

Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann)

**Identifizierung, Klonierung, Lokalisation und Charakterisierung
dreier neuer modulatorischer γ -Untereinheiten
spannungsabhängiger Kalziumkanäle**

Georg Franziskus Bohn

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann
2. Priv.-Doz. Dr. Th. Kleppisch
3. Univ.-Prof. Dr. J. Dudel, emeritiert, Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 06.06.02 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 11.12.02 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einteilung spannungsabhängiger Kalziumkanäle	1
1.1.1	<i>High voltage</i> aktivierte Kalziumkanäle	1
1.1.2	<i>Low voltage</i> aktivierte Kalziumkanäle	2
1.2	Aufbau spannungsabhängiger Kalziumkanäle	3
1.2.1	Die Hilfsuntereinheiten des <i>high-voltage</i> aktivierten Kalziumkanalkomplexes	5
1.3	Ziel	7
2	Material und Methoden	9
2.1	Bakterienstämme	9
2.1.1	Verwendete Stämme	9
2.1.2	Nährmedien und Antibiotika	9
2.1.3	Kultivierung	9
2.2	Verwendete Plasmide	10
2.2.1	PCR-Blunt II-TOPO Vektor	10
2.2.2	pAL1	10
2.2.3	pcDNA3	10
2.3	Reinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren	11
2.3.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	11
2.3.2	Präzipitation	11
2.3.3	Phenol/Chloroform-Extraktion	11
2.4	Isolierung von Plasmid-DNS	12
2.4.1	Kochschnelltest	12
2.4.2	Alkalische Lyse mit Säulenchromatographie (Qiagen Kits)	12
2.5	Enzymatische Modifikation von DNS	13
2.5.1	Restriktionsenzyme	13
2.5.2	Dephosphorylierung von DNS-Molekülen mittels alkalischer Phosphatase	13
2.5.3	T4-DNS-Ligase	13
2.5.4	Ligation in einen TOPO Vektor	14
2.6	Transformation von Bakterien	14
2.6.1	Präparation von kompetenten Bakterienzellen	14
2.6.2	Transformation von <i>E. coli</i>	14
2.7	Auftrennung und Isolierung von DNS-Fragmenten	15
2.7.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	15
2.7.2	Agarose-Gelelektrophorese	16
2.7.3	Elektroelution (modifiziert nach Davis et al., 1986)	16
2.8	Datenbanksuche	16
2.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	16
2.9.1	Standardprotokoll	17
2.10	Sequenzierung von Plasmid-DNS	18
2.10.1	Sequenzreaktion	18
2.11	Herstellung ³² P-markierter DNS-Gensonden	19
2.12	Northern blot-Analyse	20
2.13	<i>In situ</i> -Hybridisierung	21
2.13.1	Verwendete Lösungen	21
2.13.2	Herstellung der RNS-Gensonden	23
2.13.3	Anfertigung von Gewebsschnitten	23
2.13.4	Standardprotokoll der <i>In situ</i> -Hybridisierung (nach Simmons et al., 1989)	24
2.13.5	Filmemulsion	25
2.13.6	Histologische Färbungen	26

2.13.7	Mikroskopie und Photographie.....	27
2.14	Koloniehybridisierung auf Nitrocellulosefiltern.....	27
2.15	Zellkultur.....	28
2.15.1	Eukaryotische Zelllinien.....	29
2.15.2	Nährmedium.....	29
2.15.3	Kultur.....	29
2.15.4	Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	30
2.15.4.1	Transfektion mit Lipofectamin.....	30
2.16	Elektrophysiologische Untersuchungen.....	31
2.16.1	Grundlagen und Durchführung.....	31
3	Ergebnisse.....	34
3.1	Klonierung.....	34
3.1.1	γ_3 Untereinheit.....	35
3.1.2	γ_4 Untereinheit.....	35
3.1.3	γ_5 Untereinheit.....	35
3.2	Northern blot-Analyse.....	37
3.3	<i>In situ</i> -Hybridisierung.....	38
3.4	Elektrophysiologische Charakterisierung von γ_2 , γ_4 und γ_5	38
4	Diskussion.....	46
4.1	Sequenzvergleich und Hydrophobizitätsanalysen der Aminosäuresequenzen der γ Untereinheiten.....	46
4.2	Gewebsverteilung der einzelnen γ Untereinheiten.....	47
4.3	Elektrophysiologische Charakterisierung von γ_{1-5}	48
4.4	Ausblick.....	50
5	Zusammenfassung.....	52
6	Anhang.....	54
6.1	<i>Accession numbers</i> von γ_3 , γ_4 und γ_5	54
6.2	Nukleinsäuresequenzen von γ_3 , γ_4 und γ_5	54
6.3	Verwendete Primer.....	56
7	Literaturverzeichnis.....	58
7.1	Zitierte Veröffentlichungen.....	58
7.2	Eigene Veröffentlichungen.....	65

1 Einleitung

Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration sind entscheidend für viele physiologische Prozesse. Sie bewirken die elektromechanische Kopplung bei der Muskelkontraktion, führen zu Synthese und Sekretion von Neurotransmittern und Hormonen, regulieren die Expression von Genen und steuern Enzymaktivitäten. Ein Teil des Kalziumeinstroms in die Zelle erfolgt über spannungsabhängige Kalziumkanäle, deren Öffnungsstimulus die Depolarisation der Zellmembran darstellt. Modulierend greifen hierbei Hormone, Proteinkinasen, Proteinphosphatasen, Toxine und Pharmaka ein (Hofmann et al., 1999).

1.1 Einteilung spannungsabhängiger Kalziumkanäle

Entwicklungsgeschichtlich gehören spannungsabhängige Kalziumkanäle in eine Gruppe transmembranärer Ionenkanäle, die auch die spannungsabhängigen Natrium- und Kaliumkanäle umfaßt.

Sequenzvergleiche legen nahe, daß sie sich schon relativ früh in der Evolutionsgeschichte in die Gruppe der *high voltage* (HVA) und der *low voltage* aktivierten (LVA) Kalziumkanäle (s. Abbildung 1-1) teilten. Die beiden Gruppen unterscheiden sich sowohl hinsichtlich ihrer elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften als auch durch ihren unterschiedlichen Aufbau (Hofmann et al., 1999).

1.1.1 *High voltage* aktivierte Kalziumkanäle

HVA Kalziumkanäle bilden eine Familie heterooligomerer Komplexe aus bis zu fünf Untereinheiten, nämlich einer zentralen α_1 Untereinheit sowie modulatorischen β , α_2 , δ und γ Untereinheiten. Sie sind u.a. an der Muskelkontraktion, der Transmitterfreisetzung an Synapsen, der Insulinsekretion im Pankreas und der Blutdruckregulation beteiligt (Tanabe et al., 1988; Tsien et al., 1991).

High voltage aktivierte Kalziumkanäle öffnen sich bei Membranpotentialen zwischen -50mV (z.B. $\text{Ca}_v1.3$ (α_{1D}): Cochlea) und größer -30mV (z.B. $\text{Ca}_v1.2$ (α_{1C}): Herz). Der darauf folgende Ca^{2+} Einstrom führt zu einem deutlichen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration.

Experimentelle Befunde zeigen weiterhin, daß HVA Kalziumkanäle für Ba^{2+} permeabler sind als für Ca^{2+} (Armstrong et al., 1992).

1.1.2 *Low voltage* aktivierte Kalziumkanäle

Die LVA Kalziumkanäle werden mit der Amplifikation distaler synaptischer Signale in Neuronen in Zusammenhang gebracht und spielen u.a. eine Rolle bei der spontanen Ausbildung von Aktionspotentialen in neuronalen Netzwerken (McCormick et al., 1990; Magee et al., 1995; Huguenard, 1996).

Low voltage aktivierte Kalziumkanäle öffnen schon bei Depolarisation auf -60 bis -40 mV und inaktivieren sehr schnell. Im Vergleich zu den HVA Kalziumkanälen vollzieht sich ihre Deaktivierung 10- bis 100fach langsamer. Sie leiten Ca^{2+} und Ba^{2+} in etwa gleich gut bei einer relativ geringen Einzelkanalleitfähigkeit von 5 bis 9pS (Carbone et al., 1987).

Sind LVA Kalziumkanäle - auch T-Typ Kanäle genannt - ähnlich wie HVA Kalziumkanäle aus mehreren Untereinheiten aufgebaut?

Die Hypothese, daß der LVA Kalziumkanal nicht mit modulatorischen Untereinheiten assoziiert ist, läßt sich durch die Beobachtung stützen, daß die elektrophysiologischen Eigenschaften der zentralen α_1 Untereinheiten der LVA Kalziumkanäle bereits gut mit den an nativen T-Typ Kalziumkanälen erhobenen Daten übereinstimmen (Perez-Reyes et al., 1998; Klugbauer et al., 1999a).

Weiterhin fällt auf, daß die intrazelluläre Schleife zwischen den Domänen I und II aller LVA Kalziumkanaluntereinheiten keine typische, von den HVA Kanälen bekannte Bindungsstelle für die modulatorische β Untereinheit besitzt (Perez-Reyes et al., 1998). Die Unterdrückung der Expression der β_{1-4} Untereinheiten in Ganglion nodosum Neuronen (in diesem Kerngebiet lassen sich ausgeprägte T-Typ Kalziumströme messen) hat keinen Einfluß auf die gemessenen Ströme (Lambert et al., 1997).

Eine Koexpression der modulatorischen Untereinheiten $\alpha_2\delta-1$ und $\alpha_2\delta-3$ mit der LVA α_1 Untereinheit $\text{Ca}_v3.1$ (α_{1G}) führt nicht zu einer Änderung der Kanaleigenschaften (Lacinová et al., 1999). Auch die skelettmuskelspezifische γ Untereinheit ist sicher nicht mit T-Typ Kalziumkanälen, sondern mit der L-Typ $\text{Ca}_v1.1$ (α_{1S}) Untereinheit assoziiert (Bosse et al., 1990; Jay et al., 1990).

All diese Daten ließen zu Beginn der hier vorliegenden Arbeit die Assoziation der T-Typ α_1 Untereinheiten mit zusätzlichen modulatorischen Untereinheiten unwahrscheinlich erscheinen.

Lediglich Dolphin et al. (1999) fanden bei Koexpression von $\text{Ca}_v3.1$ (α_{1G}) mit β_{1b} bzw. $\alpha_2\delta-1$ eine vergrößerte Stromdichte sowie eine höhere Expression von $\text{Ca}_v3.1$ (α_{1G}), was sie auf ein verbessertes Targeting von $\text{Ca}_v3.1$ (α_{1G}) durch β_{1b} und $\alpha_2\delta-1$ zurückführten.

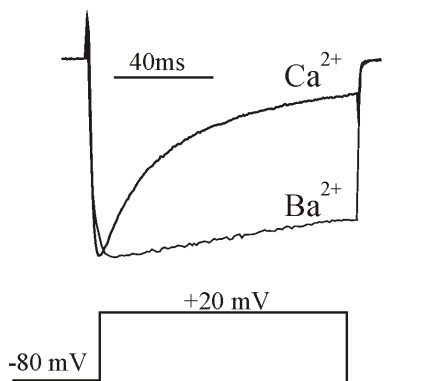
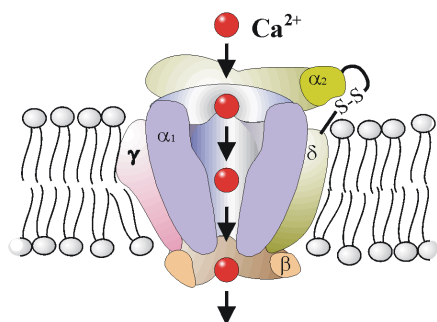
1.2 Aufbau spannungsabhängiger Kalziumkanäle

Zentraler Bestandteil aller spannungsaktivierten Kalziumkanäle ist die transmembranäre α_1 Untereinheit. Sie besteht aus vier homologen Domänen mit jeweils sechs Transmembransegmenten, enthält die Pore, den Spannungssensor, den Ionenselektivitätsfilter und die Bindungsstellen der „klassischen“ Kalziumkanalblocker (s. Tabelle 1-1).

Bis heute wurden 10 Gene identifiziert, die für α_1 Untereinheiten der HVA und LVA Kalziumkanäle kodieren. Vier Klassen von HVA Kalziumkanälen (L (long lasting)-, N (neither L- nor T)-, P/Q (Purkinje)- und R (remaining)-Typ) steht eine Klasse von LVA Kanälen (T (tiny/ transient)-Typ) gegenüber (Catterall, 1995; Hofmann et al., 1999).

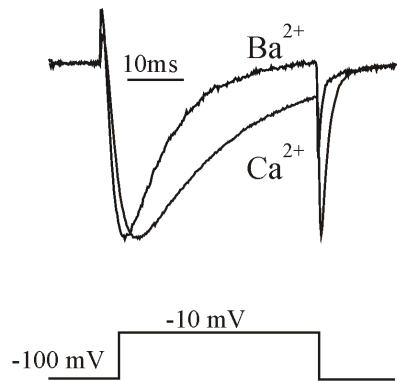
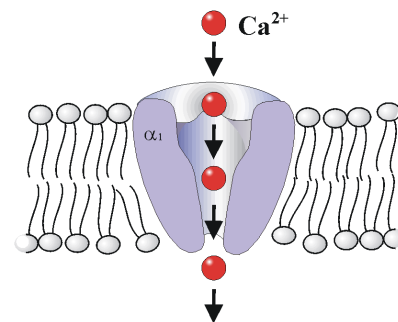
Um eine übersichtlichere Einteilung der einzelnen Kanäle innerhalb der verschiedenen Kanalklassen zu erreichen, schlugen Ertel et al. (2000) eine neue Nomenklatur der einzelnen α_1 Untereinheiten vor. Sie ist in Tabelle 1-1 der von Birnbaumer et al. (1994) etablierten Nomenklatur gegenübergestellt. Außerdem sind die Gewebsverteilung der α_1 Untereinheiten sowie spezifische Blocker angegeben. Abbildung 1-2 zeigt einen phyloge-

High voltage aktivierter Ca^{2+} Kanal



L-Typ

Low voltage aktivierter Ca^{2+} Kanal



T-Typ

Abbildung 1-1: Aufbau und elektrophysiologische Eigenschaften der HVA- und LVA-Kalziumkanäle.
(Erläuterungen: s. Text)

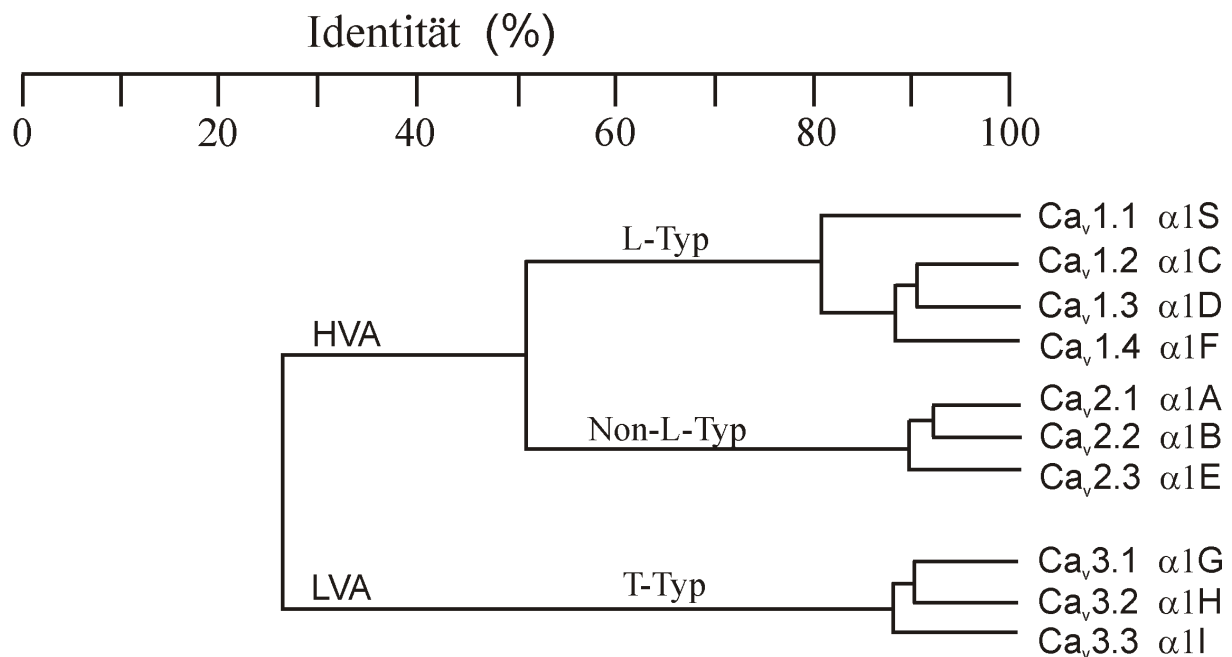


Abbildung 1-2: Phylogenetischer Stammbaum der α_1 Untereinheiten unter Berücksichtigung der neuen Nomenklatur.

	Typ	alt	neu	Spleißvar.	Vorkommen	Blocker	Literaturangabe
HVA	L-Typ	α_{1S}	$\text{Ca}_v1.1$		Skelettmuskel		Tanabe et al.,1987
		α_{1C}	$\text{Ca}_v1.2$	a	Herz	DHP	Mikami et al.,1989
				b	Skelettmuskel	PAA	Biel et al.,1990
				c	Hirn,Herz,Gl.pit.,NeNi	BTZ	Snutch et al.,1991
	α_{1D}	$\text{Ca}_v1.3$		Hirn,Pancreas,Niere, Ovar,Cochlea		Williams et al.,1992b Seino et al.,1992	
	α_{1F}	$\text{Ca}_v1.4$		Retina		*	Strom et al.,1998
	P/Q-Typ	α_{1A}	$\text{Ca}_v2.1$	a b	Hirn,Cochlea,Gl.pit.	ω -Aga	Mori et al.,1991 Starr et al.,1991
N-Typ	α_{1B}	$\text{Ca}_v2.2$	a b	Hirn, peripheres Nervensystem	ω -CTX	Williams et al.,1992a Dubel et al.,1992	
R-Typ	α_{1E}	$\text{Ca}_v2.3$	a	Hirn,Cochlea,Retina, Herz,Gl.pit.	n.b.	Niidome et al.,1992 Soong et al.,1993 Schneider et al.,1994	
			b	Hirn,Cochlea,Retina			
LVA	T-Typ	α_{1G}	$\text{Ca}_v3.1$	a,b m.meh-reren Un-terformen	Hirn, Herz, peripheres Nervensystem	Mi, Kur-toxin	Perez-Reyes et al.,1998 Klugbauer et al.,1999a Monteil et al.,2000
		α_{1H}	$\text{Ca}_v3.2$		Hirn,Herz,Niere,Leber	Mi	Cribbs et al.,1998
		α_{1I}	$\text{Ca}_v3.3$		Hirn	Mi	Lee et al.,1999

Tabelle 1-1: Nomenklatur und Verteilung der HVA und LVA Kalziumkanäle. BTZ: Benzothiazepine; DHP: Dihydropyridine; Gl.pit.: Glandula pituitaria; Mi: Mibefradil; n.b.: nicht beschrieben; NeNi: Nebennieren; PAA: Phenylalkylamine; ω -Aga: ω -Agatoxin GIVA; ω -CTX: ω -Conotoxin GVIA; *: Kanal nicht genauer charakterisiert

netischen Stammbaum der α_1 Untereinheiten basierend auf Sequenzidentitäten und Kanalklassen. Im folgenden wird die neue Nomenklatur gebraucht.

1.2.1 Die Hilfsuntereinheiten des *high voltage* aktivierten Kalziumkanalkomplexes

HVA Kalziumkanäle können durch akzessorische Hilfsuntereinheiten moduliert werden. Die Strukturen dieser als $\alpha_2\delta$, β und γ bezeichneten Hilfsuntereinheiten sind in Abbildung 1-3 dargestellt.

β Untereinheiten

Bislang sind vier modulatorische β Untereinheiten spannungsabhängiger Kalziumkanäle bekannt. Durch alternatives Spleißen entstehen jeweils mehrere Isoformen. Alle β Untereinheiten sind intrazellulär gelegen und unterscheiden sich untereinander durch drei variable Regionen, darunter der Amino- und Carboxyterminus. Von β_1 (Ruth et al., 1989) sind bislang drei Isoformen bekannt (Pragnell et al., 1991; Williams et al., 1992b), wobei die ausschließlich im Skelettmuskel vorkommende β_{1a} Untereinheit mit einem Komplex aus $Ca_v1.1$ (α_{1S}), $\alpha_2\delta$ -1 und γ_1 assoziiert ist. Die übrigen Isoformen sind in Herz, Gehirn und Milz lokalisiert (Powers et al., 1992). β_2 wird in Herz, Gehirn, Aorta, Trachea und Lunge (Biel et al., 1991), β_3 im glatten Muskel und Gehirn und β_4 im Gehirn exprimiert (Hullin et al., 1992; Castellano et al., 1993; Ludwig et al., 1997).

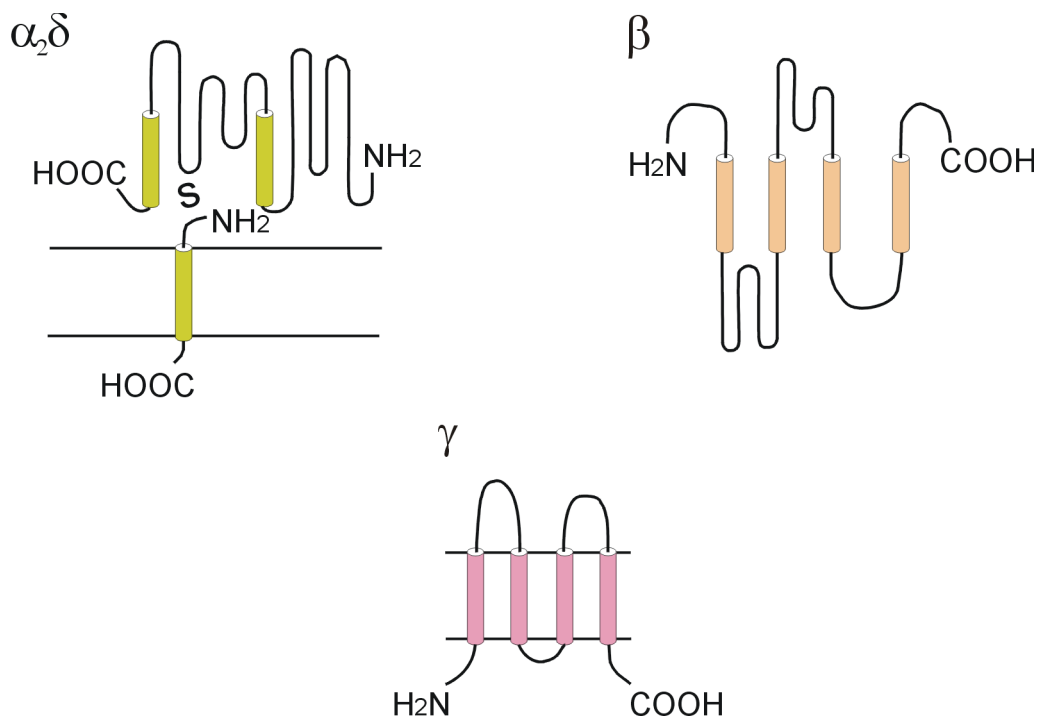


Abbildung 1-3: Strukturen der Hilfsuntereinheiten des HVA Kalziumkanalkomplexes.

