologies)

3.1.2 pcDNA3.1 (Invitrogen)

Der pcDNA3.1 Vektor wird zur Überexpression von cDNA in eukaryotischen Zellen verwendet, hier in HEK293T-Zellen. Er besitzt auch eine *multiple cloning site*, ein Neomycin- und Ampicillin-Resistenzgen und zusätzlich zum Replikationsursprung pUC-ori zur Replikation in *E.coli* einen SV40-Replikationsursprung zur Replikation in eukaryotischen Zellen. Das Plasmid hat eine Größe von 5,4 kb.

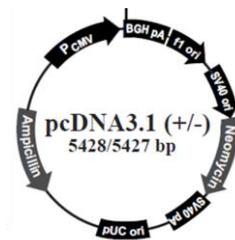


Abbildung 3-2 Darstellung des Plasmids pcDNA3.1 (Übernommen von Invitrogen)

3.1.3 pIRES2-EGFP (Clontech)

Auch dieser Vektor wird zur Überexpression von cDNA in eukaryotischen Zellen verwendet. Er besitzt ebenfalls eine pUC-ori- und eine SV40-Sequenz, eine *multiple cloning site* und als Selektionsmarker

ein Neomycin- und Kanamycin-Resistenzgen. Zusätzlich besitzt er eine IRES-Sequenz (*internal ribosomal entry site*) zwischen *multiple cloning site* und einem EGFP- (*enhanced green fluorescent protein*) Gen. Diese IRES-Sequenz führt dazu, dass sowohl das Klonierungsprodukt (in der *multiple cloning site*) als auch das EGF-Protein von einer mRNA translatiert werden kann. Damit kann bei transient transfizierten Zellen leicht anhand des EGFP-Signals zwischen erfolgreich transfizierten und nicht transfizierten Zellen unterschieden werden. Der Vektor hat eine Größe von 5,3 kb.

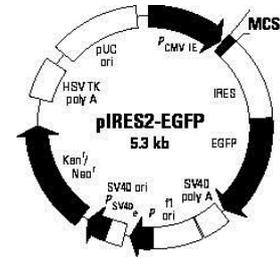


Abbildung 3-3 Darstellung des Plasmids pIRES2-EGFP (Übernommen von Clontech)

3.1.4 STOP-eGFP-ROSA26TV und CTV (beide Addgene)

Diese Plasmide dienen als Grundgerüste zur Konstruktion der Gentergating-Vektoren für den Knock-in von cDNA in den Rosa26 Locus (Chromosom 6), ein Genort, der zur ubiquitären und kontinuierlichen Expression bei Knock-in-Konstrukten geeignet ist. Beide verfügen über homologe 5'- und 3'-Sequenzen zum Rosa26 Locus, eine von loxP-Stellen flankierte NeoR-Stop-Kassette sowie eine von frt-Stellen flankierte IRES-EGFP-Sequenz. Das Klonierungskonstrukt lässt sich über eine AscI-Schnittstelle einfügen. Einziger Unterschied zwischen beiden Plasmiden ist der im CTV-Vektor zusätzlich vorhandene CAG-Promoter. Die Vektoren haben eine Größe von 14,3 kb (ROSA26TV) und 16,1 kb (CTV).

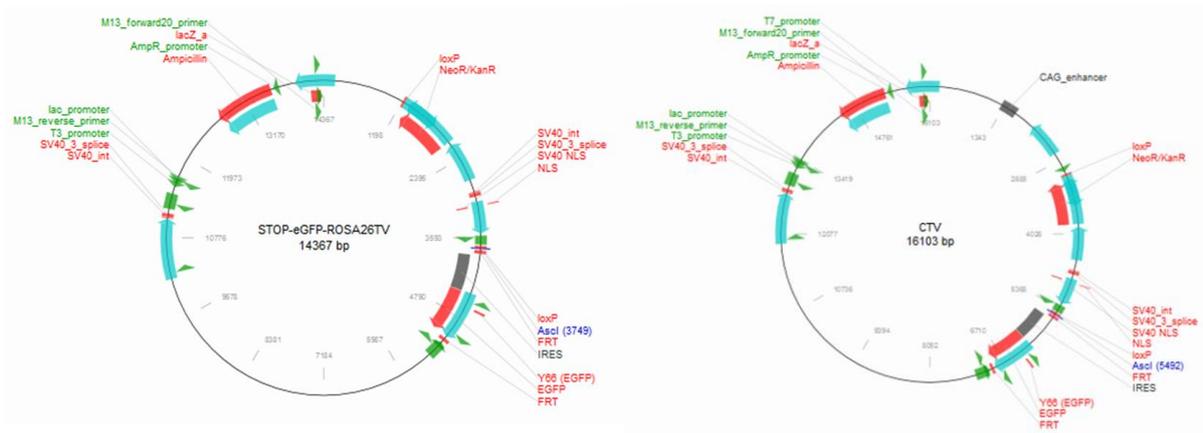


Abbildung 3-4 Darstellung der Gentergating-Vektoren CTV und STOP-eGFP-ROSA26TV (Übernommen von Addgene)

3.2 Bakterienkultur

3.2.1 Verwendete Bakterienstämme

Für Klonierungsversuche und Vermehrung bestimmter Plasmide werden Bakterien des Stammes *Escherichia coli* (*E.coli*) verwendet, die die Kompetenz besitzen, DNA in Form von Plasmiden von außen aufzunehmen. In dieser Arbeit werden zum einen XL1-Blue-Zellen (Stratagene) und XL10-Gold-Zellen (Stratagene) verwendet.

| Bezeichnung | Genotyp |
|--------------------------------|---|
| XL1-Blue competent cells | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqΔM15 Tn10</i> (Tetr)]. |
| XL10-Gold ultracompetent cells | <i>Tetr Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> Hte [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tetr) Amy Camr |

3.2.2 Kultivierung

Die Kultivierung der Bakterien erfolgt unter aeroben Bedingungen bei 37°C in einem geeigneten Nährmedium unter kontinuierlichem Schütteln.

Zur Vermehrung eines gewünschten Plasmids in kleinem (7 ml) oder großem Umfang (150 ml) werden Flüssigkulturen aus LB-Medium verwendet. LB-Medium ist ein sogenanntes reiches oder Voll-Medium, welches den *E. coli*-Bakterien gute Wachstumsbedingungen bietet und somit für einen hohen Plasmidertrag sorgt. Das LB-Medium wird direkt nach der Herstellung in 7 ml-Röhrchen oder 100 ml-Erlenmeyerkolben autoklaviert und direkt vor Verwendung mit einem Antibiotikum, je nach Resistenzeigenschaft des verwendeten Plasmids, in einer Endkonzentration von 100µg/ml versetzt. Für diese Arbeit werden Ampicillin und Kanamycin verwendet. LB-Flüssigkulturen lässt man bei 225 rpm und 37°C für 8-16 h inkubieren (Bakterienschüttler Certomat®R/H, B.Braun).

| LB-Medium | |
|------------------|-----------|
| Tryptone | 10g |
| Yeast Extract | 5g |
| NaCl | 5g |
| D(+)-Glucose | 1g |
| H ₂ O | ad 1000ml |

Bakterienausstriche zur Selektion einzelner Klone inkubiert man für ca 12 h bei 37°C im Brutschrank (Hersteller) auf LB-Agarplatten. Zur Herstellung von Agarplatten wird LB-Medium mit 1,5% Agar versehen und autoklaviert, nach Abkühlung auf 55°C wird ein Antibiotikum (Konzentration 100 µg/ml) zugegeben und das Medium in Petrischalen (Durchmesser 10cm, Corning) gegossen, die bei 4°C gelagert werden.

| LB-Agar | |
|-------------|---------|
| LB-Medium | 1000 ml |
| Select Agar | 15 g |

Zur Lagerung von Bakterienkulturen eignen sich Verdünnungsausstriche auf Agar-LB-Platten, die nach Inkubation für kurze Zeit bei 4°C aufbewahrt werden können. Zur Langzeitlagerung sind Glycerol Stocks geeignet. Hierfür mischt man 1 ml einer Bakterienflüssigkultur mit 1 ml sterilem Glycerol, überführt das Gemisch in ein Cryo-Röhrchen (Nunc) und lagert es bei -80°C.

3.2.3 Transformation

Als Transformation bezeichnet man das Einbringen von fremder DNA in Bakterien. Zur Selektion erfolgreich transformierter Zellen dient eine Antibiotikaresistenz, für die das neu eingefügte Plasmid ebenfalls kodiert.

Transformation durch Elektroporation

Bei dieser Methode wird durch einen Hochspannungspuls die Bakterienwand perforiert und so die Aufnahme des Plasmids ermöglicht. Hierzu muss der Ligationsansatz (siehe Punkt 3.4.6.3) durch Fällung und Zentrifugation möglichst salzfrei gemacht werden. Zu 10 µl des Ligationsansatzes pipettiert man in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf) 5 µl tRNA (1 µg/µl), 10 µl Ammoniumacetat (7,5 M) und 50 µl 100%igen Ethanol. Bei RT und 15000 rpm wird für 30 min zentrifugiert und im Anschluss zweimal mit 800 µl 70% igem Ethanol gewaschen, dabei wird jeweils 5 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Nach der letzten Zentrifugation wird der Ethanol vorsichtig abgegossen, die DNA in der Vakuumzentrifuge (Bachofer) getrocknet und in 5 µl Wasser gelöst.

Die gelöste DNA gibt man nun auf 50 µl eines Aliquots elektrokompetenter Bakterien (XL-1 Blue, Stratagene), inkubiert für eine Minute auf Eis und überführt das Gemisch in eine Elektroporationsküvette (Pecqlab). Durch den Elektroporator GenePulser (Biorad) wird bei 25 µF, 200 Ω und 2,5 kV ein Hochspannungspuls appliziert, nach erfolgreicher Elektroporation wird der

Bakterien-DNA-Ansatz mit 1 ml SOC+ Medium versehen und für 1 h bei 225 rpm und 37°C inkubiert. Danach plattiert man den Transformationsansatz auf mit Antibiotikum versehenen Agarplatten aus und inkubiert sie über Nacht bei 37°C.

| SOC(-) Medium | | SOC(+) Medium | |
|------------------|-----------|-------------------------|--------|
| yeast extract | 0,5 g | SOC(-) | 4,8 ml |
| Bacto Tryptone | 2 g | MgCl ₂ , 1 M | 50 µl |
| NaCl, 5 M | 0,2 ml | MgSO ₄ , 1 M | 50 µl |
| KCl, 1 M | 0,25 ml | Glucose, 20 % | 100 µl |
| H ₂ O | ad 100 ml | | |

Chemische Transformation

Hierfür gibt man zu 100 µl chemisch kompetenten Zellen (XL-10 Gold, Stratagene) 4 µl β-Mercaptoethanol und lässt das Gemisch 10 min auf Eis inkubieren. Dann fügt man 2 µl des Ligationsansatzes oder 10-30 ng Plasmid-DNA hinzu und lässt es weitere 30 min auf Eis inkubieren. Für 30 s wird der Ansatz in einem 42°C warmen Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt, anschließend 2 min auf Eis gekühlt, mit 0,9 ml SOC+ Medium versehen und 1 h bei 225 rpm und 37°C inkubiert. Der Ansatz wird bei 3500 rpm für 5 min zentrifugiert, das Bakterienpellet in 100 µl Medium resuspendiert und auf einer antibiotikumhaltigen Agarplatte ausplattiert. Über Nacht inkubiert man die Agarplatte bei 37°C.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Vervielfältigung von DNA mittels Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction* - PCR) lassen sich DNA-Fragmente - unter anderem Plasmid-DNA, cDNA oder genomische DNA - vervielfältigen oder verändern, zum Beispiel durch Hinzufügen neuer Restriktionsschnittstellen. Jede PCR verläuft nach einem grundsätzlichen Schema. Zunächst erfolgt durch Erhitzen der Probe auf 95°C eine Denaturierung und Trennung der doppelsträngigen, zu vervielfältigenden DNA (*template* DNA). Im nächsten Schritt lagern sich komplementäre Oligonukleotide (Primer) an die einzelsträngige *template* DNA an (*Annealing*). Die Temperatur des *Annealing* hängt vor allem von der Primerkonfiguration ab und liegt meist zwischen 50-55°C. Als letzter Schritt erfolgt die Synthese der neuen DNA-Fragmente

durch eine hitzestabile DNA-Polymerase bei dem Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms, meist bei 72°C (Elongation).

Die als Primer verwendeten Oligonukleotide werden mit Hilfe des Programms DNA-Man 5.0 (Lynnon Biosoft) erstellt und von der Firma MWG Eurofins synthetisiert.

3.3.1.1 Verwendete Polymerasen

Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System (Roche)

Das Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System ist ein Gemisch aus der thermostabilen Taq-Polymerase und einem thermostabilen Enzym ohne DNA-Polymerase-Eigenschaften, das eine 3'-5'-Exonucleaseaktivität zur Korrektur fehlerhaft eingebauter Basen besitzt (*proofreading*). Dadurch wird die Fehlerrate der Taq-Polymerase auf 1/6 minimiert. Aufgrund dieser geringen Fehlerrate bei der Synthese von DNA-Fragmenten wird dieses System verwendet, um PCR-Produkte zur Klonierung oder Sequenzierung herzustellen.

| Reaktionsansatz Expand High Fidelity ^{PLUS} Polymerase | |
|---|----------|
| dNTP-Mix, 10 mM | 8 µl |
| Primer forward, 10 µM | 2 µl |
| Primer reverse, 10 µM | 2 µl |
| template DNA, 50-100 ng | x µl |
| Expand High Fidelity ^{PLUS} Reaction buffer, 5x | 10 µl |
| Expand High Fidelity ^{PLUS} Enzym | 0,5 µl |
| H ₂ O | ad 50 µl |

| Standard PCR-Protokoll Expand High Fidelity ^{PLUS} PCR System | | | |
|--|-------|--------|-------|
| 94°C | 2 min | | |
| 94°C | 30 s | | |
| 60°C | 30 s | dT-1°C | } 10x |
| 72°C | 2 min | | |
| 94°C | 30 s | | |
| 55°C | 30 s | | } 25x |
| 72°C | 2 min | | |
| 72°C | 7 min | | |

Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes)

Die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase ist ebenfalls ein Enzymgemisch mit sowohl 5'-3'-Polymerase-Aktivität als auch 3'-5'-Exonucleaseaktivität. Sie ist deshalb auch geeignet für die

Synthese von DNA-Produkten zu Klonierzwecken.

| Reaktionsansatz Phusion High-Fidelity DNA Polymerase | |
|--|----------|
| Phusion HF Buffer, 5x | 10 µl |
| dNTP-Mix, 10 mM | 10 µl |
| template DNA, 50-100 ng | x µl |
| Primer forward, 10 µM | 2,5 µl |
| Primer reverse, 10 µM | 2,5 µl |
| Phusion DNA Polymerase | 0,5 µl |
| H ₂ O | ad 50 µl |

| Standard PCR-Programm Phusion High-Fidelity DNA Polymerase | | | |
|--|-------|--------|-------|
| 98°C | 30 s | | |
| 98°C | 10 s | | |
| 65°C | 30 s | dT-1°C | } 10x |
| 72°C | 2 min | | |
| 98°C | 30 s | | } 20x |
| 55°C | 30 s | | |
| 72°C | 2 min | | |
| 72°C | 5 min | | |

3.3.2 Isolierung von Nukleinsäuren

3.3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wird die alkalische Lyse verwendet. Durch Zugabe von NaOH und SDS-haltigen Puffer (MP2) wird die bakterielle Zellwand zerstört und Proteine und DNA denaturiert. Durch Zugabe eines RNase-haltigen Puffer (MP1) wird freiwerdende RNA abgebaut. Mit einem weiteren Puffer mit Eisessig und Kaliumacetat wird die Lösung neutralisiert (MP3), Plasmid-DNA kann wieder renaturieren, Proteine, genomische DNA, Zellwandbestandteile und Organellen fallen aus und können abzentrifugiert werden, während die Plasmid-DNA im Überstand in Lösung bleibt. Je nachdem ob im großen oder kleinen Umfang Plasmid-DNA gewonnen werden soll, verwendet man eine Mini- oder Maxipräparation.

| RNase-Puffer (MP1) | | NaOH/SDS-Puffer (MP2) | |
|---------------------------------------|------------|-----------------------|------------|
| Tris | 6,06 g | NaOH | 8 g |
| Na ₂ EDTA*H ₂ O | 3,72 g | 10% SDS | 100 ml |
| RNase A | 0,1 g | H ₂ O | ad 1000 ml |
| H ₂ O | ad 1000 ml | | |

| Neutralisationspuffer (MP3) | |
|--------------------------------|------------|
| Kaliumacetat | 294,5 g |
| H ₂ O | ad 1000 ml |
| mit Eisessig pH 5,5 einstellen | |

Minipräparation

Hierfür wird ein Bakterienklon in einer antibiotikumhaltigen 7,5 ml-LB-Kultur über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert. 1,5 ml der Bakteriensuspension werden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 3500 rpm 10 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet resuspendiert man in 250 µl MP1, gibt 250 µl MP2 dazu und inkubiert 5 min bei RT. Dann pipettiert man 250 µl MP3 hinzu, homogenisiert die Suspension und stellt die Probe 15 min auf Eis. Anschließend wird 15 min bei 15000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 525 µl Isopropanol hinzugegeben und nochmals 15 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen, das Pellet mit 800 µl 70%igem Ethanol gewaschen und 5 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das DNA-Pellet wird in 20 µl Wasser gelöst.

