

# Das Protein rEAG2

und

## die immunhistochemische Bestimmung der Lokalisation *ether-à-go-go* homologer Proteine im zentralen Nervensystem der Ratte

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von  
Dipl.-Biochem. Rüdiger Weseloh  
geboren am 11. Januar 1966 in Braunschweig

**1997**

[Weseloh@mail.mpiem.gwdg.de](mailto:Weseloh@mail.mpiem.gwdg.de)

Referent: PD Dr. Walter Müller  
Koreferent: Prof. Dr. Olaf Pongs  
Tag der Promotion: 18. Dezember 1997  
Datum der Veröffentlichung: 9. 2. 1998

---

## **Abstract (deutsch)**

Im Rahmen dieser Arbeit wird ein ether-à-go-go homologes Protein der Ratte (rEAG2) anhand der von der cDNA translatierten Proteinsequenz beschrieben. Es werden in der Proteinsequenz vorhandene Kaliumkanal-spezifische Sequenzmotive und für diese Proteinklasse ungewöhnliche Motive diskutiert.

Die immunhistochemisch bestimmte Verteilung dieses Proteins und den homologen Proteinen rEAG1 und rERG im zentralen Nervensystem der Ratte werden beschrieben und diskutiert.

---

## **Abstract (english)**

The protein sequence of a ether-à-go-go homolog protein of the rat (rEAG2) is described on the basis of the translation of the corresponding cDNA sequence. Sequence motives, for potassium channels common ones and for this class of proteins unusual ones, are discussed.

The immunohistochemical determined distribution of this protein and the homolog proteins rEAG1 and rERG in the central nervous system of the rat is described and discussed.

---

## **Schlagworte**

Kaliumkanäle, ether-à-go-go, Immunhistochemie

---

## **Keywords**

potassium channels, ether-à-go-go, immunohistochemistry

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungen und Glossar .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>16</b>
3.1.1	Säuren, Laugen, Salze und Puffer .....	16
3.1.2	Lösungsmittel .....	16
3.1.3	Lösungen.....	16
3.1.4	Proteine, Peptide und Protease-Inhibitoren .....	17
3.1.5	Farbstoffe und Substrate.....	17
3.1.6	Andere Chemikalien .....	17
3.1.7	Mono-, Oligo- und Polynukleotide .....	18
3.1.8	Plasmidvektoren.....	18
3.1.9	<i>E.coli</i> -Bakterienstämme .....	18
3.1.10	Kits .....	18
3.1.11	Sonstiges Material.....	18
<b>3.2</b>	<b>Puffer und Lösungen.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>29</b>
3.3.1	Durchführung von Klonierungen .....	29
3.3.2	Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	29
3.3.2.1	Herstellung von LB-, LB <sub>amp</sub> - und LB <sub>TET</sub> -Platten .....	29
3.3.2.2	Herstellung kompetenter Bakterien .....	30
3.3.2.3	Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA aus Ligationen.....	30
3.3.2.4	Retransformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA .....	30
3.3.2.5	Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA-Lösungen.....	30
3.3.2.6	Ethanol-Präzipitation von DNA.....	31
3.3.2.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus 3ml Kulturen (DNA-Minipräp).....	31
3.3.2.8	Isolierung von Plasmid-DNA aus 50ml Kulturen (DNA-Midipräp).....	31
3.3.3	Modifikation von DNA .....	32
3.3.3.1	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und cDNA .....	32
3.3.3.2	Auffüllen von Einzelstrangüberhängen .....	32
3.3.3.3	Abbau von DNA-Einzelstrangüberhängen .....	32
3.3.3.4	Phosphorylierung.....	32
3.3.3.5	Dephosphorylierung.....	33
3.3.3.6	Ligation.....	33
3.3.4	Extraktion von DNA aus Agarosegelen .....	33
3.3.5	Sequenzierung .....	33
3.3.6	Molekularbiologische Gelelektrophorese-Techniken .....	34
3.3.6.1	DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	34
3.3.6.2	DNA-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	34
3.3.7	PCR zur <i>in vitro</i> -Mutagenese .....	35
3.3.7.1	PCR .....	35
3.3.7.2	Overlap-PCR .....	36



---

<b>3.4</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b> .....	<b>37</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Allgemeine proteinbiochemische Methoden</b> .....	<b>37</b>
3.4.1.1	Dialyse von Proteinlösungen .....	37
3.4.1.2	Einfrieren und Lagerung von Proteinlösungen .....	37
3.4.1.3	Ultraschallbehandlung von Bakterienkulturen und Proteinlösungen .....	37
3.4.1.4	Bestimmung der Proteinkonzentration mit <i>Coomassie</i> -Farbstoff .....	37
3.4.1.5	Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bicinchonininsäure .....	37
<b>3.4.2</b>	<b>Molekularbiologische Gelelektrophorese-Techniken</b> .....	<b>38</b>
3.4.2.1	Analytische SDS-PAGE .....	38
3.4.2.2	Präparative <i>Laemmli</i> -SDS-PAGE .....	39
3.4.2.3	Elektroelution von Proteinen aus der SDS-PAGE .....	40
<b>3.4.3</b>	<b>Herstellen von Membranpräparationen</b> .....	<b>40</b>
3.4.3.1	Membranpräparation aus nativem Gewebe.....	40
3.4.3.2	Membranpräparation aus Gewebekulturzellen .....	40
<b>3.4.4</b>	<b>Überexpression von Fusionsproteinen in <i>E. coli</i></b> .....	<b>40</b>
3.4.4.1	Überexpression von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen .....	40
3.4.4.2	Überexpression von (His) <sub>10</sub> -Tag-Fusionsproteinen .....	41
<b>3.4.5</b>	<b>Aufreinigung von Fusionsproteinen</b> .....	<b>41</b>
3.4.5.1	Löslichkeitstest für Fusionsproteine .....	41
3.4.5.2	Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen mit Glutathion-Agarose .....	41
3.4.5.3	Aufreinigung von (His) <sub>10</sub> -Tag-Fusionsproteinen mit Ni <sup>2+</sup> -Chelat-Affinitätschromatographie unter nicht denaturierenden Bedingungen .....	42
3.4.5.4	Aufreinigung von (His) <sub>10</sub> -Tag-Fusionsproteinen mit Ni <sup>2+</sup> -Chelat Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen .....	42
3.4.5.5	Alternative Aufreinigungsmethode für Fusionsproteine.....	43
3.4.5.6	Testen aufreinigter Fusionsproteine.....	43
<b>3.5</b>	<b>Allgemeine immunologische Methoden</b> .....	<b>43</b>
<b>3.5.1</b>	<b>Vorbereitung von Antigenen für die Immunisierung von Kaninchen</b> .....	<b>43</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Immunisierung von Kaninchen und Gewinnung von Blut</b> .....	<b>43</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Behandlung des Rohserums immunisierter Kaninchen</b> .....	<b>43</b>
<b>3.5.4</b>	<b>Affinitätsreinigung von Antikörpern</b> .....	<b>44</b>
<b>3.5.5</b>	<b>ELISA</b> .....	<b>44</b>
<b>3.5.6</b>	<b>IgG-Test im Sandwich-ELISA</b> .....	<b>45</b>
<b>3.5.7</b>	<b>Kompetitiver ELISA</b> .....	<b>45</b>
<b>3.5.8</b>	<b>Dot-Blot</b> .....	<b>46</b>
<b>3.5.9</b>	<b>Western-Blot</b> .....	<b>46</b>
<b>3.5.10</b>	<b>Detektion von Proteinen im Western-Blot mit ECL</b> .....	<b>47</b>
<b>3.6</b>	<b>Immuncytochemie</b> .....	<b>47</b>
<b>3.6.1</b>	<b>Fixierung von Zellen für die Immuncytochemie</b> .....	<b>47</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Immuncytochemie überexprimierender Zellen</b> .....	<b>47</b>
<b>3.7</b>	<b>Immunhistochemie</b> .....	<b>47</b>
<b>3.7.1</b>	<b>Vorbereitende Methoden</b> .....	<b>47</b>
3.7.1.1	Silanisierung von Objektträgern .....	47
3.7.1.2	Vorbereitung des Gewebes für die Immunhistochemie .....	48
3.7.1.3	Anfertigen von Gewebsschnitten am Gefriermikrotom.....	49
<b>3.7.2</b>	<b>Behandlung von Gewebsschnitten im <i>free floating</i>-Verfahren mit der ABC-DAB/Ni<sup>2+</sup>-Methode</b> .....	<b>49</b>

---

<b>3.7.3</b>	<b>Konservierung und Dokumentation immunhistochemischer Präparate</b> .....	50
3.7.3.1	Entwässern und Eindeckeln von Gewebeschnitten .....	50
3.7.3.2	Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse und fotografieren am Lichtmikroskop .....	50
3.7.3.3	Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse und Fotografieren am konfokalen Mikroskop .....	50
<b>3.8</b>	<b><i>In-situ</i>-Hybridisierung</b> .....	<b>51</b>
<b>3.8.1</b>	<b>Vorbereitende Methoden</b> .....	<b>51</b>
3.8.1.1	Silianisierung von Objektträgern .....	51
3.8.1.2	Vorbereitung des Gewebes .....	51
3.8.1.3	Anfertigen von Gewebsschnitten .....	51
<b>3.8.2</b>	<b>Herstellung von cRNA-Sonden</b> .....	<b>51</b>
<b>3.8.3</b>	<b>Hybridisierung</b> .....	<b>51</b>
<b>3.9</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>52</b>
<b>3.9.1</b>	<b>Beschichtung von Glas mit Poly-L-Lysin</b> .....	<b>52</b>
<b>3.9.2</b>	<b>Zellkultur humaner embryonaler Nierenzellen (HEK 293)</b> .....	<b>52</b>
3.9.2.1	Kultivierung .....	52
3.9.2.2	Kryokonservierung .....	53
<b>3.9.3</b>	<b>Transiente Transfektion von Gewebekulturzellen mit CaPO<sub>4</sub>-Methode zur heterologen Überexpression von Proteinen unter Kontrolle des CMV-Promotors</b> .....	<b>53</b>
<b>3.9.4</b>	<b>Stabile Transfektion von Gewebzellen zur heterologen Überexpression von Proteinen unter Kontrolle des CMV-Promotors</b> .....	<b>54</b>
<b>3.10</b>	<b>Datenverarbeitung am Computer</b> .....	<b>55</b>
<b>3.10.1</b>	<b>Auswertung von Daten des ELISA-Lesegeräts mit <i>Excel</i></b> .....	<b>55</b>
3.10.1.1	Auswertung der Daten des ELISAs .....	55
3.10.1.2	Auswertung der Daten des IgG-Tests .....	55
3.10.1.3	Auswertung der Daten des kompetitiven ELISAs .....	56
<b>3.10.2</b>	<b>Sequenzanalysen mit <i>gcg</i></b> .....	<b>56</b>
3.10.2.1	Erstellung eines Sequenzvergleichs .....	56
3.10.2.2	Erstellung eines Dendrogramms .....	57
<b>3.10.3</b>	<b>Erstellung eines Hydropathieplots</b> .....	<b>57</b>
<b>3.10.4</b>	<b>Erstellung eines Homologievergleichs</b> .....	<b>58</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Die Proteinsequenz des Kaliumkanals rEAG2</b> .....	<b>60</b>
	Die rEAG2 Proteinsequenz .....	61
<b>4.2</b>	<b>Die Strukturklasse, die Familie und die Subfamilie des <i>reag2</i>-Gens</b> .....	<b>61</b>
	Vergleich der Sequenzen innerhalb der <i>eag</i> -Genfamilie. ....	62
	Darstellung der Verwandtschaft der rEAG2-Sequenz mit anderen Ionenkanälen im Dendrogramm .....	62
<b>4.3</b>	<b>Sequenzmotive in rEAG2</b> .....	<b>63</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Das <i>bipartite-nuclear-targeting</i>-Signal</b> .....	<b>63</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Ein mögliches hydrophobes <i>Cluster</i> in Proteinen der <i>eag</i>-Familie</b> .....	<b>64</b>
	Modelle der Anordnungen von <i>Aminosäureclustern</i> in $\alpha$ -Helix und <i>coiled-coil</i> .....	64
	Sequenzvergleich der Bereiche von <i>Leucine-Zippern</i> in Kernproteinen mit den Bereichen möglicher hydrophober <i>Cluster</i> in Proteinen der <i>eag</i> -Familie .....	65
	Strukturvoraussagen nach Chou-Fasman und Garnier-Osguthorpe-Robson .....	66

---

<b>4.4</b>	<b>Die Herstellung von Antikörpern gegen rEAG1, rEAG2 und rERG .....</b>	<b>67</b>
	Hydrophathie von rEAG2 und Sequenzähnlichkeit von rEAG2 zu rEAG1 und rERG .....	67
<b>4.4.1</b>	<b>Die Charakterisierung der Antikörper .....</b>	<b>68</b>
	ELISA der vorbehandelten (P/D) arEAG1-, arEAG2- und arERG-Rohseren .....	68
	ELISA der affinitätsgereinigten arEAG1-, arEAG2- und arERG-Antikörper .....	69
	Kompetitiver ELISA der affinitätsgereinigten arEAG1-, arEAG2- und arERG-Antikörper .....	69
	IgG-Bestimmung der affinitätsgereinigten arEAG1-, arEAG2- und arERG-Antikörper.....	70
<b>4.5</b>	<b>Bestimmung der Verteilung von rEAG1, rEAG2 und rERG im ZNS der Ratte im <i>Western-Blot</i> .....</b>	<b>71</b>
	<i>Western-Blots</i> von K <sub>v</sub> 1.4, rEAG1 und rEAG2 heterolog exprimierenden Gewebekulturzellen.....	71
	<i>Western-Blots</i> von Membranfraktionen aus nativem Gewebe.....	72
<b>4.6</b>	<b>Immuncytochemische Detektion von rEAG1, rEAG2 und rERG in heterolog Protein - exprimierenden Gewebekulturzellen.....</b>	<b>73</b>
<b>4.7</b>	<b>Bestimmung der Verteilung der Proteine rEAG 1, rEAG2 und rERG im ZNS der Ratte durch <i>in-situ</i>-Hybridisierung und Immunhistochemie.....</b>	<b>74</b>
	Sagittalschnitte durch das Rattenhirn.....	75
	Koronarschnitte durch das Rattenhirn.....	76
	Die Großhirnrinde ( <i>Cortex cerebri</i> ).....	77
	Der Hippocampus und <i>Gyrus dentatus</i> .....	78
	Das hippocampale Feld CA1 .....	79
	Das Septum.....	79
	Das Kleinhirn ( <i>Cerebellum</i> ).....	80
	Die <i>Substantia nigra</i> .....	82
	Der olfaktorische Bulbus ( <i>Bulbus olfactorius</i> ) .....	83
	Der supraoptische Nukleus ( <i>Nucleus supraopticus</i> ) .....	84
	Die Hypophyse .....	85
	Das <i>Ganglion vestibulocochlearis</i> .....	86
	Das <i>Ganglion cervicale superior</i> .....	87
	Ausschnitte der rEAG1-IHC.....	88
	Ausschnitte der rEAG2-IHC.....	89
	Ausschnitte der rERG-IHC .....	90
<b>4.8</b>	<b>Tabellarische Auswertung der arEAG1, arEAG2 und rERG IHC-Signale im ZNS.....</b>	<b>91</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>98</b>
<b>5.1</b>	<b>rEAG2 .....</b>	<b>98</b>
<b>5.2</b>	<b>Sequenzmotive in rEAG2 .....</b>	<b>98</b>
<b>5.3</b>	<b>Die Antikörper gegen rEAG1, rEAG2 und rERG .....</b>	<b>102</b>
<b>5.3.1</b>	<b><i>Western-Blots</i> mit arEAG1- und arEAG2-Antikörpern.....</b>	<b>102</b>
<b>5.3.2</b>	<b><i>Western-Blots</i> mit arERG-Antikörpern .....</b>	<b>103</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Blockieren der arEAG1-, arEAG2- und arERG-Immunreaktivität durch Vorinkubation der Antikörper mit dem Antigen.....</b>	<b>103</b>
<b>5.4</b>	<b>Anmerkungen zur arEAG1- und arEAG2-Immunhistochemie.....</b>	<b>104</b>
<b>5.5</b>	<b>Immuncytochemie .....</b>	<b>105</b>

---

---

<b>5.6</b>	<b>Die Verteilung der Proteine im ZNS.....</b>	<b>105</b>
5.6.1	rEAG1 und rEAG2.....	105
5.6.2	rERG.....	106
<b>5.7</b>	<b>arEAG1- und arEAG2- Immunreaktivität in Zellkernen? Eine Hypothese .....</b>	<b>107</b>
<b>5.8</b>	<b>In welchem Gewebe besteht die Chance der elektrophysiologischen Charakterisierung eines nativen rEAG2 vermittelten K<sup>+</sup>-Stroms?.....</b>	<b>108</b>
<b>5.9</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>110</b>
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>111</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>126</b>
<b>8.1</b>	<b>Primer.....</b>	<b>126</b>
<b>8.2</b>	<b>Vektoren und Proteine.....</b>	<b>127</b>
<b>8.2.1</b>	<b>reag1-Vektoren .....</b>	<b>127</b>
8.2.1.1	pcreag1.....	127
8.2.1.2	Proteindaten rEAG1.....	127
8.2.1.3	pGreag1CG .....	128
8.2.1.4	GST-rEAG 1CG .....	128
8.2.1.5	pEreag1C .....	129
8.2.1.6	(His) <sub>10</sub> -rEAG 1C .....	129
8.2.1.7	pSR1ISH.....	130
8.2.1.8	pKR1ISH .....	130
<b>8.2.2</b>	<b>reag 2-Vektoren .....</b>	<b>131</b>
8.2.2.1	pcreag2.....	131
8.2.2.2	Proteindaten rEAG2.....	131
8.2.2.3	pGreag2CG .....	132
8.2.2.4	GST-rEAG 2CG .....	132
8.2.2.5	pEreag2C .....	133
8.2.2.6	(His) <sub>10</sub> -rEAG 2C .....	133
8.2.2.7	pSr2ISH .....	134
8.2.2.8	pKr2ISH.....	134
<b>8.2.3</b>	<b>rerg-Vektoren.....</b>	<b>135</b>
8.2.3.1	pGreg.....	135
8.2.3.2	GST-rERG .....	135
8.2.3.3	pEreg .....	136
8.2.3.4	(His) <sub>10</sub> -rERG.....	136
	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>137</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>138</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärungen .....</b>	<b>139</b>

---

# 1 Abkürzungen und Glossar

A	Ampère	DAB	3,3'-Diaminobenzidin
A	Alanin	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's-Medium
A	Adenin	DEPC	Diethylpyrocarbonat
Abb.	Abbildung	DIC	differentieller Interferenzkontrast ( <i>differential interference contrast</i> ; mikroskopische Methode)
ABC	Peroxidase-Avidin/Biotin-Komplex	DMSO	Dimethylsulfoxid
ABTS	(2,2-Azino-bis-[3-ethylbenzthiazolin]-6-sulfonsäure) Diammoniumsalz	DNA	Desoxyribonukleinsäure
Ac	Acetat	DNase	Desoxyribonuklease
a.d.	mit Aqua Millipore auffüllen auf	dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
amp	Ampicillin	DTT	Dithiothreitol
Anm.	Anmerkung	E	Glutamat
APS	Ammoniumperoxodisulfat	ECL	verstärkte Chemielumineszenz ( <i>enhanced chemilumineszenz</i> )
Aqua dem.	demineralisiertes Wasser	<i>E. coli</i>	Darmbakterium <i>Escherichia Coli</i>
Aqua Millipore	entmineralisiertes Wasser	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
AS	Aminosäure(n)	ELISA	Enzym gekoppelter Immunoabsorptionstest ( <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> )
ATP	Adenosintri-phosphat	<i>et al.</i>	und andere
BCA	Bicinchonininsäure (4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolin)	EtBr	Ethidiumbromid
BES	2-[bis(Hydroxyethyl)amino]-ethansulfonsäure	EtOH	Ethanol
BGaR	biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper	F	Phenylalanin,
<i>Bind</i> -Silan	3-Methacryloxypropyl-trimethoxysilan	FCS	fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
bp	Basenpaar(e)	g	Gramm
BSA	Rinderserumalbumin	G	Glycin
BSA-OAc	acetyliertes BSA	G	Guanin
C	Cytosin	GaR	Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper ( <i>goat-anti-rabbit</i> )
C	Cystein	GST	Glutathion-S-Transferase aus <i>Shistosoma japonicum</i>
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure	h	Stunde(n)
Ci	Curie	H	Histidin
CMV	Cytomegalovirus	HAc	Essigsäure
cpm	Zählereignisse pro Minute ( <i>counts per minute</i> )	HEK 293	Tumorzelllinie aus humanem embryonalem Nierengewebe ( <i>human embryonic kidney</i> )
Cy3	Fluoreszenzfarbstoff		
Cy3-GaR	mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper		
D	Aspartat		
Da	Dalton		

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino)-ethansulfonsäure	NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
(His) <sub>10</sub> -Tag	Ein zur spezifischen Aufreinigung verwendbarer, aus zehn hintereinander folgenden Histidinen bestehender aminoterminaler Proteinanteil	NTA	Nitrilotriessigsäure ( <i>nitrilotriacetic acid</i> )
I	Isoleucin	OD	optische Dichte
I.E.	internationale Einheit	ORF	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
IgG	Immunglobulin G	p	Pico (10 <sup>-12</sup> )
Insert	In einen Plasmidvektor eingefügter Bereich einer cDNA	P	Prolin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	PAG	Polyacrylamidgel
J	Joule	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
k	Kilo (10 <sup>3</sup> )	PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
K	Lysin	PGaR	Peroxidase-gekoppelter-Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper
KAc	Kaliumacetat	P <sub>i</sub>	Phosphat
kb	Kilobasenpaare	PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
Kit	kommerziell erhältliche Zusammenstellung, des zur Durchführung eines Experiments erforderlichen Materials	PLL	Poly-L-Lysin
l	Liter	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
L	Leucin	PNK	Polynukleotidkinase
LB	Luria Bertani	Primer	Oligonukleotid zum Starten einer DNA-Synthesereaktion
Lsg.	Lösung	PVDF	Polyvinylidendifluorid
-lsg	-lösung	Q	Glutamin
m	Milli (10 <sup>-3</sup> )	R	Arginin
M	Methionin	<i>Repel</i> -Silan	Dimethyldichlorsilan-Lösung in CHCl <sub>3</sub>
M	Molar	RIgG	Kaninchen-IgG
min	Minute(n)	RNA	Ribonukleinsäure
MMP	Magermilchpulver	RNase	Ribonuklease
mm Hg	veraltete, in der Medizin noch gebräuchliche, Einheit für Druck (750mm Hg ≅ 1Bar)	RT	Raumtemperatur
MOPS	(4-(N-Morpholino)-propan)-sulfonsäure	s	Sekunde
mRNA	Boten- ( <i>messenger</i> ) Ribonukleinsäure	S	Serin
n	Nano (10 <sup>-9</sup> )	SDS	Natriumdodecylsulfat
N	Asparagin	T	Threonin
NGS	Ziegen-Normalserum ( <i>normal goat serum</i> )	T	Thymin
		Tab.	Tabelle
		Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
		TEA	Tetraethylammonium
		TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
		Template	DNA, die als Matrize für die DNA-Synthese eingesetzt wird

---

Tris	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit
UKE	Universitätskrankenhaus Eppendorf
üN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
V	Valin
V	Volt
Vol.	Volumen
W	Tryptophan
<i>Western-Blot</i>	Überführen von Proteinen im elektrischen Feld von einer SDS-PAGE, senkrecht zur Trennungsrichtung, auf eine proteinbindende Membran
×g	multipliziert mit der relativen Erdbeschleunigung
Y	Tyrosin
@	bei
μ	Micro (10 <sup>-6</sup> )

---

## 2 Einleitung

Für die Stabilisierung des Membranpotentials von erregbaren und nicht-erregbaren Zellen sowie die Modulation des Ruhepotentials und die Form und Dauer von Aktionspotentialen in Neuronen, Muskelzellen und endokrinen Zellen sind Kalium ( $K^+$ )-Kanäle von zentraler Bedeutung<sup>65,139</sup>.

Die Fähigkeit von Zellen und Geweben, bedingt durch  $K^+$ -Kanäle, das Membranpotential, die Erregbarkeit oder deren zeitlichen Verlauf zu regulieren, ist durch eine Vielzahl von  $K^+$ -Genen bedingt, die ontogenetischer<sup>46</sup> oder zell- bzw. gewebespezifischer Expressionsregulation unterliegen<sup>176</sup>. Eine weitere Spezialisierung erreichen Zellen durch subzelluläre Separation exprimierter Kanäle, in Epithelien durch den spezifischen Einbau in basolaterale oder apikale Membranareale und in neuronalem Gewebe in somatodendritische oder axonale Bereiche<sup>151,152,178,185</sup>. Die Bildung unterschiedlicher heteromultimerer Kanäle und die Beeinflussung dieser durch akzessorische Untereinheiten, führt zu einer weiteren Diversifikation der zellulären Elektrophysiologie. Auch sind  $K^+$ -Kanäle häufig die Effektoren von *second-messenger*-Kaskaden, durch deren Signale, vermittelt beispielsweise durch Kinasen/Phosphatasen<sup>36,45,81,112</sup>, G-Proteine<sup>67</sup> oder  $Ca^{2+}$ -Ionen<sup>159</sup>, die Kanalaktivität moduliert wird.

Durch klassische genetische Untersuchungen an der Taufliege *Drosophila melanogaster* wurden Genloci charakterisiert, in denen Mutationen zu abnormalem motorischen Verhalten führen<sup>188</sup>. Die Auswirkungen auf die Motorik sind dabei u. a. abnorme Schüttelbewegungen unter Ethernarkose [*Shaker* (*Sh*), *ether-à-go-go* (*eag*)<sup>83</sup>, *slowpoke* (*slo*)<sup>187</sup> und *hyperkinetik* (*Hk*)] und temperaturabhängige Paralyse [*seizure* (*sei*)<sup>71</sup>, *slo*, *Hk*].

Die elektrophysiologische Charakterisierung dieser Fliegenmutanten zeigte veränderte (*Sh*) oder spontane (*eag*, *Hk*) Aktionspotentiale in Motorneuronen wie auch abnormale  $K^+$ -Ströme in den Muskeln (*Sh*, *eag*, *Hk*, *slo*). So werden durch Mutationen im *eag*-Locus alle im Muskel der Fliegenlarve identifizierten  $K^+$ -Ströme, der transiente ( $I_A$ ) und der nicht-inaktivierende (*delayed rectifier*) ( $I_K$ ) spannungsabhängige  $K^+$ -Strom sowie der schnelle ( $I_{CF}$ ) und der langsame ( $I_{CS}$ )  $Ca^{2+}$ -aktivierte  $K^+$ -Strom verändert<sup>190</sup>.

Das  $K^+$ -Kanal-Gen, welches als erstes molekularbiologisch charakterisiert wurde, ist das *Shaker*-Gen<sup>82,117,125</sup>. Es kodiert für spannungsabhängige  $K^+$ -Kanäle. Molekularbiologische Techniken ermöglichten es anschließend, verwandte Gene aus *Drosophila* zu klonieren. So wurden *Shaker* (*Sh*, *Shab*, *Shaw*, *Shal*<sup>23,24</sup>) und *eag* (*eag*<sup>20,181</sup>, *erg*<sup>167</sup>, *elk*<sup>182</sup>) zu ganzen Genfamilien erweitert. Auch in den cDNAs der Vertebraten wurden homologe Gene identifiziert. Die spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanäle der  $K_v$ -Genfamilien sind homolog zur *Shaker*-Genfamilie [ $K_v1.x$  (*Sh*),  $K_v2.x$  (*Shab*),  $K_v3.x$  (*Shaw*) und  $K_v4.x$  (*Shal*)]. Auch die Gene der *Drosophila* Loci *slo*<sup>6</sup> und *eag*<sup>181</sup> kodieren für  $K^+$ -Kanalproteine, der *Hk*-Genlocus kodiert für eine akzessorische  $K^+$ -Kanal-Untereinheit<sup>35</sup> der *Shaker*-Kanäle. Auch dem *seizure*-Locus, welcher nach biochemischen<sup>75</sup> und elektrophysiologischen<sup>47,74</sup> Untersuchungen mit einem Natriumkanal in Verbindung gebracht wurde, ist nach molekularbiologischer Charakterisierung, das für einen Kaliumkanal kodierende *erg*-Gen (*eag related gene*) zugeordnet worden<sup>167</sup>. Die für die  $Ca^{2+}$ -aktivierten Kaliumkanäle mit großer Leitfähigkeit (*BK*) kodierenden Gene der Vertebraten sind homolog zum *Drosophila slo*-Gen<sup>25</sup>.



Inzwischen wurden über 100 K<sup>+</sup>-Kanal-Gene aus den verschiedensten Organismen kloniert<sup>29,76</sup>. Zusätzlich sind K<sup>+</sup>-Kanalgene durch Genomprojekte<sup>184</sup> und durch in *expressed-sequence-tag*-Datenbanken aufgespürt worden<sup>141</sup>.

Von den durch die Molekularbiologie zugänglich gewordenen cDNA-Sequenzen von K<sup>+</sup>-Kanal-Genen konnten über die Ableitung der Proteinsequenzen theoretische Voraussagen über potentielle Struktur/Funktionsbeziehungen gemacht werden. Die Möglichkeit der elektrophysiologischen Charakterisierung dieser Proteine machte die Voraussagen experimentell überprüfbar. Es zeigte sich, daß eine große Anzahl der Ionenkanal bildenden  $\alpha$ -Untereinheiten sich durch gemeinsame Strukturparameter in eine Strukturklasse einordnen lassen. Zu den gemeinsamen Strukturparametern gehören sechs hydrophobe Segmente, die die Transmembrandomänen (S1-S6) ausbilden, und ein weiteres hydrophobes Segment (H5), zwischen der fünften und sechsten Transmembranregion, welches einen wesentlichen Anteil der Pore und den Selektivitätsfilter ausbildet<sup>39,89</sup>. In der vierten Transmembranregion (S4) liegt der Spannungssensor dieser Ionenkanäle<sup>104,118</sup>, der sich durch eine Abfolge positiv geladener Aminosäuren, getrennt durch jeweils zwei hydrophobe Aminosäuren  $\{([K/R]-X-X)_{3-7}\}$  auszeichnet. Außerdem besitzen sie intrazelluläre Amino- und Carboxytermini. Zu den Ionenkanälen mit diesen Merkmalen gehören u. a. die relativ Ionen-unselektiven, zyklisch-Nukleotid-gesteuerten-(CNG-) Kanäle<sup>84</sup>, die spannungsgesteuerten K<sup>+</sup>-Kanäle der *Shaker*-(K<sub>v</sub>)-Familie, die Pflanzenkanäle AKT1<sup>149</sup> und KAT1<sup>5</sup> sowie die K<sup>+</sup>-Kanäle der *eag*-Familie. Um funktionelle Kanäle ausbilden zu können, müssen sich die Proteinuntereinheiten zu Tetrameren zusammenlagern. Proteindomänen, die an dieser Zusammenlagerung (*Assembly*) beteiligt sind, sind in den Proteinen K<sub>v</sub>-Genfamilie im cytoplasmatischen Aminoterminus lokalisiert worden<sup>101,150</sup>. Auch der humane ERG besitzt eine aminoterminal Domäne, die in Lösung selbst-tetramerisierend ist<sup>102</sup>. Im Rattenprotein rEAG1 hingegen ist eine cytoplasmatische, carboxyterminale Domäne bestimmt worden, die die gleiche Domäne binden kann und coexprimiert mit dem gesamten rEAG1-Protein den von diesem Protein vermittelten K<sup>+</sup>-Strom unterdrücken kann<sup>105</sup>.

Die Proteine der *eag*-Familie und der CNG-Kanäle besitzen einen carboxyterminalen Sequenzbereich, der den cAMP/cGMP-Bindungsstellen zyklisch-Nukleotid-abhängiger Proteinkinasen ähnlich ist<sup>63</sup>. In den CNG-Kanalproteinen ist dieser Bereich für die Bindung der zyklischen Nukleotide verantwortlich. Für *eag*-Kanalproteine ist nicht bekannt, ob bzw. welche Funktionalität der entsprechende Bereich besitzt.

Die Ionenkanal-bildenden  $\alpha$ -Untereinheiten lagern sich als Homo- oder Heterotetramere zusammen<sup>110</sup>. *In vitro* vermitteln viele dieser Untereinheiten als Homotetramere Ströme. Es gibt immer mehr Evidenzen, daß die Komposition der *in vivo* vorkommenden K<sup>+</sup>-Kanäle komplexer ist. So gibt es Proteine, die alle Strukturmerkmale eines K<sup>+</sup>-Kanals besitzen, die aber in heterologer Expression keine elektrische Aktivität zeigen (K<sub>v</sub>8.1<sup>69</sup>, K<sub>v</sub>2.3r<sup>27</sup>), in Koexpression mit anderen  $\alpha$ -Untereinheiten (K<sub>v</sub>2.3r/K<sub>v</sub>2.1<sup>27</sup>) modulieren sie deren Funktion. Viele K<sup>+</sup>-Kanäle werden von akzessorischen Untereinheiten reguliert, die selbst keine Pore ausbilden. Zu diesen Proteinen gehören z. B. Transmembranproteine mit zwei (*slo* $\beta$ <sup>170</sup>) oder einer (*minK*) Transmembranregion(en) und membranassoziierte Proteine (K<sub>v</sub>/K<sub>v</sub> $\beta$ <sup>130</sup>). Der komplexeste bisher beschriebene, nativ vorkommende K<sup>+</sup>-Kanal, besteht aus vier

verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten und einer akzessorischen  $\beta$ -Untereinheit ( $K_v1.2/1.3/1.4/1.6$  und  $K_v\beta2^{44}$ ).

Durch den Umstand, daß Mutationen des *Drosophila eag*-Gens zu Veränderungen von mehreren  $K^+$ -Strömen an Synapsen der Motorneuronen führt und *eag/Sh*-Doppelmutationen dort synergistische Auswirkungen zeigen<sup>55</sup>, wurde eine Interaktion von Shaker und EAG postuliert. Zumindest *in vitro* wurde eine solche Interaktion elektrophysiologisch charakterisiert<sup>31</sup>.

Die Klonierung der zu den *Drosophila*-Genen homologen Gene der Vertebraten, insbesondere der Mammalier, wird von der Fragestellung begleitet, ob Mutationen auch hier pathologische Auswirkungen haben können. Für einige Säugetiergene, die für  $K^+$ -Kanäle kodieren, ist dies inzwischen auch bekannt<sup>145</sup>.

So können Mutationen im  $K_{IR}3.2$ -Gen, welches für einen G-Protein-abhängigen, einwärts-rectifizierenden Kaliumkanal codiert<sup>100</sup>, eine Bewegungsstörung (*Ataxie*) auslösen. Diese ist mit einer Fehlentwicklung des Kleinhirns verknüpft und von der Maus bekannt (*Weaver-Maus*)<sup>119</sup>.

Beim Menschen können Mutationen im Gen des spannungsgesteuerten Kaliumkanals  $K_v1.1$  zu einer Form der *Ataxie* führen, die mit unwillkürlichen Muskelkontraktionen (*Myokymie*) verbunden ist und als episodische *Ataxie* der Form 1 (*EA-1*) bezeichnet wird<sup>19,1</sup>. Desweiteren ist eine Fehlfunktion der Niere bekannt, bei der die Rückresorption von  $K^+$ -Ionen im aufsteigenden Ast der Henlé-Schleife gestört ist und die zu hypokaliämischer Alkalose, Hypercalciurie und niedrigem Blutdruck führt (*Bartters-Syndrom*). Sie läßt sich auf Mutationen im Gen des ATP-sensitiven Kaliumkanals  $K_{IR}1.1$  (ROMK) zurückführen<sup>153</sup>.

