

---

# **Struktur des *KCNJ14*-Gens und funktionelle Bedeutung der Kir2.4-Kanaluntereinheit beim Menschen und bei der Maus**

Von dem Fachbereich Biologie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von  
**Dipl.-Biol. Christoph Töpert**  
geboren am 8.3.1971 in Berlin

Göttingen 2004

---



Referent: Prof. Dr. Tosso Leeb; Tierärztliche Hochschule Hannover  
Koreferent: Prof. Dr. Andreas Karschin; Universität Würzburg

Tag der Promotion: 20. Januar 2004

# **Fortitudine vincimus**

Sir Ernest Shackleton (1874 - 1922)



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Ionenkanäle</b> .....	<b>3</b>
2.1.1	Systematik der Ionenkanäle .....	3
2.1.1.1	Spannungsgesteuerte Ionenkanäle.....	3
2.1.1.2	Ligandengesteuerte Ionenkanäle .....	4
2.1.1.3	Mechanosensitive Ionenkanäle.....	4
2.1.2	Funktionsprinzip .....	4
2.1.2.1	Ionenselektivität .....	5
2.1.2.2	Regulation der Pore (Gating) .....	6
<b>2.2</b>	<b>Kalium-Kanäle</b> .....	<b>6</b>
2.2.1	Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle .....	8
2.2.2	Tandemporen-Kaliumkanäle.....	8
2.2.3	Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle .....	9
<b>2.3</b>	<b>Kir-Kanäle</b> .....	<b>9</b>
2.3.1	Struktur der Kir-Kanäle .....	10
2.3.2	Mechanismus der Einwärtsgleichrichtung .....	10
2.3.3	Assemblierung .....	11
2.3.4	Heteromultimerisierung .....	12
2.3.5	Sequenzmotive für den zellulären Transport .....	12
2.3.6	Modulation.....	13
2.3.6.1	Hilfsuntereinheiten .....	13
2.3.6.2	Protonen.....	14
2.3.6.3	GTP-bindende Proteine .....	14
2.3.6.4	Phosphorylierung.....	15
2.3.6.5	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP <sub>2</sub> ).....	16
2.3.6.6	Adenin-Nukleotide .....	16
<b>2.4</b>	<b>Kir2.4-Kanal</b> .....	<b>17</b>
<b>2.5</b>	<b>Kaliumkanal-Gendefekte und Krankheiten</b> .....	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>Organismen &amp; Material</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Organismen</b> .....	<b>20</b>
3.1.1	Mausstämme .....	20
3.1.2	Embryonale Stammzellen .....	20
3.1.3	Bakterienstämme.....	20
3.1.4	Frosch-Oozyten.....	20
<b>3.2</b>	<b>Materialien</b> .....	<b>21</b>
3.2.1	Chemikalien und Kulturmedien .....	21
3.2.2	Radiochemikalien .....	21
3.2.3	Verbrauchsmaterial .....	21
3.2.4	Enzyme .....	21
3.2.5	Reaktionssets ( <i>Kits</i> ).....	21
3.2.6	Membranen .....	22
3.2.7	DNA-Bibliotheken.....	22
3.2.8	Vektoren.....	22
3.2.9	Größenmarker .....	22
3.2.10	Oligonukleotide.....	23
3.2.11	Filme .....	23

<b>4</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>DNA-Techniken .....</b>	<b>24</b>
4.1.1	DNA-Modifikationen.....	24
4.1.1.1	Restriktionsschneiden.....	24
4.1.1.2	Auffüllen von 3'-Überhängen .....	24
4.1.1.3	Auffüllen von 5'-Überhängen .....	25
4.1.1.4	Dephosphorylierung.....	25
4.1.1.5	Phosphorylierung.....	25
4.1.1.6	Fragmentligation .....	26
4.1.2	Agarosegelelektrophorese.....	26
4.1.3	DNA-Elution aus Agarosegelen .....	27
4.1.4	Herstellung chemokompetenter Bakterien.....	27
4.1.4.1	Konzentrationsbestimmung flüssiger Bakterienkulturen .....	27
4.1.5	Transformation chemokompetenter Bakterien .....	27
4.1.6	Plasmidpräparation .....	28
4.1.7	Polymerase-Kettenreaktion.....	28
4.1.8	Reinigung und Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen .....	29
4.1.8.1	Phenol/Chloroform-Extraktion.....	29
4.1.8.2	Ethanol-fällung .....	29
4.1.8.3	Isopropanol-fällung.....	30
4.1.8.4	Konzentrationsbestimmung .....	30
4.1.9	Sequenzierung.....	31
<b>4.2</b>	<b>Durchmusterung von <math>\lambda</math>-Phagen-Bibliotheken.....</b>	<b>32</b>
4.2.1	Herstellung phagenkompetenter Bakterien.....	32
4.2.2	Titerbestimmung einer Phagenbibliothek .....	32
4.2.3	Ausplattieren der Phagenbibliothek .....	32
4.2.4	Phagentransfer auf Nylonmembranen.....	33
4.2.5	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten .....	33
4.2.6	Prähybridisierung und Hybridisierung der Membranen .....	34
4.2.7	Identifikation und Isolierung positiver Phagenklone .....	34
4.2.8	DNA-Isolierung aus $\lambda$ -Phagen.....	34
4.2.8.1	<i>in vivo</i> -Exzision von $\lambda$ -ZAP II-Phagen .....	35
4.2.8.2	Isolierung der Phagen-DNA aus Plattenlysat.....	35
<b>4.3</b>	<b>Bestimmung der chromosomalen Lokalisation.....</b>	<b>35</b>
<b>4.4</b>	<b>Knock-out .....</b>	<b>36</b>
4.4.1	Kultivierung embryonaler Stammzellen .....	36
4.4.2	Elektroporation .....	36
4.4.3	Selektion der embryonalen Stammzellen.....	37
4.4.4	Isolierung genomischer DNA .....	37
4.4.5	Southern-Blot.....	38
<b>4.5</b>	<b>RNA-Techniken .....</b>	<b>38</b>
4.5.1	Präparation der Embryonen und Gehirne .....	39
4.5.2	Isolierung von Gesamt- und mRNA .....	39
4.5.3	Reverse Transkriptions-PCR .....	40
4.5.3.1	Unspezifische reverse Transkription.....	40
4.5.3.2	Spezifische reverse Transkription .....	40
4.5.3.3	5'-RACE-Analyse .....	41
4.5.4	Denaturierendes Formaldehyd-Agarosegel .....	41
4.5.5	Herstellung und Nachweis Digoxigenin-markierter RNA-Fragmente .....	41
<b>4.6</b>	<b><i>in situ</i>-Hybridisierungen auf Schnitten.....</b>	<b>42</b>
4.6.1	Herstellung von Gefrierschnitten.....	42
4.6.2	Prähybridisierung, Hybridisierung und Farbreaktion .....	42
<b>4.7</b>	<b><i>in situ</i>-Hybridisierungen ganzer Embryonen.....</b>	<b>43</b>
4.7.1	Vorbereitung der Embryonen und Gehirne.....	43
4.7.2	Prähybridisierung, Hybridisierung und Farbreaktion .....	43
4.7.3	Herstellung von Vibratomschnitten .....	44

<b>4.8</b>	<b>Elektrophysiologie .....</b>	<b>44</b>
4.8.1	<i>in vitro</i> -Transkription.....	44
4.8.2	Expression rekombinanter Proteine in <i>Xenopus</i> Oozyten.....	45
4.8.3	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme.....	45
<b>4.9</b>	<b>Anwendung von Informationsverarbeitungssystemen im <i>world wide web</i> .....</b>	<b>46</b>
4.9.1	Genomdatenbankrecherche.....	46
4.9.2	Suche nach genetisch-bedingten Krankheiten .....	46
4.9.3	Programmsammlung für molekularbiologische Anwendungen .....	46
4.9.4	Selektion von Primersequenzen.....	47
4.9.5	Suche nach Bindungsmotiven für Transkriptionsfaktoren .....	47
4.9.6	Weitere Internetressourcen .....	48
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
<b>5.1</b>	<b>Chromosomale Lokalisation des humanen <i>KCNJ14</i>-Gens .....</b>	<b>49</b>
5.1.1	Analyse eines somatischen Zellhybrid- und eines <i>Radiation-Hybrid</i> -Panels.....	49
5.1.2	Datenbank-Analyse.....	50
<b>5.2</b>	<b>Struktur des humanen <i>KCNJ14</i>-Gens.....</b>	<b>51</b>
5.2.1	Durchmusterung einer genomischen -Phagenbibliothek .....	52
5.2.2	Ergebnisse der Sequenzierung .....	52
5.2.3	Intron in der 5'-untranslatierten Region .....	52
<b>5.3</b>	<b>Struktur des murinen <i>Kcnj14</i>-Gens .....</b>	<b>53</b>
5.3.1	Durchmusterung einer genomischen -Phagenbibliothek .....	54
5.3.2	Ergebnisse der Sequenzierung .....	54
<b>5.4</b>	<b>Chromosomale Lokalisation des murinen <i>Kcnj14</i>-Gens .....</b>	<b>55</b>
<b>5.5</b>	<b>Elektrophysiologie des murinen Kir2.4-Kanals.....</b>	<b>56</b>
<b>5.6</b>	<b>Analyse der Proteinsequenzen.....</b>	<b>57</b>
5.6.1	Aminosäuresequenzvergleich der Kir2.4-Untereinheiten verschiedener Spezies .....	57
5.6.2	Topologie der Kir2-Kanäle .....	59
5.6.3	Homologievergleich innerhalb der Kir2-Unterfamilie .....	59
5.6.3.1	Kir-typische Aminosäuren .....	62
5.6.3.2	Kir2-typische Sequenzmotive .....	63
5.6.3.3	Kir2.4 spezifische Sequenzmotive .....	63
<b>5.7</b>	<b>Identifizierung potentiell relevanter Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren.....</b>	<b>64</b>
5.7.1	Homologievergleich nicht-kodierender genomischer Abschnitte verschiedener Spezies .....	65
5.7.2	Eingrenzung auf potentiell relevante Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive.....	66
<b>5.8</b>	<b>Knock-out-Modell.....</b>	<b>67</b>
5.8.1	Restriktionskartierung des murinen <i>Kcnj14</i> -Gens .....	67
5.8.2	Konstrukt für die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen .....	68
5.8.3	Nachweisstrategie einer korrekten homologen Rekombination .....	69
5.8.4	Elektroporation & Selektion der embryonalen Stammzellen .....	69
5.8.5	Nachweis der korrekten Integration des Rekombinationskonstrukts in das ES-Zellgenom.....	70
5.8.6	Abbruch des Knock-out-Projekts.....	70
<b>5.9</b>	<b><i>Kcnj14</i>-Genexpressionsanalyse der Maus.....</b>	<b>71</b>
5.9.1	RT-PCR-Studien .....	72
5.9.1.1	Expression in adulten Mausorganen.....	72
5.9.1.2	Expression in Mausembryonen verschiedener Entwicklungsstadien.....	72
5.9.2	<i>in situ</i> -Hybridisierung .....	73
5.9.2.1	Auswahl spezifischer <i>in situ</i> -Sonden .....	73
5.9.2.2	Expression in den Extremitäten.....	73
5.9.2.3	Expression in der Augenregion .....	76
5.9.2.4	Expression in der Region der Ohrmuschel.....	76
5.9.2.5	Expression in der Region der Tastaare.....	77
5.9.2.6	Hinweise auf weitere Expression .....	77
5.9.2.7	Vergleich der <i>Kcnj14</i> -Genexpression von adultem und E19-Gehirn.....	78

<b>5.10</b>	<b>Defekt im <i>KCNJ14</i>-Gen als potentielle Krankheitsursache</b> .....	<b>79</b>
<b>5.11</b>	<b><i>Kcnj14</i>-Genkopie der Maus</b> .....	<b>83</b>
5.11.1	Datenbank-Analyse.....	83
5.11.2	Nachweis der Genkopie im Mausgenom .....	83
5.11.3	Analyse der Nukleotid- und putativen Proteinsequenz.....	84
5.11.4	Datenbankanalyse .....	86
5.11.5	Elektrophysiologie .....	86
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>88</b>
<b>6.1</b>	<b>Struktur des <i>KCNJ14</i>-Gens bei Mensch &amp; Maus</b> .....	<b>88</b>
<b>6.2</b>	<b><i>KCNJ14</i>-Transkripte</b> .....	<b>89</b>
<b>6.3</b>	<b>Analogieschlüsse zur Funktion des Kir2.4 Proteins</b> .....	<b>90</b>
6.3.1	Porenregulation .....	90
6.3.2	Interaktionsmotive .....	91
<b>6.4</b>	<b>Extrazelluläre pH-Sensitivität</b> .....	<b>93</b>
<b>6.5</b>	<b>Häufung entwicklungsrelevanter Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren</b> .....	<b>93</b>
<b>6.6</b>	<b>Vergleich der Expressionsmuster der Kir2-Kanalgene</b> .....	<b>95</b>
6.6.1	Vergleich der embryonalen Expressionsmuster der Kir2-Kanalgene.....	95
6.6.2	Vergleich der Expressionsmuster der Kir2-Kanalgene im adulten und embryonalen Gehirn... 96	
<b>6.7</b>	<b><i>KCNJ14</i>-Gendefekte als mögliche Krankheitsursache</b> .....	<b>97</b>
<b>6.8</b>	<b>Pseudogen oder Paralog</b> .....	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>102</b>
7.1	Deutsche Zusammenfassung.....	102
7.2	Englische Zusammenfassung.....	104
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>106</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>118</b>
9.1	Puffer.....	118
9.2	Primer .....	120
9.2.1	Primer für das murine <i>Kcnj14</i> -Gen.....	120
9.2.2	Primer für das humane <i>KCNJ14</i> -Gen .....	120
9.3	Abkürzungen & Symbole .....	122
9.4	Glossar .....	124
<b>10</b>	<b>Publikationsliste</b> .....	<b>126</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>127</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>128</b>

# 1 Einleitung

Alle Zellen sind von einer Zellmembran umgeben, die aus einer für Ionen weitgehend undurchlässigen Lipiddoppelschicht besteht. Das Ein- und Ausströmen von Ionen wird von spezialisierten membranständigen Proteinen ermöglicht. Es gibt mehrere Transportsysteme, die sich grundsätzlich in ihrem molekularen Transportmechanismus unterscheiden: Ionenkanäle, Ionenpumpen und Transporter.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen von diesen Systemen nur die Ionenkanäle und von diesen besonders die Kaliumkanäle betrachtet werden. Allein in der Familie der Kaliumkanäle sind 71 verschiedene Gene bekannt, die sich aufgrund ihrer vorhersagbaren Proteinstruktur in 3 Unterfamilien einteilen lassen. Da sich ein funktioneller Kaliumkanal aus mehreren Untereinheiten zusammensetzt, besteht innerhalb der Unterfamilien die Möglichkeit, durch Bildung von Homo- und Heteromultimeren eine sehr große Zahl von Kanälen mit jeweils unterschiedlichen Eigenschaften zu bilden.

Ionenkanäle sind ionenselektive Poren, deren Öffnungs- und Schließverhalten reguliert wird. In der letzten Dekade hat das Wissen über ihre Funktionsweise stark zugenommen, so daß man heute den molekularen Mechanismus der Selektivität und der Regulation der Pore weitgehend versteht.

Ionenkanäle werden in den Zellmembranen von Mensch, Tier, Pflanze und Bakterien gefunden und spielen z.B. bei Vertebraten eine wichtige Rolle bei der Muskeleerregung, Hormonsekretion, sensorischer und motorischer Nervenleitung, Zellproliferation, Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes sowie des Blutdrucks und des Herzschlags.

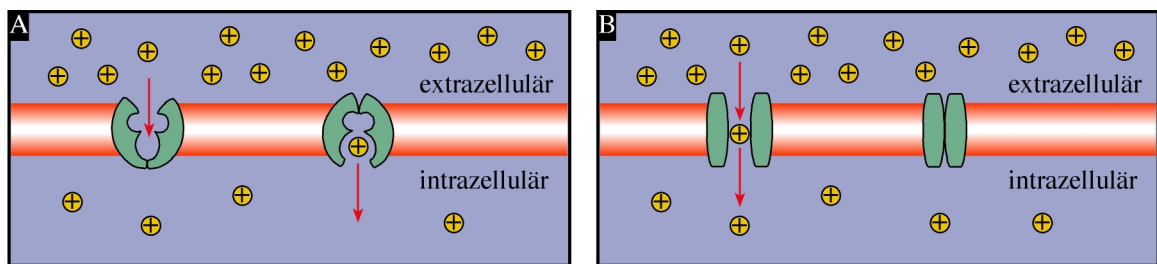
Für ihre vielseitige physiologische Bedeutung spricht die Entdeckung einer immer größer werdenden Anzahl von Krankheiten, die durch defekte Ionenkanäle verursacht werden. Bisher sind 14 Krankheiten identifiziert worden, die mit Veränderungen in Kaliumkanälen einhergehen.

Um zu verstehen, warum Kanalmutationen zu Krankheiten führen, ist die Kenntnis der molekularen Struktur und der biophysikalischen sowie physiologischen Eigenschaften der Kanäle notwendig. Um den Zusammenhang zwischen Krankheit und Gendefekt zu entdecken, ist die Kenntnis der genomischen Struktur des Kanals erforderlich. In der vorliegenden Arbeit wird versucht diese Voraussetzungen für den letzten, erst 1998 entdeckten stark einwärtsgerichtenden Kaliumkanal Kir2.4 zu schaffen.



## 2 Literaturübersicht

Voraussetzung für die Lebensfähigkeit mehrzelliger Organismen ist der Material- und Informationsaustausch innerhalb des Gesamtorganismus. Jede einzelne Zelle ist durch eine hydrophobe Zellmembran abgeschlossen. Um ihren individuellen Bedarf an im Zytoplasma gelösten Stoffen zu decken, muß es spezielle Wege für den Stoffaustausch der Zellen durch die Membran geben. Eine große Zahl unterschiedlicher Rezeptoren und Kontaktmoleküle auf der Zelloberfläche ist für die Informations- und Signalübertragung verantwortlich. Für die geregelte Aufnahme und Abgabe von Metaboliten, sowie die Steuerung der intrazellulären Ionenkonzentration ist eine Reihe von spezialisierten Molekülen in der Zellmembran zuständig, die sich entsprechend ihrer Funktionsweise in zwei Klassen unterteilen lassen: Ionenporter und Ionenkanäle.



**Abb. 1** Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Ionenporters (A) und eines Ionenkanals (B).

Ein Transporter bindet selektiv das zu transportierende Ion auf der einen Seite der Membran und entläßt nach einer Konformationsänderung das Ion auf der anderen Seite. Ein Kanalprotein hingegen bildet einen relativ stabilen, wassergefüllten Durchlaß, durch den selektiv eine Sorte Ionen die Membran passieren kann. Der wichtigste Unterschied zwischen Transportern und Kanälen besteht in der Maximalgeschwindigkeit des Ionenports. Ionen bewegen sich durch einen Kanal mit  $10^8$  Ionen pro Sekunde sehr viel schneller, als mittels eines Transporters mit  $10^5$  Ionen pro Sekunde (Hall, 1992).

### **2.1 Ionenkanäle**

Ionenkanäle haben in ihrer einfachsten Form keinen Einfluß auf die Richtung des Ionenstroms, da dieser vom Konzentrations- und Ladungsgradienten bestimmt wird. Sie sind spezifisch für den Transport von Anionen ( $\text{Cl}^-$ ) oder Kationen ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ). Sowohl pro- als auch eukaryotische Zellen besitzen Ionenkanäle. Ionenkanäle sind essentiell für zahlreiche Zellfunktionen, wie Osmoregulation, sekretorische Prozesse, Erregbarkeit von Neuronen und Muskeln, Ausbildung des Ruhepotentials und Signaltransduktion. Zum Beispiel benötigen Neuronen Ionenkanäle, um über eine schnelle Änderung des elektrischen Potentials an der Zellmembran Signale übertragen zu können.

#### **2.1.1 Systematik der Ionenkanäle**

Neben der Einteilung über die Ionenspezifität, können Ionenkanäle auch über ihren Regulationsmechanismus in spannungs- und ligandengesteuerte sowie mechanosensitive Kanäle eingeteilt werden.

##### **2.1.1.1 Spannungsgesteuerte Ionenkanäle**

Die spannungsgesteuerten Kanäle bilden eine große Gruppe mit sehr ähnlicher Struktur. Unterschiede bestehen hinsichtlich der Pore, die bei spannungsgesteuerten Natrium- und Kalziumkanälen aus einer einzigen Aminosäurekette gebildet wird, wohingegen sich bei den spannungsgesteuerten Kaliumkanälen vier Untereinheiten zusammenlagern müssen, um eine funktionelle Pore zu bilden. Spannungsgesteuerte Natriumkanäle sind für die Weiterleitung von Aktionspotentialen verantwortlich. Spannungsgesteuerte Kalziumkanäle hingegen regulieren die Konzentration des intrazellulären Kalziums, welches seinerseits zelluläre Aktivitäten, wie zum Beispiel den Transmitterausstoß, moduliert. Die spannungsgesteuerten Kaliumkanäle kontrollieren die Erregbarkeit der Zellen und die Form des elektrischen Signals. Jede Untereinheit besitzt einen membranintegrierten Spannungssensor (Bezanilla et al., 2000).

## **2 Literaturübersicht**

---

### **2.1.1.2 Ligandengesteuerte Ionenkanäle**

#### Neurotransmittergesteuerte Ionenkanäle

Diese Kanäle werden auch ionotrope Rezeptoren genannt, weil sie als Rezeptoren mit integriertem Kanal betrachtet werden können. Die Aktivität dieser Kanäle wird durch extrazelluläre Neurotransmitter reguliert. Die bekanntesten Vertreter dieser Gruppe reagieren auf Acetylcholin (ACh), Serotonin, Glutamat,  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) und Glycin. Die Kanäle sind u.a. an der synaptischer Transmission im zentralen und peripheren Nervensystem beteiligt. Viele dieser Kanäle besitzen Strukturähnlichkeiten, die sich in partiell homologen Proteinsequenzen widerspiegeln.

#### Second Messenger gesteuerte Ionenkanäle

Die Kanäle dieser Gruppe werden über zytoplasmatische Botenstoffe, wie cGMP, cAMP, ATP,  $Ca^{2+}$ , Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat und Metaboliten der Arachidonsäure gesteuert. Die Bindungsstellen für die intrazellulären Liganden sind bei einigen Kanälen direkt an der porenbildenden Kanaleinheit, bei anderen an einer membranständigen oder zytoplasmatischen Hilfsuntereinheit lokalisiert (Zagotta et al., 1996; Jiang et al., 2002).

### **2.1.1.3 Mechanosensitive Ionenkanäle**

Kanäle dieser kleinen Gruppe reagieren auf einen Stimulus, der die Zellmembran dehnt oder streckt. Beispielsweise öffnet sich bei den Kaliumkanälen TREK und TRAAK auf einen mechanischen Reiz hin die Kanalpore (Patel et al., 2001 b). Diese Reaktion ist unabhängig vom Zytoskelett und nimmt zu, wenn sich aufgrund osmotischer Veränderungen das Zellvolumen vergrößert.

## **2.1.2 Funktionsprinzip**

Ionenkanäle haben drei essentielle biophysikalische Eigenschaften:

- effizienter Ionentransport
- Ionenselektivität

- Steuerung des Öffnungsverhaltens durch elektrischen, mechanischen oder chemischen Impuls

### 2.1.2.1 Ionenselektivität

Erst seit gut 20 Jahren ist mit Sicherheit bekannt, daß Ionenkanäle regelbare, porenbildende Proteine in der Zellmembran sind. Lange blieb die Frage offen, wie ein Ionenkanal seine hohe Selektivität bei sehr hoher Durchflußgeschwindigkeit erreicht. Die Selektivität eines Kaliumkanals für Kaliumionen gegenüber Natriumionen beträgt bis zu 100:1 und die Durchflußgeschwindigkeit kommt annähernd der Diffusionsgeschwindigkeit gleich. Erst 1998 wurde durch die Aufklärung der Raumstruktur des bakteriellen Kaliumkanals KcsA mittels Röntgenstrukturanalyse die bestehende Theorie bestätigt (Doyle et al., 1998). Demnach wird die Selektivität über zwei unabhängige Filter erreicht, wie hier am Beispiel der Kalium-Natrium-Selektivität beschrieben werden soll. Das erste Filter ist der wassergefüllte, trichterförmige Poreneingang, in dem das Ion mit seiner Hydrathülle selektioniert wird. Das Natriumion ist mit seiner Hydrathülle größer als das hydrierte Kaliumion. Deshalb kann ein Natriumion keine Kaliumkanäle passieren. Das zweite Filter selektioniert nach der Größe des „nackten“ Ions. Das Kaliumion ist größer als das Natriumion und kann deshalb keinen Natriumkanal passieren. Für die zweite Selektion ist entscheidend, daß es energetisch ungünstig ist, die Hydrathülle abzustreifen. An einer Verengung der Pore, die gerade noch die Passage des nicht-hydratisierten Ions zuläßt, muß die Hydrathülle abgestreift werden. Durch eine negativ geladene Stelle in der Kanalpore wird die positive Ladung des Ions neutralisiert und dadurch energetisch kompensiert. Das Ion verläßt die Pore und kommt in den zentralen, wassergefüllten Hohlraum, in dem die Hydrathülle wieder ausgebildet und der Ausgangszustand ohne Energieverbrauch wieder hergestellt wird. Für das kleinere Natriumion ist die Anordnung der Ladungen ungünstig, so daß nicht ausreichend Energie für das Abstreifen der Hydrathülle zur Verfügung gestellt werden kann.

Da die Aminosäuresequenz des KcsA-Kanals Homologien zu spannungsgesteuerten Kaliumkanälen, Kir-Kanälen und Kalzium-aktivierbaren Kaliumkanälen aufweist, kann dieser Mechanismus zumindest für diese Kanäle verallgemeinert werden.

### 2.1.2.2 Regulation der Pore (Gating)

Die spannungsgesteuerten Kaliumkanäle öffnen sich über einen Spannungssensor, wenn die Membran depolarisiert. Dabei wird Energie, die im elektrischen Feld zwischen Innen- und Außenseite der Membran gespeichert ist, in mechanische Arbeit umgesetzt. Um die Frequenz des Aktionspotentials in Neuronen zu steuern, müssen sich die Kaliumkanäle schnell schließen können. Dieser Vorgang wird Inaktivierung genannt.

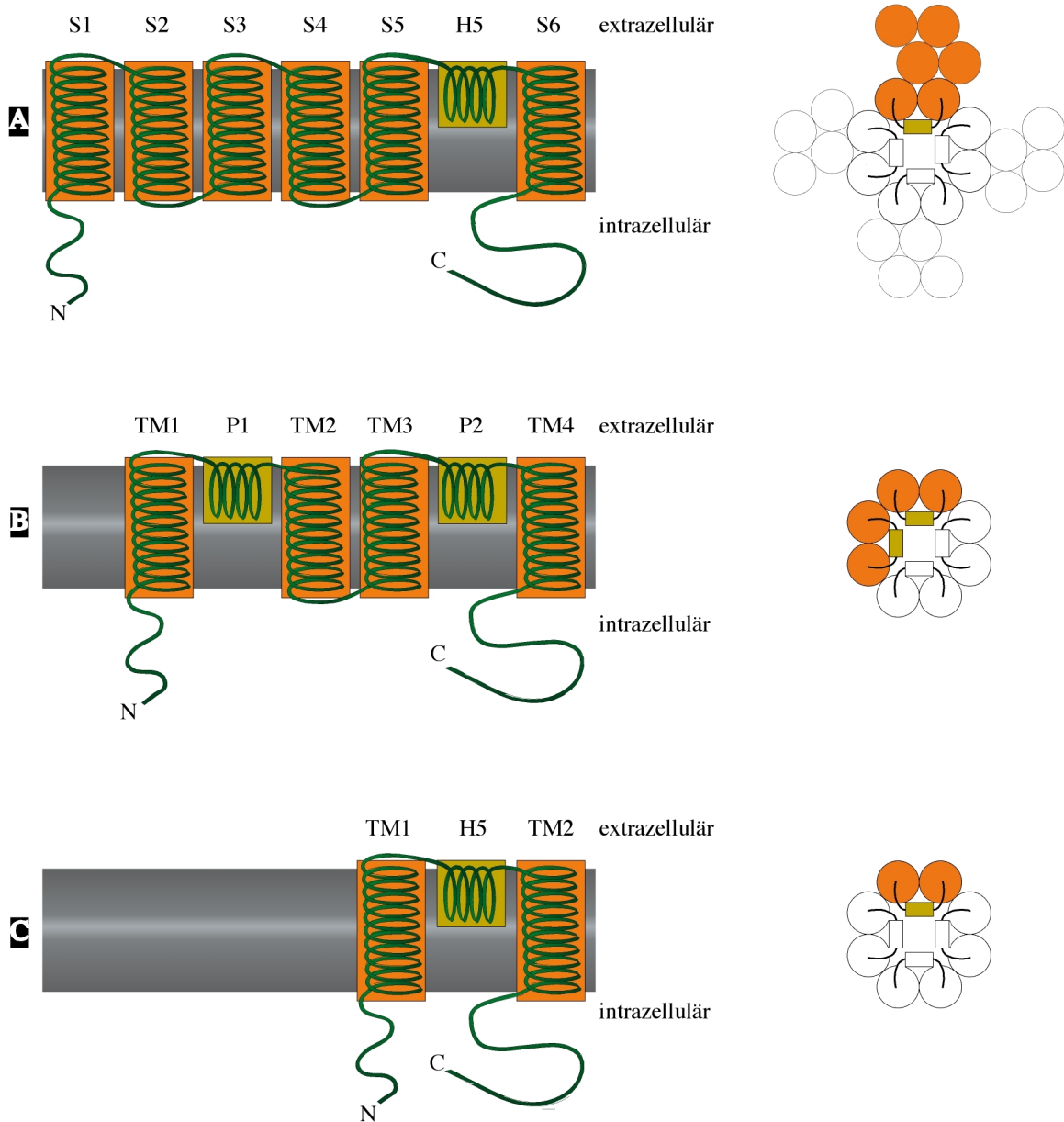
In spannungsabhängigen Kaliumkanälen vom  $K_v$ -Typ wird die Inaktivierung durch Blockade der Pore mit dem zytoplasmatischen aminoterminalen Ende des Proteins erreicht. Der von Armstrong (Armstrong et al., 1977) als „*ball-and-chain*“-Modell postulierte Mechanismus wurde insbesondere durch Mutationsanalyse (Hoshi et al., 1990; Zhou et al., 2001) experimentell untermauert. Danach sind die aminoterminalen 20 Aminosäuren für eine Form der Inaktivierung des Kanals verantwortlich. Das positiv geladene - zur einen Hälfte hydrophobe, zur andern Hälfte hydrophile - Ende des Aminoterminus dringt durch ein seitliches Fenster im zytoplasmatischen Bereich des tetrameren Kanals in den Komplex ein und bindet in der hydrophoben Tasche der Pore. Von den vier Aminotermini (je einer pro Kanaluntereinheit) ist nur einer für die Inaktivierung erforderlich.

Einen anderen *Gatingmechanismus* hat Jiang am bakteriellen Kaliumkanal MthK aufgeklärt. Der Kanal ist in relevanten Bereichen homolog zum humanen spannungsgesteuerten  $K_{Ca}$ -Kanal. Bei diesem Kanal bildet eine spezifische  $Ca^{2+}$ -bindende Domäne einen sogenannten *Gatingring*, der ähnlich der Blende eines Fotoapparates, die Porenöffnung über die  $Ca^{2+}$ -Bindung, moduliert (Jiang et al., 2002).

## 2.2 Kalium-Kanäle

Neben der Ionenspezifität haben Kaliumkanäle gemeinsam, daß mehrere Untereinheiten zu einem funktionellen Porenkomplex assemblieren müssen. Außer den aus gleichen Untereinheiten gebildeten homomeren Kaliumkanälen gibt es die Möglichkeit zur Bildung von Heteromultimeren, bei denen präferentiell Untereinheiten strukturell ähnlicher Mitglieder einer Unterfamilie miteinander assemblieren. Auf diese Weise kann aus den bisher bekannten 71 verschiedenen Kaliumkanal-Untereinheiten eine sehr große Anzahl verschiedener Kaliumkanäle generiert werden, die sich alle in ihren Eigenschaften voneinander unterscheiden. Diese Vielfalt bildet die molekulare

Grundlage der zellulären Feinregulation des Kaliumhaushalts. Kaliumkanal-Untereinheiten lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Membrantopologie in drei Hauptfamilien unterteilen: Spannungsgesteuerte, Tandemporen- und einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle.



**Abb. 2** Schematische Darstellung von Kaliumkanal-Untereinheiten in Seitenansicht (links) und vollständiger Kanäle in Sichtachse der Pore (rechts). Spannungabhängiger (A), Tandemporen- (B) und einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal (C). Transmembrandomänen S1 bis S6 und TM1 bis TM4; Porenregion H5.

### **2.2.1 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle**

Die Familie der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle ( $K_v$ ) enthält sechs Transmembranbereiche S1 bis S6 pro kanalbildender -Untereinheit. Hier fungiert die vierte Transmembranregion als Spannungssensor und die fünfte und sechste bilden mit der sie verbindenden H5-Region die eigentliche Kanalpore. Es müssen sich vier -Untereinheiten zusammenlagern, um eine funktionelle Pore auszubilden. An diesen Porenkomplex können noch verschiedene regulatorische -Untereinheiten binden.

Die  $K_v$ -Kanäle sind während des Ruhepotentials geschlossen und werden bei Depolarisation geöffnet. Sie sind an der elektrischen Erregbarkeit von Muskel- (z.B. Herzmuskel) und Nervenzellen beteiligt, z.B. bei deren Repolarisation nach einem Aktionspotential. Außerdem modulieren sie die synaptische Übertragung und die Sekretion von endokrinen Zellen (z.B. Chromaffin-Zellen und -Zellen des Pankreas).

Die Kalzium-bindenden Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ ) werden ebenfalls durch Spannungsänderung aktiviert. Ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration erhöht die Spannungssensitivität. Sie sind in fast allen Nervenzellen zu finden, wo sie eine Schlüsselrolle bei der „Wellenform“ des Aktionspotentials spielen und an der Regulation der Zellerregbarkeit beteiligt sind.

### **2.2.2 Tandemporen-Kaliumkanäle**

Die Kanaluntereinheiten der zweiten Gruppe besitzen vier Transmembranregionen TM1 bis TM4 mit je zwei Porenschlaufen P1 und P2. Da P1 und P2 als Tandem angeordnet sind, werden sie als Tandemporen- oder Leck-Kaliumkanäle bezeichnet. Diese erst vor kurzem entdeckte Kanalgruppe war aus elektrophysiologischen Messungen schon seit langem bekannt, da sie  $K^+$ -Leckströme verursachte. Die nun entschlüsselte Proteinstruktur zeigt, daß in diesem Fall zwei assemblierte Untereinheiten ausreichen, um eine funktionelle Kanalpore zu bilden. Durch diese Eigenschaft heben sie sich deutlich von den übrigen Kaliumkanälen ab. Bis jetzt wurden 13 Vertreter dieser Gruppe identifiziert. Diese Kanäle reagieren auf verschiedenste physikalische und chemische Stimuli. Dazu gehören Membrandehnung, Temperatur- und pH-Änderung, Fette und Anästhetika (Übersichtsarbeiten: O'Connell et al., 2002; Patel & Honoré, 2001 a).

### 2.2.3 Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle

Die dritte Familie ist die strukturell ursprünglichste und entwicklungsgeschichtlich vermutlich die älteste Gruppe. Die Kanaluntereinheit besitzt nur zwei Transmembrandomänen TM1 und TM2. Vier Untereinheiten lagern sich zu einem funktionellen Kanal zusammen. Vor mehr als 50 Jahren wurden diese Kanäle erstmals von Bernhard Katz elektrophysiologisch beschrieben (Katz et al., 1949). Er nannte sie Kalium-Einwärtsgleichrichter ( $K^+$  inward rectifier = Kir), nach ihrer Charakteristik, bei einer Hyperpolarisation der Zelle selektiv Kaliumionen aus dem extrazellulären Raum in die Zelle hineinzuleiten. Je stärker die Hyperpolarisation ist, desto größer ist auch der Kaliumstrom. Im Falle einer Depolarisation der Zelle lassen sie nur einen geringen Kaliumefflux zu.

Seit Anfang der 90er Jahre der erste Kir-Kanal kloniert wurde (Kubo et al., 1993), sind 14 weitere Vertreter dieser Familie aus Säugetieren isoliert worden. Alle sind gekennzeichnet durch die beiden Transmembrandomänen pro Untereinheit.

### 2.3 Kir-Kanäle

Kir-Kanäle erfüllen zwei physiologisch wichtige Aufgaben: Sie stabilisieren das Ruhepotential der Zelle in der Nähe des Kaliumgleichgewichtspotentials und sorgen für den Kaliumtransport durch die Zellmembran. Alle Mitglieder der Kir-Familie zeigen die Eigenschaft der Einwärtsgleichrichtung. Kir-Kanäle, die in die Regulation der Zellerregbarkeit involviert sind, zeigen in der Regel eine starke Einwärtsgleichrichtung. Man findet sie in Neuronen, im Herz- und Skelettmuskel. Schwache Einwärtsgleichrichter, die im Unterschied zu starken Einwärtsgleichrichtern noch einen schwachen Auswärtsstrom zulassen, sorgen für den Kaliumstrom in Epithelzellen oder sie unterdrücken die Erregbarkeit in erregbaren Zellen. Manche Kir-Kanäle vermitteln die Signale von Hormonen oder Neurotransmittern an erregbare Zellen, wie beispielsweise die G-Protein-regulierten Kir-Kanäle im Herzen und Gehirn. Andere Kir-Kanäle, wie die ATP-sensitiven  $K_{ATP}$ -Kanäle werden durch zytosolische Nukleotide reguliert und verbinden so den Zellmetabolismus mit elektrischer Aktivität und Kaliumströmen. Kir-Kanäle spielen auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der Insulinsekretion in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas, bei zerebralen Durchblutungsstörungen und der Kontrolle des Muskeltonus der glatten Gefäßmuskulatur.



## **2 Literaturübersicht**

---

Die 15 Mitglieder der Kir-Familie werden nach der IUPHAR-Nomenklatur von 2002 den Kir1-, Kir2-, Kir3-, Kir5- und Kir6-Unterfamilien zugeordnet. Zu der Kir1-Unterfamilie gehören die schwach einwärtsgerichtenden Kir-Kanaluntereinheiten. Die Unterfamilie der Kir2-Kanaluntereinheiten umfaßt die starken Einwärtsgleichrichter. Die Kanaluntereinheiten der Kir3-Unterfamilie werden über die Kopplung mit G-Proteinen und die ATP-sensitiven Mitglieder der Kir6-Unterfamilie durch die Bindung an Sulfonylharnstoffrezeptoren (SUR) reguliert. Die pH-sensitiven Kir5-Kanaluntereinheiten bilden heteromultimere Kaliumkanäle mit Kir1.2-Untereinheiten, ihre genaue Funktion ist bisher ungeklärt.

### **2.3.1 Struktur der Kir-Kanäle**

Kir-Kanäle sind deutlich kleiner als die spannungsabhängigen Kaliumkanäle. Sie sind zwischen 390 und 500 Aminosäuren lang und besitzen nur zwei Transmembrandomänen (TM1 und TM2), die über eine sogenannte Porenschleufe (H5-Region) verbunden sind. Diese Porenschleufe besteht aus einer Porenhelix und dem Selektionsfilter. Sie taucht von außen wieder in die Membran ein und kleidet so den Bereich der Pore aus. Die TM1-, H5- und TM2-Bereiche der Kir-Kanäle zeigen deutliche Homologien zu den S5-, H5- und S6-Bereichen der spannungsabhängigen Kaliumkanäle. Es findet sich kein Äquivalent zur S4-Domäne, die für die spannungsabhängige Aktivierung der K<sub>v</sub>-Kanäle zuständig ist. Dieser Unterschied erklärt, weshalb die Regulation der Kir-Kanalpore nur eine marginale Spannungsabhängigkeit zeigt. Sowohl der Amino-, wie auch der Carboxyterminus befinden sich im Zytoplasma.

### **2.3.2 Mechanismus der Einwärtsgleichrichtung**

Es gibt starke Einwärtsgleichrichter, wie die Kanäle, die aus Kir2.1- und Kir3.1-Untereinheiten gebildet werden, aber auch schwache, wie die aus Kir1.1- und Kir6.2-Untereinheiten zusammengesetzten. Die Einwärtsgleichrichtung stellt das Ergebnis einer spannungsabhängigen Blockade durch intrazelluläre Kationen dar. Die Kationen bewegen sich in die innere Öffnung der Pore, können sie nicht passieren und verhindern dadurch einen Auswärtsstrom der Kaliumionen. Mit dieser Eigenschaft unterscheiden

sie sich von anderen, in beide Richtungen durchlässigen, Ionenkanälen. Je stärker die Bindungsaffinität an dieser Stelle der Pore für Kationen ist, desto stärker ist auch die Gleichrichtung. Als relevante Kationen haben sich neben Magnesiumionen noch biogene Polyamine herausgestellt. Das Potential zur Blockierung der Pore steigt mit der Anzahl der positiven Ladungen des entsprechenden Kations (Blockierungspotential: Spermin<sup>4+</sup> > Spermidin<sup>3+</sup> > Putreszin<sup>2+</sup> = Magnesium<sup>2+</sup>). Die Kanäle mit der größten Einwärtsgleichrichtung zeigen auch die größte Sensitivität gegenüber Spermin. Drei Aminosäuren sind für die Blockierung von Bedeutung. Eine Aminosäure befindet sich in der zweiten Transmembrandomäne an Position 171 in der Kir1.1-Untereinheit. In schwachen Einwärtsgleichrichtern ist sie neutral (Asparagin) und in starken Einwärtsgleichrichtern negativ geladen (Aspartat) (Lu & MacKinnon, 1994). In manchen Kir-Kanälen, zum Beispiel Kir2.1, sind zusätzlich noch die Aminosäuren E224 und E299 im Carboxyterminus für eine starke Bindung der Kationen in der Pore verantwortlich (Kubo et al., 2001).

### **2.3.3 Assemblierung**

Die Pore der Kir-Kanäle wird, wie die der spannungsabhängigen Kaliumkanäle, aus vier Untereinheiten gebildet. Bei den K<sub>v</sub>-Kanälen ist der Aminoterminus für die Kopplung der Untereinheiten verantwortlich. Die Angaben darüber, welcher Teil des Kir-Kanalproteins für die Assemblierung der vier Untereinheiten zuständig ist, differieren stark. Studien an Mitgliedern der Kir2-Unterfamilie ergaben, daß Teile der zweiten Transmembrandomäne und der proximale Teil des Carboxyterminus (Tinker et al., 1996) und ein intakter Aminoterminus zum Assemblieren notwendig sind (Fink et al., 1996). Neuere Untersuchungen geben Hinweise darauf, daß in beiden Termini mehrere sogenannte Interaktionsdomänen vorliegen, die in den Kir-Kanaluntereinheiten stark konserviert sind (Tucker & Ashcroft, 1999; Jones et al., 2001). Es wird deshalb angenommen, daß für eine Assemblierung jeweils die aminoterminalen mit den carboxyterminalen Interaktionsdomänen benachbarter Untereinheiten koppeln (Jones et al., 2001).