Maxipräparation

Es wird eine antibiotikumhaltige 100 ml LB-Kultur mit 1 ml einer 7,5 ml-Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Die Bakteriensuspension wird 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Für die Maxipräparationen wird das QUIAGEN Plasmid Maxi Kit nach Herstellerprotokoll verwendet. Hierbei schließt sich nach der alkalischen Lyse eine Aufreinigung über sogenannte Anionenaustauschersäulen an, bei denen die DNA durch steigende Salzkonzentrationen von Proteinen und RNA gereinigt und am Ende mit Isopropanol präzipitiert wird.

3.3.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Als Trägermaterial dient ein Agarosegel, das in einem Elektrophoresepufferbad liegt. Daran wird eine definierte Spannung angeschlossen. DNA-Moleküle sind aufgrund der enthaltenen Phosphatgruppen

negativ geladen und wandern in diesem elektrischen Feld in Richtung der Kathode. Durch die Porengröße des Gels, die durch die Agarosekonzentration bestimmt wird, und die Größe der einzelnen DNA-Fragmente ergeben sich unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten, was zur Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe führt.

Zur Herstellung eines Agarosegels wird 1xTBE-Puffer mit Agarose (Biozym) in der Mikrowelle bei 1000 W für ca. 4 min aufgekocht. Die Konzentration der zugesetzten Agarose variiert je nach der Größe der DNA-Moleküle, die aufgetrennt werden sollen. Agarosegele sind für DNA-Fragmente mit einer Größe zwischen 0,5 und 30 kB geeignet, die benötigte Agarosekonzentration liegt zwischen 0,5 und 2%. Die erhitzte Agaroselösung lässt man etwas abkühlen und fügt Ethidiumbromid (Sigma) in einer Endkonzentration von 0,8 µg/ml hinzu. Ethidiumbromid interkaliert mit den DNA-Molekülen, dadurch wird unter UV-Licht seine Fluoreszenz verstärkt und die DNA-Banden werden somit sichtbar. Das klare, flüssige Agarosegel gießt man in einen Schlitten, setzt einen Kamm zur Erzeugung von Auftragstaschen ein und lässt es aushärten. Das ausgehärtete Gel wird in eine Elektrophoresekammer, die mit 1xTBE-Puffer gefüllt ist, gesetzt.

| Tris-Borat-EDTA (TBE), 10x | |
|-----------------------------------|------------|
| TrisHCl | 540 g |
| Borsäure | 275 g |
| EDTA, 0,5 M; pH 8,0 | 200 ml |
| H ₂ O | ad 5000 ml |

Die DNA-Proben werden mit Auftragspuffer im Verhältnis 6:1 versehen und in die Auftragstaschen gefüllt. Der Auftragspuffer enthält Bromophenolblau und Xylencyanol als Farbstoffe, ersterer läuft mit DNA-Banden der Größe 100 kB, letzterer mit DNA-Banden der Größe 10 kB. Durch diese Farbstoffe ist eine visuelle Kontrolle der Elektrophorese möglich. Zusätzlich trägt man in einer eigenen Tasche einen Größenstandard (DNA Molecular Weight Marker X, Roche) auf, um die Größe der einzelnen DNA-Fragmente bestimmen zu können. An die Kammer legt man eine Spannung von 10 V pro 1 cm Elektrodenabstand an, im Anschluss wird das Gel mittels des GelBiodoc2000 (Biorad) analysiert und zur Dokumentation fotografiert. Zur Isolierung von DNA-Fragmenten werden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten.

| Auftragspuffer, 6x | |
|---------------------------|-----------|
| Ficoll Typ 400 | 18 g |
| EDTA, 0,5 M; pH 8,0 | 24 ml |
| TBE, 10x | 60 ml |
| Bromophenolblau, 50 mg/ml | 3 ml |
| Xylencyanol, 50 mg/ml | 3 ml |
| H ₂ O | ad 100 ml |

Elektroelution

Die Elektroelution funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie die Gelelektrophorese. DNA Fragmente wandern aufgrund eines angelegten elektrischen Felds in Richtung der Kathode, in diesem Fall aus einem Agarosegelstück in den umgebenden Puffer.

Hierfür füllt man das ausgeschnittene Gelstück mit der gewünschten DNA-Bande und 800 µl 1xTBE-Puffer in einen Dialyseschlauch (Roth), verschließt diesen luftblasenfrei und eluiert 1,5 h bei 145 mA in einer mit 1xTBE gefüllten Elutionskammer. Anschließend pipettiert man die DNA-1xTBE-Lösung aus dem Dialyseschlauch in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß und fällt die DNA mit Ethanol (siehe Punkt 3.3.4).

3.3.4 Reinigung von Nukleinsäuren

Nukleinsäurelösungen enthalten häufig Rückstände von RNA, Proteinen oder Salzen. Für nachfolgende Versuche mit der DNA kann das ein Problem darstellen, deshalb versucht man, die DNA von diesen Rückständen zu befreien. Dazu gibt es verschiedene Möglichkeiten, zu den Aufreinigungsmöglichkeiten zählen zum Beispiel die Gelelektrophorese und Anionenaustauschersäulen, wie unter den Punkten 3.3.2.1 und 3.3.3 beschrieben. Eine weitere Möglichkeit ist die Alkoholfällung, welche gleichzeitig auch die Möglichkeit zur Konzentrierung der DNA bietet.

Bei der Alkoholfällung wird die wässrige DNA-Lösung mit 2,5 Volumenteilen 100% igem Ethanol und 1/10 Volumenteilen Natriumchlorid (5 M) oder Natriumacetat (3 M) versehen und 30 min bei -80°C oder über Nacht bei -20°C gelagert. Anschließend wird der Ansatz 15 min bei 15000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgossen und das Pellet mit 70% igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und in der Vakuumzentrifuge 5min getrocknet. Anschließend wird das DNA-Pellet bei 37°C in Wasser gelöst.

3.3.5 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wird photometrisch mit dem Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 (Peglab) bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm wird die optische Dichte (OD) der Nukleinsäurelösung bestimmt und daraus die Konzentration errechnet. Zusätzlich wird das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} ermittelt. Liegt der Wert zwischen 1,8 und 2,0 so zeigt das an, dass die Lösung keine Verunreinigung durch Proteine enthält.

Alternativ wird die Konzentration von Nukleinsäurelösungen durch eine Gelelektrophorese bestimmt. Es werden eine Verdünnungsreihe der zu bestimmenden Nukleinsäurelösung und der Größenstandard aufgetragen. Durch Vergleichen der Banden des Standards mit denen der Proben lässt sich die Konzentration der Probe abschätzen.

3.3.6 Enzymatische Modifikation von DNA

3.3.6.1 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind in Bakterien verbreitet vorkommende Endonukleasen, die an einer spezifischen Sequenz die doppelsträngige DNA schneiden. Es gibt eine Vielzahl solcher Enzyme, die in der Biotechnologie Anwendung finden. Die meisten dieser Enzyme erkennen palindromische Sequenzen von meist 4, 6 oder 8 Basenpaaren, schneiden innerhalb der Erkennungssequenz und produzieren dabei entweder gleichlange Schnittränder (*blunt ends*) oder Schnittränder mit komplementären Überhängen (*sticky ends*), meist jeweils mit einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxyl-Rest. Letztere sind für Klonierungszwecke besser geeignet, da hier die Ligation zuverlässiger funktioniert.

Anwendung finden diese Enzyme zur Überprüfung von Fragmentgrößen oder Sequenzen von Schnittstellen oder beim Klonieren zur Ligation verschiedener DNA-Fragmente.

Das Schneiden von DNA mittels Restriktionsenzymen bezeichnet man auch als Restriktionsverdau. Dieser kann für analytische Zwecke - hier wird für 1 h inkubiert - oder präparative Zwecke - man inkubiert über Nacht - verwendet werden.

Die verwendeten Restriktionsenzyme werden alle über NEB bezogen. Jedes Enzym hat bestimmte Anforderungen an ein optimales Milieu, es werden daher spezielle Puffer (ebenfalls NEB) und gegebenenfalls BSA verwendet. Je nach der eingesetzten DNA-Menge variiert die Menge des Enzyms und somit auch das gesamte Probenvolumen. Ein möglicher Ansatz für einen Restriktionsverdau sieht

wie folgt aus:

| Ansatz Restriktionsverdau | |
|----------------------------|-----------|
| DNA, 3 µg | x µl |
| NEB-Puffer, 10x | 10 µl |
| BSA, 10x | 10 µl |
| Enzym, ca 3 U bei 3 µg DNA | x µl |
| H ₂ O | ad 100 µl |

3.3.6.2 Dephosphorylierung

Nach dem Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen verbleiben an den geschnittenen DNA-Strängen ein 3'-OH-Überhang und ein 5'-Phosphatüberhang. Um leicht stattfindende Re-Ligationen zu verhindern und ein Insert einfügen zu können, wird mit Hilfe eines Enzyms, der *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIP, NEB), die 5'-Phosphatgruppe des Vektors entfernt. Dazu inkubiert man den Restriktionsansatz des Vektors mit 1 µl CIP (10U/µl) für 1 h bei 37°C. Die Restriktionsansätze werden im Anschluss über Agarosegele mit anschließender Elektroelution aufgereinigt. Das erhöht deutlich die Effizienz des nachfolgenden Ligationsschrittes.

3.3.6.3 Ligation

Bei der Ligation werden neue Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-OH-Phosphat-Ende und 3'-OH-Ende der doppelsträngigen DNA von Vektor und Insert geknüpft. Hierfür wird die T4-Ligase (NEB) verwendet.

Vektor und Insert werden vor der Ligation mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten, der Vektor ist dadurch linearisiert und wird zusätzlich dephosphoryliert, sie werden über ein Agarosegel und anschließende Elektroelution aufgereinigt und gefällt. Das Mengenverhältnis zwischen Vektor- und Insert-DNA bei der Ligation wird bestimmt durch das Längenverhältnis (in bp) von Insert zu Vektor, zusätzlich wird das Insert zur Vektor-DNA im Verhältnis 3:1 eingesetzt.

| Ligationsansatz | |
|------------------|----------|
| Vektor-DNA | x µl |
| Insert-DNA | x µl |
| T4-Puffer, 10x | 2 µl |
| T4-Ligase | 1 µl |
| H ₂ O | ad 20 µl |

Ligiert wird bei 16°C über Nacht im Wasserbad, die Inaktivierung der T4-Ligase erfolgt durch Inkubation bei 65°C für 10 min, im Anschluss daran wird der Ligationsansatz bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

3.3.7 Sequenzierung von DNA

Unter einer Sequenzierung versteht man die Analyse der Basenabfolge in Nukleinsäuren. Sequenziert wird nach PCR-Schritten, wenn die Produkte zur Ligation verwendet werden sollen, oder zur Überprüfung des fertig gestellten Konstrukts. Alle Sequenzierungen werden von der Firma MWG Eurofins, Ebersberg übernommen. Primer für die Sequenzierung werden mit Hilfe des Programms DNA-Man 5.0 (Lynnon Biosoft) erstellt.

3.4 Zellkultur

3.4.1 Kultivierung von HEK293T-Zellen und Aufrechterhaltung der Zelllinie

Alle Arbeitsschritte wurden unter einer Sterilarbeitsbank (Lamin Air HB, Heraeus) durchgeführt. Die Zellen werden in einem Brutschrank (Binder) bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt. Für die Zellkulturexperimente wurden sogenannte HEK293T Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um menschliche embryonale Nierenzellen (*human embryonic kidney cells*). Die Zellen wachsen adhärent als „Monolayer“.

Zellen ausbringen

Zellen aus Gefrierstocks werden schnell im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, in 9 ml Zellkulturmedium (Quantum 286, PAA) resuspendiert, in ein Falcon-Röhrchen (15 ml, Corning) überführt und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und man

resuspendiert das Zellpellet in 2 ml Quantum 286 mit Penicillin und Streptomycin (Pen/Strep, Invitrogen, sterilfiltriert) und überführt die Suspension in eine Zellkulturflasche (75 cm², TPP) mit 13 ml vorgelegtem Quantum 286 und Pen/Strep. Durch kreisende Bewegungen verteilt man die Zellen und inkubiert sie im Brutschrank.

Die Zellen werden bei einer Konfluenz von 100 % passagiert. Hierfür wäscht man die Zellen zweimal mit 37°C warmem PBS, gibt dann 3 ml angewärmtes EDTA-Trypsin dazu und stellt die Zellen für 5 min in den Brutschrank. Das Trypsin bewirkt das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche, der Vorgang wird durch Zugabe von 5 ml Zellkulturmedium gestoppt. Die Zellsuspension wird mit einer Pipette (Stripette, Corning) aufgenommen, in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt und bei 1000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Den Überstand saugt man ab, resuspendiert das Zellpellet in Medium und verteilt die Zellsuspension in gewünschter Verdünnung auf neue Zellkulturflaschen.

| Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), 1x | |
|---|-------------------|
| NaCl | 40 g |
| KCl | 1 g |
| Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O | 7,2 g |
| KH ₂ PO ₄ | 1,2 g |
| H ₂ O | ad 5000 ml |
| | pH 7,4 einstellen |

Werden die Zellen nicht mehr benötigt lassen sie sich mit möglichst niedrigen Passagezahlen einfrieren. Dazu werden die Zellen zweimal mit warmem PBS gewaschen und anschließend trypsiniert. Nach 5 Minuten gibt man Medium hinzu, zentrifugiert die Suspension 5 min bei 1000 rpm und saugt den Überstand ab. Das Zellpellet wird in 1 ml Einfrierlösung (Quantum 286, DMSO; 9:1) resuspendiert und in einem Cryo-Röhrchen (Nunc) zunächst 3 h bei -20°C, dann 24 h bei -80°C eingefroren, die weitere Lagerung erfolgt in einem Tank mit flüssigem Stickstoff.

Für die Experimente in dieser Arbeit werden HEK293T-Zellen mit den Passagezahlen von 12 bis 18 verwendet.

3.4.2 Transiente Transfektion

Als Transfektion wird das Einbringen von DNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. Dies kann man über mehrere Wege erreichen. Hier wird die Transfektion mittels kationischer Lipide, auch Lipofektion genannt, durchgeführt.

Diese kationischen Lipide bilden in wässrigem Milieu Mizellen und Liposomen, die DNA bindet daran und es entstehen Komplexe, die mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen werden.

Die Zellen sollten für die Transfektion eine Konfluenz von ca. 70 % haben, als Anzeichen, dass sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Das ist wichtig für optimale Transfektionsergebnisse, da während der Mitose die Wahrscheinlichkeit am größten ist, dass die transfizierte DNA in den Zellkern gelangt.

Die Zellen für die Transfektion (in 75 cm²-Flaschen) werden vorsichtig zweimal mit 10 ml auf 37°C erwärmtem PBS gewaschen, danach gibt man 15 ml antibiotikafreies Medium dazu und stellt die Zellkulturflasche zurück in den Brutschrank (37°C, 5% CO₂). Im nächsten Schritt werden die DNA und das Transfektionsreagenz vorbereitet. 14 µg der DNA werden zu 700 µl antibiotikum- und serumfreiem Medium (Opti-MEM reduced, Invitrogen) gegeben, durch einmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren werden die Substanzen vermischt. 42 µl des Transfektionsreagenz (Metafectene Pro, Biontex) werden mit 700 µl Medium (Opti-MEM reduced) durch einmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Die beiden Lösungen werden gemischt und für 15 bis 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluss pipettiert man 1,4 ml des DNA-Lipid-Komplex-Gemisches zu den Zellen und mischt es durch vorsichtiges Schwenken. Die Zellen werden weiter bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, nach 5 bis 7 Stunden wechselt man auf antibiotikumhaltiges Medium. Nach 24 h bis 72 h werden die Zellen für weitere Experimente verwendet.