β Untereinheiten binden über ein hochkonserviertes AID (α subunit interaction domain) Motiv an den zytoplasmatischen Linker zwischen Domäne I und II der HVA α_1 Untereinheiten und ermöglichen so unter Maskierung eines sogenannten ER Retentionssignales den Einbau der α_1 Untereinheiten in die Zellmembran (Bichet et al., 2000; Gao et al., 1999). Desweiteren bewirkt die β_1 Untereinheit am $\text{Ca}_v1.2$ (α_{1C}) Kanal eine Erhöhung des Spitzenstromes, eine Beschleunigung der Aktivierung und Inaktivierung und eine Verschiebung der Strom-Spannungsbeziehung zu negativeren Potentialen (Singer et al., 1991; Wei et al., 1991; Welling et al., 1993). Yamaguchi et al. (1998) wiesen nach, daß eine Blockade der Proteintranslokation in *Xenopus* Oozyten durch Bafilomycin A die Erhöhung des Spitzenstromes unterbindet, während die Modulierung der Stromkinetiken und der Spannungsabhängigkeit unverändert bleibt. Dies unterstreicht, daß β Untereinheiten eine wesentliche Rolle als Chaperone für das Targeting und für die Verfügbarkeit der HVA Kalziumkanäle spielen.

$\alpha_2\delta$ Untereinheiten

Die stark glykosylierte, ubiquitäre $\alpha_2\delta$ -1 Untereinheit wurde zuerst von Ellis et al. (1988) im Skelettmuskel beschrieben. Ihr Molekulargewicht beträgt 125 kDa. Posttranslationale Proteolyse bewirkt eine Spaltung in die transmembranäre δ (C-Terminus, Aminosäuren 935 bis 1080) und die extrazelluläre α_2 Untereinheit, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (De Jongh et al., 1990; Wiser et al., 1996). Durch alternatives Spleißen entstehen fünf gewebsspezifische Isoformen (Angelotti et al., 1996). Koexpression von $\alpha_2\delta$ -1 mit $\text{Ca}_v1.2$ (α_{1C}) führt zu einer Vergrößerung der Stromamplitude, einer Beschleunigung der Kanalaktivierung und -inaktivierung und verschiebt die spannungsabhängige Inaktivierung in Richtung negativerer Membranpotentiale. Bei zusätzlicher Koexpression mit β_{1a} werden diese Effekte noch verstärkt (Singer et al., 1991).

Kürzlich entdeckten Klugbauer et al. (1999b) zwei weitere Gene, die für $\alpha_2\delta$ Untereinheiten kodieren. $\alpha_2\delta$ -2 hat ca. 56% Identität mit $\alpha_2\delta$ -1 und kommt wie dieses ubiquitär vor. $\alpha_2\delta$ -3 ist nur im Gehirn lokalisiert und zu etwa 30% homolog mit $\alpha_2\delta$ -1. Die Koexpression von $\alpha_2\delta$ -3 mit $\text{Ca}_v1.2$ (α_{1C}) und β_{2a} bzw. $\text{Ca}_v2.3$ (α_{1E}) und β_3 führt zu vergleichbaren Ergebnissen wie bei Singer et al. (1991).

γ Untereinheiten

γ Untereinheiten sind integrale, stark glykosylierte Membranproteine mit Molekulargewichten zwischen 25 und 40kDa. Sie bestehen Hydrophobizitätsanalysen zufolge aus vier Transmembransegmenten mit intrazellulär gelegenen Amino- und Carboxytermini (Bosse et al., 1990; Jay et al., 1990). Singer et al. (1991) sowie Eberst et al. (1997) führten Koexpressionsstudien der bis dato einzigen bekannten, skelettmuskelspezifischen γ_1 Untereinheit mit dem kardialen $Ca_v1.2$ (α_{1C}), β_{2a} , $\alpha_2\delta$ -1 Komplex durch und beobachteten eine Linksverschiebung der *Steady state*-Inaktivierung sowie eine beschleunigte Strominaktivierung. Analog dazu fanden Freise et al. (2000) nach Ausschaltung des γ_1 Gens *in vivo* eine vergrößerte Amplitude des Kalziumstromes, eine verlangsamte Inaktivierung und eine rechtsverschobene *Steady state*-Inaktivierung.

Die neuronale γ_2 Untereinheit wurde von Letts et al (1998) bei der Untersuchung von an Absenceepilepsien leidenden *Stargazer* Mäusen identifiziert. Die Koexpression von γ_2 mit einem Komplex aus $Ca_v2.1$ (α_{1A}), β_{1a} und $\alpha_2\delta$ -1 führt wie bei Eberst et al. (1997) für γ_1 beschrieben zu einer Verschiebung der *Steady state*-Inaktivierungskurve in Richtung negativerer Potentiale und zu einer schnelleren Strominaktivierung.

1.3 Ziel

Lange Zeit galt die skelettmuskelspezifische, modulatorische γ Untereinheit spannungsabhängiger Kalziumkanäle als einziger Vertreter ihres Typs. Ihr Haupteffekt besteht in einer Linksverschiebung der *Steady state*-Inaktivierungskurve und einer beschleunigten Strominaktivierung. Spekulationen über die Existenz weiterer γ Untereinheiten konnten zunächst nicht bestätigt werden. Erst 1998 stießen Letts et al. auf ein der skelettmuskelspezifischen γ Untereinheit verwandtes Gen, als sie den zugrundeliegenden Defekt bei an Absenceepilepsien leidenden, sogenannten *Stargazer* Mäusen untersuchten. Dies war der Beweis, daß γ Untereinheiten auch in neuronalen Geweben entscheidend zur Regulierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle beitragen und in kausalem Zusammenhang mit der Entstehung neuronaler Krankheitsbilder stehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels Datenbankrecherchen und Bibliothekscreening drei weitere, bis dato unbekannte Vertreter der Gruppe der γ Untereinheiten erstmals identifiziert und ihre Lokalisation durch Northern blot-Analysen und *In situ*-Hybridisierung bestimmt. Die Möglichkeit spezifischer, funktionell bedeutsamer Assoziationen mit HVA und auch LVA Kalziumkanälen, über deren Zusammensetzung

bislang wenig bekannt ist, wurde in Koexpressionsstudien untersucht. Wir fanden zwei weitere neuronale γ Untereinheiten, γ_3 und γ_4 , sowie eine zusätzliche, als γ_5 bezeichnete Untereinheit, die in vielen extraneuronalen Geweben lokalisiert ist.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme

2.1.1 Verwendete Stämme

Plasmide wurden im *Escherichia coli* Stamm XL1-blue MRF' (Stratagene) amplifiziert. Sein Genotyp lautet $\Delta(mrc)183 \Delta(mrcCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ end } A1 \text{ sup } E44 \text{ thi-1 } rec A1 \text{ gyrA96 } relA1 \text{ lac}$ [F'pro AB ϕ Z Δ M15Tn10 (Tet^r)]. Außerdem wurde der *Escherichia coli* Stamm TOP10 (Invitrogen) mit Genotyp F⁻ $mrcA\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 \text{ rec } A1 \text{ deoR } araD 139 \Delta(ara-leu)7697 \text{ galU } galK \text{ rpsL } (Str^R) \text{ end } A1 \text{ nupG}$ verwendet.

2.1.2 Nährmedien und Antibiotika

Die Bakterienanzüchtung erfolgte im Vollmedium Luria-Bertani (LB) mit Glucose. Nach Sterilisation durch Autoklavieren für 10 min. bei 121°C und 2 bar wurde das LB-Medium kühl gelagert.

Luria-Bertani-Medium(+):

Trypton (Gibco-BRL)	10g	Glucose	1g
Hefeextrakt (Gibco-BRL)	5g	H ₂ O	ad 1000ml
NaCl	5g	pH 7,2-7,5	

Zufügen eines Antibiotikums diente der Selektion plasmidtragender Bakterien. Je nach Resistenz des Plasmids wurde vor dem Animpfen der Bakterien Ampicillin bzw. Kanamycin zu einer Endkonzentration von 100µg/ml bzw. 50µg/ml zugegeben.

Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 15g/l Agar (Gibco-BRL) hinzugefügt, das heiße Medium im Wasserbad auf ca. 50°C abgekühlt und anschließend das entsprechende Antibiotikum zugegeben. Nun konnte das Medium in sterile Petrischalen gegossen werden (Ampicillinkonzentration: 50µg/ml; Kanamycinkonzentration: 25µg/ml).

2.1.3 Kultivierung

Die *E. coli* wurden aerob in LB-Medium kultiviert. Die Anzüchtung von Flüssigkulturen erfolgte in Glasröhrchen oder Erlenmeyerkolben bei 37°C und 225 rpm. Ausstreichen von Bakteriensuspensionen auf LB-Platten diente der kurzfristigen Aufbewahrung und

Vereinzelung von Kolonien. Sie konnten so nach Inkubierung bei 37°C über Nacht bis zu 8 Wochen bei 4°C gelagert werden. Längere Aufbewahrung war durch Mischung gleicher Volumina logarithmisch wachsender Kulturen und autoklavierten Glycerols (ICN) und Lagerung bei -20°C möglich.

2.2 Verwendete Plasmide

2.2.1 PCR-Blunt II-TOPO Vektor

Durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erhaltene Fragmente mit glatten Enden wurden mit dem PCR-Blunt II-TOPO Vektor (Invitrogen) kloniert. Er enthält einen Teil des lacZ-Gens, den *E.coli*-Replikationsursprung, ein Kanamycin- und ein Zeocinresistenzgen, SP6- und T7-Promotorsequenzen und ein letales Gen *ccdB*, das so lange intakt ist, solange keine Fremd-DNS in den Vektor eingebaut wurde. Dadurch wird das Wachstum „leerer Vektoren“ verhindert.

Für die einfache Ligation von blunt-end DNS-Fragmenten ist der PCR-Blunt II-TOPO Vektor linearisiert und an den jeweiligen 3'-Enden mit Topoisomerase I versehen. Topoisomerasen sind bakterielle Enzyme, die dem Einbau und der Entfernung von Verdrillungen (Supercoils) in die DNS dienen. Die hier verwendete Topoisomerase I verursacht einen Einzelstrangbruch des Plasmids, vermindert die Verdrehung der DNS, so daß die Spannung abnimmt und eine Replikation möglich wird. Anschließend verbindet sie die freien DNS-Enden wieder. Diese Ligasefunktion wurde bei der Klonierung von DNS-Fragmenten in den PCR-Blunt II-TOPO Vektor ausgenutzt.

2.2.2 pAL1

Dieser Vektor wurde aus pUC19 konstruiert, indem zu beiden Seiten der multiplen Klonierungsstelle die Sequenz für den T3- und T7-RNS-Polymerase-Promotor sowie Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *BamHI* und *Asp718* eingefügt wurden (Ludwig et al., 1997). pAL1 wurde für die Subklonierung und *In vitro*-Transkription der Gensonden zur *In situ*-Hybridisierung verwendet.

2.2.3 pcDNA3

pcDNA3 ist ein Abkömmling des pRC/CMV-Vektors (beide von Invitrogen) und diente als Expressionsvektor. Er enthält ein Ampicillin- sowie ein Neomycinresistenzgen, den pUC19 *E.coli* Replikationsursprung, den CMV-Promotor, um eine hohe Expressionsrate

des gewünschten Genes in eukaryoten Zellen zu gewährleisten, und T7- und SP6-Promotoren zur *In vitro*-Transkription. Die Stabilität der transkribierten mRNA wird durch ein Polyadenylierungssignal und Transkriptionsterminationssequenzen verbessert.

2.3 Reinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Aufgrund der aromatischen Ringsysteme der DNS-Basen absorbieren Nukleinsäuren elektromagnetische Strahlung im Bereich von 250-270nm. Deshalb kann man die Nukleinsäurenkonzentration mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes durch Messung der Extinktion bestimmen. Eine gemessene Extinktion von 1 entspricht bei einer Schichtdicke von 1cm unter Verwendung monochromatischen Lichtes der Wellenlänge 260nm:

- 50µg/ml doppelsträngiger DNS
- 40µg/ml einzelsträngiger RNS
- 33µg/ml einzelsträngigen Oligonukleotids.

Die Reinheit von DNS und RNS kann aus dem Verhältnis OD_{260}/OD_{280} abgeschätzt werden. Dieser Quotient sollte über 1,7 liegen.

2.3.2 Präzipitation

Nukleinsäuren wurden zur Aufkonzentrierung und Reinigung mit Ethanol gefällt (Sambrook et al., 1989). Dazu wurde der wäßrigen DNS- bzw. RNS-Lösung 1/10 Volumen 5M NaCl und 2,5 Volumen Ethanol (-20°C) zugefügt. Dieser Ansatz wurde 15 min. bei -80°C inkubiert, abzentrifugiert (12000 x g, 15 min., 4°C) und der Überstand vorsichtig dekantiert. Zum Entsalzen wurde das Pellet mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert (12000 x g, 5 min., 4°C), in einer Vakuumzentrifuge (Speedvac) getrocknet und schließlich in Wasser gelöst.

2.3.3 Phenol/Chloroform-Extraktion

Durch die Phenol/Chloroform-Extraktion wurden Proteine (z.B. Enzyme) aus wäßrigen Nukleinsäurelösungen entfernt, so daß man besonders reine Nukleinsäuren erhielt. Die Nukleinsäurelösung wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1, Roth) versetzt, 5 min. kräftig geschüttelt und abzentrifugiert (12000 x g, 5 min.). Die wäßrige Oberphase, in der sich die Nukleinsäuren befinden, wurde in ein

neues Gefäß überführt und mit Chloroformextraktion von den restlichen Phenolspuren befreit. Anschließend wurden die Nukleinsäuren wie beschrieben mit Ethanol präzipitiert.

2.4 Isolierung von Plasmid-DNS

2.4.1 Kochschnelltest

Zur schnellen Isolierung von Plasmid-DNS nach Holmes und Quigley (1981) wurden die Bakterien durch Lysozym, Triton X-100 (nichtionisches Detergens) und Hitze aufgeschlossen.

Eine am Vortag mit einem einzigen Zellklon beimpfte, über Nacht zur Sättigung gewachsene 7ml LB-Bakterienkultur wurde durch Abzentrifugieren geerntet. Das Bakterienpellet wurde in STET-Puffer (8% Saccharose, 5% Triton-X-100, 50mM EDTA, 50mM Tris, pH 8,0) resuspendiert und in Anwesenheit von Lysozym (Roche) und RNaseA 45 sek. aufgekocht und die Zelltrümmer anschließend bei 12000 x g, 4°C 15 min. abzentrifugiert. Das im Überstand befindliche Plasmid wurde mit Isopropanol gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Ausbeute lag bei etwa 20µg. 1/20 der Präparation wurde für die Restriktionsanalyse (s. 2.5.1) verwendet.

2.4.2 Alkalische Lyse mit Säulenchromatographie (Qiagen Kits)

Um größere Mengen hochreiner Plasmid-DNS zu erhalten, wurde das „Qiagen Maxi Kit“ verwendet. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim et al., 1979) in Verbindung mit einer anschließenden chromatographischen Reinigung über eine Anionenaustauschersäule. Die Bakterien werden in NaOH/SDS lysiert. Hierbei denaturieren die Proteine und DNS-Moleküle. RNase A verdaut die freigesetzten RNS-Moleküle. Bei der darauffolgenden Neutralisation mit Kaliumacetat renaturiert die relativ kleine Plasmid-DNS wieder und bleibt deshalb in Lösung. Das viel größere Bakterienchromosom denaturiert mit den übrigen Zelltrümmern, ausgefallenen Salzen und SDS und kann so abgetrennt werden. Die Bedingungen für den Auftrag auf die Säule und die Waschschritte wurden so gewählt, daß Proteine, Polysaccharide, RNS und andere Verunreinigungen quantitativ abgetrennt werden konnten. Die eluierte Plasmid-DNS wurde gefällt, getrocknet, in 250µl Wasser aufgenommen und bei - 20°C gelagert. Mit Aliquots der DNS wurde die Konzentration photometrisch bestimmt und eine Restriktionsanalyse durchgeführt.

2.5 Enzymatische Modifikation von DNS

2.5.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsendonukleasen bilden eine Klasse von bakteriellen Enzymen, die spezifische Sequenzen in doppelsträngiger DNS erkennen und spalten können. Sie spalten ihr DNS-Substrat innerhalb oder unmittelbar neben der oft palindromischen Erkennungssequenz. Bei der Spaltung entstehen entweder glatte Enden („blunt-ends“) oder einander komplementäre 5'- bzw. 3'-überhängende „sticky-ends“. Die DNS-Enden besitzen immer eine 5'-Phosphat- und eine 3'-OH-Gruppe, wodurch die spätere enzymatische Neuverknüpfung (Ligation) kompatibler Enden ermöglicht wird. Der Restriktionsansatz wurde bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur für 1,5 h (analytischer Ansatz) bzw. 3-8 h (präparativer Ansatz) inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch untersucht. Eine Einheit (1U) Restriktionsendonukleaseaktivität entspricht der Menge an Enzym, die nötig ist, um 1µg DNS unter optimalen Bedingungen innerhalb einer Stunde vollständig zu spalten.

2.5.2 Dephosphorylierung von DNS-Molekülen mittels alkalischer Phosphatase

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP = calf intestine phosphatase) spaltet endständige 5'-Phosphatgruppen von DNS-Molekülen ab. Linearisierte Vektoren wurden dephosphoryliert, um einen intramolekularen Ringschluß während der Ligation zu verhindern und so die Klonierungseffizienz der Fremd-DNS zu erhöhen.

Das linearisierte Plasmid (etwa 5pmol) wurde in 50mM Tris pH 8,0 mit 1U CIP (Boehringer) für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Hitzedenaturierung des Enzyms (10 min., 75°C) konnte die Vektor-DNS in einen Ligationsansatz eingesetzt werden.

2.5.3 T4-DNS-Ligase

Die T4-DNS-Ligase (NEB) katalysiert ATP-abhängig die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxylende von doppelsträngiger DNS oder RNS (Weiss et al., 1968). Sie wurde eingesetzt, um Fremd- und Vektor-DNS kovalent zu rekombinanter Plasmid-DNS zu verknüpfen. Ligase, linearisierter Vektor und Fremd-DNS wurden in Ligasepuffer gemischt und für etwa 16 h bei 16°C inkubiert. Anschließend konnte das rekombinante Plasmid durch Transformation in *E. coli* eingeschleust werden (s. 2.6).

2.5.4 Ligation in einen TOPO Vektor

Zur Ligation eines DNS Fragmentes in den PCR-Blunt II-TOPO war keine Ligase erforderlich, da dieser Vektor mit der Topoisomerase I gekoppelt ist, die ebenfalls eine Ligasefunktion besitzt. Es wurden das zu klonierende DNS Fragment und der Vektor gemischt und 5 min. bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz sofort auf Eis gestellt und möglichst bald transformiert.

2.6 Transformation von Bakterien

2.6.1 Präparation von kompetenten Bakterienzellen

Als kompetente Zellen bezeichnet man bakterielle Zellen, die in der Lage sind, Fremd-DNS in ihr Zellinneres aufzunehmen. Hier wurden *E. coli* Bakterien durch kurzfristige Behandlung mit Dimethylsulfoxid (DMSO) kompetent gemacht. Man beimpfte 100ml LB(-)-Medium (ohne Glucose) mit 1ml einer Übernachtskultur ausgehend von einer frischen Einzelkolonie von *E.coli* XL1-blue. Sobald eine OD₆₀₀ von 0,35 bis 0,38 erreicht war, wurde die Kultur abgekühlt und abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 15ml 1x TSS resuspendiert, in Portionen von je 500µl aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

1x TSS(Transformation and Storage Solution):

PEG (Polyethylenglykol) 3350	12,5ml	100%DMSO	2,5ml
1M MgCl ₂	2,5ml	LB-Medium	ad 50ml

2.6.2 Transformation von *E. coli*

Die Einschleusung von DNS in Bakterienzellen bezeichnet man als Transformation. Bei geeignetem Selektionsdruck, der sich durch Zugabe von Antibiotika erreichen läßt, wird ein so in die Zelle geschleustes Plasmid stabil auf die Tochterzelle vererbt.

Die kompetenten Bakterienzellen wurden aufgetaut, zu dem Ligationsansatz (s. 2.5.4) pipettiert und zur Aufnahme der DNS auf Eis gestellt. Für die Transformation des PCR-Blunt II-TOPO Vektors wurden nicht selbst hergestellte kompetente Bakterien, sondern die TOP10 Zellen von Invitrogen verwendet. Nach einer Erholungsphase in LB-Medium bei 37°C wurde die Bakteriensuspension auf Ampicillin-Agarplatten (bei Verwendung des PCR-Blunt II-TOPO-Vektors Kanamycin-Platten) ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Die erhaltenen Klone konnten mittels Kochschnelltest (s. 2.4.1) auf Anwesenheit des rekombinanten Plasmids überprüft werden.

2.7 Auftrennung und Isolierung von DNS-Fragmenten

Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen und können deshalb in dem elektrischen Feld eines Gels nach ihrer Masse aufgetrennt werden. Durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid können die getrennten Nukleotidfragmente im UV-Licht (302nm) als diskrete Banden im Gel sichtbar gemacht werden. Zum Größenvergleich diente ein DNS-Standard (1kb Ladder, Gibco-BRL). Um den Verlauf der Elektrophorese zu kontrollieren, wurden dem Auftragspuffer Farbmarker zugegeben. Bromphenolblau wandert etwa mit DNS-Fragmenten von 100-10bp und markiert daher die Elektrophorese-Front. Xylencyanol wandert mit DNS-Fragmenten von ca. 5kb.

Lösungen:

10x TBE:

Tris (USB)	0,9M
Borsäure (Merck)	0,9M
EDTA pH 8,0 (ICN)	20mM

Auftragspuffer (6x dye):

Ficoll Typ 400 (Sigma)	18%
EDTA pH 8,0	0,12mM
TBE	6x

Ethidiumbromidstammlösung:

10mg/ml (Sigma), wässrig

Bromphenolblau(ABI)	0,15%
Xylencyanol (Sigma)	0,15%

Elektrophoresepuffer:

1x TBE (1 Teil 10x TBE + 9 Teile Wasser)

2.7.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

DNS-Fragmente mit einer Größe von 50-1000bp wurden durch vertikale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Dafür wurden 5%ige Polyacrylamidgele in 1x TBE als Laufpuffer (Sambrook et al., 1989) verwendet. Die Trennstrecke betrug 15cm und die Dicke 0,75mm (analytische Gele) bzw. 1,5mm (präparative Gele).

Zusammensetzung von 30ml Polyacrylamidgel:

Rotiphoresegel (Acrylamid/N,N'-Bisacrylamid = 29:1, 40%, Roth)	3,75ml
10x TBE	3ml
H ₂ O	ad 30ml
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, Sigma)	35µl
20% APS (Ammoniumpersulfat, Sigma)	80µl

Den DNS-Proben wurde vor dem Auftragen 1/6 Volumen Auftragspuffer zugegeben. Zum Einlaufen wurde eine Spannung von 100V angelegt, zur Trennung schließlich für 1 h

270V. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 5 min. lang in Ethidiumbromidlösung (0,5µg/ml) gefärbt und das Bandenmuster unter UV-Licht ausgewertet.

2.7.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten im Bereich von 1 bis 12kb wurde die horizontale Gelelektrophorese in Agarosegelen (Sambrook et al., 1989) durchgeführt. 0,7% (g/v) Agarose (Seakem GTG, Biozym) wurde in 1x TBE im Mikrowellenherd aufgeschmolzen. Der Gellösung wurde vor dem Gießen in eine horizontale Biorad-Elektrophoresekammer Ethidiumbromid zugegeben (finale Konzentration im Gel: 800ng/ml). Die Elektrophorese erfolgte für 1 h bei konstanter Spannung von 100V mit 1x TBE als Laufpuffer.

2.7.3 Elektroelution (modifiziert nach Davis et al., 1986)

Um ein DNS-Fragment bestimmter Größe aus einem Gemisch isolieren zu können, wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung durchgeführt und die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Dieses Gelstück wurde mit 1x TBE in einen Dialyse-Schlauch (Sigma) überführt und die DNS in einer horizontalen Elektrophoresekammer bei 140mA auf Eis aus dem Gel eluiert. Nach etwa 1,5 h wurde die DNS durch Ethanolfällung (s. 2.3.2) isoliert.