Zwei Formen erblich bedingter Störungen der Repolarisation der Aktionspotentiale des Herzens (LQT-Syndrome) sind mit Mutationen in  $K^+$ -Kanal-Genen verknüpft. Das LQT1- (*Jervell-Lange-Nielsen*-) und das LQT2- (*Romano-Ward*-) Syndrom sind durch Mutationen in den Genen  $K_vLQT1$ <sup>179</sup> und *herg*<sup>34</sup> bedingt. Durch die Mutation werden die von den Proteinen jeweils im Zusammenspiel mit *minK* als regulatorischer Untereinheit getragenen *delayed-rectifier*- $K^+$ -Ströme des Herzens, der langsame [ $I_{Ks}$ , (*minK*/ $K_vLQT1$ <sup>13,144</sup>)] und der schnelle [ $I_{Kr}$ , (*minK*/*hERG*<sup>109</sup>)], verändert. Es kommt dabei zu verlangsamten Repolarisationen in den Ventrikeln, was im Elektrokardiogramm durch eine verlängerte QT-Phase sichtbar ist. Durch die verlangsamte Repolarisation kann es bei LQT-Syndromen zu einer Desynchronisation von Exzitation und Repolarisation des Herzens kommen, was zur Generierung vorzeitiger, unvollständiger Aktionspotentiale führen kann, die dann lebensbedrohliche Arrhythmien (*Torsade de pointes*) auslösen können<sup>85</sup>.

Ziel dieser Arbeit war es, die Klonierung der *reag2*-cDNA zu vervollständigen und für die elektrophysiologische Charakterisierung der K<sup>+</sup>-Kanäle rEAG1 und rEAG2 klonale Zelllinien herzustellen, immunhistochemisch die Expression der Proteine rEAG1, rEAG2 und rERG im zentralen Nervensystem der Ratte zu untersuchen. Dabei sollte insbesondere bestimmt werden, ob die immunhistochemische Analyse Rückschlüsse auf eine somatodendritische oder axonale Lokalisation der Proteine zulässt.

Das untersuchte rERG-Protein, ist das zum humanen ERG homologe Protein der Ratte. Ein Sequenzvergleich zeigt, daß es 1112 von 1159 identische Aminosäuren (96%) besitzt. Desweiteren sind 29 Aminosäuren konservativ sowie 18 nicht konservativ ausgetauscht. Außerdem besitzt das Protein zwei Aminosäureinsertionen. Nach den Aminosäuren 237 und 908 sind je 2 Aminosäuren inseriert.

---

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Säuren, Laugen, Salze und Puffer

Ammonium-nickelsulfat	Sigma	MOPS	Roth
Ammonium-peroxodisulfat	Riedel-De-Haën	Natriumacetat	Riedel-De-Haën
BES	Sigma	Natriumazid	Sigma
Borsäure	Sigma	Natriumhydrogencarbonat	Riedel-De-Haën
Calciumchlorid	Merck	Natriumcarbonat	Baker, Riedel-De-Haën
Dinatriumhydrogenphosphat	Riedel-De-Haën	Natriumchlorid	Merck
Essigsäure	Riedel-De-Haën	Natriumdihydrogenphosphat	Riedel-De-Haën
EDTA	Sigma	Natriumhydroxid	Riedel-De-Haën
Glycin	Sigma	Natriumnitroprussid	Sigma
Harnstoff	Roth	Natriumphosphat	Riedel-De-Haën
HEPES	Sigma	Natriumtartrat	Baker
Kaliumchlorid	Riedel-De-Haën	Nickelchlorid	Riedel-De-Haën
Kaliumdihydrogenphosphat	Riedel-De-Haën	PIPES	Sigma
Kaliumhydroxid	Merck	Phosphorsäure (85%)	Merck
Kupfersulfat	Sigma	Salzsäure	Baker
Magnesiumchlorid	Merck	Thimerosal	Sigma
Manganchlorid	Sigma	Tris, freie Base	Sigma
		Zinkchlorid	Sigma

#### 3.1.2 Lösungsmittel

Aceton	Merck
3-Aminopropyltriethoxysilan	Sigma
tert.-Butanol	Merck
Chloroform	Merck
DMSO	Merck
Ethanol, 100%	Merck
Ethanol, 96%	Apotheke, UKE
Ether	Merck
Formamid	Roth
Isopropanol	Riedel-De-Haën
Glycerin, 86%	Riedel-De-Haën
Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Merck
Mineralöl	Sigma
Phenol	Roth
Xylol	Merck
Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung (Protogel & Sequagel)	Biozym

#### 3.1.3 Lösungen

DMEM F12	Gibco
Gentamycin-Stammlösung	Gibco
L-Glutamin-Stammlösung	Gibco
Penicillin/Streptomycin-Stammlösung	Gibco

### 3.1.4 Proteine, Peptide und Protease-Inhibitoren

Alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim
Antipain	Sigma
Benzamidin	Sigma
BGaR	Vector-Camon
Caseinhydrolysat	Gibco BRL
Cy3-GaR	Vector-Camon
BSA	Fluka
BSA-OAc	Aurion
Chymostatin	Sigma
DNA-Polymerase I	Pharmacia
DNA-Ligase	Fermentas
FCS	
GaR	Vector-Camon
Gelatine	Merck
Glutathion, reduziert	Sigma
Hämoglobin	
Hefe-Extrakt	Gibco BRL
Klenow Fragment	Pharmacia
Kaninchen-IgG	Vector-Camon
Proteinmarker für die SDS-PAGE	Sigma
Leupeptin	Biomol
Lysozym	Fluka
Magermilchpulver	Nestlé
Mungbohnen-Exonuklease	USB
NGS	Linaris
<sup>+</sup> Pefabloc SC	Biomol
Pepstatin A	Biomol
PGaR	Vector-Camon
PLL	Sigma
PMSF	Serva
Polynukleotidkinase	NEB
Restriktions- endonukleasen	Pharmacia, Boehringer, Biolabs, Gibco BRL, USB
RNase A	Serva
Sequenase	USB
T4-DNA-Ligase	USB
Taq-DNA-Polymerase	Gibco BRL

### 3.1.5 Farbstoffe und Substrate

ABTS	Sigma
BCA	Sigma
Bromphenolblau	Serva
Chromotrop 2R	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva
DAB	Sigma
Ethidiumbromid	Fluka
Pyronin Y	Sigma
Xylencyanol FF	Sigma

### 3.1.6 Andere Chemikalien

Agarose	Gibco BRL
Ampicillin	Boehringer
Bacto-Agar	Gibco BRL
DEPC	Sigma
DTT	Biomol
Ficoll 400	Sigma
Freund'sches-Adjuvans	Sigma
G418	Gibco
Glucose	Sigma
Glutathion-Agarose	Sigma
GSV 1	SLEE Technik
Heparin-Natrium	Roche
IPTG	Roth
Imidazol	Sigma
Ketanest	Parke-Davis
Paraformaldehyd	Merck
Polyvinylpyrrolidon	Sigma
Saccharose	Merck
Tetracyclin	Sigma
Rompun	Bayer
TEMED	Sigma
Triton X-100	Sigma
Tween 20	Sigma
Wasserstoffperoxid (30%)	Riedel-De-Haën

### 3.1.7 Mono-, Oligo- und Polynukleotide

ATP	Pharmacia
$\alpha$ -[ <sup>33</sup> P]-UTP	Amersham
$\alpha$ -[ <sup>35</sup> S]-dATP	Amersham
Desoxyribonukleotide	Pharmacia
Hefe-RNA	Sigma
Heringsspermien-DNA	Sigma
$\lambda$ -DNA	Gibco BRL
Oligonukleotide	Pharmacia, MWG

### 3.1.8 Plasmidvektoren

pcDNA3	Invitrogen
pET 16b	Novagen
pGEX 2T	Pharmacia
pBluescript KS <sup>+</sup>	Stratagene
pBluescript SK <sup>-</sup>	Stratagene

### 3.1.9 *E. coli*-Bakterienstämme

<i>E. coli</i> XL1 Blue	Stratagene
<i>E. coli</i> HMS 174	Novagen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Novagen

### 3.1.10 Kits

<i>Renaissance</i> ECL-Kit	Du Pont
<i>ELITE</i> -ABC-Kit	Vector-Camom
<i>Maxiscript</i> mRNA-Kit	Ambion
<i>Midipräp</i> -Kit	Qiagen
<i>Qiaex</i>	Qiagen
<i>Sequenase</i> -DNA-Sequenzierungskit	USB

### 3.1.11 Sonstiges Material

Blotpapier	Schleicher & Schüll
<i>Cellocates</i>	Eppendorf
<i>Entellan</i>	Merck
96-well-ELISA-Platten	Falcon
Ni <sup>2+</sup> •NTA-Affinitätsmatrix	Novagen
Nitrocellulose-Membranen BA83	Schleicher & Schüll
Photopapier	AGFA
PVDF-Membranen	Du Pont
Ready-Caps	Beckmann
<i>Reflection</i> ECL-Film	Du Pont
Rodent Brain Matrix	ASI Instruments
Saponin	Sigma
<i>Sephadex</i> G75	Pharmacia
SDS	Fluka
Dialyseschläuche	Boehringer Ingelheim
S/W-Film APX 25	AGFA

## 3.2 Puffer und Lösungen

### 3.2.1 ABTS-Stammlösung

(ELISA)

10 mg/ml ABTS  
in Inkubationspuffer (3.2.67)

### 3.2.2 Acetylierungspuffer

0,1 M Triethanolamin  
0,9 % NaCl  
625 µl Essigsäureanhydrid  
a.d. 250ml DEPC-Wasser (3.2.37)

### 3.2.3 Acrylamid-Lösung

(Laemmli-SDS-PAGE)

30 % Acrylamid  
0,8 % Bisacrylamid

### 3.2.4 Agarosegel-Lösung (0,6-2%)

(DNA-Agarose-Gelelektrophorese)

2,4–6 g Agarose  
15 ml TEB-Stammlsg. (3.2.146)  
a.d. 300ml

### 3.2.5 Ak-Lösung

(Western-Blot)

10 ml PBST (3.2.102)  
1 g MMP  
a.d. 100ml

### 3.2.6 aP-Puffer

(DNA-Dephosphorylierung)

100 mM Tris/HCl, pH 9,5  
150 mM NaCl  
50 mM MgCl<sub>2</sub>

### 3.2.7 Ampicillin-Stammlösung

(Bakterienkultur)

0,1 g/ml Ampicillin  
in Aqua Millipore

### 3.2.8 Äquilibrierungspuffer

(Aufreinigung von GST-Fusionsprotein)

5 ml Tris/HCl-Stammlsg., pH 6,8  
(3.2.149)  
3 ml NaCl-Stammlsg. (3.2.87)  
a.d. 100ml

### 3.2.9 Alkylsilanlösung

(Objektträgerbeschichtung)

2 %<sub>(v/v)</sub> 3-Aminopropyltriethoxysilan  
in Aceton

### 3.2.10 Antigenlösung

(ELISA)

1 µg/ml Antigen  
in Beschichtungspuffer (3.2.19)

### 3.2.11 Antipain-Stammlösung

(Membranpräparation)

10 mM Antipain  
in Aqua Millipore

### 3.2.12 APS-Stammlösung

(Laemmli-SDS-PAGE)

10 % Ammoniumperoxodisulfat  
in Aqua Millipore

### 3.2.13 ATP-Stammlösung

(DNA-Phosphorylierung)

20 mM ATP  
in Wasser

### 3.2.14 Aufschlußpuffer

(Aufreinigung von GST-Fusionsprotein)

5 ml Tris/HCl-Stammlsg., pH6,8  
(3.2.149)  
3 ml NaCl-Stammlsg. (3.2.87)  
2 ml EDTA-Stammlsg., pH 6,8  
(3.2.40)  
500 µl Thimerosal-Stammlsg.  
(3.2.148)  
100 µl NaN<sub>3</sub>-Stammlsg. (3.2.90)  
1 ml DTT-Stammlsg. (3.2.39)  
1 ml Benzamidin-Stammlsg.  
(3.2.18)  
100 µl PMSF-Stammlsg. (3.2.111)  
20 mg Lysozym (≥36.000U/mg)  
a.d. 100ml

### 3.2.15 BBS (2×)

(Transfektion)

50 mM BES/HCl, pH 6,95 (@ 20°C)  
280 mM NaCl  
1,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

### 3.2.16 BCA-Lösung A

(Proteinbestimmung)

1 % BCA×2Na  
1,7 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>×2H<sub>2</sub>O  
0,16 % Na-Tartrat  
0,4 % NaOH  
in Aqua Millipore

**3.2.17 BCA-Lösung B**

(Proteinbestimmung)

4 % CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O  
in Aqua Millipore**3.2.18 Benzamidin-Stammlösung**

(Membranpräparation)

0,1 M Benzamidin  
in Aqua Millipore**3.2.19 Beschichtungspuffer**

(ELISA)

50 mM NaCO<sub>3</sub>/HCl, pH 9,6  
in Aqua Millipore**3.2.20 Bleichpuffer**

(Western-Blot)

5 ml PBS-Stammlsg. (3.2.99)  
1 g MMP  
10 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30%  
1,5 ml NaN<sub>3</sub>-Stammlsg. (3.2.90)  
a.d. 100ml**3.2.21 Blocklösung**

(Immunhistochemie)

1 ml PBS-Stammlsg. (3.2.99)  
2 ml Normal-Goat-Serum (NGS)  
60 µl Triton-X-100  
a.d. 20ml**3.2.22 Blockpuffer**

(Western-Blot)

5 ml PBS-Stammlsg. (3.2.99)  
10 g MMP  
a.d. 100ml**3.2.23 Blotpuffer**

(Western-Blot)

100 ml Laufpuffer (3.2.74)  
100 ml MeOH  
20 ml NaCl-Stammlsg. (3.2.89)  
500 µl SDS-Stammlsg. (3.2.135)  
a.d. 1000ml**3.2.24 Bradford-Reagenz**

(Proteinbestimmung)

0,01 % Coomassie Brilliant Blue G250  
5 % EtOH  
8,5 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  
in Aqua Millipore**3.2.25 Chromotrop 2R-Stammlösung**

(Immunhistochemie)

5 % Chromotrop 2R  
in Aqua Millipore**3.2.26 Chymostatin-Stammlösung**

(Membranpräparation)

20 mM Chymostatin  
in DMSO**3.2.27 CIP-Puffer (10×)**

(DNA-Dephosphorylierung)

200 mM Tris/HCl, pH 8,0  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM ZnCl<sub>2</sub>**3.2.28 Coomassie-Färbelösung I**

(Laemmli-SDS-PAGE)

0,1 % Coomassie Brilliant Blue R250  
10 % HAc  
50 % MeOH  
in Aqua Millipore**3.2.29 Coomassie-Färbelösung II**

(Präparative Laemmli-SDS-PAGE)

0,1 % Coomassie Brilliant Blue R250  
50 % MeOH  
in Aqua Millipore**3.2.30 DAB/Ni/Imidazol-Lösung**

(Immunhistochemie)

25 mM Tris/HCl, pH 7,6  
10 mM Imidazol  
0,3 % NiNH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>  
0,05 % DAB  
in Aqua Millipore**3.2.31 ddATP-Terminationslösung**

(DNA-Sequenzierung)

8 µM ddATP  
in Wasser**3.2.32 ddCTP-Terminationslösung**

(DNA-Sequenzierung)

8 µM ddCTP  
in Wasser**3.2.33 ddGTP-Terminationslösung**

(DNA-Sequenzierung)

8 µM ddGTP  
in Wasser**3.2.34 ddTTP-Terminationslösung**

(DNA-Sequenzierung)

8 µM ddTTP  
in Wasser



**3.2.35 Denaturierungslösung**

(DNA-Sequenzierung)

1 M NaOH

in Aqua Millipore

**3.2.36 100 x Denhardt's Reagenz**

2 % Ficoll 400

2 % BSA

2 % Polyvinylpyrrolidon

**3.2.37 DEPC-Wasser**

(Herstellung von RNA-Sonden)

100 µl DEPC

a.d. 1000ml; 3h rühren, autoklaviert

**3.2.38 dNTP-Stammlösung**

(PCR)

20 mM dATP

20 mM dCTP

20 mM dGTP

20 mM dTTP

**3.2.39 DTT-Stammlösung**

(Membranpräparation)

0,1 M DTT

in Aqua Millipore

**3.2.40 EDTA-Stammlösung**

0,5 M EDTA/NaOH,

pH 6,8; 7,4; 7,9 oder 8,0

in Aqua Millipore

**3.2.41 Elektroelutionspuffer**

(Elektroelution)

100 ml 10×Laufpuffer (3.2.74)

100 µl SDS-Stammlsg. (3.2.135)

a.d. 1000ml

**3.2.42 ELISA-Waschpuffer (EWB)**

(ELISA)

50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2

0,05 % Tween 20

0,02 % NaN<sub>3</sub>

in Aqua Millipore

**3.2.43 Elutionspuffer**

(Affinitätsreinigung von Antikörpern)

0,2 M Glycin/HCl, pH 2,5

0,15 M NaCl

1 mg/ml BSA

in Aqua Millipore

**3.2.44 Entfärbelösung**

(Laemmli-SDS-PAGE)

10 % HAc

10 % MeOH

in Aqua Millipore

**3.2.45 Entwicklungslösung**

(Immunhistochemie)

25 mM Tris/HCl, pH7.6

10 mM Imidazol

0,3 % NH<sub>4</sub>NiSO<sub>4</sub>

0,05 % DAB

**3.2.46 EtBr-Stammlösung**

(DNA-Agarosegel)

10 mg/ml Ethidiumbromid

in Aqua Millipore

**3.2.47 EWB-Hb**

(ELISA)

1 mg/ml Hämoglobin in EWB (3.2.42)

**3.2.48 Fixierungslösung**

(Immunhistochemie)

1 × PBS, pH 7,4

4 % Paraformaldehyd

0,01 % Methylenblau

in Aqua Millipore

**3.2.49 G418-Stammlösung**

(Kultivierung stabiler Zelllinien)

0,1 M HEPES/NaOH, pH 7,2-7,5

45 mg/ml G418

in sterilem Aqua Millipore

**3.2.50 Gefrierschutzlösung I**

(Immunhistochemie)

50 ml PBS-Stammlsg. (3.2.99)

50 g Saccharose

a.d. 1000ml

**3.2.51 Gefrierschutzlösung II**

(Immunhistochemie)

50 ml PBS-Stammlsg. (3.2.99)

300 g Saccharose

a.d. 1000ml

**3.2.52 Gesättigte****Ammoniumsulfatlösung**

(Affinitätsreinigung von Antikörpern)

5,3 M(@0°C) Ammoniumsulfat

in Aqua Millipore

**3.2.53 L-Glutamin-Stammlösung**

[Zellkultur]

200 mM L-Glutamin  
in Wasser**3.2.54 Glutathion-Puffer**

[Aufreinigung von GST-Fusionsprotein]

500 µl Tris/HCl-Stammlsg., pH 6,8  
(3.2.149)

300 µl NaCl-Stammlsg. (3.2.87)

42,3 mg Glutathion, reduziert

a.d. 10ml

**3.2.55 His-Bindungspuffer-Stammlösung (8×)**[Aufreinigung von (His)<sub>10</sub>-Fusionsprotein]16 ml Tris/HCl-Stammlsg., pH 7,9  
(3.2.149)

4 ml Imidazol-Stammlsg (3.2.65)

80 ml NaCl-Stammlsg. (3.2.87)

a.d. 100ml

**3.2.56 His-Bindungspuffer I**[Aufreinigung von (His)<sub>10</sub>-Fusionsprotein]2 ml Tris/HCl-Stammlsg., pH 7,9  
(3.2.149)

0,5 ml Imidazol-Stammlsg (3.2.65)

10 ml NaCl-Stammlsg. (3.2.87)

a.d. 100ml

**3.2.57 His-Bindungspuffer II**[Aufreinigung von (His)<sub>10</sub>-Fusionsprotein]2 ml Tris/HCl-Stammlsg., pH 7,9  
(3.2.149)

0,25 ml Imidazol-Stammlsg (3.2.65)

10 ml NaCl-Stammlsg. (3.2.87)

48,48 g Harnstoff

a.d. 100ml

**3.2.58 His-Elutionspuffer I**[Aufreinigung von (His)<sub>10</sub>-Fusionsprotein]2 ml Tris/HCl-Stammlsg., pH 7,9  
(3.2.149)

50 ml Imidazol-Stammlsg (3.2.65)

10 ml NaCl-Stammlsg. (3.2.87)

a.d. 100ml

**3.2.59 His-Elutionspuffer II**[Aufreinigung von (His)<sub>10</sub>-Fusionsprotein]2 ml Tris/HCl-Stammlsg., pH 7,9  
(3.2.149)

50 ml Imidazol-Stammlsg (3.2.65)

10 ml NaCl-Stammlsg. (3.2.87)

48,48 g Harnstoff

a.d. 100ml

**3.2.60 His-Ladepuffer**[Aufreinigung von (His)<sub>10</sub>-Fusionsprotein]1,2 g NiCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O

a.d. 100ml

**3.2.61 His-Resuspendierungspuffer**[Aufreinigung von (His)<sub>10</sub>-Fusionsprotein]10 ml Tris/HCl-Stammlsg., pH 7,9  
(3.2.149)

2 ml EDTA-Stammlsg., pH 7,9

(3.2.40)

100 µl Thimerosal-Stammlsg  
(3.2.148)20 µl NaN<sub>3</sub>-Stammlsg. (3.2.90)

200 µl DTT-Stammlsg. (3.2.39)

200 µl Benzamidin-Stammlsg.  
(3.2.18)

20 µl PMSF-Stammlsg. (3.2.111)

20 mg Lysozym (≥36.000U/mg)

a.d. 100ml

**3.2.62 His-Waschpuffer I**[Aufreinigung von (His)<sub>10</sub>-Fusionsprotein]2 ml Tris/HCl-Stammlsg., pH 7,9  
(3.2.149)

≥6 ml Imidazol-Stammlsg (3.2.65)

10 ml NaCl-Stammlsg. (3.2.87)

a.d. 100ml

**3.2.63 His-Waschpuffer II**[Aufreinigung von (His)<sub>10</sub>-Fusionsprotein]2 ml Tris/HCl-Stammlsg., pH 7,9  
(3.2.149)

≥6 ml Imidazol-Stammlsg (3.2.65)

10 ml NaCl-Stammlsg. (3.2.87)

48,48 g Harnstoff

a.d. 100ml

<b>3.2.64 Hypotoner Homogenisationspuffer</b>		
(Membranpräparation)		
1 ml	Tris/HCl-Stammlsg., pH 7,9	(3.2.149)
1 ml	EDTA-Stammlsg., pH 7,9	(3.2.40)
500 µl	DTT-Stammlsg. (3.2.39)	
2,5 ml	+Pefabloc SC-Stammlsg.	(3.2.107)
250 µl	Thimerosal-Stammlsg.	(3.2.148)
500 µl	Benzamidin-Stammlsg.	(3.2.18)
250 µl	PMSF-Stammlsg. (3.2.111)	
50 µl	Chymostatin-Stammlsg.	(3.2.26)
50 µl	Leupeptin-Stammlsg.	(3.2.79)
50 µl	Antipain-Stammlsg.	(3.2.11)
50 µl	Pepstatin A-Stammlsg.	(3.2.108)
a.d. 50ml		

<b>3.2.65 Imidazol-Stammlösung (2M)</b>	
[Aufreinigung von (His) <sub>10</sub> -Fusionsprotein]	
13,62 g	Imidazol
a.d. 100ml	

<b>3.2.66 Inkubationslösung</b>		
(Immunhistochemie)		
5 ml	PBS-Stammlsg. (3.2.99)	
1 ml	Chromotrop 2R-Stammlsg.	(3.2.25)
10 ml	NGS	
500 µl	NaN <sub>3</sub> -Stammlsg. (3.2.90)	
100 µl	BSA-OAc	
400 mg	Gelatine	
100 mg	Saponin	
a.d. 100ml		

<b>3.2.67 Inkubationspuffer</b>		
(ELISA)		
50 mM	Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	
100 mM	NaAc/HAc, pH 4,2	
in Aqua Millipore		

<b>3.2.68 ISH-Fixierlösung</b>		
1 ×	PBS, pH 7,4	
4 %	Paraformaldehyd	
in Aqua Millipore		

<b>3.2.69 ISH-Hybridisierungspuffer</b>		
25 mM	PIPES/NaOH, pH 6,8	
25 mM	EDTA, pH 6,8	
750 mM	NaCl	
50 %	Formamid, entionisiert	
10 %	Dextransulfat	
5 x	Denhardt´s-Reagenz (3.2.36)	
0,2 %	SDS	
10 mM	DTT	
250 µg/ml	Heringsspermien-DNA	
250 µg/ml	Hefe-RNA	

<b>3.2.70 ISH-Prähybridisierungspuffer</b>		
25 mM	PIPES/NaOH, pH 6,8	
25 mM	EDTA, pH 6,8	
750 mM	NaCl	
50 %	Formamid, entionisiert	
5 x	Denhardt´s-Reagenz (3.2.36)	
0,2 %	SDS	
10 mM	DTT	
250 µg/ml	Heringsspermien-DNA	
250 µg/ml	Hefe-RNA	

<b>3.2.71 ISH-Waschpuffer</b>		
10 mM	Tris/HCl, pH 7,5	
1 mM	EDTA	
500 mM	NaCl	
alles RNase frei; in DEPC-Wasser (3.2.37)		

<b>3.2.72 IPTG-Stammlösung</b>		
(Überexpression von Fusionsproteinen)		
1 M	IPTG	
in LB-Medium (3.2.77); frisch angesetzt		

<b>3.2.73 Laemmli-Probenpuffer</b>		
(Laemmli-SDS-PAGE)		
5 ml	Tris/HCl-Stammlsg.	(pH 6,8; 3.2.149)
4 ml	SDS-Stammlsg. (3.2.135)	
6,7 ml	Mercaptoethanol (MeSH)	
4,2 ml	Glycerin (86%)	
0,01 %	Bromphenolblau	
a.d. 20ml		

<b>3.2.74 Laufpuffer (10×)</b>		
(Laemmli-SDS-PAGE)		
144 g	Glycin	
30 g	Tris	
a.d. 1000ml		

**3.2.75 Laufpuffer (1×)**

(Laemmli-SDS-PAGE)

100 ml Laufpuffer (10×; 3.2.74)  
 5 ml SDS-Stammlsg. (3.2.135)  
 a.d. 1000ml

**3.2.76 LB-Platten-Lösung**

1 l LB-Medium  
 15 g Bacto-Agar  
 autoklaviert

**3.2.77 LB-Medium**

10 g Caseinhydrolysat  
 5 g Hefeextrakt  
 10 g NaCl  
 a.d. 1000ml; pH 7,4 (HCl/NaOH);  
 autoklaviert

**3.2.78 LB<sub>amp</sub>-Medium**

100 ml LB-Medium (3.2.77)  
 100 µl Ampicillin-Stammlösung  
 (3.2.7)

**3.2.79 Leupeptin-Stammlösung**

(Membranpräparation)

10 mM Leupeptin  
 in Aqua Millipore

**3.2.80 Ligationspuffer (10×)**

(DNA-Ligation)

0,2 M Tris/HCl, pH 7,4  
 0,1 M MgCl<sub>2</sub>  
 0,1 M DTE  
 10 mM ATP

**3.2.81 Lösung I**

(Minipräp)

25 mM Tris/HCl, pH 7,9  
 10 mM EDTA/NaOH, pH 7,9  
 50 mM Glucose  
 in Aqua Millipore

**3.2.82 Lösung II**

(Minipräp)

0,2 M NaOH  
 1 % SDS  
 in Aqua Millipore

**3.2.83 Lösung III**

(Minipräp)

3 M KAc/HAc, pH 4,8  
 in Aqua Millipore

**3.2.84 Lower Tris**

(Laemmli-SDS-PAGE)

500 ml Tris/HCl-Stammlsg., pH 8,8  
 (3.2.149)  
 20 ml SDS-Stammlsg.(3.2.135)  
 a.d. 1000ml

**3.2.85 Markierungslösung**

(DNA-Sequenzierung)

7,5 µM 7-Deaza-dGTP  
 7,5 µM dCTP  
 7,5 µM dTTP  
 in Wasser

**3.2.86 Mg<sup>2+</sup>-Lösung**

(Herstellung kompetenter Zellen)

1 M MgCl<sub>2</sub>  
 1 M MgSO<sub>4</sub>  
 in Aqua Millipore, steril filtriert

**3.2.87 Mungbohnen-Exonuklease-Puffer (10×)**

(Auffüllen von DNA-Einzelstrangüberhängen)

200 mM NaCl  
 500 mM NaAc, pH 4,5  
 10 mM ZnSO<sub>4</sub>  
 5 % Glycerin

**3.2.88 Nachspüllösung**

(Immunhistochemie)

100 mM Na-P<sub>i</sub>, pH 7,2  
 5 % Saccharose

**3.2.89 NaCl-Stammlösung (5M)**

292,2 g NaCl  
 a.d. 1000ml

**3.2.90 NaN<sub>3</sub>-Stammlösung (20%)**

20 g NaN<sub>3</sub>  
 a.d. 100ml

**3.2.91 Nährmedium**

(Zellkultur)

500 ml DMEM F12  
 50 ml FCS  
 10 ml L-Glu-Stammlsg. (3.2.53)  
 5 ml P/S-Stammlsg. (3.2.109)

**3.2.92 Neutralisationspuffer**

(Affinitätsreinigung von Antikörpern)

1 M Tris/HCl-Stammlsg., pH 7,9  
 (3.2.149)

**3.2.93 Ni/Imidazol-Lösung**

(Immunhistochemie)

25 mM Tris/HCl, pH 7,6

10 mM Imidazol

0,3 % Ni(NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>

in Aqua Millipore

**3.2.94 P1**

(Midipräp)

0,1 mg/ml RNase A

50 mM Tris/HCl, pH 8,0

10 mM EDTA/NaOH, pH 8,0

**3.2.95 P2**

(Midipräp)

0,2 M NaOH

1 % SDS

**3.2.96 P3**

(Midipräp)

3 M KAc/HAc, pH 4,8

**3.2.97 PBS (1×)**2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>8 mM NaHPO<sub>4</sub>

154 mM NaCl

in Aqua Millipore; pH 7,4

**3.2.98 PBS (Gibco)**

(Zellkultur)

1,15 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

8 g/l NaCl

0,2 g/l KCl

(autoklaviert)

**3.2.99 PBS-Stammlösung (20×)**40 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>160 mM NaHPO<sub>4</sub>, pH 7,4

3,08 M NaCl

in Aqua Millipore

**3.2.100 PBSA-Stammlösung (10×)**

500 ml PBS-Stammlsg. (3.2.99)

5 ml NaN<sub>3</sub>-Stammlsg. (3.2.90)

a.d. 1000ml

**3.2.101 PBS-Hb**

(ELISA)

500 µl PBS-Stammlsg. (3.2.99)

1 mg/ml Hämoglobin

a.d. 10ml

**3.2.102 PBST-Stammlösung (10×)**

(Western-Blot)

500 ml PBS-Stammlsg. (3.2.99)

3 ml Tween 20

a.d. 1000ml

**3.2.103 PBSTB-Stammlösung (10×)**

(Western-Blot)

100 ml PBST-Stammlsg. (3.2.102)

100 mg BSA

**3.2.104 PBSTX (1×)**

50 ml PBS-Stammlsg. (3.2.99)

1 ml Triton-X-100

a.d. 1000ml

**3.2.105 P/C-Lösung**

(P/C-Extraktion von DNA-Lösungen)

1 Vol. Phenol

1 Vol. Chloroform

mit 1×TE (3.2.145) gesättigt

**3.2.106 PCR-Puffer (10×)**

(PCR)

0,1 M Tris/HCl, pH 9,0

0,5 M KCl

15 mM MgCl<sub>2</sub>

0,1 % Gelatine

**3.2.107 <sup>+</sup>Pefabloc SC-Stammlösung**

(Membranpräparation)

20 mM <sup>+</sup>Pefabloc SC

in Aqua Millipore

**3.2.108 Pepstatin A-Stammlösung**

(Membranpräparation)

1 mM Pepstatin A

in DMSO

**3.2.109 P/S-Stammlösung**

(Zellkultur)

10.000 U/ml Penicillin

10.000 µg/ml Streptomycin

25 µg/ml Fungizone

in Wasser

**3.2.110 PLL-Stammlösung**

(Zellkultur)

10 mg/ml Poly-L-Lysin

in Aqua Millipore, steril

**3.2.111 PMSF-Stammlösung**

(Membranpräparation)

0,2 M PMSF  
in EtOH, 100%**3.2.112 PNK-Puffer**

(DNA-Phosphorylierung)

100 mM Tris/HCl, pH 7,6  
500 mM NaCl  
50 mM DTT  
1 mM EDTA**3.2.113 Probenpuffer (3×)**

(Laemmli-SDS-PAGE)

2,5 ml Tris/HCl-Stammlsg., pH 6,8  
(3.2.149)  
4 ml Glycerin, 86%  
100 µl Mercaptoethanol  
10 ml SDS  
0,01 % Bromphenolblau  
a.d. 20ml**3.2.114 Probenpuffer (5×)**

(DNA-Agarosegel)

25 ml TEB-Stammlsg. (3.2.146)  
58 ml Glycerin (86%)  
200 mg Bromphenolblau  
200 mg Xylencyanol ff  
a.d. 100ml**3.2.115 Puffer A**

(Restriktionsverdau, Boehringer Enzyme)

33 mM Tris/HAc, pH 7,9 (@37°C)  
10 mM MgAc  
66 mM KAc  
0,5 mM DTT**3.2.116 Puffer B**

(Restriktionsverdau, Boehringer Enzyme)

10 mM Tris/HCl, pH 8,0 (@37°C)  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,1 M NaCl  
1 mM MeSH**3.2.117 Puffer B**

(Restriktionsverdau, Fermentas Enzyme)

10 mM Tris/HCl, pH 7,5 (@37°C)  
10 mM MgCl<sub>2</sub>**3.2.118 Puffer G**

(Restriktionsverdau, Fermentas Enzyme)

10 mM Tris/HCl, pH 7,5 (@37°C)  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 mM NaCl**3.2.119 Puffer H**

(Restriktionsverdau, Boehringer Enzyme)

10 mM Tris/HCl, pH 7,5 (@37°C)  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
100 mM NaCl  
1 mM DTE**3.2.120 Puffer L**

(Restriktionsverdau, Boehringer Enzyme)

10 mM Tris/HCl, pH 7,5 (@37°C)  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM DTE**3.2.121 Puffer M**

(Restriktionsverdau, Boehringer Enzyme)

10 mM Tris/HCl, pH 7,5 (@37°C)  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 mM NaCl  
1 mM DTE**3.2.122 Puffer O**

(Restriktionsverdau, Fermentas Enzyme)

10 mM Tris/HCl, pH 7,5 (@37°C)  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
100 mM NaCl**3.2.123 Puffer R**

(Restriktionsverdau, Fermentas Enzyme)

10 mM Tris/HCl, pH 8,5 (@37°C)  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
100 mM KCl**3.2.124 Puffer Y**

(Restriktionsverdau, Fermentas Enzyme)

33 mM Tris/HAc, pH 7,9 (@37°C)  
10 mM MgAc  
66 mM KAc**3.2.125 Puffer QBT**

(Midipräp)

50 mM MOPS/HCl, pH 7,0  
0,75 M NaCl  
15 % EtOH  
0,15 % Triton-X-100**3.2.126 Puffer QC**

(Midipräp)

50 mM MOPS/HCl, pH 7,0  
1 M NaCl  
15 % EtOH

**3.2.127 Puffer QF**

(Midipräp)

50	mM	Tris/HCl, pH 8,5
1,25	M	NaCl
15	%	EtOH

**3.2.128 Pyronin Y-Lösung**

(SDS-PAGE)

1	mg	Pyronin Y
1	ml	1×Laufpuffer (3.2.75)

**3.2.129 QIAEX-Suspension**(DNA-Extraktion aus Agarosegelen)  
Silicagel-Suspension**3.2.130 QX 1**

(DNA-Extraktion aus Agarosegelen)

5	mM	Tris/HCl, pH 7,5
3	M	NaI
4	M	NaClO <sub>4</sub>
0,1	%	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>

**3.2.131 QX 2**

(DNA-Extraktion aus Agarosegelen)

8	M	NaClO <sub>4</sub>
---	---	--------------------

**3.2.132 QX 3**

(DNA-Extraktion aus Agarosegelen)

10	mM	Tris/HCl, pH 7,5
70	%	EtOH
0,1	M	NaCl
1	mM	EDTA

**3.2.133 Reaktionspuffer (5×)**

(DNA-Sequenzierung)

200	mM	Tris/HCl, pH 7,5
100	mM	MgCl <sub>2</sub>
250	mM	NaCl

in Wasser

**3.2.134 Schnellentfärbelösung**(SDS-PAGE oder *Western-Blot*)

100	ml	HAc
500	ml	MeOH

a.d. 1000ml

**3.2.135 SDS-Stammlösung**

20	%	SDS
----	---	-----

in Aqua Millipore

**3.2.136 Sequenase-Verdünnungspuffer**

(DNA-Sequenzierung)

10	mM	Tris/HCl, pH 7,5
5	mM	DTT
0,5	mg/ml	BSA

in Wasser

**3.2.137 SOB-Medium**

(Herstellung kompetenter Zellen)

20	g	Casein-Hydrolysat
5	g	Hefe-Extrakt
500	mg	NaCl
186	mg	KCl

a.d. 1000ml, pH 7,0 (NaOH), autoklaviert

**3.2.138 SSC (20×)**

300	mM	Natriumcitrat//HCl, pH 7,0
3	M	NaCl

**3.2.139 Standard 1**

(ELISA)

25	pg/ml	Kaninchen-IgG
5	µg/ml	BSA

in Beschichtungspuffer (3.2.19)

**3.2.140 Standard 2**

(ELISA)

100	pg/ml	Kaninchen-IgG
5	µg/ml	BSA

in Beschichtungspuffer (3.2.19)

**3.2.141 Stopp-Lösung**

(ELISA)

5	ml	NaN <sub>3</sub> -Stammlsg. (3.2.90)
50	ml	PBS-Stammlsg. (3.2.97)
945	ml	Aqua Millipore

**3.2.142 Stopp-Puffer**

(DNA-Sequenzierung)

20	mM	EDTA
95	%	Formamid
0,05	%	Bromphenolblau
0,05	%	Xylencyanol FF

**3.2.143 Strippuffer**

(Western-Blot)

62,5	ml	Tris/HCl-Stammlsg., pH 6,8 (3.2.149)
100	ml	SDS-Stammlsg. (3.2.135)
7	ml	MeSH

a.d. 1000ml

**3.2.144 TB-Medium**

(Herstellung kompetenter Zellen)

10	mM	PIPES/KOH, pH 6,7
15	mM	CaCl <sub>2</sub>
250	mM	KCl
55	mM	MnCl <sub>2</sub>

Das MnCl<sub>2</sub> wurde nach einstellen des pHs zugegeben; steril filtriert.**3.2.145 TE-Stammlösung (10×)**

100	ml	Tris/HCl-Stammlsg., pH 7,4 (3.2.149)
20	ml	EDTA -Stammlsg., pH 7,4 (3.2.40)

a.d. 1000ml

**3.2.146 TEB-Stammlösung (20×)**

(DNA-Agarose-Gelelektrophorese)

1,78	M	Tris, freie Base
1,78	M	Borsäure
40	mM	EDTA/NaOH, pH 7,9

in Aqua Millipore

**3.2.147 Tetracyclin-Stammlösung**

(Bakterienkultur)

50	mg	Tetracyclin
----	----	-------------

a.d. 1ml

**3.2.148 Thimerosal-Stammlösung (20%)**

(Membranpräparation)

200	mg	Thimerosal
-----	----	------------

a.d. 1ml

**3.2.149 Tris/HCl-Stammlösung**

1	M	Tris/HCl, pH 6,8; 7,4; 7,9; 8,0 oder 8,8
---	---	---

**3.2.150 Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco)**

(Zellkultur)

0,5	g/l	Trypsin (1:250)
0,2	g/l	EDTA
0,4	g/l	KCl
0,3	g/l	NaHCO <sub>3</sub>
8	g/l	NaCl
1	g/l	Glucose
5	mg/l	Phenolrot

steril filtriert

**3.2.151 Überschichtungslösung 1**

(Laemmli-SDS-PAGE)

tert.-Butanol

mit Lower Tris (3.2.84) gesättigt

**3.2.152 Überschichtungslösung 2**

(Laemmli-SDS-PAGE)

tert.-Butanol

mit Upper Tris (3.2.153) gesättigt

**3.2.153 Upper Tris**

(Laemmli-SDS-PAGE)

0,5	M	Tris/HCl, pH 6,8
0,4	%	SDS

in Aqua Millipore

**3.2.154 Vorinkubationslösung**

(Immunhistochemie)

5	ml	PBS-Stammlsg. (3.2.99)
1	ml	Chromotrop 2R-Stammlsg. (3.2.25)
10	ml	NGS
500	µl	NaN <sub>3</sub> -Stammlsg. (3.2.90)
100	µl	BSA-OAc
400	mg	Gelatine
300	mg	Saponin

a.d. 100ml;

Direkt vor Beginn der Vorinkubation wurde von 5µl Phenylhydrazin/10ml dazugegeben.