3.4.3 Ernte der Zellen

Die Zellen werden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, wobei man darauf achten muss, sie durch das Zugeben des PBS nicht abzulösen. Es wird nochmals 5 ml kaltes PBS dazugegeben und die Zellschicht mit einem Zellschaber abgeschabt. Die Zellsuspension nimmt man mit einer 10 ml Stripette auf und überführt sie in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen, welches man 5 min bei 1000 rpm und 4°C

abzentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.4.4 Beschichtung von Deckgläschen mit Polylysin

Deckgläschen mit einem Durchmesser von 12 mm oder 24 mm (Menzel) werden zur Vorbereitung für eine Beschichtung mit Polylysin autoklaviert und in eine 6-well-Platte (Corning) gelegt. 10 μl Polylysin (Biochrom) werden mit 5 ml autoklaviertem Wasser gemischt und auf die Plättchen gegeben, sodass diese vollständig bedeckt sind. Anschließend wird für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Polylysinlösung wird abgesaugt und die Plättchen werden einmal mit 1xPBS gewaschen. Die Zellzahl wird in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt und die gewünschte Zahl an Zellen kann auf die Plättchen ausgesät werden.

3.4.5 Fixierung der Zellen

Auf Deckgläschen ausgesäte Zellen werden zweimal mit 1 x PBS gewaschen und 10 min bei Raumtemperatur mit 4% igem PFA inkubiert. Im Anschluss werden sie nochmals zweimal mit 1 x PBS gewaschen, dann werden sie mit einem Tropfen Aquatex (Merck) auf einem Objektträger (Menzel) fixiert und über Nacht getrocknet. Die so fixierten Zellen werden abgedunkelt bei 4°C aufbewahrt.

3.4.6 Fluoreszenzmikroskopie von HEK293T-Zellen

Für die fluoreszenzmikroskopischen Versuche werden die Zellen 24 h nach erfolgter Transfektion auf polylysinbeschichtete 24 mm Deckgläschen gesplittet. In das Medium werden 500 nM Shield-1 gegeben. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Shield-1-Zugabe werden die Zellen auf Objektträgern fixiert. Als Mikroskop wird ein Zeiss LSM 510 Laser Scan Microscope verwendet.

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Proteingewinnung aus HEK293T-Zellen

Die Proteingewinnung erfolgt über den sogenannten SDS-Aufschluss. Dazu werden HEK293T-Zellpellets auf Eis aufgetaut. Zu jedem Pellet gibt man 0,5 ml Tris SDS-Puffer, 0,4 µl Calpaininhibitor I, 0,4 µl Calpaininhibitor II (beide Roche), 0,5 µl PMSF 200 mM (Phenylmethylsulfonylfluorid; Fluka) und 1 µl Protease Inhibitor Mixture (Sigma). Das gelöste Pellet wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 10 min bei 95°C inkubiert und dabei in regelmäßigen Abständen homogenisiert. Im Anschluss zentrifugiert man die Probe 10 min bei 15000 rpm und 4°C. Der Überstand wird abgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

| Tris SDS-Puffer | |
|------------------|----------|
| Tris (pH 7,8) | 500 µl |
| SDS, 10 % | 2 ml |
| H ₂ O | ad 10 ml |

3.5.2 Quantitative Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt über das BCA Protein Assay (Pierce). Dieser Test beruht darauf, dass zweiwertige Kupferionen in alkalischem Milieu durch Proteine zu einwertigen Kupferionen reduziert werden (Biuret-Reaktion) und diese dann violettfarbene Komplexe mit je zwei Bicinchoninsäure-Molekülen bilden. Photometrisch misst man die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die gemessene Absorption ist direkt proportional zum Proteingehalt der Probe. Um von gemessener Absorption auf die Proteinkonzentration schließen zu können, erstellt man eine BSA-Standardreihe (0,5-5 µg). Aus den Werten der Messung und den bekannten Proteinkonzentrationen lassen sich eine Standardkurve mit zugehöriger Gleichung erstellen, über die die Proteinkonzentration aus der jeweiligen Absorption errechnet werden kann.

Die Proteinproben werden auf Eis aufgetaut, anschließend erstellt man eine Verdünnungsreihe, wobei Standard und Proteinverdünnungen in Doppelbestimmung angesetzt werden. Jeweils 50 µl werden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, danach wird zügig jeweils 200 µl BCA-Reagenz (BCA

Protein Assay Reagent I und II, 50:1; Pierce) dazu pipettiert und bei 60°C für 45 min inkubiert. Anschließend werden aus jedem Reaktionsgefäß 200 µl auf eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Absorption bei 540 nm in einem Titertek Multiskan MCC/340 Photometer gemessen.

3.5.3 Western Blot-Analyse

Um isolierte Proteine qualitativ zu bestimmen, verwendet man die Western Blot Protein-Detektion. Hierbei werden zunächst die isolierten Proteine über eine Gelelektrophorese aufgetrennt, anschließend vom Gel auf eine Membran übertragen (das eigentliche „Blotting“) und schließlich werden die Proteine, bzw. das gesuchte Protein, mit Antikörpern detektiert.

Auftrennung der Proteine mittels SDS-Page (Polyacrylamid Gelelektrophorese)

Zur Probenvorbereitung werden die Proteinlösungen mit einem SDS- und DTT-haltigen Puffer (4 x Lämmli-Puffer) auf 95°C für 5 min erhitzt und bis zum Auftragen auf Eis gestellt. Dies führt zu einer Denaturierung der Proteine, DTT zerstört dabei Disulfidbrücken, während SDS eine Auflösung von Sekundär- und nicht auf Disulfidbrücken basierender Tertiärstruktur und eine Negativladung der Proteine proportional zu ihrer Masse bewirkt. Damit stellt man sicher, dass die Auftrennung der Proteine während der Gelelektrophorese allein aufgrund ihrer Massen erfolgt und nicht aufgrund der Faltung der Proteine.

| Lämmli-Probenpuffer, 4x | |
|--------------------------------|----------|
| TrisCl, 1 M, pH 6,7 | 10 ml |
| DTT | 2 mg |
| SDS, 20 % | 12,5 ml |
| Bromophenolblau | 20 mg |
| Glycerin | 20 ml |
| H ₂ O | ad 50 ml |

Zur Herstellung eines SDS-Polyacrylamid-Gels wird zunächst ein sogenanntes Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen, die in eine Gelapparatur (Biorad) eingespannt sind. Das Gel wird mit 100 %igem Ethanol überschichtet, um eine gerade Kante zu erzeugen. Nach ca. 30 min ist das Gel fest, der Ethanol wird abgegossen, man gießt das Sammelgel darauf und steckt einen Kamm hinein, um Einfülltaschen zu bilden.

Das Sammelgel hat eine geringere Polyacrylamidkonzentration und damit größere Poren, und einen

niedrigeren pH-Wert. So erreicht man das „Sammeln“ der Proteine in einer schmalen Bande. Diese schmale Bande kann sich im folgenden Trenngel mit höherer Polyacrylamidkonzentration und höherem pH-Wert gut auftrennen, der Größe der jeweiligen Proteine entsprechend.

| TrisCl/SDS pH 8,8; 4x | | TrisCl/SDS pH 6,8; 4x | |
|-----------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Tris base | 18,2 g | Tris base | 3,02 g |
| SDS | 0,4 g | SDS | 0,2 g |
| H ₂ O | ad 80 ml | H ₂ O | ad 40 ml |
| | mit HCl pH 8,8 einstellen | | mit HCl pH 6,8 einstellen |
| | ad 100 ml | | ad 50 ml |

| Trenngel, 10 % | | Sammelgel | |
|----------------------|---------|-----------------------|----------|
| Acrylamid, 29:1 | 1,67 ml | Acrylamid 29:1 | 325 µl |
| 4x TrisCl/SDS pH 8,8 | 1,25 ml | 4x TrisCl/SDS, pH 6,8 | 625 µl |
| H ₂ O | 2,08 ml | H ₂ O | 1,525 ml |
| TEMED | 5 µl | TEMED | 3 µl |
| APS 20 % | 12,5 µl | APS 20% | 6 µl |

Das Gel wird in eine Gelkammer (MiniProtean3Cell, Biorad) eingesetzt, die Kammer wird mit 1x SDS-Elektrophorese-Puffer gefüllt, die Proteinproben und 5 µl Proteingrößenstandard (Precision Plus Protein Standard, Biorad) werden in die Probenaschen gefüllt. Die Auftrennung der Proteine erfolgt zunächst für 30 min bei 50 V und anschließend für ca. 60 min bei 120 V.

Western Blot

Der Transfer der aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Page-Gel auf eine PVDF-Membran (Porengröße 0,45 µm, Immobilon-P, Milipore) erfolgt als „semidry-Blotting“.

Hierfür werden sowohl 3 mm dickes Whatman Filterpapier (Schleicher&Schüll) als auch die PVDF-Membran auf die gleiche Größe wie das Gel zugeschnitten. 3 Filterpapiere trinkt man in dem Anodenpuffer I und legt diese auf die Anodenplatte der Blotting-Apparatur (Semi-dry Blotter Multiphor II, Pharmacia LKB). 2 Filterpapiere werden in Anodenpuffer II getränkt und genau auf die bereits auf der Anodenplatte liegenden Papiere gelegt. Als nächstes gibt man die in Methanol getränkte PVDF-Membran darauf. Auf die Membran platziert man nun das SDS-PAGE-Gel und als letztes folgen 5 in Kathodenpuffer getauchte Filterpapiere. Wichtig ist, die einzelnen Schichten

möglichst exakt und luftblasenfrei übereinander zu legen. Dann legt man die Kathodenplatte darauf und beschwert das Ganze gleichmäßig. Für eine Stunde wird eine Stromstärke von 0,8 mA/cm² angelegt und die Proteine werden auf die Membran übertragen.

| Anodenlösung 1 | | Anodenlösung 2 | |
|----------------------------|------------|----------------------------|------------|
| Tris base | 36,3 g | Tris base | 3,03 g |
| Methanol | 200 ml | Methanol | 200 ml |
| H ₂ O | ad 1000 ml | H ₂ O | ad 1000 ml |
| mit HCl pH 10,4 einstellen | | mit HCl pH 10,4 einstellen | |

| Kathodenlösung | |
|---------------------------|------------|
| 6-Aminohexansäure | 5,2 g |
| Tris base | 3,03 g |
| Methanol | 200 ml |
| H ₂ O | ad 1000 ml |
| mit HCl pH 7,6 einstellen | |

Detektion der Proteine

Die Detektion der gewünschten Proteine erfolgt mittels Antikörpern. Man verwendet einen Primärantikörper, der spezifisch an dem gesuchten Protein bindet, und einen sekundären Antikörper, der am Fc-Teil des Primärantikörpers bindet. Der sekundäre Antikörper ist an das Enzym Meerettich-Peroxidase gekoppelt, welches eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert. Die entstehende Lichtemission wird auf einem Photofilm sichtbar gemacht. Dadurch, dass mehrere sekundäre Antikörper an einem Primärantikörper binden können, wird das Signal zusätzlich verstärkt.

Um eine unspezifische Bindung der Antikörper auf der Membran zu verhindern, wird die geblottete Membran über Nacht in einer 1x TBST+3% BSA Blockinglösung bei 4°C inkubiert.

Der primäre Antikörper wird 1:500 in einer 1xTBST+5% BSA-Lösung verdünnt und die Membran wird am folgenden Tag in dieser Lösung 1,5 h auf dem Taumelmischer (Neolab) bei RT inkubiert und im Anschluss dreimal für jeweils 10 Minuten mit 1xTBST+1% BSA-Lösung gewaschen. Als nächstes wird die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Taumelmischer mit dem sekundären Antikörper inkubiert, der in 1xTBST gelöst ist. Dann wird zweimal 5 Minuten mit 1xTBST+1% BSA und zweimal für 10 Minuten mit 1xTBST gewaschen.

Für die Chemilumineszenzreaktion wird die Membran eine Minute mit dem Western Lightning Chemiluminescence Reagent (Perkin Elmer, Chemiluminescence Reagent und Oxidizing Reagent, 1:1)

inkubiert, in Klarsichtfolie eingeschlagen und in eine Photokassette gelegt. In der Dunkelkammer legt man einen Film (Hyperfilm ECL, GE) auf. Anschließend wird der Film in der Entwicklermaschine Curix 60 (AGFA) entwickelt.

3.6 Elektrophysiologische Methoden

3.6.1 Versuchsaufbau und verwendete Geräte

Alle Messungen werden bei Raumtemperatur durchgeführt, wodurch die Hypoxietoleranz der Zellen erhöht wird. Das 12 mm Glasplättchen mit den zu untersuchenden Zellen wird in eine Ableitkammer gelegt und die Zellen werden ständig mit Extrazellulärlösung umspült. Die Extrazellulärlösung (s. unten) entspricht in ihrer Zusammensetzung der Ionenkonzentrationen des extrazellulären Milieus und ist mit Sauerstoff angereichert. Die Flussrate der Pumpe (Ismatech) beträgt 0,3-0,5 l/min.

Die Pipetten werden aus dünnwandigen Borosilikatglas-Kapillaren (Hugo-Sachs Elektronik-Harvard Apparatus) mit einem Innendurchmesser von 1,17 mm und einem Außendurchmesser von 1,5 mm mit Hilfe eines horizontalen Pipettenziehgeräts (DMZ-Universalpuller, Zeitz) hergestellt und hitzepoliert. An der Spitze beträgt der Durchmesser der Pipetten 1 μm , ihr Widerstand liegt zwischen 4 und 8 M Ω . Die Pipette wird mit einer Lösung gefüllt, die in ihrer Zusammensetzung dem intrazellulären Milieu entspricht (Intrazellulärlösung, s. unten), und in eine Pipettenhalterung eingespannt. Über eine Elektrode aus Silber/Silberchlorid ist die Patchpipette mit Intrazellulärlösung mit dem Patch-Clamp-Verstärker (SEC 10L, NPI electronic) verbunden. Durch eine Badelektrode aus Silber/Silberchlorid in der Extrazellulärlösung wird bei Eintauchen der Patchpipette in die Extrazellulärlösung der Stromkreis geschlossen. Ein Analog-Digital-Wandler (ITC-16 Computer Interface, Instrutech Corp.) dient zur Aufnahme der Daten über einen Computer.

Als Mikroskop dient ein Axioskop FS (Zeiss) mit Wasserimmersionsobjektiv (60-fach, numerische Aperatur 0,9; Olympus), eine am Mikroskop angebrachte Infrarot-Videokamera (Hamamatsu Photonics) ermöglicht die Darstellung des Bildes auf dem Computerbildschirm.

Das Mikroskop, die Ableitkammer und die Halterung für die Mikropipette sind auf einem schwingungsgedämpften Tisch montiert und über Mikromanipulatoren (Luigs und Neumann) unabhängig von einander in allen drei Raumrichtungen beweglich. Dieser Versuchsaufbau ist durch einen Faraday'schen Käfig abgeschirmt und geerdet.

Die Identifizierung von transfizierten Zellen gelingt mittels eines Fluoreszenzsignals bei einer

Anregungs-Wellenlänge von 488 nm (XC Polychrome V; T.I.L.L. Photonics), welches durch eine High Speed CCD Kamera (Retiga-2000RV, Qimaging) registriert und durch das Programm TillVision (T.I.L.L. Photonics) aufgenommen und dargestellt wurde.

| Intrazellulärlösung, pH 7,4 | | Extrazellulärlösung, pH 7,4 | |
|-----------------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------|
| 130 mM | KCl | 135 mM | NaCl |
| 5 mM | NaCl | 5,4 mM | KCl |
| 2 mM | MgCl ₂ | 1,8 mM | CaCl ₂ |
| 5 mM | EGTA | 1 mM | MgCl ₂ |
| 0,2 mM | MgATP | 10 mM | Glucose |
| 5 mM | HEPES | 5 mM | HEPES |

3.6.2 Verwendete Zellen, Vorbereitung der Zellen

Für die Experimente werden HEK293T-Zellen verwendet. Die Zellen werden nach dem unter Punkt 3.4 beschriebenen Protokoll kultiviert und transfiziert. 24 h nach Transfektion werden sie in 12 well-Platten auf 12 mm Deckgläschen gesplittet, die vorher mit Polylysin (siehe Punkt 3.4.4) beschichtet wurden. Weitere 24 h später werden die elektrophysiologischen Experimente durchgeführt.

3.6.3 Patch Clamp-Experimente zur Einzelzelleitung

Die Patch Clamp-Methode ist eine der wichtigsten elektrophysiologischen Techniken, sie wurde 1976 von Neher und Sakmann entwickelt. Neben der Möglichkeit, kleine Ströme durch einzelne Ionenkanäle zu messen, lässt sich auch die elektrische Aktivität der gesamten Zelle darstellen. Dies erfolgt in sogenannter Ganzzell (*whole-cell*) -Konfiguration (Blanton et al., 1989). Alle elektrophysiologischen Messungen im Rahmen dieser Arbeit erfolgten in der *whole-cell*-Konfiguration.