2.8 Datenbanksuche

Um neue γ Isoformen zu identifizieren wurden sämtliche öffentlich zugänglichen Datenbanken durchsucht. Als Sonde wurden die Proteinsequenzen von γ_1 und γ_2 verwendet. Es wurde sowohl mit dem BLASTP-Programm nach Homologien in einer anderen Proteinsequenz als auch mit dem tBLASTN-Programm nach Homologien in einer Nukleotidsequenz gesucht. Bei dem tBLASTN-Modus werden die durchsuchten Nukleotidsequenzen in allen möglichen Leserahmen in die Proteinsequenz übertragen.

2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) (Saiki et al., 1988) ist ein *In vitro*-Verfahren zur selektiven Amplifikation von definierten Nukleinsäuresequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen. Zwei Oligonukleotid-Primer sind erforderlich, die spezifisch an den kodierenden bzw. an den nicht-kodierenden Strang einer DNS-Sequenz binden. Die DNS-Matrize wird durch

Hitzedenaturierung bei 94°C zunächst für 1 min. aufgeschmolzen. Danach können die Primer, die in großem molarem Überschuß vorliegen, an ihre entsprechende Zielsequenz binden (Primer-Annealing, 45-60°C, 1 min.). Ausgehend von diesem kurzen doppelsträngigen Bereich wurde durch eine hitzestabile DNS-Polymerase der fehlende, komplementäre Einzelstrang in 5'→3'-Richtung synthetisiert (Elongation, 72°C). Je nach Länge des zu amplifizierenden Fragments betrug die Elongationszeit eine bis fünf Minuten. Nach erneutem Aufschmelzen der DNS und Primer-Annealing arbeitet die DNS-Polymerase wieder weiter. Mit jedem Zyklus kommt es im Idealfall zu einer Verdopplung der DNS und damit in einer Kettenreaktion zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung der durch die Oligonukleotide flankierten DNS-Sequenz. Theoretisch entstehen bei n Zyklen 2^{n-1} amplifizierte Moleküle.

Mittels PCR wurden DNS-Fragmente aus der cDNS von Mausgehirn und einer gemischten Organpräparation von neugeborenen Mäusen zur Herstellung von Gensonden und zur Konstruktion von Expressionsvektoren amplifiziert.

2.9.1 Standardprotokoll

Die PCR fand in einem Thermocycler (Omni Gene HB-TR 3) von Hybaid statt. Als thermostabile Polymerasen wurden die *PfuTurbo* DNS-Polymerase von Stratagene bzw. die *Taq* DNS-Polymerase von Roche verwendet. Als Ausgangs-DNS wurden entweder 10-20ng Plasmid-DNS oder 10ng cDNS eingesetzt.

Reaktionsansatz:

Primer A (10pmol/μl)	2,5μl		
Primer B (10pmol/μl)	2,5μl	<i>PfuTurbo</i> DNS-Polymerase (2,5U/μl)	1,0μl
dNTPs	8,0μl	bzw.	
10x PCR-Puffer	5,0μl	<i>Taq</i> DNS-Polymerase (5 U/μl)	1,0μl
DNS	1,0μl	H ₂ O	ad 50μl

Zunächst wurde der Reaktionsansatz zusammenpipettiert, mit Öl überschichtet und bei 94°C für 5 min. denaturiert. Danach wurde die DNS in 25-40 Zyklen aus Denaturierung, Annealing und Elongation vermehrt. Abschließend erfolgte eine letzte Verlängerungsphase von 10 min. bei 72°C, so daß möglicherweise nicht in ganzer Länge amplifizierte DNS-Fragmente vervollständigt werden konnten.

2.10 Sequenzierung von Plasmid-DNS

Die Sequenzanalyse von rekombinanter Plasmid-DNS erfolgte nach der von Sanger et al. (1977) entwickelten Didesoxymethode. Dabei synthetisiert eine DNS-Polymerase *in vitro* an einer einzelsträngigen DNS-Matrize den komplementären Strang. In Anwesenheit von 2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs) kommt es zu Kettenabbrüchen, da eine OH-Gruppe in 3'-Position der Nukleotide für eine Verlängerung der DNS notwendig ist. Bei sorgfältiger Wahl des Verhältnisses zwischen dNTPs und ddNTPs entsteht eine Mischung aus DNS-Fragmenten jeder möglichen Länge. Die unterschiedlich langen DNS-Fragmente werden durch den Einbau der mit Fluoreszenzfarbstoffen versehenen Didesoxynukleotide markiert. So können Guanin, Cytosin, Adenin und Thymin in einem Ansatz sequenziert werden, da jede der vier Basen einen anderen Fluoreszenzfarbstoff trägt.

2.10.1 Sequenzreaktion

Für die Sequenzreaktionen zur Synthese der unterschiedlich langen, fluoreszierenden DNS-Fragmente wurde folgendes Standardprotokoll verwendet:

Sequenzreaktion:

Ready Reaction Mix (Perkin Elmer)	6µl	DNS (50-500ng)	1µl
Primer (0,8pmol/µl)	4µl	H ₂ O	ad 20µl

Die vier verschiedenen ddNTPs, die bei einer jeweils anderen Wellenlänge fluoreszieren (ddGTP: 540nm, ddATP: 570nm, ddTTP: 600nm, ddCTP: 630nm) sind in dem Ready-Reaction Mix enthalten. Der Ansatz der Sequenzreaktion wird kurz gemixt, mit 40µl Öl überschichtet und in dem Thermozykler (Omni Gene HB-TR 3) von Hybaid amplifiziert. Zunächst wird die DNS für 2 min. bei 95°C denaturiert. Anschließend werden 25 Zyklen durchgeführt, die ähnlich wie bei der PCR aus einer Denaturierungs-, einer Annealings- und einer Elongationsphase bestehen:

- 95°C für 30 sek.
- 50°C für 40 sek.
- 60°C für 4 min.

Da nur ein Primer zugegeben wird, findet bei dieser Sequenzreaktion nur eine lineare Vermehrung der DNS-Matrize statt und nicht wie bei der PCR eine exponentielle Amplifikation.

Das Produkt der Sequenzreaktion muß mittels einer Säule (CentiSep Colum, Perkin Elmer), die für 2 h mit 800µl H₂O bei Raumtemperatur inkubiert wird, von den überflüssigen fluoreszierenden Nukleotiden gereinigt werden. Zunächst wird die Säule für 2 min. bei 2500 rpm zentrifugiert, um das überschüssige Wasser abzutrennen. Anschließend pipettiert man das Produkt der Sequenzreaktion auf die Säule und zentrifugiert wieder für 2 min. bei 2500 rpm. In einem Gefäß unter der Säule wird die gereinigte DNS aufgefangen und anschließend für 15 min. in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Pellet wird in 20µl Template Suppression Reagent (Perkin Elmer) resuspendiert, für 3 min. bei 95°C denaturiert und in den Sequencer ABI PrismTM gestellt. Die Lösung wird von dem Sequencer automatisch in eine mit Polymer (Perkin Elmer) gefüllte Kapillare aufgezogen. Durch die angelegte Spannung von 12,2 kV wandern die DNS-Fragmente in 5'→3'-Richtung auf den Laserdetektor zu. Aus der Abfolge der von diesem bestimmten Farbsignale errechnet der Computer die vorliegende Nukleotidsequenz.

2.11 Herstellung ³²P-markierter DNS-Gensonden

Um ³²P-markierte DNS-Gensonden zu erhalten, wurde das „Random Primed Labeling Kit“ (Boehringer) verwendet. Das als Matrize eingesetzte DNS-Fragment stammt aus einer PCR oder wird durch Restriktionsenzyme aus Plasmid-DNS herausgeschnitten. Als „random“-Primer dient ein Gemisch aus verschiedensten Hexanukleotiden (Feinberg et al., 1983), die an die Matrizen-DNS binden und an deren 3'-Ende die Synthese des komplementären Stranges durch das Klenow-Enzym beginnt. Das Klenow-Enzym ist ein Fragment der DNS-Polymerase I aus *E.coli*, dem der C-Terminus und damit die 5'→3'-Exonukleaseaktivität fehlt. Es dient zum Einbau von ³²P-markiertem dCTP in den Strang. Nach Abschluß der Reaktion müssen überschüssige, nicht eingebaute Desoxyribonukleosidtriphosphate durch Säulenchromatographie an einer NickTM Säule (Pharmacia) entfernt werden. Die gereinigte Probe wird nun mit TE-Puffer von der Säule eluiert und ihre spezifische Aktivität mit Hilfe eines Szintillationszählers bestimmt.

TE-Puffer:	1M Tris pH 8,0	10ml
0,5M EDTA, pH 8,0	2ml	ad 1000ml
	H ₂ O	

2.12 Northern blot-Analyse

Mit der Northern blot-Analyse konnten Vorkommen und Größe bestimmter RNS Transkripte in verschiedenen Geweben mittels Detektion mit einer DNS-Sonde untersucht werden. Es wurden vorgefertigte Northern blots der Firma Clontech verwendet. Auf die Membranen ist bereits die immobilisierte RNS verschiedener Gewebe von Mensch und Maus gebunden. Sie wurden mit 1ml Prähybridisierungspuffer pro 5cm² Filter in einen Hybridisierungsbeutel (Gibco-BRL) eingeschweißt und im Wasserbad für drei Stunden bei 42°C inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte bei gleicher Temperatur in der Hybridisierungslösung, die die geeignete ³²P-markierte Gensonde einer Länge von 400-700bp enthielt (5x10⁶cpm/ml). 15 bis 18 Stunden später wurde mit den folgenden Waschschritten unspezifisch gebundene und überschüssige Sonde von der Membran entfernt:

- 2 x 5 min. in 2x SSC, 0,1% SDS-Lösung bei Raumtemperatur
- 2 x 10 min. in 1x SSC, 0,1% SDS-Lösung bei Raumtemperatur
- 2 x 15 min. in 0,1x SSC, 0,1% SDS-Lösung bei 42°C

Auf den Filter wurde ein Film (Hyperfilm, Amersham) aufgelegt und zwischen zwei signalverstärkenden Folien in einer Kassette für 6 bis 48 Stunden bei -80°C gelagert. Nach der Entwicklung des Films war dort, wo die Gensonde mit der gesuchten, komplementären RNS hybridisiert hatte, eine schwarze Bande erkennbar. Die Größe der RNS ließ sich durch eine auf der Membran befindlichen Längenstandard erschließen. Der Filter konnte nach zwei viertelstündigen Waschschritten mit 0,1x SSC, 0,1% SDS-Lösung bei 95°C erneut zur Hybridisierung eingesetzt werden.

5x PE-Lösung:

Natriumphosphat	1g	H ₂ O	ad ca. 150ml
SDS	10g	→ bei 65°C in etwa 30 min. lösen	
Polyvinylpyrrolidon (40.000)	2g	→ auf 37°C abkühlen lassen	
Ficoll (400.000)	2g	+ 5% BSA (frisch)	40ml
1M Tris pH 7,5	50ml	+H ₂ O	ad 200ml
0,5 M EDTA	10ml	Sterilfiltrieren und bei -20°C lagern.	

Prähybridisierungslösung:

5x PE	2,0ml		
20x SSC	2,5ml	ssDNS (salmon sperm)	150µl
100% Formamid, deionisiert	5,0ml	H ₂ O	ad 10ml

Hybridisierungslösung:

5x PE	1,0ml	ssDNS(10mg/ml,Gibco-BRL)	75µl
20x SSC	1,25ml	Gensonde	[5x10 ⁶ cpm/ml]
100% Formamid, deionisiert	2,5ml	H ₂ O	ad 5ml

Zur Denaturierung der DNS erhitzt man die Hybridisierungslösungen kurz vor ihrer Verwendung 10 min. lang im kochenden Wasserbad.

2.13 *In situ*-Hybridisierung

Wenn die Methoden der Nukleinsäure-Hybridisierung direkt an einem Gewebeschnitt angewandt werden, um Boten-RNS-Moleküle im Gewebe („in situ“) nachzuweisen und zu lokalisieren, spricht man von *In situ*-Hybridisierung.

Es wurden 120-160bp lange DNS-Sequenzen verwendet, die einem Abschnitt der zu untersuchenden mRNA entsprachen und einzigartig für das zu untersuchende Gen waren. Diese wurden in den Transkriptionsvektor pAL1 kloniert. DNS-abhängige RNS-Polymerasen, die ihren jeweiligen Promotor erkennen, synthetisieren cRNS nach Linearisierung des Plasmids durch *BamHI* bzw. *Asp718*. Je nach Orientierung entsteht der „Antisense“-Gegenstrang, der komplementär zur Boten-RNS ist, oder der „Sense“-cRNS-Einzelstrang. Durch Einbau von ³⁵S-UTP werden die RNS-Gensonden radioaktiv markiert. Nach Zugabe der Gensonden auf vorbehandelte Gewebeschnitte bildet die Antisenseprobe ein stabiles mRNA/cRNS-Hybrid mit der mRNA im Gewebe. RNase A baut spezifisch einzelsträngige RNS ab, nicht aber das doppelsträngige Hybrid. Durch Autoradiographie kann die erfolgreiche Hybridisierung sichtbar gemacht werden.

2.13.1 Verwendete Lösungen

H₂O_{DEPC}:

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	1,0g
H ₂ O	ad 1000ml

Über Nacht rühren lassen, danach durch Autoklavieren Reste von DEPC entfernen.

1M Tris:

Tris-Base	121g
H ₂ O	ad 1000ml

pH mit HCl_{conc} auf 8,0 einstellen.

10x PBS:

NaCl	80g
KCl	2g
Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	6,2g
KH ₂ PO ₄	2g
H ₂ O	ad 1000ml
Hat ca. pH 7,4.	

0,5M EDTA, pH 8,0:

Na ₂ EDTA*2 H ₂ O	186,1g
H ₂ O	ad 1000ml
Mit 5M NaOH auf pH 8,0 einstellen.	

5x Protease-Puffer:

1M Tris pH 8,0	250ml
0,5M EDTA pH 8,0	25ml
H ₂ O	ad 1000ml

5x RNase A-Puffer:

5M NaCl	250ml
1M Tris pH 8,0	25ml
0,5M EDTA pH 8,0	5ml
H ₂ O	ad 500ml

3M Natriumacetat, pH 5,2:

Natriumacetat*3H ₂ O	40,8g
H ₂ O	ad 100ml
Mit Eisessig auf pH 5,2 einstellen.	

Alle oben genannten Lösungen wurden RNase-frei hergestellt und durch Autoklavieren sterilisiert.

1M DTT:

Dithiothreitol (ICN)	1,5g
3M NaAcetat	33µl
H ₂ O	ad 10ml
Sterilfiltrieren, aliquotiert bei -20°C haltbar.	

Chloralhydratlösung:

Chloralhydrat	3,0g
10x PBS pH 7,4	1ml
H ₂ O	ad 10ml
Sterilfiltrieren, bei 4°C 4 Wo. haltbar.	

50% Dextran:

Dextransulfat (MG=5x10 ⁵)	12,5g
H ₂ O	ca. 12ml
3h bei 68°C lösen	
H ₂ O	ad 25ml
Bei -20°C lagern.	

Box-Puffer:

Formamid	50ml
20x SSC	20ml
H ₂ O	ad 100ml

Formamid (deionisiert):

Ionenaustauscherharz (BioRad)	ca. 5g
Formamid	ca. 45ml
Bei 4°C lagern.	

4% PFA:

Paraformaldehyd	6g
10x PBS	15ml
H ₂ O	ad 150ml
Bei 60°C lösen, auf 4°C abkühlen, frisch zubereiten.	

50x Denhardt:

Ficoll	1g
Polyvinylpyrrolidon	1g
BSA	1g
H ₂ O	ad 100ml
Sterilfiltrieren, aliquotiert bei -20°C lagern.	

1,25x Hybridisierungspuffer:

1M Tris pH 8,0	0,625ml
5M NaCl	3,75ml
0,5M EDTA pH 8,0	0,125ml
50x Denhardt	1,25ml
50% Dextran	12,5ml
Formamid (deionisiert)	31,25ml
H ₂ O	ad 50ml

2.13.2 Herstellung der RNS-Gensonden

Spezifische Gensonden für γ_2 bis γ_4 wurden durch PCR (s. 2.9) amplifiziert und anschließend über *BamHI*- / *Asp718*-Schnittstellen in den Vektor pAL1 ligiert. Alle Insertionen wurden auf beiden Strängen sequenziert.

Für die Sense- bzw. Antisense-Sonde werden je 12µg Plasmid-DNS mit *BamHI* bzw. *Asp718* über Nacht bei 37°C linearisiert (s. 2.5.1) und nach Phenol/Chloroform-Reinigung (s. 2.3.3) mit Ethanol gefällt, in 10µl H₂O_{DEPC} gelöst und bei -20°C gelagert. Die *In vitro*-Transkription wird mit jeder Probe einmal ohne das radioaktiv markierte ³⁵S-UTP „kalt“ getestet und das entsprechende RNS-Produkt gelelektrophoretisch untersucht. Anschließend wiederholt man die *In vitro*-Transkription mit radioaktivem ³⁵S-UTP. Die T7-RNS-Polymerase synthetisiert bei diesem System einen RNS-Strang, der komplementär zur entsprechenden Boten-RNS ist, die sogenannte Antisense-Probe. Die T3-Polymerase synthetisiert den zur Antisense-Probe komplementären Sense-Strang. DNase baut nach erfolgter *In vitro*-Transkription die DNS-Matrize ab: Es folgt die chromatographische Auftrennung des Ansatzes (NickTM Column, Pharmacia). Von den Fraktionen 1 bis 5 pipettiert man jeweils 2µl zu 3ml Szintillationsflüssigkeit und mißt die Aktivität im Szintillationszähler. Die radioaktiv markierte Gensonde befindet sich in Fraktion 2 und wird zur besseren Stabilität in Hybridisierungslösung auf eine Konzentration von 1x10⁷dpm/ml verdünnt und mit Transfer-RNS (tRNS, RNase-frei, Boehringer) mit einer Endkonzentration von 0,5µg/µl und DTT mit einer Endkonzentration von 10mM gemischt. Dabei dient DTT als Antioxidans der Stabilität des ³⁵S und die tRNS der Verminderung unspezifischer Bindungen und des Hintergrundrauschens.

2.13.3 Anfertigung von Gewebsschnitten

Sämtliche für die *In situ*-Hybridisierung verwendeten Mäusegewebe stammten von erwachsenen, C57/bl6 Mäusen. Die entnommen Organe wurden auf Eis zwischengelagert

und in 2-Methylbutan eingefroren, das in einer Trockeneis-Ethanol-Mischung auf -40°C gekühlt wurde. In luftdichten Gefäßen konnten die Organe bei -80°C gelagert werden.

In einem Kryostat (Leica, Jung CM 3000) wurden bei -20°C $16\mu\text{m}$ dicke Präparate von den Geweben geschnitten und auf Polylysin-beschichtete Objektträger (PolysineTM, Menzel Gläser) aufgeschmolzen. Die Objektträger wurden eine halbe Stunde unter Vakuum getrocknet und bei Raumtemperatur mit 4%iger Paraformaldehydlösung für 20 min. fixiert. Nach einem Waschgang mit 0,5x SSC wurden die Schnitte in aufsteigenden Ethanolkonzentrationen (50%, 70%, 95%, 100%) entwässert. Die Schnitte wurden für mindestens 30 min. vakuumgetrocknet. Falls sie nicht gleich zur *In situ*-Hybridisierung weiterbearbeitet wurden, konnten sie bei -80°C in einer luftdichten Box zusammen mit viel Trockenmittel (Silikagel) über Monate hinweg gelagert werden.

2.13.4 Standardprotokoll der *In situ*-Hybridisierung (nach Simmons et al., 1989)

Die trockenen, fixierten Schnitte wurden für 15 min. mit $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Proteinase K in 1x Proteasepuffer vorbehandelt.

- Waschschrift: 5 min. in 0,5x SSC

Um eine unspezifische Bindung der Sonde an den Schnitten zu vermeiden wurde das Gewebe azetyliert:

- 3 min. in 0,1M TEA (Triethanolaminhydrochlorid) pH 8,0 inkubieren

- 10 min. in 0,25%iger Essigsäureanhydridlösung in 0,1M TEA

- 2 Waschschrte: je 2 min. in 2x SSC

Entwässerung der Schnitte:

- je 3 min. in 50%, 70%, 95%, 100% Ethanol

- 5 min. lufttrocknen

- 30 min. vakuumtrocknen

Die Objektträger (OT) wurden in einer dicht verschließbaren Box waagrecht auf ein Gitter gelegt und die Gewebeschnitte mit der dickflüssigen Prähybridisierungslösung bedeckt, die aus 8 Anteilen 1,25x Hybridisierungspuffer, 1 Anteil 1M DTT und 1 Anteil Wasser bestand. Um ein feuchtes Milieu in der Box aufrechtzuerhalten und damit ein Antrocknen der Hybridisierungslösung zu verhindern, wurde Saugpapier auf den Gefäßboden gelegt und mit Boxpuffer getränkt. Die Prähybridisierung erfolgte für zwei Stunden bei 42°C .

Sense- und Antisenseprobe (mit 1×10^7 dpm/ml Hybridisierungspuffer) wurden 10 min. im 65°C Wasserbad erhitzt und nach Zugabe von 80 µl 1M DTT pro 1ml Probenlösung zentrifugiert (2 min., 2000 rpm). 30 bis 100 µl der Hybridisierungslösung mit Antisense- bzw. Sense-Probe wurden auf die prähybridisierten Schnitte pipettiert, die man danach bei 55°C für etwa 16 h inkubierte.

Die Objektträger wurden am nächsten Tag in einen Glasträger gestellt und in Glasgefäßen von unspezifisch gebundener Probe befreit. Um den im RNS/RNS-Hybrid gebundenen ^{35}S zu stabilisieren, enthielten die Waschlösungen 1mM DTT und 1mM EDTA pH 8,0. Die mit Sense- und Antisense-Probe hybridisierten Schnitte wurden vollkommen gleich behandelt.

- 2 Waschschrte: je 10 min. 2x SSC
- RNase A-Verdau: 30 min. in 20 µg/µl RNase A in 1x RNase-Puffer

RNase A baut spezifisch einzelsträngige RNS ab, RNS/RNS-Hybride bleiben davon unberührt.

- 2 Waschschrte: je 10 min. in 2x SSC bei Raumtemperatur
- 2 Waschschrte: je 1 h in 0,1x SSC bei 60 bis 70°C
- 3 Waschschrte: je 10 min. in 0,5x SSC bei Raumtemperatur
- Entwässern:
 - je 3 min. in 50%, 70%, 95%, 100% Ethanol

Die verdünnten Ethanolösungen enthielten je 2,3% Ammoniumacetat, um das RNS/RNS-Hybrid zu stabilisieren.

- 5 min. lufttrocknen
- 30 min. vakuumtrocknen

Die getrockneten Objektträger wurden auf Karton aufgeklebt und ein Film (Kodak BioMax MR) aufgelegt. Nach 6 bis 20 Tagen Exposition bei 4°C wurde der Film entwickelt.

2.13.5 Filmemulsion

Ob in einem Gewebe eine *In situ*-Hybridisierung prinzipiell stattgefunden hat, kann mit Hilfe des exponierten Filmes geklärt werden. Um die Lokalisation der hybridisierten mRNS auf zellulärer Ebene bestimmen zu können, muß eine Mikroautoradiographie durchgeführt werden. Das heißt, die Objektträger mit den markierten Gewebsschnitten werden mit einer Filmemulsion überzogen, die man nach vier- bis achtwöchiger Exposition

entwickelt. Unter dem Lichtmikroskop kann man nun das Gewebe und die darüberliegenden Silberkörner untersuchen, die durch die radioaktive Gensonde ausgelöst wurden.

Die im folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden in der Dunkelkammer ohne jegliche Beleuchtung ausgeführt: Die Filmemulsion Kodak NTB-2 (Kodak) wurde 10 min. im 42°C Wasserbad aufgeschmolzen und die Objektträger nacheinander eingetaucht, langsam wieder herausgezogen und senkrecht in einen Metallständer gestellt. Nach dem Trocknen der Emulsion wurden die Objektträger in eine lichtdichte Box verpackt, die viel Silikagel enthielt, und bei 4°C lichtgeschützt gelagert. Die Filmemulsion bewahrte man nach Abkühlen - vor Licht und radioaktiver Strahlung geschützt - bei 4°C auf.