### **2.3.4 Heteromultimerisierung**

Kir-Kanäle, die aus vier identischen Untereinheiten zusammengesetzt sind, werden als Homomultimere bezeichnet. Es finden sich jedoch auch funktionelle Kir-Kanäle, bei denen verschiedene Untereinheiten zu heteromultimeren Kanälen assemblieren. In den meisten Fällen bilden sich heteromultimere Kanäle nur aus verschiedenen Untereinheiten derselben Kir-Unterfamilie. Heteromultimere besitzen charakteristische und von den Homomultimeren verschiedene Eigenschaften und haben große physiologische Bedeutung. Beispielsweise liegen die G-Protein-gekoppelten Kir-Kanäle im Herzen und Gehirn als Heteromultimere vor. Der im Herzen vorkommende  $I_{K_{ACh}}$ -Kanal, ist ein Heteromultimer aus Kir3.1- und Kir3.4-Untereinheiten (Krapivinsky et al., 1995). Im Gehirn assembliert hingegen die Kir3.1- mit der Kir3.2-Untereinheit (Kofuji et al., 1995).

### **2.3.5 Sequenzmotive für den zellulären Transport**

Die Effizienz, mit der Kaliumkanäle ihre Wirkung erreichen, hängt von ihrer Konzentration auf der Zelloberfläche ab. Diese wird über sekretorische und endozytotische Prozesse reguliert. Die Sekretion beginnt im endoplasmatischen Retikulum (ER), wo Proteine synthetisiert, gefaltet und assembliert werden. Bis vor kurzem nahm man an, daß die Kir-Kanäle ungesteuert exportiert werden, weil sich weder ein ER-Rückhalte- noch ein Exportmotiv in der Aminosäuresequenz finden ließ. Inzwischen wurde für die Kir6-Unterfamilie ein solches Rückhaltmotiv mit der Aminosäuresequenz RKR im distalen Ende des Carboxyterminus identifiziert (Zerangue et al., 1999). Es wird angenommen, daß dieses Motiv nach einer erfolgreichen Assemblierung der vier Kir6-Untereinheiten und der anschließenden Bildung des Oktamers mit den vier Sulfonylharnstoffrezeptor-Untereinheiten verdeckt und auf diese Weise der Kanalkomplex erst dann zum ER-Export freigegeben wird.

Vor kurzem wurde in der Kir2-Unterfamilie ein hoch konserviertes Aminosäuremotiv (FCYENE) im Carboxyterminus als ER-Exportsignal entschlüsselt (Ma et al., 2001; Stockklausner et al., 2001). Da diese Sequenz ausschließlich in Kir2-Untereinheiten vorkommt, war damit zu rechnen, daß in den übrigen Kir-Kanälen andere Motive diese Funktion übernehmen. Für die Kir1.1-Untereinheit wurden die letzten Aminosäuren des C-Terminus (VLSEVDETD) als Exportsignal eingegrenzt (Ma et al., 2001).

Für den Kir4.1-Kanal wurde ein weiterer Exportmechanismus beschrieben. Der Kanal wird nur exportiert, wenn er zusammen mit PSD95 (*postsynaptic density protein; 95 kDa*) koexprimiert wird (Stockklausner et al., 2001). Einige Kir-Kanäle benötigen also einen Partner mit dem sie assemblieren müssen, bevor sie aus dem endoplasmatischen Retikulum exportiert werden können. Die Mitglieder der PSD-Proteinfamilie binden mit speziellen Aminosäuresequenz-Domänen (PDZ-Domänen) spezifisch an PDZ-Bindungsmotive anderer Proteine.

In der Sequenz des PSD95-Proteins befinden sich drei PDZ-Domänen und in einigen Kir-Kanälen wurden PDZ-Bindungsmotive identifiziert. Für den Kir2.3-Kanal konnte nachgewiesen werden, daß er über PSD95 an der Synapse verankert wird (Inanobe et al., 2002). In den Sequenzen der meisten Kir2-Untereinheiten findet sich das PDZ-Bindungsmotiv in den letzten sechs Aminosäuren des Carboxyterminus wieder. Gleichzeitig befindet sich dort eine Proteinkinase A-Phosphorylierungsstelle. Im Falle einer PKA-Stimulation dissoziieren PSD95 und Kir2-Kanal (Cohen et al., 1996 a). Auf diese Weise könnte die PKA-Phosphorylierung die Verankerung der Kanäle in der Synapse regulieren. Es konnte gezeigt werden, daß dasselbe PDZ-Bindungsmotiv in den Kir2-Kanälen auch an enge Verwandte des PSD95 bindet, die ebenfalls eine Verbindung zum Zytoskelett knüpfen können (Nehring et al., 2000; Leonoudakis et al., 2001; Dart & Leyland, 2001; Le Maout et al., 2001; Olsen et al., 2002).

### **2.3.6 Modulation**

Die Aktivität der Ionenkanäle kann auf unterschiedliche Weise reguliert werden. Physiologisch wichtig ist die Regulation durch Protonengradienten, Phosphorylierung, GTP-bindende Proteine, Adenin Nukleotide und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>).

#### **2.3.6.1 Hilfsuntereinheiten**

Bei der Kir6-Unterfamilie resultiert die alleinige Expression von Kir6.1-Untereinheiten und die von Kir6.2-Untereinheiten nicht in einem funktionellen Kanal. Erst durch Koexpression mit einem Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR) kommt es zur Ausbildung eines funktionsfähigen Kanals. Die Rezeptor- und die Kanaluntereinheiten bilden ein

Oktamer, bei dem die vier Rezeptoruntereinheiten den tetrameren Porenkomplex des Kir6-Kanals umschließen (Clement et al., 1997). Dieser Gesamtkomplex bildet einen ATP-sensitiven Kaliumkanal ( $K_{ATP}$ ) (Sakura et al., 1995), der durch MgADP aktiviert wird.

### 2.3.6.2 Protonen

Einige Kir-Kanäle werden durch einen Abfall des intrazellulären pH-Werts inhibiert. Sowohl die Öffnungswahrscheinlichkeit, als auch die Leitfähigkeit werden herabgesetzt. In der Niere ist die Protonen-abhängige Regulation von besonderer Wichtigkeit, da dort Veränderungen des internen pH-Werts sowohl die Aktivität des Kir1.1-, als auch die des  $K_{ATP}$ -Kanals und somit die transepithelialen Kaliumströme beeinflussen. Eine einzige Aminosäure, Lysin in der Position 80 im Aminoterminus, kurz vor dem ersten Transmembranbereich, ist in der Kir1.1-Untereinheit für die intrazelluläre pH-Sensitivität verantwortlich (Fakler et al., 1996).

Die Kir2.3-Untereinheit ist gegenüber extrazellulären pH-Veränderungen sensitiv. Dieses Verhalten wird durch Histidin an Position 117 zwischen dem Ende der ersten Transmembrandomäne und der Porenschlaufe bewirkt (Coulter et al., 1995). Diese pH-Sensitivität könnte in hippokampalen Neuronen, in denen die Kir2.3-Untereinheit stark exprimiert wird, eine wichtige Rolle bei zerebralen Durchblutungsstörungen spielen. Fällt als Folge der Durchblutungsstörung der extrazelluläre pH-Wert stark ab, wird der Kir2.3-Kanal aktiviert und die Neuronen werden hyperpolarisiert. Dadurch wird die neuronale Erregbarkeit gedämpft und ein gefährlicher Abfall des zellulären ATP-Spiegels verhindert. Für die Kir2.3-Untereinheit wurde ein weiterer pH-Sensor, Threonin an Position 53, im Aminoterminus beschrieben (Qu et al., 1999).

### 2.3.6.3 GTP-bindende Proteine

Viele Neurotransmitter vermitteln ihre Wirkung auf die Zellerregbarkeit über die Aktivierung von GTP-bindenden Proteinen (G-Proteinen), die ihrerseits direkt oder indirekt mit Ionenkanälen interagieren und deren Aktivität steigern oder senken. Wenn ein Neurotransmitter einen G-Protein gekoppelten Rezeptor stimuliert, wird der gebundene G-Proteinkomplex aktiviert. Der G-Proteinkomplex besteht aus

– und –Untereinheiten. Bei der Aktivierung bindet GTP an die G -Untereinheit und die G –Untereinheit wird abgespalten. Die G -Untereinheit bindet direkt an eine Bindungsstelle des Ionenkanals. Im Falle der Kir-Kanäle vermittelt eine G –Untereinheit ihre Wirkung über die Aktivierung von Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC). Die Proteinkinasen phosphorylieren die Kir-Kanäle an spezifischen Motiven und bewirken auf diese Weise eine Veränderung der Kanalaktivität (Karschin, 1999).

Die Regulation von Kir-Kanälen durch G-Proteine spielt im Herzen eine wichtige Rolle. Die Ausschüttung von Acetylcholin (ACh) bewirkt im Herzen eine Reduzierung der Herzschlagfrequenz. Das ACh bindet an muskarinische ACh-Rezeptoren, welche im Unterschied zu nikotinischen ACh-Rezeptoren nicht über einen intrinsischen Ionenkanal verfügen. Der gebundene G-Proteinkomplex wird aktiviert und die G -Untereinheit dissoziiert. Der  $I_{K_{ACh}}$ -Kanal im Herzen ist ein Heteromultimer aus Kir3.1- und Kir3.4-Untereinheiten. Von beiden Untereinheiten ist bekannt, daß sie G -Untereinheiten binden können. Durch diese Signalkette kann ACh die Aktivität des  $I_{K_{ACh}}$ -Kanals steigern. Die Frage nach der konkreten Bindungsstelle im Protein ist bisher unbeantwortet geblieben, obgleich es Hinweise dafür gibt, daß sowohl der Carboxy-, als auch der Aminoterminus involviert sind (Huang et al., 1995).

Eine Aktivitätsveränderung der Kir2-Unterfamilie auf ein Neurotransmittersignal scheint in der Regel über Phosphorylierungen durch Proteinkinase A und C abzulaufen. Für Kir2.3-Kanäle wurde jedoch eine Inaktivierung durch die G -Untereinheit nachgewiesen (Cohen et al., 1996 b).

### 2.3.6.4 Phosphorylierung

Verschiedene Hormone und Transmitter vermitteln ihre Wirkung über eine Protein-Phosphorylierung des Kaliumkanals an Serin- und Threonin-Resten und bewirken dadurch eine Modulation des Kanals, was sich auf die zelluläre Erregbarkeit und die transmembranen Kaliumströme auswirkt. Es konnte gezeigt werden, daß der Aktivitätsanstieg des in der glatten Gefäßmuskulatur vorkommenden  $K_{ATP}$ -Kanals, als Reaktion auf CGRP (*Calcitonin-gene-related-peptide*), durch eine PKA-abhängige Phosphorylierung vermittelt wird (Quayle et al., 1994). Da der  $K_{ATP}$ -Kanal den Muskeltonus in der glatten Muskulatur der Blutgefäße reguliert, führt ein Anstieg der Kanalaktivität zu einer Gefäßerweiterung. Dies erklärt den starken Effekt von CGRP

auf den Blutdruck. Für die Kir2-Unterfamilie wurde gezeigt, daß eine PKA-Phosphorylierungsstelle in den letzten Aminosäuren des Carboxyterminus eine wichtige Rolle bei der Kanalinaktivierung spielt (Wischmeyer & Karschin, 1996).

Am Beispiel der Kir2.1-Untereinheit wurde gezeigt, daß Kir-Kanäle auch von Tyrosin-Kinasen phosphoryliert werden können. Tyrosin in Position 242 im Carboxyterminus wurde als einzige Phosphorylierungsstelle identifiziert (Wischmeyer et al., 1998).

### 2.3.6.5 Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>)

Kir-Kanäle werden durch PIP<sub>2</sub> stimuliert (Huang et al., 1998). Die Kir2.1-Untereinheit bindet PIP<sub>2</sub> stärker, als die Kir3.1- und die Kir3.4-Untereinheit. Während die Kir2.1-Untereinheit dafür keine weitere Untereinheit benötigt, wird die PIP<sub>2</sub>-Bindung der Kir3.1- und Kir3.4-Untereinheiten erst durch die Anwesenheit der G<sub>i</sub>-Untereinheit und die der Kir1.1-Untereinheit durch Phosphorylierung mit PKA ermöglicht (Soom et al., 2001). Im K<sub>ATP</sub>-Kanal reduziert PIP<sub>2</sub> die Affinität für ATP, welches den Kanal hemmt (Baukrowitz et al., 1998).

Auch andere zytoplasmatische Lipide haben einen Einfluß auf Kir-Kanäle. Mit Ausnahme des Kir6.2 werden aber alle anderen bevorzugt von PIP<sub>2</sub> moduliert (Fan et al., 1997).

Das negativ geladene PIP<sub>2</sub> bindet an positiv geladene Sequenzen im Carboxyterminus. In der Kir2.1-Untereinheit sind das die Aminosäuren 186 bis 189 (PKKR). Für eine optimale Stimulierung des Kanals durch PIP<sub>2</sub> sind aber drei weitere Bereiche im Carboxyterminus notwendig. Die beiden distalen Bereiche liegen in den Kir3.1-, Kir3.4- und beiden Kir6-Untereinheiten in der Nähe der Bindungsstellen für G<sub>i</sub> bzw. ATP (Soom et al., 2001).

In jüngster Zeit haben PIP<sub>2</sub>-Bindungsstellen besondere Aufmerksamkeit erfahren, weil der Zusammenhang von Mutationen im PIP<sub>2</sub>-Bindungsbereich mit Krankheiten aufgeklärt werden konnte (Donaldson et al., 2003).

### 2.3.6.6 Adenin-Nukleotide

Kaliumkanäle, die durch den Anstieg der intrazellulären ATP-Konzentration inhibiert werden, bezeichnet man als ATP-sensitive Kaliumkanäle oder K<sub>ATP</sub>-Kanäle. Sie wurden

in den unterschiedlichsten Geweben gefunden: in  $\beta$ -Zellen des Pankreas, in glatter und Skelettmuskulatur, in Neuronen des Gehirns, in peripheren Axonen und in Epithelzellen (Ashcroft & Ashcroft, 1990). Der  $K_{ATP}$ -Kanal mit der stärksten Sensitivität gegenüber ATP besteht aus zwei Untereinheiten: Kir6.2 und einem Sulfonylharnstoffrezeptor. Vier Kir-Untereinheiten bilden dabei wie üblich die Kanalpore mit intrinsischer ATP-Sensitivität, wohingegen die vier SUR-Untereinheiten als regulatorische Elemente fungieren.

$K_{ATP}$ -Kanäle, die in Epithelzellen gefunden werden, sind normalerweise weit weniger sensitiv für ATP als solche in Herz- oder  $\beta$ -Zellen, bei denen millimolare Konzentrationen für eine Inaktivierung ausreichen. Die epithelialen  $K_{ATP}$ -Kanäle werden möglicherweise durch Vertreter der Kir1-Unterfamilie gebildet. Noch nicht abschließend geklärt ist, ob ATP direkt an die Kir1.1-Untereinheit bindet oder die Sensitivität durch eine Hilfsuntereinheit hervorgerufen wird. Im Carboxyterminus der Kir1.1-Untereinheit findet sich ein Aminosäuremotiv, das in anderen Proteinen für die Bindung und Hydrolyse von ATP verantwortlich ist. Mutationen dieses Motivs bewirken auch eine veränderte ATP-Sensitivität des Kir1.1 (McNicholas et al., 1996).

### **2.4 Kir2.4-Kanal**

Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Kaliumkanal Kir2.4 wurde 1998 in boviner Retina, sowie Rattengehirn identifiziert (Töpert et al., 1998). Ein Vergleich der Aminosäuresequenz mit anderen Vertretern der Kaliumkanal-Familie ergab die größte Homologie zur Gruppe der Kir2-Kanäle (53-63%). Das 47,6 kDa Protein wurde Kir2.4 genannt. Starke Homologie zu den übrigen Kir-Kanälen weist die Kir2.4-Untereinheit im Bereich der Transmembrandomänen, sowie der dazwischenliegenden Porenschleufe auf. Das trifft auch auf das im Bereich der Porenschleufe gelegene Kaliumionenspezifische Selektionsfiltermotiv (GYG) zu. Geringe Homologie besteht hingegen im Bereich der intrazellulären Termini.

Aufgrund von elektrophysiologischen Messungen konnte seine Zuordnung zu der Kir2-Familie bestätigt werden. Er weist eine starke Einwärtsgleichrichtung, eine Kinetik und eine Kaliumpermeabilität auf, wie sie für Kir2-Vertreter typisch ist. Hingegen unterscheidet er sich erheblich in seiner Blockierbarkeit durch Barium- und Cäsiumionen. Er weist eine 30 bis 50fach niedrigere Sensitivität gegenüber Barium und



Cäsium auf, als alle übrigen Kir2-Mitglieder. Diese Tatsache bietet die Möglichkeit zur physiologischen Unterscheidung des Kir2.4-Kanals von anderen Mitgliedern der Kir-Familie.

Der Kir2.4-Kanal scheint hauptsächlich im Gehirn exprimiert zu werden und zeichnet sich dort durch ein sehr restriktives Verteilungsmuster aus. Innerhalb des Gehirns wird er ausschließlich in den Kernen von Motoneuronen, die mit entsprechenden Gehirnnerven verbunden sind, exprimiert.

### **2.5 Kaliumkanal-Gendefekte und Krankheiten**

Bei den zahlreichen wichtigen Funktionen, die Ionenkanäle und speziell Kaliumkanäle ausüben, ist es nicht überraschend, daß Mutationen in Ionenkanal-Genen zu Krankheiten führen. Heute ist bereits eine große Zahl von krankheitsverursachenden Mutationen in Kaliumkanal-kodierenden Genen bekannt. In der Tabelle 1 sind Krankheiten zusammengestellt, die durch Mutationen in Kaliumkanal-Genen verursacht werden.

Bereits aus der physiologischen Funktion der Kaliumkanäle lassen sich Hinweise auf ihre Pathophysiologie ableiten. Ein naheliegendes Ziel ist deshalb, mit Hilfe der verfügbaren Information über die biochemische Funktion, die Verteilung der Kaliumkanäle im Organismus und die Lokalisation ihrer Gene im Genom einen Zusammenhang zwischen dem Ausfall bzw. einer Mutation des Kanals und einer Krankheit herzustellen. Die Kenntnis der genetischen Ursachen von Krankheiten wäre für die Entwicklung diagnostischer Verfahren, das genetische Screening, die erbbiologische Beratung, die pränatale Diagnostik und in Zukunft für gentherapeutische Ansätze nützlich. Außerdem verbessert die Kenntnis der genetischen Ursache einer Krankheit die Therapiemöglichkeiten.

Für das LQT-Syndrom z.B. sind Defekte in fünf verschiedenen Kaliumkanal- und einem Natriumkanal-Gen verantwortlich. Dieser Befund hat große klinische Bedeutung, weil die Therapie des LQT-Syndroms vom betroffenen Gen abhängig ist (Ashcroft, 2000).

<b>Gen</b>	<b>Gen- produkt</b>	<b>Chro- som</b>	<b>Gewebe/ Organ</b>	<b>Krankheit</b>	<b>Referenz</b>
<i>KCNA1</i>	Kv1.1	12p13	Cerebellum, Neuron	Episodische Ataxie (EA1)	Browne et al., 1994
<i>KCNQ1</i>	KvLQT1	11p15.5	Herz, Niere	LongQT-Syndrom 1	Wang et al., 1996
-"	-"	-"	Innenohr	Jervell Lange-Nielson- Syndrom 1	Neyroud et al., 1997
<i>KCNQ2</i>	KvEBN1	20q13.3	Gehirn	Benigne neonatale fam. Epilepsie (EBN1)	Biervert et al., 1998
<i>KCNQ3</i>	KvEBN2	8q24.22-3	Gehirn	Benigne neonatale fam. Epilepsie (EBN2)	Charlier et al., 1998
<i>KCNQ4</i>	KvLQT4	1p34	Innenohr	Autosomale dominante Taubheit	Kubisch et al., 1999
<i>KCNH2</i>	hERG,LQT2	7q35-36	Herz	LongQT-Syndrom 2	Curran et al., 1995
<i>KCNE1</i>	minK	21q22.1	Niere, Herz, Uterus	LongQT-Syndrom 5	Splawski et al., 1997
-"	-"	-"	Retina	Jervell Lange-Nielson- Syndrom 2	Schulze-Bahr et al., 1997
<i>KCNE2</i>	minK-related	21q22.1	Herz	LongQT-Syndrom 6	Abbott et al., 1999
<i>KCNJ2</i>	Kir2.1	17q23.1-24.2	Herz	LongQT-Syndrom 7	Plaster et al., 2001
<i>KCNN3</i>	SKCa3	1q21.3	Gehirn	Schizophrenie	Chandy et al., 1998
<i>KCNJ1</i>	Kir1.1b	11q24	Niere	Bartter's-Syndrom 2	Ho et al., 1993
<i>KCNJ11</i>	Kir6.2+SUR	11p15.1	Pankreas	Persistente hyperinsulinämische Hyperglykämie der Kindheit (PHHI)	Simon et al., 1996; Thomas et al., 1995

**Tabelle 1** Bekannte Krankheiten, die durch Mutationen in Kaliumkanal-Genen verursacht werden.

### **3 Organismen & Material**

#### **3.1 Organismen**

##### **3.1.1 Mäusstämme**

NMRI-Mäuse wurden von der Tierhaltung der Abteilung Molekulare Zellbiologie, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen, bezogen.

##### **3.1.2 Embryonale Stammzellen**

Für die homologe Rekombination des Knock-out-Konstrukts, wurde die Wildtyp-Embryonale-Stammzelllinie MPI II aus dem Mausstamm 129SvJ verwendet, die von der Abteilung Molekulare Zellbiologie, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen, bezogen wurde.

##### **3.1.3 Bakterienstämme**

Transformationen wurden mit den *E. coli*-Stämmen XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, USA), DH5 (Hanahan et al., 1985) und SURE (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Als Wirtsstamm für  $\lambda$ -gt10-Phagen wurde der *E. coli*-Stamm LE392 und für  $\lambda$ -ZAP II-Phagen wurden die *E. coli*-Stämme XL1-Blue und SOLR als Wirtsbakterien verwendet.

##### **3.1.4 Frosch-Oozyten**

Die für die elektrophysiologischen Experimente eingesetzten Frosch-Oozyten wurden aus adulten weiblichen Exemplaren der Gattung *Xenopus laevis* präpariert.

## **3.2 Materialien**

### **3.2.1 Chemikalien und Kulturmedien**

Die Chemikalien wurden in Analysequalität von den Firmen Difco (Detroit, USA), Gibco (Gaithersburg, USA), J. T. Baker (Deventer, Holland), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen, sofern nicht anders angegeben.

### **3.2.2 Radiochemikalien**

Radiochemikalien stammten von der Firma Amersham-Pharmacia (Braunschweig).

### **3.2.3 Verbrauchsmaterial**

Die Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Biozym (Oldendorf), Corning (Corning, USA), Eppendorf (Hamburg), Falcon (New Jersey, USA), Greiner (Nürnberg), Sarstedt (Nürnbrecht), Schleicher & Schuell (Dassel), Schütt (Göttingen) und Terumo (Tokio, Japan) bezogen.

### **3.2.4 Enzyme**

Die Restriktionsenzyme wurden ausschließlich von New England Biolabs (Bad Schwalbach) und Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Von der Firma Qiagen (Hilden) wurde die *Taq*-DNA-Polymerase eingesetzt. Sofern nicht anderweitig vermerkt, wurden alle weiteren Enzyme von Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen.

### **3.2.5 Reaktionssets (*Kits*)**

Von der Firma Qiagen (Hilden) wurden die QiaexII, Qiaquick, Qiaprep Spin Mini, Plasmid Maxi und PCR-Purification Kits eingesetzt. Die DNA-Sonden wurden mit dem Random Primed DNA Labeling Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) und dem

## **2 Organismen & Material**

---

Multiprime DNA Labeling System (Amersham-Pharmacia, Braunschweig) radioaktiv markiert.

### **3.2.6 Membranen**

Die Nylonmembranen wurden von Amersham-Pharmacia (Braunschweig) und Qiagen (Hilden) bezogen.

### **3.2.7 DNA-Bibliotheken**

Die humane genomische  $\lambda$ -DASH II-DNA-Bibliothek der Firma Stratagene (La Jolla, USA) und die murine genomische DNA-Bibliothek des Mausstamms 129SvJ (Günther Schütz, DKFZ, Heidelberg) wurde benutzt.

### **3.2.8 Vektoren**

Für Klonierungen wurde, sofern nicht anderweitig vermerkt, der Klonierungsvektor pBluescript SK+ der Firma Stratagene (La Jolla, USA) eingesetzt. Das Rekombinationskonstrukt für das Knock-out-Projekt wurde in den pKO-Scrambler 1908-Vektor (Stratagene, La Jolla, USA) kloniert.

### **3.2.9 Größenmarker**

Zur Längenabschätzung von DNA-Fragmenten auf Agarosegelen wurde eine Mischung aus *Hind*III geschnittener  $\lambda$ -Phagen-DNA und *Hae*III geschnittener PhiX174-Phagen-DNA benutzt (New England Biolabs, Bad Schwalbach). Alternativ wurde der DNA-Marker Gene Ruler 1 kb von Fermentas (St. Leon-Rot) eingesetzt.

In denaturierenden Formaldehyd-RNA-Agarosegelen wurde ein Marker von New England Biolabs (Bad Schwalbach) eingesetzt, der nach den Angaben des Herstellers vorbereitet und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde.

### **3.2.10 Oligonukleotide**

Alle Oligonukleotide, die entweder zur Sequenzierung oder in PCR-Ansätzen eingesetzt wurden, stammten von der Firma NAPS (Göttingen).

### **3.2.11 Filme**

Die Autoradiografien wurden mit XAR-3- und BIOMAX-Filmen der Firma Kodak (Rochester, USA) erstellt. Farbfotografien wurden auf Kunstlichtfilmen Extrachrome 320T und 64T gemacht, die ebenfalls von der Firma Kodak stammten.

# **4 Methoden**

Alle molekularbiologischen Standardmethoden, die nachfolgend nicht aufgeführt sind, wurden nach der Beschreibung von Sambroock durchgeführt (Sambroock et al., 1989).

## **4.1 DNA-Techniken**

### **4.1.1 DNA-Modifikationen**

#### **4.1.1.1 Restriktionsschneiden**

DNA wurde gemäß den Angaben des Enzymherstellers mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die Inkubationszeiten lagen in Abhängigkeit von eingesetzter DNA- und Enzymmenge, aber auch der Anzahl an Restriktionsschnittstellen zwischen einer und drei Stunden. Doppelrestriktionen wurden nach Möglichkeit in einem für beide Enzyme geeigneten Puffer, der aus entsprechenden Tabellen der Hersteller ausgewählt wurde, ausgeführt. Ließ sich kein für beide Enzyme geeigneter Puffer finden oder schnitten die Enzyme bei unterschiedlichen Temperaturen, wurden die Restriktionen nacheinander durchgeführt und die DNA in einem Zwischenschritt aufgereinigt.

#### **4.1.1.2 Auffüllen von 3'-Überhängen**

Nach Restriktion mit asymmetrisch schneidenden Enzymen kann doppelsträngige DNA 3'-überhängende Enden enthalten. Auch Amplifikationsprodukte einer Polymerase-Kettenreaktion mit Taq-Polymerase weisen wegen deren 3'-Extendasefunktion ebenfalls ein überhängendes Adenin am 3'-Ende auf. Da diese überhängenden Enden bei einer Ligationsreaktion möglicherweise inkompatibel mit dem zu verknüpfenden Ende sind, wurden sie durch die Zugabe von T4-DNA-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim) und dNTPs in stumpfe Enden (*blunt ends*) umgewandelt. Der Reaktionsansatz wurde 15 Min. bei 16 °C inkubiert und das Enzym anschließend durch 10-minütige Erwärmung auf 75 °C hitzeinaktiviert. Vor einer weiteren Verarbeitung wurde die DNA entweder durch Gelelektrophorese mit anschließender Gelextraktion oder Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt.

#### **4.1.1.3 Auffüllen von 5'-Überhängen**

Mit Hilfe des Klenow-Fragments lassen sich überhängende 5'-Enden doppelsträngiger DNA nach Restriktionsspaltungen auffüllen und in stumpfe Enden umwandeln. Das Klenow-Fragment ist ein proteolytisches Produkt der *E. coli*-DNA-Polymerase I, dem die Polymerase- und 3'-5'-Exonukleaseaktivität erhalten geblieben und die 5'-3'-Exonukleaseaktivität verlorengegangen ist. Nach Zugabe des Enzyms (Roche Diagnostics, Mannheim) und dNTPs wurde der Reaktionsansatz 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Enzyminaktivierung erfolgte durch Erwärmung auf 75 °C für 10 Min. Bevor die DNA weiterverarbeitet werden konnte, mußte sie aufgereinigt werden.

#### **4.1.1.4 Dephosphorylierung**

Um die Religation linearisierter Plasmid-DNA zu verhindern, wurde die 5'-terminale Phosphatgruppe durch das Enzym alkalische Phosphatase abgespalten. Die Dephosphorylierung von bis zu 3 µg Plasmid-DNA erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 10 U alkalischer Phosphatase (Shrimp Alkalische Phosphatase, Roche Diagnostics, Mannheim) bei 37 °C in 30 Min. Anschließend wurde das Enzym durch Inkubation bei 75 °C für 10 Min. inaktiviert und die DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt.

#### **4.1.1.5 Phosphorylierung**

Den Amplifikationsprodukten einer Polymerase-Kettenreaktion fehlen an ihren Enden die 5'-Phosphatgruppen. Sofern die PCR-Produkte vor einer Ligation nicht durch eine Restriktion nachbearbeitet werden sollten, mußten die 5'-Enden phosphoryliert werden, um mit einem anderen DNA-Doppelstrang durch das Enzym Ligase verknüpft werden zu können. Der PCR-Reaktionsansatz wurde für die Phosphorylierung mit T4-DNA-Polynukleotidkinase (Roche Diagnostics, Mannheim) und ATP versetzt. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C folgte die Enzyminaktivierung bei 65 °C für 20 Min. Vor einer weiteren Verarbeitung wurde die DNA entweder durch Gelelektrophorese mit anschließender Gelextraktion oder durch Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt.



### 4.1.1.6 Fragmentligation

Doppelsträngige DNA-Enden wurden mit der T4-DNA-Ligase verknüpft. Das Enzym katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-OH-Gruppe am Ende des einen DNA-Strangs und der 5'-Phosphatgruppe am Ende des anderen DNA-Strangs. Um die endergonische Reaktion ablaufen zu lassen, ist Energie aus der Hydrolyse von ATP, das im Enzympuffer vorliegt, notwendig. Der Ligationsansatz inkubierte über Nacht bei 16 °C und wurde anschließend direkt für eine Transformation chemokompetenter Bakterien eingesetzt.

Das molare Verhältnis von Insert und Vektor bei einer Standardligation betrug 3:1 und wurde anhand eines analytischen Agarosegels abgeschätzt. Um das korrekte Verhältnis unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Banden-Leuchtintensitäten und Längenverhältnisse einstellen zu können, wurde vom Autor dieser Arbeit eine Formel entwickelt, die alle Faktoren berücksichtigt und folgendes Pipettierverhältnis als Ergebnis hat:  $\text{Pipettierverhältnis Insert / Vektor} = (\text{LV} \times \text{ZV}) / \text{IV}$ .

In der Formel entspricht LV dem Längenverhältnis von Insert zum Vektor, ZV dem beabsichtigten Mischungsverhältnis von Insert zu Vektor ( im Standardansatz 3:1) und IV dem subjektiven Leuchtverhältnis der Insertbande zu Vektorbande auf einem Testgel.

### 4.1.2 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente nach ihrer Größe getrennt. DNA wandert aufgrund der negativen Ladungen der Phosphatreste in einem elektrischen Feld zur Anode.

Agarosegele wurden für analytische und präparative Zwecke angefertigt. Abhängig von der Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 0,7 bis 2,5 %ige Agarosegele (w/v) verwendet und mit jeweils 0,1 µg Ethidiumbromid pro ml 1x TAE-Puffer versetzt. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Die DNA wurde vor dem Auftragen mit Probenpuffer gemischt und bei einer Spannung zwischen 50 und 110 Volt aufgetrennt. Durch den Auftrag eines DNA-Längenstandards mit DNA-Stücken definierter Größe, ließ sich die Länge der im Gel aufgetrennten DNA-Fragmente ermitteln. Anschließend wurden die Gele bei kurzweiligem UV-Licht ( =258 nm) fotografiert. Präparative Gele wurden, um

die Bildung von Thymidindimeren und Strangbrüchen zu vermeiden, nur langwelligem, energieärmerem UV-Licht ( $>300$  nm) ausgesetzt.

### **4.1.3 DNA-Elution aus Agarosegelen**

Um DNA-Fragmente, z.B. nach einer Restriktionsspaltung, zu isolieren, wurde der Restriktionsansatz, nachdem er mit Probenpuffer versetzt worden war, auf ein Agarosegel aufgetragen und die DNA-Fragmente nach ihrer Länge aufgetrennt. Unter langwelliger UV-Beleuchtung wurde das Gelstück mit dem zu isolierenden DNA-Fragment zügig mit einem Skalpell ausgeschnitten und zur Extraktion der DNA mit QIAquick Gelextraction Kit (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Der Ablauf der Extraktion verlief entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

### **4.1.4 Herstellung chemokompetenter Bakterien**

50 ml LB-Flüssigkulturmedium wurden mit 500  $\mu$ l aus einer frischen 3 ml LB-Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C geschüttelt. Nachdem die Bakterien in die logarithmische Wachstumsphase eingetreten waren, wurden sie bei 4 °C abzentrifugiert, in eiskaltem TFB I-Puffer resuspendiert und 10 Min. auf Eis gestellt. Die Bakterien wurden erneut abzentrifugiert und in 8 ml TFB II-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde aliquotiert, in einem Methanol/Trockeneisbad schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### **4.1.4.1 Konzentrationsbestimmung flüssiger Bakterienkulturen**

Das Wachstum von Bakterienkulturen wurde photometrisch durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm von 1:500-Verdünnungen der Kulturen kontrolliert.

### **4.1.5 Transformation chemokompetenter Bakterien**

Für einen Transformationsansatz wurde ein Aliquot der bei -80 °C gelagerten chemokompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden im Falle einer Retransformation etwa 100 ng DNA oder üblicherweise der komplette Ligationsansatz hinzugegeben. Dieser Ansatz inkubierte 30 Min. auf Eis bevor die Bakterien für 50 s

## 4 Methoden

---

einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt wurden. Nach weiteren 5 Min. auf Eis wurden 250 µl SOC-Medium (Gibco, Gaithersburg, USA) hinzugegeben und der komplette Ansatz 45 Min. bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurde der Ansatz auf vorgewärmten LB-Agar-Platten, die ein zum Vektorrestistenzgen passendes Antibiotikum enthielten, ausplattiert. Die Platten inkubierten über Nacht bei 37 °C und am nächsten Morgen wurden mit den Einzelkolonien 3 ml LB-Flüssigkulturen angeimpft.

### **4.1.6 Plasmidpräparation**

Zur Gewinnung geringer DNA-Mengen (3 - 15 µg) wurde in 3 ml LB-Flüssigmedium eine Bakterienkultur bei 37 °C über Nacht angezogen. Ein Milliliter wurde anschließend mit dem Qiaprep Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers verarbeitet.

Größere DNA-Mengen (300 - 500 µg) und DNA in höherem Reinheitsgrad wurden aus 50 ml Kulturen gewonnen. 50 ml LB-Flüssigmedium wurden mit 50 µl Bakteriensuspension einer 3 ml Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterien des kompletten Ansatzes wurden anschließend nach Herstellerangaben mit dem Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) verarbeitet.

### **4.1.7 Polymerase-Kettenreaktion**

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um ein *in vitro*-Verfahren, das zur Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt wurde. Die Methode basiert auf einer exponentiellen Amplifikation doppelsträngiger DNA zwischen einem spezifischen Strangprimer und einem ebenfalls sequenzspezifischen Gegenstrangprimer. In einem dreiphasigen Zyklus, der aus Denaturierung des Doppelstrangs, Primeranlagerung und Strangverlängerung besteht, wird durch eine DNA-Polymerase ausgehend vom 3'-Ende des jeweiligen Primers der komplementäre Strang zur Vorlagen-DNA gebildet.

In analytischen Ansätzen wurde die *Taq*-Polymerase von Qiagen (Hilden) eingesetzt, der die Korrekturleseaktivität zu Gunsten einer höheren Amplifikationsgeschwindigkeit fehlt. Für präparative Ansätze wurde die *Pfu*-Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) benutzt, deren Fehlerrate aufgrund einer Korrekturlesefunktion deutlich niedriger als die der *Taq*-Polymerase ist.

Die Primer wurden entweder durch Sequenzvergleich oder mit dem im Internet verfügbaren Programm Primer3 konzipiert. Die zur Template-DNA spezifische Sequenz der Primer hatte eine Länge von 15 bis 25 Basenpaaren, die zum Teil noch um Restriktionschnittstellen verlängert wurden. Die Anlagerungstemperatur der Primer wurde mit der Formel  $T_m = [(A + T) \times 2 \text{ °C}] + [(G + C) \times 4 \text{ °C}]$  abgeschätzt.

Die drei zyklischen Reaktionsschritte wurden 20 - 30 mal wiederholt, immer mit einem initialen Denaturierungsschritt eingeleitet, während dem die Polymerase hinzupipettiert wurde (Hotstart-PCR), und mit einem terminalen 72 °C-Schritt von 10 Minuten Dauer beendet. Während des terminalen 72 °C-Schritts werden alle unvollständigen Amplifikationsprodukte vervollständigt, da die Elongation durch die Polymerase bei 72 °C abläuft.

### **4.1.8 Reinigung und Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen**

#### **4.1.8.1 Phenol/Chloroform-Extraktion**

Bei der Phenol/Chloroform-Extraktion wurde zu einem Volumen wässriger DNA- (oder RNA-) Lösung ein gleiches Volumen einer Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (Mischungsverhältnis: 25:24:1) gegeben. Dieser Ansatz wurde intensiv gemischt und anschließend bei Raumtemperatur 5 Min. mit maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die denaturierten Proteine, Membranbestandteile und in organischen Lösungsmitteln löslichen Bestandteile sammelten sich in der unteren Phenol/Chloroform-Phase, sowie der Interphase. Die aufgereinigte DNA bzw. RNA, die sich in der wässrigen oberen Phase befand, wurde vorsichtig abgenommen und in zwei weiteren Durchgängen mit einem Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) von möglichen Phenolresten befreit. Um die DNA bzw. RNA zu konzentrieren, wurde sie anschließend mit Isopropanol oder Ethanol gefällt.

#### **4.1.8.2 Ethanolfällung**

Zu der in Wasser gelösten DNA bzw. RNA wurde 1/10 Volumen 5M wässriger Natriumazetat-Lösung hinzugefügt. Danach wurde die 2,5fache Menge des neuen Volumens absoluten Ethanol hinzugegeben und der gesamte Ansatz intensiv gemischt. Der Fällungsansatz wurde entweder 30 Min. bei -20 °C oder 5 Min. bei -80 °C

inkubiert. Zum Sedimentieren der präzipitierten DNA bzw. RNA wurde der Ansatz bei 4 °C mit maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 15 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Um Salzreste aus der DNA zu entfernen, wurde das Präzipitat mit 0,5 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, anschließend wieder 5 Min. zentrifugiert und der Überstand erneut entfernt. Das DNA- bzw. RNA-Pellet wurde im Vakuum getrocknet und in Wasser resuspendiert.

### 4.1.8.3 Isopropanolfällung

Eine Isopropanolfällung hat den Vorteil, daß zur Fällung der DNA- bzw. RNA-Lösung nur ein geringeres Volumen zugefügt werden muß und die DNA mit einem geringem Salzgehalt ausfällt. Anstelle von Ethanol und Natriumazetat werden der DNA- bzw. RNA-Lösung nur 0,7 Volumenanteile Isopropanol hinzugefügt. Der folgende Ablauf entspricht der Fällung mit Ethanol und Natriumazetat.

Nachteile der Isopropanolfällung sind die geringere Flüchtigkeit des Isopropanols, sowie ein durchsichtiges und weniger festes Pellet nach der Zentrifugation.

### 4.1.8.4 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA und RNA in wäßrigen Lösungen wurde photometrisch im Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260 nm bestimmt. Die Nukleinsäurekonzentration ist bis zu einem Wert von 1,5 OD proportional zur Absorption.

Da das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm liegt, kann das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  als Maß für die Verunreinigung der Lösung mit Proteinen benutzt werden. Für proteinfreie Nukleinsäurelösungen beträgt das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  1,8. Zwischen gemessener Absorption und Nukleinsäurekonzentration in der Lösung gilt folgende Relation:

Doppelstrang-DNA:            1  $OD_{260}$  = 50 ng/ $\mu$ l

Einzelstrang-RNA:            1  $OD_{260}$  = 40 ng/ $\mu$ l

**4.1.9 Sequenzierung**

Bei der DNA-Sequenzierung wurde das von Sanger entwickelte Kettenabbruchverfahren eingesetzt. Das Prinzip der Methode wird im folgenden kurz beschrieben: Wie bei der PCR-Reaktion wird mit Hilfe einer DNA-Polymerase und eines spezifischen Primers ein komplementärer Strang synthetisiert. Da nur ein Primer für einen Strang hinzugefügt wird, dient nur einer der beiden Doppelstränge als Kopiervorlage. Zusätzlich zu den normalen Desoxyribonukleotiden, befinden sich im Sequenzierungsansatz auch Didesoxyribonukleotide, bei deren Einbau im Verlauf der Strangverlängerung es zu einem Abbruch der Synthese kommt. Die vier verschiedenen Didesoxyribonukleotide sind mit vier verschiedenen Fluorochromen markiert. Im Verlauf der Polymerasereaktion entstehen DNA-Kopien, die sich in ihrer Länge jeweils nur um eine Base unterscheiden und deren letztes Glied ein Fluorochrom-markiertes Didesoxyribonukleotid ist. Am Ende der Reaktion wurde das Gemisch der unterschiedlich langen Stränge mit einer Kapillargelelektrophorese aufgetrennt und das terminale Didesoxyribonukleotid mit einem Laser anhand des Fluorochroms identifiziert. Auf diese Weise können in einem Durchlauf Sequenzen von bis zu 700 Nukleotiden bestimmt werden.