Die Zellen befinden sich in einer Extrazellulärlösung. Unter mikroskopischer Sicht nähert man sich mit einer Mikropipette der zu patchenden Zelle. In der Pipette herrscht zunächst ein leichter Überdruck, der an der Zelloberfläche abgelassen und durch einen leichten Unterdruck ersetzt wird. Das führt dazu, dass die Zellmembran mit der Mikropipettenspitze dicht abschließt und der Widerstand der Pipette in den Gigaohmbereich („Gigaseal“) steigt. Diese Konfiguration nennt man *cell-attached*-Modus. Wird nun ein höherer Unterdruck an die Pipette angelegt, wird dadurch das Membranstück

innerhalb der Pipettenöffnung zerstört und eine Verbindung zwischen Pipetten-Innerem und Intrazellularraum geschaffen: die *whole cell*-Konfiguration. Hier ist es möglich, den Strom zu messen, der über alle Kanäle der Zellmembran vermittelt wird.

Ruhemembranpotential

Das Ruhemembranpotential der Zelle wird im *bridge*-Modus am Verstärker abgelesen. Alternativ kann das Ruhemembranpotential auch durch Auswertung der Strom-Spannungskurve zum Zeitpunkt der ausbleibenden Strominjektion bestimmt werden.

Strom-Spannungsbeziehung

Hierzu werden Strompulse mit einer Pulsdauer von 500 ms im Abstand von 2 s und einer Stromstärke von -90 pA bis +130 pA ($\Delta I = 10$ pA) appliziert und die zugehörigen Änderungen des Membranpotentials registriert. Die Messungen erfolgen im sogenannten *current-clamp*-Modus, das bedeutet, dass der fließende Strom vorgegeben wird und das resultierende Potential sowie die Potentialänderungen zwischen Pipette und Badelektrode gemessen und aufgezeichnet werden.

3.6.4 Auswertung der Daten aus den elektrophysiologischen Experimenten

Die Applikation von Strompulsen sowie die Datenaufzeichnung erfolgt über einen Computer mit einer entsprechenden Software (HEKA Pulse, Heka Elektronik, Lambrecht). Zusammenfassung und Auswertung sowie statistische Analyse der Daten erfolgt mit Hilfe von Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corp.). Die Darstellung der Werte erfolgt als Mittelwert mit zugehörigem Standardfehler (Mittelwert \pm Standardfehler). Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen werden mittels t-Test auf signifikante Unterschiede überprüft. (Signifikanzniveau: $p < 0,05$).

4 Ergebnisse

4.1 Hergestellte Vektorkonstrukte

4.1.1 Expressionsplasmide für *in vitro*-Versuche

Um die Funktionsweise des mit der destabilisierenden Domäne versehenen Kir2.1-Kanals zunächst *in vitro* zu testen, wurden verschiedene Expressionsplasmide hergestellt. Es wurde die cDNA des humanen Kir2.1 Kanals (*KCNJ2*) verwendet (IOH35746, ImGene) sowie das DD-ZsGreen1 Reporter System (Clontech). Dabei handelt es sich um die destabilisierende Domäne DD, welche zusätzlich mit einem grün fluoreszierenden Protein (GFP) gekoppelt ist. Die cDNA des DD-ZsGreen1-Tags wurde an das N-terminale Ende der cDNA des *KCNJ2*-Genes kloniert. Es wurde beschrieben, dass sowohl eine N- als auch eine C-terminale Anfügung der destabilisierenden Domäne an das gewünschte Protein möglich ist (Chu et al., 2008). Abbildung 4-1 legt als Übersicht schematisch die Klonierungsstrategie zur Erstellung der verschiedenen Vektoren dar.

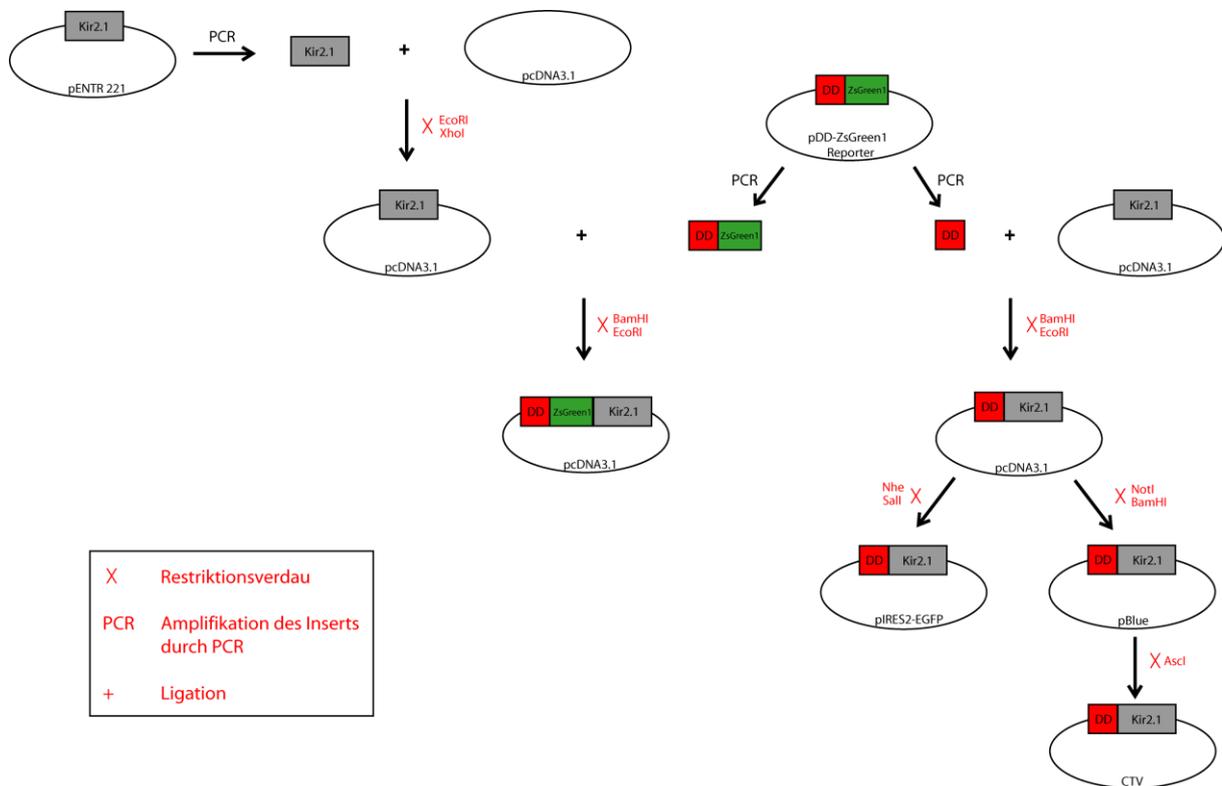


Abbildung 4-1 Übersichtsdarstellung der Klonierungsstrategie

4.1.1.1 DD-ZsGreen1-Kir2.1 in pcDNA 3.1

Zunächst wurde die cDNA-Sequenz des Kir2.1-Kanals mittels PCR amplifiziert. Durch die verwendeten Primer hu_Kir_for und hu_Kir_rev wurden am 5'-Ende der Kir2.1-Sequenz eine EcoRI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine XhoI-Schnittstelle eingefügt. Zudem wurde das Startcodon ATG des *KCNJ2*-Gens entfernt. Über die neuen Schnittstellen EcoRI und XhoI wurde die *KCNJ2*-Sequenz in das Plasmid pcDNA3.1 (Invitrogen) ligiert. Im folgenden Schritt wurde die cDNA-Sequenz des DD-ZsGreen1-Tags ebenfalls mittels PCR amplifiziert. Durch das Primerpaar pDD-for und pDD-rev wurde das Stop-Codon TGA aus der ZsGreen1-Sequenz entfernt. Am 5'-Ende der DD-Sequenz wurde zusätzlich noch eine KOZAK-Sequenz eingefügt, welche wichtig für die Initiation der Translation ist. Als Schnittstellen wurden eine BamHI-Schnittstelle am 5'-Ende sowie eine EcoRI-Schnittstellen am 3'-Ende des DD-ZsGreen1-Tags eingefügt. Über diese Schnittstellen wurde das DD-ZsGreen1-Insert in das Kir2.1-pcDNA3.1 Konstrukt eingefügt.

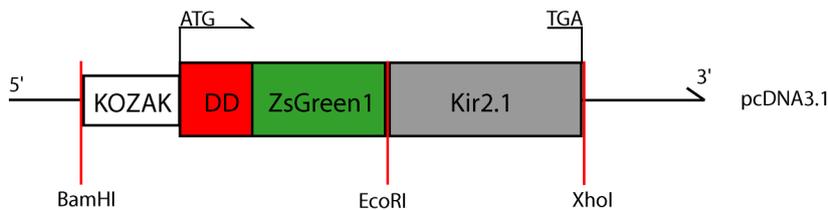


Abbildung 4-2 Schematische Darstellung des Vektors DD-ZsGreen1-Kir2.1 in pcDNA3.1

Bei dem anschließenden Restriktionsverdau mit BamHI und XhoI zeigten sich die erwarteten Banden bei 5,4 kb und 2,3 kb in der Gelelektrophorese (siehe Abbildung 4-3). Durch eine Sequenzanalyse konnte die erfolgreiche und fehlerfreie Insertion nachgewiesen werden.

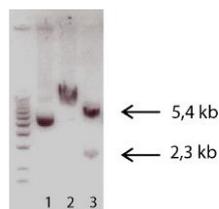


Abbildung 4-3 Restriktionsverdau der Klonierung DD-ZsGreen1 in pcDNA3.1: Bande 1 zeigt das ungeschnitten aufgetragene Plasmid, für Bande 2 wurde der Klon mit BamHI linearisiert, Bande 3 zeigt den Verdau mit BamHI und XhoI

4.1.1.2 DD-Kir2.1 in pcDNA3.1

Um eventuelle Störungen der Funktionalität und Konformation des Ionenkanals durch das GFP auszuschließen, wurde ein Plasmid ohne ZsGreen1 (GFP) hergestellt. Dazu wurde die cDNA des DD-ZsGreen1 Reporter Systems mittels PCR amplifiziert, durch die verwendeten Primer pDD-for und nurDD-rev wurde der ZsGreen1-Anteil entfernt. Als Schnittstellen wurden am 5'-Ende wieder eine

BamHI-Schnittstelle sowie am 3'-Ende eine EcoRI-Schnittstelle eingefügt. Über diese beiden Schnittstellen wurde die destabilisierende Domäne ohne GFP in das Plasmid Kir2.1 in pcDNA3.1 ligiert.

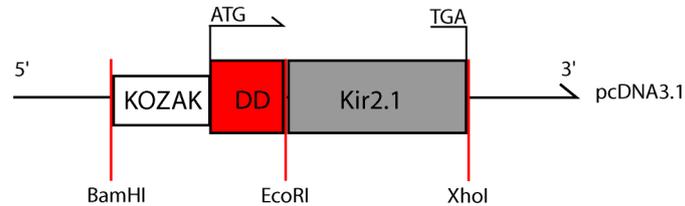


Abbildung 4-4 Schematische Darstellung des Vektors DD-Kir2.1 in pcDNA3.1

Der Klonierungserfolg wurde mittels Restriktionsverdau und Gelelektrophorese überprüft. Wie in Abbildung 4-5 dargestellt, zeigte der Klon in der elektrophoretischen Auftrennung die erwarteten Banden bei 1,6 kb und 5,4 kb. Durch eine Sequenzanalyse konnte eine fehlerhafte Insertion ausgeschlossen werden.

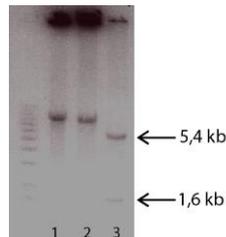


Abbildung 4-5 Restriktionsanalyse des Plasmids DD-Kir2.1 in pcDNA3.1: Bande 1 zeigt den ungeschnittenen Vektor, bei Bande 2 wurde das Ligationsprodukt mit EcoRI linearisiert und bei Bande 3 wurde mit BamHI und XhoI verdaut

4.1.1.3 DD-Kir2.1 in pIRES2-EGFP

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurde das Insert DD-Kir2.1 in das Plasmid pIRES2-EGFP (Clontech) kloniert, um einfach zwischen transfizierten und nicht transfizierten Zellen unterscheiden zu können.

Hierzu wurde das Konstrukt DD-Kir2.1 aus dem Vektor DD-Kir2.1 in pcDNA3.1 mittels PCR amplifiziert. Durch das Primerpaar nurDD_Kir_cut_for und nurDD_Kir_cut_rev wurden neue Schnittstellen an das Insert angefügt: NheI an das 5'-Ende und Sall an das 3'-Ende des DD-Kir2.1-Inserts. Über diese Schnittstellen wurde das DD-Kir2.1-Insert in das pIRES-Plasmid eingefügt.

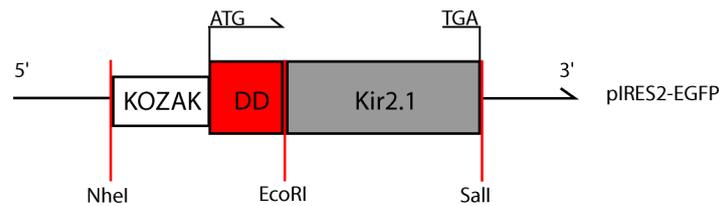


Abbildung 4-6 Schematische Darstellung des Vektors DD-Kir2.1 in pIRES2-EGFP

Der Klonierungserfolg wurde mit einem Restriktionsverdau überprüft. Verwendet wurden die Restriktionsenzyme NheI und Sall. Ein Klon besaß in der elektrophoretischen Auftrennung die richtigen Bandengrößen von 1,6 kb (Insert) und 5,3 kb (pIRES2-EGFP-Vektor).

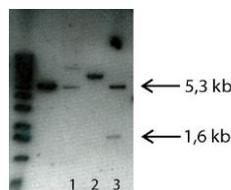


Abbildung 4-7: Gelelektrophorese der Klonierung der Konstrukts DD-Kir2.1 in pIRES: Bei Bande 1 wurde das Klonierungsprodukt ungeschnitten aufgetragen, für Bande 2 wurde der Vektor linearisiert mit NheI und bei Bande 3 wurde der Vektor geschnitten mit NheI und Sall. Hier zeigten sich die richtigen Bandengrößen von 1,6 kb (Insert) und 5,3 kb (Plasmid).

Durch eine Sequenzierung wurde die Fehlerfreiheit der Basenabfolge überprüft und bestätigt.

4.1.2 Gentergeting-Vektoren

Es wurden zwei Gentergeting-Vektor mit dem DD-getaggten Kaliumkanal Kir2.1 erstellt.

Das DD-Kir2.1-Konstrukt soll an dem sogenannten ROSA26 Locus (Chromosom 6) in das Genom integriert werden. Von diesem Genort weiß man, dass er ubiquitär sowohl in embryonalen als auch adulten Stadien exprimiert wird. Man nimmt an, dass der Genort für drei nicht translatierte Genprodukte kodiert, deren Funktionen noch nicht bekannt sind. Eine Zerstörung der Genprodukte durch Einfügen eines Konstrukts scheint aber keine Auswirkungen auf den Organismus zu haben. Zudem ist der Genort gut zugänglich, für die homologe Rekombination liegen hohe Erfolgsquoten vor (Friedrich et al., 1991; Hohenstein et al., 2008; Soriano, 1999; Zambrowicz et al., 1997).

Zur Erstellung des Gentergeting Vektors wurden das CTV- und das STOP-eGFP-ROSA26TV-Plasmid von Klaus Rajewsky, MDC Berlin-Buch, verwendet (siehe 3.1.4).

Zunächst wurde das Insert DD-Kir2.1 mittels PCR unter Verwendung des Primerpaares ROSA-for und ROSA-rev aus dem Vektor DD-Kir2.1 in pcDNA3.1 amplifiziert und mit neuen Schnittstellen versehen. Am 5'-Ende wurde eine NotI-Schnittstelle und eine Ascl-Schnittstelle eingefügt, am 3'-Ende eine Ascl-

und eine BamHI-Schnittstelle. Über die NotI- und BamHI-Schnittstellen wurde das Konstrukt in pBluescript II KS+ (Stratagene) zwischenkloniert.