Entwicklung der Filmemulsion:

Die Entwicklerlösung (Kodak Developer D1-19) mußte mit Wasser 1:1 verdünnt werden. Anschließend wurden Entwickler und Fixierlösung (Kodak Fixer) filtriert und in Glasgefäßen auf 15°C temperiert. In der Dunkelkammer wurden die Objektträger aus der Box geholt, in einen Glasständer gestellt und nacheinander in die Lösungen getaucht:

- 4 min. in den Entwickler
- 10 sec. in Wasser
- 5 min. in den Fixierer
- 5 min. in Wasser

Anschließend ließ man die Objektträger (OT) noch mindestens 30 min. im Wasser stehen, bevor sie gefärbt wurden. Die Emulsionsschicht auf der Rückseite der OT wurde nach dem Trocknen mit einem Skalpell entfernt.

2.13.6 Histologische Färbungen

Um die Morphologie der Gewebeschnitte untersuchen zu können, wurden sie nach der Entwicklung der Filmemulsion mit Hämatoxylin/Eosin (HE) oder Toluidinblau behandelt. HE färbt die Kerne blauviolett und das Zytoplasma rosa, wohingegen Toluidinblau sowohl Kerne als auch Zytoplasma bläut. Nach der Färbung wurden die Gewebeschnitte mit DePeX-Harz (Serva) und Deckgläschen bedeckt und standen für die Mikroskopie zur Verfügung.

HE-Färbung:

OT für 1min. in die Hämatoxylinlösung	
2x2 min in H ₂ O	8x in 95% Ethanol eintauchen
5 sek. in 0,1% Ammoniaklösung (frisch!)	8x in 100% Ethanol eintauchen
2x2 min. in H ₂ O	2 min. in 100% Ethanol
für 1min. in die Eosinlösung	2x2 min. in Xylol

Eosin-Lösung:

Eosin Y	6,0g	
Phloxine B	1,5g	
70% Ethanol	ad 250ml	

Hämatoxylinlösung (Sigma):

Hämatoxylin	7,5g/l
-------------	--------

Toluidinblau-Färbung:

OT für 10-30 min. in Toluidinblaulösung
 3x in H₂O tauchen
 in 30% Ethanol nach Bedarf entfärben
 trocknen lassen
 2x2 min. in Xylol

Toluidinblau-Lösung:

Toluidinblau (Sigma)	10g/l
----------------------	-------

2.13.7 Mikroskopie und Photographie

Die angefärbten Gewebsschnitte wurden mit einem Zeiss Axioskop im Hell- und Dunkelfeld untersucht. Photographien wurden von 10-, 20- und 40-fachen Vergrößerungen mit einer Contax 167 MT-Kamera aufgenommen. Als Schwarz-Weiß-Negativfilm wurde der Kodak 5052 TMX, 100 ASA verwendet.

2.14 Koloniehybridisierung auf Nitrocellulosefiltern

Das Verfahren der Koloniehybridisierung wurde angewandt, um aus cDNS-Bibliotheken aus Mausgehirn bzw. -niere Klone der γ_4 bzw. γ_5 Untereinheit zu isolieren. Zunächst wurden von den 80 Filtern, auf denen die ca. 500.000 Klone ausplattiert waren, identische Kopien des Kolonienmusters erstellt. Das geschah durch Anfertigen eines Abklatschpräparates auf einen zweiten Nitrocellulosefilter. Diese sogenannten Replika wurden auf Ampicillinplatten für etwa 4 h bei 37°C inkubiert, bis die Kolonien darauf ausreichend groß gewachsen waren. Die Bakterien auf den Replika wurden durch Behandlung mit 0,5N Natronlauge abgetötet und die enthaltene DNS dabei denaturiert. Nach Neutralisation mit 1M Tris pH 7,5 wurden die Nitrocellulosemembranen für 2,5 h bei

80°C unter Vakuum gebacken. Die denaturierte einzelsträngige DNS wurde so auf die Trägermembran fixiert. Durch Waschen der Filter in 3x SSC, 0,1% SDS bei 60°C konnten die restlichen Zellbestandteile entfernt werden, und die Filter waren zur Hybridisierung fertig.

Jeweils 20 Filter wurden in einer Petrischale (d=85mm) mit 12ml Prähybridisierungspuffer für 3 h bei 60°C inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte im Hybridisierungspuffer bei 50°C über Nacht. Nach 15-20 h wurde die ungebundene Sonde in folgenden Waschschrritten entfernt:

- 2x 5 min. in 3x SSC, 0,1% SDS-Lösung bei Raumtemperatur
- 2x10 min. in 1x SSC, 0,1% SDS-Lösung bei Raumtemperatur
- 2x30 min. in 0,3x SSC, 0,1% SDS-Lösung bei 50°C

Die Filter wurden auf einen Karton aufgelegt und in einer Filmkassette zwischen zwei Verstärkerfolien mit einem Röntgenfilm bedeckt. Nach 6-24 h Exposition bei -80°C waren die positiven Kolonien, die die gesuchte DNS enthielten, als schwarze Punkte auf dem Film erkennbar. Durch Vergleich des Röntgenfilms mit den Originalagarplatten konnten die richtigen Kolonien identifiziert und angezogen werden. Falls die Bakterien so dicht gewachsen waren, daß eine eindeutige Zuordnung des Signals zu einer Kolonie nicht möglich war, mußten die Bakterien eines ganzen Bereiches verdünnt und nochmals ausplattiert werden. Die Hybridisierung wurde mit diesen Verdünnungen wiederholt.

Prähybridisierungslösung:		Hybridisierungslösung:	
20x SSC	1,8ml	20x SSC	1,8ml
50x Denhardt	2,4ml	50x Denhardt	2,4ml
ssDNS (10mg/ml)	0,18ml	ssDNS (10mg/ml)	0,18ml
H ₂ O	ad 12ml	³² P-Gensonde	5x10 ⁵ cpm/ml
		H ₂ O	ad 12ml

Die ssDNS (salmon sperm) wurde vor Verwendung für 10 min. zur Denaturierung gekocht.

2.15 Zellkultur

Das Anlegen der Zellkulturen und die elektrophysiologischen Messungen wurden von Herrn Dr. S. Dai und Frau Dr. L. Lacinová durchgeführt.

2.15.1 Eukaryotische Zelllinien

Für die Expression in eukaryotischen Zellen wurde die permanente Zelllinie HEK293 (ATCC® Nr. CRL 1573; Graham et al., 1977) verwendet. HEK293 Zellen sind stabil mit dem humanen Adenovirus Typ 5 transfizierte, menschliche embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney cells).

2.15.2 Nährmedium

MEM-Medium (Minimum Essential Medium) ist gut für das Wachstum von Säugerzellen geeignet, da es Aminosäuren, Vitamine, Glucose und Mineralien (Eagle, 1959) enthält.

Zusammensetzung von MEM:

H ₂ O (autoklaviert)	435ml	10x MEM (Biochrom)	50ml
7,4% NaHCO ₃ (sterilfiltriert)	15ml	Fetales Kälberserum (FCS)	50ml
200mM L-Glutamin (sterilfiltriert)	5ml	Antibiotika(Penicillin/Streptomycin)	5ml

Das komplette Kulturmedium war in dieser Form bei 4°C etwa 2 Wochen haltbar.

Um das Wachstum von Bakterien in den Zellkulturen zu unterdrücken, wurde dem Medium eine Mischung von Penicillin G und Streptomycin (Biochrom, Aufbewahrung: portioniert bei -20°C) mit der Endkonzentration von 100U/ml Penicillin G und 100µg/ml Streptomycin zugesetzt.

2.15.3 Kultur

HEK293 Zellen wachsen in adhärennten Kulturen, sogenannten Monolayern, angeheftet an Plastik-Kulturgefäße aus Polysterol (Costar). Die Zellen wurden in Brutschränken bei 37°C und einem CO₂-Gehalt der Luft von 6% zur Konstanthaltung des pH-Wertes des Mediums kultiviert.

Lösungen:

PBS:		Trypsin/EDTA:	
NaCl	40g	Stammlösung:0,5% Trypsin/0,2% EDTA	
KCl	1,0g	mit PBS 1:10 verdünnen,	
Na ₂ HPO ₄ *12 H ₂ O	14,5g	⇒ 0,05% Trypsin/0,02% EDTA	
KH ₂ PO ₄	1,2g	Bei -20°C lagern.	
H ₂ O	ad 5000 ml		
Auf pH 7,4 einstellen, autoklavieren.			

Einfriermedium:

MEM/FCS	90%
DMSO	10%

Die bei -80°C bzw. -196°C eingefrorenen HEK293 Zellen wurden aufgetaut und in eine Kulturflasche mit vorgelegtem Medium ausgesät. Die zum Verdünnen notwendigen Lösungen wärmte man auf 37°C vor. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch kurze Behandlung mit Trypsin von den Kulturgefäßen abgelöst. Der größte Teil der Zellen wurde zunächst eingefroren und später verwendet. Etwa 1/10 der Zellsuspension wurde in ein neues Kulturgefäß überführt, mit frischem Medium versetzt und im Brutschrank inkubiert (Passagieren der Zellen). Von den in ein Röhrchen überführten Zellen wurde die Zellzahl pro ml Suspension im Hämozytometer nach Neubauer bestimmt. Die Zellen konnten daraufhin für eine Transfektion ausgesät werden.

2.15.4 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Das Einschleusen von Fremd-DNS in eukaryotische Zellen bezeichnet man als Transfektion. Bei der hier durchgeführten transienten Transfektion wurde die zirkuläre Fremd-DNS unabhängig vom Genom der Wirtszelle (episomal) transkribiert. Allerdings waren die eingeschleusten Gene nur vorübergehend aktiv und gingen im Verlauf weiterer Zellteilungen wieder verloren. Bei Kotransfektionen wurden gleichzeitig mehrere Gene im selben Massenverhältnis in eine Wirtszelle eingeschleust.

2.15.4.1 Transfektion mit Lipofectamin

Zur transienten Expression von Kalziumkanaluntereinheiten in HEK293 Zellen wurde ein Lipofectamin-Reagenz (GibcoBRL) verwendet. Dieses Reagenz ist eine liposomenhaltige Emulsion, die DOPSA (2,3-Dioleyloxy-N-[2(spermincarboxamindo)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium Trifluorazetat) und DOPE (Diolelylphosphatidylethanolamin) im Verhältnis 3:1 enthält.

Zunächst wurden die Zellen mit serumfreiem MEM-Medium ohne Antibiotikazusatz gewaschen und auf Petrischalen (35mm, Costar) ausgesät. Anschließend wurde verdünntes Lipofectamin-Reagenz (1 Teil Lipofectamin, 9 Teile Wasser) und die zu transfizierende DNS mit einer Konzentration von etwa 1µg/µl zugegeben. Die Zellen wurden für 24-72 h bei 37°C in einem Brutschrank mit 6% CO₂ inkubiert, um die Transfektion zu

ermöglichen. Anschließend konnten die Zellen elektrophysiologisch gemessen werden, da in dieser Zeit bis zu 30% der Zellen das transfizierte Protein exprimierten.

2.16 Elektrophysiologische Untersuchungen

2.16.1 Grundlagen und Durchführung

Es wurden sowohl Kalzium- (I_{Ca}) als auch Bariumströme (I_{Ba}) im Ganzzell-Modus nach der Patch-Clamp-Methode gemessen. Die transient transfizierten HEK293 Zellen säte man aus und analysierte sie zwei bis vier Tage später elektrophysiologisch unter mikroskopischer Beobachtung. Die Patchpipette, eine sehr dünne Glaspipette, die eine Elektrode enthält, wurde auf die Membranoberfläche der transfizierten Zellen aufgesetzt. Dadurch erhöhte sich der Pipettenwiderstand bis in den Gigaohmbereich (Gigaseal). Durch einen kurzen Sog wurde das von der Pipette bedeckte Membranstück aufgebrochen, so daß das Innere der Pipette mit dem Zellinneren in Verbindung stand. Dieser Modus erlaubte die Messung des Stromes der Kalziumkanäle, die sich auf der gesamten Zelloberfläche befanden. Die Ableitung erfolgte mit Hilfe der Elektrode der Patchpipette, die mit einem Verstärker (EPC-7) gekoppelt war. Die Daten wurden je nach Experiment mit 5, 10 oder 20kHz digitalisiert und bei 1 oder 3kHz gefiltert. Die Auswertung erfolgte mit pCLAMP- (Axon Instruments, USA) und Origin 6.0-Software (Microcal Inc.) sowie dem IEPC-9 Pulse Program (HEKA). Leckströme und kapazitative Ströme wurden in Kontrollversuchen bestimmt und von den Meßwerten abgezogen. Die Messungen wurden alle bei Raumtemperatur durchgeführt.

Es wurden Mittelwert und Standardabweichung anhand des Student t-Tests errechnet. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Für die Untersuchung von Interaktionen mit der $Ca_v2.1$ (α_{1A}) Untereinheit des *high voltage* aktivierten (HVA) Kalziumkanal-Komplexes wurden folgende Lösungen verwandt:

Extrazelluläre Lösung (Badlösung):

NaCl	110mM	MgCl ₂	1mM
BaCl ₂ oder CaCl ₂	10mM	HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-	
TEA-Cl (Tetraethylammoniumchlorid)	20mM	piperazinethansulfonsäure	5mM
4-Aminopyridin	2mM	Glucose	10mM
		Mit NaOH auf pH 7,4 einstellen.	

Intrazelluläre Lösung (Lösung in der Pipette):

CsCl	120mM		
TEA-Cl	10mM	EGTA (Ethylenbis(oxonitrilo)tetraacetat)	10mM
MgATP	3mM	HEPES	5mM
GTP	0,5mM	Mit CsOH auf pH 7,4 einstellen.	

Interaktionen mit der $Ca_v1.2$ (α_{1C}) Untereinheit des HVA Kalziumkanal-Komplexes wurden mit folgenden Lösungen bestimmt:

Extrazelluläre Lösung:

NaCl	82mM		
TEA-Cl	20mM	HEPES	5mM
4-Aminopyridin	2mM	EGTA	0,1mM
BaCl ₂	30mM	Glucose	10mM
MgCl ₂	1mM	Mit NaOH auf pH 7,4 einstellen.	

Die Zusammensetzung der intrazellulären Lösung entsprach der bei der Ableitung der $Ca_v2.1$ (α_{1A}) Untereinheit verwendeten.

Das Verhalten von $Ca_v3.1$ (α_{1G}), einem Vertreter der *low voltage* aktivierten (LVA) T-Typ Kalziumkanäle, wurde mit folgenden Lösungen bestimmt:

Extrazelluläre Lösung:

NMDG (N-methyl-D-glucosamin)	110mM
CaCl ₂	20mM
CsCl	5mM
MgCl ₂	10mM
HEPES	10mM
Glucose	10mM
Mit HCl auf pH 7,4 einstellen.	

Intrazelluläre Lösung:

CsCl	102mM
MgATP	5mM
NaCl	5mM
TEA-Cl	10mM
EGTA	10mM
HEPES	10mM
Mit CsOH auf pH 7,4 einstellen.	

Die im Ganzzellmodus vermessenen Kalziumkanäle wurden durch einen 100ms (HVA α_1 Untereinheiten) bzw. 40ms (T-Typ $Ca_v3.1$ (α_{1G}) Untereinheit) langen, depolarisierenden Testpuls aktiviert, der von -80mV bis +10mV (-20mV bis +40 mV für $Ca_v3.1$ (α_{1G})) in 10mV Schritten gewählt wurde. Anhand der gemessenen Ströme konnte die Strom-Spannungsbeziehung mit und ohne Koexpression einer γ Hilfsuntereinheit ermittelt werden. Hieraus wurde die Inaktivierungszeitkonstante τ für depolarisierende Testpulse

kalkuliert. Dazu fittete man im Falle der HVA Untereinheiten den schnellen aufsteigenden Teil des Einwärtsstromes mit einer Exponentialfunktion. Im Falle der T-Typ Untereinheiten wurde die Hodgkin-Huxley-Gleichung in ihrer m4h Form zum Fitten der gesamten Ableitung verwandt.

Zur Bestimmung der *Steady state*-Inaktivierungskurve wurde bei Vermessung der HVA α_1 Untereinheiten die Membran zunächst 3 sek. auf Potentiale zwischen -80 und $+50\text{mV}$ in Abständen von 10mV geklemmt. Darauf kehrte man für 5ms zum Haltepotential von -80mV zurück, woraufhin der 200ms dauernde, depolarisierende Puls zum maximal aktivierenden Potential von $+10$ bzw. $+20\text{mV}$ folgte. Als Ladungsträger dienten sowohl Kalzium- als auch Bariumionen. (Für die Ableitung der T-Typ Kanäle: Haltepotential: $-100\text{mV} \rightarrow 5$ sek. konditionierender Präpuls: -120 bis -10mV in 10mV Schritten $\rightarrow 5\text{ms}$ Rückkehr zum Haltepotential von $-100\text{mV} \rightarrow 40\text{ms}$ depolarisierender Puls von -10mV ; Ladungsträger: Kalziumionen). Aus den gemessenen Strömen konnte die Beziehung der Inaktivierung zu den verschiedenen depolarisierenden Potentialen bestimmt werden. Das Präpulspotential $V_{1/2}$, bei dem die Hälfte der Kanäle inaktiviert war, wurde mit der Boltzmann-Gleichung errechnet.

Boltzmann-Gleichung: $y = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 + e^{[(x - V_{1/2})/k]})$

x: Präpulsspannung

$V_{1/2}$: Präpulsspannung, bei der 50% der Kanäle inaktiviert sind

k: Steigung der Kurve

A_1 : minimaler Anteil inaktivierter Kanäle (hier 0%)

A_2 : maximaler Anteil inaktivierter Kanäle (hier 100%)

y: Anteil der inaktivierten Kanäle an der Gesamtzahl

3 Ergebnisse

Modulatorische γ Untereinheiten haben wesentlichen Einfluß auf die elektrophysiologischen Charakteristika der HVA Kalziumkanäle. Koexpression der skelettmuskelspezifischen γ_1 Untereinheit mit einem Komplex aus $Ca_v1.2$ (α_{1C}), β_{2a} und $\alpha_2\delta-1$ führt zu einer Verschiebung der *Steady state*-Inaktivierungskurve in Richtung negativerer Potentiale und zu einer beschleunigten Strominaktivierung (Eberst et al., 1997). Mutationen der neuronalen γ_2 Untereinheit sind verantwortlich für die bei sogenannten *Stargazer* Mäusen von Letts et al. (1998) beschriebenen Absencen. Defekte anderer Untereinheiten neuronaler spannungsabhängiger Kalziumkanäle und anderer Ionenkanäle führen zu verschiedensten neurologischen Krankheitsbildern (s. Tabelle 4-2).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals drei neue, bislang unbekannte γ Untereinheiten spannungsabhängiger Kalziumkanäle identifiziert. Sie wurden vollständig kloniert, ihre cDNS Sequenz komplett bestimmt und ihre gewebsspezifische Verteilung ermittelt. Koexpressionsstudien mit verschiedenen Kombinationen aus α_1 , β und $\alpha_2\delta$ Untereinheiten und Vergleich mit den Eigenschaften der bereits bekannten Untereinheiten γ_1 und γ_2 dienten der funktionellen, d.h. elektrophysiologischen, Charakterisierung. In diesem Zusammenhang wurde auch eine mögliche Assoziation der neu identifizierten Untereinheiten mit LVA Kalziumkanälen untersucht, über deren genaue molekulare Zusammensetzung bislang wenig bekannt ist.

Die Datenbank *accession numbers* sowie alle in diesem Kapitel erwähnten Primer und die Sequenzen der neu identifizierten γ Untereinheiten sind im Anhang angegeben.

3.1 Klonierung

Als Grundlage zur Identifizierung neuer γ Untereinheiten dienten die bereits bekannten Sequenzen der skelettmuskelspezifischen γ_1 (Bosse et al., 1990; Jay et al., 1990) und der neuronalen γ_2 Untereinheiten (Letts et al., 1998). Datenbanksuchen führten zur Identifizierung mehrerer ESTs (expressed sequence tags) mit verschiedenen Homologien zu γ_1 und γ_2 . Durch Screenen von cDNS-Bibliotheken konnten die *Full length*-Klone von γ_3 , γ_4 und γ_5 isoliert werden. Alle erhaltenen Klone wurden jeweils auf beiden Strängen sequenziert.

3.1.1 γ_3 Untereinheit

Grundlage der Klonierung von γ_3 war die von Black und Lennon (1999) veröffentlichte humane Proteinsequenz dieser Untereinheit. Sie diente zur Amplifizierung der homologen Maussequenz mit dem degenerierten Primerpaar g31 und g32 aus einer cDNS-Bank aus Maushirn (s. 6.2). Maus- und Humansequenz sind zu 90,5 % identisch.

3.1.2 γ_4 Untereinheit

Das Screenen einer cDNS-Bibliothek aus Mausgehirn mit dem partiellen EST mit der GenBank *accession number* mm38636 ergab mehrere Klone. Einer von ihnen war der *Full length*-Klon von γ_4 (s. 6.2).

3.1.3 γ_5 Untereinheit

Die bereits aus überlappenden ESTs (GenBank *accession numbers*: ai048969, aa8817904, mm1155303, mma69349) erhaltene vollständige Sequenz von γ_5 , die Start- und Stopcodon beinhaltet, wurde nach Amplifizierung des Gesamtfragments aus einer gemischten Organpräparation von neugeborenen Mäusen und durch das Screenen einer Nieren-cDNS-Bibliothek aufgeklärt (s. 6.2). Die zur Identifizierung von γ_4 und γ_5 verwendeten ESTs wurden wie in Abschnitt 2.8 beschrieben auf Grundlage der Proteinsequenzen der Untereinheiten γ_1 und γ_2 aufgefunden.

Die Proteinsequenzen der so identifizierten neuen γ Untereinheiten sind zusammen mit den bereits bekannten Sequenzen von γ_1 und γ_2 in Abbildung 3-1 dargestellt. Dieses Alignment zeigt interessante Übereinstimmungen bezüglich der Aminosäureidentitäten der einzelnen γ Untereinheiten auf. So sind die γ_1 und γ_5 Untereinheit untereinander sowie zu den restlichen γ Untereinheiten nur zu etwa 25% identisch. γ_2 hingegen besitzt zu γ_3 eine 75,6 prozentige und im Vergleich zu γ_4 eine 60 prozentige Identität.

Desweiteren fällt auf, daß die γ_1 Untereinheit mit 223 und die γ_5 Untereinheit mit 211 Aminosäuren deutlich kürzer sind als γ_2 (323 Aminosäuren), γ_3 (315 Aminosäuren) und γ_4 (327 Aminosäuren). Dies ist bedingt durch den längeren C-Terminus von γ_2 , der Hydrophobizitätsanalysen zufolge intrazellulär gelegen ist und eine Konsensus-Phosphorylierungsstelle für cAMP/cGMP abhängige Proteinkinasen beinhaltet.

Hydrophobizitätsanalysen aller γ Untereinheiten ergeben jeweils vier hydrophobe Segmente. Diese entsprechen wahrscheinlich vier Transmembransegmenten. Trotz der

geringen Sequenzhomologie zwischen γ_1 und γ_5 fallen die ähnlichen Hydrophobizitätsprofile und ein hochkonserviertes GLWxxC-Motiv auf.