Es wurde das Gerät ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, USA) benutzt und den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt. Dem Reaktionsansatz wurden 400 - 600 ng DNA, 4 pmol Primer und 8 µl Ready Reaction Mix (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, USA) zugegeben. Die Zyklen setzten sich aus folgenden Einzelschritten zusammen, die 25 mal durchlaufen wurden: 30 s bei 94 °C ; 1 Min. bei 50 °C; 3 Min. bei 60 °C.

Anschließend wurde das Produkt mit Ethanol gefällt, die Probe in TSR-Puffer (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, USA) aufgenommen und dem Sequenator vorgelegt, der diese automatisch in die Kapillare lud.

Die Sequenziererergebnisse wurden mit der ABI PRISM 310 Software ausgelesen und analysiert.

### **4.2 Durchmusterung von $\lambda$ -Phagen-Bibliotheken**

#### **4.2.1 Herstellung phagenkompetenter Bakterien**

Mit einer frischen *E. coli*-Kolonie wurde eine 3 ml Vorkultur angeimpft. Das LB-Flüssigmedium enthielt 0,2 % Maltose, sowie 10 mM MgSO<sub>4</sub> und wurde über Tag bei 37 °C geschüttelt. Mit 500  $\mu$ l dieser Vorkultur wurde eine größere Übernachtskultur im gleichen Medium angesetzt. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien sedimentiert, in einer 10 mM MgSO<sub>4</sub>-Lösung resuspendiert und die Bakterienkonzentration auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 eingestellt.

Die Bakterien waren nun für eine Infektion mit  $\lambda$ -Phagen kompetent und blieben bei 4 °C etwa eine Woche stabil.

#### **4.2.2 Titerbestimmung einer Phagenbibliothek**

Die Ausplattierung einer genügend großen Anzahl von Phagen einer Bibliothek war Voraussetzung für die erfolgreiche Identifizierung eines bestimmten Phagenklons. Daher mußte der aktuelle Titer der verwendeten Bibliothek bestimmt werden. Mit diesem Ziel wurde mit SM-Puffer eine Verdünnungsreihe der Bibliothek hergestellt, die aus fünf Verdünnungen von  $1 \times 10^{-2}$  bis  $1 \times 10^{-6}$  bestand. Wie im späteren Experiment auch, wurde ein Gemisch aus Phagen und kompetenten Bakterien in Topagar ausplattiert. Nach 6 - 9 h wurden Löcher (Plaques) im opaken Bakterienrasen sichtbar. Aus der Anzahl dieser Plaques ließ sich über den Verdünnungsfaktor die Phagenkonzentration in der Bibliothek errechnen.

#### **4.2.3 Ausplattieren der Phagenbibliothek**

Phagenkompetente Bakterien wurden mit einer Phagenmenge der Bibliothek versetzt, die der von 50000 Plaques pro Kulturschale entsprach. Diese Suspension inkubierte 15 Min. bei 37 °C, wurde anschließend mit 46 °C warmem Topagar gemischt und auf Kulturschalen ausplattiert. Diese Platten wurden nun 5 - 9 h bei 37 °C inkubiert, bis etwa 1 mm große, klare Plaques im trüben Bakterienrasen sichtbar wurden. Um eine weitere Lyse der Bakterien und eine Vermischung der Plaques zu verhindern, wurden die Platten bei 4 °C aufbewahrt.

#### **4.2.4 Phagentransfer auf Nylonmembranen**

Um positive Plaques identifizieren zu können, wurden die Phagen auf eine Nylonmembran übertragen, die Phagenhüllen aufgelöst und die DNA an die Nylonmembran gebunden.

Hybond N<sup>+</sup> Nylonmembranen (Amersham-Pharmacia, Braunschweig) der passenden Größe wurden beschriftet und auf den Bakterienrasen mit den Phagen-Plaques gelegt. Um später die Ausrichtung der aufgelegten Membranen auf den Platten zuordnen zu können, wurden mit Kanülen Löcher in die Membranen und den darunterliegenden Topagar gestochen. Nach 1 Min. wurden die Membranen abgezogen und für 5 Min. auf Denaturierungslösung-getränktes Whatman-Papier gelegt. Anschließend kamen die Membranen auf Whatman-Papier, das mit Neutralisierungslösung getränkt war und abschließend für 3 Min auf Waschlösung-getränktes Whatman-Papier. Um die DNA zu fixieren, wurde die Membran für 2 h bei 80 °C getrocknet.

Von jeder Kulturplatte wurden zwei Membranen gezogen, um später die Anzahl falsch positiver Klone zu verringern.

#### **4.2.5 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten**

Für die Herstellung radioaktiver DNA-Sonden, wurde das Random Primed DNA Labeling Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) eingesetzt. Mit diesem Kit werden mit Hilfe des Klenow-Fragments und randomisierten Hexanukleotid-Primern Teilkopien der zu markierenden Sonde synthetisiert. Der Markierungsansatz enthielt 25 - 50 ng DNA der Sondenvorlage. Klenow-Fragment, dNTP-Gemisch (ohne dCTP), <sup>32</sup>P-dCTP (Amersham-Pharmacia, Braunschweig) und das Random-Primer-Gemisch wurden hinzugefügt und der Ansatz 45 Min. bei 37 °C inkubiert. Bei diesem Ansatz entstanden Sonden, bei denen jeweils die Cytosine radioaktiv markiert sind.

Im Anschluß wurden, um die Hintergrundaktivität zu reduzieren, nicht eingebaute radioaktive Nukleotide entfernt. Dazu wurde der Ansatz mit TE-Puffer auf 50 µl aufgefüllt und auf eine vorbereitete Sephadex G50-Mikrosäule (Amersham-Pharmacia, Braunschweig) aufgetragen. Das Eluat enthielt die von freien Nukleotiden gereinigte Sonde. Bevor die Sonde eingesetzt werden konnte, mußte sie 5 Min. bei 95 °C denaturiert und 5 Min. auf Eis abgekühlt werden.



## **4 Methoden**

---

Die Qualität der Sondenmarkierung wurde durch Messung der Radioaktivität mit einem Szintillationszähler bestimmt

### **4.2.6 Prähybridisierung und Hybridisierung der Membranen**

Um unspezifische Bindungsstellen an den Membranen abzusättigen, wurden sie 2 h bei 42 °C in Prähybridisierungslösung, die DNA aus Heringssperma enthielt, inkubiert.

Im Anschluß an die Prähybridisierung wurden pro Milliliter Prähybridisierungslösung  $2 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  cpm radioaktiv markierter und denaturierter DNA-Sonde hinzugegeben. Dieser Hybridisierungsansatz wurde über Nacht bei 42 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Hybridisierungslösung entfernt und die Membranen 15 Min. bei Raumtemperatur in 2x SSC/1 % SDS-Lösung gewaschen. Es folgten zwei Waschschrte bei 60 °C für jeweils 30 Min. und abschließend noch einer bei Raumtemperatur für 30 Min. Die Membranen wurden getrocknet und zusammen mit einem Röntgenfilm in lichtdichten Kassetten für 3 bis 4 Tage bis zur Filmentwicklung aufbewahrt.

### **4.2.7 Identifikation und Isolierung positiver Phagenklone**

Die Markierungen der Membranen wurden auf die entwicklten Röntgenfilme übertragen. Auf einen positiven Klon wurde nur dann geschlossen, wenn die überlagerten Röntgenbilder beider Membranen an gleicher Stelle ein Signal zeigten. Die positiven Plaques wurden auf den Platten identifiziert und mit einer sterilen Pipettenspitze ausgestochen und in SM-Puffer transferiert. Die Phagen wurden über Nacht bei 4 °C aus dem Agar eluiert. Das Eluat wurde in gleicher Weise wiederholt untersucht, bis eindeutig positive Einzelplaques isoliert werden konnten.

### **4.2.8 DNA-Isolierung aus $\lambda$ -Phagen**

Da mit mehreren Phagenbibliotheken gearbeitet worden war, gab es zwei verschiedene Methoden zur DNA-Isolierung.

#### **4.2.8.1 *in vivo*-Exzision von $\lambda$ -ZAP II-Phagen**

Die Methode der *in vivo*-Exzision bot sich bei den kommerziellen cDNA-Bibliotheken der Firma Stratagene an. Zuerst wurden phagenkompetente *E. coli* vom Bakterienstamm XL1-Blue mit dem Phageneluat und einem Helferphagen 15 Min. bei 37 °C inkubiert, mit LB-Medium versetzt und weitere 2 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien bei 70 °C lysiert und die Bakterentrümmer durch Zentrifugation sedimentiert. Mit den im Überstand verbliebenen Phagen wurden kompetente *E. coli* vom Bakterienstamm SOLR infiziert, die dann auf LB-Agarplatten, die Ampizillin enthielten, ausplattiert wurden. Mit den Bakterienkolonien dieser LB-Agarplatten wurden 3 ml Flüssigkulturen angeimpft, aus denen mit der Standardmethode zur DNA-Isolierung aus Bakterienflüssigkulturen die in den pBluescript-Vektor klonierte cDNA des Phagen isoliert werden konnte.

#### **4.2.8.2 Isolierung der Phagen-DNA aus Plattenlysate**

Mit einem Aliquot des  $\lambda$ -gt10-Phageneluats wurde der konfluente Bakterienrasen auf einer 150 mm Kulturschale vollständig lysiert. Die Phagen wurden mit 10 ml SM-Puffer und einigen Tropfen Chloroform über Nacht bei 4 °C aus der Agarose gewaschen. Der Überstand wurde mit DNase und RNase versetzt und bei 37 °C für 30 Min. inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienreste sedimentiert. Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen 20 %igem Polyethylenglykol 6000 in 2 M NaCl-Lösung versetzt und die Phagen nach 2-stündiger Inkubation bei 4 °C durch Zentrifugation pelletiert. Die Phagen wurden getrocknet und in 500  $\mu$ l SM-Puffer resuspendiert. Es folgte eine Chloroformextraktion, ein weiterer RNase-Verdau für 15 Min. und ein Proteinase K-Verdau für 15 Min. Abschließend wurde die Phagen-DNA mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Die Phagen-DNA wurde in TE-Puffer gelöst und bei 4 °C gelagert.

### **4.3 Bestimmung der chromosomalen Lokalisation**

Genomische DNA aus Hybridzelllinien des chromosomalen (NIGMS, Human Genetic Mutant Cell Repository) und Radiation-Hybrid-Panels (GeneBridge 4) wurden mit

einem spezifischen Primerpaar (siehe Anhang, Primer *h chrlok s* und *hchrlok as*) amplifiziert. Die Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Im Falle des chromosomalen Panels zeigte die DNA-Probe, aus der das korrekte Produkt generiert worden war, direkt das Chromosom an auf dem das zu untersuchende Gen liegt. Im Falle des Radiation-Hybrid-Panels wurden die Ergebnisse in einem für das Whitehead-Mapper-Programm geeigneten Daten-Vektor zusammengestellt, mit entsprechenden Vektoren von Markern mit bekannter chromosomaler Position verglichen und statistisch ausgewertet. Die Marker, deren Vektoren die größte Ähnlichkeit mit dem des untersuchten Gens hatten, zeigten die Region an, in der das Gen liegt.

### **4.4 Knock-out**

Nachdem ein Rekombinationskonstrukt hergestellt worden war, mußten Wildtyp-embryonale Stammzellen damit transformiert werden.

#### **4.4.1 Kultivierung embryonaler Stammzellen**

Embryonale Stammzellen wurden auf Fibroblasten-Zellrasen kultiviert. Es handelte sich dabei um Mausfibroblasten, die durch eine Mitomycin C-Behandlung mitotisch inaktiviert wurden. Diese Fibroblasten wurden in Gewebekulturschälchen ausplattiert, die mit Gelatinelösung vorbehandelt worden waren.

Die ES-Zellen wuchsen auf dem Fibroblasten-Zellrasen in runden Kolonien und wurden täglich mikroskopisch kontrolliert. Das Medium wurde täglich gewechselt und mit FCS und LIF (Leukemia Inhibiting Factor) versetzt. LIF verhinderte eine Differenzierung der ES-Zellen.

#### **4.4.2 Elektroporation**

Embryonale Stammzellen wurden nach einer Trypsinbehandlung zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden etwa  $1,5 \times 10^7$  Zellen in 0,8 ml PBS suspendiert und mit 25 µg des linearisierten Rekombinationskonstrukts sorgfältig gemischt. Dieser Ansatz wurde in eine Elektroporationsküvette (Biorad, 4 mm Elektrodenabstand) überführt und 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Elektroporation erfolgte mit

einem Impuls von 500  $\mu$ F bei 250 V Spannung. Dadurch wurden die embryonalen Stammzellen zur Transformation mit dem Rekombinationskonstrukt vorbereitet. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen in ES-Zellmedium aufgenommen und auf den vorbereiteten Fibroblasten Zellrasen ausplattiert.

### **4.4.3 Selektion der embryonalen Stammzellen**

Die Selektion der transformierten ES-Zellen begann 24 h nach der Elektroporation. Das Zellmedium wurde gegen ein Selektionsmedium, das Neomycin und Gancyclovir enthielt, ausgetauscht. Dieses Selektionsmedium wurde täglich erneuert und ab dem 5. Tag konnte die Applikation von Gancyclovir abgesetzt werden. Am 8. Tag nach der Elektroporation wurden einzelne ES-Zellklone unter dem Stereomikroskop mit einer Pipettenspitze isoliert, mit Trypsin behandelt und in einem Trog einer 24-Loch-Kulturplatte auf inaktivierten Fibroblasten ausplattiert. Die einzelnen Klone in den Trögen der 24-Lochplatten wurden bis zur Konfluenz kultiviert. Nachdem die Zellen nochmals trypsiniert worden waren, wurden sie in zwei Aliquote aufgeteilt. Ein Aliquot wurde in flüssigem Stickstoff gelagert, aus dem anderen wurde die genomische DNA isoliert, die auf ein homologes Rekombinationsereignis hin untersucht wurde.

### **4.4.4 Isolierung genomischer DNA**

Das Gewebe (z.B. murine Schwanzspitze) oder die embryonalen Stammzellen wurden über Nacht bei 56 °C in Proteinase K-Lösung verdaut. Am nächsten Morgen wurden die unverdauten Bestandteile (z.B. Knochen oder Haare) abzentrifugiert. Die genomische DNA im Überstand wurde zuerst mit Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend mit Isopropanol gefällt. Das DNA-Pellet wurde nicht vollständig getrocknet, um die Löslichkeit in TE-Puffer zu erhalten. Bei allen Schritten war es wichtig, die DNA nicht durch heftiges Mischen oder schnelles Aufsaugen in kleine Pipettenspitzen durch Scherkräfte zu degradieren.

### 4.4.5 Southern-Blot

Bei diesem von Southern entwickelten Verfahren wird fragmentierte genomische DNA aus einem Agarosegel auf eine Membran übertragen, fixiert und mit entsprechenden Sonden identifiziert.

Zuerst wurde genomische DNA über Nacht einer Restriktionspaltung unterzogen. Die Wahl des Restriktionsenzymys hing von der im Anschluß an den Southern-Blot zur Detektion eines bestimmten DNA-Fragments eingesetzten Sonde ab. Die DNA-Fragmente des Restriktionsansatzes wurden auf einem 0,5 – 0,75 %igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Das Agarosegel mit dem DNA-Längenstandard wurde anschließend mit einem Zentimetermaß unter UV-Beleuchtung fotografiert. Um die DNA-Banden effizienter transferieren zu können, wurde das Agarosegel zuerst 15 Min. in 0,25 M HCl inkubiert, anschließend in Denaturierungslösung transferiert und nach 30 Min. für weitere 30 Min. in Neutralisierungslösung eingelegt. Das so vorbehandelte Gel wurde nun in den Blotaufbau für die aufwärtsgerichtete Kapillartransfermethode, mit 20x SSC als Transferpuffer, integriert. Nach 12 - 16 h wurde der Transfer der DNA auf die Nylonmembran abgeschlossen. Auf der Membran wurde die Position der Gel-Taschen mit einem Bleistift markiert, der Blot in 2x SSC-Puffer gewaschen und bei 80 °C für 2 h gebacken.

Mit den Methoden, wie sie bereits für die Durchmusterung einer Phagen-Bibliothek beschrieben worden sind, wurde nun eine radioaktiv markierte DNA-Sonde hergestellt, die dann mit der Membran hybridisiert wurde. Nach verschiedenen Waschschritten wurde ein Röntgenfilm mit dieser Membran exponiert. Nach der Filmentwicklung konnte das spezifische Bandenmuster ausgewertet werden.

## 4.5 RNA-Techniken

Voraussetzung für das Arbeiten mit RNA war die Vermeidung von RNase-Kontamination. Zu diesem Zweck wurden bei allen Arbeiten immer Handschuhe getragen und die Arbeitsmittel zuvor gründlich gereinigt. Die eingesetzten Glasgeräte wurden vor Gebrauch 2 h bei 220 °C gebacken, die Arbeitsflächen mit Ethanol gereinigt und RNase-freie Verbrauchsmaterialien benutzt. Wasser wurde mit 0,1 %iger Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Lösung versetzt und wie alle übrigen wäßrigen Lösungen, soweit die Bestandteile hitzestabil waren, autoklaviert.

### **4.5.1 Präparation der Embryonen und Gehirne**

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Um adulte Gehirne zu präparieren, wurde der Kopf abgetrennt, das Fell vom Schädelknochen gelöst und der Schädelknochen mit Schere und Pinzette vorsichtig entfernt. Das freipräparierte Gehirn wurde mit einem Spatel von der Schädelbasis abgelöst. Die Präparation der Mausembryonen erfolgte unter dem Stereomikroskop. Die Bauchdecke und der Uterus wurden mit Präparierbesteck geöffnet und die Embryonen an der Nabelschnur hängend entnommen. Anschließend wurde die Fruchtblase geöffnet und die Embryonen für die Experimente vorbereitet.

Embryonen und Gehirne, die für eine RNA-Präparation vorgesehen waren, wurden sofort bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Embryonen und Gehirne, die für *in-situ*-Hybridisierungsexperimente auf Kryostatschnitten eingesetzt werden sollten, wurden in PBS gewaschen und auf Trockeneis in Plastikschrälchen in Einbettmedium (Tissue-Tec, Miles, USA) eingebettet. Die eingebetteten Gewebe wurden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Embryonen, die für *whole-mount-in-situ*-Experimente vorgesehen waren und dafür gelagert werden sollten, wurden bei Raumtemperatur in PBS präpariert, sofort in 4 %ige PFA/PBS überführt und über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  in dieser Lösung fixiert. Am nächsten Morgen wurden die Embryonen in einer aufsteigenden Methanolreihe in 20 %-Schritten jeweils 10 Min. inkubiert. Die auf diese Weise dehydrierten Embryonen konnten in Methanol bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  mehrere Wochen stabil gelagert werden.

### **4.5.2 Isolierung von Gesamt- und mRNA**

Die frisch präparierten oder bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Gewebe wurden mit einem Ultra-Turrax (IKA, Staufen) bei Raumtemperatur in einem geeigneten, mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzten Puffer homogenisiert. Zuerst wurde die Gesamt-RNA mit dem RNeasy Total RNA Kit (Qiagen, Hilden) isoliert, indem sie an eine Säulenmatrix gebunden und von dieser nach verschiedenen Waschschritten eluiert wurde. Die anschließende mRNA-Isolierung mit dem Oligotex-Kit (Qiagen, Hilden) beruhte auf der Bindung der polyadenylierten 3'-Enden der mRNA an Oligo-dT-Nukleotide, die an Glaskügelchen (Glasmilch) gekoppelt waren. Die Bindung erfolgte in einem Hochsalzpuffer und die Elution nach mehreren Waschschritten unter Niedrigsalzbedingungen. Die Konzentration der erhaltenen mRNA wurde

photometrisch bestimmt und die Qualität mittels Gelelektrophorese abgeschätzt. Die mRNA wurde aliquotiert und war bei  $-80\text{ °C}$  mehrere Monate stabil.

### **4.5.3 Reverse Transkriptions-PCR**

Für die cDNA-Erststrangsynthese aus mRNA wurde eine virale reverse Transkriptase eingesetzt (Superscript II, Gibco, Gaithersburg, USA). Die Synthese eines zur mRNA komplementären DNA-Einzelstrangs wurde durch die Anlagerung eines Primers an die mRNA initiiert. Durch die Auswahl dieses Erststrangprimers konnten abhängig vom Ziel entweder alle im Reaktionsgemisch vorliegenden mRNAs in cDNA umgeschrieben werden oder selektiv nur eine. Vor Beginn der Standard-PCR-Amplifikation wurde der Erststrangsynthese-Ansatz mit RNase-behandelt.

#### **4.5.3.1 Unspezifische reverse Transkription**

Um eine Kopie des gesamten mRNA-Spektrums des mRNA-Gemischs herzustellen, wurde ein Primer gewählt, der komplementär zum PolyA-Schwanz der mRNA ist. Mit diesem Primer war es allerdings problematisch Transkripte der 5'-Enden von langen mRNAs zu erhalten. Deshalb wurden auch unspezifische, zufällige Hexanukleotide als Primer eingesetzt, die mit der reversen Transkription innerhalb der mRNA beginnen und dadurch die Chance auf ein Transkript mit vollständigem 5'-Ende vergrößern. Diese Methoden wurde zur Herstellung von cDNA-Bibliotheken angewandt.

#### **4.5.3.2 Spezifische reverse Transkription**

Bei dieser Methode wird dem Transkriptionsansatz ein spezifischer Gegenstrangprimer hinzugefügt. Auf diese Weise wird nur die mRNA revers transkribiert, die eine zum Primer komplementäre Sequenz enthält. Diese analytische Methode wurde eingesetzt, um eine bestimmte mRNA in einem mRNA-Gemisch nachzuweisen.

### **4.5.3.3 5'-RACE-Analyse**

Bei einer RACE (*rapid amplification of cDNA ends*)-Analyse wurde nach der Erststrangsynthese an die einzelsträngige cDNA enzymatisch mit der terminalen Transferase (Roche Diagnostics, Mannheim) ein PolyC-Schwanz am 3'-Ende anpolymerisiert. In einer nun folgenden PCR wurde mit einem zur PolyC-Sequenz komplementären PolyG-Primer und einem spezifischen Primer das 5'-Ende der cDNA amplifiziert.

### **4.5.4 Denaturierendes Formaldehyd-Agarosegel**

Einzelsträngige RNA neigt sehr stark zur Bildung von Sekundärstrukturen. Deshalb wurde sie in denaturierender Umgebung elektrophoretisch getrennt, da nur unter diesen Bedingungen die Laufstrecke mit der Länge der RNA korreliert.

Für ein 1,3 %iges Gel wurden 0,6 g analytische Agarose in 30 ml DEPC-Wasser aufgeschmolzen und mit 8 ml 5x MOPS-Laufpuffer, sowie 7 ml 37 %iger Formaldehyd-Lösung luftblasenfrei vermischt. Die aufzutragende RNA wurde mit Probenpuffer und Ethidiumbromid versetzt und 10 Min. auf 65 °C erhitzt. Für die Elektrophorese wurde 1x MOPS-Laufpuffer verwendet.

### **4.5.5 Herstellung und Nachweis Digoxigenin-markierter RNA-Fragmente**

Für die Herstellung Digoxigenin (DIG)-markierter RNA wurde ein Nukleotidgemisch (Roche Diagnostics, Mannheim) eingesetzt. Digoxigenin ist ein im Fingerhut vorkommendes Steroid, das an dUTP gekoppelt wurde. Dieses DIG-dUTP wurde durch eine *in vitro*-Transkription in die RNA-Kopien einer DNA-Vorlage eingebaut. Die Methode der *in vitro*-Transkription wird später ausführlich behandelt.

Der Nachweis der DIG-markierten RNA erfolgte im ersten Schritt durch die Bindung eines gegen Digoxigenin gerichteten Antikörpers, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist. In einem zweiten Schritt katalysierte die alkalische Phosphatase einerseits die Oxidation des farblosen Substrats BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat) zu Indigo (blau) und andererseits in einer gekoppelten Reaktion die Reduktion des farblosen NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) zu blauem Diformazan.



### **4.6 *in situ*-Hybridisierungen auf Schnitten**

#### **4.6.1 Herstellung von Gefrierschnitten**

Gefrierschnitte wurden mit einem Kryostaten (Model CM 3050, Leica, Mannheim) angefertigt. Das von Einbettmittel (Tissue-Tec, Miles, USA) umgebene Gewebe wurde auf einem  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  kalten Metallblock fixiert und anschließend in der gewünschten Schnittebene justiert. Je nach Einstellung wurden 10 - 15  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt und auf einen silanisierten Objektträger (Superfrost<sup>\*</sup>/Plus, Schütt, Göttingen), der Raumtemperatur besaß, aufgeschmolzen. Die Schnitte wurden 25 Min. bei Raumtemperatur auf dem Objektträger getrocknet und anschließend bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  trocken gelagert.

#### **4.6.2 Prähybridisierung, Hybridisierung und Farbreaktion**

Die bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Gefrierschnitte wurden bei Raumtemperatur getrocknet. Um das Verlaufen der wäßrigen Hybridisierungsprobe bei den folgenden Schritten zu verhindern, wurde mit einem Spezialstift (Emmedge Pen) auf dem Objektträger ein hydrophober Rand um die Schnitte gezogen. Die Schnitte wurden in 4 %iger PFA-Lösung fixiert, in PBS-Puffer gewaschen und mit Proteinase K angedaut. Die Proteolyse wurde durch mehrmaliges Waschen abgestoppt. Nach einer Refixierung der Schnitte folgte eine weitere Waschung bevor sie bei  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 2 h prähybridisiert wurden. Für die Hybridisierung wurden pro Objektträger 150  $\mu\text{l}$  Hybridisierungspuffer in das hydrophob umrandete Feld pipettiert und die Objektträger in verschlossenen Plastikkisten in einer Formamid-/Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre bei  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Schnitte bei  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 2x SSC/ 50 % Formamid gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger in Schafserum enthaltendem Puffer 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Antikörperreaktionen auf den Schnitte zu verhindern. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit der 1:2000 verdünnten DIG-Antikörperlösung. Am folgenden Tag wurden die Schnitte mehrfach gewaschen und für die Farbreaktion äquilibriert. Die NBT/BCIP-Färbelösung wurde wieder in jedes hydrophob umrandete Feld einzeln eingetragen. Die Objektträger wurden unter Lichtausschluß gelagert, der Fortschritt der Färbung regelmäßig kontrolliert und die Färbelösung häufig gewechselt, um die

unspezifische Hintergrundfärbung niedrig zu halten. Die Farbreaktion wurde durch mehrfaches Waschen in 1x PBT abgestoppt. Schließlich wurden die Präparate mit Moviol (Hoechst, Frankfurt) und Deckgläschen verschlossen.

## **4.7 *in situ*-Hybridisierungen ganzer Embryonen**

Die *whole-mount-in-situ*-Hybridisierungstechnik erlaubt die Lokalisation spezifischer mRNA in ganzen Embryonen. Da sich die Permeabilität der Embryonen mit der fortschreitenden Größenzunahme im Verlauf der Embryogenese verschlechtert, ist die Anwendung dieser Methode nur bis zum Entwicklungsstadium E14 möglich.

### **4.7.1 Vorbereitung der Embryonen und Gehirne**

Die in Methanol bei  $-20\text{ °C}$  gelagerten, dehydrierten Embryonen wurden zunächst über eine abfallende Methanolreihe in 20 %-Schritten für jeweils 10 Min. rehydriert. Bei Embryonen ab E11 wurde deren Permeabilität durch Einstiche mit einer feinen Nadel erhöht. Bei größeren Embryonen war es zusätzlich notwendig, durch Bleichen die Transparenz und den Kontrast gegenüber einem späteren spezifischen Signal zu erhöhen. Dazu wurden die Embryonen 30 Min. in 6 %igem  $\text{H}_2\text{O}_2$  in PBT-Puffer gebleicht und anschließend mit PBT-Puffer gewaschen. Je nach Größe der Embryonen folgte eine unterschiedlich lange Behandlung mit Proteinase K bei  $37\text{ °C}$ , die die Permeabilität für Sonde und Antikörper weiter verbessern sollte. Abschließend wurden die Embryonen in 4 % iger PFA/PBS-Lösung 20 Min. refixiert.

### **4.7.2 Prähybridisierung, Hybridisierung und Farbreaktion**

Die Embryonen wurden 3 h bei  $70\text{ °C}$  in Prähybridisierungslösung äquilibriert, bevor die denaturierte Digoxigenin-markierte RNA-Sonde hinzupipettiert wurde. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei  $70\text{ °C}$ . Anschließend wurden die Embryonen mehrfach gewaschen, die nicht-hybridisierte RNA mit RNase A entfernt und die Embryonen für die Antikörperbindung äquilibriert. Zur Reduzierung des Signalhintergrunds wurden die Embryonen mit fötalem Kälberserum vorbehandelt. Um die unspezifische Bindung der Antikörper an embryonale Proteine abzusättigen, wurden

diese mit Embryo-Pulver vorbehandelt. Die Embryonen inkubierten über Nacht bei 4 °C mit der Antikörper-Lösung. Am folgenden Tag wurde in mehreren Waschschrritten der überschüssige Antikörper entfernt und der pH-Wert der Embryonen für die Farbreaktion eingestellt. Die Farbreaktion wurde durch die Zugabe von NBT/BCIP-Stammlösung (Roche Diagnostics, Mannheim) eingeleitet. Die Embryonen inkubierten in der Färbelösung bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß. Die Färbelösung wurde alle 2 h ausgetauscht und der Fortschritt der Färbung wiederholt beobachtet. Die Färbung dauerte in der Regel 36 h. In der Nacht wurde die Färbelösung auf 4 °C abgekühlt. Die Färbung wurde durch Auswaschen mit PBT-Puffer abgestoppt. Zur Lagerung und späteren Dokumentation wurden die Embryonen anschließend durch eine aufsteigende Glycerol-Reihe in 80 %igen Glycerol/ PBT-Puffer überführt und bei 4 °C gelagert.

### **4.7.3 Herstellung von Vibratomschnitten**

Um die Expression des untersuchten Gens auch im Inneren der Embryonen nachzuweisen, wurden Vibratomschnitte sowohl in saggitaler, wie auch in coronaler Orientierung angefertigt. Zunächst wurden die Embryonen aus dem 80 %igen Glycerol/PBT-Puffer über eine aufsteigende PBT-Puffer Reihe rehydriert. Die Embryonen wurden in Gelatine-Lösung äquilibriert und anschließend in Gelatine, die mit Glutaraldehyd vernetzt war, eingebettet. Nachdem der Gelatineblock vollständig ausgehärtet war, wurde er mit einer Rasierklinge grob zugeschnitten und mit Sekundenkleber auf dem Vibratom (Pelco-1000, Leica, Mannheim) in der gewünschten Orientierung fixiert. 40 µm dicke Schnitte des Objekts wurden unter Wasser angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und anschließend mit Moviol (Hoechst, Frankfurt) und einem Deckgläschen vor dem Austrocknen geschützt.

## **4.8 Elektrophysiologie**

### **4.8.1 *in vitro*-Transkription**

Mit dieser Methode wurden in einer *in vitro*-Reaktion sogenannte *run-off*-Transkripte hergestellt. Zuerst wurde das zu transkribierende DNA-Fragment in einen Vektor (pBS SK+ oder pSGEM der Firma Stratagene) kloniert. RNA-Polymerase bindet spezifisch

an eine Promotorsequenz im Vektor und transkribiert die von diesem Startpunkt 3'-gelegene DNA-Sequenz. Um die Bildung von *run-around*-Transkripten zu verhindern, wurde der Vektor zuvor durch einen Restriktionsschnitt am 3'-Ende der zu transkribierenden Sequenz linearisiert. Nachdem der Transkriptionsansatz 1 h bei 37 °C inkubiert worden war, schloß sich eine Inkubation mit DNase I für 15 Min. bei 37 °C an, um die DNA-Vorlage der Transkription zu eliminieren. Die cRNA wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt und in DEPC-Wasser resuspendiert und bei -80 °C gelagert. Um die Ausbeute, Qualität und Menge an Abbruchfragmenten der Transkription abschätzen zu können, wurde ein Aliquot auf einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

### **4.8.2 Expression rekombinanter Proteine in *Xenopus* Oozyten**

Um eine Proteinexpression in *Xenopus* Oozyten zu erreichen, wurden mit einem Nanoject Injektor (Drummond, USA) 2 - 12 ng der *in vitro* hergestellten cRNA in defollikulierte Oozyten (Dumont-Entwicklungsstadium VI) injiziert. Diese Oozyten wurden anschließend 2 - 4 Tage bei 19 °C in einem Wärmeschrank (Mytron, Heiligenstadt) in ND 96-Lösung, der Gentamycin und Na-Pyruvat hinzugefügt worden war, inkubiert. Die Lösung wurde täglich gewechselt.

### **4.8.3 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme**

Aus Borosilikatglaskapillaren mit Filament (GC200F-15) wurden mit einem Elektrodenziehgerät (List-Medical, Darmstadt) zwei Elektroden hergestellt und die fein ausgezogene Spitze auf einen voraussichtlichen elektrischen Widerstand von 1,5 - 2 M abgebrochen. Die Elektroden wurden mit einer 96 mM K<sup>+</sup>-Lösung gefüllt und in eine Oozyte eingestochen. Mit einer der beiden Elektroden wurde der Oozyte ein Strompuls appliziert und mit der zweiten die daraus resultierende Spannungsänderung gegen eine Elektrode in der Badlösung gemessen. Die Meßdaten wurden über einen Rückkopplungsverstärker (Turbo TEC-10, NPI, Tamm) vom PULSE-Programm (Heka, Lambrecht) aufgezeichnet.

### **4.9 Anwendung von Informationsverarbeitungssystemen im *world wide web***

#### **4.9.1 Genomdatenbankrecherche**

Auf den Seiten des Ensembl Genome Browsers (<http://ensembl.org>) und des National Center for Biotechnology Information (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) war es möglich, durch Eingabe von Nukleotid- oder Protein-Sequenzen (BLAST-Suche) oder Suchbegriffen (z.B. Gencode oder chromosomale Lokalisation) homologe und aktuelle Sequenzen sowie dazugehörige zusätzliche Informationen zu erhalten.

Beide Internetseiten greifen auf die selben Datenbanken der Genomprojekte in verschiedenen Spezies zurück. Recherchen nach EST-Sequenzen oder wissenschaftlichen Publikationen (PubMed) wurden ausschließlich auf den Seiten des NCBI durchgeführt.

Die Metasuchmaschine Source (<http://source.stanford.edu>) der Stanford Universität durchsucht verschiedene Genom-Datenbanken nach Suchbegriffen und gibt die Information sehr übersichtlich sortiert aus. Diese Metasuchmaschine eignet sich sehr gut, um schnell große Mengen an Informationen, z.B. zu einem Gen, zu recherchieren.

#### **4.9.2 Suche nach genetisch-bedingten Krankheiten**

Eine Zusammenstellung bisher bekannter Krankheiten, deren Pathophysiologie in Zusammenhang mit einem genetischen Defekt steht, ist im Internet in der OMIM-Datenbank (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) zu finden. Es werden sowohl Krankheiten aufgeführt, deren genetischer Hintergrund bereits aufgeklärt ist, als auch solche, bei denen bisher nur erste Evidenzen und grobe Verknüpfungen zu einem genomischen Locus bestehen.

#### **4.9.3 Programmsammlung für molekularbiologische Anwendungen**

Für allgemeine Computer-gestützte molekularbiologische Arbeiten mit Nukleotid- und Protein-Sequenzen, aber auch für globale und lokale Homologiesequenzvergleiche wurde das sehr umfangreiche, anmeldepflichtige Programmpaket Biology Workbench

(<http://workbench.sdsc.edu>) benutzt. Diese Programm-Suite erlaubt auch die Speicherung von Daten und Ergebnissen, sowie die Formatierung der Ergebnisausgabe.

### **4.9.4 Selektion von Primersequenzen**

Auf dem Server des Whitehead Institute for Biomedical Research ([http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)) wird das online-nutzbare Programm Primer3 zur Auswahl spezifischer Oligonukleotid-Primersequenzen zur Verfügung gestellt. Da dieses Programm über eine Vielzahl einstellbarer Parameter verfügt, wurde es eingesetzt, wenn spezielle Anforderungen an die Primer gestellt wurden, die eine Auswahl ohne Rechnerunterstützung nicht erfüllen konnte.

### **4.9.5 Suche nach Bindungsmotiven für Transkriptionsfaktoren**

Die Programmkombination mVISTA und rVISTA (<http://www-gsd.lbl.gov/vista>) ermöglichte eine gezielte Suche nach Transkriptionsfaktor-Bindungsmotiven. Das Programm mVISTA stellte Homologievergleiche zwischen genomischen Sequenzen verschiedener vom Benutzer vorgelegter Spezies an. Darauf aufbauend wurden die von mVISTA identifizierten Regionen großer Homologie mit dem Programm rVISTA (Loots et al., 2002) der Suche nach relevanten Transkriptionsfaktor-Bindungsmotiven unterzogen. Das Programm rVista lieferte im Falle des *KCNJ14*-Gens jedoch keine verwertbaren Ergebnisse.

Eine weitere Internet-basierte Anwendung zur Suche von Promotorregionen eines Gens ist die kommerzielle Programmsammlung von Genomatix, die in eingeschränktem Umfang nach Anmeldung kostenlos zu benutzen war (<http://www.genomatix.de>). Das Programm PromoterInspector aus dieser Sammlung durchsucht die direkt vor dem Transkriptionsstart eines Gens gelegene DNA-Sequenz nach Bindungsstellen bekannter Promotormodule, die sich aus verschiedenen Transkriptionsfaktoren zusammensetzen. Die Suche mit diesem Programm schlug beim *KCNJ14*-Gen fehl, da dieses Gen, wie auch andere Kaliumkanal-Gene, eine bisher unbekannte Kombination von Transkriptionsfaktor-Bindungsmotiven in der Promotorregion enthält.

Das Programm MatInspector aus dem Genomatixpaket vergleicht eine genomische DNA-Sequenz mit der Transfac-Datenbank (Biobase, Braunschweig, Wingender et al.,

## **4 Methoden**

---

2001) und gibt alle möglichen Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive aus. Aufgrund der geringen Selektivität des Programms, war die Anzahl der identifizierten Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive sehr hoch und deshalb wenig aussagekräftig.

### **4.9.6 Weitere Internetressourcen**

Eine Zusammenstellung bisher bekannter humaner Kaliumkanal-Gene mit ihren systematischen Namen, ihrer chromosomalen Lokalisation und ihrer Datenbank-Kennung ist auf den Internetseiten des HUGO Gene Nomenclature Committee zu finden (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/KCN.shtml>).

Auf den Seiten des italienischen TIGEM-Servers befindet sich eine umfangreiche Link-Sammlung zu verschiedenen molekularbiologischen Internetanwendungen (<http://tigemania.tigem.it/emboss/emboss.list.html>).

## **5 Ergebnisse**

### **5.1 Chromosomale Lokalisation des humanen *KCNJ14*-Gens**

Die letzte der stark einwärtsgerichteten Kir-Untereinheiten, Kir2.4, wurde 1998 aus der Ratte isoliert (Töpert et al., 1998). Eine Voraussetzung für die Charakterisierung der physiologischen Bedeutung im Menschen und für die Suche nach Krankheiten, deren Ursache eine Mutation im Gen kodierend für die Kir2.4-Kanaluntereinheit (systematischer Name: *KCNJ14*-Gen) sein könnte, ist die Identifikation des humanen Orthologs und seine chromosomale Lokalisation. Deshalb wurde die physikalische Position des *KCNJ14*-Gens im humanen Genom mit PCR-Analysen eines somatischen Zellhybridpanels und eines *Radiation-Hybrid*-Panels bestimmt und durch Datenbankrecherchen präzisiert.

#### **5.1.1 Analyse eines somatischen Zellhybrid- und eines *Radiation-Hybrid*-Panels**

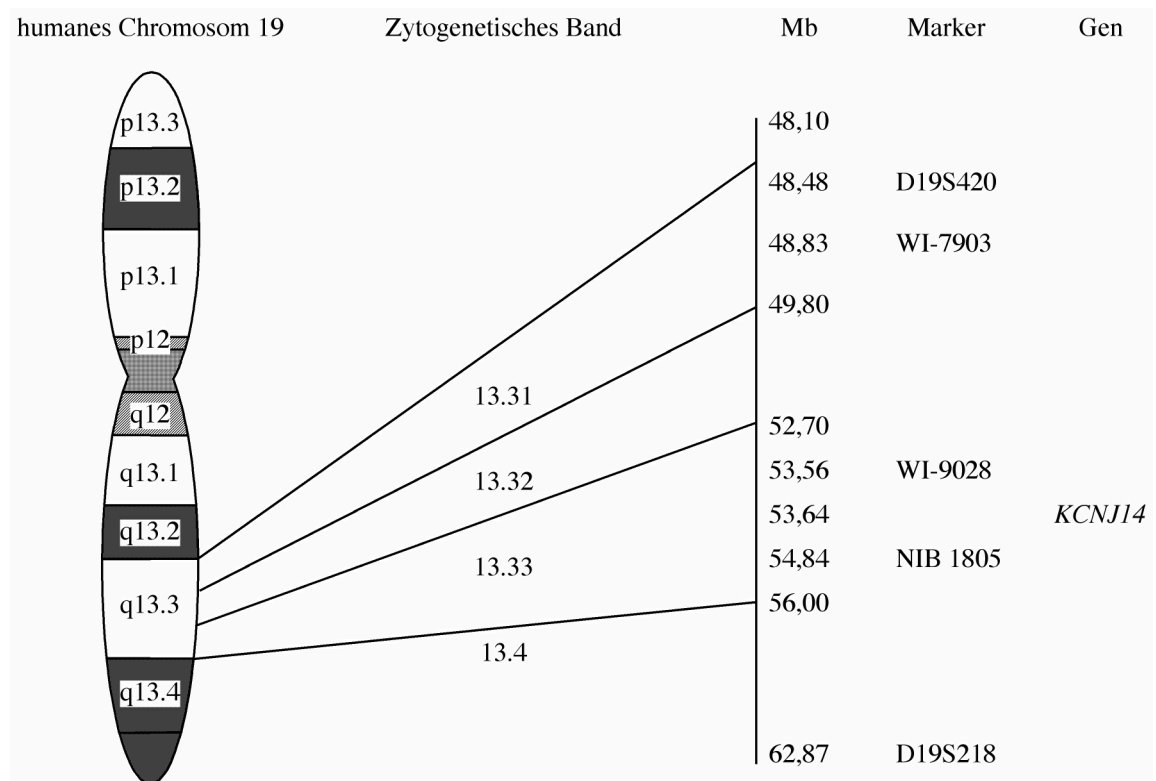
Die PCR-Analyse wurde in zwei Schritten durchgeführt: Mit dem ersten wurde das Chromosom des *KCNJ14*-Gens und mit dem zweiten die Position des Gens auf dem Chromosom ermittelt.