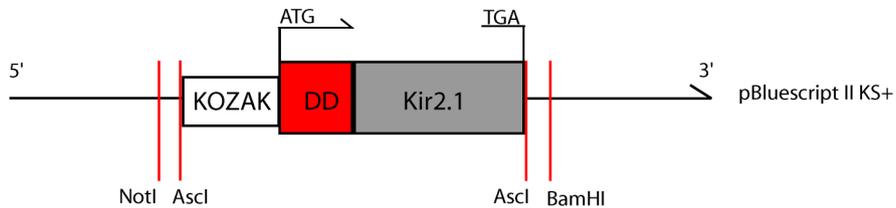


Abbildung 4-8 Zwischenklonierung des Inserts DD-Kir2.1 in pBluescript II KS+

Anschließend erfolgten ein Restriktionsverdau mittels Ascl und die Ligation des Inserts in das CTV-Plasmid beziehungsweise in das STOP-eGFP-ROSA26TV-Plasmid. Exemplarisch ist in Abbildung 4-9 die Ligation in das CTV-Plasmid dargestellt.

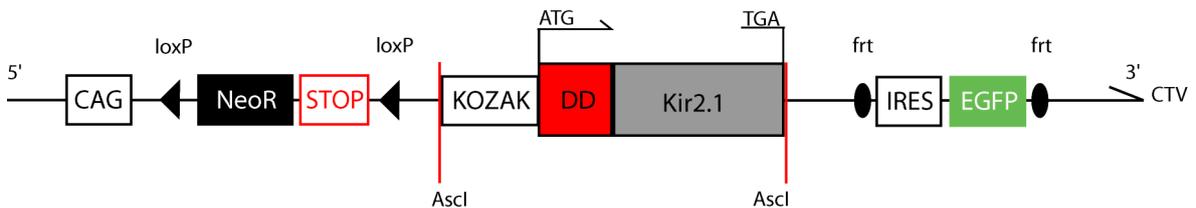


Abbildung 4-9 Schematische Darstellung des Gentargetingvektors DD-Kir2.1 in CTV

Mittels Restriktionsverdau mit Ascl wurde die erfolgreiche Integration des Inserts in den Vektor überprüft.

Sowohl für die Ligation in das CTV-Plasmid als auch in das Plasmid STOP-eGFP-ROSA26TV zeigt die Gelelektrophorese die richtigen Größen der Banden: 16,1 kb und 1,6 kb für die Ligation in CTV und 14,3 kb und 1,6 kb bei der Ligation in das Plasmid STOP-eGFP-ROSA26TV (siehe Abbildung 4-10).

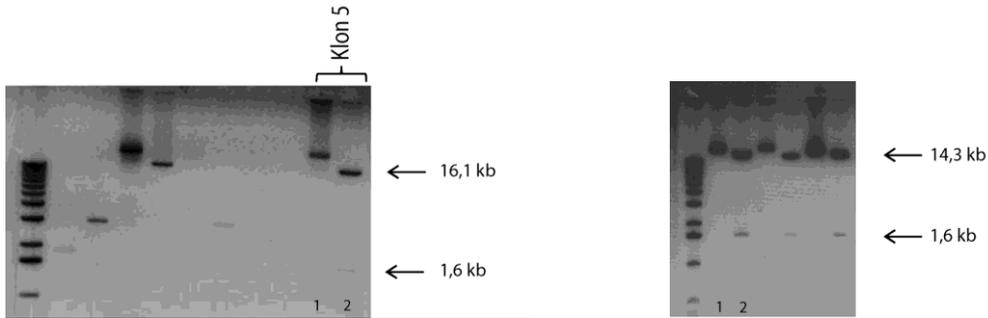


Abbildung 4-10 Restriktionsverdau der Klonierung der Gentargetingvektoren In (1) wurden jeweils nicht geschnittene Proben aufgetragen, für (2) wurde das Plasmid mit *Ascl* verdaut. Im linken Bild besitzt der Klon 5 die richtigen Bandengrößen und zeigt die erfolgreiche Insertion in das Plasmid CTV an. Im rechten Bild haben alle Klone die richtigen Größen und zeigen die erfolgreiche Insertion in das Plasmid STOP-eGFP-ROSA26TV.

Da das Insert nur über eine Schnittstelle (*Ascl*) und somit in 5'- als auch in 3'-Richtung eingefügt werden konnte, wurde durch Ansequenzierung die richtige Orientierung (5'→3') des Inserts in der cDNA der Klone überprüft. Der Klon mit richtiger Orientierung des Inserts wurde vervielfältigt. Das Gentargetingprodukt wurde durch eine vollständige Sequenzanalyse überprüft. Es konnte eine fehlerfreie Insertion nachgewiesen werden.

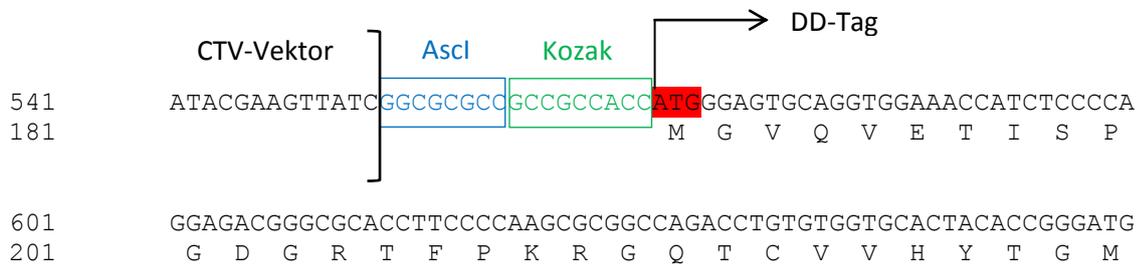


Abbildung 4-11 Ausschnitt der Sequenzierung des DD-Kir2.1-Konstrukts in den CTV-Vektor Dargestellt ist das 5'-Ende des Inserts mit dem Startcodon ATG des DD-Tags. Das Insert hat in dem CTV-Vektor die richtige Orientierung.

4.1.3 Vektor für den Virus-vermittelten Gentransfer

Um auch die Möglichkeit zu haben, für *in vivo*- Experimente die Strategie des Virus-basierten Gentransfers zu verfolgen, wurde ein Vektor zur Expression des Konstrukts in adenoassoziierten Viren, Subtyp 8 (AAV 8), konstruiert. Dieses Konstrukt wurde von Dr. Angela Jurik (II. Med. Klinik, Klinikum Rechts der Isar, TU München) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. In Abbildung 4-12 ist der Aufbau dieses Vektors schematisch dargestellt.

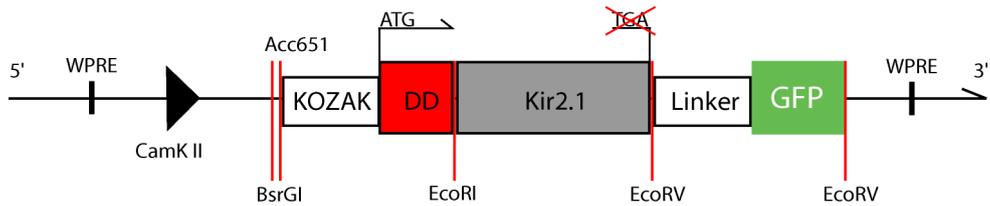


Abbildung 4-12 Schematische Darstellung des Vektors für viralen Gentransfer mittels AAV 8

4.2 Etablierung der Shield-1-Technik in HEK293T-Zellen

Das Ziel der Etablierung der Shield-1-Technik in HEK293T-Zellen war es zu zeigen, dass die Vektoren funktionsfähig sind und das Konstrukt durch die Zellen exprimiert wird, ohne einen toxischen Effekt auf die Zellen zu haben. Zudem sollte überprüft werden, ob der mit der destabilisierenden Domäne versehene Kir2.1-Kanal zuverlässig abgebaut wird und das Konstrukt nach Zugabe des Stabilisierungsliganden Shield-1 stabil exprimiert werden kann.

4.2.1 Nachweis mittels Western Blot

Zunächst sollte die Expression des Fusionsproteins mit Hilfe einer Western Blot-Analyse nachgewiesen werden.

Hierzu wurden die Zellen 48 h nach Transfektion geerntet. Als Vektor zur Transfektion wurde das Konstrukt DD-ZsGreen1 in pcDNA3.1 verwendet. Die Proteine wurden mit TrisSDS-Puffer isoliert, die Proteinkonzentration bestimmt und über ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Es wurden je 100 µg Proteinisolat eingesetzt. Mittels Western Blot wurden die Proteinfractionen auf eine Membran transferiert und das Fusionsprotein DD-ZsGreen1-Kir2.1 sowie die MAP Kinase (MAPK) durch Antikörper detektiert. Die MAPK diente hierbei als Ladekontrolle. Als primärer Antikörper gegen das Fusionsprotein wurde ein gegen den DD-Tag gerichteter monoklonaler Antikörper (DD Monoclonal antibody, Clontech) in einer Verdünnung von 1:500 verwendet, als sekundärer Antikörper ein Goat-Anti-Mouse-Antikörper (Dianova). Zur Detektion der MAP-Kinase wurde ein Anti-MAPK-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet (primärer Antikörper, Cell Signaling Technology). Als sekundärer Antikörper gegen MAPK diente ein Goat-Anti-Rabbit-

Antikörper (Dianova).

Verglichen wurden nicht transfizierte HEK293T-Zellen, transfizierte Zellen ohne Inkubation mit dem Stabilisationsliganden Shield-1 und Zellen nach vierstündiger Inkubation von Shield-1 in einer Konzentration von 500 nM.

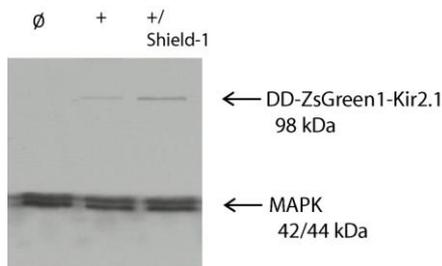


Abbildung 4-13: Western Blot-Analyse Proteinfractionen von nativen HEK293T-Zellen (rechts), transfizierten Hek293T-Zellen ohne Shield-1-Inkubation (Mitte) und transfizierten Hek293T-Zellen nach Inkubation von Shield-1 über 4 h (links)

Das Konstrukt zeigte eine Bande bei 98 kDa. Diese Bande setzt sich aus den Größen der unterschiedlichen Bestandteile des Konstrukts zusammen: Der Kanal Kir2.1 besitzt eine Größe von 48 kDa, der DD-Tag hat eine Größe von 12 kDa und das GFP ZsGreen 1 von 38 kDa.

Dabei fand sich bei mit Shield-1 behandelten Zellen ein deutlich stärkeres Signal als bei nicht behandelten Zellen, nicht transfizierte Zellen zeigten erwartungsgemäß kein Signal (siehe Abbildung 4-13). Die MAPK lief in allen Proben als Bande bei 42 kb und 44 kb.

4.2.2 Nachweis mittels Fluoreszenzmikroskopie

Als weitere Methode zur Überprüfung des Fusionsproteins DD-Kir2.1 diente die Fluoreszenzmikroskopie. Zur Darstellung der Proteinexpression mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden HEK293T-Zellen mit dem Vektor DD-ZsGreen1-Kir2.1 in pcDNA3.1 transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 4 %igem PFA auf Objektträgern fixiert.

Verglichen wurden nicht transfizierte HEK293T-Zellen, transfizierte Zellen ohne Behandlung mit dem Stabilisationsliganden Shield-1 und Zellen, die 30 min, 5 h oder 9 h mit Shield-1 inkubiert worden waren. Die Konzentration von Shield-1 betrug 500 nM. Die fixierten Zellen wurden unter einem konfokalen Mikroskop mit einer 63-fachen Vergrößerung abgebildet. Es wurde jeweils ein Durchlichtbild gemacht und ein Bild bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm.

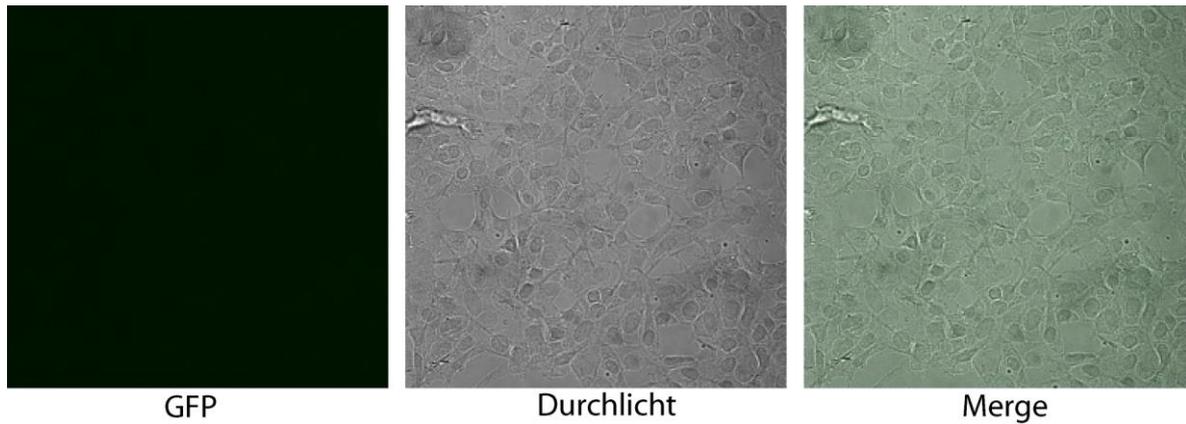


Abbildung 4-14: Fluoreszenzmikroskopie nicht transfizierter HEK293T-Zellen (Vergrößerung 63x): Es war kein Fluoreszenzsignal detektierbar.

Bei nicht transfizierten HEK293T-Zellen ließ sich erwartungsgemäß kein Fluoreszenzsignal detektieren (siehe Abbildung 4-14).

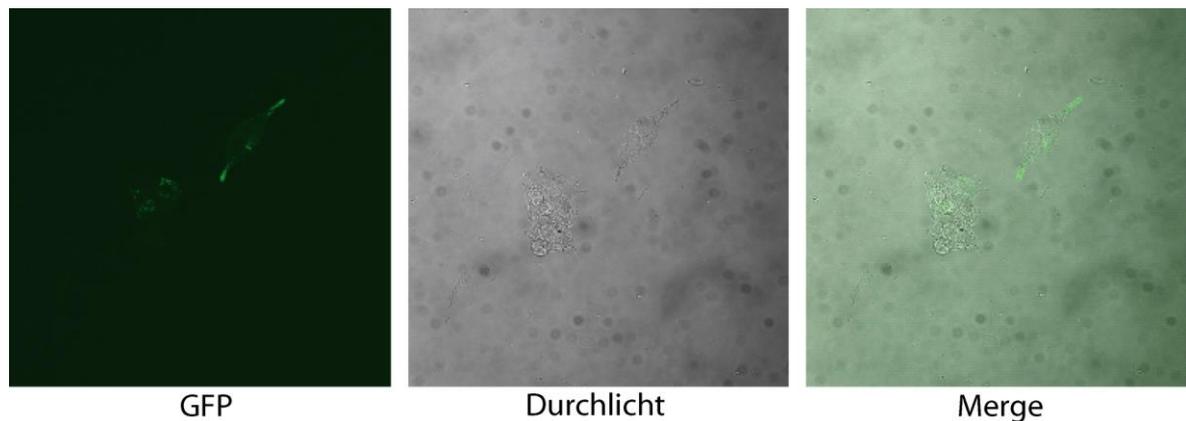


Abbildung 4-15 Fluoreszenzmikroskopie transfizierter HEK293T-Zellen ohne Inkubation von Shield-1 (Vergrößerung 63x): Die Zellen zeigen kaum Fluoreszenz.

Im Vergleich zu untransfizierten HEK293T-Zellen zeigten transfizierte Zellen ohne die Inkubation von Shield-1 kaum ein Fluoreszenzsignal (siehe Abbildung 4-15). Bereits nach 30 minütiger Inkubation mit dem Stabilisationsliganden Shield-1 verstärkte sich dieses Signal, wie in Abbildung 4-16 dargestellt ist.