γ_1	MSQT.KTAKV	RV...	TLFF	ILVGGV	LAMV	AVVTDHWAVL	SP..HLEHHN	43
γ_2	MGLFDRGVQM	LL...	TTVG	AFAAFSLMTI		AVGTDYWLYS	RG..VCKTKS	44
γ_3	MRMCDRGIQM	LI...	TTVG	AFAAFSLMTI		AVGTDYWLYS	RG..VCRTKS	44
γ_4	MVRCDRGLQM	LL...	TTAG	AFAAFSLMAI		AIGTDYWLYS	SAH.ICNGTN	45
γ_5	MTAIGAQAHK	LLGLKRP	HRS	FFESF	IRTLI	IVCTALAVVL	SSVSI	CDGHW 50
γ_1	ETCEA.....		AH.F	GLWRIC	TARV	AVHNKDKS..	CEHVTP..S	76
γ_2	VSENE..TSK	KNEEVM	TH.S	GLWRITCC	LEG	NFKGLCKQ..	IDHFPEDAD	88
γ_3	TSDNE..TSR	KNEEVM	TH.F	GLWRITCC	LEG	AFRGVCKK..	IDHFPEDAD	88
γ_4	LTMDDGPPPR	RARGDL	TH.S	GLWRVCC	IEG	IYRGHC	FR..INHFPEDND	91
γ_5	LLVED.....		HLF	GLWYF	CTIGN	HSEPHCLRDL	SQAHP...G	85
γ_1	GEKNCS..YF	RHFNP	GESSE		IFEFT	TQKE...Y	S.....ISA	108
γ_2	YEADTAEYEL	RAVRASS	IFP		ILSVILLFM	GGLCIAASEF	YKTRHNIILS	137
γ_3	YEQDTAEYLL	RAVRASS	VFP		ILSVTLLEF	GGLCVAASEF	HRSRHSVILS	137
γ_4	YDHDSSSEYLL	RIVRASS	VFP		ILSITILLLL	GGLCIGAGRI	YSRKNNIVLS	140
γ_5	LAVGMG..LA	RSVAAMA	VVA	AIFGLE	MLIV	SQVC...EDV	RS R.KWAIG	129
γ_1	AATAIFSLGF	IIVGSI	CAFL	SFGNKR	DYL.	...LRPASM	FY...AFAG	149
γ_2	AGIEFVSAGL	SNIIGI	IIVYI	S.ANAG	DPS.	.KSDSKKNSY	SYGWSFYFGA	184
γ_3	AGIEFVSAGL	SNIIGI	IIVYI	S.ANAG	DPG.	.QRDSKKSY	SYGWSFYFGA	183
γ_4	AGILEFVAAGL	SNIIGI	IIVYI	S.SNTG	DPSP	KRDEDKKNHY	NYGWSFYFGA	189
γ_5	SYLLLVAFIL	S.SGGL	LLTFI	I.LLKN	QIN.	...LLGFTL	MF.WCEFTAS	171
γ_1	LCLTVSVEVM	RQSVKRM	ID.S	EDTVWIE...	...HYYSWS	182	
γ_2	LSFIIAEMVG	VLAVHMF	IDR	HKQLR	ATARA	TDYLQAS..A	ITRIPSYRYR	232
γ_3	FSFIIAETVG	VVAVHIY	IEK	HQQLR	ARSHS	ELLKKST...	FARLPPYRYR	230
γ_4	LSFIVAETVG	VLAVNIY	IEK	NKELR	FKTKR	EFLKASSSSP	YARMPYRYR	239
γ_5	FLFFLNAAASG	.LHINSLT..	Q	PWDPPAG...TLAYR	201	
γ_1	F.....ACA	C.....		...AAFILLF	LGGLFLLLFS	LPRMP...QN	211	
γ_2	YQRRSRSSSR	STEP	SHSRDA	SPVGV	KGFNT	LPSTEISMYT	LSRDPLKAAT	282
γ_3	F.RR.RSSSR	STEP	.SRDL	SP.I	SKGFHT	IPSTDISMFT	LSRDPSKLTM	276
γ_4	R.RR.RSSSR	STE	ASPSRDA	SPVGL	KITGA	IPMGELSMYT	LSREPLKVTT	288
γ_5	K.....RGYDGTSL	I.....	211	
								*
γ_1	...PWES	CM	DA..EPEH..223	
γ_2	TPTATYNSDR	DNSFLO	VENC	IQKDSK	DSLH	ANTANRRR	TTP V.323	
γ_3	..GTLN	SDR	DHAFLO	VENS	TPKEFK	ESLH	NNPANRRR	TTP V.315
γ_4	..AASY	SDQ	DAGFLO	MEDF	FQQDL	KEGFH	VSMLNRRR	TTP V.327

Abbildung 3-1: Aminosäuresequenz Alignment von γ_1 bis γ_5 . Weiße Buchstaben auf schwarzem Grund: Positionen mit mindestens drei identischen Aminosäuren; *: C-terminale *consensus site* der neuronalen $\gamma_{2,4}$ Untereinheiten für die cAMP/cGMP abhängige Proteinkinasephosphorylierung

3.2 Northern blot-Analyse

γ_1 ist ausschließlich im Skelettmuskel (Jay et al., 1990; Bosse et al., 1990; Powers et al., 1993; Eberst et al., 1997; Wissenbach et al., 1998), γ_2 nur im ZNS zu finden (Letts et al., 1998).

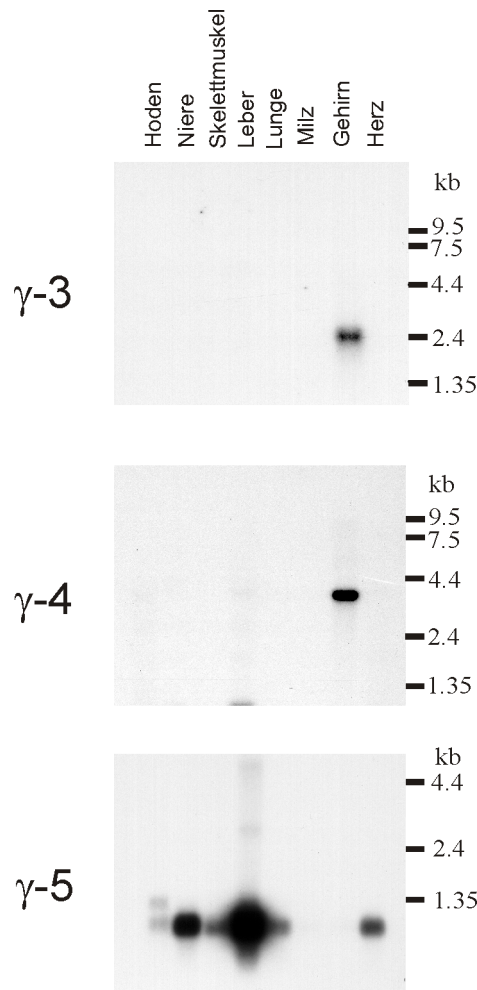


Abbildung 3-2: Northern blot-Analyse von γ_3 , γ_4 und γ_5 .

Zur genaueren Untersuchung der Expression der neu identifizierten γ Untereinheiten in verschiedenen Geweben wurden Northern blot-Analysen mit ^{32}P markierten Sonden durchgeführt. Dazu wurden folgende Fragmente als Sonden verwendet:

γ_3 : Nukleotide 131 bis 853, amplifiziert mit dem Primerpaar g33 und g34

γ_4 : Nukleotide 501 bis 957, amplifiziert mit dem Primerpaar g43 und g44

γ_5 : Nukleotide 131 bis 508, amplifiziert mit dem Primerpaar g53 und g54

Daraus ergab sich folgende, in Abbildung 3-2 wiedergegebene Gewebsverteilung:

Die γ_3 und γ_4 Untereinheiten kommen ebenso wie γ_2 nur im Gehirn vor. Selbst bei sehr langen Expositionszeiten konnten keine zusätzlichen Signale in anderen Geweben

detektiert werden. Die Länge des mRNA Transkriptes von γ_3 beträgt 2,4kb, die desjenigen von γ_4 3,8kb. Demgegenüber hat die von Letts et al. (1998) bestimmte mRNA von γ_2 eine Größe von 6-7kb mit einigen kleineren Fragmenten.

γ_5 kommt nahezu ubiquitär vor (in Leber, Niere, Herz, Lunge, Skelettmuskel und etwas schwächer im Hoden). Die Größe des mRNA Transkriptes entspricht 1,1kb.

3.3 *In situ*-Hybridisierung

Zur genauen Lokalisation der neu identifizierten neuronalen Untereinheiten γ_3 und γ_4 im ZNS wurden im Rahmen dieser Arbeit *In situ*-Hybridisierungen an Gehirnschnitten angefertigt. Zusätzlich wurde eine Hybridisierung mit γ_2 durchgeführt und mit derjenigen von Letts et al. (1998) verglichen. Die Expressionsmuster der drei neuronalen γ Untereinheiten konnten so direkt einander gegenübergestellt werden. Die amplifizierten DNS-Fragmente stammten aus der für jede Untereinheit spezifischen variablen Region des C-Terminus. Einen genauen Überblick zeigt Tabelle 3-1:

	Lokalisation der Sonde	verwendete Primer
γ_2	Nukleotide 820-947	g25; g26
γ_3	Nukleotide 748-912	g35; g36
γ_4	Nukleotide 839-980	g45; g46

Tabelle 3-1: Lokalisation der Sonden zur *In situ*-Hybridisierung von γ_2 , γ_3 und γ_4 .

Die Auswertung der ca. 10 Tage aufliegenden Röntgenfilme ergab für jede Untereinheit ein spezifisches Verteilungsmuster, das aus Abbildung 3-3 und Tabelle 3-2 ersichtlich ist. Die genaue mikroskopische Untersuchung der Schnitte nach vier- bis achtwöchiger Mikroautoradiographie erbrachte zusätzlich, daß γ_2 im Kleinhirn vornehmlich in der Purkinje-Zellschicht vorhanden ist, während sich γ_4 präferentiell in der Molekular-Zellschicht darstellt (s. Abbildung 3-4).

3.4 Elektrophysiologische Charakterisierung von γ_2 , γ_4 und γ_5

Die hier dargestellten elektrophysiologischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. L. Lacinová und Herrn Dr. S. Dai erhoben.

Zur Untersuchung möglicher molekularer Assoziationen und zur funktionellen Charakterisierung der neu identifizierten γ Untereinheiten führten wir Koexpressionsstu-

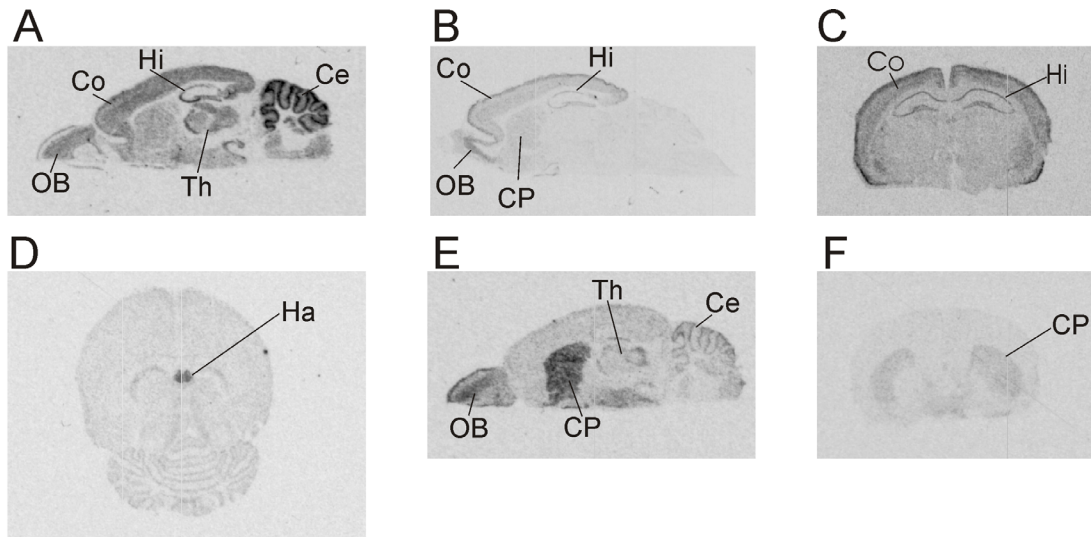


Abbildung 3-3: *In situ*-Hybridisierung von γ_2 (A), γ_3 (B,C) und γ_4 (D-F) an Gehirnschnitten der Maus.
 Ce: Kleinhirn; Co: Großhirnrinde; CP: Nucleus caudatus und Putamen; Ha: Habenulae; Hi: Hippocampus; OB: Bulbus olfactorius; Th: Thalamus

Lokalisation	γ_2	γ_3	γ_4	Funktion
Endhirn				
Großhirnrinde	++	+++	-	höchstes Integrationsorgan des Gehirns
Olfaktorischer Bulbus	++	++	+++	erste Schaltzentrale olfaktorischer Reize
Striatum (z. Basalgl.)		++	+++	extrapyramidalmotorische Bewegungszentren
limbisches System				emotionale Färbung von Wahrnehmungen und Ideen
Hippocampus	++	+++	-	Informationsübergang vom Kurzzeit- zum Langzeitgedächtnis
Zwischenhirn				
Thalamus	++	-	++	zentrale Schaltstelle und Endpunkt vieler Sinnesbahnen
Habenulae (z. Epithal.)	-	-	+++	Vermittlung zwischen Vegetativum und limbischem System
Kleinhirn				Koordination von Bewegungen, Gleichgewicht
Purkinje-Zellschicht	+++	-	+	
Molekular-Zellschicht	++	-	+++	
Granular-Zellschicht	++	-	+	

Tabelle 3-2: Lokalisation von γ_{2-4} im Gehirn. Die einzelnen Hirnregionen sind nach entwicklungsgeschichtlichen Gesichtspunkten gegliedert. Ihre Funktion ist kurz skizziert.

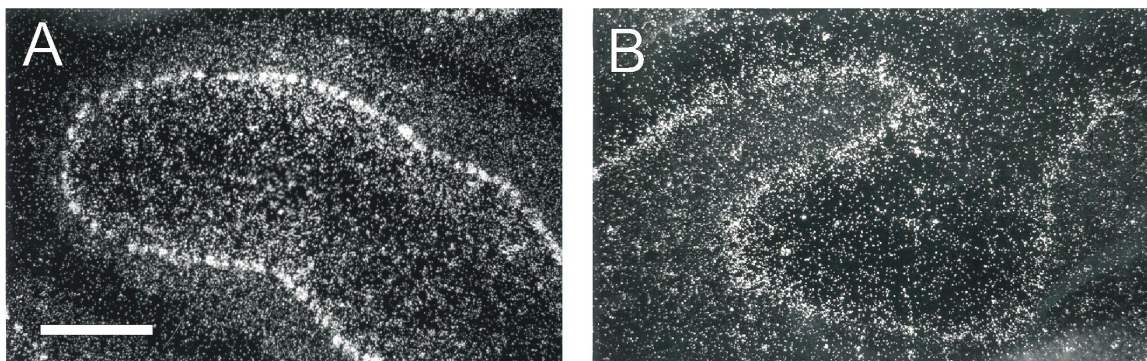


Abbildung 3-4: Dunkelfeldmikroskopie der Kleinhirnregion der Maus nach *In situ*-Hybridisierung der Schnitte mit spezifischen Sonden für γ_2 (A) und γ_4 (B). Der Balken entspricht einer Länge von 500µm.

dien mit der in Herz und Gehirn lokalisierten L-Typ Kalziumkanaluntereinheit $Ca_v1.2$ (α_{1C}) und der gehirnspezifischen Non-L-Typ $Ca_v2.1$ (α_{1A}) Untereinheit in HEK293 Zellen durch. Die überlappenden Verteilungsmuster der α_1 und γ Untereinheiten (s. Tabelle 4-1) legten diese Experimente nahe. Eine mögliche Assoziation mit LVA Kalziumkanälen wurde durch Koexpression mit $Ca_v3.1$ (α_{1G}) untersucht.

In einem ersten Ansatz wurde das bereits von Letts et al. (1998) zur Charakterisierung der γ_2 Untereinheit beschriebene neuronale Modell bestehend aus $Ca_v2.1$ (α_{1A}), β_{1a} und $\alpha_2\delta-1$ verwandt. Dieser Komplex wurde mit γ_2 , γ_4 bzw. γ_5 koexprimiert. Die γ_3 Untereinheit wurde aufgrund ihrer ausgeprägten Sequenzübereinstimmung mit γ_2 und des daher angenommenen ähnlichen Verhaltens nicht weiter charakterisiert. Die Spannungs-Leitfähigkeitsbeziehung von I_{Ca} unter diesen Bedingungen ist in Abbildung 3-5A dargestellt. Lediglich bei Koexpression mit γ_2 verschob sich die Aktivierungskurve signifikant zu positiveren Potentialen. Wie bereits von Letts et al. (1998) beschrieben bewirkte die Koexpression mit γ_2 eine Verschiebung der *Steady state*-Inaktivierungskurve hin zu hyperpolarisierteren Potentialen, ein Effekt, der auch für die γ_4 , nicht aber die γ_5 Untereinheit nachgewiesen werden konnte (s. Abbildung 3-5B). Die Inaktivierungszeitkonstanten τ_1 und τ_2 waren signifikant vermindert im Falle einer Koexpression mit γ_2 oder γ_4 (s. Abbildung 3-5C).

Zur Überprüfung eines rein neuronalen Modells wurde in einer zweiten Versuchsreihe statt der skelettmuskelspezifischen β_{1a} Untereinheit die von Perez-Reyes et al. (1992) beschriebene neuronale β_{2a} ($n\beta_{2a}$) Untereinheit zusammen mit $Ca_v2.1$ (α_{1A}), $\alpha_2\delta-1$ und γ_2 koexprimiert. Diesmal wurde zusätzlich Ba^{2+} als Ladungsträger verwendet. Interessanterweise war nur bei Verwendung von Ca^{2+} die bereits beschriebene Verschiebung der spannungsabhängigen Inaktivierungskurve zu negativeren Potentialen zu beobachten. Die Verwendung von Ba^{2+} als Ladungsträger hatte den gegenteiligen Effekt. Hier verschob sich die Kurve in Richtung positiverer Potentiale (s. Abbildung 3-6A). Die Spannungsabhängigkeit der Leitfähigkeiten wurde ebenfalls mit Ba^{2+} und Ca^{2+} untersucht. Nur bei Verwendung von Ba^{2+} war unabhängig von der Koexpression mit γ_2 eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung zu hyperpolarisierten Potentialen hin festzustellen (s. Abbildung 3-6B).

Eberst et al. hatten 1997 die γ_1 Untereinheit in Koexpression mit der L-Typ $Ca_v1.2a$ (α_{1C-a}), der kardialen β_{2a} ($c\beta_{2a}$) und der $\alpha_2\delta-1$ Untereinheit untersucht und dabei festgestellt, daß sich in diesem Komplex die *Steady state*-Inaktivierungskurve um ca. 30mV in den

negativeren Bereich verschob. Die Inaktivierung wurde beschleunigt. Analog dazu untersuchten wir den Effekt einer Koexpression von γ_2 und γ_5 mit diesem Komplex unter Verwendung von Ba^{2+} als Ladungsträger. Wie aus den Abbildung 3-6C/D ersichtlich wurde nur für γ_2 , nicht aber für γ_5 , eine kleine, aber signifikante Verschiebung der *Steady state*-Inaktivierungskurve und der Spannungs-Leitfähigkeitsbeziehung in Richtung positiverer Potentiale gemessen. Eine Koexpression von $Ca_v1.2a$ (α_{1C-a}), $c\beta_{2a}$ und γ_5 ohne $\alpha_2\delta-1$ blieb ohne Einfluß. Die genannten Ergebnisse sind nochmals in Tabelle 3-3 wiedergegeben.

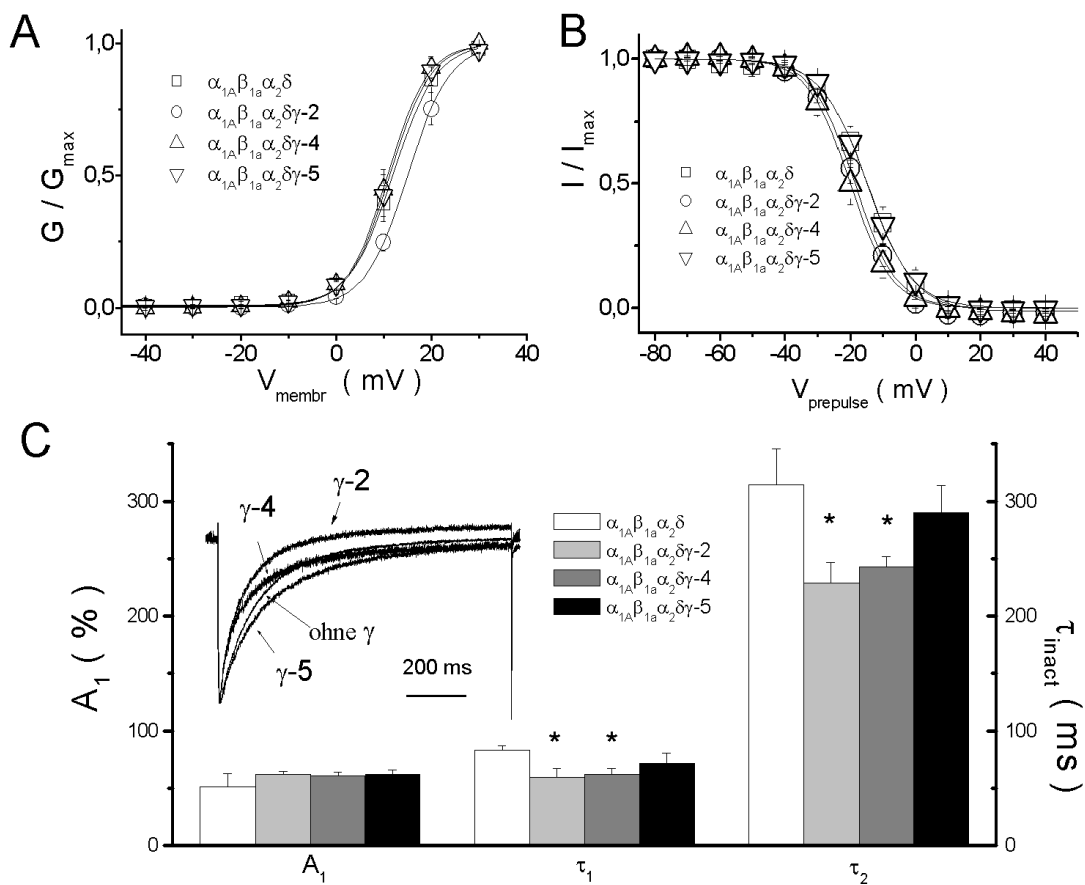


Abbildung 3-5: Modulation der spannungsabhängigen Aktivierung und Inaktivierung des $Ca_v2.1$ (α_{1A}) Kalziumkanals durch verschiedene γ Untereinheiten. Die verschiedenen Kombinationen der Untereinheiten sind in den jeweiligen Graphiken angegeben. **A:** Spannungs-Leitfähigkeitsbeziehung von I_{Ca} in An- und Abwesenheit verschiedener γ Untereinheiten. G wurde wie in den Erläuterungen zu Tabelle 3-3 angegeben berechnet. Die Daten wurden gemittelt und mit der Boltzmann-Gleichung gefittet. **B:** Für I_{Ca} in An- und Abwesenheit verschiedener γ Untereinheiten gemessene *Steady state*-Inaktivierungskurven (s. 2.16.1). Kurven normalisiert auf die maximale Amplitude. **C:** Vergleich der Inaktivierungseigenschaften von $Ca_v2.1$ (α_{1A}) bei Koexpression mit verschiedenen γ Untereinheiten. Zusätzlich abgebildet sind die Zeitverläufe von I_{Ca} nach einer einsekündigen Depolarisation auf +20mV (Kurven normalisiert auf dieselbe Amplitude). I_{Ca} ließ sich am besten als Summe zweier abfallender Exponentialfunktionen beschreiben. A_1 : Prozentsatz des schnellen Teils der Inaktivierung (τ_1); τ_2 : langsamer Teil der Inaktivierung; *: signifikanter Unterschied bei $P < 0,05$