**3.2.155 Vorspüllösung**

(Immunhistochemie)

50	ml	PBS-Stammlsg. (3.2.99)
1	ml	Heparin-Na (5.000 I.E./ml)
2,6	g	Natriumnitroprussid

a.d. 1000ml



## 3.3 Molekularbiologische Methoden

### 3.3.1 Durchführung von Klonierungen

Von neu klonierter Plasmid-DNA, die durch Restriktionsverdau (3.3.3.1) von Vektor-DNA und einklonierter cDNA entstanden war, wurden, nach der Ligation (3.3.3.6), der Transformation (3.3.3.6) und dem Wachstum üN bei 37°C auf einer LB<sub>amp</sub>-Platte (3.3.2.1), zunächst 3ml LB<sub>amp</sub>-Kulturen (3.3.2.7) angeimpft.

Die Anzahl von 3ml Kulturen, die angeimpft wurde, war durch das Verhältnis von Kolonien bestimmt, die nach der Klonierung aus der Ligation von Vektor und Fragment entstanden waren, zu der Anzahl, die unter gleichen Bedingungen aus der Ligation des Vektors ohne Fragment entstanden waren. Je höher das Verhältnis, desto weniger 3ml LB<sub>amp</sub>-Kulturen wurden angeimpft.

Von den 3ml Kulturen wurden DNA-Minipräps (3.3.2.7) angefertigt und die Minipräp-DNA kontrollverdaut. D.h., es wurden Restriktionsverdau zur Kontrolle der neu klonierten Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen durchgeführt, die DNA-Fragmente generierten, welche, nach Auftrennung in einer DNA-Agarose-Gelelektrophorese (3.3.6.1), ein Bandenmuster zeigten, anhand dessen der Erfolg oder Mißerfolg der gewünschten Klonierung nachgewiesen werden konnte.

Klone, in die das Fragment korrekt einkloniert worden war, wurden retransformiert (3.3.2.4) und üN bei 37°C auf einer LB<sub>amp</sub>-Platte (3.3.2.1) inkubiert. Für die weitere Verwendung der Plasmid-DNA wurden DNA-Midipräps (3.3.2.8) angefertigt.

Neu klonierte Plasmid-DNA, die aus der Amplifizierung der cDNA in der PCR (3.3.7) hervorgegangen war, wurde ebenso analysiert und die eingebaute DNA anschließend sequenziert (3.3.5), gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.3.6.2) und die Sequenz auf den Austausch von Nukleotiden überprüft.

Auch von diesen Klonen, in die das Fragment korrekt einkloniert worden war und deren Nukleotidsequenz durch die PCR nicht unerwünscht verändert worden war, wurden für die weitere Verwendung DNA-Midipräps angefertigt.

### 3.3.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden<sup>142</sup>

#### 3.3.2.1 Herstellung von LB-, LB<sub>amp</sub>- und LB<sub>TET</sub>-Platten

Jeweils 1l der LB-Platten-Lösung (3.2.76) wurde, nach dem Autoklavieren, auf 60°C abgekühlt. Für LB<sub>amp</sub>-Platten wurde 10ml Ampicillin-Stammlösung (3.2.7) dazugegeben. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt, auf Plastik-Petrischalen (Ø9cm) verteilt und nach dem Aushärten des Agars bei 4°C, bis zur Verwendung, gelagert.

Je eine Platte, pro LB<sub>amp</sub>-Platten-Charge, wurde durch Ausstreichen nicht-transformierter Bakterien und Inkubation üN bei 37°C auf unerwünschtes Bakterienwachstum getestet.

LB<sub>TET</sub>-Platten wurden aus LB-Platten, durch ausstreichen von 100µl Tetracyclin-Stammlösung (3.2.147), hergestellt.

### 3.3.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien<sup>72</sup>

Ein eingefrorenes Aliquot kompetenter *E.coli* XL1 Blue wurde aufgetaut und ein Verdünnungsausstrich auf einer LB<sub>TET</sub>-Platte (3.3.2.1) üN bei 37°C inkubiert. Mit 5-6 Bakterienkolonien wurden 2×125ml SOB-Medium (3.2.137), zu dem je 1,25ml Mg<sup>2+</sup>-Lösung (3.2.86) gegeben worden war, angeimpft und bei 22-25°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,45-0,6 bei 225UpM auf dem Schüttelinkubator (≈24h) inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde für 10min auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (2.500×g, 10min, 4°C). Das Sediment wurde in 10ml TB-Medium (@0°C) (3.2.144) resuspendiert, wiederum für 10min auf Eis inkubiert und wie zuvor abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 10ml TB-Medium (0°C) resuspendiert und, nach Zugabe von 750µl DMSO, für 10min auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde, unter leichtem Schütteln, in 200µl Aliquots, in vorgekühlte (0°C) 1,5ml Reaktionsgefäße pipettiert. Die kompetenten Bakterien wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C bis zur Verwendung gelagert.

Die Transformationsrate wurde durch Transformation (3.3.2.3) von 100µl Suspension kompetenter Bakterien mit 10pg pBluescript SK<sup>-</sup> ermittelt.

### 3.3.2.3 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA aus Ligationen

Ligationsansätze (3.3.3.6) mit 10µl Volumen wurden mit 90µl Suspension kompetenter *E.coli* XL1 Blue (3.3.2.2) für 30min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock, durch Inkubation für 90s bei 42°C, wurde für weitere 10min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde auf LB<sub>amp</sub>-Platten (3.3.2.1) ausgestrichen. Die Bakterien wuchsen im Inkubator üN bei 37°C.

### 3.3.2.4 Retransformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Plasmid-DNA, aus DNA-Minipräps (3.3.2.7) oder DNA-Midipräps (3.3.2.8), wurde, für eine erneute Transformation, auf 1ng/µl verdünnt und damit 10µl Suspension kompetenter *E.coli* XL1 Blue Bakterien, wie unter 3.3.2.3 beschrieben, transformiert.

Die Bakterienstämme *E.coli* HMS174 und *E.coli* BL21(DE3) wurden mit Plasmiden, die aus dem Plasmidvektor pET 16b entstanden waren, nur retransformiert. Dafür wurden 2µg Plasmid-DNA und 10µl Suspension kompetenter Bakterien eingesetzt. Der Hitzeschock wurde auf 30s bei 42°C verkürzt und der Ansatz vor dem Ausplattieren für 30min mit 200µl LB-Medium (3.2.77) bei 37°C inkubiert.

### 3.3.2.5 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA-Lösungen

Zur Entfernung von Proteinen aus einer wäßrigen, DNA enthaltenden Lösung wurde diese mit 2 Vol. P/C-Lösung (3.2.105) versetzt, auf dem *Vortex*-Schüttler gründlich durchmischt und die Phasen durch Zentrifugation (14.000×g, 2min, RT) getrennt. Die obere, wäßrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. War in der Interphase viel Protein ausgefallen, wurde die Extraktion wiederholt.

### 3.3.2.6 Ethanol-Präzipitation von DNA

Zur Fällung von DNA aus einer wäßrigen Lösung wurde diese mit  $\frac{1}{3}$  Vol. Lösung III (3.2.83) und 3 Vol. 100%igem EtOH versetzt, bei  $-70^{\circ}\text{C}$  für  $\geq 45$ min inkubiert und zentrifugiert ( $8.000\times g$ , 15min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Die sedimentierte DNA wurde dann mit  $500\mu\text{l}$  70%igem EtOH mindestens zweimal gewaschen und jeweils rezentrifugiert ( $8.000\times g$ , 2min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Danach wurde die DNA für 2min bei RT getrocknet.

### 3.3.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus 3ml Kulturen (DNA-Minipräp)<sup>16,142</sup>

Es wurden 3ml  $\text{LB}_{\text{amp}}$ -Medium (3.2.78) mit einer Einzelkolonie plasmidtragenden *E.coli* XL1 Blue angeimpft und für 16h bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Warmluftschüttler ( $180\text{UpM}$ ) inkubiert. Nach Überführung von 1,5ml der Bakteriensuspension in ein 1.5ml Reaktionsgefäß wurde die Suspension abzentrifugiert ( $14.000\times g$ , 2min, RT). Anschließend wurde das Sediment in  $100\mu\text{l}$  Lösung I (3.2.81) resuspendiert,  $200\mu\text{l}$  Lösung II (3.2.82) dazugegeben und die Bakterien durch vorsichtiges Durchmischen lysiert, bis die Lösung klar und viskos war. Nach Zugabe von  $150\mu\text{l}$  eiskalter Lösung III (3.2.83) wurde wiederum zentrifugiert ( $14.000\times g$ , 5min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Mit dem Überstand der Zentrifugation wurde eine P/C-Extraktion durchgeführt (3.3.2.5). Die Plasmid-DNA wurde präzipitiert (3.3.2.6) und in  $20\mu\text{l}$  TE (3.2.145) aufgenommen.

### 3.3.2.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus 50ml Kulturen (DNA-Midipräp)<sup>126</sup>

Es wurden 50ml  $\text{LB}_{\text{amp}}$ -Medium (3.2.78) mit einer Einzelkolonie plasmidtragenden *E.coli* XL1 Blue angeimpft und  $\mu\text{N}$  bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Warmluftschüttler ( $180\text{UpM}$ ) inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde in ein 50ml Gefäß überführt und die Bakterien durch Zentrifugation ( $6.000\times g$ , 10min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) sedimentiert. Das Sediment wurde in 4ml P1 (3.2.94) resuspendiert, 4ml P2 (3.2.95) dazugegeben und die Bakterien unter vorsichtigem Mischen bei RT lysiert, bis die Lösung klar war. Nach Zugabe von 4ml eiskaltem P3 (3.2.96) erfolgte bei  $0^{\circ}\text{C}$  eine Inkubation für 15 min, der sich eine Zentrifugation ( $8.000\times g$ , 30min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) anschloß. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und unter gleichen Bedingungen rezentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Papierfilter auf eine, mit 10ml QBT-Puffer (3.2.125) äquilibrierte, *Qiagen*-Tip-100 Säule aufgetragen und die Säule mit  $2\times 10\text{ml}$  QC-Puffer (3.2.126) gespült. Die Plasmid-DNA wurde mit 5ml QF-Puffer (3.2.127) eluiert, mit 4ml Isopropanol bei RT gefällt und anschließend zentrifugiert ( $30.000\times g$ , 30min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Das Präzipitat wurde mit 5ml eisgekühltem, 70%igem EtOH gewaschen und wiederum, unter gleichen Bedingungen, rezentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Sediment für 5min bei RT getrocknet und in  $100\mu\text{l}$   $1\times\text{TE}$  (3.2.145) aufgenommen.

### 3.3.3 Modifikation von DNA

#### 3.3.3.1 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und cDNA<sup>142</sup>

Zwischen 200ng-5µg DNA wurden, mit der erforderlichen Menge Restriktionsenzym der Fa. *Boehringer* oder der Fa. *Fermentas*, Aqua Millipore und 1/10 Vol. des entsprechenden *Boehringer*-Restriktionspuffers [A (3.2.115), B (3.2.116), H (3.2.119), M (3.2.121) oder L (3.2.121)], oder und 1/10 Vol. des entsprechenden *Fermentas*-Restriktionspuffern [B (3.2.117), G (3.2.118), O (3.2.122), R (3.2.123), Y (3.2.124)], restriktionsverdaut. Bei Verwendung von DNA aus 3ml Kulturen wurde 0,2µl RNaseA (5U/µl) zum Restriktionsansatz gegeben. Die Inkubationstemperatur richtete sich nach den Herstellerangaben. Die Inkubationsdauer betrug in der Regel 120min. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von ¼Vol. 5×Probenpuffer (3.2.114) gestoppt und die entstandenen Fragmente gelelektrophoretisch (3.3.6.1) aufgetrennt.

#### 3.3.3.2 Auffüllen von Einzelstrangüberhängen

Zum Auffüllen, durch Restriktionsverdau generierter, 5'-überhängender-DNA wurden zu 1-5µl, der elektrophoretisch aufgetrennten (3.3.6.1) und aus dem Agarosegel eluierten (3.3.4) DNA, 1µl dNTP-Stammlösung (3.2.38) und 1µl Restriktionspuffer A (3.2.115) gegeben. Der Ansatz wurde auf mit Aqua Millipore auf 9µl aufgefüllt. Die Auffüllreaktion erfolgte, nach Zugabe von 1µl *Klenow*-Fragment der DNA-Polymerase I (1U/µl), für 30min bei 37°C. Das Enzym wurde anschließend durch Inkubation für 10min bei 65°C inaktiviert und ein Aliquot des Ansatzes zur Klonierung eingesetzt.

#### 3.3.3.3 Abdau von DNA-Einzelstrangüberhängen

Zum Abdauen, durch Restriktionsverdau oder PCR generierter, 5'- oder 3'-überhängender-DNA wurde zu 1-5µl, der elektrophoretisch aufgetrennten (3.3.6.1) und aus dem Agarosegel eluierten (3.3.4) DNA, 1/10 Vol. Mungbohnen-Exonuklease-Puffer (3.2.87) gegeben. Der Ansatz wurde auf mit Aqua Millipore auf 9µl aufgefüllt. Die Abdaureaktion erfolgte, nach Zugabe von 1µl Mungbohnen-Exonuklease (15U/µg DNA), für 30min bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1µl EDTA-Lösung (3.2.40) gestoppt, die Exonuklease bei 68°C für 10min inaktiviert und vor der Klonierung eingesetzt. PCR-Produkte wurden gegebenenfalls vor der Klonierung noch phosphoryliert (3.3.3.4).

#### 3.3.3.4 Phosphorylierung

DNA-Fragmente, die zur Klonierung eingesetzt werden sollten und die am 5'-Ende kein Phosphat trugen, PCR-Produkte, wurden phosphoryliert. Zu ≈1µg des DNA-Fragments wurden 1µl PNK-Puffer (3.2.112), 1µl ATP-Stammlösung (3.2.13) und 1µl T4-PNK (1U/µl) gegeben und der Reaktionsansatz mit Aqua Millipore auf 10µl aufgefüllt. Es wurde durch Inkubation für 60min bei 37°C phosphoryliert. Die T4-PNK wurde anschließend durch Inkubation für 10min bei 65°C inaktiviert.

### 3.3.3.5 Dephosphorylierung

Zur Dephosphorylierung eines restriktionsverdauten Plasmidvektors wurden 2µl aP-Puffer (3.2.6) und 1U alkalische Phosphatase, pro 50pmol 5'-Enden des Vektors, zum Restriktionsansatz (3.3.3.1) gegeben. Der Ansatz wurde 1h bei 37°C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion, mit 1/5 Vol. Probenpuffer (3.2.114), wurde der Ansatz elektrophoretisch aufgetrennt (3.3.6.1) und der Vektor daraus isoliert (3.3.4).

### 3.3.3.6 Ligation

Für die Ligation wurden ≈20ng Plamidvektor-DNA mit einem 3-5fachen molaren Überschuß DNA-Fragment in 1×Ligationspuffer (3.2.80) mit 1U T4-DNA-Ligase für ≥4h bei 14°C inkubiert. Um eine bimolekulare Reaktion, Ligation von Vektor mit Fragment, gegenüber einer monomolekularen Reaktion, Religation des Vektors, zu begünstigen, wurde ein kleines Reaktionsvolumen (10-20µl) für den Reaktionsansatz eingesetzt.

War das Insert aus einem Vektor durch Restriktionsverdau nur partiell entfernt worden und sollte das freie Ende des am Vektor verbleibenden Fragments wieder mit diesem verknüpft werden (Religation), wurde ein größeres Volumen (50-250µl) für den Religationsansatz eingesetzt. Die sonstigen Bedingungen entsprachen denen der Ligation.

## 3.3.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen<sup>177,127</sup>

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen (3.3.6.1) erfolgte mit Hilfe des *Qiaex*-Gelelutionskits. Das DNA-Fragment von Interesse wurde, unter UV Licht von 366nm, aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Pro 100mg Agarosegel wurden 300µl QX1-Puffer (3.2.130) und 10µl *Qiaex*-Suspension (3.2.129) dazupipettiert. Unter Schütteln (140UpM) erfolgte im Heizblock bei 50°C eine Inkubation für 10min. Die Suspension wurde daraufhin sedimentiert (14.000×g, 30s, RT). Das Sediment wurde anschließend je zweimal, zuerst mit 500µl Puffer QX2-Puffer (3.2.131), dann mit QX3-Puffer (3.2.132) gewaschen und zwischendurch jeweils wie zuvor sedimentiert. Nach dem Abnehmen des QX3-Puffers wurde das Sediment kurz bei RT getrocknet und die DNA, durch Resuspendieren in 20µl 1×TE (3.2.145) und Inkubation für ≥20min bei RT, eluiert. Danach wurde das Silicagel abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Ausbeute im Agarosegel bestimmt.

## 3.3.5 Sequenzierung<sup>143,165</sup>

Zur Sequenzierung wurden 2-3µg doppelsträngiger DNA, aus Mini-(3.3.2.7) oder Midipräp (3.3.2.8), als Matrize eingesetzt. Die DNA wurde, durch Zugabe von 0,4 Vol. Denaturierungslösung (3.2.35) und Inkubation für 10min bei RT, denaturiert. Anschließend wurde die DNA präzipitiert (3.3.2.6).

Das Hybridisieren der Sequenzierprimer an die Template-DNA erfolgte, nach Zugabe von 1µl Primer (0,5pmol), 2µl Reaktionspuffer (3.2.133) und 7µl Aqua Millipore, durch Inkubation für 15min bei 37°C. Nach dem Abkühlen auf RT wurde der Ansatz mit dem *Reagent Kit for DNA Sequencing with 7-deaza-dGTP and Sequenase* (USB) sequenziert. Dazu wurden zu dem hybridisierten DNA/Primer-Ansatz 1µl DTT-Lösung (3.2.39), 2µl Markierungslösung (3.2.85), 0,5µl α-[<sup>35</sup>S]-dATP (10µCi/µl) und 0,5µl *Sequenase*, die zuvor mit dem *Sequenase*-

Verdünnungspuffer (3.2.136) auf 1,5U/μl verdünnt worden war, dazugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 2min bei RT inkubiert.

Jeweils 2,5μl des Reaktionsansatzes wurden zu 2,5μl eines Terminationsmixes, ddATP-Terminationsmix (3.2.31), ddCTP-Terminationsmix (3.2.32), ddGTP-Terminationsmix (3.2.33) und ddTTP-Terminationsmix (3.2.34), pipettiert und für 3min bei 37°C inkubiert. Jede Terminationsreaktion wurde durch Zugabe von 4μl Stopp-Puffer (3.2.142) gestoppt. Die Proben wurden für 5min bei 80°C denaturiert und anschließend jeweils 1-2μl auf das Sequenziergel (3.3.6.2) aufgetragen.

### 3.3.6 Molekularbiologische Gelelektrophorese-Techniken

#### 3.3.6.1 DNA-Agarose-Gelelektrophorese<sup>142</sup>

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in horizontalen Agarosegelen. Je nach Trennproblem wurden Agarosekonzentrationen zwischen 0,8% (DNA-Fragmente größer als 2kb) und 2,0% (DNA-Fragmente kleiner als 0,4kb) gewählt. Zur Vorbereitung des Agarosegels wurden 300ml Agarosegel-Lösung (3.2.4) aufgeköcht und dann auf 60°C abgekühlt. Davon wurden 50ml mit 30μl Ethidiumbromid-Stammlösung (3.2.46) versetzt, in einen Gelträger gegossen, ein 8- oder 11-zähliger Kamm zur Generierung der Probenauftragstaschen bis zu  $\frac{3}{4}$  der Tiefe in die Lösung gesteckt und das Aushärten durch Abkühlung auf RT abgewartet.

Zur Vorbereitung der Proben wurde 1/5 Vol. Probenpuffer zu 100ng-2μg DNA, Plasmid-DNA aus einem Restriktionsverdau (3.3.3.1) oder DNA aus einer PCR (3.2.114), pipettiert und ≤20μl der Probe auf das Agarosegel aufgetragen. Als Größen- und Mengenstandard wurden 500ng λ-DNA, mit *EcoRI* und *HindIII* verdaut, aufgetragen.

Die Größen [bp] (und Mengen [ng]) des Standards: 21226 (219), 5148 (53), 4973 (51), 4268 (44), 3530 (36), 2027 (21), 1904 (20), 1584 (16), 1375 (14), 947 (10), 831 (9), 564 (6) und 125 (1).

Die Elektrophorese wurde in *Gel Electrophoresis Apparatus GNA-100*-Elektrophoresekammern (Pharmacia), mit 25μl EtBr-Stammlösung (3.2.46) in 250ml 1×TEB (3.2.146) als Laufpuffer, durchgeführt. Die angelegte Spannung variierte zwischen 70 und 130V (4-7V/cm). Die Trenndauer betrug 30-90min.

#### 3.3.6.2 DNA-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Sequenzierte(n) Probe(n) (3.3.5) wurden auf einem 4%igen, denaturierenden Polyacrylamidgradientengel (0,2-0,4mm; *Protogel*, Biozym) in einer *Macrophor*-Gelapparatur (Pharmacia) aufgetrennt. Die Platten, zwischen denen das Gel polymerisiert wurde, die Thermoplatte und die Sequenzierplatte, waren vor der Anfertigung des Gels gründlich sowohl mit Aqua dem. als auch mit 96%igem EtOH gereinigt worden. Die Thermoplatte wurde mit 2%igem *Repel*-Silan, die Sequenzierplatte mit 100μl *Bind*-Silan behandelt. Nach zehnmütiger Trocknungszeit wurde letztere zweimal mit 96%igem EtOH abgerieben. Die anschließende Elektrophorese erfolgte mit 3kV für 100-140min, in 1×TEB (3.2.146) als kathodischem und anodischem Laufpuffer. Die Thermoplatte wurde dabei auf bei 48°C temperiert. Nach Abschluß der Elektrophorese erfolgte eine Fixierung des Gels für

30min in 10% HAc, Spülen mit 96%igem EtOH, Trocknen bei 80°C für 60min und Autoradiografie über Nacht.

### 3.3.7 PCR zur *in vitro*-Mutagenese

#### 3.3.7.1 PCR<sup>140</sup>

Für die Mutagenese wurde ein Ansatz aus 10ng Plasmid-DNA (*Template*), je 50pmol Sense- und Antisense-Primer, 10µl 10×PCR-Puffer (3.2.106), 1µl dNTP-Stammlösung (3.2.38) und 2,5U *taq*-DNA-Polymerase mit Aqua Millipore (autoklaviert und UV-behandelt) auf 100µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde mit 50µl Mineralöl überschichtet und in die PCR-Maschine (*Trioblock*, Biometra) gestellt.

Er wurde dann für 1min bei 94°C denaturiert. Die sich anschließenden 20 PCR-Zyklen bestanden jeweils aus Denaturierung (1min, 94°C), Binden der Primer [1min, 4°C unterhalb der niedrigeren der beiden Schmelztemperaturen der Primer ( $T_m$ )] und Synthese (je 1min/1000bp). Der  $T_m$  der Primer wurde anhand der Anzahl, der im Primer vorhandenen Nukleotide (A, C, G und T), durch die Näherungsformel  $T_m=4\times(G+C)+2\times(A+T)$  berechnet. Enthielten die Primer Nukleotide, die zur cDNA nicht komplementär waren, wurden pro nicht paarendem Nukleotid 5°C von der berechneten  $T_m$  subtrahiert, wenn sich das entsprechende Nukleotid im Inneren des Primers befand. Befanden sich die nicht komplementären Nukleotide am 5'-Ende des Primer wurde eine Korrektur des  $T_m$  nicht vorgenommen, die Nukleotide aber auch nicht in die Berechnung des  $T_m$  mit einbezogen.

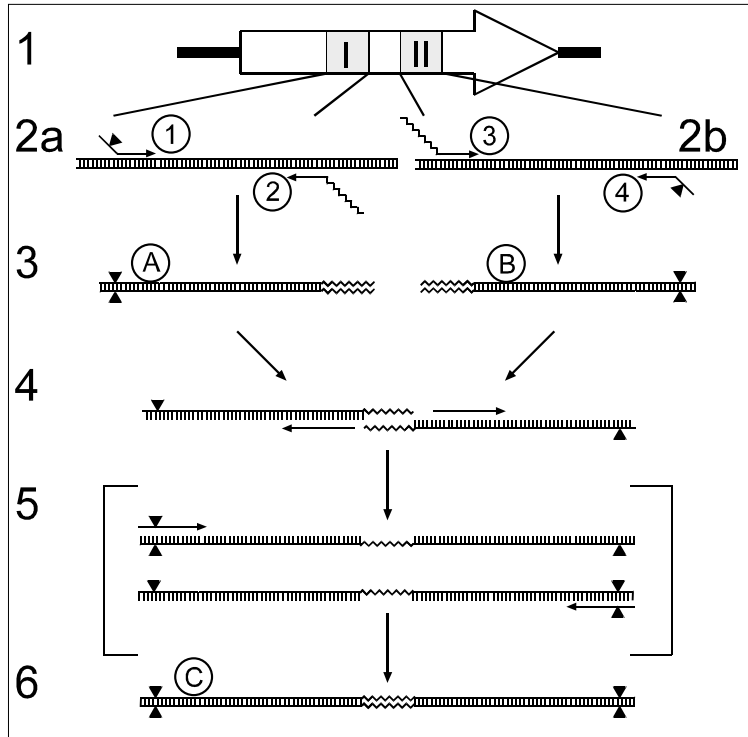
Nach Beendigung der PCR-Zyklen wurde die Synthesereaktion für 5min bei 72°C weitergeführt und die Proben nachfolgend auf 4°C abgekühlt.

Die entsandenen PCR-Produkte wurden aus 10-20µl des PCR-Ansatzes, nach gelelektrophoretischer Trennung (3.3.6.1) und Extraktion aus dem Gel, isoliert. (3.3.4). In der PCR generierte überhängende Enden wurden aufgefüllt (3.3.3.2), das Fragment phosphoryliert (3.3.3.4) und für die Klonierung (3.3.1) eingesetzt.

Alternativ enthielten die verwendeten Primer an ihrem 5'-Ende einen Bereich, der zum eingesetzten cDNA-Template nicht komplementär war und aus dem in der PCR jeweils eine Restriktionsschnittstelle generiert wurde. In diesem Fall wurden 10-20µl des PCR-Ansatzes zunächst gefällt (3.3.2.6), dann resuspendiert und restriktionsverdaut (3.3.3.1). Der Restriktionsansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel extrahiert und in einen entsprechend restriktionsverdauten Plasmidvektor einkloniert.

### 3.3.7.2 *Overlap-PCR*

Es sollte die für ein Fusionsprotein kodierende cDNA aus zwei Bereichen (1: **I** und **II**) zusammengefügt werden. Die beiden Bereiche sollten durch 18 Nukleotide, die für 6 Glycine kodieren (GGG), verbunden werden. Dafür wurde die *Overlap-PCR* eingesetzt.



Benötigt wurden ein Sense- (①) und ein Antisense-Primer (④), die zum einen am 5'-Ende von Bereich **I** (①) und zum anderen am 3'-Ende von Bereich **II** (④) der cDNA binden. Beide Primer haben, jeweils an ihrem 5'-Ende, eine Sequenz, aus der in der PCR jeweils eine Restriktionsschnittstelle (▼) generiert wurde. Die Restriktionsschnittstellen wurden später für die Klonierung (3.3.1) in den Plasmidvektor verwandt.

Außerdem wurde als Gegenprimer für den 3'-Antisense-Primer (④), ein Sense-Primer (③) verwandt,

dessen 18 Nukleotide am 5'-Ende, für 6 Glycine kodieren (GGG). Desweiteren wurde als Gegenprimer für den 5'-Sense-Primer (①) ein Antisense-Primer (②) eingesetzt, der am 5'-Ende, in invers-komplementärer Orientierung die 18 Nukleotide des 3'-Antisense-Primers ③ trägt. Alle vier Primer haben an ihrem 3'-Ende jeweils 15 Nukleotide, die der cDNA, entweder in Sense (①, ③)- oder Antisense- (②, ④) Orientierung, entsprechen.

In einer PCR (3.3.7.1) mit 15 Zyklen wurde, mit der cDNA sowie Primer ① und ②, Fragment **A** aus der cDNA amplifiziert (2a). Desgleichen wurde, mit der cDNA sowie Primer ③ und ④, Fragment **B** aus der cDNA amplifiziert (2b). Die entstandenen PCR-Fragmente (**A** und **B**), wurden aus dem PCR-Ansatz, nach gelelektrophoretischer Trennung (3.3.6.1) und Extraktion aus dem Agarosegel (3.3.4), isoliert (3).

In einer weiteren PCR (4–6) wurden zunächst 3 Zyklen nur mit Fragment **A** und Fragment **B** durchgeführt (4). Es wurde dann, für 14 weitere Zyklen, Primer ① und ② dazugegeben. Das entstandene PCR Produkt, Fragment **C** (6), wurde zunächst gefällt (3.3.2.6), dann resuspendiert und mit den Restriktionsenzymen, deren Schnittstellen durch Primer ① und Primer ④ generiert worden waren, restriktionsverdaut (3.3.3.1). Der Ansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel extrahiert und das Fragment **C** in einen entsprechend restriktionsverdauten Plasmidvektor inkloniert.



## 3.4 Proteinbiochemische Methoden

### 3.4.1 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

#### 3.4.1.1 Dialyse von Proteinlösungen

Zur Vorbereitung der Dialyse wurden getrocknete Dialyseschläuche in der Mikrowelle, 1× in 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung und 2× in Aqua Millipore, aufgekocht. Die Aufbewahrung der Dialyseschläuche erfolgte anschließend in 0,1% NaN<sub>3</sub>-Lösung.

Der Dialyseschlauch wurde auf die benötigte Länge zurechtgeschnitten und an einem Ende mit einer Plastikklammer verschlossen. Eine Proteinlösung wurde in den Dialyseschlauch eingefüllt und auch das andere Ende des Schlauchs mit Plastikklammer verschlossen. Daraufhin wurde mindestens 2×, für jeweils ≥4h bei 4°C gegen den gewünschten Puffer, mit jeweils ≥1.000 Vol. des Volumens der Proteinlösung, dialysiert. Der Dialysepuffer wurde dabei auf dem Magnetrührer mit ≈150UpM gerührt.

#### 3.4.1.2 Einfrieren und Lagerung von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden zur Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C (für kurze Zeit) bzw. bei -70°C (für längere Zeit) gelagert.

#### 3.4.1.3 Ultraschallbehandlung von Bakterienkulturen und Proteinlösungen

Um lösliche Fusionsproteine nach Lyse der Bakterien in Lösung zu bringen oder Proteine aus dem Sediment der Membranpräparation (3.4.3.1, 3.4.3.2) in Probenpuffer (3.2.113) zu lösen, wurden die Suspensionen am Ultraschallgerät (*Cell Disruptor B15*, Branson) mit der Mikrospitze, Stufe 7 (AN/AUS: 50%), 5× für 30s, mit jeweils 30s Pause, beschallt.