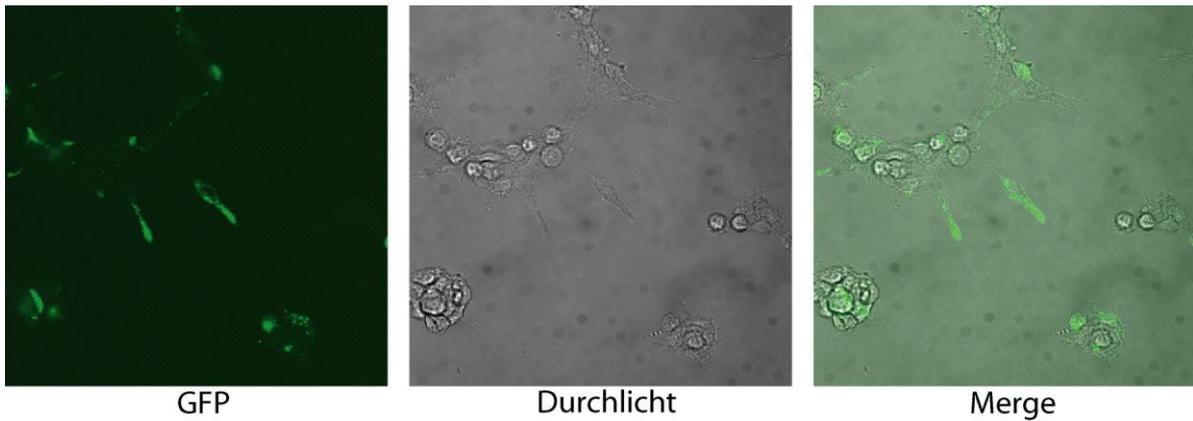


Abbildung 4-16: Fluoreszenzmikroskopie transfizierter HEK293T-Zellen mit 30 min Inkubation von Shield-1 (Vergrößerung 63x): Ein zunehmendes Fluoreszenzsignal ist bereits nach 30 min Inkubation sichtbar.

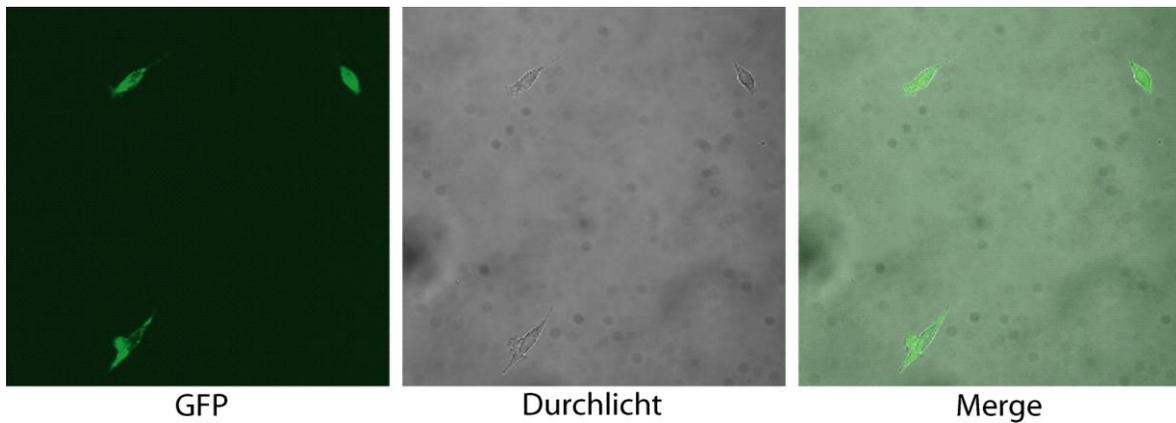


Abbildung 4-17: Fluoreszenzmikroskopie transfizierter HEK293T-Zellen mit 5 h Inkubation von Shield-1 (Vergrößerung 63x): Eine weitere Zunahme des GFP-Signals ist deutlich erkennbar.

Bei der Mikroskopie von Zellen mit Inkubation über 5 h zeigte sich ein bereits sehr starkes Fluoreszenzsignal. Das Signal wurde in Zellen nach 9 h Inkubation von Shield-1 nochmals stärker und zeigte in diesen Zellen die höchste Intensität (siehe Abbildung 4-17 und Abbildung 4-18).

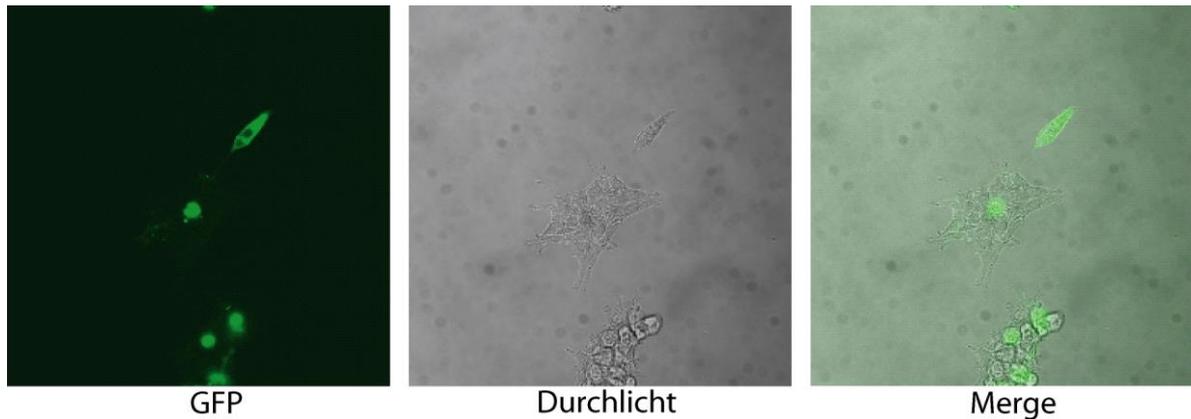


Abbildung 4-18: Fluoreszenzmikroskopie transfizierter HEK293T-Zellen mit Inkubation von Shield-1 über 9 h (Vergrößerung 63x): Diese Zellen zeigen die höchste Intensität des Fluoreszenzsignals.

4.3 Elektrophysiologische Untersuchung der Shield-1-Technik

Um auch die Funktionalität des DD-Kir2.1-Konstrukts im Sinne einer Hyperpolarisation der Zellen zu überprüfen, wurden elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt. Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden HEK293T-Zellen mit dem Plasmid DDKir2.1 in pIRES-EGFP transfiziert und auf polylysinbeschichtete Deckgläschen gesplittet. Die Patch-Clamp-Experimente wurden 48 h nach Transfektion durchgeführt.

Verglichen wurden nicht transfizierte HEK293T-Zellen, transfizierte Zellen, die nicht mit dem Stabilisationsliganden Shield-1 behandelt wurden und Zellen, die für 4 h mit Shield-1 in einer Konzentration von 500 nM inkubiert wurden. Zudem wurde nach der Bestimmung des Ruhemembranpotentials Bariumchlorid 300 μ M eingewaschen, nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde das RMP erneut bestimmt.

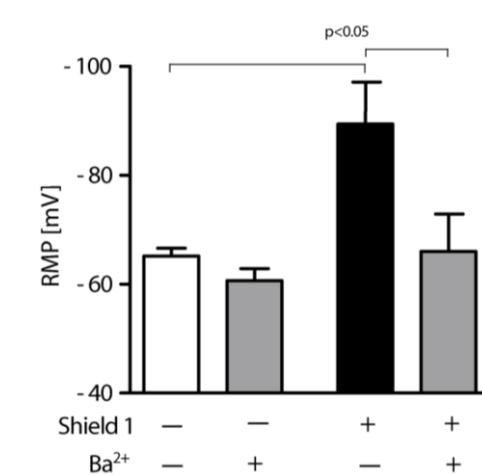


Abbildung 4-19 Ruhemembranpotential von transfizierten Zellen mit und ohne Shield-1-Behandlung und nach Einwaschen von BaCl₂

In Abbildung 4-19 ist die deutliche Hyperpolarisation der Zellen nach Shield-1-Behandlung dargestellt. Allerdings zeigte sich, dass transfizierte, nicht Shield-1-behandelte Zellen im Vergleich zu nativen HEK293T-Zellen (RMP = $53,1 \pm 3,604$) ebenfalls mäßig hyperpolarisiert waren. Nach Einwaschen von Bariumchlorid kam es zu einer Repolarisation der Zellen.

5 Diskussion

Ein wichtiger neurowissenschaftlicher Ansatz ist es, die resultierenden physiologischen oder pathologischen Prozesse von neuronaler Aktivität oder Inaktivität in bestimmten Hirnregionen zu entschlüsseln. Hierfür wurden in den letzten Jahren immer wieder neue Methoden entwickelt, die unterschiedliche Ansätze verfolgten. Das Methodenspektrum mit diesem Ziel spannt sich beispielsweise von der Optogenetik über die Entwicklung des DREADD-Systems bis hin zur Nutzung Ivermectin sensibler Ionenkanäle (Tervo et al., 2007).

Die Idee für dieses Projekt war es, die Eigenschaften des einwärtsgerichteten Kaliumkanals Kir2.1 zu nutzen. Bei Überexpression dieses Kanals zeigen die Zellen eine Hyperpolarisation und die elektrische Aktivität der Zellen nimmt ab (Baines et al., 2001; Johns et al., 1999).

Kombiniert man die Überexpression dieses Kanals nun mit einem System zur Liganden-induzierten Proteinstabilisierung mittels DD-Tag und synthetischem Stabilisationsliganden Shield-1 (Banaszynski et al., 2006), lässt sich die Überexpression des Kanals und damit die Inhibition der Neuronen durch Ligandenzugabe steuern. In Abwesenheit des Liganden Shield-1 ist das Fusionsprotein DD-Kir2.1 instabil und wird durch das Proteasom rasch abgebaut. Appliziert man nun den Stabilisationsliganden, kann der Kanal stabil exprimiert werden. Die Neuronen werden hyperpolarisiert und zeigen weniger elektrische Aktivität. Diese Kombination zweier bereits etablierter Systeme stellt ein neuartiges Werkzeug im Bereich des *neuronal silencing* dar. Diese Hypothese sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit überprüft werden.

5.1 Etablierung der Methode *in vitro*

Die Möglichkeit zur Steuerung der Proteinstabilität des Kir2.1-Kanals durch den DD-Tag sollte zunächst *in vitro* überprüft werden. Dazu erfolgte die Konstruktion mehrerer Vektoren zur Expression des Proteins in HEK293T-Zellen. Bei der Konstruktion des Fusionsproteins wurde die Destabilisierungsdomäne N-terminal an den Kir2.1-Kanal fusioniert. Es wurde die Sequenz des humanen Kir2.1-Kanals (*KCNJ2*) verwendet. Für Proteinbiochemie und Fluoreszenzmikroskopie wurde zwischen dem DD-Tag und dem Kir2.1-Kanal die Sequenz des Fluoreszenzproteins GFP inkloniert. Als Plasmide wurden das pcDNA3.1-Plasmid und ein pIRES-EGFP-Plasmid verwendet. Für sich anschließende *in vivo*-Versuche wurde außerdem sowohl ein Gene-Targeting-Vektor für den

Gentransfer mittels homologer Rekombination (Knock-in-Strategie) sowie ein Vektor für den Virus-basierten Gentransfer erstellt.

Western Blot-Analyse und Fluoreszenzmikroskopie konnten zunächst nachweisen, dass das Fusionsprotein exprimiert wird und die Expression keine toxischen Effekte auf die Zellen hat. Somit sind die klonierten Vektoren funktionsfähig und können das Fusionsprotein exprimieren.

Im nächsten Schritt wurde die Stabilisierung des DD-Kir2.1-Fusionsproteins durch Shield-1 in einer Zeitreihe getestet. Mit zunehmender Dauer der Shield-1-Inkubation von transfizierten HEK293T-Zellen ließ sich in der Fluoreszenzmikroskopie eine Zunahme des GFP-Signals mit einem Maximum nach 9 h erkennen, was einer zunehmenden stabilen Expression des Fusionsproteins DD-ZsGreen1-Kir2.1 entspricht (siehe Abbildung 4-14 bis Abbildung 4-18).

Durch einen monoklonalen Antikörper gegen DD wurde das Fusionsprotein im Western Blot nachgewiesen. Hier zeigte sich nach einer Inkubation mit Shield-1 über 4 h ein deutlich stärkeres Signal des Fusionsproteins bei 98 kDa als bei transfizierten, aber nicht mit Shield-1 behandelten Zellen oder nativen HEK293T-Zellen (siehe Abbildung 4-13). Auch hier ließ sich also der Effekt der Proteinstabilisierung durch Shield-1 nachweisen. Somit konnte die Funktionalität der Proteinstabilisierung und –destabilisierung auf Proteinebene *in vitro* belegt werden.

Allerdings zeigte sich sowohl im Western Blot als auch in der Fluoreszenzmikroskopie ein bereits leichtes Signal bei transfizierten, nicht mit Shield-1 behandelten Zellen. Dieses Signal war hier zwar deutlich schwächer, zeigte aber an, dass eine geringe, basale Expression auch ohne den Stabilisierungsliganden vorhanden ist. Für diesen Punkt gibt es verschiedene mögliche Erklärungsansätze:

Zum einen wurde bei der Western Blot-Analyse der gesamte Proteingehalt der Zelle verwendet und nicht nur die Fraktion, die in der Membran lokalisiert ist. Es kann sich also bei dem detektierten Protein in der nicht mit Shield-1 inkubierten Probe auch um plasmatische, nicht membranständige Kir2.1-Kanäle handeln, beispielsweise direkt nach der Translation. Dabei würde es sich um Protein handeln, das funktionell für die Inhibition der Zelle keine Bedeutung hat.

Eine andere Möglichkeit ist, dass es zu einer sehr starken Expression des Fusionsproteins kommt, sodass das Ubiquitylierungssystem und das Proteasom nicht alles anfallende Protein abbauen können und unter Kontrollbedingungen überschüssiges Fusionsprotein anfällt.

Zusätzlich sollte in den *in vitro*-Versuchen auch die Hypothese der Inhibition von Zellen durch das DD-Kir2.1-Fusionsprotein überprüft und bestätigt werden. Um die Funktionalität des DD-Kir2.1-Modellsystems zu testen, sollte die resultierende Hyperpolarisation von Zellen unter Liganden-induzierter Proteinstabilisierung untersucht werden.

Hierfür wurden Ganzzell-Ableitungen in HEK293T-Zellen vorgenommen. Vergleicht man das Ruhemembranpotential transfizierter Zellen ohne Shield-1-Behandlung mit transfizierten Zellen, die mit dem Stabilisierungsliganden für einige Stunden behandelt wurden, lässt sich eine signifikante Hyperpolarisation der Shield-1 behandelten Zellen gegenüber nicht behandelten Zellen feststellen. Dieser Effekt kann durch Bariumchlorid, welches Kir-Kanäle blockiert, revidiert werden. Dadurch lässt sich auf elektrophysiologischer Ebene zeigen, dass Shield-1 einen stabilisierenden Effekt auf das Fusionsprotein ausübt, sodass schließlich mehr einwärtsgerichtete Kaliumkanäle in der Zellmembran zu einer Hyperpolarisation der Zelle führen. Zudem lässt sich folgern, dass die Fusion des DD-Tags an den N-Terminus des Kanalproteins weder Transport noch Integration des Kanals in die Membran beeinträchtigt.

Allerdings zeigte sich, dass transfizierte, nicht Shield-1-behandelte Zellen im Vergleich zu nativen HEK293T-Zellen ebenfalls mäßig hyperpolarisiert waren. Diese Hyperpolarisation war aber deutlich weniger ausgeprägt als bei transfizierten, Shield-1-inkubierten Zellen. Diese Beobachtung passt zu den Ergebnissen der Western Blot-Analyse und Fluoreszenzmikroskopie, die in Abwesenheit des Stabilisationsliganden Shield-1 eine basale Expression wie oben diskutiert vermuten lassen.

5.2 Ausblick und Überprüfung der Methode *in vivo*

Mit folgender experimenteller Strategie soll der neuartige pharmakogenetische Ansatz, die Inhibition von Neuronen mit Hilfe der Stabilisierung von Ionenkanälen (Kir2.1) durch *small molecule*-Modulatoren (Shield-1), etabliert werden.

Zunächst soll auch *in vivo* die Expression des Fusionsproteins im Gewebe mittels Proteinbiochemie und Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Zur detaillierten elektrophysiologischen Charakterisierung der Methode sollen Einzelzelleitungen in Neuronen, in denen das DD-Kir2.1-Fusionsprotein exprimiert wird, in Hirnschnitten vorgenommen werden, um die Funktionalität der Methode darzulegen.

Als weiterer Punkt soll überprüft werden, ob sich durch die Inhibition von Neuronen mittels des DD-Kir2.1- Modellsystems ein Verhaltenseffekt induzieren lässt. Das ließe sich beispielsweise mit einem Amphetamin-Rotationstest überprüfen (Lerchner et al., 2007). Hierfür wird unilateral das Striatum durch das DD-Kir2.1-System inhibiert. Diese unilaterale Inhibition löst nach Amphetamingabe

ipsilaterale Rotationen des Tieres aus, im Gegensatz zu genereller Hyperlokomotion nach Amphetamingabe bei beidseits intaktem Striatum.