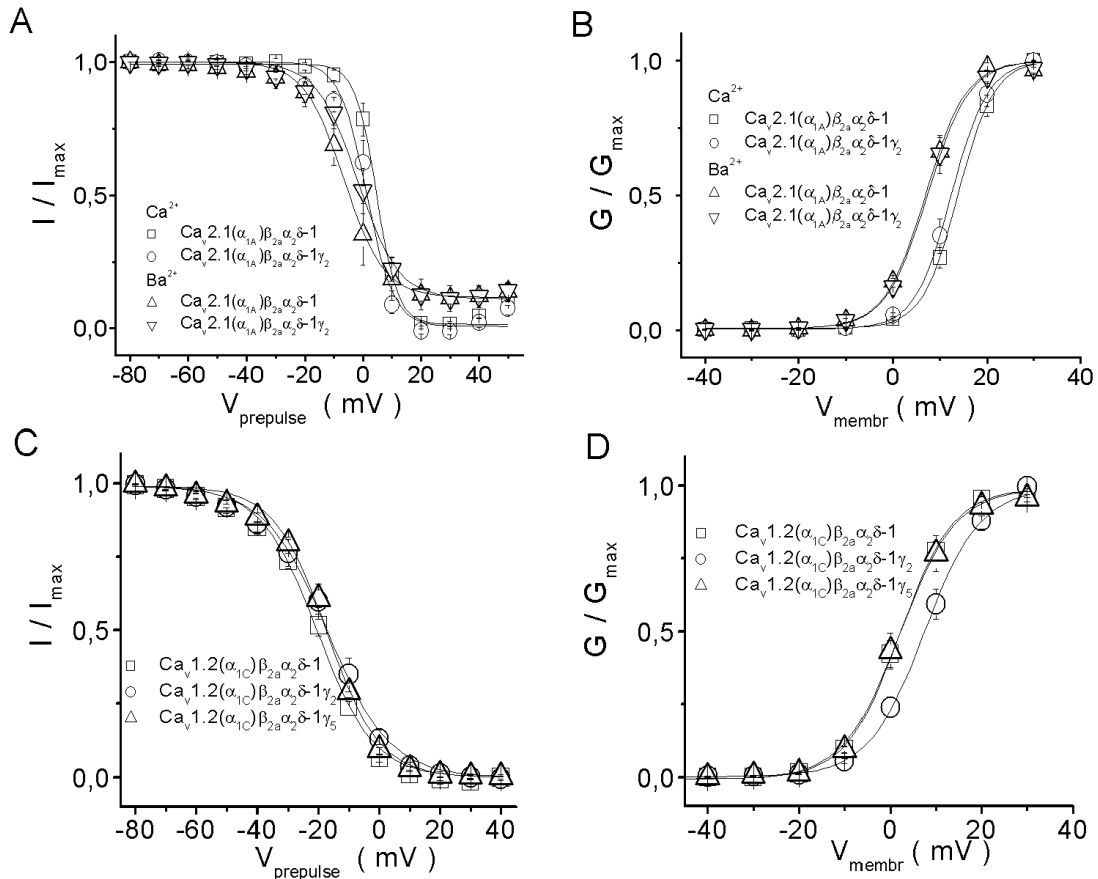


Abbildung 3-6: Vergleich der *Steady state*-Inaktivierungskurven und Leitfähigkeiten für I_{Ca} und I_{Ba} von $Ca_v2.1(\alpha_{1A})\beta_{2a}\alpha_2\delta-1$ mit und ohne γ_2 bzw. $Ca_v1.2(\alpha_{1C})\beta_{2a}\alpha_2\delta-1$ mit und ohne γ_2 bzw. γ_5 in HEK293-Zellen (genaue Kombinationen in den Abbildungen angegeben). **A,C: *Steady state*-Inaktivierungskurven (10mM Ca^{2+} (A) oder Ba^{2+} (A,C) als Ladungsträger; Ableitungen entsprechend Abbildung 3-5). **B,D:** Boltzmann Berechnungen der spannungsabhängigen Leitfähigkeiten der in A bzw. C vermessenen Kombinationen**

Die α_1 Untereinheiten der T-Typ Kalziumkanäle besitzen kein typisches Motiv zur Interaktion mit β Untereinheiten (Perez-Reyes et al., 1998). Die Unterbindung der Expression aller β Untereinheiten in Neuronen der primären sensorischen Hirnrinde änderte nichts an den elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Kanäle (Lambert et al., 1997).

Über mögliche Assoziationen von LVA T-Typ Kanälen mit γ Untereinheiten war bis zu Beginn unserer Arbeit nichts bekannt. Wir führten deshalb Koexpressionsstudien von γ_2 , γ_4 bzw. γ_5 und $Ca_v3.1(\alpha_{1G})$ mit 20 mM Ca^{2+} als Ladungsträger durch.

Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskurve blieb unverändert. Die *Steady state*-Inaktivierungskurven wurden leicht zu positiveren Potentialen hin verschoben, ein Effekt, der lediglich für γ_4 signifikant war. Die Erholungszeit nach spannungsabhängiger Inakti-

Kanal	Stromdichte (pA/pF)	Aktivierung			Inaktivierung		
		$V_{0.5}$ (mV)	k	n	$V_{0.5}$ (mV)	k	n
$Ca_v2.1(\alpha_{1A})\beta_{1a}\alpha_2\delta-1(Ca^{2+})$	34.8±8.7	+11.9±0.1	4.5±0.1	8	-15.0±0.3	6.9±0.2	7
$Ca_v2.1\beta_{1a}\alpha_2\delta-1\gamma_2(Ca^{2+})$	29.9±3.4	+15.0±0.1*	4.4±0.1	9	-18.7±0.4*	6.3±0.4	9
$Ca_v2.1\beta_{1a}\alpha_2\delta-1\gamma_4(Ca^{2+})$	35.9±9.3	+10.8±0.2	4.2±0.2	8	-20.0±0.3*	6.3±0.3	6
$Ca_v2.1\beta_{1a}\alpha_2\delta-1\gamma_5(Ca^{2+})$	36.0±8.9	+11.3±0.2	4.3±0.2	9	-14.9±0.2	6.9±0.2	8
$Ca_v2.1\beta_{2a}\alpha_2\delta-1(Ca^{2+})$	40.8±2.7	+13.9±0.2	3.8±0.1	9	+4.6±0.5	3.6±0.3	8
$Ca_v2.1\beta_{2a}\alpha_2\delta-1\gamma_2(Ca^{2+})$	42.9±8.4	+12.4±0.1	3.9±0.1	10	+1.3±0.8*	4.6±0.7	8
$Ca_v2.1\beta_{2a}\alpha_2\delta-1(Ba^{2+})$	45.9±8.8	+6.9±0.4	4.4±0.2	8	-6.5±0.5	6.9±0.4	6
$Ca_v2.1\beta_{2a}\alpha_2\delta-1\gamma_2(Ba^{2+})$	46.5±6.2	+7.3±0.3	4.5±0.2	8	-1.9±0.7*	7.0±0.6	6
$Ca_v1.2(\alpha_{1C})\beta_{2a}\alpha_2\delta-1(Ba^{2+})$	62.8±7.0	+2.0±0.4	5.9±0.2	18	-19.8±0.6	9.8±0.6	16
$Ca_v1.2\beta_{2a}\alpha_2\delta-1\gamma_2(Ba^{2+})$	45.1±8.2	+7.3±0.3*	6.1±0.2	9	-16.5±0.7*	11.2±0.6	7
$Ca_v1.2\beta_{2a}\alpha_2\delta-1\gamma_5(Ba^{2+})$	59.9±9.7	+1.9±0.4	6.2±0.3	11	-17.2±0.6	9.1±0.5	8

Tabelle 3-3: Effekte der verschiedenen γ Untereinheiten auf die Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften verschiedener Kombinationen von Kalziumkanal Untereinheiten. HEK293 Zellen wurden transient mit cDNS-Plasmiden der angegebenen Untereinheitskombinationen transfiziert. Zur Analyse der spannungsabhängigen Aktivierung wurde die Leitfähigkeit G anhand der Gleichung $G(V)=I/(V-V_{rev})$ berechnet (I: Stromstärke; V: Potential des Testpulses; V_{rev} : gemessenes Umkehrpotential). Die erhobenen Daten wurden gemittelt und mit der Boltzmann-Gleichung gefittet: $G(V)=G_{max}/(1+\exp[(V-V_h)/k])$ mit V_h : Potential der halbmaximalen Aktivierung und k: Steigung. n: Anzahl der gemessenen Zellen; *: signifikanter Unterschied mit $P<0,05$

vierung war signifikant verlangsamt bei γ_2 und γ_4 . Der zeitliche Verlauf der Aktivierungs- und Inaktivierungskurven wurde durch die γ_5 Untereinheit signifikant über den gesamten Potentialbereich beschleunigt. γ_4 zeigte entsprechende Eigenschaften nur bei Spannungen oberhalb der Schwelle der Stromaktivierung. All dies deutet auf eine mögliche Assoziation von γ_5 als modulatorische Hilfsuntereinheit mit LVA Kalziumkanälen hin.

Ferner wurde die Möglichkeit der Existenz zusätzlicher modulatorischer Untereinheiten des $Ca_v3.1(\alpha_{1G})$ - γ_5 Komplexes in Betracht gezogen. Da $Ca_v3.1(\alpha_{1G})$ wie bereits erwähnt über keine Interaktionsstelle für β Untereinheiten verfügt, wurde die mögliche Assoziation mit einem Vertreter der $\alpha_2\delta$ Untereinheiten untersucht. Weder $\alpha_2\delta-1$ noch $\alpha_2\delta-3$ modulieren die Kanaleigenschaften von $Ca_v3.1(\alpha_{1G})$ (Lacinová et al., 1999). Wir konzentrierten uns deshalb auf die Kombination von $Ca_v3.1(\alpha_{1G})$ und $\alpha_2\delta-2$ mit und ohne Koexpression von γ_5 . Es zeigte sich, daß schon die Koexpression von $\alpha_2\delta-2$ alleine mit $Ca_v3.1(\alpha_{1G})$ zu einer signifikanten Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der *Steady state*-Inaktivierung zu negativeren Potentialen führte. Dieser Effekt war unabhängig von einer zusätzlichen Koexpression der γ_5 Untereinheit. Die Ergebnisse der Koexpressionsstudien mit der $Ca_v3.1(\alpha_{1G})$ Untereinheit sind nochmals in Abbildung 3-7 wiedergegeben und in Tabelle 3-4 zusammengefaßt.

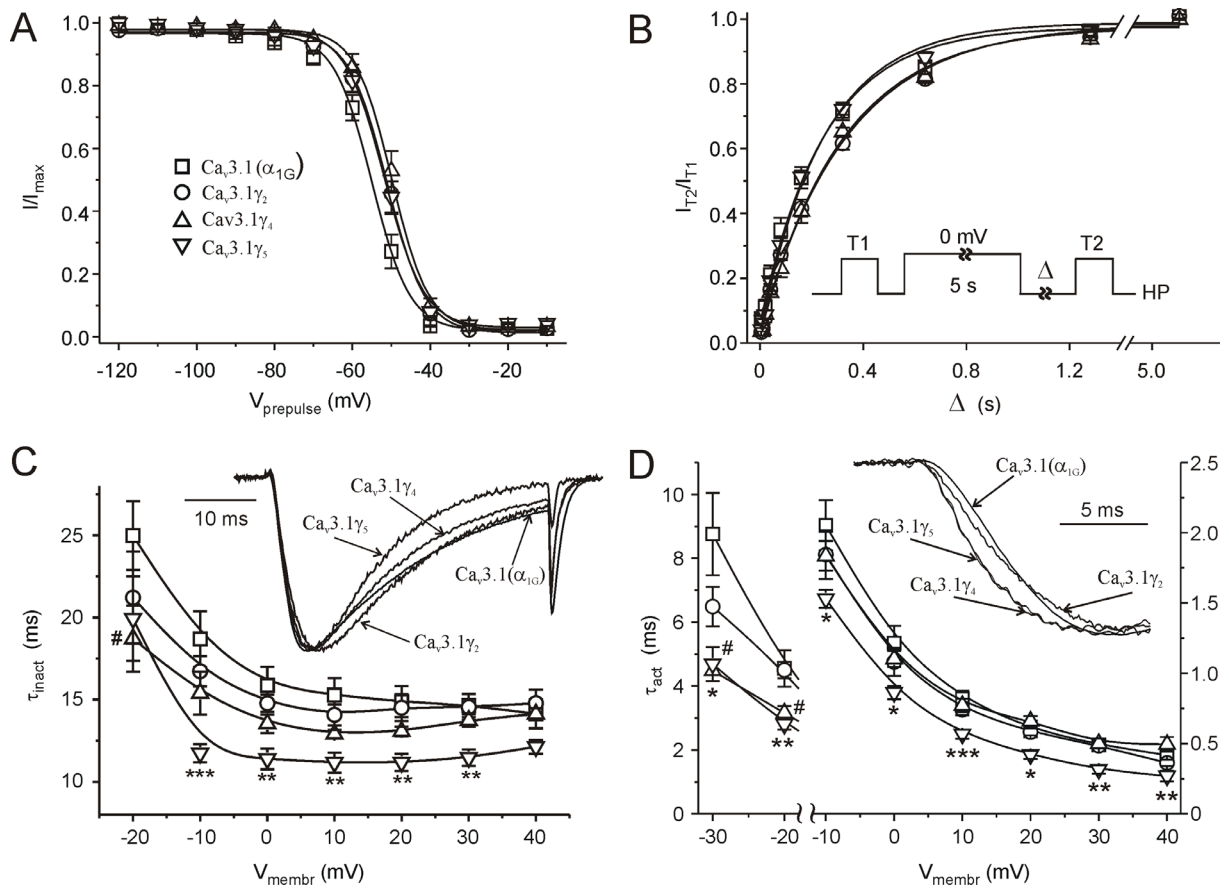


Abbildung 3-7: Effekte von γ_2 , γ_4 und γ_5 auf die spannungsabhängige Aktivierung und Inaktivierung von $\text{Ca}_v3.1 (\alpha_{1G})$ (Kombinationen wie in A angegeben). **A:** *Steady state*-Inaktivierungskurven. Die in 2.16.1 beschriebene Pulssequenz wurde alle 10 sek. wiederholt. Die Amplituden wurden anhand der maximalen Testpulsamplituden normalisiert und gemittelt. Durchgezogene Linien: mit der Boltzmann-Gleichung gefittete gemittelte experimentelle Daten. **B:** Recovery von der spannungsabhängigen Inaktivierung. (T1: Puls von 40ms bis zum Maximum der Strom-Spannungsbeziehung. Kanalaktivierung durch Stromstoß von 5 sek. auf 0mV. Nach unterschiedlichen Erholungszeiten Δ wurde die Stromamplitude nochmals mit einem Testpuls T2 untersucht, der identisch zu T1 war). Das Ausmaß der Erholung wurde mit I_{T2}/I_{T1} erhalten. **C:** Spannungsabhängigkeit der Zeitkonstanten τ_{inact} der Strominaktivierung (s. 2.16.1). Der Einschub zeigt den aufsteigenden Teil von auf dieselbe Amplitude normalisierten Strömen, die bei einer Depolarisierung auf -10mV (Gipfel der Strom-Spannungsbeziehung) gemessen wurden. **D:** Spannungsabhängigkeit der Stromaktivierungs-Zeitkonstanten τ_{act} für Membranpotentiale von -30mV bis $+40\text{mV}$ (s. Erläuterung zu C). In der Figur angegeben ist ein Beispiel der während eines Testpulses auf -20mV erhaltenen Stromverläufe, die zum besseren Vergleich auf dieselbe Amplitude normalisiert wurden. Beachte die unterschiedliche Skalierung der Y-Achse für Depolarisationen zwischen -30mV und -20mV (links) sowie zwischen -10mV und $+40\text{mV}$ (rechts). #: signifikanter Unterschied zwischen $\text{Ca}_v3.1 (\alpha_{1G})$ und $\text{Ca}_v3.1 (\alpha_{1G}) + \gamma_4$ ($P < 0,05$); *: signifikanter Unterschied zwischen $\text{Ca}_v3.1 (\alpha_{1G})$ und $\text{Ca}_v3.1 (\alpha_{1G}) + \gamma_5$ (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; *** $P < 0,001$)

Kanal	I(pA/pF)	Aktivierung		Inaktivierung		
		$V_{0.5}$ (mV)	k	$V_{0.5}$ (mV)	k	τ (ms)
Ca_v3.1(α_{1G})	62±7(20)	-24.9±1.2(12)	3.9±0.3	-54.9±1.2(9)	4.3±0.2	251±24(9)
Ca_v3.1γ_2	87±13(13)	-24.4±1.6(10)	3.8±0.2	-51.4±1.4(10)	4.2±0.2	336±14**(8)
Ca_v3.1γ_4	79±12(14)	-23.9±1.3(10)	4.1±0.2	-50.0±1.4*(11)	3.9±0.2	320±17*(10)
Ca_v3.1γ_5	73±9(22)	-24.1±1.0(12)	3.9±0.2	-51.7±1.2(11)	4.5±0.2	248±11(9)
Ca_v3.1$\alpha_2\delta$-2	93±15*(17)	-22.3±0.8(12)	4.1±0.2	-50.4±0.7**(11)	4.0±0.2	279±12(10)
Ca_v3.1$\alpha_2\delta$-2γ_5	85±12(18)	-21.4±1.1(19)	4.2±0.2	-49.3±1.1**(11)	4.1±0.3	296±25

Tabelle 3-4: Effekte von γ_2 , γ_4 und γ_5 auf die spannungsabhängige Aktivierung und Inaktivierung des Ca_v3.1 (α_{1G}) T-Typ Kalziumkanals. I: gemittelte Stromdichten aller getesteten Kombinationen. Berechnung der Aktivierung mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung wie in Tabelle 3-3. Die *Steady state*-Inaktivierung wurde wie in Abbildung 3-7 beschrieben gemessen und mit der Boltzmann-Gleichung gefittet. Die resultierenden $V_{0.5}$ und k Werte wurden gemittelt. In der letzten Spalte ist die gemittelte Recovery τ der spannungsabhängigen Inaktivierung wiedergegeben (s. Erläuterung zu Abbildung 3-7). *: P<0,05 zwischen Ca_v3.1 (α_{1G}) und Ca_v3.1 (α_{1G}) + γ_4 ; **: P<0,01 zwischen Ca_v3.1 (α_{1G}) und Ca_v3.1 (α_{1G}) + γ_2 . Die Anzahl der gemessenen Zellen ist in Klammern angegeben.

4 Diskussion

Über viele Jahre galt die skelettmuskelspezifische, modulatorische γ Untereinheit als einziger Vertreter ihres Typs. Letts et al. (1998) identifizierten als verantwortliches Genprodukt für die Absenceepilepsien bei *Stargazer* Mäusen ein Protein, das sich als weiteres potentiell Mitglied einer Genfamilie von γ Hilfsuntereinheiten erwies (γ_2).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals drei weitere Vertreter dieser Untereinheitenklasse identifiziert und charakterisiert. Zwei der drei neuen γ Untereinheiten sind im Gehirn, die dritte in peripheren Geweben lokalisiert. Koexpressionsstudien mit unterschiedlichen Kombinationen aus α_1 , β und $\alpha_2\delta$ Untereinheiten dienten der funktionellen Charakterisierung von γ_{2-5} .

Zeitgleich zu unseren Arbeiten führten Black et al. (1999) und Burgess et al. (1999) unabhängig voneinander Datenbanksuchen nach weiteren humanen γ Untereinheiten durch. Mit Ausnahme der humanen γ_5 Untereinheit, die nicht der von uns identifizierten murinen γ_5 Untereinheit entspricht, führten ihre Recherchen zu ähnlichen Ergebnissen. γ_3 des Menschen konnte so Chromosom 16, γ_4 und γ_5 genau wie γ_1 Chromosom 17 und γ_2 Chromosom 22 zugeordnet werden. Allerdings untersuchte keine der beiden Gruppen Lokalisation und Eigenschaften der neu entdeckten Untereinheiten.

4.1 Sequenzvergleich und Hydrophobizitätsanalysen der Aminosäuresequenzen der γ Untereinheiten

Ein Alignment der Untereinheiten γ_1 bis γ_5 ist bereits in Abbildung 3-1 gezeigt. Abbildung 4-1 illustriert die Sequenzhomologien anhand eines phylogenetischen Stammbaumes. Es fällt auf, daß die neuronalen γ_{2-4} mit 75,6 bzw. 60 % für γ_2 zu γ_3 bzw. γ_4 hohe Identitäten aufweisen, ihre Verwandtschaft mit γ_1 oder γ_5 aber nur ca. 25% beträgt. Trotzdem konnte die Zugehörigkeit aller beschriebenen Untereinheiten zur Familie der γ Untereinheiten mittels der in Hydrophobizitätsanalysen ermittelten vier Transmembransegment-Struktur sowie der in allen Fällen übereinstimmenden Intron-Exon-Struktur mit jeweils vier Exonen bestätigt werden (s. auch Black et al., 1999; Burgess et al., 1999).

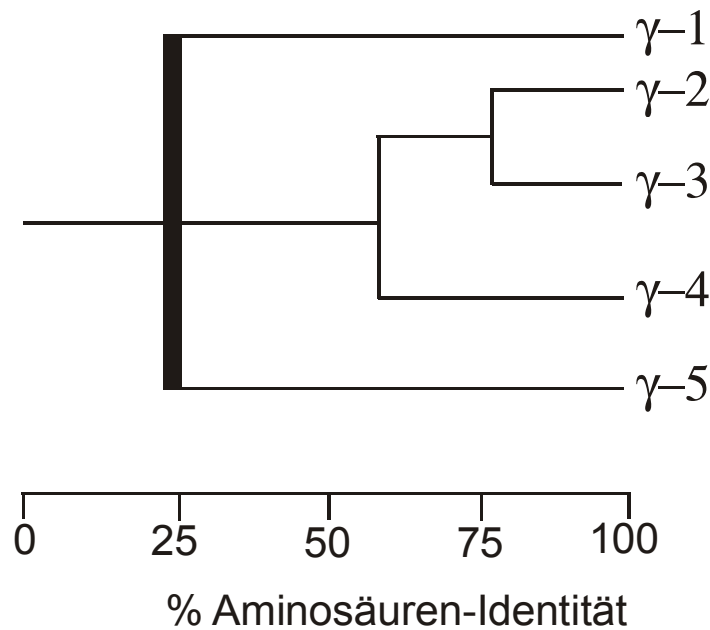


Abbildung 4-1: Phylogenetischer Stammbaum aller γ Untereinheiten.

Die neuronalen Untereinheiten γ_{2-4} besitzen einen ca. 100bp längeren C-Terminus als γ_1 und γ_5 . Letts et al. (1998) spekulierten, daß dieser verlängerte C-Terminus eine Rolle bei Protein-Protein-Wechselwirkungen übernehmen und über solche Interaktionen an der Entstehung von *Spike wave*-Komplexen im EEG bei *Stargazer* Mäusen beteiligt sein könnte.

4.2 Gewebsverteilung der einzelnen γ Untereinheiten

Von der skelettmuskelspezifischen γ_1 Untereinheit ist schon lange aus verschiedenen Spezies bekannt, daß sie mit der ebenfalls skelettmuskelspezifischen $\text{Ca}_v1.1$ (α_{1S}) Untereinheit assoziiert ist (Miller, 1992).

Die von Letts et al. (1998) beschriebene Verteilung der γ_2 Untereinheit im Maushirn konnte von uns bestätigt werden. Die Gewebsverteilung der übrigen Untereinheiten der γ Familie wurde erstmals im Rahmen dieser Arbeit beschrieben. Tabelle 4-1 faßt die in den Abschnitten 3.2 und 3.3 beschriebenen Ergebnisse zusammen und vergleicht die Lokalisationen von γ_{1-5} mit denjenigen der neuronalen Non-L-Typ $\text{Ca}_v2.1$ (α_{1A}), der L-Typ $\text{Ca}_v1.2$ (α_{1C}) und der T-Typ $\text{Ca}_v3.1$ (α_{1G}) Untereinheiten. Aus dieser Zusammenstellung geht hervor, daß diese Untereinheiten im Gehirn ähnliche Lokalisationen wie die neuronalen γ_{2-4} aufweisen; γ_5 ist parallel zu $\text{Ca}_v1.2$ (α_{1C}) und $\text{Ca}_v3.1$ (α_{1G}) u.a. auch im Herzen anzutreffen. Dies stützt die Ergebnisse unserer bereits beschriebenen elektrophysiologischen Koexpressionsstudien.