Um Bakterien-DNA aus großen Bakteriensedimenten nach Lyse der Bakterien zu scheren, wurden diese am Ultraschallgerät mit der Mikrospitze, Stufe 7 (AN/AUS: 50%), 5× für je 3min, mit jeweils 1min Pause, beschallt.

Während der Behandlungen wurden die Probengefäße in Eis gekühlt.

#### 3.4.1.4 Bestimmung der Proteinkonzentration mit *Coomassie-Farbstoff*<sup>18</sup>

Die zu untersuchenden Proteinproben wurden auf ≈0,05–0,5µg Protein/µl verdünnt. Von den Proben wurden drei Volumina, 10µl, 30µl und 80µl, mit Puffer auf 100µl aufgefüllt. Desweiteren wurde eine BSA-Standardreihe mit 1µg, 2µg, 3µg, 5µg, 7µg, 10µg, 15µg und 20µg BSA, in jeweils 100µl Puffer sowie zwei Ansätze ohne BSA für den Blindwert, hergestellt. Für die Proteinproben, die BSA-Standards und den Blindwert wurde der gleiche Puffer verwandt.

Es wurde 900µl Bradford-Reagenz (3.2.24) zu den Proben gegeben und für 10min bei RT inkubiert. Anschließend wurde im Photometer die OD<sub>580</sub> der Proben bestimmt und anhand der BSA-Standardreihe die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

#### 3.4.1.5 Bestimmung der Proteinkonzentration mit *Bicinchonininsäure*<sup>156</sup>

Die zu untersuchenden Proteinproben, die BSA-Standardreihe und die Blindwerte, wurden, wie in 3.4.1.4 beschrieben, vorbereitet.

Es wurden 10ml BCA-Lösung A (3.2.16) und 200µl BCA-Lösung B (3.2.17) zusammengegeben und davon zu jeder Probe 800µl pipettiert. Nach Inkubation für 30min bei 60°C wurden pro Probe 2× je 360µl auf eine 96-well-Platte pipettiert, im ELISA-Lesegerät (SLT) die OD<sub>550</sub> bestimmt und anhand der BSA-Standardreihe die Proteinkonzentration der Probe berechnet.

### 3.4.2 Molekularbiologische Gelelektrophorese-Techniken

#### 3.4.2.1 Analytische SDS-PAGE<sup>96</sup>

Für die analytische SDS-PAGE, in einer *Mini-Protean*-Gelapparatur (*Bio Rad*), wurde zunächst ein Trenngel vorbereitet. Je nach Größe des Proteins/der Proteine von Interesse enthielt das Trenngel eine Acrylamidkonzentration zwischen 7% (Proteine ≥100kDa) und 15% (Proteine ≤30kDa).

Zunächst wurden ≈10ml Lösung für das Trenngel vorbereitet. Dazu wurde Acrylamid-Lösung (3.2.3), mit der entsprechend vorgegebenen Acrylamidkonzentration zwischen 7-15%, 2,5ml Lower-Tris (3.2.84) mit Aqua Millipore auf 1 Vol. aufgefüllt. Zum Starten der Polymerisation wurde 1/100 Vol. APS-Stammlösung (3.2.12) sowie 1/1.000 Vol. TEMED dazugegeben, die Lösung gemischt und zwischen zwei Glasplatten (7cm Höhe × 8,3cm Breite), getrennt durch Abstandshalter (0,5cm Breite × 0,15cm Tiefe), bis zu einer Höhe von ≈5cm gegossen. Die Gellösung wurde mit Überschichtungslösung I (3.2.151) überschichtet und für 30min die Polymerisation des Gels abgewartet.

Dann wurden 5ml Lösung für das Sammelgel vorbereitet. Dazu wurden 500µl Acrylamidlösung (3% Acrylamid-Endkonzentration), 1,25ml Upper-Tris (3.2.153) und 3,25ml Aqua Millipore gemischt. Die Überschichtungslösung wurde vom Trenngel mit Aqua dem. entfernt. Zum Starten der Polymerisation wurde 50µl APS-Lösung sowie 5µl TEMED dazugegeben und die Lösung bis zum oberen Rand der Glasplatten über das Trenngel geschichtet. Vor der Polymerisation für 30min wurde ein 15-zähliger Kamm, zum Generieren der Probenauftragstaschen, so in die Sammelgellösung eingesetzt, daß das Gel luftdicht abgeschlossen war.

Nach der Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die kathodische wie anodische Kammer mit je 200ml 1×Laufpuffer (3.2.75) gefüllt.

Zu den Proteinproben für die SDS-PAGE wurde in 1/3 Vol. Probenpuffer (3.2.113) gegeben. Die Proben wurden für 2min bei 95°C [Protein überexprimierende Bakterien (3.4.4.1, 3.4.4.2) und gereinigtes Fusionsprotein (3.4.5.1, 3.4.5.3, 3.4.5.4, 3.4.5.5)] oder für 1h bei RT [Membranpräparationen (3.4.3.1, 3.4.3.2)] denaturiert.

Pro Proben tasche wurde entweder eine 30µl Bakterienkultur entsprechende Menge Protein (3.4.4.1, 3.4.4.2), ≈1µg gereinigtes Fusionsprotein (3.4.5.1, 3.4.5.3, 3.4.5.4, 3.4.5.5), ≈10-50µg Protein von Membranpräparationen aus nativem Gewebe (3.4.3.1) oder von Zellen aus Zellkultur (3.4.3.2) aufgetragen.

Sollte von dem SDS-PAGE ein *Western-Blot* angefertigt werden, wurde pro Proben tasche 10µl Bakterienkultur entsprechende Menge Protein, (3.4.4.1, 3.4.4.2), ≈100ng gereinigtes Fusionsprotein (3.4.5.1, 3.4.5.3, 3.4.5.4, 3.4.5.5), ≈10-50µg Protein von Membranpräparationen aus nativem Gewebe (3.4.3.1) oder ≈1-10µg Protein von

Membranpräparationen Protein-überexprimierender Zellen aus Zellkultur (3.4.3.2) aufgetragen. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Molekulargewichtsstandard in 1/3 Vol. Probenpuffer aufgetragen. Dazu wurde für Proteine <60kDa der Standard M14-70, für größere Proteine der Standard M6H, mit jeweils ≈200ng Protein pro erwarteter Proteinbande, eingesetzt. Die Größen der Proteine in den Standards [kDa] sind für M14-70: 66, 49, 29, 18, 14 und für M6H: 205, 116, 97, 66, 49, 29. Das aufgetragene Volumen pro Probe betrug maximal 30µl.

Die Proteine wurden mit 100V im elektrischen Feld (10V/cm) getrennt, bis kurz bevor das Bromphenolblau das untere Ende des Gels erreicht hatte (≈45min). Sollte das Gel nach der Elektrophorese für den *Western-Blot* eingesetzt werden, wurde, kurz vor Beendigung der Elektrophorese, 2µl Pyronin Y-Lösung (3.2.128) in die Probentasche des Standards pipettiert. Das Gel wurde zwischen den Gelplatten herausgenommen und entweder für den *Western-Blot* (3.5.9) eingesetzt oder für 20min in *Coomassie-Färbelösung I* (3.2.28) auf dem Horizontalschüttler bei 200UpM geschüttelt. Anschließend wurde das Gel üN in Entfärbelösung (3.2.44) oder 1-2h in Schnellentfärbelösung (3.2.134) entfärbt, bis der Hintergrund des Gels praktisch frei von *Coomassie-Farbstoff* war.

### 3.4.2.2 Präparative *Laemmli*-SDS-PAGE

Es wurden 40ml Lösung für das Trenngel entsprechend der Proteingröße, wie in 3.4.2.2 beschrieben, vorbereitet. Die Lösung wurde zwischen zwei Glasplatten (17cm Höhe × 15,5cm Breite), getrennt durch Abstandshalter (0,8cm Breite × 0,4cm Tiefe), bis zu einer Höhe von ≈13cm gegossen und mit Überschichtungslösung I (3.2.151) überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels (≈2h) und Entfernung der Überschichtungslösung I mit Aqua dem., wurden ≈10ml Sammelgel (3.4.2.2) über das Trenngel geschichtet und mit Überschichtungslösung II (3.2.152) überschichtet. Das vollständig polymerisierte Gel wurde in die Gelkammer für die präparative SDS-PAGE eingespannt und die anodische wie kathodische Pufferkammer je 400ml 1×Laufpuffer (3.2.75) gefüllt.

Zur Auftrennung von Fusionsprotein aus überexprimierenden Bakterien (3.4.4.1, 3.4.4.2), wurde das Bakteriensediment aus 100ml Bakterienkultur in 1ml PBS (3.2.97) resuspendiert, 500µl Probenpuffer (3.2.113) dazugegeben und mit Ultraschall behandelt (3.4.1.3). Anschließend wurde die Probe für 2min bei 95°C denaturiert.

Die denaturierte Probe wurde auf das Gel aufgetragen und üN bei 20V (1V/cm) aufgetrennt, bis kurz bevor das Bromphenolblau das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Das Gel wurde zwischen den Gelplatten herausgenommen und für 20min in *Coomassie-Färbelösung II* (3.2.29) auf dem Horizontalschüttler leicht geschüttelt. Anschließend wurde das Gel in Aqua dem. unter leichtem Schütteln entfärbt, bis sich die Proteinbanden so deutlich abzeichneten, daß der Bereich, in dem sich das Fusionsprotein befand, identifiziert und ausgeschnitten werden konnte.

### 3.4.2.3 Elektroelution von Proteinen aus der SDS-PAGE

Proteinbanden, die nach präparativer SDS-PAGE aus dem Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten worden waren (3.3.3.3), wurden durch Elektroelution aus dem Gel eluiert.

Die Elektroelutionskammer *Biotrap BT 1000* (Schleicher & Schüll) wurde zu beiden Seiten mit je einer proteinimpermeablen *BT1*-Membranen (Schleicher & Schüll) abgedichtet. Zur anodischen Seite der Kammer wurde mit einer weiteren, für Proteine semipermeablen, *BT2*-Membran (Schleicher & Schüll) eine kleine Kammer ( $\approx 1\text{ml}$ ) abgeteilt, in die das Protein aus dem Gel eluiert wurde.

Die Elutionskammer sowie die anodische und die kathodische Pufferkammer wurden zunächst mit 1×Elektroelutionspuffer (3.2.41) gefüllt und die kleingeschnittenen Gelstücke (3.4.2.2) in die Elutionskammer gelegt. Die Elution erfolgte bei  $4^\circ\text{C}$  mit  $150\text{V}$  ( $\approx 5\text{V/cm}$ ) für  $\geq 16\text{h}$ . Die Lösung mit dem eluierten Protein wurde aus der kleinen Kammer entnommen. Vor der weiteren Verwendung des eluierten Proteins wurde die Proteinlösung dialysiert (3.4.1.1), die Größe der eluierten Bande (3.4.2.1) und die Proteinkonzentration (3.4.1.5) bestimmt.

### 3.4.3 Herstellen von Membranpräparationen

#### 3.4.3.1 Membranpräparation aus nativem Gewebe<sup>58</sup>

Frisches Gewebe wurde nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verarbeitung, nicht länger als 1 Woche, bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.

Das auf  $-70^\circ\text{C}$  gelagerte Gewebe wurde zum Auftauen in  $10\text{ml}$  frisch angesetzten, hypotonen Homogenisationspuffer (hHP, 3.2.64) pro Gramm Gewebe gegeben. Größere Gewebestücke wurden, untergetaucht in hHP, mit einer Schere kleingeschnitten.

Das Teflonpistill eines Potters wurde an einem KPG-Rührer befestigt. Das Gewebe wurde in einem Potter, bei  $\approx 800\text{UpM}$  des Teflonpistills, durch 20 Stöße (langsames Rauf-und-runter Bewegen des Teflonpistills) homogenisiert. Es wurde  $1/6$  Vol.  $2\text{M}$  Saccharose-Lösung dazugegeben und zunächst 2× bei geringer Beschleunigung zentrifugiert ( $1.000\times g$ ,  $10\text{min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ). Der Überstand wurde jeweils abgenommen. Dann wurde 2× bei mittlerer Beschleunigung ( $10.000\times g$ ,  $10\text{min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) und zum Schluß 1× bei hoher Beschleunigung ( $100.000\times g$ ,  $60\text{min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde mit  $\ddot{U}3$ , das in hHP resuspendierte Sediment mit S3 bezeichnet.

#### 3.4.3.2 Membranpräparation aus Gewebekulturzellen<sup>58</sup>

Die Zellen von zwei konfluent bewachsenen Kulturschalen ( $\varnothing 9\text{cm}$ ; 3.10.2) wurden mit PBS (3.2.97) von der Schale gewaschen, in ein  $50\text{ml}$  Reaktionsgefäß überführt und sedimentiert ( $5.000\times g$ ,  $10\text{min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ). Die Zellen wurden in  $1\text{ml}$  PBS resuspendiert und die Membranen, wie unter 3.4.3.1 beschrieben, präpariert.

### 3.4.4 Überexpression von Fusionsproteinen in *E. coli*

#### 3.4.4.1 Überexpression von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen<sup>50</sup>

Zunächst wurde der Bereich (oder die Bereiche, s. 3.3.7.2) der cDNA, dessen (deren) Translationsprodukt(e) überexprimiert werden sollte(n), in den Plasmidvektor pGEX 2T, an

das 3'-Ende des Leserahmens der Glutathion-S-Transferase (GST) kloniert (3.3.1), so daß ein GST-Fusionsprotein mit durchgehendem Leserahmen exprimiert werden konnte.

Mit einer Kolonie des klonierten, in *E. coli* XL1 Blue transformierten (3.3.2.3) Vektors, wurden 50ml LB<sub>amp</sub>-Medium (3.2.77) angeimpft und üN im Schüttelinkubator mit 180UpM bei 37°C inkubiert. Zur üN-Kultur wurde mit 450ml LB<sub>amp</sub>-Medium verdünnt und für 2h, wie zuvor, im Schüttelinkubator inkubiert. Zur Bakteriensuspension wurde 1/1000 Vol. IPTG-Stammlösung (3.2.72) pipettiert und weitere 4-6h unter gleichen Bedingungen inkubiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (5.000×g, 10min, 4°C) und das Bakteriensediment in 10ml PBS (3.2.97) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde wiederum abzentrifugiert, der Überstand dekantiert, das Sediment in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung (3.4.5.1) bei -70°C gelagert.

#### **3.4.4.2 Überexpression von (His)<sub>10</sub>-Tag-Fusionsproteinen<sup>162</sup>**

Zunächst wurde der Bereich (oder die Bereiche, s. 3.3.7.2) der cDNA, dessen (deren) Translationsprodukt(e) überexprimiert werden sollte(n), in den Plasmidvektor pET 16b, an das 3'-Ende des Leserahmens des (His)<sub>10</sub>-Tags kloniert (3.3.1), so daß ein (His)<sub>10</sub>-Tag-Fusionsprotein mit durchgehendem Leserahmen exprimiert werden konnte.

Mit dem klonierten Vektor wurden *E. coli* HMS 174 oder BL21(DE3) transformiert (3.3.2.3). Der weitere Ablauf der Überexpression war, wie unter 3.4.4.1 beschrieben.

### **3.4.5 Aufreinigung von Fusionsproteinen**

#### **3.4.5.1 Löslichkeitstest für Fusionsproteine**

Von einer überexprimierenden Bakterienkultur (3.4.4.1, 3.4.4.2) wurden 1,5ml abgenommen und die Bakterien sedimentiert (5.000×g, 10min, 4°C). Das Sediment wurde in 300µl PBSTX (3.2.104) resuspendiert, mit Ultraschall behandelt (3.4.1.3) und die Suspension abzentrifugiert (20.000×g, 45min, 4°C). Der die löslichen Proteine enthaltende Überstand wurde abgenommen und 150µl Probenpuffer dazugegeben. Das die unlöslichen Proteine enthaltende Sediment wurde in 300µl PBSTX resuspendiert, 150µl Probenpuffer dazugegeben, mit Ultraschall behandelt (3.4.1.3) und abzentrifugiert (21.000×g, 20min, 4°C). Je 10µl der Proben wurden in der SDS-PAGE (3.4.2.1) auf Überexpression des Fusionproteins überprüft.

#### **3.4.5.2 Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen mit Glutathion-Agarose<sup>155</sup>**

Sedimentierte Bakterien, die lösliches (3.4.5.1), überexprimiertes GST-Fusionsprotein enthielten (3.4.4.1), wurden aufgetaut, in 25ml Aufschlußpuffer (3.2.14) resuspendiert und für 30min bei 0°C inkubiert. Die lysierten Bakterien wurden mit Ultraschall behandelt (3.4.1.3) und abzentrifugiert (20.000×g, 45min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und auf eine, in Äquilibriumspuffer (3.2.8) äquilibrierte, Glutathion-Agarose-Säule mit 1,5ml Bettvolumen aufgetragen. Die Säule wurde mit ≈45ml Äquilibriumspuffer gewaschen und das Protein mit 2× 1,5ml Glutathionpuffer eluiert (3.2.54).

Unlösliches, überexprimiertes GST-Fusionsprotein wurde aufgearbeitet, wie unter 3.4.5.5 beschrieben.

### **3.4.5.3 Aufreinigung von (His)<sub>10</sub>-Tag-Fusionsproteinen mit Ni<sup>2+</sup>-Chelat-Affinitätschromatographie unter nicht denaturierenden Bedingungen<sup>78</sup>**

Sedimentierte Bakterien, die lösliches (3.4.5.1), überexprimiertes (His)<sub>10</sub>-Tag-Fusionsprotein (3.4.4.2) enthielten, wurden aufgetaut, in 25ml His-Resuspendierungspuffer (3.2.61) resuspendiert und für 30min bei 0°C inkubiert. Zu den lysierten Bakterien wurde 25µl Triton-X-100 gegeben, die Suspension mit Ultraschall behandelt (3.4.1.3) und anschließend für 30min bei 4°C am Kopf-über-Schüttler mit ≈30UpM geschüttelt.

Die Suspension wurde abzentrifugiert (20.000×g, 45min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und, nach Zugabe von 3,125ml His-Bindungspuffer-Stammlösung (3.2.55) sowie 62,5µl Mg<sup>2+</sup>-Lösung (3.2.86), auf eine, mit His-Ladepuffer (3.2.60) beladene und in His-Bindungspuffer I (3.2.56) äquilibrierte, Ni<sup>2+</sup>•NTA-Affinitätsmatrix-Säule mit 1ml Bettvolumen aufgetragen. Die Säule wurde mit ≈30ml His-Bindungspuffer I und dann mit ≈30ml His-Waschpuffer I (3.2.62) gewaschen.

Die im His-Waschpuffer I enthaltene Imidazolkonzentration war zuvor in einer Aufreinigung im Maßstab 1:50 bestimmt worden. Dabei wurde die Säule mit Waschpuffer I mit ansteigenden Imidazol-Konzentrationen, 60mM, 120mM, 240mM, 480mM und 960mM, gewaschen und die Eluate in der SDS-PAGE (3.4.2.1) auf enthaltenes Fusionsprotein getestet. Das Protein wurde mit 10ml His-Elutionspuffer I (3.2.58) eluiert.

Unlösliches, überexprimiertes (His)<sub>10</sub>-Tag-Fusionsprotein wurde aufgearbeitet, wie unter 3.4.5.4 beschrieben.

### **3.4.5.4 Aufreinigung von (His)<sub>10</sub>-Tag-Fusionsproteinen mit Ni<sup>2+</sup>-Chelat-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen**

Das Sediment von Bakterien, die unlösliches (3.4.5.1) überexprimiertes (His)<sub>10</sub>-Tag-Fusionsprotein (3.4.4.2) enthielten, wurde aufgetaut, in 25ml His-Resuspendierungspuffer (3.2.61) resuspendiert und für 30min bei 0°C inkubiert. Zu den lysierten Bakterien wurde 25µl Triton-X-100 gegeben, die Suspension mit Ultraschall behandelt (3.4.1.3) und anschließend für 30min bei 4°C am Kopf-über-Schüttler mit 30UpM geschüttelt. Die Suspension wurde abzentrifugiert (20.000×g, 45min, 4°C).

Das Sediment wurde in 25ml His-Resuspendierungspuffer resuspendiert, Harnstoff bis zu einer Konzentration von 8M dazugegeben, für 60min bei 4°C am Kopf-über-Schüttler mit 30UpM geschüttelt und erneut abzentrifugiert (20.000×g, 45min, 4°C).

Der Überstand wurde, nach Zugabe von 3,125ml His-Bindungspuffer-Stammlösung (3.2.55) sowie 62,5µl Mg<sup>2+</sup>-Lösung (3.2.86), mit His-Bindungspuffer II (3.2.57) auf 6M Harnstoff verdünnt und auf eine, mit His-Ladepuffer (3.2.60) beladene und in His-Bindungspuffer II äquilibrierte, Ni<sup>2+</sup>•NTA-Affinitätsmatrix-Säule mit 1ml Bettvolumen aufgetragen. Die Säule wurde mit ≈30ml His-Bindungspuffer II und mit ≈30ml His-Waschpuffer II (3.2.63) gewaschen. Die im Waschpuffer II enthaltene Imidazolkonzentration war zuvor, wie in 3.4.5.3 beschrieben, bestimmt worden.

Das Protein wurde mit 10ml His-Elutionspuffer II (3.2.59) eluiert.

### **3.4.5.5 Alternative Aufreinigungsmethode für Fusionsproteine**

Unlösliches GST-Fusionsprotein (3.4.5.1) wurde durch Auftrennung in der präpartiven SDS-PAGE (3.4.2.2) und anschließende Elektroelution (3.4.2.3) aufgereinigt.

### **3.4.5.6 Testen aufreinigter Fusionsproteine**

Vor der weiteren Verwendung der gereinigten Fusionsproteine (3.4.5.2, 3.4.5.3, 3.4.5.4 und 3.4.5.5), wurden die erhaltenen Proteinlösungen gegen 1×PBSA (3.2.100) dialysiert (3.4.1.1) sowie die Reinheit (3.4.2.1) und die Proteinkonzentration (3.4.1.2) der eluierten Fraktion bestimmt.

## **3.5 Allgemeine immunologische Methoden**

### **3.5.1 Vorbereitung von Antigenen für die Immunisierung von Kaninchen<sup>64</sup>**

Die, für die Immunisierung als Antigen eingesetzten, aufgereinigten GST-Fusionsproteine (3.4.5.2 oder 3.4.5.5) wurden durch Dialyse (3.4.1.1) in PBS äquilibriert. Etwa 1mg Fusionsprotein in 1ml PBS wurde mit dem gleichen Volumen *Freund'sches* Adjuvans emulgiert. Dazu wurde die Lösung mit dem Fusionsprotein und das Adjuvans in eine 2ml Plastikspritze aufgezogen. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Lösungen frei von Luftblasen waren. Die beiden Spritzen wurden Kopf-an-Kopf, über zwei durch eine Kapillare verbundene Spritzenaufsätze, zusammengesteckt. Die Proteinlösung wurde durch die Kapillare in das Adjuvans gedrückt. Beide Lösungen zusammen wurden dann so oft von der einen in die andere Spritze gedrückt ( $\approx 20\times$ ), bis der Widerstand der entstandenen Emulsion sich soweit erhöht hatte, daß das Überführen von der einen in die andere Spritze fast unmöglich war. Die Emulsion wurde in der 2ml Spritze für die Immunisierung eingesetzt (3.5.2).

Für die Erstimmunisierung wurde komplettes *Freund'sches* Adjuvans, für die folgenden Immunisierungen inkomplettes *Freund'sches* Adjuvans verwandt.

### **3.5.2 Immunisierung von Kaninchen und Gewinnung von Blut<sup>64</sup>**

Das vorbereitete Antigen (3.5.1) wurde dem Kaninchen, auf 5 Stellen des Rückens verteilt, subcutan gespritzt. Die erste Auffrischung der Immunisierung fand 6 Wochen nach der Erstimmunisierung statt. Die weiteren Auffrischungen (2-4) folgten im Abstand von jeweils 4 Wochen. Vor der Erstimmunisierung und jeweils 10-12 Tage nach jeder Immunisierung, wurde den Kaninchen jeweils  $\approx 5\text{ml}$  Testblut abgenommen. Der Titer des Testbluts gegen das immunisierte Antigen wurde jeweils im ELISA (3.5.5) bestimmt. Veränderte sich der Titer zwischen zwei Immunisierungen nicht mehr bzw. kaum noch wurde das Blut des Kaninchens durch Ausbluten gewonnen.

### **3.5.3 Behandlung des Rohserums immunisierter Kaninchen<sup>64</sup>**

Das gewonnene Blut (3.5.2) wurde für 6h bei 37°C inkubiert. Der gebildete Blutkuchen wurde vom Rand des Gefäßes gelöst und das Blut üN bei 4°C stengelassen. Das Rohserum wurde dekantiert und abzentrifugiert ( $5.000\times g$ , 10min, 4°C). Das Serum wurde wiederum

abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und für 30min bei 56°C dekomplementiert. Nach erneuter Zentrifugation (5.000×g, 10min, 4°C) wurde das dekomplementierte Rohserum abgenommen und mit 1 Vol. gesättigter Ammoniumsulfatlösung (3.2.52) für 6h bei 4°C gerührt. Die Suspension wurde anschließend abzentrifugiert (21.000×g, 30min, 4°C), das entstandene Sediment in 250µl PBS resuspendiert und gegen 1×PBSA (3.2.100) dialysiert (3.4.1.1). Das entstandene P/D-Serum wurde aliquotiert, schockgefroren (3.4.1.2) und bei –70°C gelagert.

### 3.5.4 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Die Fusionsproteine, die für die Affinitätsreinigung als Antigen verwandt wurden, entsprachen im fusionierten Anteil den immunisierten GST-Fusionsproteinen, trugen jedoch statt des GST-Tags einen (His)<sub>10</sub>-Tag.

Es wurden für die Voradsorption (3×) und Affinitätsreinigung (1×) Nitrocellulosemembranen BA 83 (2,5cm × 2,5cm) mit je ≈400µg gereinigtem Antigen in 2ml 1×PBSA (3.2.100), durch Inkubation üN bei 4°C, beschichtet. Die Membranen wurden danach zunächst getrocknet, dann in PBS reäquilibriert und die restlichen Proteinbindungsstellen mit 5ml Blockpuffer (3.2.22) für 2h bei 4°C blockiert. Die Membran wurde 3× für je 1min in PBSA gewaschen. Die Inkubationen und Waschschrte wurden auf dem Horizontalschüttler mit 100UpM durchgeführt.

Es wurden 300µl des P/D-Serums (3.5.3) mit PBSA auf 5ml verdünnt und für 90min bei 4°C mit einer vorbereiteten Membran mit kreuzreagierendem Antigen inkubiert. Dieser Vorgang wurde 2× wiederholt. Anschließend wurde eine Membran mit dem (His)<sub>10</sub>-Tag-Fusionsprotein des immunisierten Antigens zu dem verdünnten Serum gegeben und wie zuvor, jedoch für 120min, inkubiert. Die Membran wurde 3× für 5min sowie 2× für 10min mit 1×PBSTB (3.2.103) gewaschen und daraufhin in ein 2,2ml Reaktionsgefäß mit 500µl Elutionspuffer (3.2.43) überführt. Das Reaktionsgefäß wurde auf dem *Vortex*-Schüttler für 90s heftig geschüttelt. Der Elutionspuffer wurde entnommen und in einem Reaktionsgefäß mit 125µl 1M Tris/HCl (pH 7,9) neutralisiert. Die Elution wurde wiederholt. Die Eluate wurden vereinigt, gegen PBSA dialysiert (3.4.1.1) und in Aliquots schockgefroren (3.4.1.2). Der Titer (3.5.5) und die IgG-Konzentration (3.5.6) der affinitätsgereinigten Antikörper wurde bestimmt.

### 3.5.5 ELISA<sup>49</sup>

Zur Bestimmung des Titers wurden 16 Vertiefungen einer 96-well-ELISA-Platte mit je 100ng des zu testenden Antigens in 100µl Beschichtungspuffer (3.2.19) üN bei RT beschichtet. Es wurden außerdem je 2×100µl zweier qualitativer IgG-Standards, Standard I (3.2.139) und Standard II (3.2.140), in je zwei Vertiefungen aufgetragen.

Nach dem Entfernen der Beschichtungslösung, durch Ausschütten und anschließendes Ausschlagen der invertierten Platte auf Papiertüchern, wurde mit je 150µl EWB-Hb (3.2.47) pro Vertiefung für 1h inkubiert. Als Blindwerte für den ELISA dienten vier unbeschichtete Vertiefungen, die mit je 150µl EWB-Hb inkubiert wurden. Diese wurden später statt mit Antikörpern wiederum mit EWB-Hb inkubiert. Danach wurden diese Vertiefungen wie die anderen weiterbehandelt.



Nach dem Entfernen des EWB-Hb, wurde die ELISA-Platte 3× mit ELISA-Waschpuffer (3.2.42) gewaschen. Von den zu testenden Antikörpern (Rohserum, P/D-Serum oder affinitätsgereinigte Antikörper), wurden 100µl pro Vertiefung, verdünnt in EWB-Hb, aufgetragen. Die Verdünnungsfaktoren betragen 1/100, 1/300, 1/1.000, 1/3.000, 1/10.000, 1/30.000, 1/100.000 und 1/300.000. Dabei wurde in jeweils zwei Vertiefungen die gleiche Verdünnung aufgetragen.

Die angegebenen Verdünnungsfaktoren sind jeweils auf das Volumen des Rohserums bezogen. Veränderungen des Volumens auf dem Weg vom Rohserum zur affinitätsgereinigten Antikörperlösung, Verdünnungen oder Konzentrierungen, wurden als Faktor in die Berechnung des Verdünnungsfaktors mit einbezogen.

Nach 120min Inkubation wurden die Lösungen mit den Antikörpern aus der Platte entfernt und die ELISA-Platte 3× mit PBS gewaschen. Es wurde anschließend 100µl/Vertiefung einer Lösung aus 1µg/ml PGaR in PBS-Hb (3.2.101) aufgetragen. Nach Inkubation für 60min wurde die Platte wiederum 3× mit PBS gewaschen.

Von der ABTS-Stammlösung (3.2.1), die bei -20°C gelagert wurde, wurde 1ml aufgetaut, mit 9ml Inkubationspuffer (3.2.45) verdünnt und 3µl Wasserstoffperoxid (30%) dazugegeben. Damit wurde die die ELISA-Platte mit 100µl pro Vertiefung für 5min entwickelt. Die Entwicklungsreaktion wurde durch Zugabe von 100µl Stopp-Lösung (3.2.141) pro Vertiefung gestoppt und die jeweilige OD<sub>405</sub> der Lösungen in den Vertiefungen im ELISA-Lesegerät gemessen. Aus den erhaltenen Daten wurde der Titer bestimmt (3.11.1.1).

### **3.5.6 IgG-Test im Sandwich-ELISA**

Zur Bestimmung der IgG-Konzentration affinitätsgereinigter Antikörper wurden für jede Probe 16 Vertiefungen einer 96-well-ELISA-Platte mit je 100ng eines anti-Kaninchen-IgG Antikörpers aus der Ziege (GaR) in je 100µl Beschichtungspuffer (3.2.19) üN bei RT beschichtet. Zusätzlich wurden für die Blindwerte und den IgG-Standard 28 Vertiefungen mit GaR beschichtet.

Als Standard wurde Kaninchen-IgG in EWB-Hb auf 0,5ng/ml, 1ng/ml, 2ng/ml, 3ng/ml, 5ng/ml, 7ng/ml, 10ng/ml, 12ng/ml, 15ng/ml, 20ng/ml, 30ng/ml und 50ng/ml verdünnt.

Die weitere Durchführung war wie unter 3.5.5, nur daß die Standards zusätzlich zu den Proben aufgetragen wurden. Aus den erhaltenen Daten wurde die IgG-Konzentration bestimmt (3.11.1.2).

### **3.5.7 Kompetitiver ELISA**

Die Antigenkonzentration, die bei einer bestimmten Antikörperverdünnung nötig ist, um die OD<sub>405</sub> im ELISA 50% bzw. 90% zu unterdrücken, sollte bestimmt werden.

Dazu wurde aus den Daten des ELISAs der zum OD<sub>405</sub>-Wert von 0,6 zugehörige Verdünnungsfaktor bestimmt. Die Antikörper wurden in dieser Konzentration für den kompetitiven ELISA eingesetzt.

Die Antikörper wurden mit Antigen in EWB-Hb, in den Konzentrationen 100µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml, 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml, 100pg/ml, 10pg/ml, 1pg/ml und ohne Antigen (3.2.47), üN bei 4°C vorinkubiert. Eine ELISA-Platte wurde mit dem gleichen Antigen beschichtet.

Die weitere Durchführung des kompetitiven ELISAs war wie unter 3.5.5 beschrieben. Die Auswertung der Daten des kompetitiven ELISA ist unter 3.11.1.3 beschrieben.

### 3.5.8 *Dot-Blot*

Für die Herstellung von Standards für die Sensitivität von Erst- und Zweitantikörpern im *Western-Blot*, wurden Proteinlösungen mit 10ng/ml der Antigene der Antikörper, in 1×PBST (3.2.102) mit 100µg/ml BSA, hergestellt. Davon wurde, jeweils in der gleichen Lösung, eine Verdünnungsreihe, mit den Konzentrationen 3ng/ml, 1ng/ml, 300pg/ml, 100pg/ml, 30pg/ml, 10pg/ml und 3pg/ml, hergestellt.

Eine PVDF-Membran (3cm × 7cm) wurde für 3min in EtOH (95%) sowie für 3min in PBST äquilibriert und auf dickes, in PBST getränktes, Blotpapier aufgelegt.

Von der Verdünnungsreihe wurden, in absteigender Konzentration, jeweils 0,5µl auf die PVDF-Membran aufgetragen. Der *Dot-Blot* wurde getrocknet zusammen mit einem *Western-Blot* inkubiert (3.5.9).

### 3.5.9 *Western-Blot*<sup>62,168</sup>

In der SDS-PAGE (3.4.2.1) aufgetrennte Proteine, wurden, senkrecht zur Auftrennungsrichtung, im elektrischen Feld auf PVDF-Membran übertragen (*Western-Blot*). Dazu wurde zunächst das Sammelgel und Trenngel getrennt und das Trenngel für 30min in Blotpuffer (3.2.23) äquilibriert.

Eine PVDF-Membran, mit den gleichen Dimensionen wie das SDS-PAG, wurde für 3min in 95% EtOH und dann für 3min in Blotpuffer äquilibriert. Das Trenngel wurde, untergetaucht in Blotpuffer, luftblasenfrei auf die Blotmembran aufgelegt. Membran und Gel wurden von beiden Seiten, mit je zwei Blotpapieren mittlerer Dicke und je einem dickem Blotpapier, eingefasst. Das Blotsandwich wurde in die Blothalterung zwischen Anode und Kathode, das Gel auf der anodischen Seite, in die mit Blotpuffer (4°C) gefüllte *Mini TransBlot*-Blotkammer (Biorad) gestellt und auf dem Magnetrührer bei 100UpM mit 100mA (≈1,5V/cm) für 16h geblottet.

Nach Beendigung des Blottens wurde das Blotsandwich aus der Kammer entnommen, der Blot vom SDS-PAG abgehoben und der Bereich des Blots abgeschnitten, auf den der Proteinmarker geblottet worden war. Dieser Blotstreifen wurde für 1min in *Coomassie-Färbelösung I* (3.2.28) gefärbt sowie nachfolgend in Schnellentfärbelösung (3.2.134) entfärbt, bis der Membranhintergrund praktisch ohne *Coomassie*-Farbstoff war und die Banden des Proteinmarkers deutlich zu erkennen waren. Der restliche Blot wurde zunächst getrocknet.

Sollten als Standards für die Erst- und/oder Zweitantikörper *Dot-Blots* eingesetzt (3.5.8), werden, wurden diese von nun an parallel mit dem *Western-Blot* behandelt.