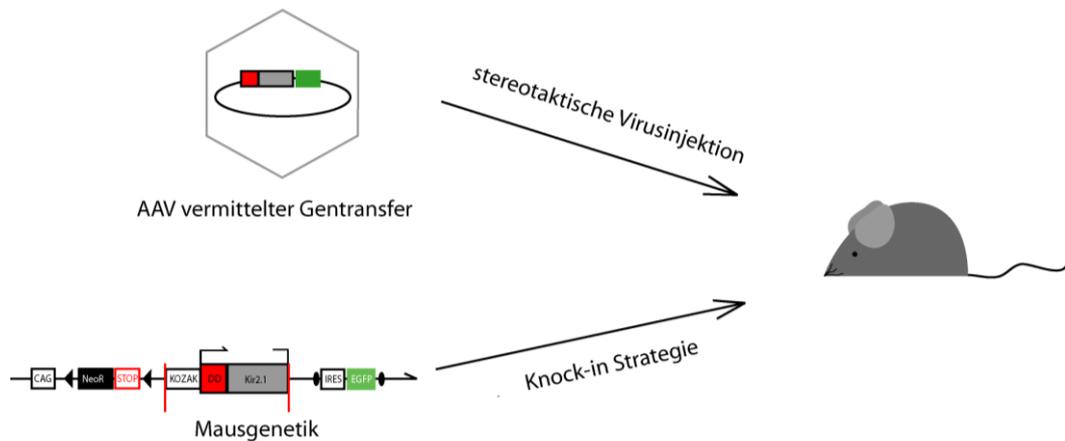


Abbildung 5-1 Übersicht über mögliche Strategien zur Etablierung eines transgenen Tiermodells

Zur Generierung eines Mausmodells für die dargelegten *in vivo*- Experimente wurden zwei Vektoren für den Gentransfer konstruiert. Dabei handelt es sich zum einen um einen Gentergeting-Vektor (DD-Kir2.1 in CTV) für die Generierung einer Knock-in Mausmutante, zum anderen um einen Genvektor, der einen Gentransfer in Neuronen *in vivo* mittels adenoassoziierten Viren ermöglicht.

Durch spezifische Cre-Rekombinasen (Knock-in Strategie) bzw. durch stereotaktische Operation und Auswahl eines geeigneten Virussubtyps (Virus-vermittelter Gentransfer) lässt sich eine gewebespezifische Expression im Maushirn erreichen. Über entsprechende Promotoren (bspw. CamKII) kann die Expression auch zellspezifisch gesteuert werden.

Ein Vorteil des Virus-basierten Gentransfers ist die schnellere Umsetzbarkeit, da die Virusproduktion deutlich weniger Zeit benötigt als die Etablierung von transgenen Tieren.

Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Viren ist es, dass nur das Areal transduziert wird, an dem für die jeweilige Fragestellung Interesse besteht. Andere Hirnregionen oder Organe bleiben unberührt, somit werden eventuelle Nebeneffekte minimiert. Allerdings stellt die bei virusvermitteltem Gentransfer nötige stereotaktische Virusinjektion ein Trauma dar, welches bei Verwendung der Knock-in Strategie nicht vorhanden ist.

5.3 Vorteile und Limitationen des DD-Kir2.1-Fusionsproteins

Der in dieser Arbeit entwickelte neuartige Ansatz mit der Zielsetzung der temporären Inhibition von Nervenzellen bietet viele Vorteile gegenüber bereits etablierten Methoden der Neuroneninaktivierung. Die Inhibition der elektrischen Aktivität von Zellen durch Überexpression des Kir2.1-Kanals lässt sich durch Zugabe des Stabilisierungsliganden Shield-1 reversibel steuern, da nach Auswaschen des Liganden *in vitro* oder renale Elimination *in vivo* das Fusionsprotein aufgrund der nun nicht mehr blockierten Destabilisierungsdomäne wieder zellulär abgebaut wird. Das konnte bereits bei anderen Anwendungen des DD-Shield-1-Systems sowohl *in vitro* auch *in vivo* gezeigt werden (Banaszynski et al., 2008; Rodriguez et al., 2012; Schoeber et al., 2009). Andere Systeme lassen diese Reversibilität missen, beispielsweise die modifizierten, durch Licht aktivierbaren Kir2.1-Kanäle PIRK wie sie durch Kang et al. vorgestellt wurden (Kang et al., 2013).

Ein weiterer Vorteil ist es, dass der Ansatz der DD-Kir2.1 basierten neuronalen Inhibition gut zu etablieren ist und damit auch leicht, einfach und in einem breiten Einsatzfeld anwendbar ist.

Zudem nutzt die DD-Kir2.1-Strategie zelleigene Mechanismen aus, nämlich das Ubiquitylierungssystem und das Proteasom (Banaszynski et al., 2006; Egeler et al., 2011). Der verwendete Kanal ist ein in Säugetieren ubiquitär exprimierter Kaliumkanal. In anderen Systemen, wie beispielsweise der Optogenetik, stammen die verwendeten Ionenkanäle und -pumpen aus Algen oder aus dem Fadenwurm *C. elegans*, wie der Ivermectin sensitive Chloridkanal (Lerchner et al., 2007).

Der verwendete Stabilisierungsligand Shield-1 ist gut gewebebegängig und kann die Blut-Hirnschranke passieren (Banaszynski et al., 2006). Des Weiteren sind bisher keine Nebeneffekte bekannt und Shield-1 ist nicht toxisch. Im Gegensatz dazu ist beispielsweise von Ivermectin bekannt, in hohen Dosen neurotoxisch zu sein (Menez et al., 2012). Dieser Punkt ist vor allem für die geplanten *in vivo*-Versuche von entscheidender Bedeutung.

Des Weiteren ist es mit dem DD-Kir2.1-Fusionsprotein auch möglich, große neuronale Netzwerke zu inhibieren, mittels optogenetischer Methoden gelingt nur die Inhibition lokalisierter Nervenzellpopulationen (Tervo et al., 2007).

Als weiteren Punkt muss angemerkt werden, dass aufgrund der Reversibilität der Inhibition von Neuronen durch das DD-Kir2.1-Fusionsprotein keine dauerhafte Hyperpolarisation in den Zellen besteht. Dies ist als weiterer Vorteil der Methode zu sehen, da Okada et al. zeigten, dass eine dauerhafte Überexpression von Kir2.1 zur Verminderung spannungsabhängiger Kaliumströme (Okada et al., 2008) und einer Änderung der homöostatischen Plastizität neuronaler Netzwerke führt (Burrone et al., 2002; Turrigiano, 2008).

Verglichen mit optogenetischen Methoden zur Inaktivierung von Nervenzellen, welche innerhalb von Millisekunden zur Inhibition führen, dauert es bei Anwendung des DD-Kir2.1-Fusionsproteins *in vitro* etwa 4-8 h bis es zu einer ausreichenden Expression für eine Hyperpolarisation der Zellen kommt. Zudem konnte *in vitro* mittels Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass es 9 h nach Shield-1-Applikation zur höchsten Expression des Fusionsproteins kommt. Diese Zeitspanne ist auch für *in vivo* Versuche anzunehmen und wurde in anderen *in vivo* Anwendungen des DD-Shield-1-Systems bereits bestätigt (Banaszynski et al., 2008).

In den *in vitro* Versuchen zeigte sich, dass es auch in Abwesenheit von Shield-1 zu einer geringen Expression des Fusionsproteins kommt. In anderen Anwendungen des DD-Shield-1-Systems wurde *in vivo* ebenfalls eine basale Expression beobachtet (Schoeber et al., 2009). Es bleibt also abzuwarten, wie hoch diese basale Expression in den *in vivo*-Experimenten mit dem DD-Kir2.1-Fusionsprotein ausfällt und ob dies zu einer Beeinträchtigung der Funktion führt.

Abschließend bietet sich mit dem DD-Kir2.1-System, wenn sich die Funktionalität *in vivo* bestätigen lässt, eine neue pharmakogenetische Strategie zur schnellen und reversiblen Inhibition von Neuronen, um so neue neurowissenschaftliche Erkenntnisse zu erlangen.

6 Zusammenfassung

Es existieren zahlreiche experimentelle Methoden, die die Rolle verschiedener neuronaler Netzwerke in physiologischen, aber auch pathologischen Prozessen des Gehirns untersuchen. Neurowissenschaftliche Konzepte, die auf einer schnellen und reversiblen Inaktivierung von Neuronen oder neuronalen Netzwerken („neuronal silencing“) beruhen, haben dabei in den letzten Jahren einen hohen Stellenwert erhalten.

Wird der einwärtsgerichtete Kaliumkanal Kir2.1 in Neuronen überexprimiert, resultiert daraus eine Hyperpolarisation und Inhibition der Zellen. Um eine induzierbare Überexpression des Kanals zu ermöglichen, ist die Steuerung der Überexpression mit einem System zur ligandeninduzierten Proteinstabilisierung notwendig: die Überexpression und die Inhibition der Neuronen können durch Ligandenzugabe selektiv manipuliert werden.

Das Prinzip dieses Systems beruht darauf, dass der Kaliumkanal mittels genetischer Methoden am N-Terminus mit einer Destabilisierungsdomäne (DD) fusioniert wird. Dadurch ist das Fusionsprotein DD-Kir2.1 instabil, es wird durch das Proteasom der Zellen abgebaut. Appliziert man jedoch den synthetischen Stabilisierungsliganden Shield-1, wird die Destabilisierungsdomäne blockiert und das Fusionsprotein kann stabil exprimiert werden. Dadurch werden die Neuronen hyperpolarisiert und elektrisch inaktiver.

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde das Fusionsprotein DD-Kir2.1 konstruiert und für die Überexpression in HEK2913T-Zellen in verschiedene Vektoren kloniert.

In *in vitro*-Experimenten in HEK293T-Zellen konnte damit erstmalig gezeigt werden, dass sich durch die Behandlung Vektor-exprimierender Zellen mit Shield-1 eine stabile Expression des Fusionsproteins DD-Kir2.1 erzielen lässt. Die Stabilisierung ist zeitabhängig, erreicht ihr Maximum nach ca. 9 h Ligandeninkubation und konnte fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden. Elektrophysiologisch wurde über Einzelzelleitungen in DD-Kir2.1-transfizierten HEK293T-Zellen eine Hyperpolarisation der Zellmembran nach Inkubation mit Shield-1 und somit die Funktionalität dieses Modellsystem nachgewiesen werden.

Für zukünftige *in vivo*-Experimente wurde ein Gen-Targeting-Vektor sowie ein Vektor für Virus-vermittelten Gentransfer konstruiert. Können die in *in vitro*-Versuchen gewonnenen, hier dargestellten Ergebnisse in einem transgenen Mausmodell bestätigt werden, kann dieses System als ein neuartiger pharmakogenetischer Ansatz zur schnellen, reversiblen und spezifischen Inaktivierung von Neuronen verstanden werden.

7 Literaturverzeichnis

- Baines, R. A., Uhler, J. P., Thompson, A., Sweeney, S. T., & Bate, M. (2001). Altered electrical properties in *Drosophila* neurons developing without synaptic transmission. *J Neurosci*, 21, 1523-1531.
- Banaszynski, L. A., Chen, L. C., Maynard-Smith, L. A., Ooi, A. G., & Wandless, T. J. (2006). A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. *Cell*, 126, 995-1004.
- Banaszynski, L. A., Sellmyer, M. A., Contag, C. H., Wandless, T. J., & Thorne, S. H. (2008). Chemical control of protein stability and function in living mice. *Nat Med*, 14, 1123-1127.
- Blanton, M. G., Lo Turco, J. J., & Kriegstein, A. R. (1989). Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex. *J Neurosci Methods*, 30, 203-210.
- Boyer, S. B., Slesinger, P. A., & Jones, S. V. (2009). Regulation of Kir2.1 channels by the Rho-GTPase, Rac1. *J Cell Physiol*, 218, 385-393.
- Burrone, J., O'Byrne, M., & Murthy, V. N. (2002). Multiple forms of synaptic plasticity triggered by selective suppression of activity in individual neurons. *Nature*, 420, 414-418.
- Chu, B. W., Banaszynski, L. A., Chen, L. C., & Wandless, T. J. (2008). Recent progress with FKBP-derived destabilizing domains. *Bioorg Med Chem Lett*, 18, 5941-5944.
- Clackson, T., Yang, W., Rozamus, L. W., Hatada, M., Amara, J. F., Rollins, C. T., Stevenson, L. F., Magari, S. R., Wood, S. A., Courage, N. L., Lu, X., Cerasoli, F., Jr., Gilman, M., & Holt, D. A. (1998). Redesigning an FKBP-ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 10437-10442.
- Coetzee, W. A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M. S., Ozaita, A., Pountney, D., Saganich, M., Vega-Saenz de Miera, E., & Rudy, B. (1999). Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci*, 868, 233-285.
- Derst, C., & Karschin, A. (1998). Evolutionary link between prokaryotic and eukaryotic K⁺ channels. *J Exp Biol*, 201, 2791-2799.
- Dong, Y., Green, T., Saal, D., Marie, H., Neve, R., Nestler, E. J., & Malenka, R. C. (2006). CREB modulates excitability of nucleus accumbens neurons. *Nat Neurosci*, 9, 475-477.
- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, 280, 69-77.
- Egeler, E. L., Urner, L. M., Rakhit, R., Liu, C. W., & Wandless, T. J. (2011). Ligand-switchable substrates for a ubiquitin-proteasome system. *J Biol Chem*, 286, 31328-31336.
- Farrell, M. S., & Roth, B. L. (2013). Pharmacosynthetics: Reimagining the pharmacogenetic approach. *Brain Res*, 1511, 6-20.
- Ficker, E., Tagliatela, M., Wible, B. A., Henley, C. M., & Brown, A. M. (1994). Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science*, 266, 1068-1072.
- Friedrich, G., & Soriano, P. (1991). Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev*, 5, 1513-1523.
- Gossen, M., & Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 5547-5551.
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., & MacKinnon, R. (1994). Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J*, 66, 1061-1067.
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., & Kurachi, Y. (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev*, 90, 291-366.
- Hilgemann, D. W., & Ball, R. (1996). Regulation of cardiac Na⁺,Ca²⁺ exchange and KATP potassium channels by PIP₂. *Science*, 273, 956-959.

- Ho, K., Nichols, C. G., Lederer, W. J., Lytton, J., Vassilev, P. M., Kanazirska, M. V., & Hebert, S. C. (1993). Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature*, 362, 31-38.
- Hohenstein, P., Slight, J., Ozdemir, D. D., Burn, S. F., Berry, R., & Hastie, N. D. (2008). High-efficiency Rosa26 knock-in vector construction for Cre-regulated overexpression and RNAi. *Pathogenetics*, 1, 3.
- Holt, D. A., Luengo, J. I., Yamashita, D. S., Oh, H.-J., Konialian, A. L., Yen, H.-K., Rozamus, L. W., Brandt, M., Bossard, M. J., & Levy, M. A. (1993). Design, Synthesis, and kinetic evaluation of high-affinity FKBP ligands and the X-ray crystal structures of their complexes with FKBP12. *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 9925-9938.
- Huang, C. L., Feng, S., & Hilgemann, D. W. (1998). Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by Gbetagamma. *Nature*, 391, 803-806.
- Johns, D. C., Marx, R., Mains, R. E., O'Rourke, B., & Marban, E. (1999). Inducible genetic suppression of neuronal excitability. *J Neurosci*, 19, 1691-1697.
- Kang, J. Y., Kawaguchi, D., Coin, I., Xiang, Z., O'Leary, D. D., Slesinger, P. A., & Wang, L. (2013). In Vivo expression of a light-activatable potassium channel using unnatural amino acids. *Neuron*, 80, 358-370.
- Katz, B. (1949). Les constantes électriques de la membrane du muscle. *Archs. Sci. Physiol.*, 3, 285-299.
- Klinke, R., Pape, H.-C., & Silberagl, S. (2005). *Physiologie* (Vol. 5. Auflage): Thieme Verlag.
- Kubo, Y., Baldwin, T. J., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (1993). Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature*, 362, 127-133.
- Lerchner, W., Xiao, C., Nashmi, R., Slimko, E. M., van Trigt, L., Lester, H. A., & Anderson, D. J. (2007). Reversible silencing of neuronal excitability in behaving mice by a genetically targeted, ivermectin-gated Cl⁻ channel. *Neuron*, 54, 35-49.
- Lewandoski, M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet*, 2, 743-755.
- Leyland, M. L., & Dart, C. (2004). An alternatively spliced isoform of PSD-93/chapsyn 110 binds to the inwardly rectifying potassium channel, Kir2.1. *J Biol Chem*, 279, 43427-43436.
- Lopatin, A. N., Makhina, E. N., & Nichols, C. G. (1994). Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature*, 372, 366-369.
- Lopatin, A. N., Makhina, E. N., & Nichols, C. G. (1995). The mechanism of inward rectification of potassium channels: "long-pore plugging" by cytoplasmic polyamines. *J Gen Physiol*, 106, 923-955.
- Lu, T., Ting, A. Y., Mainland, J., Jan, L. Y., Schultz, P. G., & Yang, J. (2001). Probing ion permeation and gating in a K⁺ channel with backbone mutations in the selectivity filter. *Nat Neurosci*, 4, 239-246.
- Lu, Z., Klem, A. M., & Ramu, Y. (2001). Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature*, 413, 809-813.
- Ma, C., Rosenzweig, J., Zhang, P., Johns, D. C., & LaMotte, R. H. (2010). Expression of inwardly rectifying potassium channels by an inducible adenoviral vector reduced the neuronal hyperexcitability and hyperalgesia produced by chronic compression of the spinal ganglion. *Mol Pain*, 6, 65.
- MacKinnon, R., Cohen, S. L., Kuo, A., Lee, A., & Chait, B. T. (1998). Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science*, 280, 106-109.
- Matsuda, H., Saigusa, A., & Irisawa, H. (1987). Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg²⁺. *Nature*, 325, 156-159.
- Medema, R. H. (2004). Optimizing RNA interference for application in mammalian cells. *Biochem J*, 380, 593-603.
- Menez, C., Sutra, J. F., Prichard, R., & Lespine, A. (2012). Relative neurotoxicity of ivermectin and moxidectin in Mdr1ab (-/-) mice and effects on mammalian GABA(A) channel activity. *PLoS Negl Trop Dis*, 6, e1883.