	Ca _v 2.1 (α_{1A})	Ca _v 1.2 (α_{1C})	Ca _v 3.1 (α_{1G})	γ_1	γ_2	γ_3	γ_4	γ_5
Skelettmuskel	-	-	-	+++	-	-	-	++
Leber	-	-	-	-	-	-	-	+++
Niere	-	-	-	-	-	-	-	+++
Herz	-	++	++	-	-	-	-	++
Lunge	-	-	-	-	-	-	-	++
Hoden	-	-	-	-	-	-	-	+
Gehirn								
Olfaktorischer Bulbus	++	++	++	-	++	++	+++	-
Großhirnrinde	++	-	++	-	++	+++	-	-
Hippocampus	+++	++	++	-	++	+++	-	-
Thalamus	++	+	++	-	++	-	++	-
Striatum	+++	-	-	-	-	++	+++	-
Habenulae	-	-	+	-	-	-	+++	-
Kleinhirn								
Purkinje-Zellschicht	+++	-	+++	-	+++	-	+	-
Molekular-Zellschicht	++	-	+	-	++	-	+++	-
Granular-Zellschicht	+++	++	+	-	++	-	+	-

Tabelle 4-1: Gewebsverteilung der Ca_v2.1 (α_{1A}), Ca_v1.2 (α_{1C}), Ca_v3.1 (α_{1G}) sowie γ_{1-5} Untereinheiten.

4.3 Elektrophysiologische Charakterisierung von γ_{1-5}

Die skelettmuskelspezifische γ_1 Untereinheit ist schon lange bekannt und auch elektrophysiologisch charakterisiert. Singer et al. (1991) und Eberst et al. (1997) berichteten eine Verschiebung der Inaktivierungskurven um 30mV in Richtung negativerer Potentiale bei Koexpression von Ca_v1.2 (α_{1C}), kardialem β_{2a} ($c\beta_{2a}$) und $\alpha_2\delta$ -1 mit γ_1 . Aktuelle Resultate einer *In vivo*-Studie des murinen L-Typ Kalziumkanals des Skelettmuskels bestätigen dies: Freise et al. (2000) fanden nach Ausschaltung des γ_1 Genes einen erhöhten dihydropyridinsensitiven Kalziumstrom und eine zu positiveren Potentialen hin verschobene *Steady state*-Inaktivierungskurve.

Letts et al. (1998) führten *In vitro*-Koexpressionsstudien von γ_2 mit einem Komplex aus der neuronalen Ca_v2.1 (α_{1A}), β_{1a} und $\alpha_2\delta$ -1 Untereinheit durch und sahen analog zu γ_1 eine Linksverschiebung der *Steady state*-Inaktivierungskurve. Eine Mutation der γ_2 Untereinheit führt demzufolge aufgrund eines übermäßigen Kalziumeinstroms in neuronale Zellen schon bei normalem Ruhepotential zu den bei sogenannten *Stargazer* Mäusen beobachteten absenceähnlichen Epilepsiezuständen.

Demgegenüber bringen Chen et al. (2000) das als Stargazin bezeichnete Genprodukt der *Stargazer* Mäuse mit der Ausbildung defekter AMPA Rezeptoren in zerebellären Granularzellen und hippocampalen Pyramidenzellen in Verbindung. In ihrem *In vitro*-

Modell weisen sie der γ_2 Untereinheit eine essentielle Rolle für den Transport von AMPA Rezeptoren zur neuronalen Oberfläche und ihre korrekte Positionierung in der Postsynapse zu. Der letztendliche Beweis einer direkten Assoziation *in vivo* steht allerdings aus.

Die von uns identifizierten neuronalen Untereinheiten γ_3 und γ_4 sind mit 75,6 und 60% Sequenzhomologien der γ_2 Untereinheit sehr verwandt. Um ihre Effekte mit denen von γ_2 zu vergleichen, wählten wir die bereits von Eberst et al. (1997) für γ_1 bzw. Letts et al. (1998) für γ_2 verwendeten Komplexe aus $\text{Ca}_v1.2$ (α_{1C}), $\text{c}\beta_{2a}$ und $\alpha_2\delta-1$ bzw. $\text{Ca}_v2.1$ (α_{1A}), β_{1a} und $\alpha_2\delta-1$ und exprimierten diese mit γ_2 , γ_4 und γ_5 . Die von beiden Arbeitsgruppen beschriebenen Effekte konnten bei Verwendung von Ca^{2+} als Ladungsträger für γ_2 und γ_4 , nicht jedoch für γ_5 – unabhängig von einer Koexpression mit oder ohne $\alpha_2\delta-1$ – bestätigt werden. Bei Verwendung von Ba^{2+} als Ladungsträger wurde für γ_2 und γ_4 überraschenderweise eine Rechtsverschiebung der spannungsabhängigen Inaktivierung beobachtet. Die physiologische Relevanz dieser Entdeckung konnte bislang nicht geklärt werden.

Hieraus schlußfolgern wir, daß die γ_5 Untereinheit wahrscheinlich keine modulatorische Hilfsuntereinheit von HVA Kalziumkanälen ist.

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse und unter Zuhilfenahme der in Tabelle 4-1 gegebenen Expressionsmuster der einzelnen α_1 und γ Untereinheiten untersuchten wir die Möglichkeit einer Assoziation der neu entdeckten γ Untereinheiten mit $\text{Ca}_v3.1$ (α_{1G}), einem Vertreter der T-Typ Kalziumkanäle. Dolphin et al. (1999) fanden bei Koexpression von $\text{Ca}_v3.1$ (α_{1G}) mit β_{1b} bzw. $\alpha_2\delta-1$ eine vermehrte Expression von $\text{Ca}_v3.1$ (α_{1G}) in der Plasmamembran von COS-7 Zellen sowie eine vergrößerte Stromdichte. Der beobachtete Effekt wurde auf ein verbessertes Targeting von $\text{Ca}_v3.1$ (α_{1G}) durch β_{1b} bzw. $\alpha_2\delta-1$ zurückgeführt. Dem widersprechen die Untersuchungen von Perez-Reyes et al. (1998), Cribbs et al. (1998) und Klugbauer et al. (1999a), wonach T-Typ Kalziumkanäle keiner Modulation durch β Untereinheiten unterliegen und auch keine typische Bindungsstelle für diese besitzen. Die Unterbindung der β Expression in Ganglion nodosum Neuronen blieb ohne Einfluß auf die gemessenen T-Typ Kalziumströme (Lambert et al., 1997). Koexpression von $\alpha_2\delta-1$ bzw. $\alpha_2\delta-3$ mit $\text{Ca}_v3.1$ (α_{1G}) modulierte die Eigenschaften von $\text{Ca}_v3.1$ (α_{1G}) nicht (Lacinová et al., 1999).

In unseren Untersuchungen hatten γ_2 und γ_4 keinen wesentlichen Einfluß auf die Spannungsabhängigkeit oder die Kinetik der $\text{Ca}_v3.1$ (α_{1G}) Ströme. Bei Koexpression von γ_5 und $\alpha_2\delta-2$ mit $\text{Ca}_v3.1$ (α_{1G}) hingegen zeigte sich, daß $\alpha_2\delta-2$ unabhängig von einer

zusätzlichen Expression der γ_5 Untereinheit eine erhöhte Stromdichte und eine Linksverschiebung der *Steady state*-Inaktivierungskurve von $\text{Ca}_v3.1$ (α_{1G}) bewirkte. γ_5 alleine beschleunigte den zeitlichen Verlauf der Aktivierung und Inaktivierung der T-Typ Kalziumkanaluntereinheit über den gesamten Potentialbereich.

Da dieser Effekt nur bei der T-Typ Kalziumkanal Untereinheit $\text{Ca}_v3.1$ (α_{1G}), nicht aber bei der L-Typ Kalziumkanal Untereinheit $\text{Ca}_v1.2$ (α_{1C}) oder Non-L-Typ Kalziumkanal Untereinheit $\text{Ca}_v2.1$ (α_{1A}) zu beobachten war, ist anzunehmen, daß γ_5 auch *in vivo* mit T-Typ Kalziumkanal α_1 Untereinheiten interagieren kann. Dies stellt die erste beschriebene Interaktion von LVA Kalziumkanälen mit modulatorischen Hilfsuntereinheiten dar.

4.4 Ausblick

Wir haben im Rahmen dieser Arbeit zwei neue Hilfsuntereinheiten, $\gamma_{3/4}$, der HVA Kalziumkanäle kloniert und charakterisiert. Bezüglich der ebenfalls neu identifizierten γ_5 Untereinheit deuten unsere Ergebnisse auf eine funktionelle Assoziation mit den bislang nicht mit modulatorischen Hilfsuntereinheiten in Verbindung gebrachten LVA Kalziumkanälen hin. Drei der insgesamt fünf bekannten murinen γ Untereinheiten (γ_{2-4}) sind im Gehirn lokalisiert.

Der bei *Stargazer* Mäusen beschriebenen Absenceepilepsie liegt eine Mutation im γ_2 Gen zugrunde (Letts et al., 1998). Das defekte Protein führt hier schon bei dem normalen Ruhepotential neuronaler Zellen zu einem übermäßigen Kalziumeinstrom. Dies hat eine gesteigerte Erregbarkeit der Zellen zur Folge und wird als ursächlich für die Entstehung von *Spike wave*-Komplexen im EEG angesehen. Außerdem findet sich bei diesen Mäusen eine siebzigfache Reduktion der mRNA Expression des *brain derived neurotrophic factors* (BDNF), die in Zusammenhang mit der zusätzlich beobachteten cerebellären Ataxie gebracht wird. Für die BDNF Downregulation wird ebenfalls ein übermäßiger Kalziumeinstrom verantwortlich gemacht, da die Zahl der BDNF Rezeptoren (TrkB) unverändert bleibt.

Viele weitere Krankheitsbilder sind auf Defekte bekannter L-Typ und Non-L-Typ Kalziumkanal Untereinheiten zurückzuführen (s. Tabelle 4-2).

Ferner werden auch andere neuronale Ausfälle mit Ionenkanaldefekten in Verbindung gebracht, so z.B. benigne neonatale Konvulsionen mit Kaliumkanaldefekten (Biervert et al., 1998; Singh et al., 1998) oder Fieberkrämpfe mit Natriumkanalmutationen (Wallace et al., 1998).

Chen et al. (2000) zufolge hat die von Letts et al. (1998) beschriebene γ_2 Untereinheit keinen modulatorischen Einfluß auf HVA Kalziumkanäle, sondern ist für den korrekten Einbau und die Positionierung von AMPA Rezeptoren in der Postsynapse verantwortlich. Der letztendliche *In vivo*-Beweis der veröffentlichten Daten fehlt bislang. Dennoch unterstreicht die genannte Publikation eindrucksvoll, wie vielfältig und komplex die Struktur und das Zusammenspiel neuronaler Rezeptoren und Ionenkanäle sind. Störende Einflüsse können sich auf sehr unterschiedliche Art und Weise darstellen und auswirken.

Die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit erhobenen Daten erweitern unsere Kenntnisse über die funktionelle Vielfalt von Kalziumkanälen. Die weitere Erforschung der Struktur, Zusammensetzung und Funktion von Ionenkanälen allgemein und ihrer Untereinheiten sowie die chromosomale Lokalisierung ihrer Gene werden in den nächsten Jahren wesentlich dazu beitragen, Pathomechanismen neuronaler und extraneuronaler Krankheitsbilder aufzuklären, für deren Entstehen Ionenkanaldefekte ursächlich sind.

Gen	Spezies	Lokalisation	GE/KO	Funktion	Literaturangabe
L-Typ Kalziumkanäle					
<i>Ca_v1.1</i>	Maus	Skelettmuskel	GE	lethal	1
β_1	Maus	Skelettmuskel	KO	lethal	2
γ	Maus	Skelettmuskel	KO	phänotypisch unauffällig	3
<i>Ca_v1.1</i>	Mensch	Skelettmuskel	GE	hypokaläm.period.Lähmung	4,5
<i>Ca_v1.2 ähnl.</i>	<i>C.elegans</i>	Muskel	GE	Myotonie;mehrere Phänotypen	6
<i>Ca_v1.4</i>	Mensch	Retina	GE	X-chromosomale KSNB	7,8
<i>Ca_v1.2</i>	Maus	Herz,gl.Musk.	KO	lethal	9
Non-L-Typ Kalziumkanäle					
<i>Ca_v2.1</i>	Mensch	Gehirn	GE	fam.hemipl.Migr.u.epis.Atax.II	10
<i>Ca_v2.1</i>	Mensch	Gehirn	GE	zerebelläre Ataxie	11
<i>Ca_v2.1</i>	Maus	Gehirn	GE	Tottering Maus/Absencen	12
β_3	Maus	Gehirn	KO	Verminderung d.N-Typ Kanäle	13,14
β_4	Maus	Gehirn	GE	Lethargic Maus/Atax.u.Anfälle	15
γ_2	Maus	Gehirn	GE	Stargazer Maus/Absencen	16

Tabelle 4-2: Mit HVA Kalziumkanälen assoziierte genetische Erkrankungen (modifiziert nach Hofmann et al., 1999). GE: genetische Erkrankung; KO: experimenteller Knock Out; KSNB: kongenitale stationäre Nachtblindheit; fam.hemipl.Migr.u.epis.Atax.II: familiäre hemiplegische Migräne und episodische Ataxie Typ II

1: Chaudhari(1992); 2: Gregg et al.(1996); 3: Freise et al.(2000); 4: Ptáček et al.(1994); 5: Jurkat-Rott et al.(1994); 6: Lee et al.(1997); 7: Strom et al.(1998); 8: Bech-Hansen et al.(1998); 9: Seisenberger et al.(2000); 10: Ophoff et al.(1996); 11: Zhuchenko et al.(1997); 12: Fletcher et al.(1996); 13: Namkung et al.(1998); 14: Cavalié et al.(1998); 15: Burgess et al.(1997); 16: Letts et al.(1998)

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels Datenbanksuche drei neue murine modulatorische γ Untereinheiten (γ_{3-5}) spannungsabhängiger Kalziumkanäle identifiziert. Die *Full length*-Klone wurden isoliert und ihre Sequenzidentität mit den zwei bereits bekannten γ Untereinheiten, γ_1 und γ_2 , verglichen. Erstmals erfolgte eine Bestimmung ihrer Gewebsverteilung anhand von Northern blot-Analysen. Die rein neuronalen Untereinheiten γ_{2-4} wurden ferner im Maushirn durch *In situ*-Hybridisierungen genau lokalisiert. *In vitro*-Koexpressionsstudien mit verschiedenen Kombinationen von Komplexen aus α_1 , β und $\alpha_2\delta$ mit den neuen γ Untereinheiten dienten der funktionellen Charakterisierung.

Es zeigte sich, daß die neu entdeckten Untereinheiten γ_{3-5} 25% identische Aminosäuren mit der skelettmuskelspezifischen γ_1 Untereinheit aufweisen. Die neuronalen γ_2 , γ_3 und γ_4 sind untereinander zu 75,6% ($\gamma_2:\gamma_3$) bzw. 60% ($\gamma_{2/3}:\gamma_4$) identisch.

Der skelettmuskelspezifischen γ_1 Untereinheit stehen mit γ_{2-4} rein neuronale Vertreter gegenüber. γ_2 ist vornehmlich im Bulbus olfactorius, Cerebellum, Cortex, Hippocampus und Thalamus anzutreffen, γ_3 im Bulbus olfactorius, Cortex, Hippocampus und Striatum und γ_4 im Bulbus olfactorius, Cerebellum, Striatum und Thalamus sowie in den Habenulae. Demgegenüber ist γ_5 in Herz, Leber, Lunge, Niere, Skelettmuskel und in geringerem Ausmaß im Hoden lokalisiert.

Die Koexpression der neuronalen non-L-Typ $\text{Ca}_v2.1$ (α_{1A}) Untereinheit, β_{1a} und $\alpha_2\delta-1$ zusammen mit γ_2 und γ_4 verschob die *Steady state*-Inaktivierungskurve des $\text{Ca}_v2.1$ (α_{1A}) Kanals in Richtung negativer Potentiale und verringerte die Inaktivierungszeitkonstanten τ_1 und τ_2 . Ein Austausch der β_{1a} mit der neuronalen β_{2a} Untereinheit führte bei Verwendung von Ca^{2+} als Ladungsträger zu dem gleichen Ergebnis. Zusätzlich untersuchten wir das von Eberst et al. (1997) beschriebene Modell mit $\text{Ca}_v1.2$ (α_{1C-a}), der kardialen β_{2a} Untereinheit und $\alpha_2\delta-1$ mit γ_2 . Hier beobachtete man bei Verwendung von Ba^{2+} als Ladungsträger eine Verschiebung der *Steady state*-Inaktivierung sowie der Spannungs-Leitfähigkeitsbeziehung in Richtung positiver Potentiale.

Da γ_5 in keiner der untersuchten Kombinationen mit Vertretern der HVA Kalziumkanäle einen signifikanten Effekt zeigte, prüften wir in einem zweiten Schritt, ob diese Untereinheit modulierend auf die T-Typ Kalziumkanäle einwirkt. T-Typ Kalziumkanäle besitzen kein Interaktionsmotiv für β Untereinheiten. Koexpression von $\alpha_2\delta-1$ und $\alpha_2\delta-3$ mit $\text{Ca}_v3.1$ (α_{1G}) moduliert die Kanaleigenschaften nicht. γ_5 und $\alpha_2\delta-2$ sind genau wie

Ca_v3.1 (α_{1G}) u.a. im Herzen lokalisiert. Die Koexpression von γ_5 mit der Ca_v3.1 (α_{1G}) Untereinheit beschleunigte deren Aktivierung und Inaktivierung über den gesamten Potentialbereich hinweg.

Diese Beobachtung und die Tatsache, daß $\alpha_2\delta-2$ die *Steady state*-Inaktivierungskurve von Ca_v3.1 (α_{1G}) zu negativeren Potentialen hin zu verschieben vermag, lassen erstmals den Schluß zu, daß auch die Vertreter der T-Typ Kalziumkanäle, über deren Assoziation mit Hilfsuntereinheiten bisher nichts bekannt war, mit solchen modulatorischen Proteinen assoziiert sind.

6 Anhang

6.1 Accession numbers von γ_3 , γ_4 und γ_5

Die neu identifizierten Untereinheiten γ_3 , γ_4 und γ_5 sind in der EMBL Datenbank unter folgenden Nummern abgelegt:

γ_3 : AJ272044

γ_4 : AJ272045

γ_5 : AJ272046

6.2 Nukleinsäuresequenzen von γ_3 , γ_4 und γ_5

γ_3 Untereinheit

```

1      ATGAGGATGT GTGACAGAGG TATCCAGATG TTGATCACTA CTGTAGGAGC CTTCGCAGCT
61     TTTAGTTTAA TGACCATTGC AGTGGGCACG GACTACTGGC TATATTCAG AGGTGTGTGC
121    AGGACTAAAT CTACAAGTGA CAATGAAACC AGCAGGAAGA ATGAAGAAGT AATGACCCAC
181    TTCGGGTTGT GGAGGACCTG CTGCTTGGAA GGAGCTTTCC GAGGCGTGTG CAAGAAAATC
241    GATCACTTCC CAGAAGATGC AGACTATGAA CAGGATACAG CAGAATATCT TCTACGAGCT
301    GTGAGGGCCT CCAGCGTCTT TCCCATCCTC AGCGTCACTC TGCTGTTTTT CGGGGGACTC
361    TGCGTGGCTG CCAGCGAGTT CCACCGCAGC AGGCACAGTG TGATCCTCAG CGCTGGCATC
421    TTCTTCGTCT CTGCAGGGCT AAGCAACATC ATCGGCATCA TAGTTTATAT CTCAGCCAAT
481    GCTGGAGACC CTGGGCAGAG GGACTCTAAA AAGAGCTACT CCTACGGCTG GTCCTTTTAT
541    TTTGGAGCCT TCTCTTTCAT CATCGCGGAA ATTGTGGGCG TGGTCGCCGT GCACATCTAT
601    ATCGAGAAGC ATCAGCAGTT GCGTGCCAGA TCCCATTAG AGCTCCTGAA GAAGTCTACA
661    TTTGCGCGCC TGCCGCCCTA CAGGTATAGA TTCCGAAGAC GGTCAAGTTC TCGCTCCACT
721    GAACCCAGAT CTCGAGACCT TTCTCCCATC AGCAAAGGCT TCCACACCAT CCCTTCCACC
781    GACATCTCCA TGTTACCCCT CTCCCAGGAC CCCTCTAAGC TTACCATGGG GACCCTTCTC
841    AACTCTGACC GGGACCATGC TTTTCTACAG TTCCACAACCT CCACACCCAA AGAGTTCAAA
901    GAGTCATTGC ATAACAATCC GGCCAACAGA CGCACCACGC CCGTCTGA

```

γ_4 Untereinheit

```

1      ATGGTGCAT GCGACCGCGG GCTGCAGATG CTGCTGACCA CGGCCGGAGC CTTCGCCGCC
61     TTCTCGCTCA TGGCCATCGC CATCGGCACC GACTACTGGC TGTACTCCAG CGCGCACATC
121    TGCAACGGCA CCAACCTGAC CATGGACGAC GGGCCCCCGC CCCGCCGCGC TCGCGGCGAC
181    CTCACCCATT CGGGACTCTG GCGGGTGTGT TGCATCGAAG GCATCTATAG AGGGCACTGC

```

241 TTCCGGATCA ACCACTTCCC AGAGGACAAT GATTACGACC ACGACAGCTC CGAGTACCTC
 301 CTCCGCATTG TGCGAGCCTC CAGTGTCTTT CCCATCCTCA GCACCATTCT GCTCCTGCTC
 361 GGAGGGCTCT GCATCGGCGC TGGGAGGATC TACAGCCGCA AGAACAAATAT TGTCTCAGC
 421 GCGGGAATCC TCTTTGTGGC GGCAGGCCTC AGTAATATCA TCGGTATCAT CGTCTACATT
 481 TCCAGCAACA CGGGCGACCC CAGTGACAAA CGTGACGAAG AAAAAAGAA CCATTACAAC
 541 TACGGCTGGT CTTTTTACTT TGGAGCCCTG TCGTTTATTG TGGCGGAGAC CGTGGGCGTC
 601 CTGGCTGTAA ACATTTACAT TGAGAAAAAT AAAGAGTTGA GGTTTAAGAC CAAGCGGGAG
 661 TTCCTTAAGG CCTCTTCCTC CTCTCCTTAC GCCAGGATGC CGAGCTACAG GTACCGGCGA
 721 CGGCGGTCCA GGTCCAGTTC AAGGTCCACG GAGGCCTCAC CCTCCAGGGA TGCATCTCCC
 781 GTGGGCTGA AGATCACCGG AGCCATTCCC ATGGGTGAGC TGTCCATGTA CACGCTATCC
 841 AGAGAACCCC TTAAGGTGAC CACAGCTGCG AGCTACAGTC CGGACCAGGA CGCTGGCTTC
 901 CTGCAGATGC ATGACTTCTT CCAACAGGAC CTAAAGGAAG GTTTCATGT CAGCATGCTG
 961 AACCGGCGGA CGACTCCCGT GTGA