Die Blots wurden für 3min in 95% EtOH und 3min in 1×PBST (3.2.102) reäquilibriert. Die Proteinbindungskapazität der Blotmembran wurde, durch Inkubation für 2h in Blockpuffer (3.2.22), abgesättigt. Alle Wasch-, Vorinkubations- und Inkubationsschritte wurden bei RT auf dem Horizontalschüttler bei 200UpM durchgeführt.

Danach wurde die Membran für 30min mit Bleichpuffer (3.2.20) inkubiert, 3× für je 5min mit PBST gewaschen und mit Ak-Lösung (3.2.5) für 30min vorinkubiert. Dann wurde mit 10ng/ml des Antikörpers, dessen Antigen nachgewiesen werden sollte, in Ak-Lösung für

120min inkubiert. Der Blot wurde wiederum 4× für je 5min mit 1×PBST gewaschen, mit Ak-Lösung für 30min vorinkubiert, mit 5ng/ml PGaR in Ak-Lösung für 90min inkubiert und erneut 4× für je 5min mit 1×PBST gewaschen.

### **3.5.10 Detektion von Proteinen im Western-Blot mit ECL**

Der Blot (3.5.8 oder 3.5.9) wurde mit 125µl *ECL*-Reagenz/cm<sup>2</sup> Blotmembran, jeweils zur Hälfte *Oxidizing Reagent* und *Enhanced Luminol Reagent (Renaissance ECL-Kit, Du Pont)* bestehend, auf dem Horizontalschüttler für eine Minute bei 400UpM inkubiert. Die *ECL*-Lösung wurde, durch Auflegen auf ein Papiertuch, von der Rückseite des Blots entfernt. Der Blot wurde, die mit Protein beladene Seite nach oben, zwischen zwei *Overhead*-Folien gelegt, von denen die untere Folie auf dem Photokopierer geschwärzt worden war. Die Folienränder wurden mit wasserfestem Klebeband abgedichtet.

Ein *ECL*-Film (*Reflection, Du Pont*) wurde zunächst für 5min aufgelegt und anschließend entwickelt. Anhand des Schwärzungsgrades wurde die ideale Dauer weiterer Expositionen abgeschätzt und gegebenenfalls 2-3 weitere Expositionen, mit einer Dauer zwischen 10s und 1min, durchgeführt.

## **3.6 Immuncytochemie**

### **3.6.1 Fixierung von Zellen für die Immuncytochemie**

Von transient-transfizierten HEK 293-Zellen (3.10.3) wurde 40h nach Transfektion das Nährmedium abgenommen und die Zellen mit -20°C kaltem MeOH für 5min fixiert.

### **3.6.2 Immuncytochemie überexprimierender Zellen**

Die fixierten Zellen (3.6.1) wurden 3× mit PBS (3.2.97) gewaschen und 1-10µg/ml des affinitätsgereinigten Antikörpers, dessen korrespondierendes Antigen die Zellen überexprimierten, in Blocklösung (3.2.21) dazugegeben. Zur Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen auf gleiche Art behandelt. Die Zellen wurden bei 100UpM auf dem Horizontalschüttler für 90min bei RT inkubiert und 4× je 1min mit PBS gewaschen. Es wurde 400ng/ml Cy3-GaR in PBS dazugegeben und wie zuvor inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS, wurden die Zellen mit 37°C warmer Glycerin-Gelatine eingedeckelt.

Nach Abkühlung des Präparates auf 4°C wurden die Zellen im konfokalen Mikroskop analysiert (3.7.3.3).

## **3.7 Immunhistochemie**

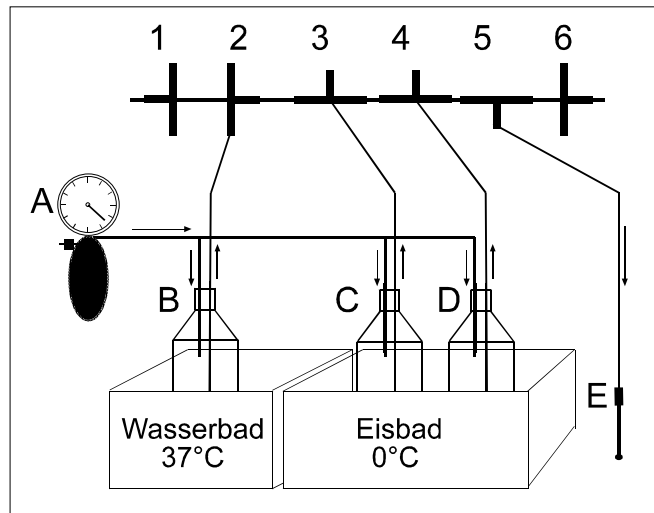
### **3.7.1 Vorbereitende Methoden**

#### **3.7.1.1 Silanisierung von Objektträgern**

Die zu beschichtenden Objektträger wurden zu jeweils 10 Stück in Schlitten für 300ml Glasküvetten eingestellt, mit einem Draht befestigt und in der Spülmaschine gewaschen. Die Küvetten mit den Objektträgern wurden für 15s in Alkylsilanlösung (3.2.9) eingestellt, daraufhin 1× kurz in Aceton und anschließend 2× kurz in Aqua Millipore getaucht. Danach wurden sie in den Inkubator gestellt und zunächst 3h bei RT vorgetrocknet. Nach 24h

stündiger Erwärmung auf 42°C, wurden Gewebsschnitte auf die Objektträger aufgezogen (3.7.2) oder sie wurden bis zur Verwendung gelagert.

### 3.7.1.2 Vorbereitung des Gewebes für die Immunhistochemie



Um für die Immunhistochemie Semidünnschnitte mit einem möglichst geringen Verlust der Gewebestruktur des ZNS anfertigen zu können, wurde eine Perfusionsfixierung mit Nachfixierung eingesetzt.

Es wurden zunächst 1l Vorspüllösung (3.2.155, **B**) im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt und je 1l Fixierlösung (3.2.48, **C**) und Nachspüllösung (3.2.88, **D**) im Eisbad auf 0°C vorgekühlt. Da die Perfusion bei konstantem Druck

durchgeführt wurde, waren die Lösungen in Gaswaschflaschen abgefüllt. Über den Lösungen konnte, mit Hilfe einer Handpumpe mit Manometer und Luftablaßschraube (**A**), der Luftdruck reguliert werden. Die Flaschen waren über Dreiwegehähne (**1-6**) mit der Perfusionskanüle (**E**) verbunden, so daß die Lösungen nacheinander durch die Perfusionskanüle laufen konnten (→). Das Schlauchsystem, von den Flaschen bis zur Kanüle, wurde so vorbereitet, daß es luftblasenfrei Fixierlösung und Nachspüllösung (bis zu den Dreiwegehähnen **3** und **4**) sowie Vorspüllösung (über die Dreiwegehähne **2** und **5**) bis zur Perfusionskanüle enthielt. Die Dreiwegehähne **1** & **6** wurden zur luftblasenfreien Füllung des Schlauchsystems verwandt. Der Luftdruck in den Flaschen wurde auf 200mm Hg gebracht.

Eine adulte Ratte wurde durch Inhalationsnarkose, in einem 5l Becherglas mit Deckel, mit Ether betäubt. Anschließend wurde dem Tier intraperitoneal 500µl *Rompun* (2%), 200µl *Ketanest* (50mg/ml) und 100µl Heparin (5.000 I.E./ml) pro kg Körpergewicht gespritzt. Nach vollständigem Verschwinden des Flexorreflexes der Hinterpfote und des Lidschlußreflexes, wurde der Brustraum eröffnet, die Spitze der linken Herzkammer abgeschnitten und durch das entstandene Loch die Perfusionskanüle eingeführt. Diese wurde dann durch die linke Herzkammer in die aufsteigende Aorta geführt und dort festgeklemmt.

Kurz vor dem Einführen der Kanüle war diese geöffnet worden. Es wurde für ≈5s mit 200mm Hg Vorspüllösung gespült, dann mit Fixierlösung für 10min mit 200mm Hg und für weitere 20min mit 50mm Hg. Zuletzt wurde mit der Nachspüllösung für 10min mit 50mm Hg nachgespült.

Das Gehirn wurde freipräpariert und, sollten anschließend Schnitte in sagittaler Orientierung angefertigt werden, entlang der Mittellinie geteilt. Sollten später Schnitte in koronarer Orientierung angefertigt werden, wurde das Gehirn mit Hilfe der *Rodent Brain Matrix* (ASI Instruments) in Scheiben von ≈2mm Dicke geschnitten. Die *Rodent Brain Matrix* ist eine Edelstahlpassform für das Rattenhirn, mit parallelen Seitenschlitzen, dazu geeignet mit Rasierklingen das Gehirn in parallele, koronare Sektionen à 2mm, oder einem vielfachen davon, zu schneiden.

Die Gewebestücke wurden üN bei 4°C in Fixierlösung nachfixiert, dann in 100ml Gefrierschutzlösung I (3.2.50) überführt, darin 24h inkubiert, und anschließend 2× für jeweils 24h in je 100ml Gefrierschutzlösung II (3.2.51) inkubiert. Danach wurde das Gewebe eingefroren und Gefrierschnitte (3.7.1.3) angefertigt.

### 3.7.1.3 Anfertigen von Gewebsschnitten am Gefriermikrotom

Das Gefriermikrotom (*Jung Frigocut 2000*) wurde auf -28°C äquilibriert.

Das vorbereitete Gewebe (3.7.1.2) wurde, mit der anzuschneidenden Seite, auf Deckgläschen gelegt, mit dem Einbettmedium DSV 1 überschichtet, um 180° gedreht, auf die Mitte einer Schneidehalterung plziert und im Gefriermikrotom eingefroren. Nach Äquilibrierung auf die Temperatur des Schneidegeräts wurden Serien von Schnitten à 25µm angefertigt. Die Schnitte wurden jeweils mit einem Pinsel in 6-well-Platten mit PBS (3.2.97) überführt.

### 3.7.2 Behandlung von Gewebsschnitten im *free floating*-Verfahren mit der ABC-DAB/Ni<sup>2+</sup>-Methode

Die angefertigten Gefrierschnitte (3.7.1.3) wurden zunächst für 15min in frischem 1%igem NaBH<sub>4</sub> in PBS (3.2.97) inkubiert. Alle Inkubationen und Waschschrte wurden bei 60UpM auf dem Horizontalschüttler durchgeführt. Die Schnitte wurden dann 3× für je 10min mit PBS gewaschen und für 30min in Vorinkubationslösung (3.2.154) vorinkubiert. Die Schnitte wurden danach direkt in Inkubationslösung (3.2.66) mit 1-10µg/ml affinitätsgereinigten Antikörpern aus Kaninchen, deren Antigen nachgewiesen werden sollte, überführt und für 48h bei 4°C inkubiert.

Die Schnitte wurden 4× für je 10min mit PBS gewaschen, für 30min in Blocklösung (3.2.21) vorinkubiert und in Blocklösung mit 1µg/ml BGaR für 24h bei 4°C inkubiert. Die Schnitte wurden wiederum 4× für je 10min mit PBS gewaschen und für 30min in Blocklösung vorinkubiert. Es wurde 1µl/ml *Elite*-Lösung A (*Elite-ABC-Kit*, Vector-Camon) in Blocklösung, mit 1µl/ml *Elite*-Lösung B gemischt und 30min vorinkubiert. Die Schnitte wurden dann in diese Lösung überführt und für 12h bei 4°C darin inkubiert.

Die Schnitte wurden 4× für je 10min in PBS gewaschen, für 10min in Ni/Imidazol-Lösung (3.2.93) und für 10min in DAB/Ni/Imidazol-Lösung (3.2.30) vorinkubiert. Die Schnitte wurden in frische DAB/Ni/Imidazol-Lösung überführt und die Entwicklungsreaktion durch Zugabe von 1/10 Vol. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3%) gestartet. Die Reaktion wurde nach 3min durch Zugabe von 1 Vol. PBS, das 0,1% NaN<sub>3</sub> enthielt, gestoppt. Die Schnitte wurden wiederum 3× für je 10min mit PBS gewaschen und anschließend auf silanisierte Objektträger (3.7.1.1) aufgezogen. Nach dem Trocknen üN wurden die Schnitte entwässert und eingedeckelt (3.7.3.1).

### 3.7.3 Konservierung und Dokumentation immunhistochemischer Präparate

#### 3.7.3.1 Entwässern und Eindeckeln von Gewebeschnitten

Die aufgezogenen Schnitte (3.7.2) wurden, für jeweils 3min, der Reihenfolge nach in 50% EtOH, 70% EtOH, 90% EtOH, 96% EtOH, 2×100% EtOH und 2× Xylol entwässert. Nach Entnahme der Objektträger aus dem Xylol wurde *Entellan* auf die Schnitte gegeben und mit einem Deckgläschen blasenfrei eingedeckelt. Die Immunfärbung der Schnitte wurde anschließend am Mikroskop (*Axiophot*, Zeiss) ausgewertet und dokumentiert (3.7.3.2).

#### 3.7.3.2 Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse und fotografieren am Lichtmikroskop<sup>120,121</sup>

Die Immunfärbung von Gewebsschnitten des Rattenhirns wurden anhand von *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*<sup>121</sup> und *The Rat Nervous System*<sup>120</sup> ausgewertet. Die Dokumentation erfolgte mit der fotografischen Anlage eines Mikroskops (*Axiophot*, Zeiss). Es wurden Aufnahmen im Durchlicht oder mit differentiellem Interferenzkontrast (DIC) gemacht.

#### 3.7.3.3 Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse und Fotografieren am konfokalen Mikroskop

Aufnahmen der Fluoreszenz von Zellen, die mit Cy3-gekoppelten Antikörpern markiert worden waren, wurden am konfokalen, Laser-Scanning Mikroskop (TCS NT, Zeiss) gemacht (Anm.: Cy3:  $\lambda_{EX}^{max} = 575nm$ ;  $\lambda_{EM}^{max} = 605nm$ ). Für die Exzitation des Fluorophors wurde die Krypton-Linie (568nm) des Argon-Krypton-Mischlasers verwandt. Am *Photomultiplier* wurde, hinter einem Filter (DD488/568), die Emission der Cy3-Fluoreszenz gemessen. Dazu wurde ein Objektiv mit 63facher Vergrößerung und einer numerischen Appertur von 1,32 (Öl) (PL APO, Zeiss) benutzt. Die Größe der Lochblende betrug während der Aufnahmen 78 $\mu m$ . Es wurden Bilder von 80 $\mu m \times 80\mu m$  (2× Zoom) bzw. 40 $\mu m \times 40\mu m$  (4× Zoom) in der xy-Ebene mit 512×512 Bildpunkten digitalisiert, was Schrittweiten von 155nm bzw. 78nm entspricht. In z-Richtung wurden 16 Schnitte, in einem Abstand von  $\approx 1\mu m$  aufgenommen. Die maximale theoretische Auflösung betrug 150nm (xy) und 300nm (z).

Die farbigen Bilder wurden mit Photoshop (Adobe) in Graustufen umgewandelt, hell/dunkel-invertiert und der gewünschte Ausschnitt vergrößert.

### 3.8 Herstellung von cRNA-Sonden<sup>111</sup>

Etwa 5µg der Plasmid-DNA wurde mit einem Restriktionsenzym, 250-350bp vom zu verwendenden RNA-Polymerase-Promotor, linearisiert (3.3.3.1). Die linearisierte DNA wurde präzipitiert (3.3.2.6) und in 5µl DEPC-Wasser (3.2.37) resuspendiert. Ein Aliquot, mit ca. 500ng DNA, wurde im Agarosegel (3.3.6.1) auf vollständige Linearisierung überprüft.

Für den Reaktionsansatz zur Herstellung der markierten RNA mit dem *Maxiscript*-Kit (*Ambion*) wurden 1µl linearisierte DNA (1µg/µl), 7µl DEPC-Wasser (3.2.37), 2µl Transkriptionspuffer (10×), 1µl ATP (10mM), 1µl CTP (10mM), 1µl GTP (10mM), 5µl α-<sup>33</sup>P]-UTP (≥800Ci/mmol, ≥10mCi/ml) und 2µl SP6- oder T7- RNA-Polymerase (5U/µl + 5U/µl RNase-Inhibitor) zusammenpipettiert. Der Ansatz wurde 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurde 1µl RNase freie DNaseI (2U/µl) dazugegeben und für 15min bei 37°C inkubiert. Die RNA wurde durch EtOH-Präzipitation von nicht inkorporierten Nukleotiden getrennt und in 10µl DEPC-Wasser resuspendiert. Jeweils 1µl wurde in *Ready-Caps* (Beckmann) pipettiert, im Szintillationszähler (*LS 6000 IC*, Beckmann) gemessen und, durch Vergleich der gemessenen Zerfallsrate zur Zerfallsrate von 1µl des gesamten Reaktionsansatzes, die Ausbeute des α-<sup>33</sup>P]-UTP-Einbaus in die RNA bestimmt.

### 3.9 *In-situ*-Hybridisierung

#### 3.9.1 Vorbereitende Methoden

##### 3.9.1.1 Silianisierung von Objektträgern

Die Objektträger wurden vorbereitet wie unter 3.7.1.1 beschrieben. Nach dem Waschen wurden sie zusätzlich üN auf 180°C erhitzt.

##### 3.9.1.2 Vorbereitung des Gewebes

Die Tiere wurden, wie unter 3.7.1.2 beschrieben, narkotisiert. Nach dem Eintreten der Narkose wurden sie dekapitiert, das Gehirn freipräpariert und mit Einbettmedium (DSV 1) in Trockeneis möglichst schnell auf eine Schneidehalterung für das Gefriermikrotom aufgefroren.

##### 3.9.1.3 Anfertigen von Gewebsschnitten

Von dem eingefrorenen Gehirn (3.9.1.2) wurden bei -20°C Schnitte von 10µm Dicke, wie unter 3.7.1.3 beschrieben, angefertigt und durch kurzes Erwärmen der Objektträger, die auf Schneidetemperatur vorgekühlt waren, auf diese aufgefroren.

##### 3.9.1.4 Hybridisierung

Die angefertigten Schnitte (3.9.1.3) wurden in ISH-Fixierungslösung (3.2.68) für 5min fixiert und 2× für je 5min in PBS (3.2.97; RNase-frei) gewaschen.

Die fixierten Schnitte wurden für 10min in Acetylierungspuffer (3.2.2) eingestellt und in der aufsteigenden Alkoholreihe, 50% EtOH, 70% EtOH, 90% EtOH, 96% EtOH, 100% EtOH, 100% EtOH, für jeweils 3min dehydratisiert. Daraufhin wurden sie für 5min in 100% Chloroform eingestellt, wiederum für 3min in 100% EtOH und anschließend an der Luft getrocknet.

Die Objektträger mit den Schnitten wurden flach in eine feuchte Kammer (50:50 Formamid/Wasser) gelegt, auf jeden Objektträger 1ml ISH-Prähybridisierungspuffer (3.2.70) pipettiert und 3h bei 50°C prähybridisiert. Der ISH-Prähybridisierungspuffer wurde von den Objektträgern entfernt und die Schnitte dann mit der cRNA-Probe, die 4ng radioaktiv markierter cRNA ( $7,5 \times 10^5$  cpm/ng DNA) und 20ng nicht markierter cRNA enthielt, in 100µl ISH-Hybridisierungspuffer (3.2.69) überschichtet. Es wurde ein Deckgläschen auf die Schnitte gegeben und üN bei 50°C in feuchter Kammer hybridisiert.

Die Deckgläschen wurden durch Waschen der Objektträger in 4× SSC (3.2.138) entfernt. Sie wurden dann 2× für je 5min bei RT in 4× SSC, 1× für 30min bei 37°C in ISH-Waschpuffer (3.2.71) und 2× für in 2× SSC für 30min bei 50°C gewaschen.

Die Objektträger mit den Schnitten wurden in der Alkoholreihe (s. o.) dehydratisiert, getrocknet und für zunächst 3 Tage dann für 5 Tage ein Röntgenfilm (Kodak X-O-mat AR) aufgelegt.

## **3.10 Zellbiologische Methoden**

### **3.10.1 Beschichtung von Glas mit Poly-L-Lysin**

Vor der Verwendung von Glaswaren, z.B. *Cellocates* (3.10.3), in der Zellkultur, wurden diese mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet. Dazu wurde die PLL-Stammlösung (3.2.110) 1:100 mit sterilem Wasser verdünnt und damit die Glasoberflächen für 30min damit inkubiert. Die PLL-Lösung wurde abgenommen, das Glas 2× mit sterilem Wasser gespült und getrocknet. Anschließend wurden Zellen auf dem PLL-beschichteten Glas ausgesät.

### **3.10.2 Zellkultur humaner embryonaler Nierenzellen (HEK 293)**

#### **3.10.2.1 Kultivierung**

Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Arbeitsbank mit Abzugshaube durchgeführt. Die Zellen wurden im Brutschrank, bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit, in Nährmedium (3.2.91) auf Zellkulturschalen (Ø9cm) kultiviert. Alle mit den Zellen in Kontakt kommenden Lösungen wurden vorher im Wasserbad auf 37°C äquilibriert. Das Nährmedium der Zellen wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Dazu wurde 90% des Nährmediums abgenommen und das gleiche Volumen an frischem Medium auf die Zellen gegeben. Bei 80% konfluent bewachsenen Zellkulturschalen wurden die Zellen auf  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml Nährmedium ausgedünnt.

Dazu wurde das Nährmedium abgenommen, die Zellen 2× mit je 4ml PBS-*Gibco* (3.2.98) gewaschen und anschließend durch Inkubation für ≈2min mit 2ml Trypsin-EDTA-Lösung (3.2.150) von den Platten gelöst. Das Trypsinieren wurde durch Zugabe von 8ml Nährmedium gestoppt und die Zellen durch triturieren – mehrmaliges Hoch-und-runter Bewegen der Zellsuspension in einer Glaspipette – vereinzelt. Die Zellen und alte Nährmedium wurden zentrifugiert (300×g, 10min, 37°C). Der Überstand der Zellen wurde abgenommen und verworfen. Die sedimentierten Zellen wurden durch triturieren in 500µl altem Nährmedium, aus dem Überstand des Zentrifugats, und 4,5ml frischem Nährmedium resuspendiert.



Ein Tropfen der Zellsuspension wurde in eine *Neubauer*-Zellzählkammer gegeben. Nach Andrücken des Deckglases, wurden unter dem Mikroskop, bei 100facher Vergrößerung, 5× die in den 16 Kleinstquadraten eines Gruppenquadrats der Zellkammer sichtbaren Zellen gezählt. Die Zellzahl pro ml ergab sich aus der mittleren pro Gruppenquadrat gezählten Anzahl multipliziert mit  $5 \times 10^4$ . Die gewünschte Anzahl von Zellen wurde mit 1/10 altem und 9/10 frischem Nährmedium, auf einer neuen Kulturschale ausplattiert.

Zu stabil-transfizierten Zelllinien, die über eine G418-Resistenz selektioniert worden waren (3.10.4), wurden 150µl G418-Stammlösung (3.2.49) pro 10ml Nährmedium dazugegeben.

### 3.10.2.2 Kryokonservierung

Die Zellen einer konfluent bewachsenen Zellkulturschale (Ø9cm) wurden, wie unter 3.2.150 beschrieben, trypsinisiert und sedimentiert. Die Zellen wurden in 900µl frischem Nährmedium (3.2.91) resuspendiert und in eine Kryogefäß überführt. Es wurden 100µl DMSO dazugegeben, das Kryogefäß verschlossen, die Suspension vorsichtig gemischt und durch gute Isolation möglichst langsam (üN) auf  $-70^\circ\text{C}$  abgekühlt. Die Kryogefäße wurden dann bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Auftauen der Zellen, nach Entnahme aus dem Stickstofftank, und erwärmen auf  $37^\circ\text{C}$ , erfolgte möglichst schnell im Wasserbad. Die Zellen wurden in 10ml,  $37^\circ\text{C}$  warmes Nährmedium eingetropt und darin sedimentiert (300×g, 10min,  $37^\circ\text{C}$ ). Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in 10ml frischem Nährmedium (auf jeden Fall ohne G418) resuspendiert und auf einer Kulturschale ausplattiert. Die Zellen wurden, wie unter 3.10.2.1 beschrieben, üN kultiviert.

### 3.10.3 Transiente Transfektion von Gewebekulturzellen mit $\text{CaPO}_4$ -Methode zur heterologen Überexpression von Proteinen unter Kontrolle des CMV-Promotors<sup>17,30</sup>

Für die transiente Transfektion wurden  $1 \times 10^5$  HEK 293-Zellen, auf fünf Poly-L-Lysin beschichteten (3.10.1) *Cellocates* (Eppendorf), in einer Zellkulturschale (Ø3,5cm) ausplattiert (3.10.2.1). Die Zellen wurden üN in 2ml Nährmedium (3.2.91), bei  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  und 100% Luftfeuchtigkeit, inkubiert.

Für die Transfektion wurden 3µl des pcDNA 3-Vektors (1µg/µl), in den der gesamte ORF der cDNA des überzuexprimierenden Proteins einkloniert worden war, mit 75µl 2×BBS (3.2.15) und 72µl 0,25M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gemischt. Nach 10min wurde, unter leichtem Schwenken der Zellkulturschale, die Lösung tropfenweise in das Nährmedium pipettiert.

Die Zellen wurden für 4h bei 3%  $\text{CO}_2$ , und 100% Luftfeuchtigkeit, und danach für 36h bei  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  und 100% Luftfeuchtigkeit, inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert (3.6.1) und für die Immuncytochemie (3.6.2) eingesetzt.

### 3.10.4 Stabile Transfektion von Gewebezellen zur heterologen Überexpression von Proteinen unter Kontrolle des CMV-Promotors<sup>17,14,30</sup>

Für die stabile Transfektion wurden jeweils  $6 \times 10^5$  HEK 293-Zellen auf vier Zellkulturschalen ( $\varnothing 9\text{cm}$ ) ausplattiert und in jeweils 10ml Nährmedium üN kultiviert (3.10.2.1). Es wurden 60 $\mu\text{l}$  des pcDNA3-Vektors (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), in den der gesamte ORF der cDNA des überzuexprimierenden Proteins inkloniert worden war, mit 1,5ml 2 $\times$ BBS (3.2.15) und 1440 $\mu\text{l}$  0,25M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gemischt. Nach Inkubation für 10min wurde, pro Schale jeweils 1ml der Lösung, tropfenweise unter leichtem Schwenken in das Nährmedium pipettiert. Als Kontrolle wurde eine Schale anstatt mit der Vektor-DNA mit Wasser „transfiziert“.

Die Zellen wurden üN bei 3%  $\text{CO}_2$  inkubiert, anschließend, wie unter (3.10.2.1) beschrieben gewaschen, trypsiniert, trituriert, sedimentiert, gezählt und erneut ausplattiert. Es wurden  $5 \times 10^4$  Zellen auf 3 Zellkulturschalen ( $\varnothing 9\text{cm}$ ), in jeweils 10ml Nährmedium ausplattiert und üN kultiviert.

Es wurde daraufhin 150 $\mu\text{l}$  G418-Stammlösung (3.2.49)/10 ml Nährmedium zum Nährmedium gegeben. Die Zellen wurden für 10-14 Tage kultiviert, während alle 2-3 Tage 90% des Nährmediums und das G418 erneuert wurde.

Es wurde überprüft, ob in der Kontrollschale alle Zellen abgestorben waren. War dies der Fall wurde unter dem Mikroskop in den transfizierten Schalen nach kleinen, sich entwickelnden Zellhaufen gesucht. Bestanden diese Zellhaufen aus  $\geq 100$  Zellen, wurden sie jeweils trypsiniert und in den Vertiefungen einer 24-well-Platte vereinzelt. Es wurden aus 24 Zellhaufen, 24 putative Zellklone vereinzelt, in der 24-well-Platte bis zu konfluentem Wachstum hochgezogen und dann auf Kulturschalen ( $\varnothing 3,5\text{cm}$ ) kultiviert.

Die Zellklone wurden getestet. Entweder durch PCR (3.3.7.1), mit einem Vektor- und einem cDNA-spezifischen Primer, auf Insertion der cDNA, oder immunologisch durch *Western-Blot* (3.5.9), auf Überexpression des Translationsproduktes der transfizierten cDNA, oder elektrophysiologisch, auf Veränderungen der Membranleitfähigkeit der Zellen, verursacht durch die Insertion des überexprimierten Translationsproduktes der transfizierten cDNA, eines putativen Kaliumkanals, in die Zellmembran. Von den positiv getesteten Zellklonen, wurden 1-2 kryokonserviert (3.10.2.2).

## 3.11 Datenverarbeitung am Computer

### 3.11.1 Auswertung von Daten des ELISA-Lesegeräts mit *Excel*

#### 3.11.1.1 Auswertung der Daten des ELISAs

Die Bestimmung des Titers, aus den Daten eines ELISAs (3.5.5), erfolgte grafisch in *Excel* (Microsoft). Zunächst wurden die  $n$  Blindwerte gemittelt [ $\overline{OD}_{405}(0)$ ].

$$\overline{OD}_{405}(0) = \left[ \frac{\sum_{i=1}^n [OD_{405}(0)]_i}{n} \right]$$

Zur Bestimmung der mittleren  $\overline{OD}_{405}$ , der  $n$ -Werte gleicher Verdünnung ( $v$ ), der  $OD_{405}(v)$ , wurden die Werte gemittelt und davon der gemittelte Blindwert subtrahiert:

$$\overline{OD}_{405}(v) = \left[ \frac{\sum_{i=1}^n [OD_{405}(v)]_i}{n} \right] - \overline{OD}_{405}(0)$$

Zur grafischen Auswertung wurden die  $\overline{OD}_{405}(v)$ -Werte gegen die Verdünnungsfaktoren ( $v$ ) aufgetragen. Jeweils zwei in der Verdünnungsreihe aufeinander folgende Werte wurden durch eine Gerade verbunden. Das Inverse des Verdünnungsfaktors, des Schnittpunktes der Geraden mit dem  $OD_{405}$ -Wert von 1,0 wurde als Titer der getesteten Antikörper bestimmt:

$$Titer = \left( \frac{1}{v_{[OD_{405}=1,0]}} \right)$$

#### 3.11.1.2 Auswertung der Daten des IgG-Tests

Die Bestimmung der IgG-Konzentration (3.5.6) erfolgte grafisch in *Excel* (Microsoft). Dazu wurden zunächst die  $OD_{405}$ -Werte der einzelnen Punkte der Standardkurve berechnet: Die  $n$   $OD_{405}$ -Werte gleicher IgG-Konzentration wurden gemittelt und davon der gemittelte Blindwert subtrahiert (s. 3.11.1.1) um  $\overline{OD}_{405}(c)$  zu erhalten. Die  $\overline{OD}_{405}(c)$ -Werte des IgG-Standards wurden gegen ihre IgG-Konzentration ( $c_{IgG}$ ) aufgetragen. Jeweils zwei, in den IgG-Konzentrationen aufeinander folgende Werte, wurden durch eine Gerade verbunden. Die zu den Schnittpunkten der Geraden mit verschiedenen  $OD_{405}$ -Werten  $i$  ( $i = 1,6; 1,4; 1,2; 1,0; 0,8; 0,6$  und  $0,4$ ) zugehörigen IgG-Konzentrationen [ $c_i(IgG)$ ] wurden ermittelt.

Die Verdünnungsreihen der affinitätsgereinigten Antikörper wurden, wie unter 3.11.1.1 beschrieben, ausgewertet. Die  $\overline{OD}_{405}(v)$  der Verdünnungsreihen der Antikörper wurde gegen den Verdünnungsfaktor ( $v$ ) aufgetragen. Jeweils zwei in der Verdünnungsreihe aufeinander folgende Werte wurden durch eine Gerade verbunden. Die zu den Schnittpunkten dieser Geraden mit verschiedenen  $OD_{405}$ -Werten  $i$  ( $i = 1,6; 1,4; 1,2; 1,0; 0,8; 0,6$  und  $0,4$ ) zugehörigen Verdünnungsfaktoren [ $v_i(Ak)$ ] wurden bestimmt.

Die IgG-Konzentration der getesteten, affinitätsgereinigten Antikörper ( $\bar{c}_{(IgG)}$ ) wurde, durch Mittelung der  $n$ -Werte für die IgG-Konzentration [ $c_i(IgG)$ ], durch den jeweiligen Verdünnungsfaktor [ $v_i(Ak)$ ] dividiert, berechnet:

$$\bar{c}_{(IgG)} = \frac{\sum_{i=1}^n \left[ \frac{c_i(IgG)}{v_i(Ak)} \right]}{n}$$

### 3.11.1.3 Auswertung der Daten des kompetitiven ELISAs

Die Antigenkonzentration ( $[Antigen]$ ), die bei einer bestimmten Antikörperverdünnung ( $v$ ) nötig ist, um die  $OD_{405}$  im ELISA um 50% [ $IC_{50}(v, Antigen)$ ] bzw. 90% [ $IC_{90}(v, Antigen)$ ] zu unterdrücken, wurde grafisch in *Excel* bestimmt.

Dazu wurden die  $n$  ermittelten  $OD_{405}$ -Werte einer Antigenkonzentration ( $OD_{405}[Antigen]$ ) zunächst, wie unter 3.11.1.1 beschrieben, gemittelt und der gemittelte Blindwert subtrahiert. Die korrigierten  $OD_{405}$ -Werte, die in Gegenwart von Antigen ermittelt wurden ( $\overline{OD}_{405}[Antigen]$ ), wurden durch den korrigierten  $OD_{405}$ -Wert, der ohne Antigen ermittelt worden war ( $\overline{OD}_{405}[ohne Antigen]$ ), geteilt und auf 100% skaliert, um die relative  $OD$  einer Antigenkonzentration zu bekommen:

$$\% \text{ rel. } OD_{[Antigen]} = \frac{\overline{OD}_{405}[Antigen]}{\overline{OD}_{405}[ohne Antigen]} \times 100\%$$

Die erhaltenen Werte ( $\% \text{ rel. } OD_{[Antigen]}$ ) wurden gegen die Antigenkonzentration ( $c_{Antigen}$ ) aufgetragen. Jeweils zwei in der Antigenkonzentration aufeinander folgende Werte wurden durch eine Gerade verbunden. Die Antigenkonzentration des Schnittpunktes der Geraden mit dem 50%-Wert wurde als  $IC_{50}(v, Antigen)$ -Wert, der Schnittpunkt mit dem 10%-Wert als  $IC_{90}(v, Antigen)$ -Wert der Antikörperverdünnung bestimmt.

## 3.11.2 Sequenzanalysen mit *gcg*

### 3.11.2.1 Erstellung eines Sequenzvergleichs

Sequenzvergleiche wurden mit dem Unterprogramm *pileup* des *gcg*-Programmpakets<sup>40</sup>, Version 9.0, erstellt. Dazu wurden die zu vergleichenden Proteinsequenzen in einem Verzeichnis gesammelt. Die zum Vergleich verwendeten Parameter für das Einfügen einer Lücke (*gap creation penalty*) und das Verlängern einer Lücke (*gap extention penalty*) in die Proteinsequenz, waren die vom Programm vorgegebenen Standardeinstellungen. Das Programm erstellte einen Sequenzvergleich, bei dem die Sequenzen in der vorgegebenen Abfolge mit einer möglichst großen Übereinstimmung gegenübergestellt wurde.

Alternativ wurden Sequenzvergleiche zur Bestimmung der Homologie innerhalb einer Genfamilie (Tab. I), mit dem *gcg*-Programm *bestfit* erstellt.

### 3.11.2.2 Erstellung eines Dendrogramms

Ein mit *pileup* erstellter Sequenzvergleich (3.11.2.1) kann von dem gleichen Programm grafisch so dargestellt werden, daß die jeweils am nächsten verwandten Sequenzen, in einer Baumstruktur, nebeneinander aufgelistet werden. Die Sequenzen wurden durch Äste so miteinander verbunden, daß der Abstand auf der Abszisse, in einer willkürlichen Einheit, dem Sequenzunterschied entspricht (Dendrogramm). Je größer der Abstand, desto größer der Sequenzunterschied.