- Miake, J., Marban, E., & Nuss, H. B. (2003). Functional role of inward rectifier current in heart probed by Kir2.1 overexpression and dominant-negative suppression. *J Clin Invest*, 111, 1529-1536.
- Minor, D. L., Jr., Masseling, S. J., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (1999). Transmembrane structure of an inwardly rectifying potassium channel. *Cell*, 96, 879-891.
- Nichols, C. G., & Lopatin, A. N. (1997). Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol*, 59, 171-191.
- Okada, M., & Matsuda, H. (2008). Chronic lentiviral expression of inwardly rectifying K⁺ channels (Kir2.1) reduces neuronal activity and downregulates voltage-gated potassium currents in hippocampus. *Neuroscience*, 156, 289-297.
- Pegan, S., Arrabit, C., Zhou, W., Kwiatkowski, W., Collins, A., Slesinger, P. A., & Choe, S. (2005). Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nat Neurosci*, 8, 279-287.
- Plaster, N. M., Tawil, R., Tristani-Firouzi, M., Canun, S., Bendahhou, S., Tsunoda, A., Donaldson, M. R., Iannaccone, S. T., Brunt, E., Barohn, R., Clark, J., Deymeer, F., George, A. L., Jr., Fish, F. A., Hahn, A., Nitu, A., Ozdemir, C., Serdaroglu, P., Subramony, S. H., Wolfe, G., Fu, Y. H., & Ptacek, L. J. (2001). Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell*, 105, 511-519.
- Priori, S. G., Pandit, S. V., Rivolta, I., Berenfeld, O., Ronchetti, E., Dhamoon, A., Napolitano, C., Anumonwo, J., di Barletta, M. R., Gudapakkam, S., Bosi, G., Stramba-Badiale, M., & Jalife, J. (2005). A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circ Res*, 96, 800-807.
- Raab, R. M., & Stephanopoulos, G. (2004). Dynamics of gene silencing by RNA interference. *Biotechnol Bioeng*, 88, 121-132.
- Reimann, F., & Ashcroft, F. M. (1999). Inwardly rectifying potassium channels. *Curr Opin Cell Biol*, 11, 503-508.
- Rodriguez, S., & Wolfgang, M. J. (2012). Targeted chemical-genetic regulation of protein stability in vivo. *Chem Biol*, 19, 391-398.
- Schoeber, J. P., van de Graaf, S. F., Lee, K. P., Wittgen, H. G., Hoenderop, J. G., & Bindels, R. J. (2009). Conditional fast expression and function of multimeric TRPV5 channels using Shield-1. *Am J Physiol Renal Physiol*, 296, F204-211.
- Schulze-Bahr, E. (2005). Short QT syndrome or Andersen syndrome: Yin and Yang of Kir2.1 channel dysfunction. *Circ Res*, 96, 703-704.
- Sellmyer, M. A., Thorne, S. H., Banaszynski, L. A., Contag, C. H., & Wandless, T. J. (2009). A general method for conditional regulation of protein stability in living animals. *Cold Spring Harb Protoc*, 2009, pdb prot5173.
- Shieh, C. C., Coghlan, M., Sullivan, J. P., & Gopalakrishnan, M. (2000). Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev*, 52, 557-594.
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet*, 21, 70-71.
- Stanfield, P. R., Davies, N. W., Shelton, P. A., Sutcliffe, M. J., Khan, I. A., Brammar, W. J., & Conley, E. C. (1994). A single aspartate residue is involved in both intrinsic gating and blockage by Mg²⁺ of the inward rectifier, IRK1. *J Physiol*, 478 (Pt 1), 1-6.
- Tervo, D., & Karpova, A. Y. (2007). Rapidly inducible, genetically targeted inactivation of neural and synaptic activity in vivo. *Curr Opin Neurobiol*, 17, 581-586.
- Turrigiano, G. G. (2008). The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell*, 135, 422-435.
- Wible, B. A., Tagliatela, M., Ficker, E., & Brown, A. M. (1994). Gating of inwardly rectifying K⁺ channels localized to a single negatively charged residue. *Nature*, 371, 246-249.
- Yang, W., Rozamus, L. W., Narula, S., Rollins, C. T., Yuan, R., Andrade, L. J., Ram, M. K., Phillips, T. B., van Schravendijk, M. R., Dalgarno, D., Clackson, T., & Holt, D. A. (2000). Investigating protein-

- ligand interactions with a mutant FKBP possessing a designed specificity pocket. *J Med Chem*, 43, 1135-1142.
- Yizhar, O., Fenno, L. E., Davidson, T. J., Mogri, M., & Deisseroth, K. (2011). Optogenetics in neural systems. *Neuron*, 71, 9-34.
- Yu, C. R., Power, J., Barnea, G., O'Donnell, S., Brown, H. E., Osborne, J., Axel, R., & Gogos, J. A. (2004). Spontaneous neural activity is required for the establishment and maintenance of the olfactory sensory map. *Neuron*, 42, 553-566.
- Zambrowicz, B. P., Imamoto, A., Fiering, S., Herzenberg, L. A., Kerr, W. G., & Soriano, P. (1997). Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 3789-3794.

8 Anhang

8.1 Antikörper

| Bezeichnung | Herkunft | Verdünnung | Bezugsquelle |
|------------------------|----------|------------|---------------------------|
| Anti-MAPK | rabbit | 1:1000 | Cell Signaling Technology |
| DD Monoclonal Antibody | mouse | 1:500 | Clontech |
| Goat-Anti –Rabbit | goat | 1:50000 | Dianova |
| Goat-Anti-Mouse | goat | 1:50000 | Dianova |

8.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs (NEB) bezogen.

| Bezeichnung | Restriktionssequenz |
|-------------|---------------------|
| BamHI | GGA TCC |
| EcoRI | GAA TTC |
| XhoI | CTC GAG |
| Ascl | GGC GCG CC |
| NotI | GCG GCC GC |
| NheI | GCT AGC |
| Sall | GTC GAC |

Polymerasen

| Bezeichnung | Verwendung | Bezugsquelle |
|---|------------------------------------|--------------|
| Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase | DNA-Amplifikation für Klonierungen | NEB |
| Expand High Fidelity ^{PLUS} Polymerase | DNA-Amplifikation für Klonierungen | Roche |

Weitere Enzyme

| Bezeichnung | Verwendung | Bezugsquelle |
|---------------|---------------------------------------|--------------|
| T4 DNA Ligase | Ligation von DNA-Fragmenten | NEB |
| CIP | Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten | NEB |

8.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide sind als Primer notwendige Bestandteile der Polymerasekettenreaktion. Alle Primer werden über die Firma MWG Eurofins, Ebersberg, bezogen.

Primer zur Amplifikation von DNA-Fragmenten:

| Bezeichnung | Sequenz in 5'-3' - Richtung | Verwendung |
|----------------|--|------------------------------------|
| pDDfor_glu | GCG ATC GGA TCC GCC GCC ACC ATG GGA GTG CAG GTG GAA ACC ATC | Klonierung pcDNA3.1 |
| pDDrev_glu | CCC AGA GAA TTC GGG CAA GGC GGA GCC GGA | Klonierung pcDNA3.1 |
| HuKirfor_glu | GCG ATC GAA TTC GGC AGT GTG CGA ACC AAC | Klonierung pcDNA3.1 |
| HuKirrev_glu | CCC AGA CTC GAG TCA TAT CTC CGA CTC TCG CCG TAA | Klonierung pcDNA3.1 |
| nurDD-rev | CCC AGA GAA TTC TTC CGG TTT TAG AAG CTC | Klonierung pcDNA3.1 |
| ROSA-for | GCG ATC GCG GCC GCG GCG CGC CGC CAC CAT GGG AGT GCA GGT GGA A | Klonierung Gentargeting- Vektor |
| ROSA-rev | CCC AGA GGA TCC GGC GCG CCT CAT ATC TCC GAC TCT CG | Klonierung Gentargeting- Vektor |
| nurDDKircutfor | GCG ATC GCT AGC GCC GCC ACC ATG GGA GTG CAG GTG GAA ACC ATC | Klonierung pIRES-EGFP |
| nurDDkircutrev | CCC AGA GTC GAC TCA TAT CTC CGA CTC TCG CCG TAA | Klonierung pIRES-EGFP |

Sequenzierungsprimer:

| Bezeichnung | Sequenz in 5'-3'-Richtung | Verwendung |
|-------------|---------------------------------|---------------------------|
| seq1pDD | GAT GTG GAG CTT CTA AAA CC | End- und Zwischenvektoren |
| seq2pDD | GGA GCC CTC CTG CGA GAA GAT | End- und Zwischenvektoren |
| seq3kir21 | GTG GGT GAG AAG GGG CAA | End- und Zwischenvektoren |
| seq4kir21 | CAC TTG GTG GAA GCT CAT | End- und Zwischenvektoren |
| rev | GGG CAA GGC GGA GCC GGA | End- und Zwischenvektoren |
| T7 | TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG | Zwischenvektoren |
| T3 | GCA ATT AAC CCT CAC TAA AGG | Zwischenvektoren |
| seqKir21rev | ATC TTA CTC TTC CCG TTC CCA AAG | Gentargeting-Vektoren |
| seqDDstart | ATG GGA GTG CAG GTG GAA ACC ATC | Gentargeting-Vektoren |
| pcDNAfor | GGC TAA CTA GAG AAC CCA CTG | pcDNA3.1-Konstrukte |
| pcDNArev | GGC AAC TAG AAG GCA CAG TC | pcDNA3.1-Konstrukte |

8.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|---|---------------|
| 6-Aminohexansäure | Roth |
| Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung | Biostep |
| Agar | Oxoid |
| Agarose LE | Biozym |
| Ammoniumacetat | Roth |
| Ampicillin | Sigma |
| APS 20% | Sigma |
| Aquatex Mounting Medium | Merck |
| Bariumchlorid | Merck |
| BCA Protein Assay, Pierce | Thermo Fisher |
| Borsäure | Roth |
| Bromophenolblau | Roth |
| BSA (Bovines Serum Albumin) | Roth |
| Calciumchlorid | Roth |
| Calpain InhibitorI | Roche |
| Calpain InhibitorII | Roche |
| Deoxycholat | Sigma |
| DEPC | Roth |
| Dextrose | Sigma |
| Dinatriumhydrogenphosphat | Roth |
| DMSO | Roth |
| dNTPs | Roth |
| DTT (Dithiothreitol) | Sigma |
| ECL | Perkin Elmer |
| Essigsäure | Roth |
| Ethanol | Roth |
| Ethidiumbromid | Sigma |
| Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA) | Roth |
| Ethylenglykol-Tetraessigsäure (EGTA) | Roth |
| Ficoll Typ 400 | Sigma |
| Glucose | Roth |
| Glycerin | Roth |
| Glycin | Roth |
| Hefeextrakt | Oxoid |
| Hepes | Roth |
| Isopropanol | Oxoid |
| Kaliumacetat | Merck |
| Kaliumchlorid | Merck |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Merck |
| Kanamycin | Sigma |
| kb-Leiter (DNA Molecular Weight Marker X) | Roche |
| Lipofectamin 2000 | Invitrogen |
| Lysoszym | Roche |

| | |
|---------------------------------|------------|
| Magnesium-ATP | Sigma |
| Magnesiumchlorid | Sigma |
| Magnesiumsulfat | Merck |
| Mercaptoethanol (βME) | Roth |
| Metafectene Pro | Biontix |
| Methanol | Roth |
| Methanol | Roth |
| Natriumacetat | Roth |
| Natriumchlorid | Roth |
| Natriumdihydrogenphosphat | Roth |
| Natriumdodecylsulfat | Roth |
| Natronlauge | Rot |
| OptiMEM reduced Serum Medium | Invitrogen |
| Paraformaldehyd | Sigma |
| Penicillin/Streptomycin 100x | Invitrogen |
| PMSF | Fluka |
| Polyacrylamid (PAGE) | Roth |
| Poly-L-Lysin | Biochrom |
| Precision Plus Protein Standard | Biorad |
| Proteinase K | Roche |
| Quantum286 | PAA |
| RNaseA | Roche |
| Rotiphorese® Gel 40 (29:1) | Roth |
| Shield-1 | Clontech |
| TEMED | Sigma |
| TrisBase | Roth |
| TrisHCl | Roth |
| Trypsin/EDTA 10x | Invitrogen |
| Trypton | Roth |
| Tween 20 | Roth |
| Xylencyanol | Sigma |

Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|---|------------------------------------|
| 1,5 ml Reaktionsgefäß | Eppendorf |
| Borosilikatglas-Kapillaren | Hugo-Sachs Elektronik Harvard App. |
| Cryovial | Nunc |
| Deckgläschen (12 mm, 14 mm) | Menzel |
| Dialyseschlauch | Roth |
| EP-Küvetten Klonieren | peqlab |
| Falkon 15 ml | Corning |
| Falkon 50 ml | TPP |
| Hyperfilm ECL | GE |
| Immobilion-P | Millipore |
| Kulturflaschen HEK (15 cm ² , 75 cm ²) | TPP |

| | |
|---|-----------------------|
| Objektträger | Menzel |
| Parafilm | Roth |
| Pasteurpipetten | Roth |
| Petrischalen 10 cm | Corning |
| Petrischalen 3 cm | Nunc |
| Pipettenspitzen ungestopft (20 µl, 200 µl, 1000 µl) | Sarstedt |
| Stripetten | Corning |
| Wellplatten (6, 24, 96) | Corning |
| Whatman 3 MM | Schleicher und Schüll |

8.5 Geräte

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|----------------------|
| A-/D-Wandler ITC-16 Computer Interface | Instrutech Corp. |
| Agarosegelkammer | MWG Biotech |
| Akkupipettierhilfe Rota-Filter | Roth |
| Analysenwaage APX-60 | Denver Instrument |
| Axioskop FS | Zeiss |
| Bakterienschüttler Certomat®R/H | B. Braun |
| BioPhotometer plus | Eppendorf |
| Brutschrank Binder CB 53 | Binder |
| Curix 60 Filmentwickler | AGFA |
| DMZ-Universalpuller | Zeitz |
| GelBiodoc 2000 | Biorad |
| GenePulser | Biorad |
| High Speed CCD Kamera | Qimaging |
| Infrarot-Videokamera | Hamamatsu Photonics |
| Inkubator | Memmert |
| Lamin Air HB | Heraeus |
| LSM 510 Laser Scan Microscope | Zeiss |
| Mikromanipulatoren | Luigs und Neumann |
| MiniProtean3Cell Gelkammer | Biorad |
| Nanodrop®Spectrophotometer ND-1000 | Peqlab |
| PCR Geräte UnoII/T1 Thermocycler | Biometra |
| pH-Messgerät pH211 | Hanna Instruments |
| Pipettierhilfe (10, 20, 200, 1000) | Gilson |
| Rotator | Neolab |
| Semi-dry Blotter Multiphor II | Pharmacia LKB |
| Spannungsquelle bei Elektroelution | Dessaga |
| Standard Powerpack P25 Spannungsquelle | Biometra |
| Taumelmischer | Neolab |
| Tischzentrifuge | Eppendorf |
| Titertek Multiscan MCC/340 | Friedrich Bartolomey |
| Ultrazentrifuge | Beckmann |
| Vakuumzentrifuge | Bachofer |

Verstärker SEC 10L
Vortexmischer
Wasserbad
XC Polychrome V

NPI electronic
Neolab
Köttermann, Haake
T.I.L.L. Photonics