Ein Primerpaar wurde bezüglich seiner Spezifität für das humane *KCNJ14*-Gen getestet. Unter Verwendung der Sequenzinformation eines humanen EST-Klons (AA504857) wurden Primer auf dem 3'-untranslatierten Bereich der mRNA ausgewählt (siehe Anhang, Primer *h chrlok s* und *h chrlok as*). In einer PCR mit genomischer DNA als Vorlage amplifizierten sie spezifisch ein 304 bp Fragment. Mit diesen Primern wurden aus der aufbereiteten genomischen DNA von 24 monochromosomalen Mensch/Hamster Hybrid-Zelllinien 24 PCR-Reaktionen gestartet. Jede der insgesamt 24 im ersten Versuchsschritt eingesetzten Zelllinien enthielt den kompletten Chromosomensatz des Hamsters, aber jeweils nur ein Chromosom des menschlichen Genoms. Die Zelllinie, aus deren genomischer DNA ein korrektes PCR-Produkt amplifiziert werden konnte, zeigte an, auf welchem Chromosom das *KCNJ14*-Gen liegt. Im nun folgenden Schritt wurde mit dem gleichen Primerpaar nach demselben Prinzip, aber mit einem hochauflösenderen Satz von Hybrid-Zelllinien (*Radiation-Hybrid*-Panel) für das bereits identifizierte Chromosom die regionale Position des *KCNJ14*-Gens bestimmt.



## 5 Ergebnisse

Mit dieser Methode wurde im ersten Schritt das Chromosom 19 und im zweiten die Kopplung des *KCNJ14*-Gens mit den Mikrosatelliten-Markern D19S420 (centromer) und D19S218 (telomer) bestimmt. Die nächstbenachbarten Marker des *KCNJ14*-Gens waren WI-9028 und NIB1805 auf dem zytogenetischen Band 19q13 (5,76 cR entfernt von WI-9028) (Töpert et al., 2000).

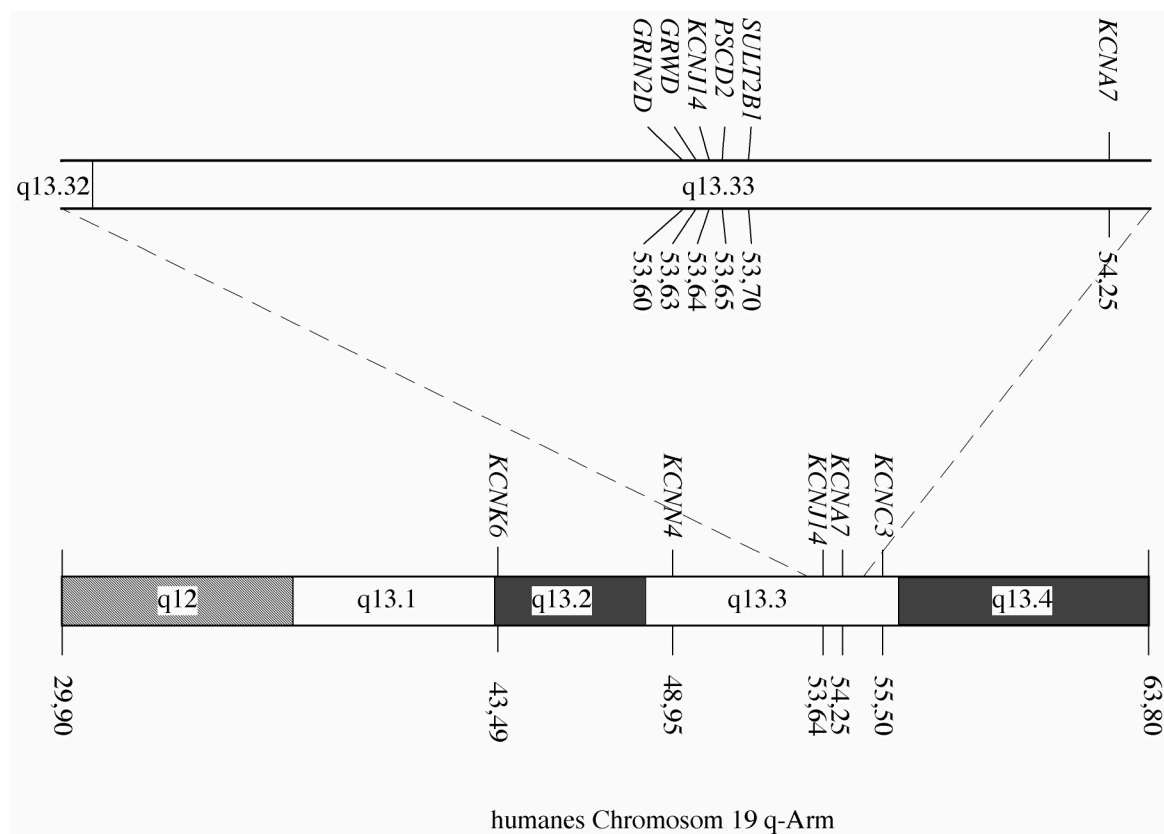


**Abb. 3** Lokalisation des *KCNJ14*-Gens und benachbarter Marker auf dem humanen Chromosom 19. Zur Orientierung sind die zytogenetischen Bänder und die Abstände vom Terminus des p-Arms in Mb angegeben.

### 5.1.2 Datenbank-Analyse

Die Veröffentlichung der vorläufigen Sequenz des humanen Genoms im Jahr 2001 (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001) und die fortlaufende Präzisierung eröffneten die Möglichkeit, durch eine zusätzliche Recherche in öffentlich zugänglichen Datenbanken eine genauere Lokalisierung des *KCNJ14*-Gens vorzunehmen. Die Position des *KCNJ14*-Gens wird in der Version 16.33.1 des humanen Genoms vom 2.7.2003 mit einer Entfernung von 53,64 Mb vom Terminus des p-Arms angegeben.

Ebenfalls mit Hilfe der Datenbank war es möglich, die direkten Nachbargene und deren Abstände zum *KCNJ14*-Gen zu identifizieren: *GRIN2D*- (korrespondierendes Protein: Glutamatrezeptor-Untereinheit 2D), *GRWD*- (*Glutamate Rich WD Repeat Protein*), *KCNJ14*-, *PSCD2*- (Cytohesin 2) und *SULT2B1*-Gen (Hydroxysteroid-Sulfotransferase 2). Außerdem stellte sich heraus, daß auffälligerweise die Gene von vier weiteren Kaliumkanälen (*KCNK6*-, *KCNN4*-, *KCNA7*-, *KCNC3*-Gen) in der Region 19q13 des humanen Genoms lokalisiert sind.



**Abb. 4** Ausschnitt aus der physikalischen Genkarte des humanen Chromosoms 19. Gezeigt ist der Bereich 19q13 mit dem *KCNJ14*-Gen und vier weiteren Kaliumkanal-Genen (unten) und einem vergrößerten Ausschnitt aus dem Bereich 19q13.3 mit dem *KCNJ14*-Gen und seinen Nachbargenen (oben).

## 5.2 Struktur des humanen *KCNJ14*-Gens

Zur weiteren Charakterisierung des *KCNJ14*-Gens, insbesondere mit dem Ziel Spleißvarianten zu identifizieren und die Promotorregion aufzuklären, wurde die genomische Struktur des humanen *KCNJ14*-Gens untersucht. Dazu mußte ein Fragment humaner genomischer DNA, welches das entsprechende Gen enthielt, identifiziert, isoliert und sequenziert werden.

### **5.2.1 Durchmusterung einer genomischen $\lambda$ -Phagenbibliothek**

Zur Durchmusterung einer humanen genomischen  $\lambda$ -Phagenbibliothek wurde ein Teilabschnitt des humanen EST-Klons (Genbank Eintrag: AA504857) mittels PCR amplifiziert (siehe Anhang, Primer *hEST6 s* und *hEST7 as*) und anschließend mit  $^{32}\text{P}$  markiert. Dieses 565 bp lange DNA-Segment kodiert für einen Bereich im Carboxyterminus der humanen Kir2.4-Untereinheit und wurde als Sonde zur Durchmusterung eingesetzt. Es wurden drei Phagenklone identifiziert, die das *KCNJ14*-Gen enthielten. Die daraus isolierten Fragmente humaner genomischer DNA sind zwischen 16,5 und 18,5 kb lang und wurden anschließend amplifiziert und partiell sequenziert (siehe Anhang, Primer).

### **5.2.2 Ergebnisse der Sequenzierung**

Ein Vergleich der ermittelten Sequenzen lieferte folgendes unvollständige Bild des humanen Gens:

Die für den Carboxyterminus kodierende DNA-Sequenz wird von einem Intron unterbrochen, das eine Länge von 1742 bp hat und durch typische Spleißsignale von den flankierenden Exons abgegrenzt wird.

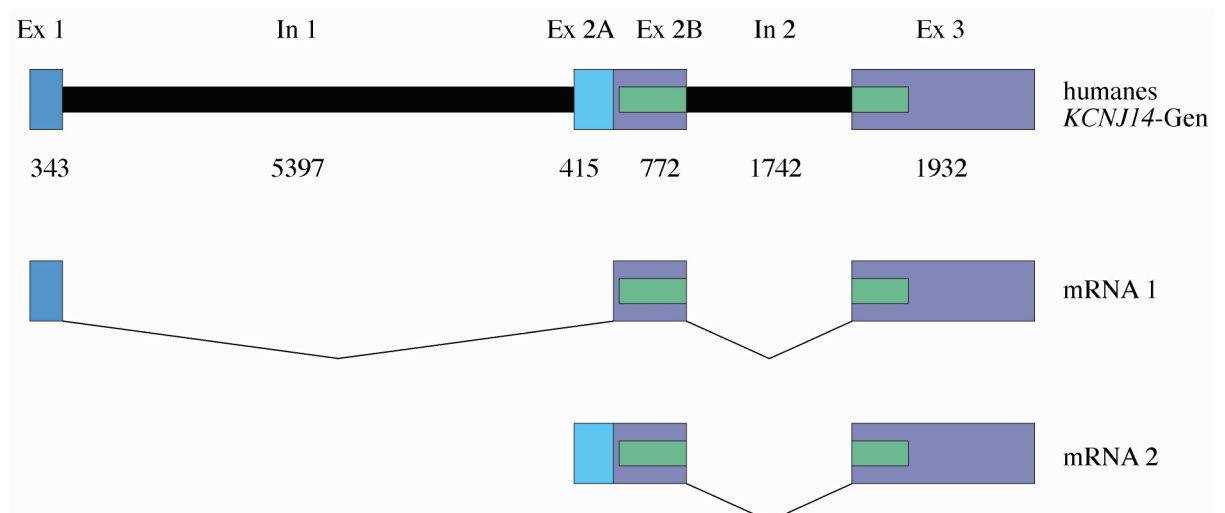
Für die Untersuchung der genomischen DNA auf nicht-kodierende Exons, wurde aus einer  $\lambda$ -Phagenbibliothek die cDNA der humanen Kir2.4-Untereinheit isoliert. Durch die Sequenzierung und den Vergleich der genomischen Sequenz mit der cDNA-Sequenz wurde offensichtlich, daß weder das untranslatierte 3'-Ende, noch das untranslatierte 5'-Ende der mRNA auf genomischer Ebene von Introns unterbrochen wird. Da die cDNA der  $\lambda$ -Phagen-cDNA-Bibliothek durch reverse Transkription von mRNA mit einem PolyT-Primer hergestellt worden war, konnte nicht mit Sicherheit von einem vollständigen 5'-Ende der 5'-untranslatierten Region (UTR) der cDNA ausgegangen werden.

### **5.2.3 Intron in der 5'-untranslatierten Region**

Mit dem Fortschritt des EST-Teilprojekts im Rahmen des Humanen Genom Projekts wurde weitere cDNA-Sequenzinformation zugänglich. Einige dieser Sequenzen besitzen zum Teil einen alternativen 5'-untranslatierten Bereich im Vergleich zu den im

vorherigen Abschnitt beschriebenen cDNA-Sequenzen aus der -Phagenbibliothek. Ein Vergleich dieser EST-Sequenzen mit den sequenzierten humanen genomischen Klonen ergab, daß ein zusätzliches Intron existiert. Dieses Intron unterbricht das 5'-untranslatierte Ende der *KCNJ14*-mRNA 1 und hat eine Länge von 5397 bp.

Damit ergibt sich die vollständige Struktur des humanen *KCNJ14*-Gens und die daraus abgeleiteten mRNA-Transkripte.



**Abb. 5** Struktur des humanen *KCNJ14*-Gens und der bekannten mRNAs mit Angabe der Längen der einzelnen Abschnitte in bp. Die kodierenden Sequenzbereiche sind grün dargestellt.

Das *KCNJ14*-Gen hat eine Länge von 10,6 kb und enthält zwei Introns. In den beiden bekannten Transkripten des *KCNJ14*-Gens werden Exon 1 und Exon 2A alternativ verwendet. Exon 1 ist von Exon 2A durch das erste Intron getrennt; Exon 2B schließt sich ohne intronische Unterbrechung an das Exon 2A an. Ebenso wie die 5'-UTR auf Exon 1, Exon 2A und Exon 2B verteilt ist, liegt auch die kodierende Sequenz auf Exon 2B und Exon 3 verteilt vor. Die 3'-UTR befindet sich vollständig auf dem Exon 3.

### **5.3 Struktur des murinen *Kcnj14*-Gens**

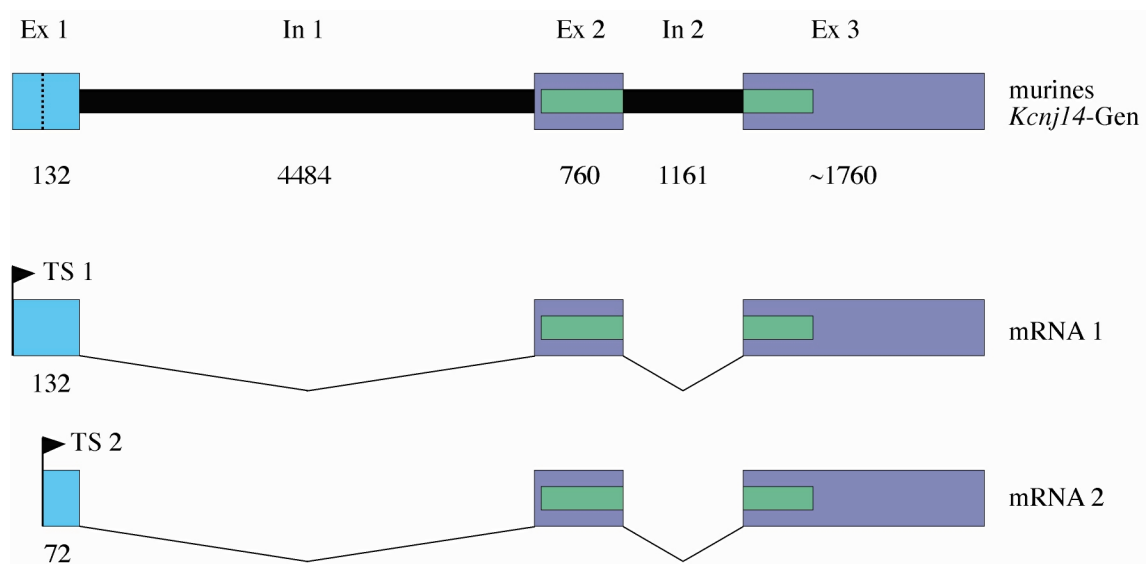
Mit dem Ziel, eine Kir2.4 defiziente transgene Mauslinie zu etablieren, wurde das murine Ortholog des humanen *KCNJ14*-Gens isoliert.

### 5.3.1 Durchmusterung einer genomischen $\lambda$ -Phagenbibliothek

Zur Durchmusterung einer genomischen  $\lambda$ -Phagenbibliothek der Maus wurde mittels PCR ein 371 bp Fragment, welches für den Kir2.4-Carboxyterminus kodiert, aus cDNA amplifiziert (siehe Anhang, Primer *r 8 s* und *m 14 as*). Dieses  $^{32}\text{P}$ -markierte Fragment diente als spezifische Sonde bei der Identifizierung eines Phagenklons, der das *Kcnj14*-Gen enthielt. Es konnte nur ein positiver 17 kb langer Phagenklon isoliert werden, dessen genomische Maus-DNA anschließend extrahiert und zum Teil sequenziert wurde (siehe Anhang, Primer).

### 5.3.2 Ergebnisse der Sequenzierung

Die Untersuchung der Sequenzdaten erbrachte, daß der kodierende Bereich durch ein 1161 bp langes Intron im Carboxyterminus unterbrochen wird. Ergebnisse aus mehreren Experimenten zur Aufklärung des 5'-Endes der *Kcnj14*-mRNA (RACE-Technik) und Sequenzinformationen aus der EST-Datenbank deuteten auf ein weiteres Intron hin. Es hat eine Länge von 4484 bp und unterteilt den 5'-untranslatierten Bereich der mRNA.



**Abb. 6** Struktur des murinen *Kcnj14*-Gens und der bekannten mRNAs mit Angabe der Längen der einzelnen Abschnitte in bp. Die kodierenden Sequenzbereiche sind grün dargestellt. Die beiden mRNA-Transkripte resultieren aus zwei unterschiedlichen Transkriptionsstartpunkten (TS 1 und TS 2) im Exon 1.

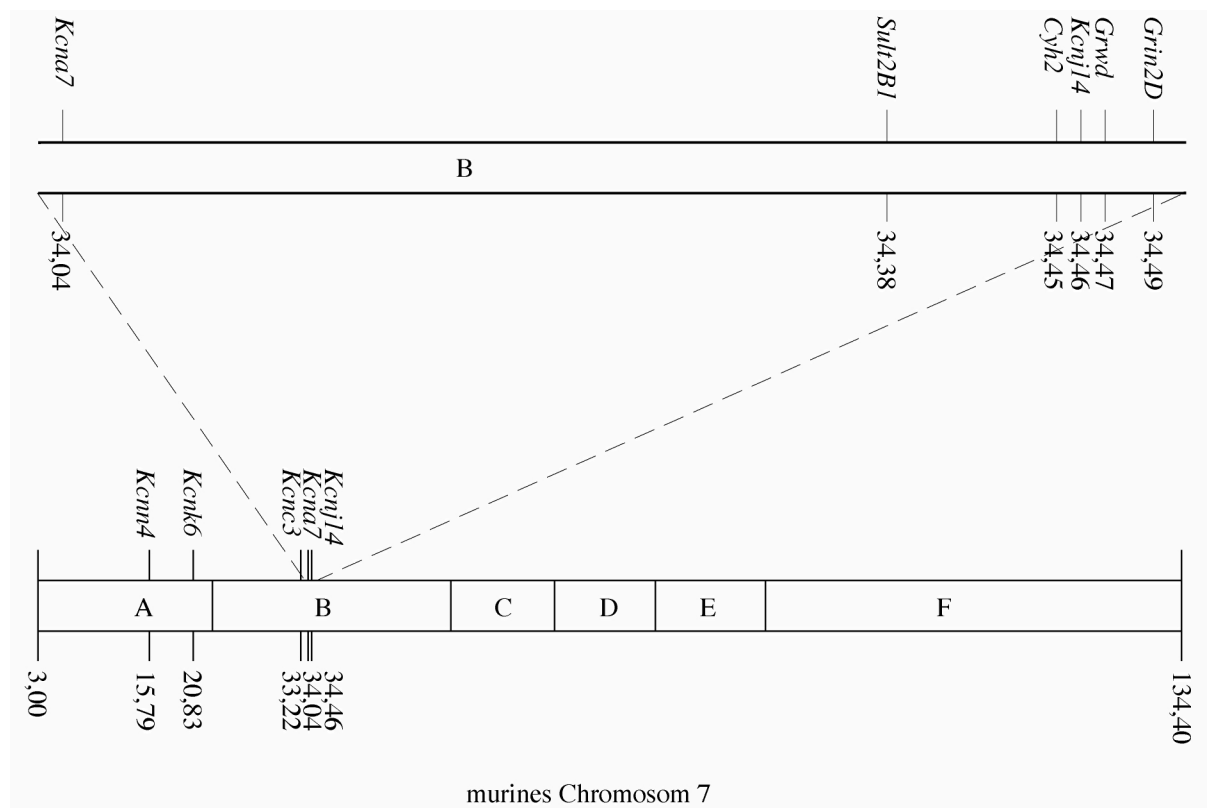
Beide Introns sind durch typische Spleißsignale von den flankierenden Exons eindeutig abgegrenzt. Die identifizierten cDNA-Sequenzen weisen auf zwei alternative

Transkriptionsstartpunkte in Exon 1 hin, die eine Verlängerung bzw. Verkürzung des 5'-untranslatierten Bereichs um 60 bp zur Folge haben.

Bei den beiden mRNA-Transkripten im Menschen handelt es sich um alternative Spleißprodukte, wohingegen die beiden Transkripte in der Maus unterschiedlich lange Transkripte des gleichen Spleißvorgangs darstellen. Die genomischen Strukturen des humanen und des murinen *KCNJ14*-Gens sind jedoch sehr ähnlich, beide Orthologe besitzen drei Exons und die kodierende Sequenz wird in beiden Genen an identischer Position durch das zweite Intron unterbrochen.

## 5.4 Chromosomale Lokalisation des murinen *Kcnj14*-Gens

Die Fertigstellung der ersten Version der Sequenz des Mausgenoms im Jahre 2002 (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002) und die fortschreitende Präzisierung dieser Sequenz machten es möglich, das *Kcnj14*-Gen der Maus chromosomal zu lokalisieren.



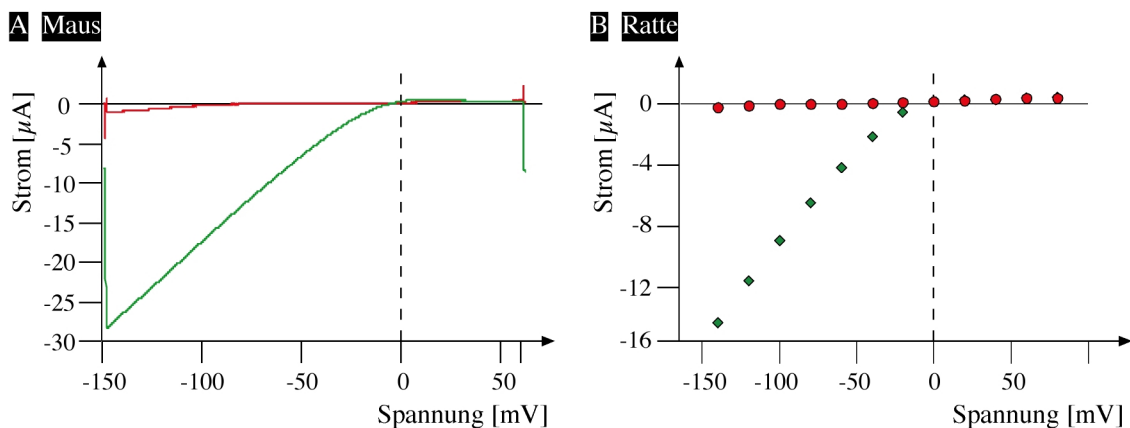
**Abb. 7** Ausschnitt aus der physikalischen Genkarte des murinen Chromosoms 7. Gezeigt ist der Bereich A bis F mit dem *Kcnj14*-Gen und vier weiteren Kaliumkanal-Genen (unten) und einem vergrößerten Ausschnitt aus dem Bereich B mit dem *Kcnj14*-Gen und seinen Nachbargenen (oben).

## 5 Ergebnisse

Die Sequenzen der kodierenden Exons fanden sich auf Chromosom 7 in der Region B2 wieder. In der aktuellsten Version 16.30.1 des Mausgenoms vom 6.5.2003 hat das *Kcnj14*-Gen die physikalische Position 34,46 Mb. Die direkt benachbarten Gene wurden identifiziert als: *Grin2D*- (korrespondierendes Protein: Glutamatrezeptor-Untereinheit 2D), *Grwd*- (*Glutamate Rich WD Repeat Protein*), *Kcnj14*-, *Cyh2-Mouse*- (Cytohesin 2) und *Sult2B1*-Gen (Hydroxysteroid-Sulfotransferase 2).

### 5.5 Elektrophysiologie des murinen Kir2.4-Kanals

Die Elektrophysiologie des Kir2.4-Kanals wurde in der Zwei-Elektroden Spannungsklemme an Oozyten von *Xenopus laevis*, denen *Kcnj14*-cRNA injiziert worden war, untersucht. Pro Oozyte wurden 30 nl cRNA-Lösung (ca. 10 ng) injiziert und die Oozyten anschließend bei Raumtemperatur in ND96-Lösung inkubiert. Nach 24 Stunden konnten sie elektrophysiologisch untersucht werden, da die Translation der cRNA bis dahin zu einer deutlichen Proteinexpression geführt hatte.



**Abb. 8** Strom-Spannungskurve des Kir2.4-Kanals der Maus (A) und der Ratte (B) in *Xenopus laevis* Oozyten bei 96 mM (grün) und 2 mM (rot) extrazellulärer Kaliumkonzentration (Die Strom-Spannungskurve der Ratte ist der Diplomarbeit von C. Töpert entnommen)

Bei niedriger (2 mM) und hoher (96 mM) Kaliumkonzentration in der extrazellulären Lösung wurde als Stimulus je eine kontinuierliche Spannungsänderung durchlaufen (-150 bis +60 mV), der resultierende Strom gemessen und gegen die angelegte Spannung aufgetragen. Unter hyperpolarisierenden Bedingungen wurde bei hoher extrazellulärer Kaliumkonzentration ein starker Strom von bis zu 28 µA gemessen. Bei

niedriger extrazellulärer Kaliumkonzentration betrug die Stromstärke nur noch 1,5  $\mu\text{A}$ . Diese Ergebnisse und die Meßdaten vom Kir2.4-Kanal der Ratte sind in Abbildung 8 dargestellt. Der murine Kir2.4-Kanal wies in Bezug auf seine Einwärtsgleichrichtung eine Charakteristik auf, wie sie schon vom Kir2.4-Kanal der Ratte bekannt war (Töpert et al., 1998).

Für den humanen Kir2.4-Kanal war eine Sensitivität gegenüber extrazellulären pH-Veränderungen beschrieben worden (Hughes et al., 2000). Entsprechende Untersuchungen am Kir2.4-Kanal der Maus zeigten jedoch erst ab einem unphysiologischen pH-Wert von 5,5 eine reversible Vergrößerung des Stroms um etwa 5 %.

### **5.6 Analyse der Proteinsequenzen**

Die Analyse der Proteinsequenzen hat die Identifizierung und Zuordnung essentieller Strukturelemente zum Ziel. Im Vergleich mit anderen bereits gut untersuchten Kir-Kanälen können Ähnlichkeiten bzw. Unterschiede weiteren Aufschluß über die Funktion des Kir2.4-Kanals liefern. Bei der Analyse sind besonders die im Verlauf der Evolution konservierten Bereiche aussagekräftig. Das trifft sowohl auf den Sequenzvergleich innerhalb der Kir-Familie zu, als auch auf den der Kir2.4-Kanäle verschiedener Spezies.

#### **5.6.1 Aminosäuresequenzvergleich der Kir2.4-Untereinheiten verschiedener Spezies**

Aus den in Kapitel 5.2.2 und 5.3.2 bestimmten Nukleotidsequenzen wurden die Aminosäuresequenzen der Kir2.4-Untereinheiten für Mensch und Maus abgeleitet und mit der Ratten- (Töpert et al., 1998) und Meerschweinchensequenz (Genbank Eintrag: AAG17050.1) verglichen und in homologer Anordnung in Abbildung 9 dargestellt.

Die Nukleotidsequenzen der kodierenden Bereiche der Kir2.4-Untereinheiten der vier Spezies unterscheiden sich nur geringfügig, und aufgrund des degenerierten genetischen Codes haben die meisten Unterschiede keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz.



## 5 Ergebnisse

HS	MGLARALRRLSGALDSGDSRAG-----DEEEAGPGLCRNGWAPAPVQSPV	45
MM	MGLARALRRLSGALEPGNSRAG-----DEEEAGAGLCRNGWAPG--PVAG	43
RN	MGLARALRRLSGALEPGNSRAG-----DEEEAGAGLCRNGWAPG--PVAG	43
CP	MGLAKALRRLSGALESGNSREGENSRPDDEEAAGPGLCRNGWAPA--QGPG	48
HS	GRRRGRFVKKDGHCNVRFVNLGGQGARYLSDLFTTCVDVRRWRMCLLFSC	95
MM	SRRRGRFVKKDGHCNVRFVNLGGQGARYLSDLFTTCVDVRRWRMCLLFSC	93
RN	NRRRGRFVKKDGHCNVRFVNLGGQGARYLSDLFTTCVDVRRWRMCLLFSC	93
CP	ARRRGRFVKKDGHCNVRFVNLGGQGARYLSDLFTTCVDVRRWRMCLLFSC	98
HS	SFLASWLLFGLAFWLIASLHGDLAAPPPPAPCFSSHVASFLAAFLFALETQ	145
MM	SFLASWLLFGLTFWLIASLHGDLAAPPPPAPCFSQVASFLAAFLFALETQ	143
RN	SFLASWLLFGLTFWLIASLHGDLAAPPPPAPCFSQVASFLAAFLFALETQ	143
CP	SFLASWLLFGLAFWLIASLHGDLAAPPPPAPCFSSHVASFLAAFLFALETQ	148
HS	TSIGYGVRSVTEECPAAVAAVVLQCIAGCVLDAFVVGAVMAKMAKPKKRN	195
MM	TSIGYGVRSVTEECPAAVAAVVLQCIAGCVLDAFVVGAVMAKMAKPKKRN	193
RN	TSIGYGVRSVTEECPAAVAAVVLQCIAGCVLDAFVVGAVMAKMAKPKKRN	193
CP	TSIGYGVRSVTEECPAAVAAVVLQCIAGCVLDAFVVGAVMAKMAKPKKRN	198
HS	ETLVFSENAVVALRDHRLCLMWRVGNLRRSHLVEAHVRAQLLQPRVTPEG	245
MM	ETLVFSENAVVALRDHRLCLMWRVGNLRRSHLVEAHVRAQLLQPRVTPEG	243
RN	ETLVFSENAVVALRDHRLCLMWRVGNLRRSHLVEAHVRAQLLQPRVTPEG	243
CP	ETLVFSENAVVALRDHRLCLMWRVGNLRRSHLVEAHVRAQLLQPRVTPEG	248
HS	EYIPLDHQDVDVGFDDGGTDRIFLVSPITIVHEIDSASPLYELGRAELARA	295
MM	EYIPLDHQDVDVGFDDGGTDRIFLVSPITIVHEIDSASPLYELGRAELARA	293
RN	EYIPLDHQDVDVGFDDGGTDRIFLVSPITIVHEIDSASPLYELGRAELARA	293
CP	EYIPLDHQDVDVGFDDGGTDRIFLVSPITIVHEIDSASPLYELGRAELARA	298
HS	DFELVVILEGMVEATAMTTQCRSSYLPGELLWGHRFEPVLFQRGSQYEVD	345
MM	DFELVVILEGMVEATAMTTQCRSSYLPGELLWGHRFEPVLFQRGSQYEVD	343
RN	DFELVVILEGMVEATAMTTQCRSSYLPGELLWGHRFEPVLFQRGSQYEVD	343
CP	DFELVVILEGMVEATAMTTQCRSSYLPGELLWGHRFEPVLFQRGSQYEVD	348
HS	YRHFHRTYEVPGTPVCSAKELDERAEQASHSLKSSFPGSLTAFICYENELA	395
MM	YRHFHRTYEVPGTPVCSAKELDERAEQASHSPKSSFPGSLTAFICYENELA	393
RN	YRHFHRTYEVPGTPVCSAKELDERAEQASHSPKSSFPGSLAAFICYENELA	393
CP	YRHFHRTYEVPGTPVCSAKELDERAEQNAHSPKSSFPGSLAAFICYENELA	398
HS	LSCCQEEDEDEDETEEGNGVETEDGAASPRVLTPTLALTLPP.	436
MM	LSCCQEEDEEEDTKEGTSAETPERAASPQALTPTLALTLPP.	434
RN	LSCCQEEDEEEDTKEGTSAETPDRAASPQALTPTLALTLPP.	434
CP	LSCCQEEDEEETKEETGAETEDGAASPRVITPTLALSLLP.	439

**Abb. 9** Homologe Anordnung der Kir2.4-Aminosäuresequenzen von Mensch (HS), Maus (MM), Ratte (RN) und Meerschweinchen (CP). Nicht-homologe Bereiche sind schwarz und die Bereiche TM1, TM2 und H5 zur Orientierung grau unterlegt.

Abgesehen von den äußeren Bereichen der Amino- und Carboxytermini ist der überwiegende Teil der Sequenzen identisch. Lediglich an drei Positionen wird der große homologe Bereich unterbrochen. Bezogen auf die Mausequenz sind dies: T105, Q128 und H209. Die Kir2.4-Proteine haben eine Länge von 434 Aminosäuren bei Maus und Ratte und, als Folge von aminoterminalen Insertionen, 436 beim Menschen und 439 beim Meerschweinchen.

### 5.6.2 Topologie der Kir2-Kanäle

Aufgrund der großen Sequenzhomologie der Kir2.4-Sequenzen mit denen der Kir2-Unterfamilie kann von einer nahezu gleichartigen Topologie der kanalbildenden Elemente ausgegangen werden. Zu diesen Elementen zählt die äußere Helix TM1 und die innere Helix TM2, sowie die Porenschleife H5, die sich aus den funktionellen Einheiten Selektionsfilter und Porenhelix zusammensetzt. In der Abbildung 10 ist die mögliche Raumstruktur eines Kir2-Kanals schematisch dargestellt.

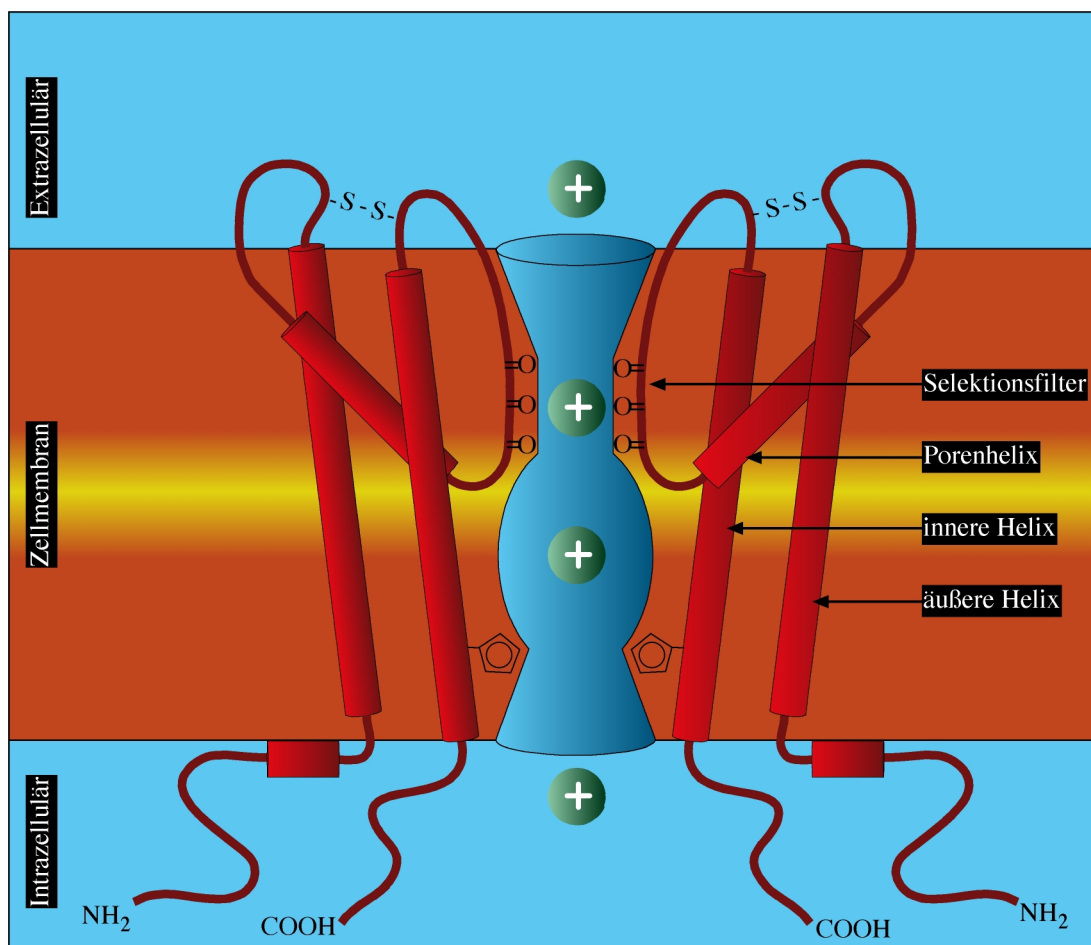


Abb. 10 Schematische Darstellung eines Kir2-Kanals modifiziert nach Kuo (Kuo et al., 2003). Zur besseren Übersicht sind nur zwei der vier kanalbildenden Untereinheiten dargestellt.

### 5.6.3 Homologievergleich innerhalb der Kir2-Unterfamilie

Eine homologe Anordnung bekannter Kir2-Aminosäuresequenzen erlaubt die Identifizierung konservierter Aminosäuren, die Einfluß auf die Kanalregulation bzw. die

## 5 Ergebnisse

HS/Kir2.1	-MGSVRTNR--YSIVSSEEDGMKLATMAVANGFGNGKSKVHTRQ---QCR	44
MM/Kir2.1	-MGSVRTNR--YSIVSSEEDGMKLATMAVANGFGNGKSKVHTRQ---QCR	44
RN/Kir2.1	-MGSVRTNR--YSIVSSEEDGMKLATMAVANGFGNGKSKVHTRQ---QCR	44
HS/Kir2.2	MTAASRANP--YSIVSSEEDGLHLVTMSGANGFGNG--KVHTRR---RCR	43
MM/Kir2.2	MTAASRANP--YSIVSSEEDGLHLVTMSGANGFGNG--KVHTRR---RCR	43
RN/Kir2.2	MTAASRANP--YSIVSSEEDGLHLVTMSGANGFGNG--KVHTRR---RCR	43
HS/Kir2.3	-----MHGHS--RNGQAHVP-RR---KRR	18
MM/Kir2.3	-----MHGHN--RNGQAHVP-RR---KRR	18
RN/Kir2.3	-----MHGHS--RNGQAHVP-RR---KRR	18
HS/Kir2.4	-MGLARALRRLSGALDSGDSRAGDEEEAGPGLCRNGWAPAPVQSPVGRRR	49
MM/Kir2.4	-MGLARALRRLSGALEPGNSRAGDEEEAGGLCRNGWAPGPVAG--SRRR	47
RN/Kir2.4	-MGLARALRRLSGALEPGNSRAGDEEEAGGLCRNGWAPGPVAG--NRRR	47

HS/Kir2.1	SRFVKKDGHCVQFINVGEKGQRYLADIFTTCVDIRRWRWMLVIFCLAFVL	94
MM/Kir2.1	SRFVKKDGHCVQFINVGEKGQRYLADIFTTCVDIRRWRWMLVIFCLAFVL	94
RN/Kir2.1	SRFVKKDGHCVQFINVGEKGQRYLADIFTTCVDIRRWRWMLVIFCLAFVL	94
HS/Kir2.2	NRFVKKNGQCNIIEFANMDEKSQRYLADMFTTCVDIRWRYMMLLIFSLAFLA	93
MM/Kir2.2	NRFVKKNGQCNIIEFANMDEKSQRYLADMFTTCVDIRWRYMMLLIFSLAFLA	93
RN/Kir2.2	NRFVKKNGQCNIIEFANMDEKSQRYLADMFTTCVDIRWRYMMLLIFSLAFLA	93
HS/Kir2.3	NRFVKKNGQCNVYFANLSNKSQRYMADIFTTCVDTRWRYMMLIFSAAFVL	68
MM/Kir2.3	NRFVKKNGQCNVYFANLSNKSQRYMADIFTTCVDTRWRYMMLIFSAAFVL	68
RN/Kir2.3	NRFVKKNGQCNVYFANLSNKSQRYMADIFTTCVDTRWRYMMLIFSAAFVL	68
HS/Kir2.4	GRFVKKDGHCVRFVNLGGQGARYLSDLEFTTCVDVRWRWMLLIFSCSFLA	99
MM/Kir2.4	GRFVKKDGHCVRFVNLGGQGARYLSDLEFTTCVDVRWRWMLLIFSCSFLA	97
RN/Kir2.4	GRFVKKDGHCVRFVNLGGQGARYLSDLEFTTCVDVRWRWMLLIFSCSFLA	97

HS/Kir2.1	SWLFFGCVFWLIALLHGDL	DAS-----KEGKACVSEV	126
MM/Kir2.1	SWLFFGCVFWLIALLHGDL	DTS-----KVSKACVSEV	126
RN/Kir2.1	SWLFFGCVFWLIALLHGDL	DAS-----KESKACVSEV	126
HS/Kir2.2	SWLFFGIIFWVIAVAHGDL	EPAEG-----RGRTPCVMQV	127
MM/Kir2.2	SWLFFGIIFWVIAVAHGDL	EPAEG-----RGRTPCVLQV	127
RN/Kir2.2	SWLFFGIIFWVIAVAHGDL	EPAEG-----RGRTPCVLQV	127
HS/Kir2.3	SWLFFGLLFWCIAFFHGDL	EASPGVPAAGGPAAGGGGAAPVAPKPCIMHV	118
MM/Kir2.3	SWLFFGLLFWCIAFFHGDL	EASPSVPAAGGPGGNGG-ASPNAKPCIMHV	117
RN/Kir2.3	SWLFFGLLFWCIAFFHGDL	EPSPSGPTAGGPGGNGGGAAPTAAPKPCIMHV	118
HS/Kir2.4	SWLFFGLAFWLIASLHGDL	-----AAPPFPAPCFSHV	131
MM/Kir2.4	SWLFFGLTFWLIASLHGDL	-----AAPPFPAPCFSQV	129
RN/Kir2.4	SWLFFGLTFWLIASLHGDL	-----AAPPFPAPCFSQV	129

HS/Kir2.1	NSFTAFLFSIETQTTIGYGFRCVTEDECP	IAVFMVVFQSI	IVGCIIDAFII	176
MM/Kir2.1	NSFTAFLFSIETQTTIGYGFRCVTEDECP	IAVFMVVFQSI	IVGCIIDAFII	176
RN/Kir2.1	NSFTAFLFSIETQTTIGYGFRCVTEDECP	IAVFMVVFQSI	IVGCIIDAFII	176
HS/Kir2.2	HGFMAFLFSIETQTTIGYGLRCVTEEC	PVAVFMVVAQSI	IVGCIIDAFII	177
MM/Kir2.2	HGFMAFLFSIETQTTIGYGLRCVTEEC	PVAVFMVVAQSI	IVGCIIDAFII	177
RN/Kir2.2	HGFMAFLFSIETQTTIGYGLRCVTEEC	PVAVFMVVAQSI	IVGCIIDAFII	177
HS/Kir2.3	NGFLGAFVSVETQTTIGYGFRCVTEEC	PLAVIAVVVQSI	IVGVIDSFMI	168
MM/Kir2.3	NGFLGAFVSVETQTTIGYGFRCVTEEC	PLAVIAVVVQSI	IVGVIDSFMI	167
RN/Kir2.3	NGFLGAFVSVETQTTIGYGFRCVTEEC	PLAVIAVVVQSI	IVGVIDSFMI	168
HS/Kir2.4	ASFLAFLFALETQTSIGYGVRSVTEEC	PAVAAVVLQCI	AGCVLDAFVV	181
MM/Kir2.4	ASFLAFLFALETQTSIGYGVRSVTEEC	PAVAAVVLQCI	AGCVLDAFVV	179
RN/Kir2.4	ASFLAFLFALETQTSIGYGVRSVTEEC	PAVAAVVLQCI	AGCVLDAFVV	179

HS/Kir2.1	GAVMAKMAKPKKRNETLVFSHNAVIAMRDGKL	CLMWRVGNLRKSHLVEAH	226
MM/Kir2.1	GAVMAKMAKPKKRNETLVFSHNAVIAMRDGKL	CLMWRVGNLRKSHLVEAH	226
RN/Kir2.1	GAVMAKMAKPKKRNETLVFSHNAVIAMRDGKL	CLMWRVGNLRKSHLVEAH	226
HS/Kir2.2	GAIMAKMARPKKRAQTLLFSHNAVVALRDGKL	CLMWRVGNLRKSHIVEAH	227
MM/Kir2.2	GAIMAKMARPKKRAQTLLFSHNAVVALRDGKL	CLMWRVGNLRKSHIVEAH	227
RN/Kir2.2	GAIMAKMARPKKRAQTLLFSHNAVVALRDGKL	CLMWRVGNLRKSHIVEAH	227
HS/Kir2.3	GTIMAKMARPKKRAQTLLFSHNAVISVRDGL	CLMWRVGNLRKSHIVEAH	218
MM/Kir2.3	GTIMAKMARPKKRAQTLLFSHNAVISVRDGL	CLMWRVGNLRKSHIVEAH	217
RN/Kir2.3	GTIMAKMARPKKRAQTLLFSHNAVISVRDGL	CLMWRVGNLRKSHIVEAH	218
HS/Kir2.4	GAVMAKMAKPKKRNETLVFSENAVVALRDHRL	CLMWRVGNLRRSHLVEAH	231
MM/Kir2.4	GAVMAKMAKPKKRNETLVFSENAVVALRDHRL	CLMWRVGNLRRSHLVEAH	229
RN/Kir2.4	GAVMAKMAKPKKRNETLVFSENAVVALRDHRL	CLMWRVGNLRRSHLVEAH	229





**Abb. 11** Homologe Anordnung der Kir2-Aminosäuresequenzen von Mensch (HS), Maus (MM) und Ratte (RN). Nicht-homologe Bereiche sind schwarz unterlegt. Sequenzen mit bekannter Funktion sind beginnend am Aminoterminus durchnummeriert, farbig gekennzeichnet und werden im Text erläutert. Die Nummern sind dort in eckige Klammern gesetzt. Kir2.4 spezifische Unterschiede, auf die im Text Bezug genommen wird, sind gelb gedruckt.