γ₅ Untereinheit

1 ATGACGGCCA TCGGCGCGCA GGCCACAAG CTGTTGGGCC TTAAGAGGCC CCACCGTCT
 61 TTCTTTGAGT CCTTCATCCG GACTCCTATC ATCGTGTGCA CTGCCCTGGC TGTGGTCTCT
 121 TCTTCAGTCT CCATCTGCGA TGGCCACTGG CTCCTAGTGG AGGATCATCT CTTTGGGCTG
 181 TGGTACTTCT GCACCATCGG CAACCACAGT GAACCACACT GTCTGAGAGA CCTGAGCCAG
 241 GCCCATATGC CCGGGCTGGC TGTAGGCATG GGCCTAGCAC GCAGTGTGGC CGCCATGGCA
 301 GTGGTGGCTG CCATCTTCGG CTTGGAGATG CTCATTGTGT CCCAGGTGTG TGAAGATGTC
 361 CGCTCACGGC GCAAGTGGGC CATCGGTTCC TACCTCCTCC TGGTTGCCTT TATCCTCTCC
 421 TCTGGGGGCC TCCTCACCTT CATCATCCTG CTCAAGAATC AGATCAACCT CCTGGGCTTC
 481 ACCCTGATGT TCTGGTGTGA ATTCACTGCC TCCTTCCTCT TCTTCCTCAA TGCCGCCAGC
 541 GGCCTTACA TCAACAGCCT CACTCAGCCC TGGGACCCTC CAGCAGGGAC CCTGGCTTAC
 601 AGAAAGCGAG GTTATGATGG GACTTCTCTG ATATAG

6.3 Verwendete Primer

Primername	Sequenz (5' → 3')	Verwendung	Besonderheit
g31	CGG GGT ACC GCC ACC ATG AGG ATG TGT GAC AGA G	Forward Primer für Klonierung bzw. Bestätigung der Sequenz von γ_3 , γ_4 und γ_5 und Einbringen in pcDNA3 Vektor	Acc65.I Schnittstelle; Kozak Sequenz (zur Initiation der Translation)
g41	CGG GGT ACC GCC ACC ATG GTG CGA TGC GAC CGC		
g51	CGG GGT ACC GCC ACC ATG ACG GCC ATC GGC GCG CA		
g32	C TAG TCT AGA TCA GAC GGG CGT GGT GCG	Reverse Primer für Klonierung von γ_3 , γ_4 und γ_5 und Einbringen in pcDNA3 Vektor	XbaI Schnittstelle
g42	C TAG TCT AGA TCA CAC GGG AGT CGT CCG C		
g52	C TAG TCT AGA CTA TAT CAG AGA AGT CCC AT		
g33	CTA CAA GTG ACA ATG AAA CCA	Forward Primer zur Herstellung der Sonden für die Northern blot- Analyse	
g43	CAG TGA CAA ACG TGA CGA AGA C		
g53	CTA CAA GTG ACA ATG AAA CC		
g34	CCC GGT CAG AGT TGA GAA GG	Reverse Primer zur Herstellung der Sonden für die Northern blot- Analyse	
g44	CAT GCT GCT GAC ATG GAA ACC		
g54	TAG AGT CCC TCT GCC CAT GGT		
g25	CGC GGA TCC AGT AGG GAC CCC CTG AAG GCT	Forward Primer zur Herstellung der Sonden für die <i>In situ</i> - Hybridisierung und Einbringen in pAL1 Vektor	BamHI Schnittstelle
g35	CGC GGA TCC ATC AGC AAA GGC TTC CAC A		
g45	CGC GGA TCC CCA GAG AAC CCC TTA AGG TG		

g26	ATC CGG TAC CGC TGT GTT GGC GTG GAG AGA	Reverse Primer zur Herstellung der Sonden für die <i>In situ</i> - Hybridisierung und Einbringen in pAL1 Vektor	Asp718 Schnittstelle
g36	ATC CGG TAC CAT GCA ATG ACT CTT TGA ACT		
g46	ATC CGG TAC CAC GGGA GTC GTC CGC CGG TT		

7 Literaturverzeichnis

7.1 Zitierte Veröffentlichungen

- Angelotti T, Hofmann F (1996) „Tissue-specific expression of splice variants of the mouse voltage-gated calcium channel alpha2/delta subunit” *FEBS Lett* 397: 331-337
- Armstrong CM, Neyton J (1992) „ Ion permeation through calcium channels“ *Ann NY Acad Sci* 635: 18-25
- Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, Pearce WG, Koop B, Fishman GA, Mets M, Musarella MA, Boycott KM (1998) „ Loss-of-function mutations in a calcium-channel alpha1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness” *Nat Genet* 19: 264-267
- Bichet D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, Mori Y, De Waard M (2000) „The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit” *Neuron* 25: 177-190
- Biel M, Ruth P, Bosse E, Hullin R, Stuhmer W, Flockerzi V, Hofmann F (1990) „Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung” *FEBS Lett* 269: 409-412
- Biel M, Hullin R, Freundner S, Singer D, Dascal N, Flockerzi V, Hofmann F (1991) „Tissue-specific expression of high-voltage-activated dihydropyridine-sensitive L-type calcium channels” *Eur J Biochem* 200: 81-88
- Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, Berkovic SF, Propping P, Jentsch TJ, Steinlein OK (1998) „A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy” *Science* 279: 403-406
- Birnbaumer L, Campbell KP, Catterall WA, Harpold MM, Hofmann F, Horne WA, Mori Y, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T et al. (1994) „The naming of voltage-gated calcium channels” *Neuron* 13: 505-506
- Birnboim HC, Doly J (1979) „A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid” *Nucl Acid Res* 7: 1513-1518
- Black JL, Lennon VA (1999) „Identification and cloning of putative human neuronal voltage-gated calcium channel γ -2 and γ -3 subunits: neurologic implications” *Mayo Clin Proc* 74: 357-361
- Bosse E, Regulla S, Biel M, Ruth P, Meyer HE, Flockerzi V, Hofmann F (1990) „The cDNA and deduced amino acid sequence of the gamma subunit of the L-type calcium channel from rabbit skeletal muscle” *FEBS Lett* 267: 153-156
- Burgess DL, Jones JM, Meisler MH, Noebels JL (1997) „Mutation of the Ca²⁺ channel beta subunit gene Cchb4 is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse” *Cell* 88: 385-392

- Burgess DL, Caleb FD, Gefrides LA, Noebels JL (1999) „Identification of three novel Ca²⁺ channel γ subunit genes reveals molecular diversification by tandem and chromosome duplication” *Genome* 9: 1204-1213
- Carbone E, Lux HD (1987) „Kinetics and selectivity of a low-voltage-activated calcium current in chick and rat sensory neurones“ *J Physiol* 386: 547-570
- Castellano A, Wei X, Birnbaumer L, Perez-Reyes E (1993) „Cloning and expression of a neuronal calcium channel beta subunit” *J Biol Chem* 268: 12359-12366
- Catterall WA (1995) „Structure and function of voltage-gated ion channels“ *Annu Rev Biochem* 64: 493-531
- Cavalié A, Murakami M, Fleischmann B, Ludwig A, Schroth G, Trost C, Hescheler J, Schwegler H, Flockerzi V (1998) „CA channel function in beta3 deficient mice“ *N-Sch Archiv Pharmacol* 358: R163
- Chaudhari N (1992) „A single nucleotide deletion in the skeletal muscle-specific calcium channel transcript of muscular dysgenesis (mdg) mice” *J Biol Chem* 267: 25636-25639
- Chen L, Chetkovich DM, Petralia RS, Sweeney NT, Kawasaki Y, Wenthold RJ, Brecht DS, Nicoll RA (2000) „Stargazing regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms” *Nature* 408: 936-943
- Cribbs LL, Lee JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Perez-Reyes E (1998) „Cloning and characterization of α_{1H} from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family” *Circ Res* 83: 103-109
- Davis G, Dibner MD, Battey JF (1986) „Basic methods in molecular biology“ *Elsevier*, New York
- De Jongh KS, Warner C, Colvin AA, Catterall WA (1990) „Characterization of the two size forms of the alpha 1 subunit of skeletal muscle L-type calcium channels” *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10778-10782
- Dolphin AC, Wyatt CN, Richards J, Beattie RE, Craig P, Lee JH, Cribbs LL, Volsen SG, Perez-Reyes E (1999) „The effect of alpha2-delta and other accessory subunits on expression and properties of the calcium channel alpha1G” *J Physiol* 519: 35-45
- Dubel SJ, Starr TV, Hell J, Ahlijanian MK, Enyeart JJ, Catterall WA, Snutch TP (1992) „Molecular cloning of the alpha-1 subunit of an omega-conotoxin-sensitive calcium channel” *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5058-5062
- Eagle H (1959) „Amino acid metabolism in mammalian cell cultures“ *Science* 130: 432-437
- Eberst R, Dai S, Klugbauer N, Hofmann F (1997) „Identification and functional characterization of a calcium channel gamma subunit” *Pflug Arch* 433: 633-637

- Ellis SB, Williams ME, Ways NR, Brenner R, Sharp AH, Leung AT, Campbell KP, McKenna E, Koch WJ, Hui A, et al (1988) „Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel” *Science* 241: 1661-1664
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Sntch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien, RW, Catterall WA (2000) „Nomenclature of voltage-gated calcium channels” *Neuron* 25: 533-535
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) „A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity“ *Anal Biochem* 132: 6-13
- Fletcher CF, Lutz CM, O'Sullivan TN, Shaughnessy JD Jr, Hawkes R, Frankel WN, Copeland NG, Jenkins NA (1996) „Absence epilepsy in tottering mutant mice is associated with calcium channel defects“ *Cell* 87: 607-617
- Freise D, Held B, Wissenbach U, Pfeifer A, Trost C, Himmerkus N, Schweig U, Freichel M, Biel M, Hofmann F, Hoth M, Flockerzi V (2000) „Absence of the gamma subunit of the skeletal muscle dihydropyridine receptor increases L-type Ca²⁺ currents and alters channel inactivation properties“ *J Biol Chem* 275: 14476-14481
- Gao T, Chien AJ, Hosey MM (1999) „Complexes of the alpha1C and beta subunits generate the necessary signal for membrane targeting of class C L-type calcium channels” *J Biol Chem* 274: 2137-2144
- Graham FL, Simley J, Russel WC, Nair R (1977) „Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5“ *J Gen Viol* 36: 59-74
- Gregg RG, Messing A, Strube C, Beurg M, Moss R, Behan M, Sukhareva M, Haynes S, Powell JA, Coronado R, Powers PA (1996) „Absence of the beta subunit (cchb1) of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the alpha 1 subunit and eliminates excitation-contraction coupling” *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13961-13966
- Hofmann F, Lacinová L, Klugbauer N (1999) „Voltage dependent calcium channels: From structure to function“ *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 139: 35-87
- Holmes DS, Quigley M (1981) „A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids“ *Anal Biochem* 114: 193-197
- Huguenard JR (1996) „Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons“ *Annu Rev Physiol* 58: 329-348
- Hullin R, Singer-Lahat D, Freichel M, Biel M, Dascal N, Hofmann F, Flockerzi V (1992) „Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain” *EMBO J* 11: 885-890
- Jay SD, Ellis SB, McCue AF, Williams ME, Vedvick TS, Harpold MM, Campbell KP (1990) „Primary structure of the gamma subunit of DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle” *Science* 248: 490-492

- Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F, Elbaz A, Heine R, Gregg RG, Hogan K, Powers PA, Lapie P, Vale-Santos JE, Weissenbach J, et al. (1994) „A calcium channel mutation causing hypokalemic periodic paralysis“ *Hum Mol Genet* 3: 1415-1419
- Klugbauer N, Marais E, Lacinova L, Hofmann F (1999a) „A T-type calcium channel from mouse brain“ *Pflugers Arch* 437: 710-715
- Klugbauer N, Lacinova L, Marais E, Hobom M, Hofmann F (1999b) „Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit“ *J Neurosci* 19: 684-691
- Lacinová L, Klugbauer N, Hofmann F (1999) „Absence of modulation of the expressed calcium channel alpha1G subunit by alpha2delta subunits“ *J Physiol* 516: 639-645
- Lambert R, Maulet Y, Mouton J, Beattie R, Volsen S, De Waardt M, Feltz A (1997) „T-type Ca^{2+} current properties are not modified by Ca^{2+} channel β subunit depletion in nodosus ganglion neurons“ *J Neurosci* 17: 6621-6628
- Lee RY, Lobel L, Hengartner M, Horvitz HR, Avery L (1997) „Mutations in the alpha1 subunit of an L-type voltage-activated Ca^{2+} channel cause myotonia in *Caenorhabditis elegans*“ *EMBO J* 16: 6066-6076
- Lee JH, Daud AN, Cribbs LL, Lacerda AE, Pereverzev A, Klockner U, Schneider T, Perez-Reyes E (1999) „Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family“ *J Neurosci* 19: 1912-1921
- Letts VA, Felix R, Biddlecome GH, Arikath J, Mahaffey CL, Valenzuela A, Bartlett FS, Mori Y, Campbell KP, Frankel WN (1998) „The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca^{2+} -channel gamma subunit“ *Nat Genet* 19: 340-347
- Ludwig A, Flockerzi V, Hofmann F (1997) „Regional expression and cellular localization of the alpha1 and beta subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain“ *J Neurosci* 17(4): 1339-1349
- Magee JC, Johnston D (1995) „Synaptic activation of voltage-gated channels in the dendrites of hippocampal pyramidal neurons“ *Science* 268: 301-304
- McCormick DA, Pape HC (1990) „Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones“ *J Physiol* 431: 291-318
- Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S, Numa S (1989) „Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel“ *Nature* 340: 230-233
- Miller RJ (1992) „Voltage-sensitive Ca^{2+} channels“ *J Biol Chem* 267: 1403-1406
- Monteil A, Chemin J, Bourinet E, Mennessier G, Lory P, Nargeot J (2000) „Molecular and functional properties of the human alpha(1G) subunit that forms T-type calcium channels“ *J Biol Chem* 275: 6090-6100

- Namkung Y, Smith SM, Lee SB, Skrypnik NV, Kim HL, Chin H, Scheller RH, Tsien RW, Shin HS (1998) „Targeted disruption of the Ca²⁺ channel beta3 subunit reduces N- and L-type Ca²⁺ channel activity and alters the voltage-dependent activation of P/Q-type Ca²⁺ channels in neurons” *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12010-12015
- Niidome T, Kim MS, Friedrich T, Mori Y (1992) „Molecular cloning and characterization of a novel calcium channel from rabbit brain” *FEBS Lett* 308: 7-13
- Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, Lamerdin JE, Mohrenweiser HW, Bulman DE, Ferrari M, Haan J, Lindhout D, van Ommen GJ, Hofker MH, Ferrari MD, Frants RR (1996) „Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4” *Cell* 87: 543-552
- Perez-Reyes E, Castellano A, Kim HS, Bertrand P, Bagstrom E, Lacerda AE, Wei XY, Birnbaumer L (1992) „Cloning and expression of a cardiac/brain beta subunit of the L-type calcium channel” *J Biol Chem* 267: 1792-1797
- Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Lee JH (1998) „Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel” *Nature* 391: 896-899
- Powers PA, Liu S, Hogan K, Gregg RG (1992) „ Skeletal muscle and brain isoforms of a beta-subunit of human voltage-dependent calcium channels are encoded by a single gene” *J Biol Chem* 267: 22967-22972
- Powers PA, Shuying L, Hogan K, Gregg RG (1993) „Molecular characterization of the gene containing the gamma subunit of the human skeletal muscle 1,4-dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channel (CACNLG), cDNA sequence, gene structure and chromosomal location” *J Biol Chem* 268: 9275-9279
- Pragnell M, Sakamoto J, Jay SD, Campbell KP (1991) „ Cloning and tissue-specific expression of the brain calcium channel beta-subunit” *FEBS Lett* 291: 253-258
- Ptáček LJ, Tawil R, Griggs RC, Engel AG, Layzer RB, Kwiecinski H, McManis PG, Santiago L, Moore M, Fouad G, et al. (1994) „Dihydropyridine receptor mutations cause hypokalemic periodic paralysis” *Cell* 77: 863-868
- Ruth P, Rohrkasten A, Biel M, Bosse E, Regulla S, Meyer HE, Flockerzi V, Hofmann F (1989) „Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle” *Science* 245: 1115-1118
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) „Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase” *Science* 239: 487-491
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) „Molecular cloning. A laboratory manual” *Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York*
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors” *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467

- Schneider T, Wei X, Olcese R, Costantin JL, Neely A, Palade P, Perez-Reyes E, Qin N, Zhou J, Crawford GD, et al (1994) „Molecular analysis and functional expression of the human type E neuronal Ca²⁺ channel alpha 1 subunit” *Receptors Channels* 2:255-270
- Seino S, Chen L, Seino M, Blondel O, Takeda J, Johnson JH, Bell GI (1992) „Cloning of the alpha 1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic beta cells” *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 584-588
- Seisenberger C, Specht V, Welling A, Platzer J, Pfeifer A, Kühbandner S, Striessnig J, Klugbauer N, Feil R, Hofmann F (2000) „Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-Type α_{1C} (Ca_v1.2) calcium channel gene in the mouse” *J Biol Chem* 275:39193-39199
- Simmons DM, Arrizy JL, Swanson LW (1989) „A complete protocol for *in situ* hybridisation of messenger RNAs in brain and other tissues with radiolabeled single-stranded RNA probes” *J Histotech* 12(3): 169-181
- Singer D, Biel M, Lotan I, Flockerzi V, Hofmann F, Dascal N (1991) „The roles of the subunits in the function of the calcium channel” *Science* 253: 1553-1557
- Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, Ronen GM, Bjerre I, Quattlebaum T, Murphy JV, McHarg ML, Gagnon D, Rosales TO, Peiffer A, Anderson VE, Leppert M (1998) „A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns” *Nat Genet* 18: 25-29
- Snutch TP, Tomlinson WJ, Leonard JP, Gilbert MM (1991) „Distinct calcium channels are generated by alternative splicing and are differentially expressed in the mammalian CNS” *Neuron* 7: 45-57
- Soong TW, Stea A, Hodson CD, Dubel SJ, Vincent SR, Snutch TP (1993) „Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family” *Science* 260: 1133-1136
- Starr TV, Prystay W, Snutch TP (1991) „Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum” *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5621-5625
- Strom TM, Nyakatura G, Apfelstedt-Sylla E, Hellebrand H, Lorenz B, Weber BH, Wutz K, Gutwillinger N, Ruther K, Drescher B, Sauer C, Zrenner E, Meitinger T, Rosenthal A, Meindl A (1998) „An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness” *Nat Genet* 19:260-3
- Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, Numa S (1987) „Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle” *Nature* 328: 313-318
- Tanabe T, Beam KG, Powell JA, Numa S (1988) „Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA” *Nature* 336: 134-139

- Tsien RW, Ellinor PT, Horne WA (1991) „Molecular diversity of voltage dependent Ca^{2+} channels“ *Trends Pharmacol Sci* 12: 349-354
- Wallace RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George AL Jr, Phillips HA, Saar K, Reis A, Johnson EW, Sutherland GR, Berkovic SF, Mulley JC (1998) „Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na^{+} -channel beta1 subunit gene SCN1B“ *Nat Genet* 19: 366-370
- Wei XY, Perez-Reyes E, Lacerda AE, Schuster G, Brown AM, Birnbaumer L (1991) „Heterologous regulation of the cardiac Ca^{2+} channel alpha 1 subunit by skeletal muscle beta and gamma subunits. Implications for the structure of cardiac L-type Ca^{2+} channels“ *J Biol Chem* 266: 21943-21947
- Weiss B, Jacquemin-Sablon A, Live TR, Fared GC, Richardson CC (1968) „Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from Escherichia coli infected with bacteriophage T4“ *J Biol Chem* 243: 4543-4555
- Welling A, Kwan YW, Bosse E, Flockerzi V, Hofmann F, Kass RS (1993) „Subunit-dependent modulation of recombinant L-type calcium channels. Molecular basis for dihydropyridine tissue selectivity“ *Circ Res* 73: 974-980
- Wiser O, Trus M, Tobi D, Halevi S, Giladi E, Atlas D (1996) „The alpha 2/delta subunit of voltage sensitive Ca^{2+} channels is a single transmembrane extracellular protein which is involved in regulated secretion“ *FEBS Lett* 379: 15-20
- Williams ME, Brust PF, Feldman DH, Patthi S, Simerson S, Maroufi A, McCue AF, Velicelebi G, Ellis SB, Harpold MM (1992a) „Structure and functional expression of an omega-conotoxin-sensitive human N-type calcium channel“ *Science* 257: 389-395
- Williams ME, Feldman DH, McCue AF, Brenner R, Velicelebi G, Ellis SB, Harpold MM (1992b) „Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2 delta and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype“ *Neuron* 8: 71-84
- Wissenbach U, Bosse-Doenecke E, Freise D, Ludwig A, Murakami M, Hofmann F, Flockerzi V (1998) „The structure of the murine calcium channel gamma-subunit gene and protein“ *Biol Chem* 379: 45-50
- Yamaguchi H, Hara M, Strobeck M, Fukasawa K, Schwartz A, Varadi G (1998) „Multiple modulation pathways of calcium channel activity by a beta subunit. Direct evidence of beta subunit participation in membrane trafficking of the alpha1C subunit“ *J Biol Chem* 273: 19348-19356
- Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns WB, Subramony SH, Zoghbi HY, Lee CC (1997) „Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel“ *Nat Genet* 15: 62-69

7.2 Eigene Veröffentlichungen

Klugbauer N, Dai S, Specht V, Lacinova L, Marais E, Bohn G, Hofmann F (2000) „A family of gamma-like calcium channel subunits“ *FEBS Lett* 470: 189-197

Bohn G, Moosmang S, Conrad H, Stieber J, Ludwig A, Biel M, Klugbauer N, Hofmann F (2000) „Molecular basis of pacemaker current“ *JPN J Electrcardiol* 20 (suppl. 3): 76-78

Bohn G, Moosmang S, Conrad H, Ludwig A, Hofmann F, Klugbauer N (2000) „Expression of T- and L-type calcium channel mRNA in murine sinoatrial node“ *FEBS Lett* 481: 73-76

Moosmang S, Bohn G, Conrad H, Ludwig A, Biel M, Klugbauer N, Hofmann F (2001) „Molecules contributing to cardiac pacemaker current“ in Morad M, Kostyk P: *Calcium Signaling* (IOS Press): 262-264

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die Anteil am Gelingen dieser Arbeit haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann, der mich ganz selbstverständlich in sein Institut aufgenommen hat. Er war beständig am Fortgang meiner Arbeit interessiert und versteht es wie kaum ein anderer durch seine aufmunternde und konstruktive Art, allen Mitarbeitern steter Ansporn zu sein.

Ein herzliches Dankeschön meinem Betreuer, Herrn PD Dr. Norbert Klugbauer, der sich selbst durch mich nie aus der Ruhe bringen ließ und durch seine enorme Erfahrung auch scheinbar ausweglose Sackgassen eines Doktorandendaseins zu breiten Alleen forschersicher Wonne werden ließ.

Frau Dr. Elsé Marais hat mir nicht nur selbstlos die von ihr erhobenen Daten über γ_2 und γ_4 zur Verfügung gestellt, sondern auch die Bürde auf sich genommen, mir molekularbiologisches Arbeiten beizubringen. Ihr sei an dieser Stelle vielmals gedankt. Hard work impeccably done!

Herr Dr. Sven Moosmang erwies sich über die wissenschaftliche Arbeit hinaus als ein wahrer Freund.

Frau Dr. Lubica Lacinová und Herrn Dr. Shuiping Dai, die die elektrophysiologischen Daten im Rahmen dieser Arbeit erhoben, gilt mein herzlicher Dank. Habt ebenfalls Dank für das geduldige Erklären der Daten!

Frau Dr. Verena Specht und Frau Dr. Juliane Stieber, die mir immer wieder wertvolle Tips gaben und mich mit ihrem Frohsinn unentwegt aufheiterten, gebührt ein fröhlicher Dank.

Ich danke unseren beiden Super-TAs, Frau Susanne Kampf und Frau Anna Klein, die mir in so vielen Fällen schwierige Arbeit erleichtert oder gar abgenommen haben.

Dem gesamten Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München: Hier habe ich erfahren, daß Forschung nicht nur spannend ist, sondern auch viel Spaß macht.