### 3.11.3 Erstellung eines Hydropathieplots

Jeder Aminosäure  $[(AS)_x]$  eines aus  $n$  AS bestehenden Proteins ( $x = 1$  bis  $n$ ) wurde, anhand des hydropathischen Charakters der Seitenkette, ein Wert zwischen  $-4,5$  und  $+4,5$  für die Hydrophobizität  $[H(AS)_x]$  zugeordnet<sup>95</sup>. Höhere Werte entsprechen dabei einem hydrophoberen, niedrigere Werte einem hydrophileren Charakter der Aminosäureseitenkette. Die zugeordneten Werte wurden über ein Fenster von 25AS gemittelt  $[\bar{H}(x)]$ .

Für die ersten zwölf Aminosäuren ( $AS_1$  bis  $AS_{12}$ ) wurde nur über die davor liegenden AS ( $AS_{(x-1)}$  bis  $AS_{[x-(x+1)]}$ ), die AS selbst ( $AS_x$ ) und die nächsten 12AS ( $AS_{(x+1)}$  bis  $AS_{(x+12)}$ ) gemittelt  $[\bar{H}(x)_{ANFANG}]$ . Für die letzten zwölf Aminosäuren ( $AS_{(n-11)}$  bis  $AS_n$ ) wurde nur über die vorhergehenden 12AS ( $AS_{(x-12)}$  bis  $AS_{(x-1)}$ ), die AS selbst ( $AS_x$ ) und die darauf folgenden AS ( $AS_{(x+1)}$  bis  $AS_n$ ) gemittelt ( $\bar{H}(x)_{ENDE}$ ).

$$\text{Für } x = 1 \text{ bis } 12: \bar{H}(x)_{ANFANG} = \frac{\sum_{i=[x-(x+1)]}^{(x+12)} H(AS)_i}{(x+12)}; \text{ für } x = 13 \text{ bis } (n-12): \bar{H}(x) = \frac{\sum_{i=(x-12)}^{x+12} H(AS)_i}{25};$$

$$\text{und für } x = (n-11) \text{ bis } n: \bar{H}(x)_{ENDE} = \frac{\sum_{i=(x-12)}^n H(AS)_i}{n - (x+13)}.$$

Die grafische Darstellung des hydropathischen Charakters des Proteins, erfolgte durch Auftragen der gemittelten Hydrophobizität ( $\bar{H}(x)_{ANFANG}$ ;  $\bar{H}$ -Werte;  $\bar{H}(x)_{ENDE}$ ) gegen die Aminosäure an der entsprechenden Position der Proteinsequenz ( $x$ ). Die Berechnungen und die grafische Darstellung wurden mit dem Programm *Excel97* (Microsoft) durchgeführt.

### 3.11.4 Erstellung eines Homologievergleichs

Als Vorlage diente ein mit *pileup* erstellter Sequenzvergleich (3.11.2.1). Zur Betrachtung der Homologie ( $G$ ) wurde ein Protein als Standard bestimmt. Aus der Aminosäuresequenz des Standardproteins wurden die von *pileup* eingefügten Lücken entfernt und die  $AS_x$  in der Standardsequenz mit der jeweils gegenübergestellten Position verglichen:

- Befand sich an dieser Position die identische AS, bekam die Position in der Standardsequenz den Wert 4.
- Befand sich an dieser Position eine konservativ ausgetauschte AS, bekam die Position in der Standardsequenz den Wert 2. Konservativ untereinander austauschbare AS gliedern sich in folgende Gruppen: (A, G, P, S, T); (I, L, M, V); (F, W, Y); (D, E, N, Q); (H, K, R) und (C)<sup>38</sup>.
- Befand sich an dieser Position eine nicht konservativ ausgetauschte AS oder eine Lücke, bekam die Position in der Standardsequenz den Wert 0.

Die Werte für die Homologie wurden über ein Fenster von 25AS aufsummiert und ergaben so, mit dem Maximalwert 100, einen in prozentualen Wert für die Homologie [ $\bar{G}(x)$ ], für jede  $AS_x$  der Standardsequenz im Vergleich zur gegenübergestellten Sequenz.

$$\bar{G}(x) = \sum_{i=(x-12)}^{(x+12)} G_i$$

Für den Anfang und das Ende der Sequenz wurden, wie in 3.11.3 beschrieben, veränderte  $\bar{G}_x$ -Werte,  $\bar{G}(x)_{ANFANG}$  und  $\bar{G}(x)_{ENDE}$ , berechnet:

$$\bar{G}(x)_{ANFANG} = \left[ \frac{\sum_{i=[x-(x+1)]}^{(x+12)} G_i}{(x+12)} \right] \times 25; \quad \bar{G}(x)_{ENDE} = \left[ \frac{\sum_{i=(x-12)}^n G_i}{n-(x+13)} \right] \times 25$$

Die grafische Darstellung der Homologie erfolgte durch Auftragen der Homologiewerte ( $\bar{G}(x)_{ANFANG}$ ,  $\bar{G}_x$  und  $\bar{G}(x)_{ENDE}$ ) in Prozent [%] gegen gegen die Aminosäure an der entsprechenden Position der Proteinsequenz ( $x$ ).

---

## 4 Ergebnisse

Damit die zum *Drosophila* EAG (dEAG) homologen Proteine der Ratte, immunhistochemisch charakterisiert werden konnten, wurde zunächst die Klonierung der zweiten *eag*-homologen cDNA<sup>186</sup> der Ratte (*reag2*) vervollständigt.

Der komplette Leserahmen der cDNA des ersten *eag*-homologen Proteins der Ratte (*reag1*)<sup>106</sup> und der *reag2*-cDNA wurden in den Plasmidvektor pcDNA3 kloniert. Mit diesen Plasmiden, pcreag1 (8.2.1.1) und pcreag2 (8.2.2.1), wurden Gewebekulturzellen (HEK 293, *human embryonic kidney*) stabil transfiziert. Durch die resultierende Expression der K<sup>+</sup>-Kanäle rEAG1 und rEAG2, unter Kontrolle des Cytomegalovirus-Promotors, in diesen Zellen, konnten die Kanäle, in Zusammenarbeit mit C. Stansfeld und Q. Liu, elektrophysiologisch charakterisiert werden<sup>107,159</sup>.

Wesentliche elektrophysiologische Unterschiede wurden zwischen rEAG1 und rEAG2 nicht festgestellt. Beide Proteine, rEAG1 und rEAG2, vermitteln einen spannungsabhängigen, nicht-inaktivierenden K<sup>+</sup>-Strom, der für den Kaliumkanalblocker 4-Aminopyridin relativ insensitive ist. Die Kinetik der spannungsabhängigen Aktivierung beider K<sup>+</sup>-Kanäle ist vom Membranpotential, welches vor der Aktivierung vorliegt (Vorpulspotential), und der extrazellulären Mg<sup>2+</sup>-Konzentration abhängig. Eine negativere Membranpotential, vor der den Kanal aktivierenden Depolarisation, und eine höhere Mg<sup>2+</sup>-Konzentration verlangsamen die Aktivierung des Kanals. rEAG2 besitzt, verglichen mit rEAG1, eine geringere Sensitivität für die Blockierung durch extrazelluläres Ba<sup>2+</sup>. Die Amplitude des durch rEAG2 vermittelten Stroms, wird durch 10mM Ba<sup>2+</sup> um 14% reduziert.

An den rEAG1- bzw. rEAG2-exprimierenden Zelllinien konnte außerdem gezeigt werden, daß der K<sup>+</sup>-Strom beider Kanäle durch extrazelluläre Applikation muscarinischer Agonisten, und den damit verbundenen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, teilweise repetitiv, unterdrückt werden kann<sup>107</sup>.

---

## 4.1 Die Proteinsequenz des Kaliumkanals rEAG2

MPGGKRGLVA PONTFLENIV RHSSSESSFL L GNAQIVDWPV VYSNDGFCKL	50
SGYHRADVMQ KSSTCSFMYG ELTDKKTIEK VRQTFDNYES NCFEVL LLYKK	100
NRTPVWFYMQ IAPIRNEHEK VVLF LCTFKD I TLFKQPIED DSTKGWTKFA	150
RLTRALTNSR SVLQQLTPMN KTETVHKHSR LAEVLQLGSD ILPQYKQEAP	200
KTP <b>S1</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">PHIILHY CAFKTTWDWV ILILTFYTAI MVP</span> YNVSFKT KQNNIA <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">WLVL</span>	250
<b>S2</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">DSVVDVIFLV DIVLNFH</span> TTF VGP GGEVISD PKLIRMNYLK T <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">WFVIDLLSC</span>	300
<b>S3</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">LPYDIINAF</span> E NVDEGISSL <b>S4</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">F SSLKVVRLLR LGRVARKLDH Y</span> LEYGAAVLV	350
<b>S5</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">LLVCVFGLVA HWLACIWYSI</span> GDYEVIDEVT NTIQIDSWLY QLALSIGTPY	400
RYNTSAGIWE GGPSKDSLY <b>H5</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">V SSLYFTMTSL TTIGFGN IAP</span> TTDVEKMF <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">SV</span>	450
<b>S6</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AMMVGSLLY ATIFGNVTTI FQQM</span> YANTNR YHEMLNNVRD FLKLYQVPKG	500
LSERVMDYIV STWSMSKG <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">ID TEKVLSICPK DMRADICVHL NRKVFNEHPA</span>	550
<b>mögliche Bindungsstelle</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">FRLASDGCLR ALAVEFQTIH CAPGDLIYHA GESVDSLSFV VSGSLEVIQD</span>	600
<b>für zyklische Nukleotide</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">EEVVAILGKG DVFGDIFWKE TTLAHACANV RALTYCDLHI IKREALLKVL</span>	650
<b>bnts</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">DFYTAFANSF SRNLTLT</span> CNL <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">RKRIIFRKIS DVKKEEERL RQK</span> NEVTLSI	700
PVDHPVRKLF QKFKQOKELR NQGS AQSDPE RSQ LQVESRP LQNGASITGT	750
SVVTVSQITP IQTSLAYVKT SETLKQNNRD AMELKPNGGA EPKCLKVNSP	800
IRMKNGNGKG WLRLKNNMGA HEEKKEEWN VTKAESMGLL SEDPKGSDSE	850
NSVTKNPLRK TDSCDSGITK SDLALDKAGE ARSPLEHSPS QADAKHPFYP	900
IPEQA <b>"CAD"</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">LQTTL QEVKHELKED IQLLSCRMTA LEKQVAEILK LL</span> SEKSVPQT	950
<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">SSPKPQIPLQ VPPQIPCQDI FSVSRPE SPE</span> SDKDEINF	988



**Abb. I Die rEAG2 Proteinsequenz.**

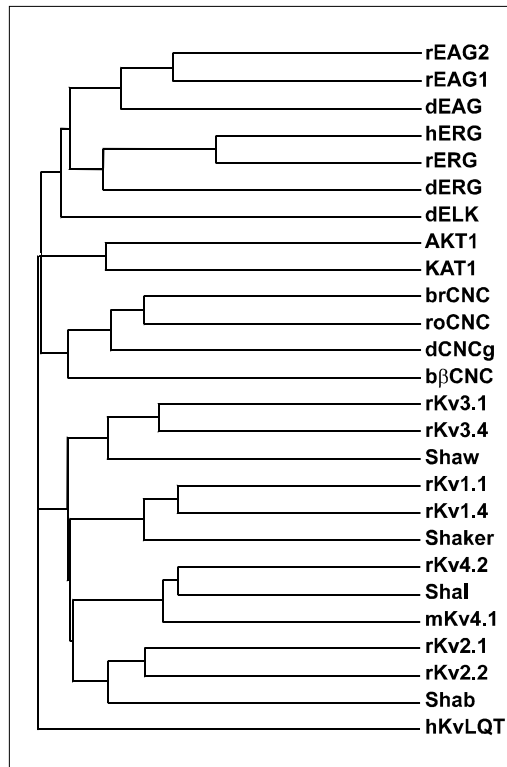
Hervorgehoben sind hydrophobe Sequenzbereiche (**S1–S6**), die die putativen Transmembranregionen des Proteins darstellen sowie die mögliche Porenregion (**H5**). Ein weiterer, hervorgehobener Sequenzbereich, die **mögliche Bindungsstellen für zyklische Nukleotide**, weist Homologien zu zyklisch-Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen auf<sup>63,107</sup> (**eingerahmter Bereich**). Die **fett** hervorgehobene Sequenz innerhalb dieses Sequenzbereichs weist zusätzlich Ähnlichkeiten zu den Nukleotidbindungsstellen cGMP-abhängiger Proteinkinasen auf<sup>63</sup>. Desweiteren sind Aminosäuren markiert, die möglicherweise durch N-Glycosylierung (**▼**) modifiziert werden<sup>7</sup>. Davon liegen nach dem Modell der Transmembrantopologie mit sechs Transmembransegmenten und intrazellulärem Amino- und Carboxyterminus zwei Asparaginreste extrazellulär. Das sind **N235**, zwischen **S1** und **S2**, sowie **N403**, zwischen **S5** und **H5**. Insgesamt 37 Serine oder Threonine, befinden sich in Konsensussequenzen für die Phosphorylierung durch Caseinkinase II<sup>122</sup> (**●**; **T14, T127, T215, S252, S369, T442, T634, T832, T869, S883, T909, T929, S981**), Proteinkinase C<sup>122</sup> (**■**; **T73, S237, S322, T478, S502, T521**), Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II<sup>122</sup> (**‡**; **T157, T555, T634, S680, S978**) oder cAMP- oder cGMP-abhängige-Proteinkinase<sup>122</sup> (**□**, **S677**). Die in Klammern angegebenen Aminosäuren stehen in den Konsensussequenzen für die Phosphorylierung, die zwischen rEAG1 und rEAG2 konserviert sind. Sechs der möglicherweise phosphorylierten Serine oder Threonine liegen allerdings tief in den putativen Transmembransegmenten oder in den potentiell extrazellulären Bereichen. Bei den Aminosäuren, die möglicherweise von der Cyclin-abhängigen-Kinase *cdc2*<sup>79</sup> phosphoryliert werden, ist bei der Markierung unterschieden, ob die Phosphorylierungsstelle zwischen rEAG1 und rEAG2 konserviert ist (**⊙**) oder nicht (**○**). Aminosäuren, die mögliche Ziele der Phosphorylierung durch zwei Proteinkinasen sind, sind durch einen Pfeil gekennzeichnet und die entsprechenden Markierungen rechts und links davon angeordnet.

Der Spannungssensor spannungsgesteuerter K<sup>+</sup>-Kanäle mit 6 Transmembranregionen liegt in der vierten Transmembranregion. Er besteht aus einer Abfolge von Aminosäuren mit positiv geladenen Seitenketten (K/R), die durch jeweils zwei hydrophobe Aminosäuren voneinander getrennt sind. Auch in rEAG2 ist in der vierten Transmembranregion (**S4**) dieses Strukturmotiv enthalten (die nicht umrandeten Aminosäuren in **S4**). Der **fett** umrandete Bereich in der Porenregion (**H5**), enthält die Aminosäuren, die zur Signatursequenz der Pore der spannungsgesteuerten K<sup>+</sup>-Kanäle (MTT [V/L]GYGD)<sup>124</sup> homolog sind. Innerhalb der K<sup>+</sup>-Kanäle der *eag*-Familie ist in diesem Bereich das **GFGN**-Motiv konserviert.

Weiterhin ist ein Signal für den Proteintransport in den Zellkern (**bnts**, *bipartite nuclear targeting signal*<sup>42</sup>) hervorgehoben (s. Abb. III). Der postulierte Bereich einer carboxyterminalen *Assembly*-Domäne ("CAD") in der rEAG2-Sequenz ist im Folgenden näher beschrieben (4.3.2). Die Modifikationsstellen und das Strukturmotiv eines *Leucine-Zippers* [(L-[X]<sub>6</sub>)<sub>3</sub>-L] innerhalb der "CAD" (**L910, L917, L924, L931**) wurden mit dem *gcg*-Programm *Prosites* bestimmt<sup>7</sup>.

## 4.2 Die Strukturklasse, die Familie und die Subfamilie des *reag2*-Gens

Eine Kategorie, in die das *reag2*-Gen eingeordnet werden kann ist die Strukturklasse der Ionenkanäle mit sechs Transmembransegmenten<sup>184</sup>. Von diesen Proteinen sind die Pflanzen-Ionenkanäle AKT1 und KAT1 die, die in ihrer Sequenz dem rEAG2 am ähnlichsten sind. Auch die zyklisch-Nukleotid gesteuerten Kationenkanäle besitzen eine etwa gleichgroße Sequenzähnlichkeit zur *eag*-Familie. Noch weitläufiger ist rEAG2 mit den spannungsgesteuerten Kaliumkanäle der Shaker-Familie und dem K<sub>v</sub>LQT verwandt (Abb. II).



**Abb. II Darstellung der Verwandtschaft der rEAG2-Sequenz mit anderen Ionenkanälen im Dendrogramm**

Der Vergleich, erstellt wie unter 3.11.2.2 beschrieben, zeigt die Sequenzähnlichkeit der rEAG2-Sequenz mit anderen Proteinen. Die waagerechten Abstände stellen die Sequenzunterschiede dar. Die mit rEAG2 verglichenen Proteine sind das am nächsten verwandte rEAG1<sup>106</sup> aus der Ratte, die *Drosophila* K<sup>+</sup>-Kanäle des *ether-à-go-go* Gens (dEAG<sup>181</sup>), des *ether-à-go-go*-verwandten Gens (dERG<sup>167</sup>) und des *ether-à-go-go*-artigen-K<sup>+</sup>-Kanals (dELK<sup>182</sup>). Desweiteren sind aus der *eag*-Genfamilie die *erg*-homologen Proteine aus der Ratte (rERG<sup>9</sup>) und dem Menschen (hERG<sup>182</sup>) dargestellt. Außerdem sind die der *eag*-Genfamilie ähnlichen Pflanzenkanäle AKT1<sup>149</sup> und KAT1<sup>5</sup> sowie zyklisch-Nukleotid-gesteuerte (CNG) Ionenkanäle aus *Drosophila* (dCNCg<sup>10</sup>), aus bovinen Sehstäbchen (brCNC<sup>84</sup>), aus olfaktorischem Epithel der Ratte (roCNC<sup>41</sup>) und eine CNG-β-Untereinheit (bbCNC<sup>92</sup>) mit rEAG2 verglichen. Weiterhin sind die spannungsabhängigen K<sup>+</sup>-Kanäle der *Shaker*-Familie aus *Drosophila* und einige der homologen Proteine dieser Kanäle aus der Ratte oder Maus (in Klammern) abgebildet: Shaker<sup>117</sup> (rKv1.1<sup>11</sup>, rKv1.4<sup>163</sup>), Shab<sup>23</sup> (rKv2.1<sup>52</sup>, rKv2.2<sup>70</sup>), Shaw<sup>23</sup> (rKv3.1<sup>129</sup>, rKv3.4<sup>148</sup>), Shal<sup>183</sup> (rKv4.2<sup>8</sup>, mKv4.1<sup>116</sup>). Zuletzt ist noch der kürzlich bekannt gewordene, einer gänzlich neuen Genfamilie angehörende K<sup>+</sup>-Kanal, hKvLQT1<sup>179</sup> aufgeführt.

Die Einordnung des klonierten Säugetiergens *reag2*, in die zu den *Drosophila*-Genen homologen *eag*-Subfamilien *reag*, *rerg* oder *relk*, erfolgt nach der Sequenzähnlichkeit der rEAG2-Proteinsequenz. Ein Sequenzvergleich dieser Proteine, mit dem Unterprogramm *pileup* des *gcg*-Programmpakets<sup>40</sup>, Version 9.0, durchgeführt, zeigt (Tab. I), daß zwischen den Genen innerhalb einer Subfamilie (rEAG1 und rEAG2) oder zwischen den *Drosophila*-Genen und den homologen Mammaliergenen (z. B. dERG und rERG), die Proteine einer Subfamilie über den gesamten konservierten Bereich, welcher die sechs hydrophoben Bereiche der putativen Transmembrandomänen und den carboxyterminalen Bereich mit Homologie zu Bindungsstellen für zyklische Nukleotide umfaßt, mehr als ≥50% Aminosäureidentität und ≥60% Aminosäureähnlichkeit besteht. Die Aminosäureähnlichkeit ergibt sich aus identischen und konservativ ausgetauschten Aminosäuren<sup>38</sup>.

**Tab. I Vergleich der Sequenzen innerhalb der *eag*-Genfamilie.**

Der Vergleich wurde, wie unter 3.11.2.1 beschrieben, mit dem *gcg*-Programm *bestfit* erstellt. Es wurden mit den Standardparametern des Programms zwischen 443 (dELK × dERG) und 976 (rEAG1 × rEAG2) Aminosäuren miteinander verglichen. In den Sequenzvergleich wurden zwischen drei (dERG × rERG) und zwölf (dEAG × dELK) Lücken eingefügt. Der Vergleich der Proteine zeigt, daß die Aminosäuresequenzen der Proteine einer Subfamilie (dunkel unterlegte Felder) >60% identisch und >70% ähnlich sind. Außerhalb einer Subfamilie besteht weniger als <50% Identität und <60% Sequenzähnlichkeit.

Sequenz-ähnlichkeit [%]	Identität [%]						
		dEAG	rEAG1	rEAG2	dERG	rERG	dELK
dEAG		100	65	67	48	50	42
rEAG1		73	100	74	48	49	44
rEAG2		76	80	100	47	47	43
dERG		58	58	57	100	72	47
rERG		59	60	57	80	100	47
dELK		51	54	53	57	60	100

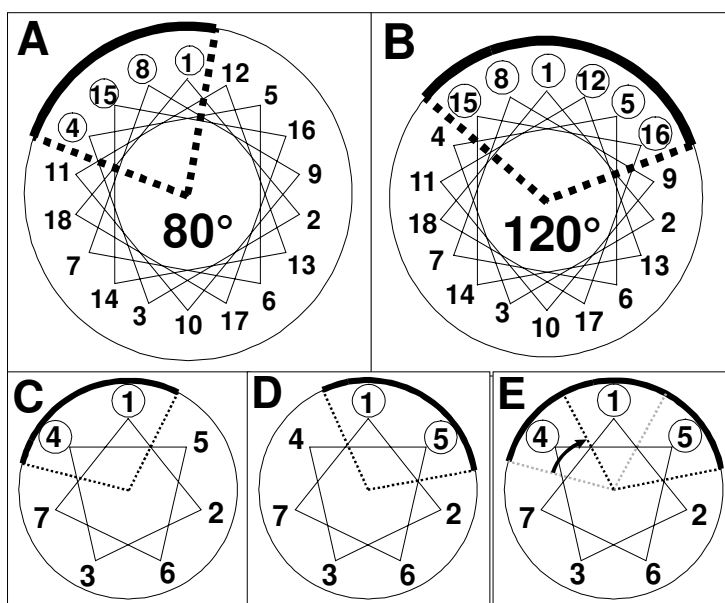


und die Anordnung der Aminosäuren der Proteine der *eag*-Familie zwischen den Aminosäuren der *bnts*-Konsensussequenz gibt es in Kernproteinen Beispiele.

Wichtig für die Funktionalität eines *bnts* ist, daß es sich an der Proteinoberfläche befindet. Der Bereich des *bnts* in rEAG1 und rEAG2 ist ein Proteinabschnitt, für den nach Berechnungen der Methode von *Janin et al*<sup>77</sup>, eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, an der Oberfläche des Proteins zu liegen. Die Berechnungen wurden mit dem Programm *PeptideStructure* durchgeführt und mit dem Programm *PlotStructure* ausgewertet. Beide Programme gehören zum *gcg*-Programmpaket<sup>40</sup>, Version 9.0.

### 4.3.2 Ein mögliches hydrophobes Cluster in Proteinen der *eag*-Familie

Der zur carboxyterminalen *Assembly*-Domäne (CAD) von rEAG1 homologe Bereich in rEAG2 enthält einen *Leucine-Zipper*<sup>97,99,115</sup>. Die Konsensussequenz für den LZ ist  $(L-X_6)_3-L$ . Die Leucine des LZ bilden eine räumliche Anordnung der Seitenketten hydrophober Aminosäuren, ein hydrophobes Cluster. Der LZ vermittelt durch hydrophobe Wechselwirkung, der in einer Helix angeordneten Leucin-Seitenketten, die Dimerisierung zweier parallel angeordneter Proteinuntereinheiten<sup>97</sup>. Der Drehwinkel zwischen den Aminosäuren einer  $\alpha$ -Helix beträgt  $100^\circ$ . Die Struktur, in der die hydrophoben Aminosäuren eines *Leucine-Zipper* angeordnet sind, ein *coiled-coil*. Das ist eine rechtsgehende,  $\alpha$ -helicale Sekundärstruktur, der eine leichte, rechtsgehende Drehung überlagert ist, so daß statt 3,6 nur 3,5 Aminosäuren pro Windung angeordnet sind<sup>115</sup>.



**Abb. IV Modelle der Anordnungen von Aminosäureclustern in  $\alpha$ -Helix und *coiled-coil*.**

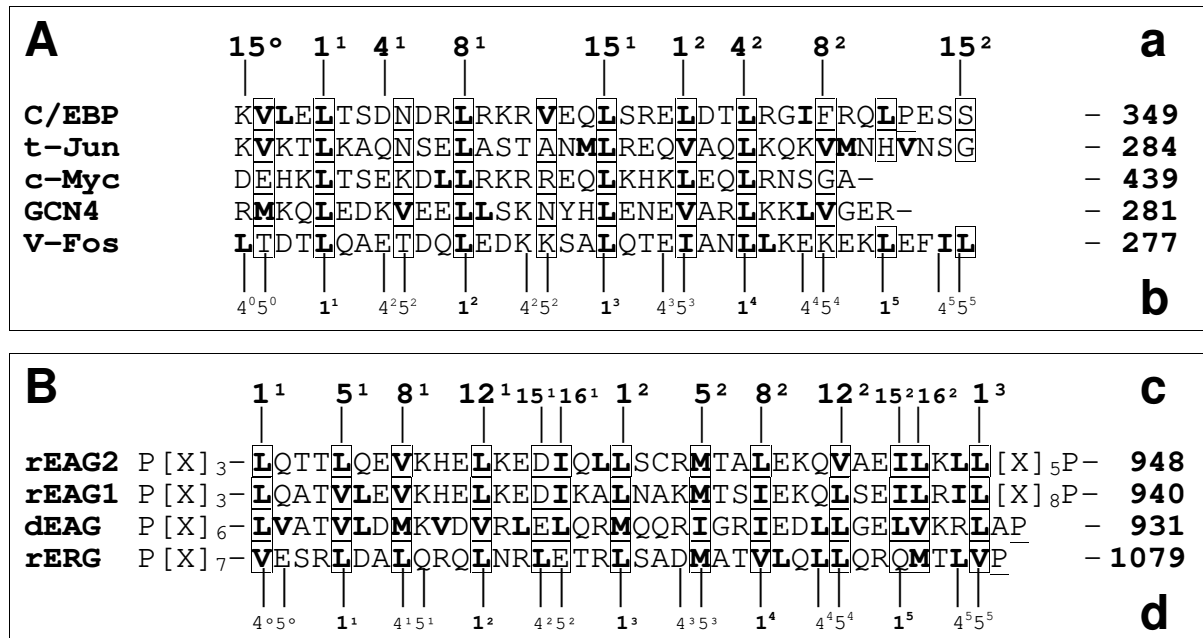
In der Abbildung sind Helices senkrecht zu der Achse um die sich die Aminosäuren anordnen, dargestellt. In der  $\alpha$ -Helix (A, B) sind 18 verschiedene Positionen um den Mittelpunkt herum angeordnet. Die 18 Positionen sind jeweils um  $20^\circ$  gegeneinander verschoben. Zwei Aminosäuren, die sich in der  $\alpha$ -Helix direkt übereinander befinden, sind fünf komplette Windungen voneinander entfernt.

Die Numerierungen in den Abbildungen geben die Reihenfolge der Besetzung der Positionen in der Helices wider. In einer  $\alpha$ -Helix würden die Leucine eines LZ,  $(L-X_6)_3-L$ , auf der zylindrischen Oberfläche der Helix einen Kreisabschnitt von  $80^\circ$  einnehmen (A, Positionen 1, 4, 8, 15).

Bei Einbeziehung zwei weiterer Positionen nimmt das hydrophobe Cluster  $120^\circ$  ein (B, Positionen 1, 5, 8, 12, 15 und 16). Die etwas andere Lage der Positionen in B gegenüber den Positionen in A bezieht sich auf die in Abb. V dargestellte Auswertung der möglichen hydrophoben Cluster in den Proteinen der *eag*-Familie.

In der helikalen Anordnung eines *coiled-coils* (C, D und E) befinden sich 3,5 Aminosäuren pro Windung, so daß nach zwei Windungen die achte Aminosäure der Helix über der ersten angeordnet ist. Von der Helixposition 1 aus besteht die Möglichkeit mit den benachbarten Positionen 4 (D) oder 5 (E) der Helix ein Cluster auszubilden. Alternativ kann z. B ein 1-4 Cluster in ein 1-5 übergehen (E).

Die Strukturvorausagen, nach Chou-Fasman<sup>32</sup> und Garnier-Osguthorpe-Robson<sup>56</sup>, gehen für die in Abb. V abgebildeten Proteinabschnitte, sowohl für die Kernproteine als auch für die Proteine der *eag*-Familie, von  $\alpha$ -Helices als der wahrscheinlichsten Struktur für weite Teile dieses Bereichs aus (Tab. II).



**Abb. V** Sequenzvergleich der Bereiche von *Leucine-Zippern* in Kernproteinen mit den Bereichen möglicher hydrophober *Cluster* in Proteinen der *eag*-Familie

Die Abbildung vergleicht Sequenzbereiche aus Kernproteinen, die *Leucine-Zipper* enthalten (**A**), und Bereiche aus rEAG1 (AS 895–931, **B**, Positionen 1<sup>1</sup> bis 1<sup>3</sup>, Numerierung **c**), der in etwa der experimentell bestimmten, carboxyterminalen *Assembly*-Domäne (*CAD*, AS 897–937) entspricht, sowie die Bereiche, die zur rEAG1-*CAD* homolog sind, der Proteine rEAG2, dEAG und rERG, der *eag*-Familie.

In den Sequenzen sind die hydrophoben Aminosäuren, **I**, **L**, **M** und **V**, **fett** hervorgehoben. Die Numerierung oberhalb der Abbildungen **A** und **B** beziehen sich auf die Anordnung von *Clustern* in einer  $\alpha$ -Helix und sind für **a** in Abb. **A** aus Modell **A** der Abb. IV und für **b** aus Modell **B** in Abb. IV abgeleitet. Die Numerierung unterhalb der Abbildungen **A** und **B** beziehen sich auf die Anordnung von *Clustern* in einem *coiled-coil* und sind für **b** in Abb. **A** und **d** in Abb. **B** aus Modell **E** der Abb. IV abgeleitet. Die Zahlen am Ende der Sequenzausschnitte beziehen sich auf die Position der letzten abgebildeten Aminosäure in den Proteinsequenzen der Proteine.

In den Proteinsequenzen der Kernproteine (**A**) sind die Aminosäuren eingerahmt, die ausgehend von Aminosäure 1<sup>1</sup> zu dem in Modell **E** der Abb. IV bezeichneten hydrophoben *Cluster* (1 und 5) *coiled-coils* des *Leucine-Zippers* gehören. Die Zahlen der entsprechenden Positionen sind im Modell **E** der Abb. IV eingekreist.

In den Proteinsequenzen der *eag*-Familie (**B**) sind die Aminosäuren eingerahmt, die ausgehend von Aminosäure 1<sup>1</sup>, Numerierung **c**, zu dem *Cluster* des  $\alpha$ -helikalen Modells **B** der Abb. IV gehören (1, 5, 8, 12, 15 und 16). Die Zahlen der entsprechenden Positionen sind in Modell **B** der Abb. IV eingekreist.

Proline, als sekundäre Aminosäure, kommen aufgrund der eingeschränkten Rotationsfreiheit um die Peptidbindung, nur selten in  $\alpha$ -Helices vor. Die Proline (**P**), die sich in den Proteinen der *eag*-Familie (**B**) vor unter hinter dem betrachteten hydrophoben *Cluster* befinden, bilden entweder Anfang oder Ende des Sequenzausschnitts oder die Anzahl der Aminosäuren (**y**) bis zum nächsten Prolin in der Sequenz ist angegeben (**[X]<sub>y</sub>**). Proline innerhalb der Sequenzausschnitte sind unterstrichen. Die Carboxytermini des **c-myc** und des **GCN4** sind durch einen Strich (-) gekennzeichnet.

Die Konsensussequenz des *Leucine-Zippers*, **(L-X<sub>6</sub>)<sub>3</sub>-L**, ist in abgebildeten Sequenzen der Kernproteine, jeweils an den Positionen 1<sup>1</sup>, 8<sup>1</sup>, 15<sup>1</sup> und 4<sup>2</sup> (Numerierung **a**), und in rEAG2, an den Positionen 5<sup>1</sup>, 12<sup>1</sup>, 1<sup>2</sup> und 8<sup>2</sup>, Numerierung **c**, enthalten.

Die *Leucine-Zipper* enthaltenden Kernproteine sind das C/EBP der Ratte<sup>98,103</sup>, das t-Jun des Avian *Sarcoma Virus 17*<sup>108</sup>, das c-Myc der Maus<sup>160</sup>, das GCN4 der Hefe<sup>2,66</sup> und das provirale v-Fos<sup>171</sup>. Der Vergleich der *Leucine-Zipper*-Sequenzen ist der Literaturstelle 99 entnommen. Die Bestimmung der hydrophoben *Cluster* wurden mit dem Programm *HelicalWheel* des *gcg*-Programm Pakets<sup>40</sup>, Version 9.0, durchgeführt.

**Tab. II Strukturvoraussagen nach Chou-Fasman und Garnier-Osguthorpe-Robson**

Die Bereiche der möglichen hydrophoben *Cluster*, der in Abb. V abgebildeten Sequenzausschnitte, für die mit den Methoden von Chou-Fasman<sup>32</sup> und Garnier-Osguthorpe-Robson<sup>56</sup> eine  $\alpha$ -helikale-Struktur vorausgesagt wird. Die Strukturvoraussagen wurden für die *Leucine-Zipper* enthaltenden Proteine C/EBP, GCN4, t-Jun und c-Myc von Position  $1^1$  bis  $8^2$ , für v-Fos von  $15^0$  bis  $8^2$  und für die Proteine der *eag*-Familie von  $1^1$  bis  $1^3$  durchgeführt. Die Numerierung der Sequenzabschnitte ist der in Abb. V **A** und **B** entsprechend. Die Berechnungen wurden mit dem Programm *PeptideStructure* durchgeführt und mit dem Programm *PlotStructure* ausgewertet. Beide Programme gehören zum *gcg*-Programmpaket<sup>40</sup>, Version 9.0.