Ausbildung der nativen Struktur dieser Proteine haben. Zur weiteren Charakterisierung der Kir2.4-Untereinheit wurden die Aminosäuresequenzen aller Kir2-Kanäle von Mensch, Maus und Ratte miteinander verglichen. Im folgenden Text beziehen sich die Bezeichnungen von Aminosäurepositionen, soweit nicht anders vermerkt, auf die Sequenz der murinen Kir2.4-Untereinheit und die Ziffern in eckigen Klammern auf die Nummerierung in Abbildung 11.

Alle unter 5.6.3.1 und 5.6.3.2 beschriebenen Sequenzkonservierungen werden beim Vergleich auch in den Kir2.4-Sequenzen gefunden.

### 5.6.3.1 Kir-typische Aminosäuren

Einige Motive sind nicht nur bei den Vertretern der Kir2-Unterfamilie konserviert, sondern finden sich auch in allen übrigen Kir-Kanälen. Dazu gehört das Kaliumkanal-typische GYG-Motiv [6] in der Porenschleife H5 [5]. Dieses Sequenzmotiv dient der Ionenselektivität und wird in allen Kir-Kanälen durch die Aminosäuren E141 und R151 [4, 7], die eine intramolekulare Salzbrücke ausbilden, in der Raumstruktur stabilisiert (Yang et al., 1997). Zwei weitere Aminosäuren in der Porenschleife sind nicht nur auf die Kir2-Unterfamilie beschränkt, sondern auch in allen anderen Kir-Kanälen stark konserviert. Es handelt sich dabei um die beiden Cysteine C125 und C157 [3, 8], die flankierend zum Selektionsfilter lokalisiert sind. Sie bilden eine intramolekulare Disulfidbrücke und werden als essentiell für die korrekte Proteinfaltung angesehen (Leyland et al., 1999; Cho et al., 2000). Die Kir2.4-Kanäle enthalten wie alle anderen Kir-Kanäle mit Ausnahme der Kir6-Unterfamilie ein Phenylalanin an Position 177 [11], das nach Kuo (Kuo et al., 2003) beim Schließen der Pore eine entscheidende Rolle spielt.

### 5.6.3.2 Kir2-typische Sequenzmotive

Die in der Kir2-Unterfamilie hoch konservierten Aminosäuren D175, E227 und E302 [10, 15, 18] sind für die Gleichrichtung des Ionendurchstroms notwendig. Geladene Aminosäuren in diesen Positionen machen die typischerweise starke Gleichrichtung der Kir2-Unterfamilie aus (Lu & MacKinnon, 1994; Kubo & Murata, 2001).

Das FCYENE-Motiv (Aminosäuren 386 - 391) [22] im Carboxyterminus ist bei allen Vertretern der Kir2-Unterfamilie stark konserviert. Es wird als Exportsignal für die Kir2-Kanäle aus dem endoplasmatischen Retikulum im Anschluss an die korrekte Faltung und Assemblierung der Proteinuntereinheiten angesehen (Ma et al., 2001; Stockklausner et al., 2001).

In den amino- und carboxyterminalen Bereichen der Kir2-Unterfamilie befinden sich weitgehend konservierte Sequenzen (R47 - F61; K185 - N219; H229 - P237; A293 - G337) [1, 13, 16, 19], von denen angenommen wird, daß sie bei der Assemblierung der Untereinheiten zum funktionellen Kanal eine entscheidende Rolle spielen. Vermutlich interagiert dabei das aminoternale Motiv der einen Kanaluntereinheit mit einem carboxyterminalen Motiv der anderen Untereinheit (Tucker & Ashcroft, 1999; Jones et al., 2001).

Die langen, zum Teil hoch konservierten Sequenzbereiche im Carboxyterminus (V178 - L211; C212 - D249; R328 - A368) [12, 14, 20] werden als regulatorische Phosphoinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>)-Bindungsstellen angesehen. Beim Vergleich dieser PIP<sub>2</sub>-Bindungsmotive in den murinen Kir2.1- und Kir2.4-Untereinheiten findet man mehr als 80% Sequenzübereinstimmung (Soom et al., 2001).

Ebenfalls im carboxyterminalen Bereich liegt die zwischen den Spezies der Kir2.4-Untereinheiten vollständig und in der Kir2-Unterfamilie weitgehend konservierte einzige Tyrosinkinase-Phosphorylierungsstelle Y245 [17] der Kir2-Unterfamilie (Wischmeyer et al., 1998).

### 5.6.3.3 Kir2.4 spezifische Sequenzmotive

Die im folgenden besprochenen Kir2.4-spezifischen Unterschiede sind in der Abbildung 11 gelb gedruckt. Im carboxyterminalen Bereich der Kir2.4-Untereinheit befinden sich drei Proteinkinase C-Phosphorylierungsstellen. In der humanen Sequenz befindet sich eine weitere putative Proteinkinase C-Phosphorylierungsstelle (SPR) 14 Aminosäuren

vor dem carboxyterminalen Ende. Das zweite Motiv SAK/R (Aminosäuren 360 - 362) [21] ist in allen Kir2-Untereinheiten konserviert. Die erste TDR (Aminosäuren 261 - 263) und dritte Proteinkinase C-Phosphorylierungsstelle SP/LK (Aminosäuren 374 - 377) hingegen kommen nur in den Kir2.4-Untereinheiten und die vierte nur in der humanen Untereinheit des Kir2.4 vor.

In allen bisher bekannte Kir2.4-Proteinsequenzen fehlt das aus den letzten fünf Aminosäuren des Carboxyterminus bestehende, in den übrigen Kir2-Kanälen streng konservierte Motiv RESA/EI. Dieses Pentapeptid stellt vermutlich ein regulierbares Protein-Interaktionsmotiv dar (PDZ-Bindungsstelle und Proteinkinase A-Phosphorylierungsstelle). Daher wird angenommen, daß dieser Sequenzbereich für die Regulation essentiell ist.

Die Kir2.4-Untereinheit enthält im nicht-konservierten Bereich des Aminoterminus eine Proteinkinase A-Phosphorylierungsstelle RLS (Aminosäuren 9 - 11), die eine ähnliche Funktion ausüben könnte.

In der Aminosäuresequenz des Kir2.3 wird ein Histidin (H116 in der Kir2.3-Maussequenz) für die extrazelluläre pH-Sensitivität verantwortlich gemacht (Coulter et al., 1995; Qu et al., 1999). Die Kir2.4-Proteinsequenzen des Menschen und des Meerschweinchens, sowie alle Kir2.2-Proteine enthalten an vergleichbarer Position zwischen TM1 und H5 ebenfalls ein Histidin. In der Maus- und Rattensequenz fehlt ein entsprechendes Äquivalent. Dieser Befund entspricht der fehlenden physiologischen pH-Sensitivität, wie sie im Abschnitt 5.5 beschrieben wurde.

Die Bedeutung der Kir2.4-spezifischen Sequenz AAPPPPAP (Aminosäuren 117 - 124), eines putativen extrazellulären Interaktionsmotivs, wird in der Diskussion behandelt.

### **5.7 Identifizierung potentiell relevanter Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren**

Die spezifische Expression eines Gens im Gewebe wird unter anderem über die Transkriptionskontrolle erreicht. Die Transkription wird über die Bindung mehrerer Transkriptionsfaktoren an die DNA reguliert. Die Summe dieser Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen auf der DNA bezeichnet man als Promotorregion.

### **5.7.1 Homologievergleich nicht-kodierender genomischer Abschnitte verschiedener Spezies**

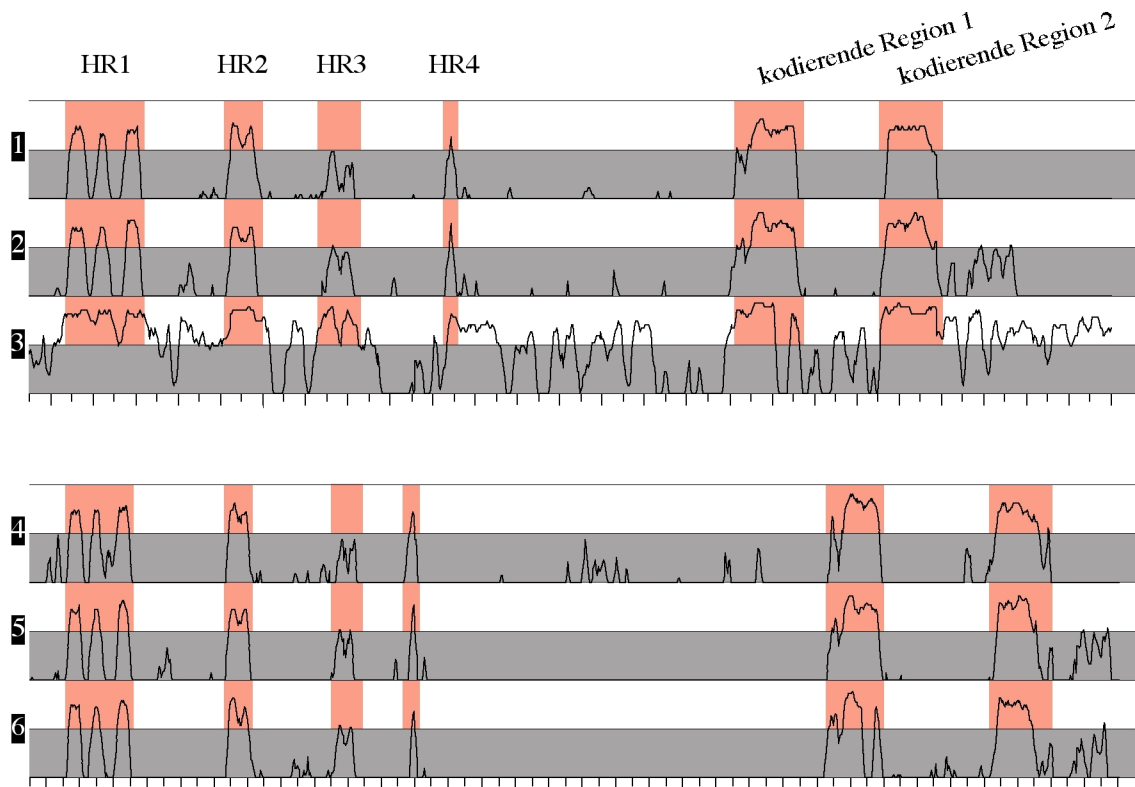
Mit den im Verlauf dieser Arbeit gewonnenen Informationen zur Struktur des *KCNJ14*-Gens und ergänzenden, über Datenbanken verfügbaren, genomischen Sequenzen aus vier Spezies (Mensch, Maus, Ratte, Meerschweinchen) wurde eine Computer-gestützte Suche (Frazer et al., 2003) nach der Promotoregion des *KCNJ14*-Gens unter folgenden Annahmen durchgeführt:

- Kodierende und regulatorische Sequenzbereiche eines bestimmten Gens sind zwischen verschiedenen Spezies stark konserviert. Daher sollten auch die Transkriptionsfaktor-Bindungssequenzen der Promotorregionen über die Spezies-grenzen konserviert sein (Hardison et al., 1997).
- Die Wahrscheinlichkeit, daß sich eine bestimmte Bindungsstelle in vier Spezies im Verlauf der Evolution zufällig an der gleichen Position im Genom erhalten hat, ist sehr gering (Gumucio et al., 1996; Dubchak et al., 2000). Deshalb sind Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, die bei entfernt verwandten Spezies konserviert und an gleicher Stelle positioniert sind, besonders relevant.

Zuerst wurden die vollständigen *KCNJ14*-Sequenzen verschiedener Spezies, einschließlich ihrer flankierenden Bereiche mit dem Programm mVista (Mayor et al., 2000) auf homologe Regionen untersucht. Im einzelnen wurden die Sequenzen von Meerschweinchen, Mensch und Ratte mit der Sequenz der Maus verglichen und die Sequenzen von Meerschweinchen, Maus und Ratte mit der Sequenz des Menschen verglichen. Auf diese Weise wurden die homologen Regionen aus den Vergleichen zwischen Maus und Meerschweinchen, Maus und Mensch, Maus und Ratte, Mensch und Meerschweinchen und Mensch und Ratte identifiziert. Bereiche wurden dann als homolog angesehen, wenn sie eine größere Homologie als 75 % bezogen auf Sequenzabschnitte von 100 bp, bei einer Schrittlänge von 15 bp, aufwiesen.

Neben den beiden Exons, die den kodierenden Teil des *KCNJ14*-Gens enthalten, fanden sich vier weitere stark konservierte Regionen. Zwei dieser Homologie-Regionen (HR) lagen 5' zum ersten Exon bezogen auf das murine Gen und hatten Ausdehnungen von 1020 bp (HR1) und 360 bp (HR2). Die dritte Homologie-Region (HR3) war 250 bp lang und enthält beide Transkriptionsstartpunkte des murinen *KCNJ14*-Gens. Die 120 bp lange, vierte Homologie-Region (HR4) liegt im Gen der Maus im ersten Intron, im humanen Gen hingegen enthält sie den Transkriptionsstart für die mRNA 1.





**Abb. 12** Homologievergleich zwischen *KCNJ14*-Sequenzen verschiedener Spezies. Die homologen Bereiche HR1 bis HR4 und die kodierenden Regionen sind orange unterlegt. Sequenzvergleich: Maus/Meerschweinchen (1), Maus/Mensch (2), Maus/Ratte (3), Mensch/Meerschweinchen (4), Mensch/Maus (5) und Mensch/Ratte (6). Ein Teilstrich entspricht 250 bp.

Alle homologen Regionen wurden einzeln und für jede Spezies separat auf Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen mit dem Programm MatInspector (Quandt et al., 1995) untersucht. In der HR1 fanden sich je nach Spezies zwischen 103 und 127 putative Bindungsmotive und für die HR2 wurden 39 bis 48 mögliche Bindungsmotive identifiziert. In den beiden homologen Regionen HR3 und HR4 wurden 20 bis 33 bzw. 17 bis 23 putative Bindungsmotive gefunden.

### **5.7.2 Eingrenzung auf potentiell relevante Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive**

Unter der in 5.7.1 beschriebenen zweiten Annahme, daß Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, die sich an der gleichen Position im Genom verschiedener Spezies erhalten haben, besonders relevant sind, läßt sich die Anzahl der gefundenen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen stark reduzieren. In der Tabelle 2 sind die Transkriptionsfaktoren aufgeführt, deren Bindungsstelle sich an der gleichen Stelle im Genom aller vier untersuchten Spezies befindet.

HR1	HR2	HR3	HR4
CLOX/CDPCR3	PAX6/PAX6	MAZF/MAZR	LEFF/LEF1
EBOX/SREBP	RARF/RAR	ZBPF/ZBP89	TALE/TGIF
ETSF/ETS1	RXRf/VDR_RXR		TBPF/TATA
HAML/AML1	SMAD/SMAD3		SRFF/SRF
HMTB/MTBF			OCT1/OCT1
HNF4/HNF4			FKHD/FREAC4
MZF1/MZF1			
RBPF/RBPJK			
REBV/EBVR			

**Tabelle 2** Potenziell relevante Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive der Homologie-Regionen des *KCNJ14*-Gens.

## **5.8 Knock-out-Modell**

Eine Möglichkeit, die Funktion eines Gens im Organismus aufzuklären, besteht in der Etablierung eines Mausmodells, das defizient für das entsprechende Gen ist. Aus dem Phänotyp einer solchen Knock-out-Maus können Rückschlüsse auf einen Genausfall beim Menschen und die daraus resultierenden Krankheiten gezogen werden.

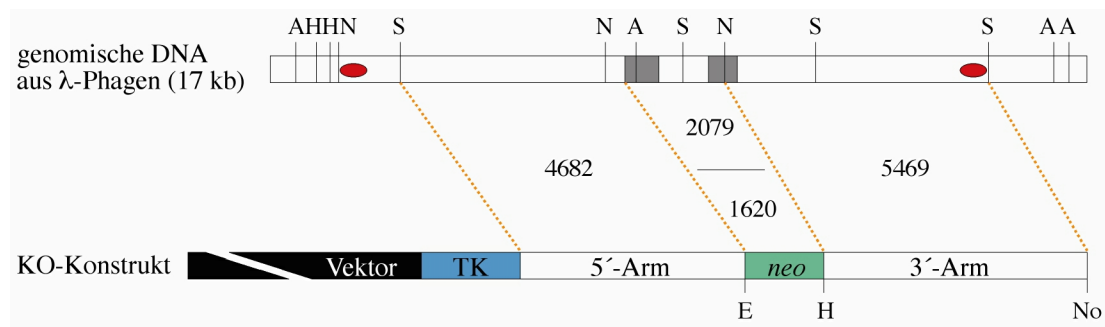
Die Deletion eines Gens in der Maus wird experimentell durch homologe Rekombination eines genomischen DNA-Konstrukts, dem die zu deletierenden genomischen Bereiche fehlen, mit dem Wildtyp-Genom einer embryonalen Stammzelle erreicht. Die Deletion kann sich dabei entweder auf eine kurze, funktionell essentielle Sequenz beschränken oder auf einen langen Exon- und Intron-einschließenden Abschnitt ausgeweitet werden.

### **5.8.1 Restriktionskartierung des murinen *Kcnj14*-Gens**

Es ist notwendig möglichst viele verschiedene Restriktionsschnittstellen in der genomischen DNA zu kartieren, um das Knock-out-Konstrukt später klonieren zu können.

## 5 Ergebnisse

Wie bereits in Abschnitt 5.3.1 beschrieben, war ein genomisches DNA-Fragment der Maus aus einer genomischen  $\lambda$ -Phagenbibliothek isoliert und partiell sequenziert worden. Dieses Fragment wurde mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespalten und die Schnittstellen geeigneter Enzyme kartiert. Die Ergebnisse der Restriktionskartierung sind in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abb. 13** Restriktionskarte des genomischen Mausklons und Klonierungsschema des Rekombinationskonstrukts. Die für die Klonierung relevanten Restriktionsschnittstellen *SacI* (S), *NdeI* (N), *HindIII* (H), *NotI* (No), *EcoRI* (E), *AflIII* (A) sind gekennzeichnet. Die Positionen der Sonden für den Nachweis der homologen Rekombination sind durch rote Ellipsen markiert. Die kodierenden Bereiche für das Kir2.4-Protein (grau), für die Neomycinresistenz (grün) und die Thymidinkinase (blau), sowie der Bereich des pKO 1908 Scrambler Vektors (schwarz) sind farbig unterlegt. Die Zahlen geben die Längen der Abschnitte in Basenpaaren an.

### 5.8.2 Konstrukt für die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen

Auf der Grundlage der Restriktionskarte wurde eine Klonierungsstrategie für das Knock-out-Konstrukt entwickelt. Dabei war zu berücksichtigen, daß neben der Deletion noch zwei Selektionskassetten eingebracht werden mußten. Außerdem war es notwendig, Nachweisstrategien zu entwickeln, um die entstehenden embryonalen Stammzellen auf die korrekte homologe Rekombination des Konstrukts hin überprüfen zu können.

Die Klonierungsstrategie sah vor, den kodierenden Anteil des Exon 2, das folgende Intron und weitere 349 bp kodierender Sequenz aus dem Exon 3 gegen ein Neomycin-Resistenz-Gen (*neo*) auszutauschen. Für die Klonierung des Rekombinationskonstruktes wurden aus Wildtyp-DNA etwa 4,7 kb 5' von der zukünftigen Deletion und knapp 5,5 kb 3' davon isoliert. Diese beiden Arme wurden in einen pKO 1908 Scrambler Vektor kloniert, so daß sie die *neo*-Kassette flankierten und sich ein Thymidinkinase-Gen (TK) stromaufwärts vom 5'-homologen Arm befand (Abbildung 13).

### **5.8.3 Nachweisstrategie einer korrekten homologen Rekombination**

Für den Nachweis eines erfolgreichen homologen Rekombinationsereignisses wurden zwei Sonden etabliert:

Die erste Sonde (5'-externe Sonde) hatte eine Länge von 480 bp. Sie war homolog zu einem Bereich, der sich 5' außerhalb des 5'-Arms befand. Auf einem *Hind*III-Southern-Blot detektierte die <sup>32</sup>P-markierte Sonde ein etwa 24 kb großes Fragment genomischer Wildtyp-DNA. Für den Fall einer homologen Rekombination des Knock-out-Konstrukts in das Mausgenom wurde für das entsprechende Allel der Nachweis eines 8,5 kb großen Fragments mit dieser Sonde erwartet.

Die zweite Sonde (3'-interne Sonde) hatte eine Länge von 550 bp und war homolog zum 3'-Ende des 3'-Arms. Mit dieser radioaktiv markierten Sonde wurde auf einem *Afl*III-Southern-Blot ein 8,7 kb Fragment genomischer Wildtyp-DNA spezifisch nachgewiesen. Im Falle einer korrekten Rekombination hätte die Sonde ein 15,8 kb Fragment detektiert. Mit einer *neo*-spezifischen Sonde hätte man das gleiche Fragment nachweisen können, sofern das Rekombinationkonstrukt an der richtigen Position in das Genom integriert worden wäre. Mit der *neo*-Sonde war es außerdem möglich, eine Mehrfachintegration des Konstrukts zu erkennen.

### **5.8.4 Elektroporation & Selektion der embryonalen Stammzellen**

Das linearisierte Rekombinationskonstrukt wurde mittels Elektroporation in die embryonale Stammzelllinie MPI-II (Abteilung Molekulare Zellbiologie, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) eingebracht. Die Zellen wurden kultiviert und dabei den positiven und negativen Selektionsbedingungen ausgesetzt. Durch Zugabe von Neomycin wurden die Zellen eliminiert, die das Konstrukt nicht integriert hatten. Die Zellen, die das Konstrukt nicht über eine homologe Rekombination, sondern über eine zufällige Integration ins Genom aufgenommen hatten, enthielten die TK-Kassette. Die in diesen Zellen synthetisierte Thymidinkinase wandelt hinzugefügtes Gancyclovir in ein aktives Zytostatikum um, das die Zellen abtötet. Die verbliebenen Zellen wurden vereinzelt, vermehrt und in zwei Aliquote pro Klon aufgeteilt. Ein Aliquot wurde benutzt, um die korrekte homologe Rekombination nachzuweisen. Das andere wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, um im Falle einer

korrekten Integration des Konstrukts in das Genom für die Morula-Aggregation zur Verfügung zu stehen (Mansouri, 1998).

### **5.8.5 Nachweis der korrekten Integration des Rekombinationskonstrukts in das ES-Zellgenom**

Nach der Selektion blieben 222 individuelle ES-Zellklone übrig, die einzeln auf korrekte Integration des Rekombinationskonstrukts in das ES-Zellgenom überprüft wurden.

Zuerst wurden alle Klone mittels PCR auf die *neo*-Kassette hin überprüft. Anschließend wurden die Klone mit der *neo*-Sonde auf Integrität des Konstrukts im Genom und mögliche Mehrfachintegrationen hin untersucht. Auf einem *AfIII*-Southern-Blot zeigte sich, daß sehr wenige korrekte Integrationen stattgefunden hatten, die immer gemeinsam mit Mehrfachintegrationen auftraten. Untersuchungen mit der 3'-internen Sonde an einem weiteren *AfIII*-Southern-Blot bestätigten diese Daten. Die 8,7 kb Wildtyp-Bande wurde immer, das 15,8 kb Fragment des Knock-out-Allels dagegen nur selten nachgewiesen. Außerdem trat das erwünschte 15,8 kb Fragment immer in Verbindung mit weiteren Fragmenten auf. Abschließend wurden alle Klone durch Experimente mit einem *HindIII*-Southern-Blot überprüft. Neben der in allen Klonen auftretenden 24 kb Wildtyp-Bande wurde vereinzelt die erwartete 8,5 kb Bande des Knock-out-Allels detektiert.

Die Auswertung dieser Versuche ergab, daß das Konstrukt in alle 222 ES-Klone mindestens einmal und in einige mehrfach integriert worden war. Nur in wenigen Fällen hatte sich das Konstrukt mit dem korrekten genomischen Locus rekombiniert und war in allen diesen Fällen noch zusätzlich in einen weiteren Locus integriert worden. Da die Konsequenzen einer Mehrfachintegration für den Phänotyp der Knock-out-Maus nicht absehbar waren, wurden alle 222 ES-Klone verworfen.

### **5.8.6 Abbruch des Knock-out-Projekts**

Vor einer Wiederholung der Elektroporation wurde eine Datenbankrecherche durchgeführt. Da die genomische NCBI-Mausdatenbank im Jahr 2000 noch sehr große Lücken aufwies, wurde die Recherche in der kommerziellen Datenbank der Firma

Celera-Genomics (Rockville, USA) durchgeführt. Diese Datenbanksuche erbrachte Hinweise auf eine Duplikation des *Kcnj14*-Gens im Mausgenom.

Für das Knock-out-Projekt bedeutete die Existenz dieser Genkopie eine unerwartete Komplikation und mögliche Erklärung für die Mehrfachintegrationen. Es mußte damit gerechnet werden, daß das Knock-out-Konstrukt in beide Genloci mit ähnlich großer Wahrscheinlichkeit integriert wird. Dadurch hatten sich die Chancen für eine einzelne und korrekte Integration deutlich verschlechtert. Außerdem konnte der Nachweis einer Integration in den korrekten Genlokus nicht mehr mit absoluter Sicherheit geführt werden, da die Sequenzinformationen nur eine schlechte Voraussage bezüglich der Ähnlichkeit der Genloci zuließen.

Eine Wiederholung der Elektroporation mit dem gleichen Konstrukt wäre daher nicht erfolgversprechend gewesen. Die Modifikation des Konstrukts mit dem Ziel, eine selektive Rekombination im gewünschten Genlokus zu erreichen, war aufgrund der wenigen und nicht verlässlichen Sequenzinformation der Genkopie ohne vorherige Untersuchungen nicht möglich. Es konnte außerdem nicht ausgeschlossen werden, daß die Genkopie ebenfalls eine Kir2.4-Kanaluntereinheit exprimiert und auf diese Weise die Ausprägung des erwünschten Knock-out-Phänotyps verhindert. Aus diesen Gründen wurde das Knock-out-Projekt nicht weiter verfolgt. Es folgte eine eingehende Untersuchung der Genkopie, deren Ergebnis unter 5.11 beschrieben wird.

### **5.9 *Kcnj14*-Genexpressionsanalyse der Maus**

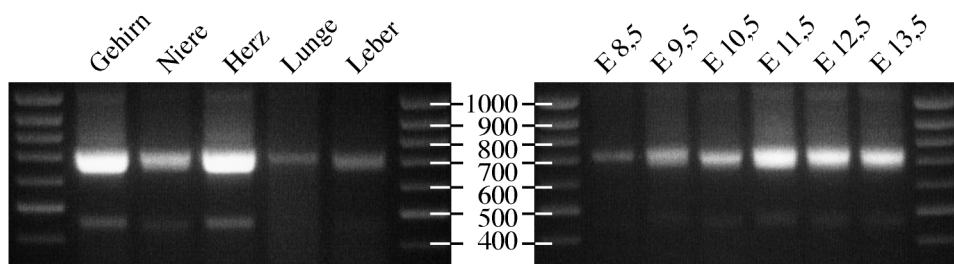
Abgesehen von Genen, die der Grundversorgung der Zelle dienen (*house-keeping genes*), ist die Expression eines Gens gewebsspezifisch und abhängig vom Entwicklungsstadium, sowie dem Aktivitätszustand der einzelnen Zelle. Damit wird das Expressionsmuster eines Gens zum Indikator für die gewebes- und entwicklungsstadienspezifische Funktion des korrespondierenden Proteins.

Die Expression des *Kcnj14*-Gens wurde mit zwei Verfahren bestimmt: Erstens durch RT-PCR-Experimente mit mRNA verschiedener Gewebe und embryonaler Stadien, zweitens histologisch durch *in situ*-Hybridisierungen mit einer geeigneten Sonde.

### 5.9.1 RT-PCR-Studien

Um die Spezifität der RT-PCR-Experimente sicherzustellen, wurde ein Primerpaar gewählt, das in Sequenzbereichen niedriger Homologie zu anderen Kir-Kanälen an die murine *Kcnj14*-mRNA bindet. Eine Verunreinigung der präparierten mRNA mit genomischer DNA war nicht mit Sicherheit auszuschließen, daher wurde der zu amplifizierende Bereich so gewählt, daß er über die Position einer Introninsertion hinwegreichte. Unter diesen Bedingungen würde, mit genomischer DNA als Vorlage, ein rund 1,2 kb größeres PCR-Produkt als das gewünschte entstehen, da das Intron ebenfalls amplifiziert werden würde (siehe Anhang, Primer *m ATG s* und *m Intron as*). Eine Unterscheidung auf dem Agarosegel ist daher problemlos möglich.

Die mRNA wurde aus adulten Mausorganen (Gehirn, Niere, Herz, Lunge und Leber) und murinen Embryos der Entwicklungsstadien E8,5; E9,5; E10,5; E11,5; E12,5; E13,5 isoliert und in separaten RT-PCR-Ansätzen eingesetzt. Die Amplifikationsprodukte wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt.



**Abb. 14** Gelelektrophorese der RT-PCR-Ergebnisse von adulten Mausorganen und murinen Embryos verschiedener Entwicklungsstadien.

#### 5.9.1.1 Expression in adulten Mausorganen

Auf dem Gel ist deutlich zu erkennen, daß das *Kcnj14*-Gen in allen untersuchten Organen exprimiert wird. Im Gehirn, Niere und Herzen ist die Expression deutlich stärker, als in Lunge und Leber.

#### 5.9.1.2 Expression in Mausembryonen verschiedener Entwicklungsstadien

In der mRNA aller untersuchten embryonalen Stadien fanden sich *Kcnj14*-Transkripte. Eine Quantifizierung der Ergebnisse ist nicht möglich, da für die mRNA-Isolierung in

den frühen Stadien mehr Embryonen eingesetzt wurden, als in den älteren Stadien, bei denen bereits die mRNA eines Embryos für die Analyse ausreichte.

### **5.9.2      *in situ*-Hybridisierung**

Bei den verschiedenen Varianten der *in situ*-Hybridisierung wird immer mit einer für die mRNA des Zielgens spezifischen RNA-Sonde nach einer zellulären Expression gesucht. Die Zellen, in denen das Zielgen transkribiert wird, werden durch die Sonde markiert, die dann ihrerseits indirekt nachgewiesen wird.

Die Expression des *Kcnj14*-Gens im Verlauf der Embryogenese wurde ab Tag 9,5 nach der Befruchtung der Eizelle (E9,5) bis E14,0 mit verschiedenen *in situ*-Techniken untersucht.

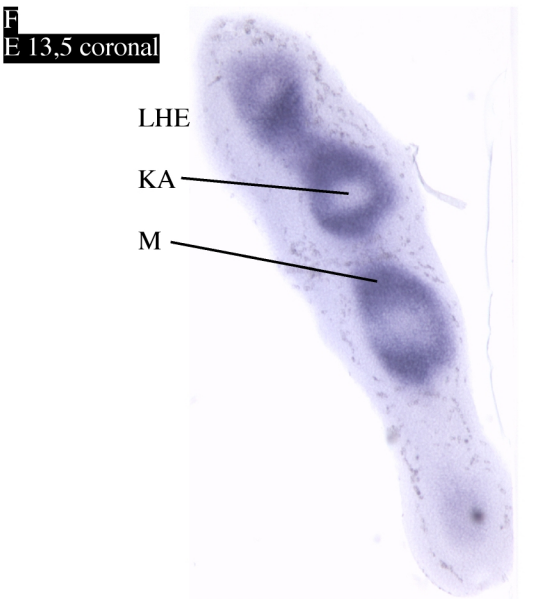
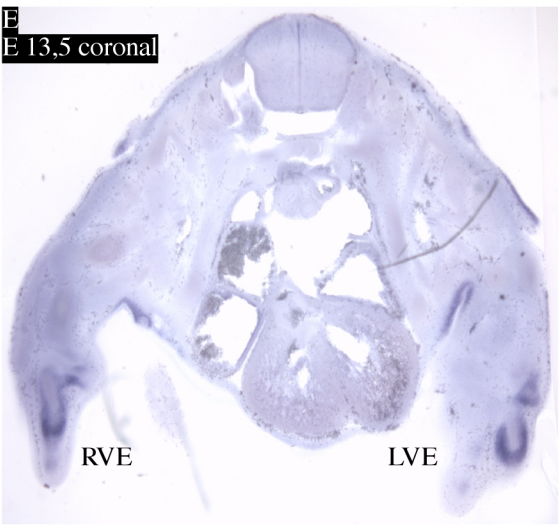
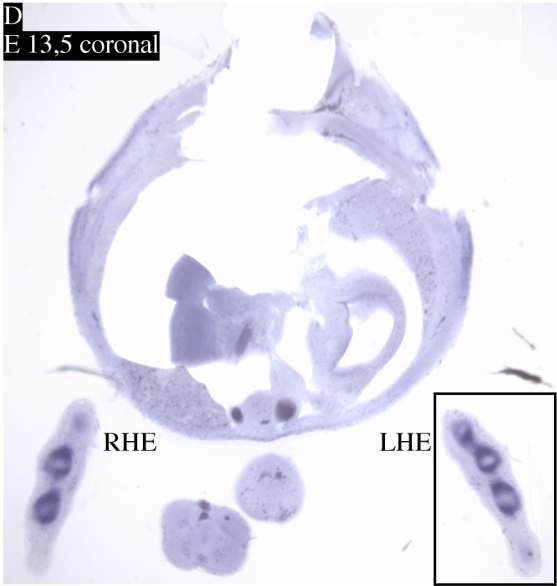
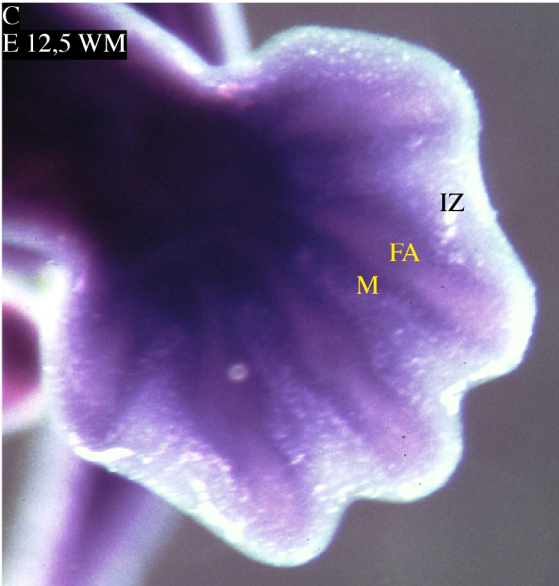
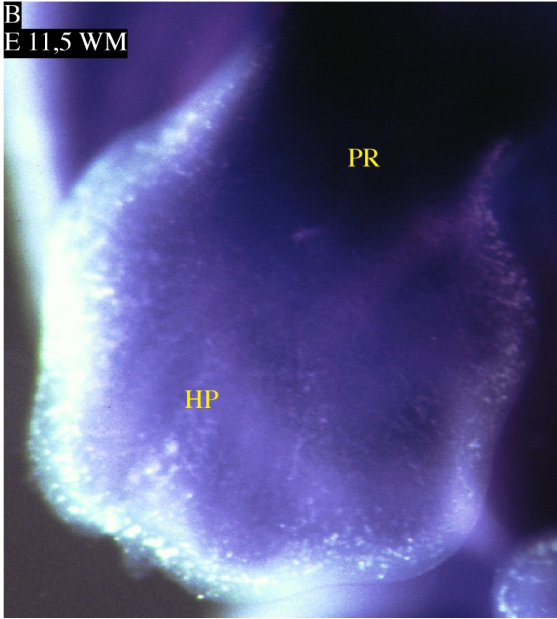
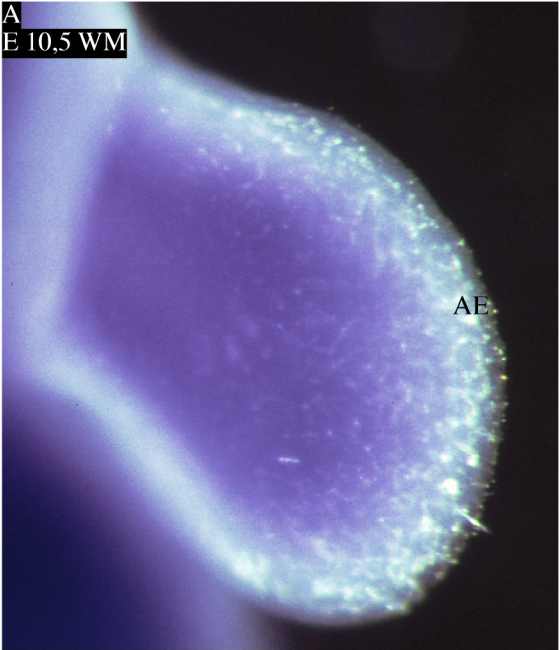
#### **5.9.2.1      Auswahl spezifischer *in situ*-Sonden**

Für den Nachweis der *Kcnj14*-mRNA wurde aus beiden untranslatierten Regionen Sonden (Sonde 5'-UTR: 401 bp; Sonde 3'-UTR: 404 bp) generiert und im *whole mount*-Experiment getestet. Bei dieser *in situ*-Variante wird der intakte Embryo in entsprechenden Lösungen inkubiert. Wegen der verhältnismäßig schlechten Permeation des intakten Embryos, ist diese Methode stark anfällig für eine hohe Hintergrundfärbung. Die Sonde aus der 3'-untranslatierten Region erwies sich als besser geeignet, obgleich sie erst nach einer Inkubation von mehr als 24 Stunden ein Signal zeigte und in dieser Zeit der Farbhintergrund zunahm.

#### **5.9.2.2      Expression in den Extremitäten**

In der embryonalen Entwicklung der Maus bilden sich ab der zweiten Hälfte des 9. Tages nach der Befruchtung der Eizelle (E9,5) zuerst die Ansätze der Vorderextremitäten aus. Einen Tag später (E10,5) sind auch die Ansätze der Hinterextremitäten gut sichtbar. Bei den Vorderextremitäten ist deutlich der Verlauf des apikalen Ektoderms an der äußeren Kante der Extremität zu erkennen. In diesem Stadium ist eine diffuse Expression des *Kcnj14*-Gens in der gesamten Extremitäten-





**Abb. 15 A-F** Expression des *Kcnj14*-Gens in den Extremitäten des Mausembryos (*whole-mount-in-situ*-Hybridisierungen). Apikales Ektoderm (AE), Handplatte (HP), proximale Region der Handplatte (PR), mesenchymale Vorläuferzellen (M), Fingeranlage (FA), Interzone (IZ), rechte hintere Extremität (RHE), linke hintere Extremität (LHE), rechte vordere Extremität (RVE), linke vordere Extremität (LVE), Knochenanlage (KA). F ist eine Vergrößerung des schwarz umrandeten Teils aus D.

anlage deutlich sichtbar (Abb. 15 A). Im Verlauf der weiteren Embryogenese liegt die Entwicklung der Hinterextremitäten immer hinter der der Vorderextremitäten zurück. Am Tag E11,5 sind bei den Vorderextremitäten schon zwei Regionen deutlich voneinander zu unterscheiden. Dabei handelt es sich um die proximale Region, die sich später zum Arm entwickelt und die distale, die die Form eines Paddels hat und als Handplatte bezeichnet wird. Auch in diesem Stadium wird das *KCNJ14*-Gen sowohl in der Handplatte, als auch in der proximalen Region der Extremität exprimiert (Abb. 15 B). Einen Tag später im Verlauf der Embryogenese hat die paddelförmige Handplatte eine eckige Kontur erhalten, die mit der Lage der sich entwickelnden Finger und Zehen korrespondiert. Die Interzonen zwischen den Fingeranlagen sind durch Einbuchtungen zu erkennen, obwohl noch kein gezieltes Zellsterben die Interzonen eingeschnürt und die Finger auf diese Weise erkennbar gemacht hat. Die Expression des *Kcnj14*-Gens in der Handplatte ist in diesem Stadium deutlich auf die Region der zukünftigen Finger beschränkt. Hier sind es jedoch ausschließlich die umrandenden Bereiche künftiger Finger und Zehen (Abb. 15 C und D). Die Armanlage ist für eine Beurteilung der Expression nicht mehr transparent genug. Am 13,5. Tag nach der Befruchtung der Eizelle sind die fünf Finger einzeln gut auszumachen und erscheinen symmetrisch, da der erste und der fünfte Finger gleich lang sind. Durch die nun fehlenden Interzonen erscheinen die Finger gespreizt. Die Hinterextremitäten sind in ihrer Entwicklung noch nicht so weit fortgeschritten. Dieser Zustand spiegelt sich in der Expression des *Kcnj14*-Gens wider. Sowohl bei den Vorder-, als auch den Hinterextremitäten sind die knorpeligen Anlagen der langen Knochen bereits vorhanden. Die weiter distal gelegenen Bereiche liegen noch in Form von verdichteten mesenchymalen Vorläuferzellen vor. Vibratonschnitte der Extremitäten in diesem Stadium zeigen eine distinkte Expression des *Kcnj14*-Gens nur im verdichteten Mesenchym, das die einzelnen Finger umgibt (Abb. 15 E und F).

### 5.9.2.3 Expression in der Augenregion

Bei der Maus beginnt die Augenentwicklung mit der Bildung des Augenvesikels in der zweiten Hälfte des 8. Tages (E8,5). Einen Tag später kollabiert die außen gelegene Seite und bildet den sekundären Augenbecher. Am Tag E10,5 setzt die Differenzierung in den neuronalen Anteil der Retina und das Pigmentepithel ein. Ein weiterer Kollaps des außen gelegenen Teils des Augenbechers führt zur Ausbildung des Linsenvesikels, das im weiteren Verlauf der Entwicklung den Kontakt zum darüberliegenden Ektoderm verliert. Dieses Ektoderm differenziert anschließend zur Cornea. 12,5 Tage nach Befruchtung der Eizelle ist schon eine Pigmentierung der äußeren Schicht der Retina zu erkennen und die Cornea ist fast transparent. Am Tag E13,5 beginnt die innere Schicht der Neuroretina zu differenzieren und bildet Nervenzellen aus, die durch den Augenstiel zum optischen Chiasma des Gehirns wachsen. Zu diesem Zeitpunkt ist erstmalig eine eindeutige Expression des *Kcnj14*-Gens im Auge in Vibratomschnitten des Kopfes zu beobachten (Abb. 16 A, B, D). Die Pigmentschicht der Retina, sowie die äußere Wand des Linsenvesikels zeigen eine starke Expression, die sich deutlich von der ungefärbten Neuroretina abhebt.

Außerdem verändert sich zwischen den Entwicklungsstadien E11,5 und E14,5 die Position der Augen in Relation zum gesamten Kopf. Im Verlaufe dieses Zeitraums wandert das Auge in eine stärker anteriore Position. Außerdem hat sich dadurch der interoculare Abstand kontinuierlich verringert.

### 5.9.2.4 Expression in der Region der Ohrmuschel

Erst ab der zweiten Hälfte des 11. Tages nach Befruchtung der Eizelle beginnen sich bei der Maus sechs kleine Tuberkel auf beiden Seiten der ersten Kiemenspalte abzuzeichnen. Diese vergrößern sich, wachsen zusammen und bilden die Anlage verschiedener Komponenten des externen Ohrs, hauptsächlich jedoch der Ohrmuschel. Wie in den Vibratomschnitten des Kopfes vom Tag E13,5 zu erkennen ist, hat sich nun eine nach anterior gerichtete Ohrmuschel ausgebildet. In dieser Struktur ist eine deutlich von der Umgebung abgegrenzte, starke Expression des *Kcnj14*-Gens sichtbar (Abb. 16 A und B).

Als Folge der Verlängerung der cervikalen Region des Kopfes, hat sich die Position des externen Ohrs weiter nach rostral verlagert.

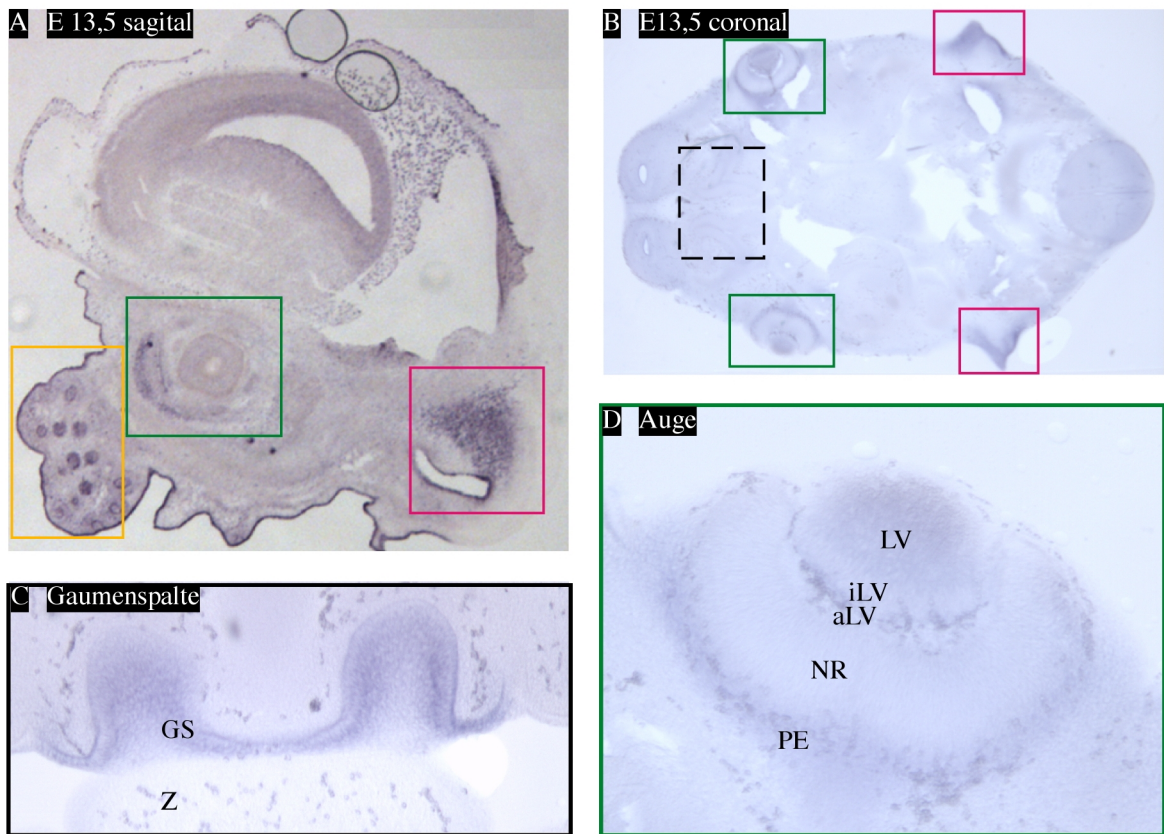
### 5.9.2.5 Expression in der Region der Tasthaare

In der Mausentwicklung beginnt am Tag E13,5 die Ausprägung der Vorläuferzellen, sowohl der taktilen Haare, als auch der Tasthaare auf der Vorderseite des Gesichts. In Vibratomschnitten des Kopfes ist die Expression des *Kcnj14*-Gens auf die Bereiche der sich entwickelnden Tasthaare beschränkt (Abb. 16 A). Die Anlagen der zukünftigen Tasthaare sind punktförmig und deutlich als nahezu parallel angeordnete Reihen, assoziiert mit der Oberlippe, im Vibratomschnitt auszumachen. Die taktilen Haare bilden sich charakteristischerweise caudal zu den Mundwinkeln, sowie in infra- und supraorbitaler Position paarweise aus. An den Positionen der taktilen Haarvorläuferzellen ist keine Expression des *Kcnj14*-Gens zu beobachten.

### 5.9.2.6 Hinweise auf weitere Expression

In der Gaumenspalte ist am Tag E13,5 eine deutliche Expression des *Kcnj14*-Gens zu erkennen, die sich von den umgebenden Geweben wie zum Beispiel der Zunge markant abhebt (Abb. 16 C).

Schwache Signale deuten ebenfalls auf eine Expression des *Kcnj14*-Gens während der Embryogenese zum Zeitpunkt E13,5 im Herzen und im Hoden hin.



**Abb. 16 A-D** Expression des *Kcnj14*-Gens im Kopfbereich des Mausembryos (*in situ*-Hybridisierungen auf Kryostatschnitten (A) und Vibratomschnitten (B, C, D)). Region der Tasthaare (gelb), Augenregion (grün), externe Ohranlage (rot); C ist ein tieferliegender Schnitt des gestrichelt umrandeten Feldes in B in höherer Vergrößerung; D ist eine Ausschnittsvergrößerung des grün umrandeten Feldes in B; Gaumenspalte (GS), Zunge (Z), Linsenvesikel (LV), innere Wand von LV (iLV), äußere Wand von LV (aLV), Neuroretina (NR), Pigmentepithel (PE).

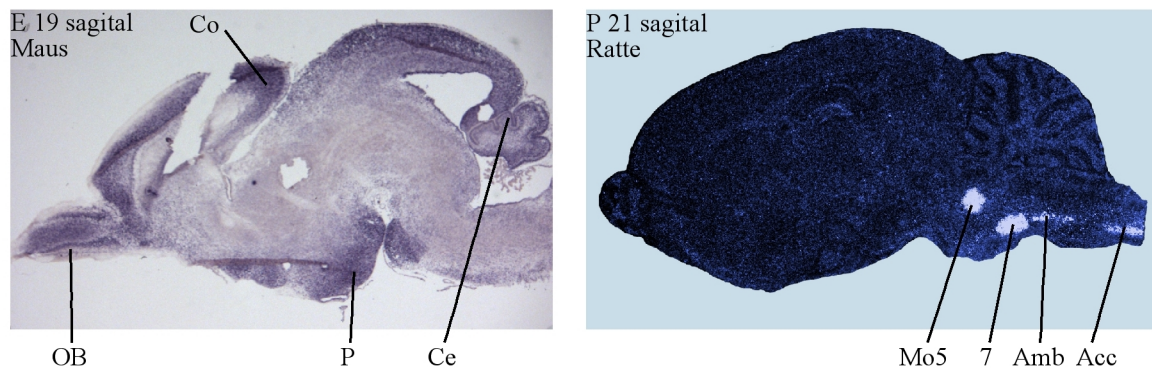
### 5.9.2.7 Vergleich der *Kcnj14*-Genexpression von adultem und E19-Gehirn

Da Gehirne zum Zeitpunkt E19 nicht mehr ausreichend permeabel für die eingesetzten Lösungen sind, wurden diese *in situ*-Hybridisierungen an Kryostatschnitten durchgeführt.

Die Schnitte zeigen, daß die *Kcnj14*-mRNA zum Zeitpunkt E19 sehr stark in großen Bereichen des Gehirns exprimiert wird. Im Unterschied dazu beschränkt sich die Expression im Gehirn adulter Mäuse auf nur wenige Regionen. In den sagitalen Schnitten der E19-Gehirne sind deutlich spezifische Signale im *Bulbus olfactorius*, dem Cortex, dem Cerebellum und dem *Nucleus pontis* zu erkennen (Abb. 17 links). Im adulten Gehirn der Ratte läßt sich eine Expression des *Kcnj14*-Gens im rechten Teil der Abb. 17 deutlich im *Nucleus motor trigeminus*, im Knie des *Nervus facialis*, im *Nucleus*



*ambiguus* und im spinalen Kern des Accessorius erkennen. In der Literatur wurde eine Expression noch im *Nukleus subthalamicus*, im *Nucleus oculomotorius*, im *Nucleus hypoglossus* und im Trapezkörper nachgewiesen (Töpert et al., 1998; Karschin & Karschin, 1999).



**Abb. 17** Expression des *Kcnj14*-Gens im Gehirn des Mausembryos E19 (links) und der adulten Ratte P21 (rechts) im Vergleich. *Bulbus olfactorius* (OB), Cortex (Co), Pons (P), Cerebellum (Ce), *Nucleus motor trigeminus* (Mo5), Knie des *Nervus facialis* (7), *Nucleus ambiguus* (Amb), spinaler Accessorius Kern (Acc). Das rechte Bild ist der Diplomarbeit von C. Töpert entnommen.

## **5.10 Defekt im *KCNJ14*-Gen als potentielle Krankheitsursache**

Die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierungen und der chromosomalen Lokalisation wurden verwendet, um Hinweise auf mögliche Funktionsstörungen zu erhalten, deren Ursache ein Defekt im *KCNJ14*-Gen sein könnte. Dazu wurde in der OMIM-Datenbank nach Krankheiten gesucht, für die das verursachende Gen auf Chromosom 19 im Bereich q13 kartiert ist. Die Recherche ergab 13 Krankheiten die in Tabelle 3 zusammengestellt sind. Mit Hilfe der Lage der flankierenden polymorphen Marker und der Information über kosegregierende Gene wurden sieben Krankheiten ausgewählt, für die aufgrund der Lokalisation ein Zusammenhang mit dem *KCNJ14*-Gen bestehen könnte. Da Kopplungsanalysen im allgemeinen relativ ungenau sind, wurden auch solche Krankheiten in die weitere Betrachtung einbezogen, die bis auf eine Entfernung von fünf Megabasen von der Position des *KCNJ14*-Gens (53,64 Mb) kartiert wurden. Die einzelnen Krankheiten wurden hinsichtlich der Organmanifestation mit den Ergebnissen der Expressions-Analyse verglichen. Dabei zeigte sich, daß von den sieben ausgewählten Krankheiten, sechs als Kandidaten in Betracht gezogen werden müssen,

da sie Organe, wie Gehirn, Neurone, Herz, Niere, Anlagen der Gliedmaßen, sowie urogenitale, ektodermale und cranio-faciale Anlagen betreffen, in denen das *KCNJ14*-Gen exprimiert wird. Nur die Erkrankung *Zystische Fibrose Modifier 1* scheidet aufgrund bisher nicht nachgewiesener Expression des *KCNJ14*-Gens im Pankreas aus. Die verbleibenden sechs Krankheiten sind mit ihrer Symptomatik, Ätiologie und Organmanifestation in der Tabelle 4 aufgelistet.

Eine weitere Krankheit, das LQT-Syndrom 7, auch Andersen's Syndrom genannt, für die ein Defekt im *KCNJ2*-Gen (korrespondierendes Protein: Kir2.1) ursächlich ist, wurde als zusätzlicher Kandidat betrachtet. Die Gründe dafür sind folgende: Die Expressionsmuster des *KCNJ2*-Gens (Kir2.1) und des *KCNJ14*-Gens sind, wie beim Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen aus der Literatur deutlich wird, sehr ähnlich. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Kir2.1- und Kir2.4-Untereinheiten funktionelle Heteromultimere bilden können (Schramm et al., 2002) und Befunde von Tristani-Firouzi deuten darauf hin, daß das Andersen's Syndrom eine heterogenetische Krankheit ist (Tristani-Firouzi et al., 2002), für die nicht allein Defekte im *KCNJ2*-Gen (Kir2.1) verantwortlich sind.

Krankheit	Abkürzungen	Zyto-genetisches Band	Polymorphe Marker / kosegregierendes Gen	Chromosomale Position (Mb)	Referenz
Alzheimer Krankheit 2	AD2	19q	-	-	Pericak-Vance et al., 1991
Dystonie-Parkinsonsche Krankheit	RDP	19q13	D19S198; D19S587 - D19S900	46,8; 39,9 - 48,8	Kramer et al., 1999
Ektrodaktilie, Ektodermale Dysplasie 2	EEC2	19	D19S416 - D19S216	38,7 - 48,9	O'Quinn et al., 1998
Familiäre benigne Hyperkalzämie 3	FBH3-Ok	19q13	D19S606; D19S908	52,6 ; 50,5	Lloyd et al., 1999
Familiäre Benigne Neonatale Epilepsie	BFIC	19q	D19S250 - D19S245	35,5 - 38,8	Guipponi et al., 1997
Familiärer progredienter Herzblock 1	PFHB1	19q13.2 - 19q13.3	<i>APOC2 - KLK1</i>	50,1 - 56,0	Brink et al., 1995
Hereditäre Motorisch-Sensible Neuropathie 3	HMSN3	19q13.1 - 19q13.2	D19S420 - D19S412	48,5 - 51,7	Delague et al., 2000
Hydatidiforme Mole	HYDM	19q13.3 - 19q13.4	D19S924 - D19S890	58,9 - 63,7	Moglabey et al., 1999
Mikrozephalie 2	MCPH2	19q13.1 - 19q13.2	-	-	Roberts et al., 1999
Modifizier 1 der Zystischen Fibrose	CFM1	19q13.2 - 19q13.4	D19S112	51,1	Zielenski et al., 1999
Orofaciale Spalte 3	OFC3	19q13	<i>BCL3</i>	49,9	Stein et al., 1995
Spastische Paraplegie 12	SPG12	19q	D19S416 - D19S220	38,7 - 43,1	Orlacchio et al., 2002
Spinozerebellare Ataxie 13	SCA13	19q13.3 - 19q13.4	D19S219	50,7	Herman-Bert et al., 2000

**Tabelle 3:** Vererbare Krankheiten mit Kopplung zur Region des *KCNJ14*-Genlokus und unbekanntem Pathomechanismus. Die chromosomalen Positionen beziehen sich auf Version 16.33.1 des humanen Genoms.



## 5 Ergebnisse

Name	Kurzbeschreibung	Symptome	Ätiologie	Organmanifestation
Dystonie-Parkinsonsche Krankheit	autosomal dominant vererbte Bewegungsstörung	fehlerhafter Spannungszustand der Muskeln	keine Degeneration der dopaminergen Nervenendigungen, kein Ansprechen auf L-Dopa	Dopaminerge Neurone
Hereditäre Motorisch-Sensible Neuropathie 3	autosomal rezessiv vererbte Neuropathie	Atrophie und Lähmung distaler Muskeln der Extremitäten, Verminderung der Nervenleitungs-geschwindigkeit, Empfindungsverlust in distalen Extremitäten	Degeneration peripherer, myelinierter Neurone	periphere Neurone
Spinocerebellare Ataxie 13	autosomal dominant vererbte Ataxie	motorische und geistige Retardierung	cerebellare Atrophie, Atrophie der Brückenhaube	Cerebellum, Brückenhaube
Familiärer progredienter Herzblock 1	autosomal dominant vererbte Reizleitungsstörung, progressiv bis zum kompletten Herzblock	Verlangsamung des Herzrhythmus, plötzlicher Herztod	Erregungsleitungsstörung	Herz, Leitungsbahnen des Herzens
LQT 7 Syndrom (Andersen's Syndrom)	autosomal dominant vererbte Triade: Arrhythmie, periodische Paralyse, Mißbildungen	LQT, Paralyse, kein plötzlicher Herztod, Mißbildungen (kleiner Augenabstand, tiefer Ohransatz, kleiner Kiefer, Syndactylie, Gaumenspalte, Skoliose)	Mutation im <i>KCNJ2</i> -Gen (Kir2.1)	Herz, Motoneurone, Anlagen der Gliedmaßen, cranio-faciale Anlagen
Familiäre benigne Hyperkalzämie 3	autosomal dominant vererbte Störung des Mineralstoffwechsels	erhöhte $Ca^{2+}$ -Konzentration, erniedrigte $Ca^{2+}$ -Ausscheidung, normale PTH-Konzentration	nicht CaSR-bedingt, vermutlich Signalübertragung nach CaSR	Nebenschilddrüse, Niere
Ektrodaktilie, Ektodermale Dysplasie 2	autosomal rezessiv vererbtes Mißbildungssyndrom	angeborene Mißbildung oder Fehlen von Fingern und Zehen	Störung der Embryonalentwicklung	Anlage der Gliedmaßen, Ektoderm, urogenitale, cranio-faciale Anlagen

**Tabelle 4:** Krankheiten mit Kopplung zum Locus des *KCNJ14*-Gens und Manifestation in Regionen der *KCNJ14*-Expression.

## **5.11 Kcnj14-Genkopie der Maus**

### **5.11.1 Datenbank-Analyse**

Erste Hinweise auf eine *Kcnj14*-Genkopie in der Maus wurden bei einer Recherche in der kommerziellen Datenbank des Mausgenoms von Celera Genomics (Rockville, USA) gefunden. Zu diesem Zeitpunkt konnte wegen der unsicheren Datenlage nicht ausgeschlossen werden, daß es sich dabei um ein Artefakt handelte, das beim Zusammenfügen der sequenzierten genomischen Einzelklone (Contigs) entstanden war.

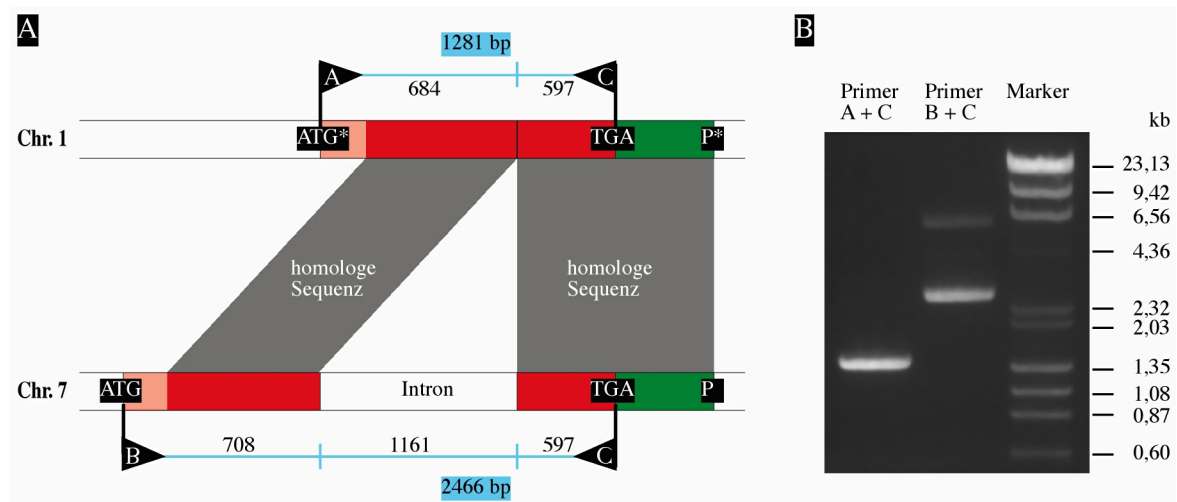
### **5.11.2 Nachweis der Genkopie im Mausgenom**

Um den Hinweis zu überprüfen, wurde getestet, ob in der Genkopie das Intron zwischen Exon 2 und Exon 3 des murinen *Kcnj14*-Gens fehlt. Die übrige Sequenz wies laut Datenbank über weite Bereiche der kodierenden Sequenz eine sehr große Homologie auf. Eine genomische PCR-Analyse mit einem spezifischen Primerpaar, das 5'- und 3'-flankierend zum Intron positioniert war (siehe Anhang, Primer *m 7 s* und *m TGA as*), sollte Klarheit über die Existenz der Genkopie bringen, denn die PCR-Produkte müßten sich um die Länge des Introns unterscheiden. Die eingesetzte genomische DNA stammte aus Wildtyp-embryonalen Stammzellen. Um eventuelle degenerative Eigenheiten der Maus-Inzuchtstämme als Fehlerquelle auszuschließen, wurde in drei verschiedenen Ansätzen die DNA von drei verschiedenen Mausstämmen (FVB, 129 SvJ und NMRI) eingesetzt. Das Ergebnis war für alle drei Mausstämmen identisch und zeigte zwei Banden der Längen 1903 bp und 742 bp die um die Länge des Introns von 1161 bp differierten. Damit war ein erster Nachweis für ein prozessiertes Pseudogen des *Kcnj14*-Gens erbracht.

Zur Überprüfung des Ergebnisses und zur Quantifizierung der Homologie von *Kcnj14*-Gen und Genkopie wurden weitere Experimente durchgeführt. Laut Datenbank brach die Homologie des *Kcnj14*-Gens und dessen Kopie im 5'-Bereich schlagartig 58 Nukleotide 3' vom Startcodon des *Kcnj14*-Gens ab. Diese nicht-homologe Region wurde benutzt, um mit spezifischen Primern sowohl den Sequenzabschnitt des *Kcnj14*-Gens, als auch den der Genkopie aus genomischer DNA zu amplifizieren (siehe Anhang, Primer *m ATG s* und *m Pseudo ATG s*). Die Template-DNAs und der

## 5 Ergebnisse

Gegenstrangprimer blieben die gleichen, wie bei der vorhergehenden PCR. Erwartet wurden PCR-Produkte, die sich mindestens um die Länge des Introns unterscheiden sollten. Auch das Ergebnis dieser PCR war eindeutig und zeigte die Spezifität der Primerpaare und die sichere Existenz der Genkopie im Mausgenom (siehe Abb. 18).



**Abb. 18** Strategie (A) und PCR-Ergebnis (B) zum Nachweis der *Kcnj14*-Genkopie. In A sind die Primerpositionen (A, B und C) an den Enden (Startcodon ATG; putatives Startcodon ATG\* und Stoppcodon TGA) der kodierenden bzw. putativ kodierenden Regionen (rot) dargestellt. Die sich an die kodierenden Regionen anschließende 3'-UTR ist grün unterlegt und wird im Chromosom 7 mit dem Polyadenylierungssignal (P) und im Chromosom 1 mit einem PolyA-Schwanz (P\*) terminiert. Homologe Sequenzabschnitte zwischen den beiden chromosomalen Regionen wurden durch graue Felder verbunden. Die Längenangaben der für die PCR-Analyse relevanten Sequenzabschnitte sind in bp angegeben und die Länge der erwarteten PCR-Produkte wurden blau unterlegt. In B ist das Ergebnis der Gel-Elektrophorese der PCR-Produkte der Primer-Kombinationen A+C und B+C abgebildet.

Um den kodierenden Bereich des *Kcnj14*-Gens mit dem entsprechenden Abschnitt der Genkopie zu vergleichen, wurde die Genkopie amplifiziert und sequenziert.

### 5.11.3 Analyse der Nukleotid- und putativen Proteinsequenz

Die Sequenzhomologie der Amplifikationsprodukte erstreckt sich über den größten Teil der kodierenden Sequenz und den kompletten 3'-untranslatierten Bereich und endet mit einer terminalen PolyA-Sequenz in der Genkopie.

Der Homologievergleich der kodierenden Sequenz des *Kcnj14*-Gens und der Genkopie ergab 11 Nukleotidaustausche, die nahezu gleichmäßig über die Sequenz verteilt sind. Auf Aminosäureebene sind die Austausche auf fünf Aminosäuren beschränkt, die, bis

auf A89T in der ersten Transmembranregion, nicht in die stark konservierten Bereiche eines putativen Proteins fallen würden. In der Genkopie sind die ersten 58 Nukleotide des Kir2.4-Leserahmens der Mausequenz durch 34 alternative Nukleotide ersetzt. Deshalb würde der Aminoterminus eines putativen Proteins um acht Aminosäuren verkürzt werden. Als Folge davon geht die einzige aminoterminele PKA-Phosphorylierungsstelle der Kir2.4-Untereinheit verloren. Auch der Carboxyterminus eines putativen Translationsprodukts wäre aufgrund eines Stoppcodons um 85 Aminosäuren verkürzt. Dadurch gehen ein Teil des proximalen PIP<sub>2</sub>-Bindungsmotivs, zwei PKC-Phosphorylierungsstellen und das ER-Exportmotiv verloren.

Kir2.4	MGLARALRRLSGALEPGNSRAGDEEEAGAGLCRNGWAPGPVAGSRRRGRF	50
Kopie	MLGCQHKNITITCAGDEEEAGAGLCRNGWAPGPVAGSRRRGRF	42
Kir2.4	VKKDGHCNVRVFVNLGGQGARYLSDLFTTCVDVRRWRMCLLFSCSFLASWL	100
Kopie	VKKDGHCNVRVFVNLGGQGAGYLSDLFTTCVDVRRWRMCLLFSCSFLTSWL	92
Kir2.4	LFGLTFWLIASLHGDLAAPPPEPAPCFSQVASFLAAFLFALETQTSIGYGV	150
Kopie	LFGLTFWLIASLHGDLAAPPSPAPCFSQVASFLAAFLFALETQTSIGYGV	142
Kir2.4	RSVTEECPAAVAAVVLQCIAGCVLDAFVVGAVMAKMAKPKKRNETLVFSE	200
Kopie	RSVTEECPTAAVAAVVLQCIAGCVLDAFVVGAVMAKMAKPKKRNETLVFSE	192
Kir2.4	NAVVALRDHRLCLMWRVGNLRRSHLVEAHVRAQLLQPRVTPEGEYIPLDH	250
Kopie	NAVVALRDHRLCLMWRVGNLRRSHLVEAHMRAQLLQPRVTPEGEYIPLDH	242
Kir2.4	QDVDVGFDDGGTDRIFLVSPITIVHEIDSASPLYELGRAELARADFELVVI	300
Kopie	QDVDVGFDDGGTDRIFLVSPITIVHEIDSASPLYELGRAELARADFELVVI	292
Kir2.4	LEGMVEATAMTTQCRSSYLPGELLWGHRFEPVLFQSGSQYEVDYRHFHRT	350
Kopie	LEGMVEATAMTTQCRSSYLPGELLWGHRFEPVLFQSGSQYEVDYRHFH.T	342
Kir2.4	YEVPGTPVCSAKELDERAEQASHSPKSSFPGSLTAFICYENELALSQCQEE	400
Kopie	YEVPGTPVCSAKELDERAEQASHSPKSSFPGSLTAFICYENELALSQCQEE	392
Kir2.4	DEEEDTKEGTS AETPERAASPQAL TPTLAL TLPP .	434
Kopie	DEEEDTKEGTS AETPERAASPQAL TPTLAL TLPP .	426

**Abb. 19** Homologe Anordnung der Aminosäuresequenzen des murinen Kir2.4 und des putativen Translationsprodukts der *Kcnj14*-Genkopie (Kopie). Nicht-homologe Bereiche sind schwarz und die Bereiche TM1, TM2 und H5 zur Orientierung grau unterlegt.

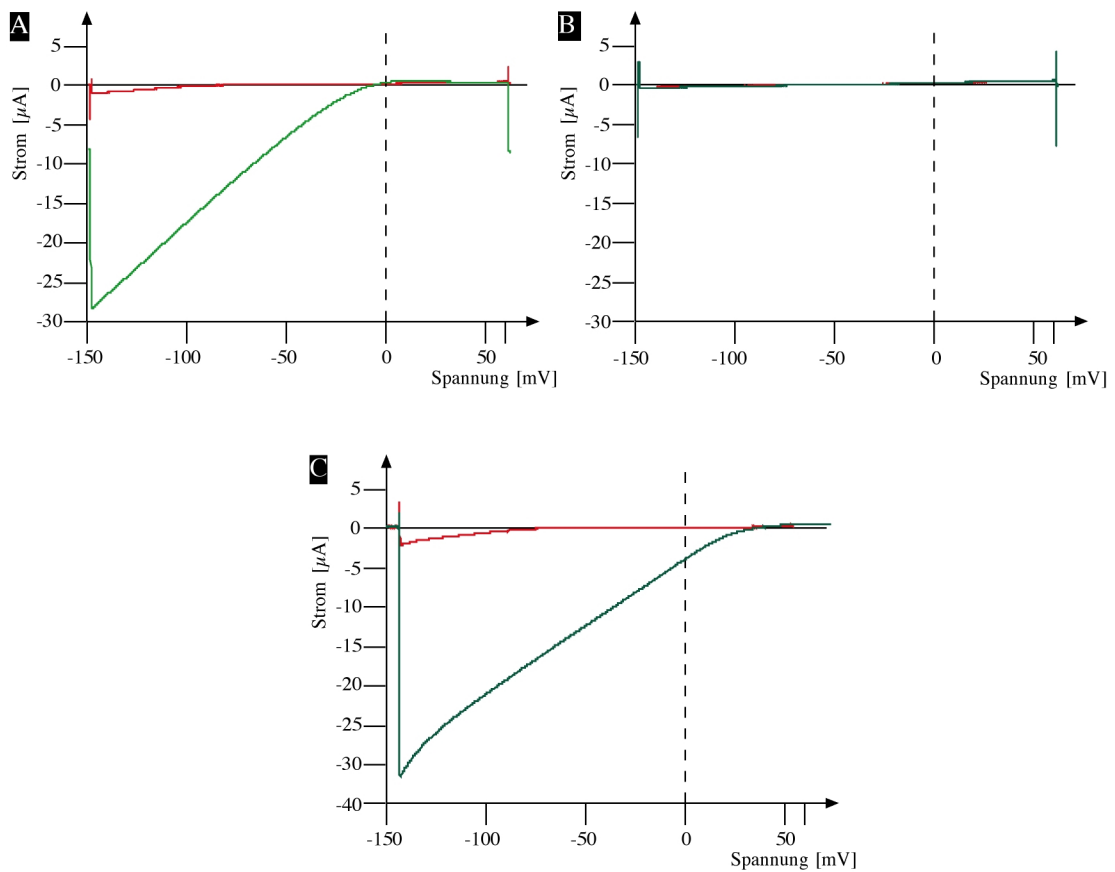
### **5.11.4 Datenbankanalyse**

Mit einer Recherche in der Version 16.30.1 des Mausgenoms vom 6.5.2003 wurde die Genkopie auf dem Chromosom 1 im Bereich A3 lokalisiert. Die physikalische Position ist 10,84 Mb und die benachbarten Gene auf diesem chromosomalen Abschnitt wurden noch nicht funktionell charakterisiert. Ein Vergleich zwischen den Nukleotid-Sequenzen der Genkopie und der *Kcnj14*-mRNA erbrachte eine 2403 bp lange Region, die eine Homologie von 98,9 % aufweist. Bei genauer Betrachtung stellte sich heraus, daß bei der Genkopie diese homologe Region an beiden Enden von einer identischen 16 bp Nukleotidsequenz (AAAAACACAATAACAG) flankiert wird.

Eine Analyse genomischer Datenbanken von Mensch und Ratte ergab keinen Hinweis auf eine *KCNJ14*-Genkopie.

### **5.11.5 Elektrophysiologie**

Die Funktion eines putativen Translationsprodukts der *Kcnj14*-Genkopie als einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal wurde mit der Zwei-Elektroden Spannungsklemme an *Xenopus* Oozyten untersucht. Die Messungen wurden sowohl an Oozyten, denen cRNA der Genkopie alleine, als auch an solchen, denen ein Gemisch von cRNA der Genkopie und *Kcnj14*-cRNA injiziert worden war, durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten Oozyten, denen Wasser injiziert wurde. Den Oozyten wurden jeweils 30 nl cRNA-Lösung (ca. 10 ng) injiziert und diese anschließend 24 Stunden bei Raumtemperatur in ND96-Lösung inkubiert. Die Meßdaten aus den mit cRNA der Genkopie injizierten Oozyten zeigten weder bei hoher, noch bei niedriger extrazellulärer Kaliumkonzentration einen Unterschied zu denen der Kontrolloozyten. An den Oozyten, denen das Gemisch injiziert worden war, wurde ein deutlicher und für den Kir2.4-Kanal typischer Strom gemessen.



**Abb. 20** Strom-Spannungskurven des murinen Kir2.4-Kanals (A), des putativen Translationsprodukts der *Kcnj14*-Genkopie (B) und eines Gemischs der beiden (C) in *Xenopus laevis* Oozyten bei 96 mM (grün) und 2 mM (rot) extrazellulärer Kaliumkonzentration im Vergleich.

## 6 Diskussion

### 6.1 Struktur des *KCNJ14*-Gens bei Mensch & Maus

Der Vergleich der Nukleotidsequenzen von Mensch und Maus zeigt, daß es sich bei beiden *KCNJ14*-Genen um Orthologe handelt, die sich von einem gemeinsamen Vorfahren ableiten lassen.

Das humane *KCNJ14*-Gen befindet sich auf dem Chromosom 19 in der Region q13. In der Regel werden Gene, die in diesem Bereich lokalisiert sind, bei der Maus auf Chromosom 7 gefunden (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Da sich das murine *Kcnj14*-Gen auch tatsächlich dort befindet, kann man von konservierter Syntänie sprechen. Die Syntänie betrifft dabei nicht nur das einzelne Gen, sondern auch die umliegenden Gene, weil sich in beiden Spezies die unmittelbaren Nachbargene in identischer linearer Anordnung wiederfinden: *GRIN2D*-, *GRWD*-, *KCNJ14*-, *PSCD2*- (*Cyh2-Mouse*-), *SULT2B1*-Gen. Es handelt sich also um syntänische Loci. Allerdings hat sich die Orientierung der beiden genomischen Abschnitte geändert, so daß sich die Reihenfolge der benachbarten Gene umgekehrt hat.

Die Syntänie setzt sich nicht über das gesamte Chromosom fort, wie aus der Anordnung des *KCNJ14*-Gens und der benachbarten anderen Kaliumkanal-Gene auf den Chromosomen von Mensch und Maus erkennbar wird.

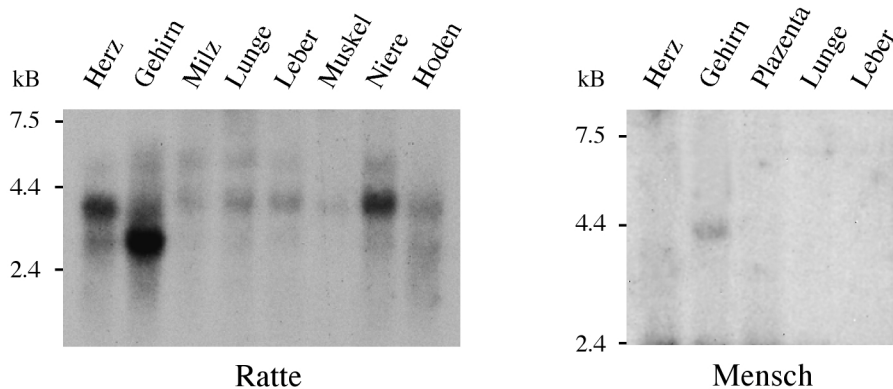
Mensch	Maus
<i>KCNK6</i> (43,46)	<i>Kcnn4</i> (15,75)
<i>KCNN4</i> (48,95)	<i>Kcnk6</i> (20,83)
<i>KCNJ14</i> (53,64)	<i>Kcnc3</i> (33,22 )
<i>KCNA7</i> (54,25)	<i>Kcna7</i> (34,04)
<i>KCNC3</i> (55,50)	<i>Kcnj14</i> (34,46)

**Tabelle 5** Reihenfolge und physikalische Position in Mb der Kaliumkanal-Gene in konservierten Segmenten (gelb und orange) auf dem humanen Chromosom 19 und dem Chromosom 7 der Maus im Vergleich.

Die chromosomalen Segmente mit den Genen *KCNC3*, *KCNA7*, *KCNJ14* und *KCNN4*, *KCNK6* sind für sich betrachtet konserviert. Im Verlauf der Evolution ist es wahrscheinlich zu einer Inversion gekommen, an die sich eine Änderung der Reihenfolge der beiden Segmente anschloß.

## 6.2 KCNJ14-Transkripte

Die Struktur des *KCNJ14*-Gens in Mensch und Maus ist sehr ähnlich. In beiden Spezies setzt sich das Gen aus drei Exons zusammen, die durch zwei Introns unterbrochen werden, von denen eines die kodierende Sequenz in beiden Spezies an der selben Position unterbricht. Nur in der humanen mRNA wird ein Teil der 5'-UTR in den beiden mRNA-Varianten alternativ gespleißt. In der Maus hingegen wird die 5'-UTR vermutlich durch zwei alternative Transkriptionsstartpunkte um 60 bp in ihrer Länge variiert. In beiden Spezies unterscheiden sich die beiden alternativen Transkripte um weniger als 75 bp in ihrer Länge voneinander. Die kodierenden Nukleotidsequenzen von Mensch und Maus weisen eine Homologie von 87,4 % auf.



**Abb. 21** Nachweis von *KCNJ14*-Transkripten in Northern-Blots verschiedener Gewebe von Ratte (links) und Mensch (rechts). Die Abbildung ist der Diplomarbeit von C. Töpert entnommen.

Auf dem Northern-Blot der Ratte ist deutlich eine gewebsspezifische Expression verschiedener *KCNJ14*-Transkripte auszumachen. Im Northern-Blot des Gehirns weist eine sehr intensive und breite Bande bei etwa 3 kb auf zwei nahe zusammenliegende intensive Einzelbanden hin. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich dabei um die beiden, jeweils für Mensch und Maus in dieser Arbeit beschriebenen und auch in der Ratte nachgewiesenen nahezu gleich großen *KCNJ14*-Transkripte. Im Northern-Blot ist im Herzen ein schwächeres Signal dieser 3 kb Bande zu beobachten.

Im Northern-Blot des Gehirns ist eine weitere spezifische Bande bei etwa 4 kb sichtbar, die erheblich schwächer ist als die 3 kb Doppelbande. Aus dem spezifischen Signal kann auf eine starke Homologie dieser unbekanntes mRNA mit dem für den Carboxyterminus kodierenden Teil der Kir2.4-Untereinheit geschlossen werden, da die



im Northern-Blot eingesetzte Sonde für diesen Bereich spezifisch war. Die unbekannte mRNA konnte bisher nicht isoliert und untersucht werden und wird am stärksten im Herzen, der Niere und dem Gehirn exprimiert. Schwache Signale sind in Milz, Lunge, Leber, Muskel und Hoden zu beobachten, in denen die Expression der 3 kb Transkripte nicht nachweisbar ist.

Durch die Aufklärung der Struktur des *KCNJ14*-Gens in Mensch und Maus konnte der Ursprung der beiden Transkripte, die überwiegend im Gehirn auftreten, geklärt werden. Der endgültige Beweis, daß es sich bei dem unbekanntem 4 kb Transkript um eine Spleißvariante des *KCNJ14*-Gens handelt, bleibt offen, weil die genomische Herkunft ungeklärt ist.

### **6.3 Analogieschlüsse zur Funktion des Kir2.4 Proteins**

Der Aminosäuresequenzvergleich zwischen den Mitgliedern der Kir2-Unterfamilie weist große homologe Bereiche auf. Homologe Bereiche deuten auf funktionell bedeutsame Regionen hin. Die Funktionen vieler konservierter Sequenzen der Kir2-Unterfamilie wurden bereits aufgeklärt. Von besonderer Relevanz sind dabei die Ergebnisse aus den Analysen des Kir2.1, da dieser von allen bekannten Kir2-Kanälen mit 62,8 % die größte Aminosäure-Sequenzhomologie zum Kir2.4 aufweist.