Voraussage der $\alpha$ -helicalen-Sekundärstruktur nach:		
Protein	Chou-Fasman	Garnier-Osguthorpe-Robson
<b>C/EBP</b>	$1^1-12^1; 4^2-8^2$	$1^1-2^1; 4^2-8^2$
<b>GCN4</b>	$1^1-15^1; 8^2$	$1^1-8^2$
<b>v-Fos</b>	$15^0-7^1$	$5^1-8^2$
<b>t-Jun</b>	$1^1-3^1; 6^1-8^2$	$1^1-8^2$
<b>c-Myc</b>	$1^1-8^2$	$1^1-8^2$
<b>rEAG2</b>	$1^1-15^1; 4^2-1^3$	$1^1-1^3$
<b>rEAG1</b>	$1^1-13^2$	$1^1-1^3$
<b>dEAG</b>	$13^1-5^2; 7^2-1^3$	$1^1-2^2; 11^2-1^3$
<b>rERG</b>	$1^1-3^2$	$3^1-11^1; 17^1-13^2$

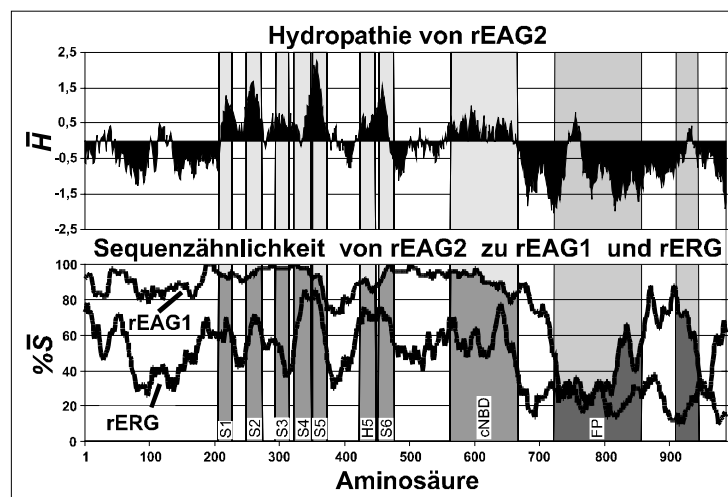
Ein Vergleich der Modelle der Anordnung der Aminosäuren (Abb. IV) mit den Sequenzausschnitten der *eag*-Familie (Abb. V) zeigt, daß sich hydrophobe *Cluster*, mit den Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Methionin und Valin, in den Proteinen der *eag*-Familie, sowohl unter der Annahme der  $\alpha$ -helicalen- als auch der *coiled-coil*- Sekundärstruktur, ausbilden würden.

In einer  $\alpha$ -Helix würden die hydrophoben Aminosäuren ein  $120^\circ$  umfassendes *Cluster*, der Positionen **1**, **5**, **8**, **12**, **15** und **16**, einnehmen. Die hydrophoben *Cluster* würden sich von Position  $1^1$  bis Position  $1^3$  erstrecken (Abb. V, **B**, Numerierung **c**). Die Bereiche entsprechen in den Proteinen folgenden Sequenzabschnitten: rEAG1<sup>895-931</sup>, rEAG2<sup>906-942</sup>, dEAG<sup>893-929</sup> und rERG<sup>1042-1078</sup>. Dabei wäre eine (rEAG1, rEAG2 und dEAG) bzw. wären zwei (rERG) Position(en) degeneriert, d. h. mit nicht-hydrophober Aminosäure(n) besetzt. Die degenerierten Positionen würden sich an den peripheren Positionen **15** und **16** der hydrophoben *Cluster* befinden (vgl. Abb. IV, **B**). An 12 von 13 (rEAG1, rEAG2 und dEAG) bzw. 11 von 13 (rERG) Positionen des *Clusters* befänden sich hydrophobe Aminosäuren.

In einem *coiled-coil* würde sich die hydrophobe Domäne in zwei Bereiche, **A** und **B**, untergliedern. Die Anordnung wäre zunächst ein *Cluster A* an den Positionen **4** und **1** und ginge in eine *Cluster B* an den Positionen **1** und **5** (Abb. V, **B**, Numerierung **d**) über. Der Bereich der Domäne **A** erstreckt sich von Position  $4^0$  bis  $4^2$  (rERG) bzw. von  $4^0$  bis  $1^2$  (rEAG1, rEAG2 und dEAG), die Domäne **B** von  $1^3$  bis  $5^5$  (rERG) bzw. von  $5^2$  bis  $5^5$  (rEAG1, rEAG2 und dEAG). Die Bereiche entsprechen in den Proteinen folgenden Sequenzabschnitten: für rEAG1 **A** rEAG1<sup>895-906</sup> und **B** rEAG1<sup>909-931</sup>, für rEAG2 **A** rEAG2<sup>906-917</sup> und **B** rEAG2<sup>920-942</sup>, für dEAG **A** dEAG<sup>893-904</sup> und **B** dEAG<sup>907-929</sup> und für rERG **A** rERG<sup>1042-1056</sup> und **B** rERG<sup>1060-1078</sup>. Es befänden sich 4 hydrophobe Aminosäuren in Bereich **A** und 7 in **B** (rEAG1, rEAG2 und dEAG) bzw. 5 in **A** und 5 von 6 in **B** (rERG) des *Clusters*.

## 4.4 Die Herstellung von Antikörpern gegen rEAG1, rEAG2 und rERG

Für die Generierung von Antikörpern gegen Teilbereiche der Proteine rEAG1<sup>106</sup>, rEAG2 und rERG<sup>9</sup> wurden die Sequenzbereiche der Proteine ausgewählt, die untereinander eine möglichst geringe Sequenzähnlichkeit aufweisen. Außerdem sollten diese Bereiche eine möglichst hohe Hydrophilie besitzen, damit sie einerseits möglichst eine hohe Antigenizität besitzen und andererseits als lösliche Proteine gut für die Affinitätsreinigung der erzeugten Antikörper einzusetzen waren. Dadurch waren die Aminotermini (N<sub>T</sub>) und die Transmembransegmente (TM) sowie die carboxyterminalen Bereiche bis einschließlich des Bereichs, der homolog zu Bindungsstellen für zyklische Nukleotide ist (cNBD), die einerseits sehr stark konserviert (N<sub>T</sub>, TM und cNBD) und andererseits hydrophob (TM und cNBD) sind, ausgeschlossen. Im weiteren Verlauf der Aminosäuresequenz von rEAG1 und rEAG2 fällt die Sequenzähnlichkeit der Proteine zunächst ab (C<sub>T</sub>1), steigt wieder an (C<sub>T</sub>2), fällt dann wiederum ab (C<sub>T</sub>3) um zum Ende wieder anzusteigen (C<sub>T</sub>4). Es fanden nur die beiden Bereiche, in denen die Sequenzähnlichkeit am geringsten ist (C<sub>T</sub>1 und C<sub>T</sub>3) für die Glutathion-S-Transferase-(GST-) Fusionsproteine der Proteine rEAG1 und rEAG2, die für die Immunisierung eingesetzt wurden, Verwendung. Die beiden Bereiche wurden für die Fusionsproteine zusammengefügt, damit die Proteine eine möglichst hohe Anzahl antigener Epitope haben. Die ausgewählten Proteinbereiche entsprechen den rEAG1-Aminosäuren rEAG1<sup>724-858</sup> (C<sub>T</sub>1) und rEAG1<sup>911-945</sup> (C<sub>T</sub>3) sowie den rEAG2-Aminosäuren rEAG2<sup>719-859</sup> (C<sub>T</sub>1) und rEAG2<sup>922-972</sup> (C<sub>T</sub>3). Die cDNA, der beiden Proteinbereiche der rEAG1- und rEAG2-GST-Fusionsproteine, wurde durch 18 Nukleotide, die für sechs Glycine kodieren, verbunden.



**Abb. VI Hydrophathie von rEAG2 und Sequenzähnlichkeit von rEAG2 zu rEAG1 und rERG**

Die Abbildung zeigt in der oberen Hälfte den Verlauf der jeweils über 25 Aminosäuren gemittelten, durchschnittlichen Hydrophobizität ( $\bar{H}$ ) der rEAG2-Aminosäuren. In der unteren Hälfte ist die jeweils über 25 Aminosäuren gemittelte, durchschnittliche Sequenzähnlichkeit ( $\bar{\%S}$ ) von rEAG2 zu den ebenfalls in dieser Arbeit betrachteten Proteinen rEAG1 und rERG abgebildet. Die grau unterlegten Bereiche beschreiben die putativen Transmembransegmente (S1-S6), die Porenregion (H5), den

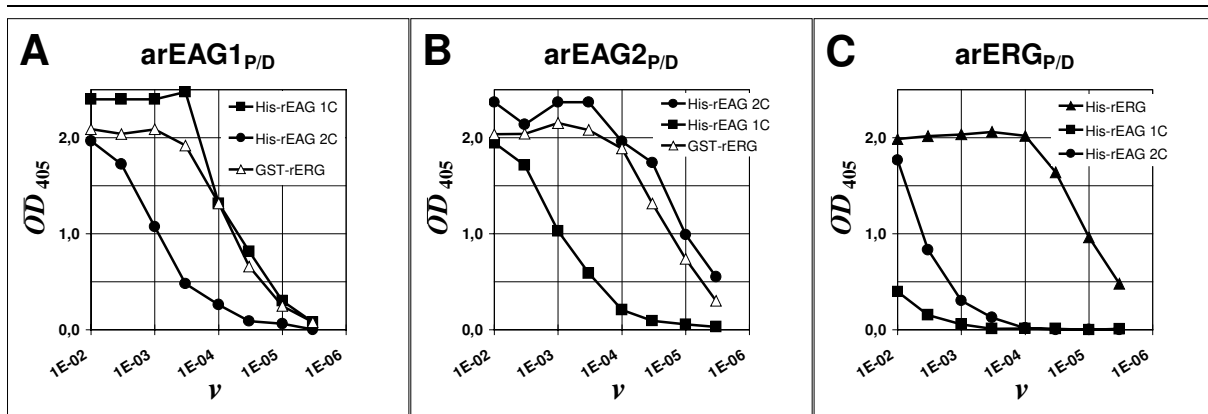
Sequenzbereich mit Ähnlichkeit zu Bindungsstellen für zyklische Nukleotide (cNBD) und die Bereiche, die für das rEAG2-Fusionsprotein GST-rEAG2<sup>Δ719-859-G<sub>6</sub>-Δ922-972</sup> Verwendung fanden. Gegen dieses Fusionsprotein (FP) wurden die rEAG2-Antikörper generiert. Die Grafiken wurden wie unter 3.11.3 und 3.11.4 beschrieben erstellt. Die Numerierung entspricht den Aminosäuren der rEAG2-Sequenz. Die Numerierung entspricht in etwa der rEAG1-Sequenz und ist im carboxyterminalen Bereich, aus dem die Fusionsproteine für die Immunisierung generiert wurden nur um etwa fünf Aminosäuren verschoben. Für rERG ist die Numerierung der Aminosäuresequenz, aufgrund eines längeren Aminoterminus, in diesem Bereich um etwa 150 Aminosäuren verschoben. Der hydrophatische Charakter des Proteins wurde nach den Werten von Dayhoff *et al.*<sup>38</sup> mit dem Programm *Excel* (Microsoft) berechnet (3.11.3). Die Bestimmung der Sequenzähnlichkeit wurde mit dem Programm *pileup* des *gcg*-Programmpakets<sup>40</sup>, Version 9.0, durchgeführt (3.11.2.1). Die Werte für die Sequenzähnlichkeit (3.11.4) wurden mit dem Programm *Excel* (Microsoft) berechnet.

Da die Sequenzähnlichkeit von rERG zu rEAG1 und rEAG2 nicht ganz so hoch ist wie die Ähnlichkeit zwischen rEAG1 und rEAG2 (Abb. VI), wurde ein durchgehendes, carboxyterminales rERG-GST-Fusionsprotein, der rERG Aminosäuren 855-1063, für die Immunisierung eingesetzt.

Die für diese Sequenzbereiche der Proteine kodierende cDNA wurden in Vektoren zur Überexpression von GST-Fusionsproteinen kloniert. Die Fusionsproteine, GST-rEAG1<sup>Δ724-858-G<sub>6</sub>-Δ911-945</sup> (GST-rEAG1CG, 8.2.1.4), GST-rEAG2<sup>Δ719-859-G<sub>6</sub>-Δ922-972</sup> (GST-rEAG2CG, 8.2.2.4) und GST-rERG<sup>Δ855-1063</sup> (GST-rERG, 8.2.3.2) wurden überexprimiert (3.4.4.1), aufgereinigt (3.4.5.2) und Kaninchen damit immunisiert (3.5.1, 3.5.2).

#### 4.4.1 Die Charakterisierung der Antikörper

Die Seren der immunisierten Kaninchen wurden gewonnen (3.5.2, 3.5.3) und die, gegen die rEAG1-, rEAG2- und rERG-spezifischen Anteile der Fusionsproteine gerichteten Antikörper durch Affinitätsreinigung (3.5.4) mit überexprimierten und aufgereinigten (His)<sub>10</sub>-Tag-Fusionsproteinen, die entsprechende rEAG1-, rEAG2- und rERG-spezifischen Bereiche enthielten, His<sub>10</sub>-rEAG1<sup>Δ724-945</sup> (His-rEAG1C, 8.2.1.6), His<sub>10</sub>-rEAG2<sup>Δ719-972</sup> (His-rEAG2C, 8.2.2.6) und His<sub>10</sub>-rERG<sup>Δ855-1063</sup> (His-rERG, 8.2.3.4), gewonnen. Die Antikörper wurden charakterisiert und auf die spezifische Detektion des Antigens getestet.

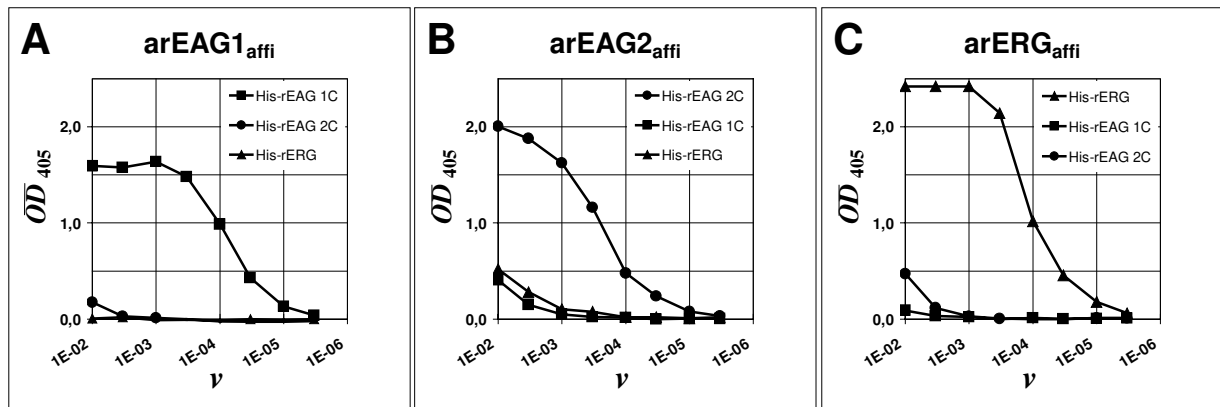


**Abb. VII ELISA der vorbehandelten (P/D) arEAG1-, arEAG2- und arERG-Rohseren**

Die drei behandelten Rohseren (P/D) wurden im ELISA gegen alle drei Antigene getestet. Der Fusionsanteil der Proteine war entweder das auch immunisierte GST- (Δ) oder (His)<sub>10</sub>- (■, ●, ▲). Der jeweils getestete, spezifische Anteil ist aus rEAG1 (■), aus rEAG2 (●) oder rERG (▲). Der spezifische, gegen den fusionierten Anteil des immunisierten Antigens gerichtete Titer (3.11.1.1) beträgt für arEAG1 17.000 (A); arEAG2 100.000 (B) und arERG 100.000 (C). Der GST-Tag ist für den hohen kreuzreaktiven Titer gegen GST-rERG (Δ) des arEAG1- und arEAG2-Serums verantwortlich.

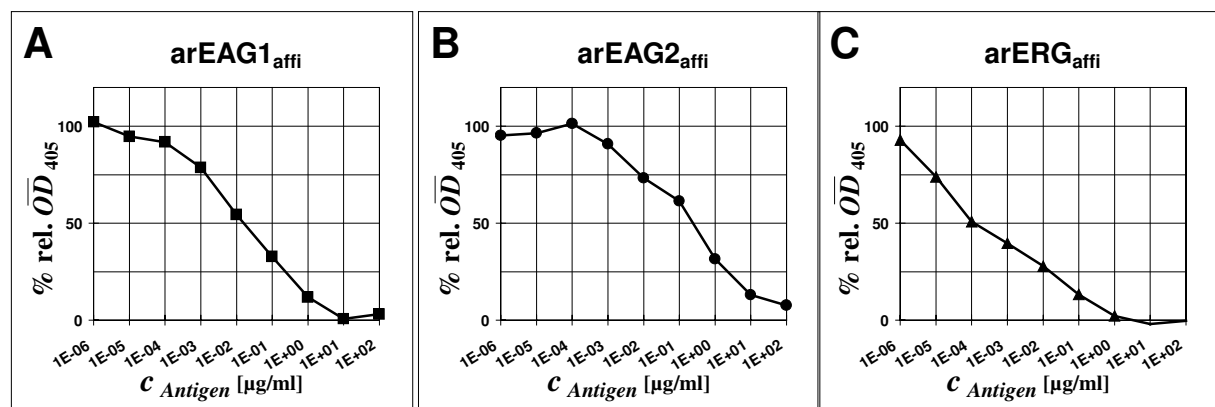
Die aus Kaninchen gewonnenen Seren, in denen polyklonale Antikörper gegen carboxyterminale Bereiche von rEAG1 (arEAG1), von rEAG2 (arEAG2) und von rERG (arERG) generiert worden waren, wurden zunächst vorbehandelt. Die Antikörper wurden durch Ammoniumsulfat-Fällung präzipitiert und anschließende Dialyse gegen PBS wieder in Lösung gebracht (3.5.3). Die vorbehandelten Rohseren (P/D) wurden im ELISA (3.5.5) getestet. Es wurde der jeweilige Titer der Seren gegen den spezifischen Anteil des immunisierten Antigens, z. B. arEAG1 gegen rEAG1C, das mit einem anderen Tag, als dem, mit dem immunisiert worden war, versehen war [(His)<sub>10</sub>- statt GST-Tag], bestimmt. Außerdem wurde jeweils die Kreuzreaktivität gegen die anderen beiden Antigene, z. B. arEAG1 gegen His-rEAG2C und His-rERG, bestimmt (Abb. VII).





**Abb. VIII ELISA der affinitätsgereinigten arEAG1-, arEAG2- und arERG-Antikörper**

Die drei behandelten Rohseren (P/D) wurden im ELISA gegen alle drei Antigene mit (His)<sub>10</sub>-Tag getestet. Der jeweils getestete, spezifische Anteil ist aus rEAG1 (■), aus rEAG2 (●) oder rERG (▲). Die Auswertung (3.11.1.1) des spezifischen, gegen den fusionierten Anteil des immunisierten Antigens gerichtete Titer, beträgt für arEAG1 10.000 (A); arEAG2 3.600 (B) und arERG 10.000 (C).



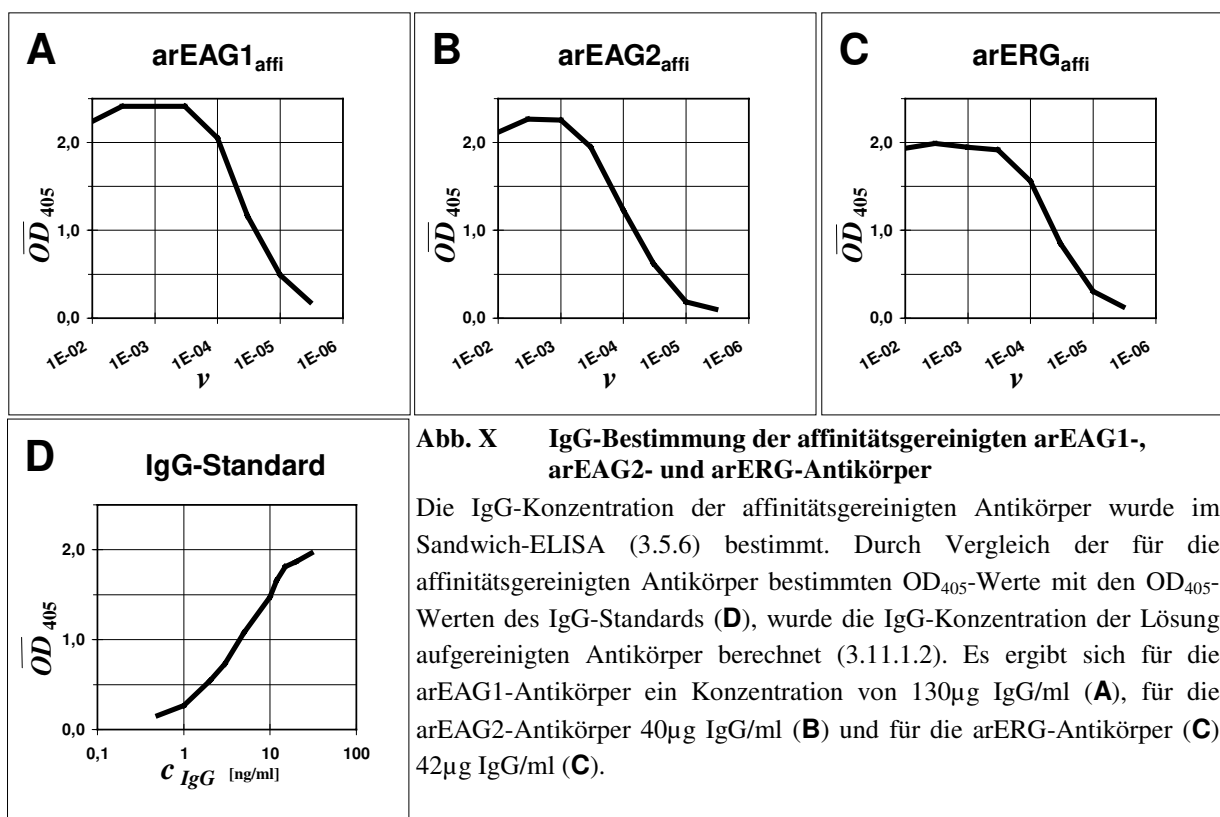
**Abb. IX Kompetitiver ELISA der affinitätsgereinigten arEAG1-, arEAG2- und arERG-Antikörper**

Die affinitätsgereinigten Antikörper (Abb. VIII) wurden auf Kompetitierbarkeit mit dem Antigen, mit welchem sie affinitätsgereinigt worden waren, getestet (3.5.7). Die arEAG1-Antikörper (A) wurden 1:22.000 verdünnt. Die OD<sub>405</sub> ohne Antigen betrug 0,825. Die Auswertung (3.11.1.3) ergab für die arEAG1-Antikörper, mit (His)<sub>10</sub>-rEAG1C (■) als Antigen, einen IC<sub>50</sub> von 0,029µg/ml und einen IC<sub>90</sub> von 2,5µg/ml. Die arEAG2-Antikörper (B) wurden 1:5.000 verdünnt. Die OD<sub>405</sub> ohne Antigen betrug 0,648. Der IC<sub>50</sub>, mit (His)<sub>10</sub>-rEAG2C (●) als Antigen, betrug 0,44µg/ml, der IC<sub>90</sub> 61µg/ml. Die arERG-Antikörper wurden 1:40.000 verdünnt. Die OD<sub>405</sub> ohne Antigen betrug 0,440. Der IC<sub>50</sub> mit (His)<sub>10</sub>-rERG (▲) als Antigen betrug 0,0015µg/ml, der IC<sub>90</sub> 0,2µg/ml.

Da die Proteine, mit denen im Rahmen dieser Arbeit Immunisierungen durchgeführt wurden, untereinander eine hohe Sequenzähnlichkeit haben und sich dadurch Kreuzreaktivitäten der erzeugten Seren zeigten, wurden die Seren vor der Affinitätsreinigung gegen das Antigen, gegen welches sie kreuzreagierten, voradsorbiert. Die Antikörper wurden daraufhin affinitätsgereinigt (3.5.4) und der Titer gegen das spezifische Antigen und die ggf. kreuzreagierenden Antigene, wiederum im ELISA bestimmt (Abb. VIII).

Aus den arEAG1-, arEAG2- und arERG-Rohseren, mit den spezifischen Titern von 17.000 (A), 100.000 (B) und 100.000 (C) (Abb. VII), konnten Lösungen affinitätsgereinigter Antikörper, mit spezifischen Titern von 10.000 (A), 3.600 (B) und 10.000 (C), hergestellt werden (Abb. VIII). Die unspezifischen Titer der kreuzreagierenden Antigene waren in den Lösungen der affinitätsgereinigten Antikörper mindestens um den Faktor 100 kleiner als der spezifische Titer (Abb. VIII).

Zur genaueren Charakterisierung der Lösungen der gereinigten Antikörper wurde zusätzlich die Kompetitierbarkeit der Antigenerkennung (Abb. IX) im kompetitiven ELISA (3.5.7) bestimmt. Die Kompetitierbarkeit der Erkennung der spezifischen Antigene durch die Antikörper, durch Vorinkubation der Antikörper mit Antigen, war nach der Affinitätsreinigung sehr unterschiedlich. So betrug die Antigenkonzentration, mit der die Erkennung von (His)<sub>10</sub>-rEAG2C durch affinitätsgereinigte arEAG2-Antikörper im ELISA zu 90% unterdrückt wurde, 61µg/ml. Bei einer Antikörperverdünnung mit vergleichbarer OD<sub>405</sub> im ELISA ohne Vorinkubation mit Antigen, wurde die Erkennung von (His)<sub>10</sub>-rEAG1 durch die arEAG1-Antikörper durch Vorinkubation mit 2,5µg/ml Antigen zu 90% unterdrückt. Bei einer höheren Antikörperverdünnung, nicht mehr als 3×, wurde die Antigenerkennung durch arERG-Antikörper mit 0,2µg/ml Antigen zu 90% unterdrückt.



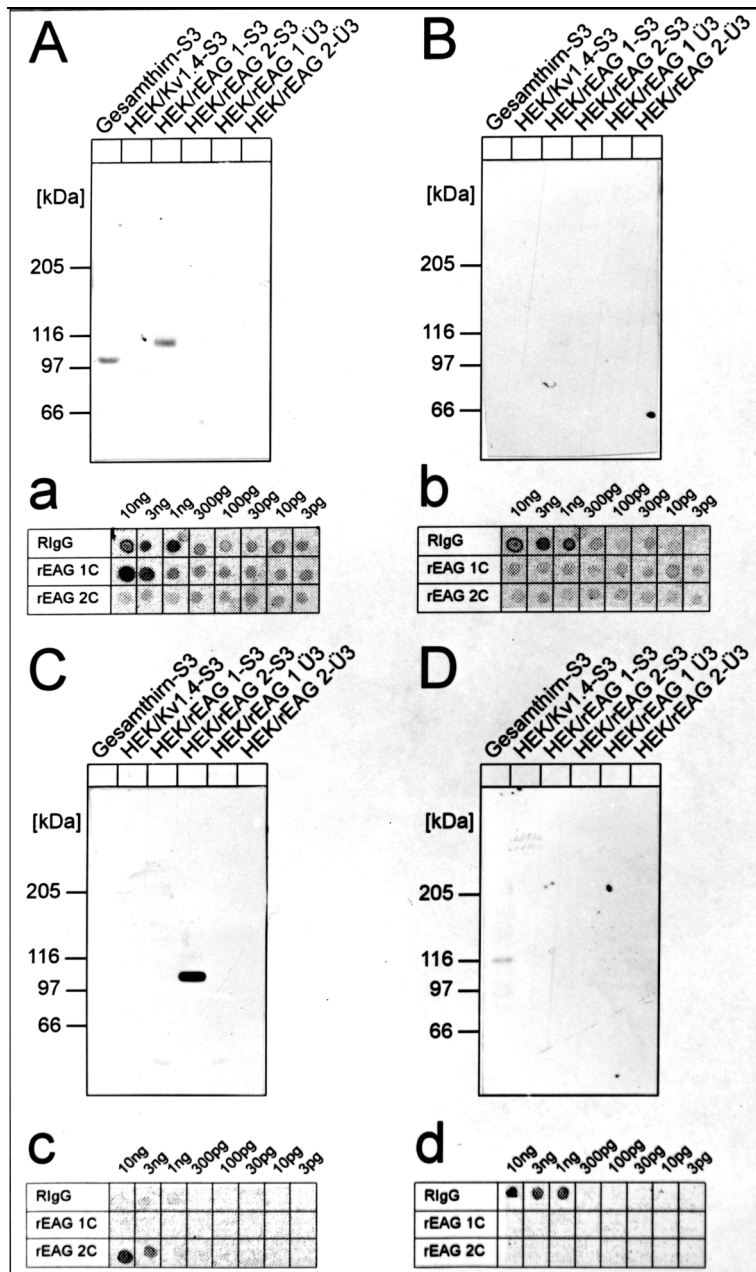
Die Bindung von Antigenen die, für den ELISA eingesetzten 96-well-Platten, wird durch über-Nacht-Inkubation der Platten mit Proteinlösungen durchgeführt. Die Affinität verschiedener, als Antigen eingesetzter Proteine an die ELISA-Platten variiert. Damit für den Einsatz der Antikörper ein Parameter existiert, der unabhängig davon ist, wie gut ein bestimmtes Antigen an ELISA-Platten bindet, wurde die IgG-Konzentration (Abb. X) der Lösungen der affinitätsgereinigten Antikörper im Sandwich-ELISA (3.5.6) bestimmt. Für diese Bestimmung wird, unabhängig von der Antigenspezifität der Antikörper, die ELISA-Platte nur mit einer Proteinlösung beschichtet. Im Falle der in Kaninchen generierten Antikörper ist dies eine Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Lösung.

Die gestesteten Lösungen enthielten 130µg IgG/ml (arEAG1), 40µg IgG/ml (arEAG2) und die 42µg IgG/ml (arERG) affinitätsgereinigter Antikörper.

Die Antikörper wurden für die im Folgenden beschriebenen Experimente eingesetzt.

## 4.5 Bestimmung der Verteilung von rEAG1, rEAG2 und rERG im ZNS der Ratte im Western-Blot

Die affinitätsgereinigten Antikörper gegen rEAG1 und rEAG2 können im *Dot-Blot* jeweils spezifisch zwischen dem rEAG1-Antigen (His)<sub>10</sub>-rEAG1C und dem rEAG2-Antigen (His)<sub>10</sub>-rEAG2C diskriminieren (Abb. XI, **a** und **c**). Die Antikörper können im *Western-Blot* in den Membranfraktionen Protein-überexprimierender Gewebekulturzellen spezifisch zwischen den beiden überexprimierten Proteinen rEAG1 und rEAG2 unterscheiden (Abb. XI, **A** und **C**).



### Abb. XI Western-Blots von K<sub>v</sub>1.4, rEAG1 und rEAG2 heterolog exprimierenden Gewebekulturzellen

Für die Überprüfung der Spezifität der affinitätsgereinigten arEAG1- und arEAG2-Antikörper wurden *Western-Blots* (**A-D**) und *Dot-Blots* (**a-d**) angefertigt (3.5.8, 3.5.9).

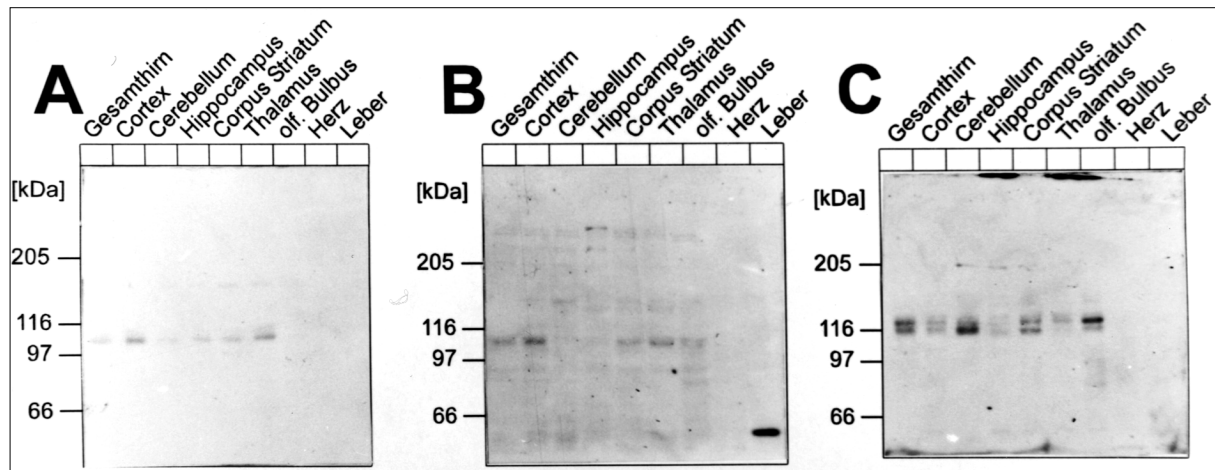
Für die *Western-Blots* (**A-D**, 3.5.9) wurden S3-Membranfraktionen aus dem gesamten Hirn der Ratte (**Gesamthirn-S3**) und aus stabil-transfizierten HEK 293-Zellen (3.10.4), die K<sub>v</sub>1.4 (**HEK/Kv1.4-S3**), rEAG1 (**HEK/rEAG1-S3**) oder rEAG2 (**HEK/rEAG2-S3**) überexprimierten, präpariert (3.4.3.1, 3.4.3.2). Als Kontrolle wurden die Proteine der cytosolischen Fraktion (Ü3), der rEAG1 (**HEK/rEAG1-Ü3**) oder rEAG2 (**HEK/rEAG2-Ü3**) überexprimierenden HEK 293 - Zellen verwandt. Von der Gesamthirn- Membranfraktion wurden 45µg Protein und von den Membranfraktionen und den cytosolischen Fraktionen der Protein überexprimierenden Zellen wurden je 5µg Protein auf eine 6%igen SDS-PAGE aufgetragen und im elektrischen Feld aufgetrennt (3.4.2.1). Die Proteine wurden dann auf PVDF-Membranen geblottet (3.5.9).

Für die *Dot-Blots* (3.5.8) wurden die angegebenen Mengen arEAG1-Antigen (**rEAG 1C**), arEAG2-Antigen (**rEAG 2C**) und das für den Zweitantikörper (PGaR) spezifische Antigen (Kaninchen-IgG, **RlgG**) auf PVDF-Membranen aufgetragen. Die Blots **A** und **a** wurden für 2h mit arEAG1-Antikörpern (500ng IgG/ml) inkubiert.

Für die Blots **B** und **b** wurden die

arEAG1-Antikörper zuvor für 2h mit (His)<sub>10</sub>-rEAG1C (8µg/ml) vorinkubiert. Die Blots **C** und **c** wurden für 2h mit arEAG2-Antikörpern (500ng IgG/ml) inkubiert. Für die Blots **D** und **d** wurden die arEAG2-Antikörper zuvor für 2h mit (His)<sub>10</sub>-rEAG2C (9µg/ml) vorinkubiert. Alle Blots wurden für 2h mit Zweitantikörper (PGaR, 5ng/ml) inkubiert. Die Blots wurden mit ECL-entwickelt (3.5.10). Die Expositionsdauer der Blots auf ECL-Film betrug für **A**, **a**, **B** und **b** 25min und für **C**, **c**, **D** und **d** 4min.

Durch Vorinkubation der Antikörper mit Antigen kann die Detektion des Antigens, sowohl für die arEAG1- als auch für arEAG2-Antikörper im *Western*-Blot der überexprimierenden Zellen (Abb. XI, **B** und **D**) und im *Dot*-Blot unterdrückt werden (Abb. XI, **b** und **d**). Die mit dem Antigen blockierten rEAG2-Antikörper (**D**) detektieren in den Proteinen der S3-Fraktion allerdings ein anderes Protein, mit einem höheren apparenten Molekulargewicht.



**Abb. XII Western-Blots von Membranfraktionen aus nativem Gewebe**

Die Durchführung der *Western*-Blots entspricht der für Abb. XI beschriebenen. Je 15 µg Protein aus S3-Membranfraktionen der bezeichneten Hirnareale sowie aus dem Herzen und der Leber der Ratte wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Der Blot **A**: wurde mit arEAG1 (2,5 µg IgG/ml), Blot **B** mit arEAG2 (200 ng IgG/ml) und Blot **C** mit arERG (500 ng IgG/ml) inkubiert. Die Blots wurden mit Zweitantikörper (PGaR, 5 ng/ml) inkubiert, mit ECL entwickelt und ECL-Film für 15 min (**A** und **B**) bzw. 70 min (**C**) exponiert.

Die apparenten Molekulargewichte der Proteine, die mit den arEAG1-, arEAG2- und rERG-Antikörpern im *Western*-Blot in S3-Membranfraktionen (3.4.3.1) des Rattenhirns detektiert werden (Abb. XII), entsprechen den von den Leserahmen der rEAG1- (108.290 Da), rEAG2- (111.724 Da) und rERG-cDNA (126.951 Da) abgeleiteten Molekulargewichten.