Der Aminosäuresequenzvergleich läßt die Annahme zu, daß der Kir2.4 im Hinblick auf die Ausschleusung aus dem endoplasmatischen Retikulum, die Assemblierung der Kanaluntereinheiten, die Einwärtsgleichrichtung, die Ionenselektivität, die Porenregulation und die meisten Modulationswege ähnlich funktioniert wie die übrigen Kir2-Kanäle.

#### **6.3.1 Porenregulation**

Seit der Veröffentlichung der ersten Röntgenstrukturanalyse eines Kaliumkanals durch Doyle (Doyle et al., 1998) sind inzwischen vier weitere Röntgenstrukturanalysen und eine elektronenmikroskopische Analyse (Sokolova et al., 2001) publiziert worden (Jiang et al., 2002; Nishida & MacKinnon, 2002; Kuo et al., 2003; Jiang et al., 2003). Der von Kuo untersuchte KirBac1.1 gehört zur Familie der bakteriellen einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle und weist eine große Sequenzhomologie im Bereich der inneren und

äußeren Helix, sowie den porenaukleidenden Aminosäuren zu eukaryotischen Kir-Kanälen auf (Loussouarn et al., 2000). Da der KirBac1.1 wie die Kir2-Kanäle nicht durch G-Proteine reguliert wird, könnte der von Kuo kürzlich beschriebene neue *Gating*-Mechanismus dieses Kanals ein geeignetes Modell für das *Gating* der Kir2-Kanäle darstellen. Nach dieser Hypothese schließt sich der Kanal, indem sich als Folge einer allosterischen Umlagerung eine hydrophobe Barriere aus den hydrophoben Seitenketten der vier Phenylalanine im Innenraum der Pore bildet. Gleichzeitig wird die Porenhelix verdreht, so daß sie die zur Ionenstabilisierung erforderliche, über Porenhelix-Dipolkräfte generierte Energie nicht mehr aufbringen kann. Die Konformation des Selektionsfilters ändert sich und der Porendurchmesser wird verkleinert.

### **6.3.2 Interaktionsmotive**

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz der Kir2.4-Untereinheit zwischen den Spezies Mensch, Maus, Ratte und Meerschweinchen zeigt zusätzlich zu den für die Kir2-Unterfamilie spezifischen, weitere konservierte Bereiche auf. Bereiche, die bei allen bekannten Kir2.4-Sequenzen konserviert sind, sollten auf Kir2.4-Kanal-spezifische Funktionen hinweisen. Weil die Zeit, die für die individuelle Evolution zur Verfügung stand, z.B. bei Mensch und Maus etwa 80 Millionen Jahre, viel kürzer ist als der Evolutionszeitraum der einzelnen Kanäle der Kir2-Unterfamilie, sind die Kir2.4-spezifischen Bereiche weniger scharf von den übrigen Bereichen abgegrenzt.

Eine auffällige Kir2.4-spezifische Sequenzkonservierung tritt bei den Proteinkinase C- und Proteinkinase A-Phosphorylierungsstellen auf. Von den drei PKC-Phosphorylierungsstellen der übrigen Kir2-Mitglieder fehlt in der Kir2.4-Untereinheit die proximale. Ebenso fehlt ihm die einzige PKA-Phosphorylierungsstelle im Carboxyterminus, die bei den anderen Kir2-Kanälen konserviert ist und mit einem PDZ-Bindungsmotiv überlappt. Dieses Bindungsmotiv dient der Fixierung am Zytoskelett, die vermutlich durch eine PKA-Phosphorylierung wieder gelöst werden kann. In der Kir2.4-Untereinheit befindet sich eine alternative PKA-Phosphorylierungsstelle im Aminoternus, allerdings ohne ein benachbartes PDZ-Bindungsmotiv. Unter der Annahme, daß der Kir2.4-Kanal nicht in der Plasmamembran treibt, muß ein anderer Mechanismus für eine Fixierung des Kanals am Zytoskelett verantwortlich sein. Denkbar wäre ein bisher unbekanntes Bindungsmotiv, das die Funktion des PDZ-

Motivs übernimmt. Unter der Annahme einer ähnlichen Rolle der PKA-Phosphorylierungsstelle müsste das Motiv auf dem distalen Ende des Aminoterminus in der Nähe der PKA-Phosphorylierungsstelle zu finden sein.

Ein bisher nicht diskutierter Unterschied zwischen der Kir2.4-Untereinheit und den übrigen Kir-Kanaluntereinheiten besteht in einem prolinreichen Abschnitt zwischen der TM1- und der H5-Region. Diese Sequenz ist in den vier untersuchten Spezies stark konserviert. Es handelt sich dabei um die extrazelluläre Sequenz APPPPAP. Prolinreiche Sequenzmotive sind in jüngster Vergangenheit mit einer großen Anzahl von Protein-Protein-Interaktionen in Zusammenhang gebracht worden. Unter den bekanntesten prolinreichen Interaktionsmotiven befinden sich auch die Ligandensequenzen zahlreicher SH3- und WW-Proteindomänen. Die besonderen physikochemischen Eigenschaften der Aminosäure Prolin sind von zentraler Bedeutung für dessen Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen. Im Unterschied zu den anderen 19 proteinogenen Aminosäuren ist Prolin keine Amino-, sondern eine Iminosäure. Die Bindung zwischen dem  $\alpha$ -Kohlenstoff- und dem Rückgrat-Stickstoffatom ist Teil eines 5-Rings und damit in seiner konformativen Freiheit eingeschränkt. Daraus ergibt sich die Tendenz Prolin-reicher Sequenzabschnitte zur Ausbildung von Regionen mit sogenannter PPII-Helixstruktur. Die PPII-Helices enthalten drei Aminosäurereste pro Windung und treten mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Oberfläche von Proteinen auf. Wegen ihrer Eigenschaft, sowohl langgestreckte hydrophobe Bereiche, als auch Ketten von Carbonylgruppen zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu präsentieren, werden sie auch „*sticky arms*“ genannt. Der gegenwärtige Kenntnisstand zur Vermittlung von Protein-Protein-Interaktion wurde jüngst von Kay (Kay et al., 2000) zusammengefasst. Die erwähnte Prolin-reiche Region in der Kir2.4-Kanaluntereinheit könnte daher ein Ansatzpunkt sein, um Fragen der Multimerisierung, sowie der Regulation durch Bindung anderer Proteine nachzugehen.

Weil diese Sequenz an exponierter Stelle auf der Außenseite der Zelle lokalisiert ist und sie in keiner anderen Kir-Kanaluntereinheit vorkommt, würde sich diese Sequenz als Antigen für die Herstellung von Antikörpern anbieten, die besonders für Untersuchungen an Zellen und Geweben geeignet sind.

## **6.4 Extrazelluläre pH-Sensitivität**

Die Ursache der pH-Sensitivität des humanen Kir2.4-Kanals wird von Hughes in Analogie zum Kir2.3-Kanal in einem Histidin an Position 130 gesehen (Hughes et al., 2000). Bei den vier bekannten Kir2.4-Vertretern besitzt das Ortholog des Menschen und das des Meerschweinchens dieses korrespondierende Histidin, wohingegen die Maus- und Ratten-Kir2.4-Untereinheit ein Glutamin an entsprechender Position aufweisen. Die Kir2.2-Untereinheit besitzt ebenfalls ein Glutamin an dieser Position und ist trotzdem pH-sensitiv. Unter funktionellen Gesichtspunkten kann das Glutamin nicht die Aufgabe eines pH-Sensors übernehmen, wie der aromatische Ring des basischen Histidins. Im Falle der Kir2.2-Untereinheit könnte das benachbarte Histidin an der Position 128 diese Aufgabe erfüllen. Da den Kir2.4-Untereinheiten von Maus und Ratte ein solches alternatives Histidin fehlt, ist es verständlich, daß diese keine physiologische pH-Sensitivität zeigen.

## **6.5 Häufung entwicklungsrelevanter Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren**

In der Literatur wurden bisher die Promotorregionen von fünf Kir-Kanälen genauer untersucht. Bei drei dieser fünf Kalium-Kanäle ließ sich kein klassischer Promotor in der 5'-Region vor dem Transkriptionsstart nachweisen. Nur in den Promotorregionen 5' vom Transkriptionsstart des *KCNJ1*-Gens (korrespondierendes Protein: Kir1.1) (Bock et al., 1997) und des *Kcnj13*-Gens (Kir7.1) (Döring & Karschin, 2000; Nakamura et al., 2000) wurden TATA- und CAAT-Boxen gefunden. Beim *KCNJ3*- (Kir3.1) (Schoots et al., 1997), *Kcnj2*- (Kir2.1) (Redell & Temple, 1998) und *KCNJ9*-Gen (Kir3.3) (Vaughn et al., 2000) fanden sich keine TATA- und CAAT-Boxen in den Regionen stromaufwärts der Transkriptionsstartpunkte. Ein Indiz für das Vorhandensein einer Promotorregion 5' vom Transkriptionsstart liefert jedoch der erhöhte GC-Gehalt dieser Regionen. In Experimenten zur quantitativen Erfassung der Transkriptionsaktivität in der entsprechenden Genregion (Luziferase-Experimente) wurde jedoch eine Regulation der Transkription nachgewiesen. Daher wird im Falle der *KCNJ3*- (Kir3.1), *KCNJ9*- (Kir3.3) und *Kcnj2*-Gene (Kir2.1) eine

Transkriptionsregulation durch bisher noch unbekannte DNA-Bindungsmotive vermutet.

Eine Untersuchung der entsprechenden Region im *KCNJ14*-Gen für Mensch und Maus mit dem Programm PromoterInspector ergab erwartungsgemäß, wie beim eng verwandten Kir2.1-Kanal, weder einen Hinweis auf eine TATA-Box, noch auf eine CAAT-Box. Das Programm zeigte zahlreiche putative Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen auf, für die es aber keine begründbare Auswahlmöglichkeit relevanter Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen gab. Erst mit einem Computer-gestützten Verfahren und unter der begründeten Annahme, daß regulatorische Bereiche eines Gens zwischen den Spezies konserviert werden und sich an gleicher Position auf den Genen der verschiedenen Spezies erhalten haben, war eine Eingrenzung auf wenige relevante Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen möglich. Der Homologievergleich zwischen den *KCNJ14*-Genen von vier Spezies (Mensch, Maus, Ratte und Meerschweinchen) hatte vier stark konservierte Regionen erbracht. Die bei allen vier Spezies homologen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen wurden den unterschiedlichen Familien der Transkriptionsfaktoren zugeordnet:

Im 3'-Bereich der HR3 befindet sich das Exon 1 des murinen *Kcnj14*-Gens. Die Recherche im 5'-Bereich dieser homologen Region nach typischen Promotorsequenzen verlief ergebnislos, stattdessen konnten nur drei hoch konservierte Zink-Finger-Proteinbindungsmotive (MAZR- und zwei ZBP 89-Bindungsstellen) in der HR3 lokalisiert werden.

In der vierten homologen Region, die den Transkriptionstart der humanen *KCNJ14*-mRNA 1 enthält und sich am 3'-Ende um 35 bp mit dem humanen Exon 1 überschneidet, wurde zwar eine konservierte TATA-Box identifiziert, allerdings fehlt für einen klassischen Promotor eine CAAT-Box. Die Bindung der RNA-Polymerase II an die TATA-Box könnte anstelle der CAAT-Box auch mit alternativen, bisher unbekanntem Transkriptionsfaktoren möglich sein. Der GC-Gehalt dieser Region ist nur leicht erhöht. Der Transkriptionsstart von dieser Position erscheint nur für das humane *KCNJ14*-Gen sinnvoll, nicht aber für das murine Ortholog, da sich dessen erstes Exon in der 1 kb stromaufwärts gelegenen dritten homologen Region befinden. Außerdem befindet sich in der HR4 ein konserviertes Bindungsmotiv für den Transkriptionsaktivator SRF.

In der zweiten homologen Region findet man eine starke Konzentration von entwicklungsrelevanten Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen. Dort befindet sich ein

Bindungsmotiv für das Homeobox-Protein PAX6, zwei Morphogen-Bindungsstellen (RAR und RXR) und außerdem eine Bindungssequenz für SMAD3, das in den TGF- $\beta$ -Signalweg involviert ist. Zu diesem Befund paßt die starke Expression des *Kcnj14*-Gens während der Embryogenese. Ein direkter Zusammenhang zwischen der embryonalen Expression des *Kcnj14*-Gens im Auge, der Nasenregion und im Cortex mit der bekannten Entwicklungskontrolle von PAX6 in diesen Regionen liegt nahe (Glaser et al., 1994; St-Onge et al., 1984; Bishop et al., 2000).

Die erste homologe Region liegt etwa 3,5 kb von den murinen und etwa 4,5 kb von dem humanen Transkriptionsstart der mRNA 1 entfernt. In dieser Region befinden sich neun verschiedene Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, die sich nur schwer in einen funktionellen Zusammenhang bringen lassen. Es wurden beispielsweise Bindungsmotive für einen Transkriptions-Repressor (RBP-J<sub>Kappa</sub>), einen muskelspezifischen Transkriptionsfaktor (MTBF), ein Zinkfinger-Protein (MZF1 mit 2 Bindungsstellen) und ein Homeobox-Protein (CDPCR3) identifiziert.

Aufgrund der noch nicht vollständigen genomischen Sequenzdaten aller Spezies ist nicht auszuschließen, daß kurze homologe Regionen bei dieser Untersuchung nicht berücksichtigt wurden. Möglicherweise finden sich in diesen Regionen weitere relevante Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive.

## **6.6 Vergleich der Expressionsmuster der Kir2-Kanalgene**

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist die strukturelle und – so weit erforscht – funktionelle Ähnlichkeit der Kir2-Kanäle groß. Es ist deshalb bemerkenswert, daß es viele ähnliche Subtypen gibt, die überlappend exprimiert werden, wie der folgende Vergleich belegt.

Durch die Bildung von heteromultimeren Kanälen mit neuen Eigenschaften kann die Vielfalt in Geweben mit überlappender Expression noch vermehrt werden. Dieser Befund weist auf den Bedarf des Organismus an einer großen Vielfalt von Kir2-Kanälen hin, für die es bisher keine Erklärung gibt.

### **6.6.1 Vergleich der embryonalen Expressionsmuster der Kir2-Kanalgene**

Da bisher zwischen Maus und Ratte keine Unterschiede im Expressionsmuster der Kir-Kanalgene nachgewiesen worden sind, sollte die Übertragbarkeit von publizierten

Ergebnissen, die mit einer der beiden Spezies gewonnen wurden, auf die andere zulässig sein. Ein Vergleich der Expressionsmuster von *Kcnj2*- (korrespondierendes Protein: Kir2.1), *Kcnj12*- (Kir2.2) und *Kcnj4*-Gen (Kir2.3) zum Zeitpunkt E17 in der Ratte (Karschin & Karschin, 1997) mit dem des *Kcnj14*-Gens im vergleichbaren Entwicklungsstadium E13,5 der Maus erbrachte sehr ähnliche Expressionsmuster von *Kcnj2*- (Kir2.1) und *Kcnj14*-Gen. Die Expression beider Kanalgene ist zu diesem Zeitpunkt stark in den Extremitäten und auch im Auge, der Gaumenspalte und Herzen nachweisbar. Das *Kcnj12*-Gen (Kir2.2) wird nur im Herzen überlappend mit dem *Kcnj14*-Gen exprimiert. In diesem Embryonalstadium wird das *Kcnj4*-Gen (Kir2.3) nicht exprimiert.

Im Knock-out-Modell für das *Kcnj2*-Gen (Kir2.1) wurden schwere Mißbildungen am Herzen, den Extremitäten und der Gaumenspalte gefunden (Zaritzky et al., 2000). Die Lokalisation der Mißbildungen deckt sich mit dem Expressionsmuster des *Kcnj2*-Gens (Kir2.1) und ist ein deutlicher Hinweis auf die Bedeutung des *Kcnj2*-Transkripts (Kir2.1) als Entwicklungsfaktor. Da das *Kcnj14*-Gen in den selben Organen exprimiert wird und darüber hinaus, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, im externen Ohrbereich und den sich entwickelnden Tastaaren, muß bei Mutationen des *Kcnj14*-Gens mit Mißbildungen am Herzen, den Extremitäten und im cranio-facialen Bereich gerechnet werden.

### **6.6.2 Vergleich der Expressionsmuster der Kir2-Kanalgene im adulten und embryonalen Gehirn**

Bis zum Zeitpunkt E21 wird das *Kcnj4*-Gen (Kir2.3) nur sehr schwach im Rattengehirn exprimiert und seine Expression nimmt erst postnatal im Vorderhirn deutlich an Intensität zu. Die Expression des *Kcnj12*-Gens (Kir2.2) im Gehirn ist zum Entwicklungsstadium E21 in der Ratte bereits stark ausgeprägt. Eine starke Expression zeigt sich im *Thalamus* und weniger stark im *Bulbus olfactorius*, dem Stammhirn, dem *Colliculus inferior*, der *Substantia grisea* und dem *Colliculus superior*. Die schwache Expression in Cortex, Cerebellum, Hippocampus, Cauda des Putamen und *Colliculus superior* zum Zeitpunkt E21 nimmt bis zum ausdifferenzierten adulten Gehirn deutlich an Intensität und Spezifität zu. Nur in wenigen Kernen wird die starke embryonale Gehirnexpression bis P21 verringert. Im Rattengehirn wird das *KCNJ2*-Gen (Kir2.1) zum Zeitpunkt E21 in *Thalamus*, Hirnstamm, Cerebellum, *Nucleus ruber*,

Trapezoidkörper, *Locus coeruleus* und dem *Nucleus olivaris inferior* exprimiert. Dieses Expressionsmuster findet sich nicht im adulten Gehirn wieder. Im adulten Gehirn wird das *Kcnj2*-Gen (Kir2.1) im Hippocampus exprimiert, allerdings ist bis P10 noch keine Expression zu erkennen. Dagegen ist die in der adulten Ratte erkennbare Expression in spezifischen Regionen des Cortex entsprechend der Differenzierung der kortikalen Schichten bereits embryonal zu beobachten (Karschin & Karschin, 1997; Karschin & Karschin, 1999).

Wie in dieser Arbeit beschrieben wurde, ist im Mausgehirn zum Zeitpunkt E19 eine breite Expression des *Kcnj14*-Gens in verschiedenen Hirnarealen zu verzeichnen. Das adulte Expressionsmuster ist auf deutlich weniger, dafür aber funktionell zusammengehörende Bereiche konzentriert.

Ein Vergleich der Expressionsentwicklung der *Kcnj2*- (Kir2.1), *Kcnj12*- (Kir2.2) und *Kcnj4*-Gene (Kir2.3) zum Zeitpunkt E21 und P21 in Rattengehirnen mit der des *Kcnj14*-Gens im Mausgehirn zum Zeitpunkt E19 und P19 teilt die Expressionsmuster der Kir2-Kanalgene in zwei Gruppen. Einerseits das *Kcnj12*- (Kir2.2) und das *Kcnj4*-Gen (Kir2.3), deren Expression sich kontinuierlich im Verlauf der Gehirnentwicklung verstärkt und mit der fortschreitenden neuronalen Differenzierung spezifiziert. Andererseits das *Kcnj2*- (Kir2.1) und das *Kcnj14*-Gen, deren Expression ein Maximum in der späten Embryogenese im Gehirn erreicht, sich in der postnatalen Entwicklung sehr stark verändert und im adulten Gehirn auf wenige Bereiche konzentriert ist. Dieser Befund steht im Einklang mit der Vermutung, daß die Kir-Kanäle eine wichtige Rolle bei der Synaptogenese spielen.

### **6.7 KCNJ14-Gendefekte als mögliche Krankheitsursache**

Bisher sind noch keine Krankheiten mit Defekten im *KCNJ14*-Gen in Verbindung gebracht worden. Dieser Befund ist wegen der weiten Verbreitung von *KCNJ14*-Transkripten im Gehirn, den Axonen, dem Herzen, der Niere und der wichtigen Gleichrichterfunktion des Kir2.4-Kanals unerwartet. Werden die neuen Befunde zur Expression des *Kcnj14*-Gens während der Embryogenese und zur Häufung entwicklungsrelevanter Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im *KCNJ14*-Gen miteinbezogen, kann vermutet werden, daß bei gezielter Suche auch Krankheiten bzw. angeborene Mißbildungen gefunden werden, die auf einen *KCNJ14*-Gendefekt



zurückzuführen sind. Als Kandidaten kommen die folgenden, im Ergebnisteil bereits tabellarisch dargestellten Krankheiten in Frage:

- Die familiäre benigne Hyperkalzämie (FBH) ist ein erbliches, genetisch heterogenes Krankheitsbild. Neben der ätiologisch aufgeklärten Form, die durch Mutationen des *CaSR*-Gens (*Ca<sup>2+</sup> sensory receptor*) verursacht wird, gibt es FBH-Phänotypen, für die keine Mutationen im *CaSR*-Gen gefunden wurden. Der CaS-Rezeptor gehört zur großen Familie der G-Protein-gekoppelten Glutamatrezeptoren und es ist vorstellbar, daß Kir2.4-regulierte Signaltransduktionswege bei der Steuerung der Kalziumreabsorption in der Niere dem CaS-Rezeptor vor- oder nachgeschaltet sind. Mutationen im *KCNJ14*-Gen könnten auf diese Weise gleiche oder ähnliche Symptome wie Mutationen im *CaSR*-Gen hervorrufen.
- Der familiäre progrediente Herzblock Typ1 ist eine erbliche Reizleitungsstörung des Herzens, die vom partiellen bis zum kompletten Herzblock führen kann.
- Die Dystonie-Parkinsonsche Krankheit ist eine Form der Dystonie in Verbindung mit Parkinsonismus, die gekennzeichnet ist durch rasches Einsetzen der Symptome, wie dem fehlerhaften Spannungszustand der Muskeln, allerdings ohne Degeneration der dopaminergen Nervenendigungen. Deshalb werden andere Pathomechanismen als die Parkinson-typischen, wie zum Beispiel Störungen der pre- und postsynaptischen Übertragungsmechanismen in den betroffenen Hirnarealen oder der neuronalen Versorgung der Muskulatur in Erwägung gezogen.
- Die spinocerebellare Ataxie ist eine große, klinisch und genetisch heterogene Erkrankungsgruppe. Das Leitsymptom ist eine progrediente Gangunsicherheit, die durch Degeneration cerebellarer und spinaler Systeme verursacht wird. Bisher sind 14 Untergruppen bekannt, von denen etwa die Hälfte hinsichtlich ihrer genetischen Ursachen aufgeklärt ist. Die Ursache der pathologischen Veränderung der spinocerebellaren Ataxie 13 (SPA13) ist unbekannt. Bei der SPA13 kommt es zu Atrophie des Cerebellums und der Brückenhaube mit motorischer und geistiger Retardierung.
- Die hereditäre motorisch-sensible Neuropathie Typ3 ist gekennzeichnet durch chronische, distale Muskelschwäche und Gefühlsverlust, hervorgerufen durch Demyelinisierung der motorischen und sensorischen Neurone.
- Das Andersen's Syndrom ist eine autosomal dominant vererbte Arrhythmie vom LQT-Typ (LQT7), die gemeinsam mit periodisch auftretender Paralyse, mit schweren Mißbildungen, wie verringertem Augenabstand, tief ansetzenden Ohren,

kleinem Kiefer, Gaumenspalte, Syndaktylie und Skoliose, auftritt. Für das Andersen's Syndrom wurde kürzlich die genetische Ursache in Mutationen im *Kcnj2*-Gen (Kir2.1) nachgewiesen (Plaster et al., 2001). Charakteristisch für diese Krankheit ist die auffallend hohe Variabilität der Symptomatik. Neben der unterschiedlichen Expression des betroffenen Allels ist in diesem Zusammenhang die Heteromultimerisierung von Kir2-Kanälen (Schramm et al., 2002) von Bedeutung. Preisig-Müller hat als Erklärung für die variable Ausprägung der kardialen Aspekte der Krankheit Heteromultimere zwischen Kir2.1- und Kir2.2- sowie Kir2.3-Untereinheiten diskutiert (Preisig-Müller et al., 2002). Kir2.4-Untereinheiten wurden von Preisig-Müller in diesem Zusammenhang nicht diskutiert, weil diese nicht in Kardiomyozyten, sondern in neuronalen Anteilen des Herzens vorkommen (Liu et al., 2001). Durch Heteromultimerisierung von Kir2-Untereinheiten könnte es einerseits zur Kompensation von fehlenden oder defekten Kir2.1-Kanälen kommen, oder aber durch die Generierung von Heteromultimeren mit modifizierter Charakteristik zu einer großen Variabilität von klinischen Effekten.

Besonders interessant ist der Befund, daß beim Andersen's Syndrom häufig Mißbildungen beobachtet werden. Im Maus-Modell wurde eine Kir2.1 *-/-* Mutante hergestellt, die ähnliche perinatal-letale Gaumen- und Kiefer-Defekte, wie die beim Andersen's Syndrom beobachteten, aufwies (Zaritsky et al., 2000). Unter Berücksichtigung der sehr ähnlichen Expressionsmuster des *Kcnj2*- (Kir2.1) und des *Kcnj14*-Gens während der Embryogenese kann die große Variabilität des Andersen's Syndrom hinsichtlich der Mißbildungen durch Heteromultimerenbildung zwischen Kir2.1- und Kir2.4-Untereinheiten erklärt werden.

- Ektrodaktilie, ektodermale Dysplasie 2 (EED2) und orofaciale Spalte 3 (OFC3) sind autosomal rezessiv vererbte Mißbildungssyndrome. Die Symptome manifestieren sich für die EED2 in angeborenen Mißbildungen oder Fehlen von Fingern und Zehen und für die OFC3 in Lippen- und Gaumenspalte. Die Häufung von Bindungsstellen für entwicklungsrelevante Transkriptionsfaktoren in der Promotorregion des *KCNJ14*-Gens, wie dem Homeobox-Protein PAX6, den Morphogenen RAR und RXR, sowie SMAD3, einem Transkriptionsfaktor der TGF- $\beta$ -Signalkaskade, könnte als zusätzlicher Hinweis auf einen Zusammenhang der beiden Krankheiten mit einem Defekt im *KCNJ14*-Gen gewertet werden.

### **6.8 Pseudogen oder Paralog**

Genomische Sequenzen mit großer Homologie zu einem Gen werden in Paraloge und Pseudogene unterteilt. Ein Paralog ist durch intragenomische Duplikation entstanden und kodiert für ein funktionelles, dem originalen Gen ähnliches Genprodukt. Ein Pseudogen dagegen kann auf verschiedene Weise entstehen und ist *per definitionem* nicht funktionell.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde eine *Kcnj14*-Genkopie im Mausgenom gefunden. Es bestand der Verdacht, daß es sich dabei um ein Paralog handelte, dessen Transkript mit der unaufgeklärten Bande im Northern-Blot (siehe Abbildung 21) identisch ist. Die Suche nach korrespondierender mRNA im Herzen, Gehirn und Niere mit spezifischen Primern für die Genkopie brachte keine positiven Resultate.

Die vermeintliche mRNA der Genkopie wurde in Form von cRNA im Oozyten-Experiment elektrophysiologisch untersucht, wobei sich kein Unterschied zu den Kontrolloozyten feststellen ließ. Dieses Ergebnis ließ sich auf zweierlei Weise interpretieren: Entweder kann das gebildete Protein keinen funktionellen Kanal bilden oder es wird aufgrund des fehlenden Exportsignals nicht aus dem endoplasmatischen Retikulum ausgeschleust. Im Fall der Koinjektion der Pseudogen-cRNA mit *Kcnj14*-cRNA war nur die Strom-Spannungs-Charakteristik des Kir2.4-Kanals nachweisbar. Das kann bedeuten, daß nur Kir2.4-Homomultimere nachgewiesen wurden oder, daß Heteromultimere aus beiden Untereinheiten gebildet werden, die sich aufgrund der geringen Sequenzunterschiede in den funktionellen Bereichen der Kir2.4-Untereinheiten und der Pseudogen-Untereinheiten in ihrem elektrophysiologischen Verhalten nicht voneinander unterscheiden lassen.

Als Konsequenz aus diesen experimentellen Ergebnissen wurde die Genkopie auf typische Merkmale von Pseudogenen hin untersucht. Prozessierte Pseudogene entstehen durch Retrotransposition von mRNA und weisen in der Regel noch typische mRNA-Eigenschaften auf. Die *Kcnj14*-Genkopie zeigt folgende Merkmale einer mRNA: Sie umfaßt Teile von Exon 2 und das vollständige Exon 3, enthält aber keine Introns, es ist kein Promotor nachweisbar und sie besitzt Reste einer mRNA-typischen 3'-PolyA-Sequenz. Ein weiteres Indiz für ein prozessiertes Pseudogen sind die kurzen identischen Nukleotidsequenzen an beiden Enden der Genkopie.

Alle Ergebnisse sprechen für ein prozessiertes Pseudogen, das über eine Retrotransposition eines unvollständigen *Kcnj14*-Transkripts auf dem murinen Chromosom 1 entstanden ist.

# 7 Zusammenfassung

## 7.1 Deutsche Zusammenfassung

**Schlagnvorte:** Kir 2.4, einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal, *KCNJ14*

Das Ziel der Dissertation war die Untersuchung der Funktion der Kir2.4-Untereinheit einwärtsgleichrichtender Kaliumkanäle, sowie die molekularbiologische Strukturaufklärung des entsprechenden Gens (*KCNJ14*-Gen) zur Durchführung eines Knock-out-Projektes.

Im Verlauf der experimentellen Arbeiten wurde das humane *KCNJ14*-Gen isoliert und hinsichtlich der chromosomalen Lokalisation und genomischen Struktur aufgeklärt (Töpert et al., 2000). Die Untersuchung der genomischen Struktur und chromosomalen Lokalisation des murinen Orthologs wurde im Zuge eines Knock-out-Projekts vorgenommen. In Übereinstimmung mit bekannten konservierten syntänischen Regionen wurde das Gen beim Menschen auf Chromosom 19 und bei der Maus auf Chromosom 7 lokalisiert. In beiden Spezies werden drei Exons durch zwei Introns getrennt. Im Mausgenom wurde außerdem eine weitgehend homologe Kopie eines *Kcnj14*-Transkripts auf Chromosom 1 entdeckt, die mit großer Wahrscheinlichkeit ein prozessiertes Pseudogen darstellt. In Northern-Blots und organspezifischen RT-PCR Analysen wurde die differentielle Expression von drei verschiedenen Spleißvarianten im Menschen und in der Maus nachgewiesen. Die Analyse der möglichen Promotorregionen der *KCNJ14*-Orthologe verschiedener Spezies wies auf vier Cluster mit gleichen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren an korrespondierenden Positionen und eine Häufung entwicklungsrelevanter Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen vor dem Transkriptionsstart hin.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der Kir2-Kanaluntereinheiten mehrerer Spezies ergab, daß es innerhalb dieser Kanalunterfamilie bezüglich Raumstruktur, *Gating*-Mechanismen, intrazellulärem Transport und Assemblierung der Untereinheiten, sowie der zellulären Regulation große Übereinstimmung gibt. Zwei putative Phosphorylierungsstellen und eine extrazelluläre PPII-Helix kommen einzig bei Kir2.4-Untereinheiten vor. Elektrophysiologische Untersuchungen der Kir2.4-Kanalproteine in *Xenopus laevis* Oozyten zeigten für alle Spezies übereinstimmende Strom-Spannungs-Charakteristika mit Unterschieden in der pH-Sensitivität.

RT-PCR Analysen und *in situ*-Hybridisierungen im embryonalen Mausgewebe mit *Kcnj2*- und *Kcnj14*-spezifischen Sonden wiesen auf eine große Übereinstimmung der Expressionsmuster und eine mögliche funktionelle und pathophysiologisch relevante Verknüpfung (z.B. beim Andersen's Syndrom) in Form von heteromultimeren Kanalproteinen während der Entwicklung und im adulten Organismus hin. Die Analyse der gewebsspezifischen Expression in Verbindung mit der chromosomalen Lokalisierung des für die Kir2.4-Untereinheit kodierenden *KCNJ14*-Gens ist eine wichtige Voraussetzung für eine mögliche Identifizierung von Erbkrankheiten, die durch Mutationen im *KCNJ14*-Gen verursacht werden können und die sich in Dystonie, Paralyse, Ataxie und embryonalen Entwicklungsstörungen äußern könnten.

### 7.2 Englische Zusammenfassung

**Key words:** Kir2.4, inwardly rectifying potassium channel, *KCNJ14*

The objective of this dissertation was the analysis of the functional properties of the Kir2.4 potassium channel subunit and the characterization of the corresponding gene (*KCNJ14*) in order to establish a murine knock out model.

During the course of the knock out project, the chromosomal localization and genomic structure of the human gene *KCNJ14* (Töpert et al., 2000) and its murine ortholog (*Kcnj14*) were analysed.

The *KCNJ14* was found to be located on human chromosome 19 and murine chromosome 7, confirming known syntenic arrangements of these two chromosomes. In both species, the gene consists of three exons that are separated by two introns. An additional copy of the *Kcnj14* was found on murine chromosome 1 very likely representing a processed pseudogene. Northern blot experiments and tissue-specific RT-PCR analyses revealed three *KCNJ14* transcripts at different expression-levels in a number of organs in both species. Sequence comparison of *KCNJ14* promoter regions from different species allowed the identification of four clusters of transcription factor binding sites that are located directly upstream of the transcription start.

A comparison of the protein sequence of Kir2.4 with sequences from other members of the Kir2 protein-family indicates substantial similarities in terms of spatial structure, gating mechanism, subunit-assembly and cellular regulation. Kir2.4, however, possesses two putative phosphorylation sites and an extracellular proline-rich region not present in other members of the Kir2-family.

Electrophysiological studies in *Xenopus laevis* oocytes of Kir2.4 channels from a number of different species show very similar characteristics that differ only in terms of their pH-sensitivity. In addition, they suggest that the murine pseudogene does not code for a functional protein.

*In situ* hybridization and RT-PCR experiments using tissue samples from adult mice and different embryonic stages suggest functional (e.g. heteromultimerization) and thus pathophysiological (e.g. Andersen's syndrome) relations between Kir2.4 und Kir2.1.

The results of the analysis of the chromosomal localization and tissue-specific expression of *KCNJ14* represent a valuable starting point for the identification of

inheritable disorders caused by mutations in the *KCNJ14* that could lead to dystonia, paralysis, ataxia and embryonic defects.



## **8 Literaturverzeichnis**

- Abbott, G. W.; Sesti, F.; Splawski, I.; Buck, M. E.; Lehmann, M.H.; Timothy, K. W.; Keating, M. T. & Goldstein, S. A. (1999): **MiRP1 forms Ikr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia.** *Cell* 97: 175 - 187.
- Armstrong, C. M. & Bezanilla, F. (1977): **Inactivation of the sodium channel. II Gating current experiments.** *J. Gen. Physiol.* 70: 567 - 590.
- Ashcroft, F. M. (2000): **Ion Channels and Disease.** Academic Press, San Diego (USA).
- Ashcroft, S. J. H. & Ashcroft, F. M. (1990): **Properties and functions of ATP-sensitive K-channels.** *Cell Signal.* 2: 197 - 214.
- Baukrowitz, T.; Schulte, U.; Oliver, D.; Herlitze, S.; Krauter, T.; Tucker, S. J.; Ruppersberg, J. P. & Fakler, B. (1998): **PIP<sub>2</sub> and PIP as determinants for ATP inhibition of K<sub>ATP</sub> channels.** *Science* 282: 1141 - 1144.
- Bezanilla, F. (2000): **The voltage sensor in voltage-dependent ion channels.** *Physiol. Rev.* 80: 555 - 592.
- Biervert, C.; Schroeder, B. C.; Kubisch, C.; Berkovic, S. F.; Propping, P.; Jentsch, T. J. & Steinlein, O. K. (1998): **A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy.** *Science* 279: 403 - 406.
- Bishop, K. M.; Goudreau, G. & O'Leary, D. D. (2000): **Regulation of area identity in the mammalian neocortex by Emx2 and Pax6.** *Science* 288: 344 - 349.
- Bock, J. H.; Shuck, M. E.; Benjamin, C. W.; Chee, M.; Bienkowski, M. J. & Slightom, J. L. (1997): **Nucleotide sequence analysis of the human *KCNJ1* potassium channel locus.** *Gene* 188: 9 - 16.
- Brink, P. A.; Ferreira, A.; Moolman, J. C.; Weymar, H. W.; van der Merwe, P.-L. & Corfield, V. A. (1995): **Gene for progressive familial heart block type 1 maps to chromosome 19q13.** *Circulation* 91: 1633 - 1340.
- Browne, D. L.; Gancher, S. T.; Nutt, J. G.; Brunt, E. R.; Smith, E. A.; Kramer, P. & Litt, M. (1994): **Episodic ataxia/ myokymia syndrome is associated with point mutations in the potassium channel gene, *KCNA1*.** *Nat. Genet.* 8: 136 - 140.
- Chandy, K. G.; Fantino, E.; Wittekindt, O.; Kalman, K.; Tong, L. L.; Ho, T. H.; Gutman, G.A.; Crocq, M. A.; Ganguli, R.; Nimgaonkar, V.; Morris-Rosendahl, D. J. & Gargus, J.J. (1998): **Isolation of a novel potassium channel gene hSKCa3 containing a polymorphic CAG repeat: a candidate for schizophrenia and bipolar disorder?** *Mol. Psychiatry* 3: 32 - 37.

- Charlier, C.; Singh, N. A.; Ryan, S. G.; Lewis, T. B.; Reus, B. E.; Leach, R. J. & Leppert, M. (1998): **A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family.** *Nat. Genet.* 18: 53 - 55.
- Cho, H. C.; Tsushima, R. G.; Nguyen, T. T.; Guy, H. R. & Backx, P. H. (2000): **Two Critical Residues Implicated in Disulfide Bond Formation and Proper Folding of Kir2.1.** *Biochemistry* 39: 4649 - 4657.
- Clement, J. P. IV; Kunjilwar, K.; Gonzalez, G.; Schwanstecher, M.; Panten, U.; Aguilar-Bryan, L. & Bryan, J. (1997): **Association and stoichiometry of K<sub>ATP</sub> channel subunits.** *Neuron* 18: 827 - 838.
- Cohen, N. A.; Brenman, J. E.; Snyder, S. H. & Brecht, D. S. (1996 a): **Binding of the Inward Rectifier K<sup>+</sup> Channel Kir2.3 to PSD-95 is Regulated by Protein Kinase A Phosphorylation.** *Neuron* 17: 759 - 767.
- Cohen, N. A.; Sha, Q.; Makhina, E. N.; Lopatin, A. N.; Linder, M. E.; Snyder, S. H. & Nichols, C. G. (1996 b): **Inhibition of an inward rectifier potassium channel (Kir2.3) by G-protein  $\beta\gamma$ -subunits.** *J. Biol. Chem.* 271: 32301 - 32305.
- Coulter, K. L.; Perier, S.; Radeke, C. M. & Vandenberg, C. A. (1995): **Identification and molecular localisation of a pH sensing domain for the inward rectifier potassium channel HIR.** *Neuron* 15: 1157 - 1168.
- Curran, M. E.; Splawski, I.; Timothy, K. W.; Vincent, G. M.; Green E. D. & Keating M. T. (1995): **A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause LongQT syndrome.** *Cell* 80: 795 - 803.
- Dart, C. & Leyland, M. L. (2001): **Targeting of an A-kinase anchoring protein, AKAP79, to an inwardly rectifying potassium channel, Kir2.1.** *J. Biol. Chem.* 276: 20499 - 20505.
- Delague, V.; Bareil, C.; Tuffery, S.; Bouvagnet, P.; Chouery, E.; Koussa, S.; Maisonobe, T.; Loiselet, J.; Megarbane, A. & Claustres, M. (2000): **Mapping of a New Locus for Autosomal Demyelinating Charcot-Marie-Tooth Disease to 19q13.1 – 13.3 in a Large Consanguineous Lebanese Family: Exclusion of MAG as a Candidate Gene.** *Am. J. Hum. Genet.* 67: 236 - 243.
- Donaldson, M. R.; Jensen, J. L.; Tristani-Firouzi, M.; Tawil, R.; Bendahhou, S.; Suarez, W. A.; Cobo, A. M.; Poza, J. J.; Behr, E.; Wagstaff, J.; Szepietowski, P.; Pereira, S.; Mozaffar, T.; Escolar, D. M.; Fu, Y.-H. & Ptacek, L. J. (2003): **PIP<sub>2</sub> binding residues of Kir2.1 are common targets of mutation causing Andersen syndrome.** *Neurology* 60: 1811 – 1816.

- Döring, F. & Karschin, A. (2000): **Genomic structure and promoter analysis of the rat Kir7.1 potassium channel gene (*Kcnj13*)**. FEBS Lett. 483: 93 - 98.
- Doyle, D. A.; Cabral, J. M.; Pfuetzner, R. A.; Kuo, A. ; Gulbis, J. M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T.; MacKinnon, R. (1998): **The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K<sup>+</sup> Conduction and Selectivity**. Science 280: 69 - 77.
- Dubchak, I.; Brudno, M.; Loots, G. G.; Pachter, L.; Mayor, C.; Rubin, E. M. & Frazer, K. A. (2000): **Active Conservation of Noncoding Sequences Revealed by Three-Way Species Comparisons**. Genome Res. 10: 1304 - 1306.
- Fakler, B.; Schulz, J. H.; Yang, J.; Schulte, U.; Brändle, U.; Zenner, H. P.; Jan, L. Y. & Ruppersberg, J. P. (1996): **Identification of a titratable lysin residue that determines sensitivity of kidney potassium channels (ROMK) to intracellular pH**. EMBO J. 15: 4093 - 4099.
- Fan, Z. & Makielski, J. C. (1997): **Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels**. J Biol. Chem. 272: 5388 - 5395.
- Fink, M.; Duprat, F.; Heurteaux, C.; Lesage, F.; Romey, G.; Barhanin, J. & Lazdunski, M. (1996): **Dominant negative chimaeras provide evidence for homo and heteromultimeric assembly of inward rectifier K<sup>+</sup> channel proteins via their N- terminal end**. FEBS Lett. 378: 64 - 68.
- Frazer, K.A.; Elnitski, L.; Church, D. M.; Dubchak, I. & Hardison, R. C. (2003): **Cross-Species Sequence Comparisons: A Review of Methods and Available Resources**. Genome Res. 13: 1 - 12.
- Glaser, T.; Jepeal, L.; Edwards, J. G.; Young, S. R.; Favor, J. & Maas, R. L. (1994): **Pax6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects**. Nat. Genet. 7: 463 - 471.
- Guipponi, M.; Rivier, F.; Vigeveno, F.; Beck, C.; Crespel, A.; Echenne, B.; Lucchini, P.; Sebastianelli, R.; Baldy-Moulinier, M. & Malafosse, A. (1997): **Linkage mapping of benign familial infantile convulsions (BFIC) to chromosome 19**. Hum. Mol. Genet. 6: 473 - 477.
- Gumucio, D.; Shelton, D.; Zhu, W.; Millinoff, D.; Gray, T.; Bock, J.; Slightom, J. & Goodman, M. (1996): **Evolutionary strategies for the elucidation of cis and trans factors that regulate the developmental switching programs of the β-like globin genes**. Mol. Phylogenet. Evol. 5: 18 - 32.
- Hall, Z. W. (1992): **An introduction to molecular neurobiology**. Sinauer Associates, Inc; Sunderland, Mass. (USA)

- Hanahan, D. H. (1985): **Techniques for transformation of *E. coli***. D. M. Glover, ed.; IRL Publisher, Oxford (UK).
- Hardison, R.; Slightom, J. L.; Gumucio, D. L.; Goodman, M.; Stojanovic, N. & Miller, W. (1997): **Locus control regions of mammalian  $\beta$ -globin gene clusters: Combining phylogenetic analyses and experimental results to gain functional insights**. *Gene* 205: 73 - 94.
- Herman-Bert, A.; Stevanin, G.; Netter, J.-C.; Rascol, O.; Brassat, D.; Calvas, P.; Camuzat, A.; Yuan, Q.; Schalling, M.; Durr, A. & Brice, A. (2000): **Mapping of spinocerebellar ataxia 13 to chromosome 19q13.3 – q13.4 in a family with autosomal dominant cerebellar ataxia and mental retardation**. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 229 - 235.
- Ho, K.; Nichols, C. G.; Lederer, W. J.; Lytton, J.; Vassilev, P. M.; Kanazirska, M. V. & Hebert, S. C. (1993): **Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel**. *Nature* 362: 31 - 38.
- Hoshi, T.; Zagotta, W. N. & Aldrich, R. W. (1990): **Biophysical and molecular mechanism of Shaker potassium channel inactivation**. *Science* 250: 533 - 538.
- Huang, C. L.; Feng, S. & Hilgemann, D. W. (1998): **Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP<sub>2</sub> and its stabilisation by G<sub>βγ</sub>**. *Nature* 391: 803 - 806.
- Huang, C.-L.; Slesinger, P. A.; Casey, P.J.; Jan, Y. N. & Jan, L. Y. (1995): **Evidence that direct binding of G<sub>βγ</sub> to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel is important for channel activation**. *Neuron* 15: 1133 - 1143.
- Hughes, B. A.; Kumar, G.; Yuan, Y.; Swaminathan, A.; Yan, D.; Sharma, A.; Plumley, L.; Yang-Feng, T. L. & Swaroop, A. (2000): **Cloning and functional expression of human retinal Kir2.4, a pH-sensitive inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel**. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 279: C771 - C784.
- Inanobe, A.; Fujita, A.; Ito, M.; Tomoike, H.; Inageda, K. & Kurachi, Y. (2002): **Inward rectifier K<sup>+</sup> channel Kir2.3 is localized at the postsynaptic membrane of excitatory synapses**. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 282: C1396 - C1403.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001): **Initial sequencing and analysis of the human genome**. *Nature* 409: 460 - 921.
- Jiang, Y.; Lee, A.; Chen, J.; Cadene, M.; Chalt, B. T. & MacKinnon, R. (2002): **Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel**. *Nature* 417: 515 - 522.

- Jiang, Y.; Lee, A.; Chen, J.; Ruta, V.; Cadene, M.; Chalt, B. T. & MacKinnon, R. (2003): **X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel**. *Nature* 423: 33 - 41.
- Jones, P. A.; Tucker, S. J. & Ashcroft, F. M. (2001): **Multiple sites of interaction between the intracellular domains of an inwardly rectifying potassium channel, Kir6.2**. *FEBS Lett.* 508: 85 - 89.
- Karschin, A. (1999): **G Protein Regulation of Inwardly Rectifying K<sup>+</sup> Channels**. *News Physiol. Sci.* 14: 215 - 220.
- Karschin, C. & Karschin, A. (1997): **Ontogeny of Gene Expression of Kir Channel Subunits in the Rat**. *Mol. Cell. Neurosci.* 10: 131 - 148.
- Karschin, C. & Karschin, A. (1999): **Distribution of Inwardly Rectifying Potassium Channels in the Brain**. *Curr. Topics Membranes* 46: 273 - 292.
- Katz, B. (1949): **Les constantes électriques de la membrane du muscle**. *Arch. Sci. Physiol.* 51: 285 - 300.
- Kay, B. K.; Williamson, M. P. & Sudol, M. (2000): **The Importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains**. *FASEB J.* 14: 231 - 241.
- Kofuji, P.; Davidson, N. & Lester, H. A. (1995): **Evidence that neuronal G-protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels are activated by G<sub>βγ</sub> subunits and function as heteromultimers**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 6542 - 6546.
- Kramer, P. L.; Mineta, M.; Klein, C.; Schilling, K.; de Leon, D.; Farlow, M. R.; Breakfield, X. O.; Bressman, S. B.; Dobyns, W. B.; Ozelius, L. J. & Brashear, A. (1999): **Rapid-onset dystonia-parkinsonism: linkage to chromosome 19q13**. *Ann. Neurol.* 46: 176 - 182.
- Krapivinsky, G.; Gordon, E. A.; Wickman, K.; Vilemirovic, B.; Krapivinsky, L. & Clapham, D. E. (1995): **The G-protein-gated atrial K<sup>+</sup> channel I<sub>KACH</sub> is a heteromultimer of two inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel proteins**. *Nature* 374: 135 - 141.
- Kubisch, C.; Schroeder, B. C.; Friedrich, T.; Lutjohann, B.; El-Amraoui, A.; Marlin, S.; Petit, C. & Jentsch, T. J. (1999): **KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness**. *Cell* 96: 437 - 446.
- Kubo, Y. & Murata, Y. (2001): **Control of rectification and permeation by two distinct sites after the second transmembrane region in Kir2.1 K<sup>+</sup> channel**. *J. Physiol.* 531: 645 - 660.

- Kubo, Y.; Baldwin, T. J.; Jan, Y. N. & Jan, L. Y. (1993): **Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel.** *Nature* 362: 127 - 133.
- Kuo, A.; Gulbis, J. M.; Antcliff, J. F.; Rahman, T.; Lowe, E. D.; Zimmer, J.; Cuthbertson, J.; Ashcroft, F. M.; Ezaki, T. & Doyle, D. A. (2003): **Cristal Structure of the Potassium Channel KirBac1.1 in the closed state.** *Science* 300: 1922 - 1926.
- Le Maout, S.; Welling, P. A.; Brejon, M.; Olsen, O. & Merot, J. (2001): **Basolateral membrane expression of a K<sup>+</sup> channel, Kir2.3, is directed by a cytoplasmic COOH-terminal domain.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10475 - 10480.
- Leonoudakis, D.; Mailliard, W. S.; Wingerd K. L.; Clegg, D. O. & Vandenberg, C. A. (2001): **Inward rectifier potassium channel Kir2.2 is associated with Synapse-Associated Protein SAP97.** *J. Cell Sci.* 114: 987 - 998.
- Leyland, M. M.; Dart, C.; Spencer, P. J.; Sutcliff, M. J. & Stanfield, P. R. (1999): **The possible role of a disulphide bond forming functional Kir2.1 potassium channels.** *Pflügers Arch.-Eur. J. Physiol.* 438: 778 - 781.
- Liu, G. X.; Derst, C.; Schlichthörl, G.; Heinen, S.; Seebohm, G.; Brüggemann, A.; Kummer, W.; Veh, R. W.; Daut, J. & Preisig-Müller, R. (2001): **Comparison of cloned Kir2 channels with native inward rectifier K<sup>+</sup> channels from guinea-pig cardiomyocytes.** *J. Physiol.* 532: 115 - 126.
- Lloyd, S. E.; Pannett, A. A. J.; Dixon, P. H.; Whyte, M. P. & Thakker, R. V. (1999): **Localization of Familial Benign Hypercalcemia, Oklahoma Variant (FBH<sub>OK</sub>), to Chromosome 19q13.** *Am. J. Hum. Genet.* 64: 189 - 195.
- Loots, G. G.; Ovcharenko, I.; Pachter, L.; Dubchak, I. & Rubin, E. M (2002): **rVista for Comparative Sequence-Based Discovery of Functional Transcription Factor Binding Sites.** *Genome Res.* 12: 832 - 839.
- Loussouarn, G.; Makhina, E. N.; Rose, T. & Nichols, C. G. (2000): **Structure and Dynamics of the Pore of Inwardly Rectifying K<sub>ATP</sub> Channels.** *J. Biol. Chem.* 275: 1137 - 1144.
- Lu, Z. & MacKinnon, R. (1994): **Electrostatic tuning of Mg<sup>2+</sup> affinity in an inward-rectifier K<sup>+</sup> channel.** *Nature* 371: 243 - 246.
- Ma, D.; Zerangue, N.; Lin, Y.-F.; Collins, A.; Yu, M.; Jan, Y. N. & Jan, L. Y. (2001): **Role of ER Export Signals in Controlling Surface Potassium Channel Numbers.** *Science* 291: 316 - 319.

- Mansouri, A. (1998): **Gene Targeting by Homologous Recombination in Embryonic Stem Cells**. Cell Biology: A laboratory handbook, 2nd Ed., Academic Press, San Diego (USA).
- Mayor, C.; Brudno, M.; Schwartz, J. R.; Poliakov, A.; Rubin, E. M.; Frazer, K. A.; Pachter, L. S. & Dubchak, I. (2000): **VISTA: Visualizing global DNA sequence alignments of arbitrary length**. Bioinformatics 16: 1046 - 1047.
- McNicholas, C. M.; Yang Y.; Giebisch, G. & Herbert, S. C. (1996): **Molecular site for nucleotide binding on an ATP-sensitive renal K<sup>+</sup> channel (ROMK2)**. Am. J. Physiol. 271: F275 - F285.
- Moglabey, Y. B.; Kircheisen, R.; Seoud, M.; El Mogharbel, N.; Van den Veyver, I. & Slim, R. (1999): **Genetic mapping of a maternal locus responsible for familial hydatidiform moles**. Hum. Mol. Genet. 8: 667 - 671.
- Mouse Genome Sequencing Consortium (2002): **Initial Sequencing and Comparative Analysis of the Mouse Genome**. Nature 420: 520 - 562.
- Nakamura, N.; Suzuki, Y.; Ikeda, Y.; Notoya, M & Hirose, S. (2000): **Complex Structure and Regulation of Expression of the Rat Gene for Inward Rectifier Potassium Channel Kir7.1**. J. Biol Chem. 275: 28276 - 28284.
- Nehring, R. B.; Wischmeyer, E.; Döring, F.; Veh, R. W.; Sheng, M. & Karschin, A. (2000): **Neuronal Inwardly Rectifying K<sup>+</sup> Channels Differentially Couple to PDZ Proteins of the PSD-95/SAP90 Family**. J. Neurosci. 20: 156 - 162.
- Neyroud, N.; Tesson, F.; Denjoy, I.; Leibovici, M.; Donger, C.; Barhanin, J.; Faure, S.; Gary, F.; Coumel, P.; Petit, C.; Schwartz, K. & Guicheney, P. (1997): **A novel mutation in the potassium channel gene K<sub>v</sub>LQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome**. Nat. Genet. 15: 186 - 189.
- Nishida, M. & MacKinnon, R. (2002): **Structural Basis of Inward Rectification: Cytoplasmic Pore of the Protein-Gated Inward Rectifier GIRK1 at 1.8 Å Resolution**. Cell 111: 957 - 965.
- O'Connell, A. D.; Morton, M. J. & Hunter, M. (2002): **Two-pore domain K<sup>+</sup> channels – molecular sensors**. Biochim. Biophys. Acta 1566: 152 - 161.
- O'Quinn, J. R.; Henekamm, R. C. M.; Jorde, L. B. & Bamshad, M. (1998): **Syndromic Ectrodactyly with Severe Limb, Ectodermal, Urogenital, and Palatal Defects Maps to Chromosome 19**. Am. J. Hum. Genet. 62: 130 - 135.

- Olsen, O.; Liu, H.; Wade, J. B.; Merot, J. & Welling, P. A. (2002): **Basolateral membrane expression of the Kir2.3 channel is coordinated by PDZ interaction with Lin-7/CASK complex.** *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282: C183 - C195.
- Orlacchio, A.; Kawarai, T.; Rogaeva, E.; Song, Y. Q.; Paterson, A. D.; Bernardi, G. S. & St. George-Hyslop, P. H. (2002): **Clinical and genetic study of a large Italian family linked to SPG12 locus.** *Neurology* 59: 1395 - 1401.
- Patel, A. J. & Honoré, E. (2001 a): **Properties and modulation of mammalian 2P domain K<sup>+</sup> channels.** *TINS* 24: 339 - 346.
- Patel, A. J.; Lazdunski, M. & Honoré, E. (2001 b): **Lipid and mechano-gated 2P domain K<sup>+</sup> channels.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 422 - 427.
- Pericak-Vance, M. A.; Bebout, J. L.; Gaskell, P. C. Jr.; Yamaoka, L. H.; Hung, W.-Y.; Alberts, M. J.; Walker, A. P.; Bartlett, R. J.; Haynes, C. A.; Welsh, K. A.; Earl, N. L.; Heyman, A.; Clark, C. M. & Roses, A. D. (1991): **Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage.** *Am. J. Hum. Genet.* 48: 1034 - 1050.
- Plaster, N. M.; Tawil, R.; Tristani-Firouzi, M.; Canun, S.; Bendahhou, S.; Tsunoda, A.; Donaldson, M. R.; Iannaccone, S. T.; Brunt, E.; Barohn, R.; Clark, J.; Deymeer, F.; George, A. L. jr.; Fish, F. A.; Hahn, A.; Nitu, A.; Ozdemir, C.; Serdaroglu, P.; Subramony, S. H.; Wolfe, G.; Fu, Y. H. & Ptacek, L. J. (2001): **Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome.** *Cell* 105: 511 - 519.
- Preisig-Müller, R.; Schlichthörl, G.; Goerge, T.; Heinen, S.; Brüggemann, A.; Rajan, S.; Derst, C.; Veh, R. W. & Daut, J. (2002): **Heteromerisation of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen's syndrome.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99: 7774 - 7779.
- Qu, Z.; Zhu, G.; Yang, Z.; Cui, N.; Li, Y.; Chanchevalap, S.; Sulaiman, S.; Haynie, H. & Jiang, C. (1999): **Identification of a Critical Motif Responsible for Gating of Kir2.3 Channel by Intracellular Protons.** *J. Biol. Chem.* 274: 13783 - 13789.
- Quandt, K.; Frech, K.; Karas, H.; Wingender, E. & Werner, T. (1995): **MatInd and MatInspector: New fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data.** *Nucleic Acids Res.* 23: 4878 - 4884.
- Quayle, J. M.; Bonev, A. D.; Brayden, J. E. & Nelson, M. T. (1994): **Calcitonin gene-related peptide activated ATP-sensitive K<sup>+</sup> currents in rabbit arterial smooth muscle via protein kinase A.** *J. Physiol.* 475: 9 - 13.



- Redell, J. B. & Tempel, B. L. (1998): **Multiple Promoter Elements Interact to Control the Transcription of the Potassium Channel Gene, *KCNJ2***. *J. Biol. Chem.* 273: 22807 - 22818.
- Roberts, E.; Jackson, A. P.; Carradice, A. C.; Deeble, V. J.; Mannan, J.; Rashid, Y.; Jafri, H.; McHale, D. P.; Markham, A. F.; Lench, N. J. & Woods, C. G. (1999): **The second locus for autosomal recessive primary microcephaly (MCPH2) maps to chromosome 19q13.1 – 13.2**. *Europ. J. Hum. Genet.* 7: 815 - 820.
- Sakura, H.; Ämmälä, C.; Smith, P. A.; Gribble, F. M. & Ashcroft, F. M. (1995) : **Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic  $\beta$ -cells, brain, heart and skeletal muscle**. *FEBS Lett.* 377: 338 - 344.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989): **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (USA).
- Schoots, O.; Voskoglou, T. & Van Tol, H. H. M. (1997): **Genomic Organization and Promoter Analysis of the Human G-Protein-Coupled  $K^+$  Channel Kir3.1 (*KCNJ3 / HGIRK1*)**. *Genomics* 39: 279 - 288.
- Schram, G.; Melnyk, P.; Pourrier, M.; Wang, Z. & Nattel, S. (2002): **Kir2.4 and Kir2.1  $K^+$  channel subunits co-assemble: a potential new contributor to inward rectifier current heterogeneity**. *J. Physiol.* 544: 337 - 349.
- Schulze-Bahr, E.; Wang, Q.; Wedekind, H.; Haverkamp, W.; Chen, Q.; Sun, Y.; Rubie, C.; Hordt, M.; Towbin, J. A.; Borggrefe, M.; Assmann, G.; Qu, X.; Somberg, J. C.; Breihardt, G.; Oberti, C. & Funke, H. (1997): ***KCNE1* mutations cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome**. *Nat. Genet.* 17: 267 - 268.
- Simon, D. B.; Karet, F. E.; Rodriguez-Soriano, J.; Hamdan, J. H.; DiPietro, A.; Trachtman, H. & Sanjad, S. A. (1996): **Lifton, R. P.: Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the  $K^+$  channel, ROMK**. *Nat. Genet.* 14: 152 - 156.
- Sokolova, O.; Kolmakova-Partensky, L. & Grigorieff, N. (2001): **Three-Dimensional Structure of a Voltage-Gated Potassium Channel at 2.5 nm Resolution**. *Structure* 9: 215 - 220.
- Soom, M.; Schönherr, R.; Kubo, Y.; Kirsch, C.; Klinger, R. & Heinemann, S. H. (2001): **Multiple  $PIP_2$  binding sites in Kir2.1 inwardly rectifying potassium channels**. *FEBS Lett.* 490: 49 - 53.

- Splawski, I.; Tristani-Firouzi, M.; Lehmann, M. H.; Sanguinetti, M. C. & Keating, M. T. (1997): **Mutations in the hminK gene cause LongQT syndrome and suppress Iks function.** Nat. Genet. 17: 338 - 340.
- St-Onge, L.; Sosa-Pineda, B.; Chowdhury, K.; Mansouri, A. & Gruss, P. (1997): **Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing  $\alpha$ -cells in mouse pancreas.** Nature 387: 406 - 409.
- Stein, J.; Mulliken, J. B.; Stal, S.; Gasser, D. L.; Malcolm, S.; Winter, R.; Blanton, S. H.; Amos, C.; Seemanova, E. & Hecht, J. T. (1995): **Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: evidence of linkage to *BCL3* in 17 multigenerational families.** Am. J. Hum. Genet. 57: 257 - 272.
- Stockklauser, C.; Ludwig, J.; Ruppertsberg, J. P. & Klöcker, N. (2001): **A sequence motif responsible for ER export and surface expression of Kir2.0 inward rectifier  $K^+$  channels.** FEBS Lett. 493: 129 - 133.
- Thomas, P. M.; Cote, G. J.; Wohllk, N.; Haddad, B.; Mathew, P. M.; Rabl, W.; Aguilar-Bryan, L.; Gagel, R. F. & Bryan, J. (1995): **Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy.** Science 268: 426 - 429.
- Tinker, A.; Jan, Y. N. & Jan, L. Y. (1996): **Regions responsible for the Assembly of Inward Rectifying Potassium Channels.** Cell 87: 857 - 868.
- Töpert, C.; Döring, F.; Derst, C.; Daut, J.; Grzeschik, K.-H. & Karschin, A. (2000): **Cloning, structure and assignment to Chromosome 19q13 of the human Kir2.4 inwardly rectifying potassium channel gene (*KCNJ14*).** Mamm. Genome 11: 247 - 249.
- Töpert, C.; Döring, F.; Wischmeyer, E.; Karschin, C.; Brockhaus, J.; Ballanyi, K.; Derst, C. & Karschin, A. (1998): **Kir2.4: a novel brain  $K^+$  inward rectifier predominantly expressed in motor neurons of cranial nerve nuclei.** J. Neurosci. 18: 4096 - 4105.
- Tristani-Firouzi, M.; Jensen, J. L.; Donaldson, M. R.; Sansone, V.; Meola, G.; Hahn, A.; Bendahhou, S.; Kwiecinski, H.; Fidzianska, A.; Plaster, N.; Fu, Y.-H.; Ptacek, L. J. & Tawil, R. (2002): **Functional and clinical characterisation of *KCNJ2* mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome).** J. Clin. Invest. 110: 381 - 388.

- Tucker, S. J. & Ashcroft, F. M. (1999): **Mapping of the Physical Interaction between the Intracellular Domains of an Inward Rectifying Potassium Channel, Kir6.2.** *J. Biol. Chem.* 274: 33393 - 33397.
- Vaughn, J.; Wolford, J. K.; Prochazka, M. & Permana, P. A. (2000): **Genomic Structure and Expression of Human KCNJ9 (Kir3.3/ GIRK3).** *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 274: 302 - 309.
- Wang, Q.; Curran, M. E.; Splawski, I.; Burn, T. C.; Millholland, J. M.; VanRaay, T. J.; Timothy, K. W.; Vincent, G. M.; de Jager, T.; Schwartz, P. J.; Toubin, J. A.; Moss, A. J.; Atkinson, D. L.; Landes, G. M.; Connors, T. D. & Keating, M. T. (1996): **Positional cloning of a novel potassium channel gene:  $K_v$ LQT1 mutations cause cardiac arrhythmias.** *Nat. Genet.* 12: 17 - 23.
- Wingender, E.; Chen, X.; Fricke, E.; Geffers, R.; Hehl, R.; Liebich, I.; Krull, M.; Matys, V.; Michael, H.; Ohnhauser, R.; et al. (2001): **The TRANSFAC system on gene expression regulation.** *Nucleic Acids Res.* 29: 281 - 283.
- Wischmeyer, E. & Karschin, A. (1996): **Receptor stimulation causes slow inhibition of IRK1 inwardly rectifying  $K^+$ -channels by direct protein kinase A-mediated phosphorylation.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 5819 - 5823.
- Wischmeyer, E.; Döring, F. & Karschin, A. (1998): **Acute Suppression of Inwardly Rectifying Kir2.1 Channels by Direct Tyrosine Kinase Phosphorylation.** *J. Biol. Chem.* 273: 34063 - 34068.
- Yamashita, I.; Sasaki, H.; Yabe, I.; Fukazawa, T.; Nogoshi, S.; Komeichi, K.; Takada, A.; Shiraishi, K.; Takiyama, Y.; Nishizawa, M.; Kaneko, J.; Tanaka, H.; Tsuji, S. & Tashiro, K. (2000): **A novel locus for dominant cerebellar ataxia (SCA14) maps to a 10.2 cM interval flanked by D19S206 and D19S605 on chromosome 19q13.4 – qter.** *Ann. Neurol.* 48: 156 - 163.
- Yang, J.; Yu, M.; Jan, Y. N. & Jan, L. Y. (1997): **Stabilization of ion selectivity filter by pore loop ion pairs in an inwardly rectifying potassium channel.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1586 - 1572.
- Zagotta, W. N. & Siegelbaum, S. A. (1996): **Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels.** *Annu. Rev. Neurosci.* 19: 235 - 263.
- Zaritsky, J. J.; Eckman, D. M.; Wellman, G. C.; Nelson, M. T. & Schwarz, T. L. (2000): **Targeted Disruption of Kir2.1 and Kir2.2 Genes Reveals the Essential Role of the Inwardly Rectifying  $K^+$  Current in  $K^+$ -Mediated Vasodilation.** *Circ. Res.* 87: 160 - 166.

- Zerangue, N.; Schwappach, B.; Jan, Y. N. & Jan, L. Y (1999): **A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane  $K_{ATP}$  channels.** Neuron 22: 537 - 548.
- Zhou, M.; Morais-Cabral, J. H.; Mann, S. & MacKinnon, R. (2001): **Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors.** Nature 411: 657 - 661.
- Zielensky, J.; Corey, M.; Rozmahel, R.; Markiewicz, D.; Aznarez, I.; Casals, T.; Larriba, S.; Mercier, B.; Cutting, G. R.; Krebsova, A.; Macek, M. Jr.; Langfelder-Schwind, E.; et al. (1999): **Detection of a cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus on human chromosome 19q13.** Nature Genet. 22: 128 - 129.

## **9 Anhang**

### **9.1 Puffer**

#### **Denaturierungslösung (4.2.4; 4.4.5)**

1,5 M NaCl  
0,5 M NaOH

#### **DEPC-H<sub>2</sub>O**

H<sub>2</sub>O  
0,1 % Diethylpyrocarbonat  
(w/v)

#### **Neutralisierungslösung (4.2.4; 4.4.5)**

0,5 M TRIS/HCl (pH 7,5)  
1,5 M NaCl

#### **10 x PBT**

1,3 M NaCl  
70 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
30 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,1 % Tween-20

#### **Prähybridisierungslösung (4.6)**

50 % Formamid  
5 x SSC (pH 4,5)  
1 % Blocking-Powder  
(Roche-Diagnostics,  
Mannheim)  
50 mM EDTA  
0,1 % Tween-20  
0,1 % CHAPS  
100 µg/ml Heparin  
1 mg/ml denaturierte  
tRNA aus Hefe

#### **50 x Denhardt's-Lösung**

1 % Ficoll (Typ 400; w/v)  
1 % Polyvinylpyrrolidon  
(w/v)  
1 % BSA (pH 7; w/v)

#### **ND 96-Lösung**

96 mM NaCl  
2 mM KCl  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
1,8 mM CaCl<sub>2</sub>  
5 mM HEPES

#### **10 x PBS**

1,3 M NaCl  
70 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
30 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### **Prähybridisierungslösung (4.2.6)**

6 x SSC  
5 x Denhardt's-Lösung  
10 mM NaCl  
0,5 % SDS  
30 % Formamid  
100 µg/ml denaturierte  
DNA aus Heringssperma

#### **Prähybridisierungslösung (4.7)**

5 x SSC (pH 4,5)  
0,1 % Tween-20  
50 % Formamid  
50 µg/ml Heparin  
100 µg/ml denaturierte  
tRNA aus Hefe

**Probenpuffer (RNA)**

MOPS-Laufpuffer  
0,1 mM EDTA  
6,5 % Formaldehyd (w/v)  
50 % Formamid (w/v)  
5 % Glycerol (w/v)  
2,5 % Bromphenolblau

**SM-Puffer**

100 mM NaCl  
10 mM MgSO<sub>4</sub>  
50 mM TRIS/HCl (pH 7,5)  
0,01 % Gelatine (w/v)

**50 x TAE Puffer**

2 M Tris  
6 % Eisessig (v/v)  
50 mM EDTA (pH 8)

**TFB I**

300 mM NaAc  
100 mM NaCl  
10 mM CaCl<sub>2</sub>  
50 mM MnCl<sub>2</sub>  
15 % Glycerol (w/v)

**Waschlösung (4.2.4)**

0,5 M TRIS (pH 7,5)  
2 x SSC

**6 x Probenpuffer (DNA)**

0,25 % Bromphenolblau  
30 % Glycerol

**20 x SSC**

150 mM NaCl  
15 mM Na-Citrat (pH 7)

**10 x TE-Puffer**

100 mM Tris/HCl (pH 8)  
10 mM EDTA

**TFB II**

10 mM NaMOPS  
10 mM NaCl  
75 mM CaCl<sub>2</sub>  
15 % Glycerol (w/v)

## 9.2 Primer

### 9.2.1 Primer für das murine *Kcnj14*-Gen

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
m ATG s	GAA TTC AAT GGG CCT GGC TAG GGC CCT
m Pseudo ATG s	GAA TTC CCA ATT CTA GAT GCT TGG ATG TCA G
m TGA as	CTC GAG TCA GAG GCT GGA AGG AAG CTG TC
r 8 s	GAA GAA GAG GAC ACT AAG G
m 1 s	GTG GGG GGG GAA TGT
m 2 as	TTA GGG GTT GGG GAG AAT
m 3 s	TAG GCT GGG AAC AGT
m 4 s	TCA ACC GAG TTC GGG TAC AGT CT
m 5 as	AGG AGG CGA GGA AGG AAC AGG
m 6 as	CAA ACC TGC AGA ACA ACA ACA
m 7 s	GCC CAA GAA ACG CAA CGA GAC ACT
m 8 as	CAG GAG GAG CAT CGG AGG AGG TAT
m 9 s	CAG AAA AAG AGC CCC AAC CAT ACT
m 10 as	GTT TTG CCT CCT ACG TTA TTA CCC
m 11 as	ACT CAG GAG CAA GGG AAG GCA GAA
m 12 s	TGT CTG CCT GCC TCT GTG CCT GTC
m 13 s	GGA CAG GGG TTT CTC AGG CTC AGT
m 14 as	CCT CCT CGG CCT TGT CTC TTG TAT
m 15 s	TGG GTT TTG GTT GGA CAT CAG T
m 16 as	CCC TGG CTG TCC TGG AAC TCA CT
m 17 s	GGT ACC CCT GAC ATT CCT GCC CAT TTT T
m 18 s	GTT GTT GTT CTG CAG GTT TGG GG
m 19 s	AAC ATA CTA GTG GGA AAG GGA ACA
m 20 s	GGG GGT AGG TAG GTC TGG CTT CTC
m 22 s	GGG TGT TCC TAG GGA TAG AGT TGT
m 23 s	AGT GAC AGA TGT GCA GGG TGA GC
m 24 as	ACT GAA CCA TGC CTG CCT CTA GCA
m 25 s	CAT GAC CTT GGC TGG CTT GCT AT
m 26 s	CAT TGG TAG GTT TCT GAG TGT GG
m 27 s	GGG GGT AGG TAG GTC TGG CTT CT
m 28 as	AGA CTG TAC CCG AAC TCG GTT GA

### 9.2.2 Primer für das humane *KCNJ14*-Gen

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
h chrlok s	CTG TGC TCC CTC CTG AGA AC
h chrlok as	GAC CAC CTA AGG AGG GAA GG

hEST1 s	TAG TTT CCC CGG CTC TCT
hEST2 as	TCC CTG GAG CCT TCA TT
hEST3 as	CCC ACA GAC TAA CAA
hEST4 s	TGA ATA CCG ACA GGC CT
hEST5 s	ATG AGC CTG ATT CCT CA
hEST6 s	TAC CTC CCT GGT GAA CTG CTC T
hEST7 as	TCT CAG GAG GGA GCA CAG AAG
h 6 as	CCA TCG TTC TAC CTC CCT ACC CCG
h 7 as	TCA CCT GTT CCC TTC CCC CTC CGG
h 8 as	TGA TAG CGG TGA AGG TAG CGT GAA
h 9 as	CGT TGC AGT GCC CGT CTT TCT TGA
h 10 s	CGC CCG CGC CCT GCT TCT CAC ACG
h 11 s	GTC GCT TCG TCA AGA AAG ACG
h 12 s	CTT CGT CGT GGG TGC TGT C
h 13 as	CCA TCC CCT CGA GAA TGA CCA CC
h 14 s	CCT GGA GGG GGC GTG GAC
h 15 as	TGA AGA AAA GGG TGA GAA CA
h 16 s	CAA AGA TGG GGT GGC CTC AGA TG
h 17 as	GCT TAG TGG CCT CAT CTG TCA AAT
h 18 s	AAA GTA CTT ACA ACA ACC TC
h 19 s	GGA GGT GGC AAC GAA ACG AAA CTG
h 20 as	TCA AAG CGA CAA CGG AAA ATA AGG
h 21 s	CAG CCT GGG CAA CAT AGT GAG
h 22 as	GTC GTG CTT TGT CGC CAG GCT
h 23 s	GCT GAG GCT GGA CTT GGA GAG GAT
h 24 as	GGC AAC TGC AAA CCC TTC C
h 25 as	GAG GTT GTT GTA AGT ACT TT
h 26 s	TTG AGG CCA GGA GTT TGA GAC CAG
h 27 as	CAC AAT CTC AGC TCA CCG CAA CC
h 28 as	TGA AGT GGG AGG TGG GCA TCT ATC
h 29 as	CTC AAG TCA CAG GCC TCC GA
h 30 as	GCT CTG TAT GCC CCA AAT CCA
h 31 as	ACA TGA GGC AGA GGC GGT GGT C
h 32 as	TGG GAT TAC AGG CGT GAG C
h 33 as	CCC CAT TCC CTT CCT CAG TCT CAT
h 34 as	CAG GAG GGA GCA CAG AAG CAG A
h 35 as	CAT TGG CTT CTC ACC CTG GTC A
h 36 s	AAG GAG GGA AGG TTA TGG AAT GC
h 37 s	TGT AGA GCA CCC AGC CAA GAG AAT
h 38 s	AGG CGG ATC ACG AGG TCA GGA GA
h 39 s	GCG GAG ATT GCA GTA AGC CAG GAT
h 40 s	AGT GGT GGG TGC AGA ATG TTG G
h 41 s	CGC CCC TCT TCC CGT TTT CTA C
h 42 s	ATG TGG ATG TGG GCT TTG ATG GAG
h 43 s	CCT GCC TGA AGC TTT GAG ATA CCA



### 9.3 Abkürzungen & Symbole

A	Ampere
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaar
C	Cytidin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHAPS	3-(3-Cholamidopropyl)diethylamino-1-propansulfonat
cpm	<i>counts per minute</i> , radioaktive Zerfälle pro Minute
cR	CentiRay
Da	Dalton
dCTP	desoxy-Cytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
dUTP	desoxy-Uridintriphosphat
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EST	<i>expressed sequence tag</i>
F	Farad
x g	x fache Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanidin
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
kb	Kilobasen
Kir	<i>K<sup>+</sup> inward rectifier</i> , K <sup>+</sup> -Gleichrichter Wellenlänge des Lichts
μ	mikro
m	milli
M	molar
Mb	Megabasen
Min.	Minute
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Messenger Ribonukleinsäure
M	Megaohm
n	nano
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte physiologische Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure

RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
T <sub>m</sub>	Schmelzpunkt doppelsträngiger DNA
Tris	Tri(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i> , Enzymeinheit
UTR	untranslatierte Region
V	Volt
w/v	<i>weight/volume</i> , Gewicht-Volumen-Verhältnis

Aminosäuren wurden mit dem Einbuchstabencode abgekürzt

### 9.4 Glossar

Allel	eine von beiden Zustandsformen eines Gens in diploiden Organismen
Ataxie	Gangunsicherheit
CentiRay	Maß für Entfernungen auf einem Gen. 1 CentiRay (cR) entspricht einer 1%igen Wahrscheinlichkeit, daß ein Chromosom zwischen zwei polymorphen Markern bricht.
Contig	überlappende genomische Klone (Klon-Contig) oder Sequenzen (Sequenz-Contig)
Deletion	Auslassung einer oder mehrerer Basen bzw. Aminosäuren in einer Sequenz
dominant	Eigenschaft eines Allels, das in einer Heterozygote den Phänotyp bestimmt
Dystonie	fehlerhafter Muskeltonus
embryonale Stammzellen	pluripotente Stammzellen, die aus Blastocysten gewonnen werden
EST	Sequenz eines cDNA-Klons zur Identifizierung von Sequenzen exprimierter Gene
Expression	Umsetzung der Information eines Gens durch Transkription und Translation
<i>gating</i>	Öffnungs- und Schließverhalten des Kanals
genomischer DNA-Klon	Vektor, der eine genomische Sequenz enthält
Herzblock	Blockierung der Reizleitung des Herzens
Homeobox	Sequenz im Bereich der homeotischen Gene, welche in der frühen Embryonalentwicklung exprimiert werden
Hybridisierung	Basenpaarung zwischen komplementären DNA- oder RNA-Strängen
Knock-out	gezielte Deaktivierung eines Gens durch homologe Rekombination
Kopplungsanalyse	Analyse gekoppelter vererbter Marker zur Identifikation neuer Krankheitsgene
Morphogen	embryonaler Entwicklungsfaktor
Northern-Blot	Transfer von RNA z. B. auf eine Membran
Ortholog	Pendant eines Gens in einer anderen Spezies
Paralog	intragenomische Genkopie
Paralyse	Lähmung
Primer	Oligonukleotid, das nach Hybridisierung mit einzelsträngiger Nukleinsäure das Startsignal für DNA- oder RNA-Polymerasen liefert
Promotor	RNA-Polymerase-Bindungsstelle, Ort der durch regulatorische Elemente initiierten Transkription
Pseudogen	genomischer Bereich hoher Homologie mit einem aktiven Gen, der aufgrund von Mutationen funktionslos geworden ist
rezessiv	Eigenschaft eines Allels, das im Phänotyp einer Heterozygote vom dominanten Allel verdeckt wird
Skoliose	seitliche Verkrümmung der Wirbelsäule
Southern-Blot	DNA-Transfer, z. B. auf eine Membran
Spleißen	Herausschneiden der Introns und Verbinden der Exons in der RNA

Syndaktylie	angeborene Verwachsung der Finger und/oder Zehen
Syntänie	identische lineare Anordnung
Wildtyp	Normalzustand eines Gens

## **10 Publikationsliste**

- Töpert, C.; Döring, F.; Derst, C.; Daut, J.; Grzeschik, K.-H. & Karschin, A. (2000): **Cloning, structure and assignment to Chromosome 19q13 of the human Kir2.4 inwardly rectifying potassium channel gene (*KCNJ14*)**. Mamm. Genome 11: 247 - 249.
- Wischmeyer, E.; Döring, F.; Töpert, C.; Derst, C.; Daut, J. & Karschin, A. (1999): **Two novel inward rectifier K<sup>+</sup> channels with unique permeation properties**. Pflügers Arch. Suppl. 437: R43.
- Döring, F.; Töpert, C.; Wischmeyer, E.; Karschin, C.; Brockhaus, J.; Balanyi, K.; Derst, C. & Karschin, A. (1998): **Kir2.4: A novel K<sup>+</sup> inward rectifier channel associated with motoneurons of cranial nerve nuclei**. Pflügers Arch. Suppl. 435: R56.
- Döring, F.; Töpert, C.; Karschin, C. & Karschin, A. (1998): **A novel G-protein-coupled receptor with similarities to the family of biogenic amine receptors**. 26. Göttinger Neurobiology Report; pg 653; Thieme; Stuttgart.
- Töpert, C.; Döring, F.; Karschin, C.; Wischmeyer, E.; Derst, C. & Karschin, A. (1998): **Kir2.4: A novel K<sup>+</sup> inward rectifying K<sup>+</sup> channel predominantly expressed in motoneurons of cranial nerve nuclei**. 26. Göttinger Neurobiology Report; pg 653; Thieme; Stuttgart.
- Töpert, C.; Döring, F.; Wischmeyer, E.; Karschin, C.; Brockhaus, J.; Balanyi, K.; Derst, C. & Karschin, A. (1998): **Kir2.4: A novel K<sup>+</sup> inward rectifier channel associated with motoneurons of cranial nerve nuclei**. J. Neurosci. 18: 4096 - 4105.

# 11 Lebenslauf

geboren	am 08.03.1971 in Berlin
Eltern	Dr. rer. nat. Michael Töpert; Diplom-Chemiker Dr. med. Monika Töpert, geb. Schröder; Internistin

## **Promotion**

5/1998 - 1/2004	Promotion am Max-Planck-Institut (MPI) für biophysikalische Chemie in Göttingen; Abteilung "Membranbiophysik" von Prof. Dr. E. Neher, Nachwuchsarbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Karschin (Universität Würzburg). Universitäre Betreuung durch Prof. Dr. Tosso Leeb, Tierärztliche Hochschule Hannover.  Enge Kooperation mit der Abteilung "Molekulare Zellbiologie" von Prof. Dr. P. Gruß, ebenfalls am MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen.
-----------------	--

## **Studium**

6/1996 - 5/1998	Diplomarbeit am MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen; Abteilung "Membranbiophysik" von Prof. Dr. E. Neher; eigenständige Nachwuchsarbeitsgruppe von PD Dr. A. Karschin.
10/1991 - 6/1996	Studium der Biologie an der Georg-August-Universität in Göttingen; Studienschwerpunkte: Biochemie, organische Chemie und Mikrobiologie.
6/1991	Allgemeine Hochschulreife am Gymnasium Pädagogium Bad Sachsa.

## **Praktika**

5/1996	MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen; Abteilung "Membranbiophysik" von Prof. Dr. E. Neher; Arbeitsgruppe PD Dr. A. Karschin.
7/1993 - 8/1993	MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen; Abteilung "Molekulare Biologie" von Prof. Dr. T. Jovin; Arbeitsgruppe Prof. Dr. K.-H. Scheit.
7/1992 - 8/1992	MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen; Abteilung "Molekulare Biologie" von Prof. Dr. T. Jovin; Arbeitsgruppe Prof. Dr. K.-H. Scheit.
9/1991 - 10/1991	FU Berlin; Institut für Immunologie; Abteilung Prof. Dr. T. Diamantstein.

### 12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. A. Karschin für die Überlassung des Themas der Doktorarbeit, seiner Anleitung und steten Bereitschaft zur Unterstützung.

Mein Dank gilt gleichermaßen Herrn Prof. T. Leeb, der die extern angefertigte Arbeit mit Rat und Tat betreut und im Fachbereich Biologie der Universität Hannover vertreten hat.

Herrn Prof. E. Neher und Herrn Prof. P. Gruß danke ich für die Bereitstellung von Labor- und Schreibplätzen in ihren Abteilungen, sowie allen notwendigen Arbeitsmitteln.

Für Anleitung und Hilfe in molekularbiologischen Fragen und Techniken möchte ich besonders Herrn Dr. F. Döhring und Herrn Dr. R. Nehring vielmals danken. Unser aller Laboralltag wäre ohne die technische Assistenz von Herrn D. Reuter nicht so störungsfrei verlaufen.

Frau Dr. M.-B. Becker und Herrn Dr. J. Berger gilt mein Dank für ihre große Hilfsbereitschaft in jeder Beziehung und ihre zahlreichen guten Ratschläge bei Problemen mit der Knock-out-Technik.

Mein herzlicher Dank gilt Frau S. Eckert und und Frau M. Daniel, die mir geduldig den Gebrauch der verschiedenen Dünnschnittapparaturen vermittelten und mich in die verschiedenen *in situ*-Techniken einwiesen. Besonders dankbar bin ich auch für die Diskussion und Hilfe bei der Interpretation der *in situ*-Ergebnisse durch Frau Prof. A. Stoykova und Frau Dr. C. Karschin.

Dankbar für Anleitung und Hilfe bei der Durchführung der Elektrophysiologie bin ich Herrn Prof. E. Wischmeyer.

Für die gute Zusammenarbeit bei der chromosomalen Lokalisation des *KCNJ14*-Gens möchte ich besonders Herrn Prof. K.-H. Grzeschik, Herrn Prof. J. Daut und Herrn Dr. C. Derst danken.

Meinem Bruder Florian danke ich herzlich für sein Interesse an der Arbeit, sowie für seine Anregungen und Vorschläge.

Meinen Eltern und meiner Freundin Kristina danke ich für ihre Geduld, guten Ratschläge und die liebevollen Ermutigungen, die mir die Kraft zum Durchhalten gaben.