Im Hirn wird rEAG1 im *Western*-Blot vor allem im Cortex und Thalamus detektiert (Abb. XII, **B**). Im Gegensatz dazu kann das Protein im *Bulbus olfactorius* kaum nachgewiesen werden. Auch die Expression im *Cerebellum* scheint geringer als durchschnittlich im gesamten Hirn. Im Hippocampus und im *Corpus Striatum* dagegen ist rEAG1 überdurchschnittlich exprimiert.

Ein mit arEAG2-Antikörpern entwickelter *Western*-Blot zeigt kaum eine Expression von rEAG2 im Hippocampus und im *Cerebellum* (Abb. XII, **C**). In Bezug auf das Gesamthirn wird im Cortex und im Thalamus eine überdurchschnittliche Expression, im olfaktorischen Bulbus und im *Corpus striatum* eine unterdurchschnittliche Expression dieser K<sup>+</sup>-Kanaluntereinheit detektiert.

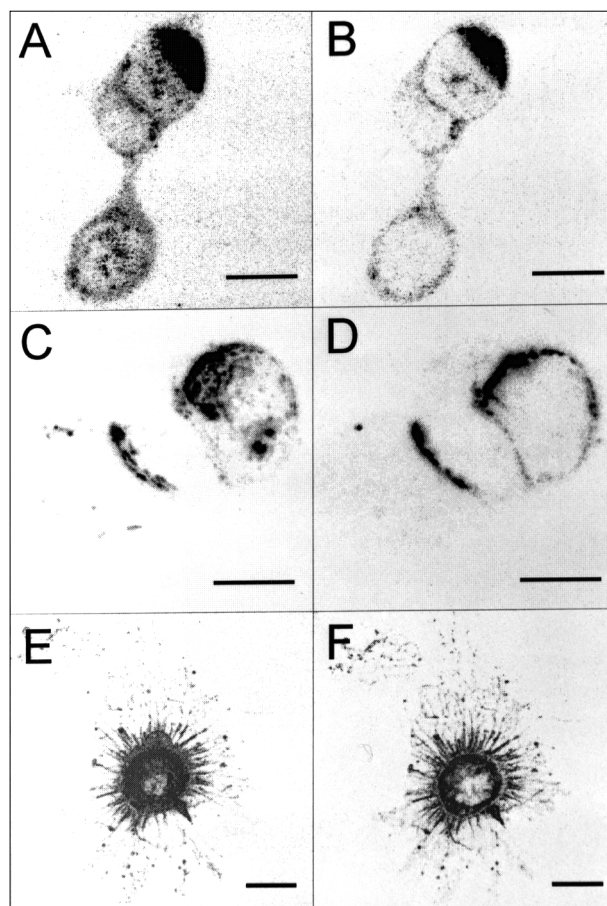
In den S3-Membranfraktionen von Herz und Leber wird nur von einem der drei Antikörper, von arEAG2, ein Protein detektiert. Im Unterschied zu den im Hirn mit diesem Antikörper detektierten Proteinen, die ein Molekulargewicht von ≈110 kDa haben, hat das in der Leber nachgewiesene Protein ein Molekulargewicht von ca. 60 kDa.

Nach den Ergebnissen von *Northern*-Blots<sup>9</sup> und in Analogie zum humanen homologen Protein hERG<sup>34</sup>, sollte rERG im Herzen exprimiert sein. Es kann im *Western*-Blot dort allerdings nicht detektiert werden (Abb. XII, **C**).

Im Rattenhirn gibt es mindestens zwei verschiedene rERG-Proteine, die sich mit den arERG-Antikörpern nachweisen lassen. Das Protein mit einem etwas höherem apparenten Molekulargewicht dominiert die Expression im *Bulbus olfactorius* und im Thalamus, das Protein mit einem niedrigerem apparenten Molekulargewicht dominiert die Expression im *Cerebellum*. Im gesamten Hirn werden beide Proteine in etwa gleichstark exprimiert.

#### 4.6 Immuncytochemische Detektion von rEAG1, rEAG2 und rERG in heterolog Protein - exprimierenden Gewebekulturzellen

In HEK 293-Zellen, die mit Plasmiden transient transfiziert worden waren, die die *reag1*-, *reag2*- oder *rerg*-cDNA, unter der Kontrolle des CMV-Promotors, enthielten, konnten mit arEAG1-, arEAG2- und arERG-Antikörpern, in den korrespondierende Ansätzen, Proteine detektiert werden (Abb. XIII). In Inkubationen der Antikörper mit nicht-transfizierten HEK293-Zellen wurden keine Proteine detektiert.



**Abb. XIII Immuncytochemie an transient-transfizierten HEK 293 Zellen**

HEK 293-Zellen wurden zur Überexpression von rEAG1, rEAG2 oder rERG unter Kontrolle des CMV-Promotors mit pcrEAG1 (8.2.1.1), pcrEAG2 (8.2.2.1) oder pcDNA3/rERG<sup>9</sup> transient transfiziert (3.10.3). Die transfizierten Zellen wurden 48h nach der Transfektion mit Methanol fixiert (3.6.1) und mit den Antikörpern, deren korrespondierendes Antigen transfiziert worden war, immuncytochemisch dargestellt (3.6.2). Dazu wurden die fixierten Zellen zunächst mit arEAG1- (7,5µg IgG/ml, **A** und **B**), arEAG2- (6µg IgG/ml, **C** und **D**) oder arERG-Antikörpern (4,1µg IgG/ml **E** und **F**) und dann mit Zweitantikörper (Cy3-GaR, 500ng/ml) jeweils für 2h inkubiert und anschließend mit Glycerin-Gelatine eingedeckelt.

Die Fluoreszenz der Zellen wurde am konfokalen Mikroskop ausgewertet (3.7.3.3). Die Bilder der fluoreszierenden Zellen wurden als Farbbilder digitalisiert. Die farbliche Darstellung wurde anschließend in 256 Graustufen umgewandelt und die Graustufen invertiert. Die Abbildungen auf der linken Seite (**A**, **C** und **E**) entsprechen 10 übereinander gelegten, durch die xy-Ebene (Papierebene) aufgenommenen Schnitten im Abstand von jeweils etwa 1µm. Die Abbildungen auf der rechten Seite entsprechen einem 1µm Schnitt in der xy-Ebene. Die Auflösung in z-Richtung beträgt ca. 300nm. Die reale, digitalisierte Bildauflösung beträgt 355 × 355 Pixel für **A** und **B**, 391 × 391 Pixel für **C** und **D** und 493 × 493

Pixel für **E** und **F**. Die Länge der Skala (—) in den Abbildungen **A-F** beträgt jeweils 10µm.

Die in Abb. XIII, 48h nach der Transfektion gezeigte, unterschiedliche Verteilung der Proteine in den Zellen, ist kein Merkmal der entsprechenden Proteine. Die Variation der intrazellulären Verteilung der Proteine ist von Zelle zu Zelle so groß wie von Protein zu Protein. Die Lokalisation der überexprimierten Proteine unter der Kontrolle des CMV-Promotors unterscheidet sich nicht (nur) von Protein zu Protein sondern (auch) von Zelle zu

Zelle. So kommt es in einigen Zellen zu einer Verteilung, in der intrazellulär Vesikel angefärbt zu sein scheinen (**B**). In anderen Zellen kommt es zu einer Verteilung, bei der das detektierte Antigen an die Extrazellulärmatrix assoziiert zu sein scheint (**F**). Zum Teil werden Zellen immunocytochemisch aber auch so gefärbt, daß das Muster des nachgewiesenen Antigens, dem Verteilungsmuster eines Membranproteins entspricht (**D**).

#### **4.7 Bestimmung der Verteilung der Proteine rEAG 1, rEAG2 und rERG im ZNS der Ratte durch *in-situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie**

Der Vergleich der Expressionsmuster einer RNA und des davon translatierten Proteins im ZNS durch *in-situ*-Hybridisierung (ISH) und Immunhistochemie (IHC), kann bei einem Membranprotein darüber Aufschluß geben, ob es an der Stelle der RNA-Expression in die Membran inseriert wird oder ob es axonal in andere Bereiche des Hirns transportiert wird. Im ZNS wird dabei zwischen dem somatodendritischen und axonalen Membrankompartiment unterschieden.

Übersichten der *in-situ*-Hybridisierungen der *reag1*-, *reag2*- und *reerg*-cRNA und der Immunhistochemie gegen rEAG1, rEAG2 und rERG sind durch Sagittalschnitte (Abb. XIV) und Koronarschnitte (Abb. XV) gegeben. Alle Genprodukte zeigen im ZNS der Ratte eine weitverbreitete Expression. Die Expression der *reag1*-, *reag2*- und *reerg*-cRNA wird in den *in-situ*-Hybridisierungen<sup>\*)</sup> vor allem in den Pyramidenzellen des *Stratum pyramidale* im *Hippocampus* und in den Körnerzellen des *Stratum granulosum* im *Gyrus dentatus* deutlich. Alle drei Proteine sind im *Bulbus olfactorius* und im *Cerebellum* sehr deutlich exprimiert<sup>\*\*)</sup>.

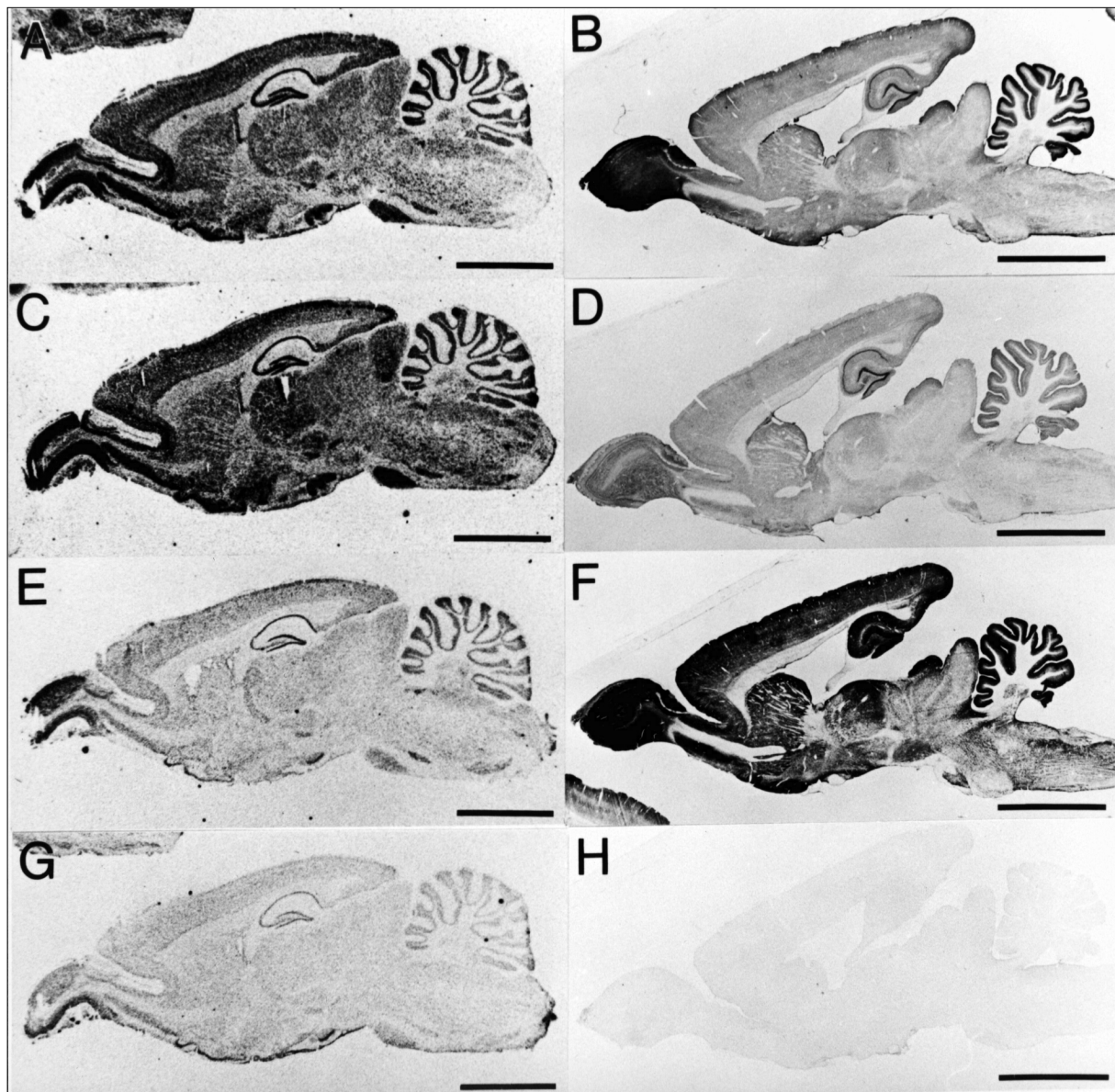
Die immunhistochemie Untersuchung der Gewebsschnitte zeigt eine deutliche Markierung der Zellsomata und insbesondere der Zellkerne durch die arEAG1- und arEAG2-Antikörper, während die arERG-Antikörper vor allem zu einer deutlichen Färbung des Neuropils führen (Abb. XVI, Abb. XVII). In den axonalen Geweben des *Corpus Callosum* (basal zum *Cortex cerebri* gelegen) und der weißen Substanz des *Cerebellums* ist keine Expression der Proteine zu erkennen. Die Abwesenheit der RNA in diesen Arealen ist in Folge der Abwesenheit neuronaler Somata nicht überraschend.

---

<sup>\*)</sup> Die Vorbereitung des Gewebes für die *in-situ*-Hybridisierung und die Inkubation mit den markierten Sonden wurden von Dr. S. Fehr durchgeführt. Die rERG-cRNA-Sonde wurde von B. Engeland synthetisiert.

<sup>\*\*)</sup> Die Auswertung der neuroanatomischen Gewebsschnitte des Rattenhirns wurde anhand des neuroanatomischen Atlas des Rattenhirns *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*<sup>120</sup> und des Buchs *The Rat Nervous System*<sup>121</sup> durchgeführt.

---

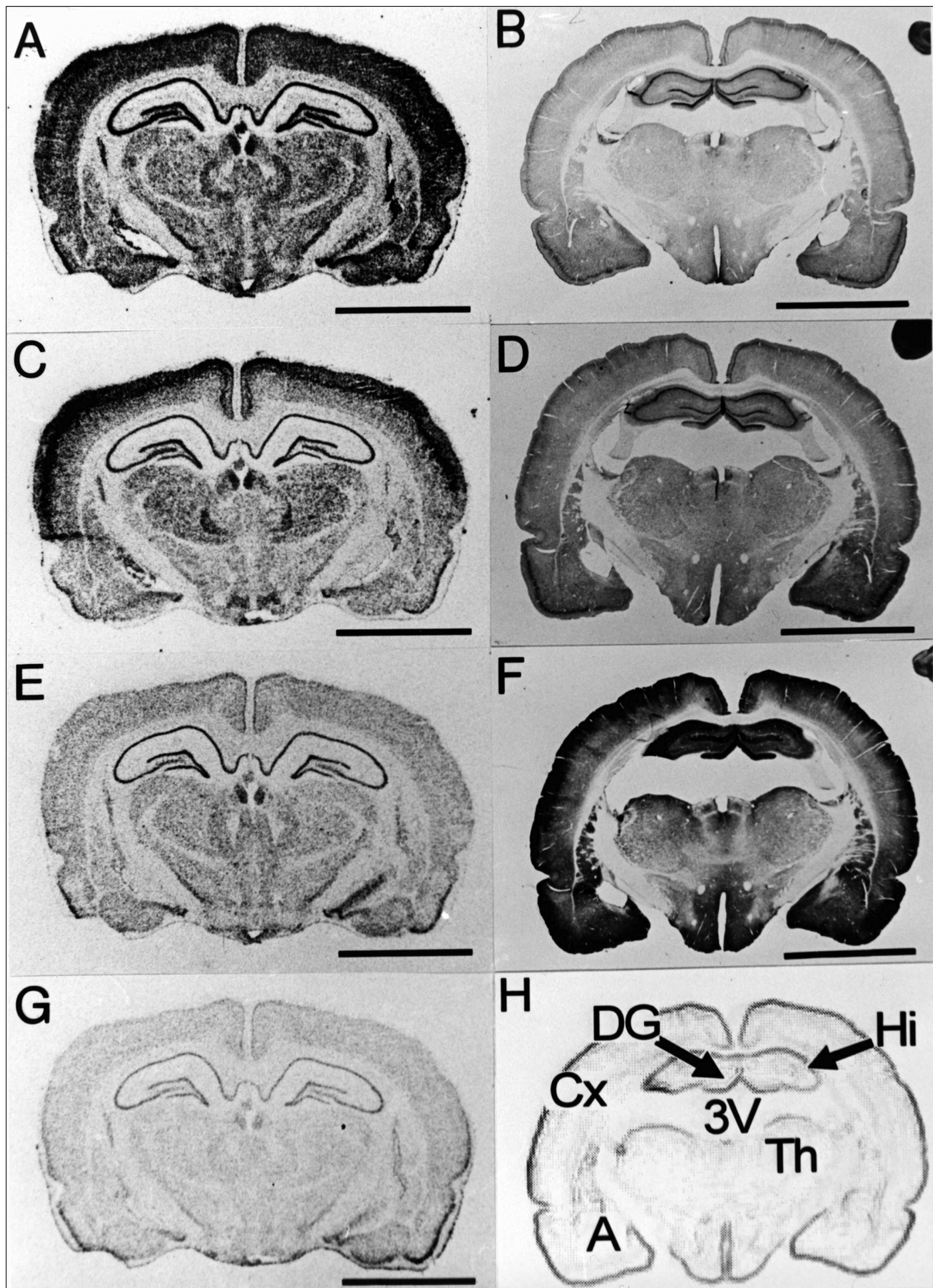


**Abb. XIV** Sagittalschnitte durch das Rattenhirn

*In-situ*-Hybridisierung (ISH, linke Hälfte) und Immunhistochemie (IHC, rechte Hälfte) von reAG1 (A und B), reAG2 (C und D) und rERG (E und F). Für die *reag*-ISH wurden zwei *reag*-Antisense-cRNA-Sonden verwandt. Sie wurde von den cDNA-Nukleotiden den Nukleotiden 3889-3642 und 3647-3440 (ORF) transkribiert und war somit zum größtenteile komplementär zum 3'-nicht-translatierten

Bereich der *reag*-cDNA (Nukleotide >3489). Die *reag1*- und *reag2*-Sonden wurden von dem cDNA-Bereich transkribiert von dem auch die Fusionsproteine, die zur Generierung der Antikörper eingesetzt wurden, translatiert. Sie sind im Anhang beschrieben (8.2.1.7, 8.2.2.7). Die *in-situ*-Hybridisierungen wurden mit  $\alpha$ - $^{33}\text{P}$ -UTP markierten *reag1*-, *reag2*- und *reag*-Antisense-cRNA-Proben ( $7,5 \times 10^6$  cpm/ml) von 250-300bp Länge durchgeführt (3.8). Die Expositionsdauer der *in-situ*-Hybridisierungen auf Röntgenfilm betrug fünf Tage (A und C) bzw. drei Tage (E und G). Die Abb. G ist die *Sense*- (Negativ-) Kontrolle für Abb. E. Für die Immunhistochemie, durchgeführt wie unter 3.7 beschrieben, wurden affinitätsgereinigte arEAG1- ( $7,5 \mu\text{g}$  IgG/ml, B), arEAG2- ( $6 \mu\text{g}$  IgG/ml, D), arERG-Antikörper ( $4,1 \mu\text{g}$  IgG/ml, F) eingesetzt. Die Abb. H stellt die Negativkontrolle für Abb. F dar. Die arERG-Antikörper ( $4,1 \mu\text{g}$  IgG/ml) wurden dafür vor der Inkubation mit dem Gewebeschnitt für 2h mit Antigen [(His) $_{10}$ -rERG,  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ] vorinkubiert. In den Sagittalschnitten sind abgebildet: 3V – dritter Ventrikel (*Ventriculus III*), Cx – Großhirnrinde (*Cortex cerebri*), Cb – Kleinhirn (*Cerebellum*), OB – olfaktorischer Bulbus (*Bulbus olfactorius*), Pn – Brückenkern (*Nucleus pontinus*), Hi – Hippocampus, DG – Gyrus dentate, Th – Thalamus, SN – Substantia nigra, CPu – caudato Putamen, SC – Colliculus cranialis, IC – Colliculus caudalis. Die Länge der Skala (—) in den Abbildungen beträgt jeweils 5mm.



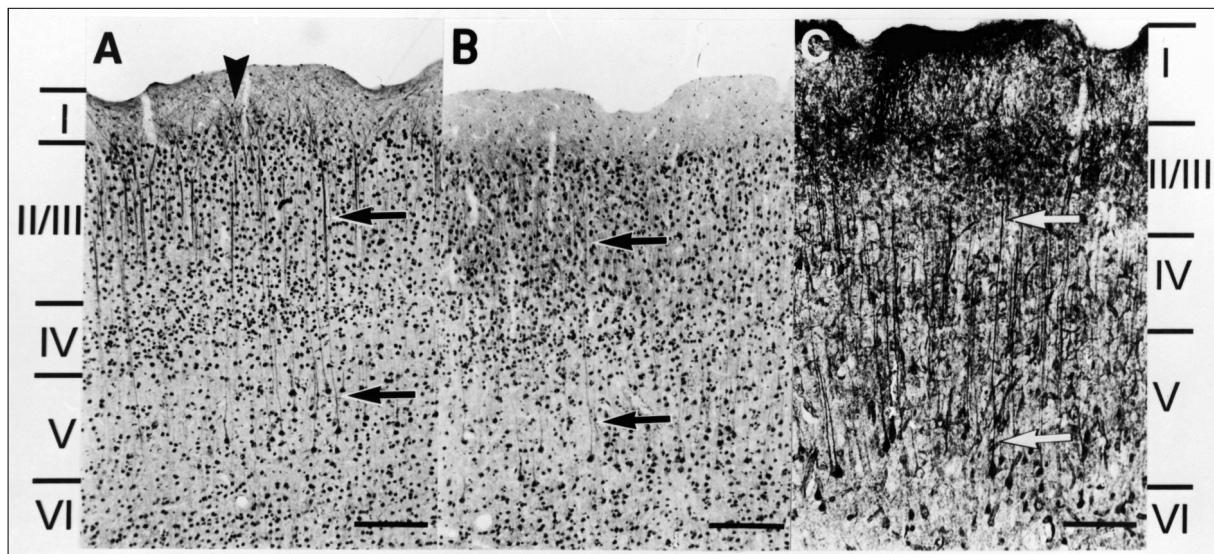


**Abb. XV Koronarschnitte durch das Rattenhirn**

*In-situ*-Hybridisierung (linke Hälfte) und Immunhistochemie (rechte Hälfte) von rEAG1 (**A** und **B**), rEAG2 (**C** und **D**) und rERG (**E** und **F**). Die Expositionsdauer betrug fünf Tage (**A** und **C**) bzw. drei Tage (**E** und **G**). Die Abb. **G** ist die *Sense*- (Negativ-) Kontrolle für Abb. **E**. Für die Immunhistochemie, durchgeführt wie unter 3.7 beschrieben, wurden arEAG1- (7,5 µg IgG/ml, **B**), arEAG2 (6 µg IgG/ml, **D**), arERG-Antikörpern (4,1 µg IgG/ml, **F**) eingesetzt. Die Abb. **H** zeigt die in den Schnitten abgebildeten Areale: **3V** – dritter Ventrikel (*Ventriculus III*), **Cx** – Großhirnrinde (*Cortex cerebri*), **Cb** – Kleinhirn (*Cerebellum*), **OB** – olfaktorischer Bulbus (*Bulbus*



*olfactorius*), **Pn** – Brücken Kern (*Nucleus pontinus*), **Hi** – Hippocampus, **DG** – *Gyrus dentatus*, **Th** – Thalamus, **Cpu** – *caudato Putamen*, **A** – Amygdala, **Hb** – Habenula. Die Länge der Skala (—) in den Abbildungen beträgt jeweils 5mm.



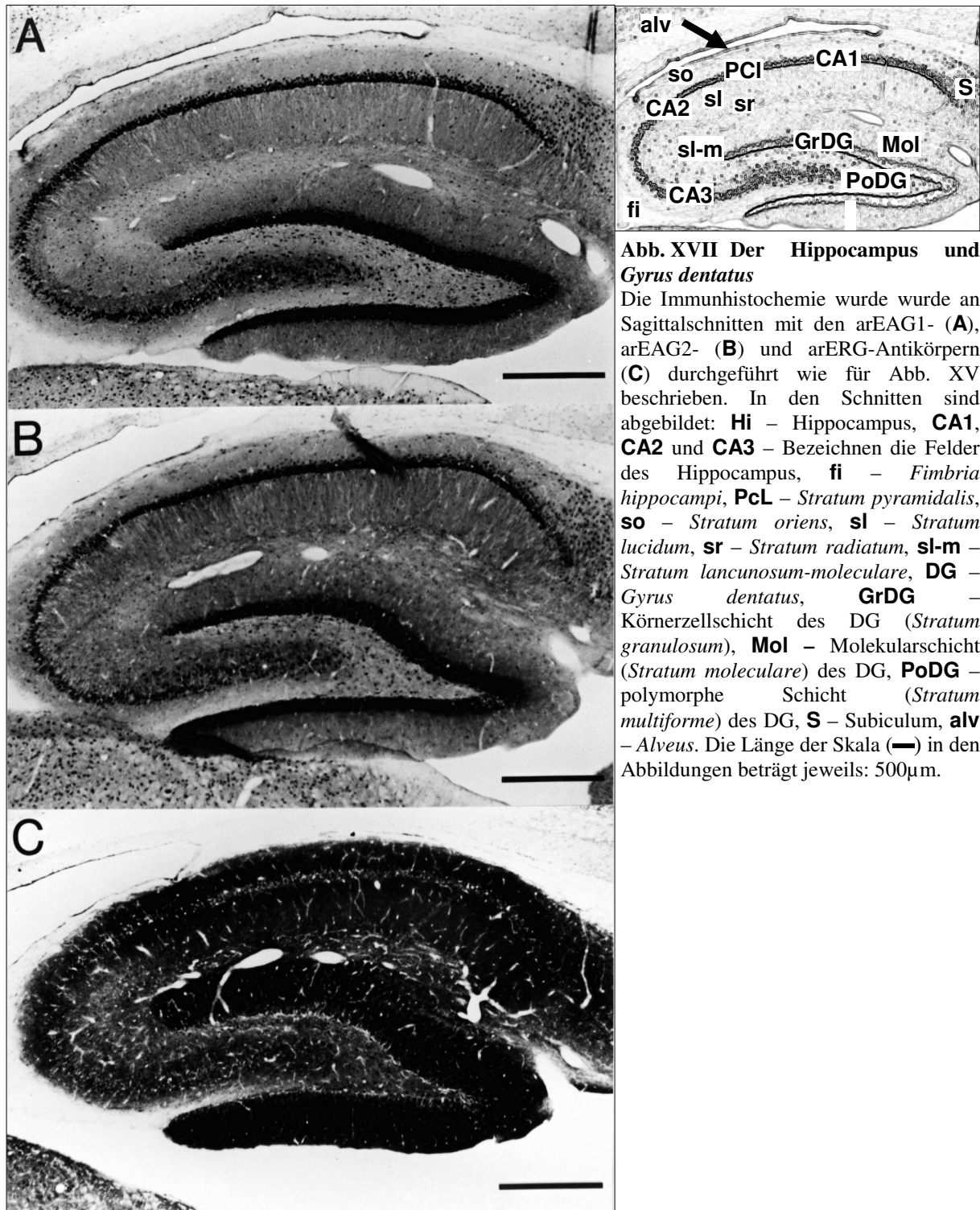
**Abb. XVI Die Großhirnrinde (*Cortex cerebri*).**

Die Immunhistochemie wurde an Sagittalschnitten mit den arEAG1- (**A**), arEAG2- (**B**) und arERG-Antikörpern (**C**) durchgeführt wie für Abb. XV beschrieben. In **A** und **B** ist ein Bereich aus dem parietalen Cortex (*Par1*) gezeigt, **C** ist aus dem frontalen Cortex (*Fr1*). In den Schnitten sind die mit römischen Zahlen bezeichneten corticalen Schichten (*Laminae*) I–VI abgebildet. Die Pfeile (→) deuten auf die apikalen Dendriten der Pyramidalneuronen aus *Lamina* V. Die Länge der Skala (—) in den Abbildungen beträgt jeweils 250µm.

Die Immunreaktivität im Ausschnitt des *Cortex cerebri* (Abb. XVI) zeigt, daß fast alle Zellkörper, von *Lamina* I bis VI, für rEAG1 (**A**) und rEAG2 (**B**) positiv sind. Die gut sichtbaren Apikaldendriten der Pyramidenzellen der fünften Zellschicht (*Lamina* V) sind für alle drei Proteine positiv. Die immunhistochemische Färbung der *Lamina* I bis VI für rEAG1 und rEAG2, ist, abgesehen von der erwähnten Färbung einiger Dendriten, vor allem auf eine Färbung der Zellkerne zurückzuführen.

Für rERG zeigt sich, daß die Somata in den immunhistochemisch gefärbten Arealen zumeist nicht besonders hervortreten. Proteine des Zellkerns werden von den arERG-Antikörpern nicht erkannt.

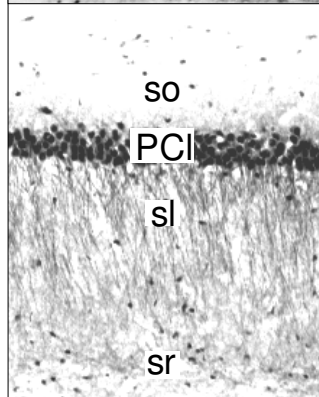
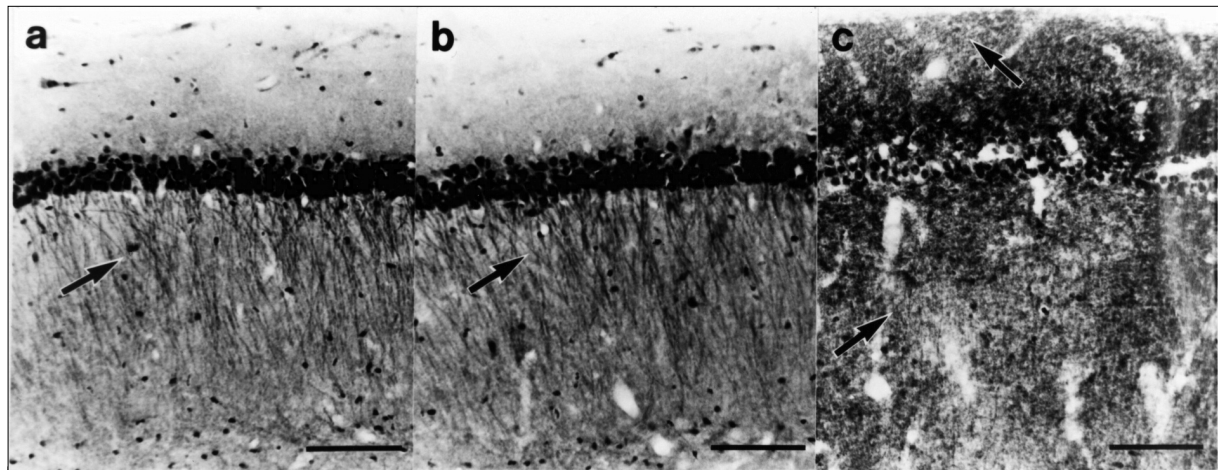
Eine Betrachtung des *Hippocampus* (Abb. XVII) zeigt, daß die Apikaldendriten der Pyramidenzellen vor allem in der CA1-Region im *Stratum lucidum* in der rEAG1- (Abb. XVII, **A**) und rEAG2-IHC (Abb. XVII, **B**) deutlich hervortreten. Im *Stratum lucidum* der CA3-Region sind die axonalen Projektionen der Körnerzellen des *Gyrus dentate*, die Moosfasern, welche ausgehend vom *Gyrus dentate* senkrecht zu den Apikaldendriten der Pyramidenzellen der CA3-Region verlaufen, vor allem für rEAG1 aber auch für rEAG2 positiv.



**Abb. XVII Der Hippocampus und Gyrus dentatus**

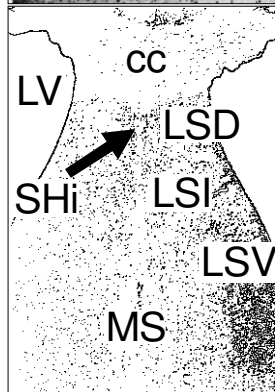
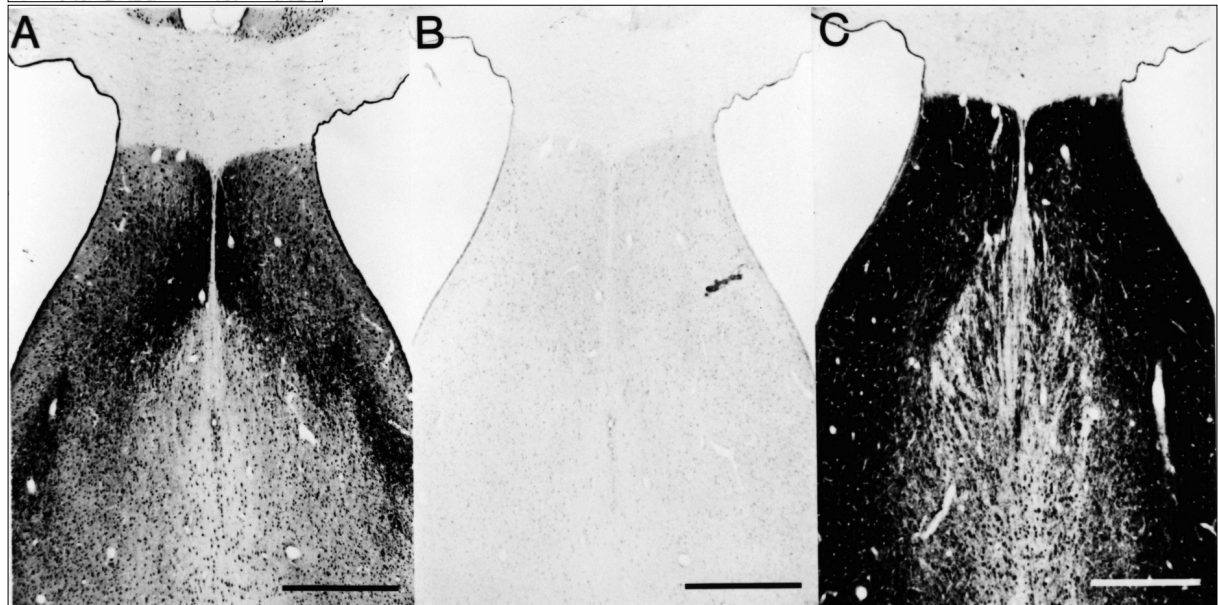
Die Immunhistochemie wurde an Sagittalschnitten mit den arEAG1- (A), arEAG2- (B) und arERG-Antikörpern (C) durchgeführt wie für Abb. XV beschrieben. In den Schnitten sind abgebildet: **Hi** – Hippocampus, **CA1**, **CA2** und **CA3** – Bezeichnen die Felder des Hippocampus, **fi** – *Fimbria hippocampi*, **PcL** – *Stratum pyramidale*, **so** – *Stratum oriens*, **sl** – *Stratum lucidum*, **sr** – *Stratum radiatum*, **sl-m** – *Stratum lacunosum-moleculare*, **DG** – *Gyrus dentatus*, **GrDG** – Körnerzellschicht des DG (*Stratum granulosum*), **Mol** – Molekularschicht (*Stratum moleculare*) des DG, **PoDG** – polymorphe Schicht (*Stratum multiforme*) des DG, **S** – Subiculum, **alv** – *Alveus*. Die Länge der Skala (—) in den Abbildungen beträgt jeweils: 500 $\mu$ m.

Das Expressionsmuster von rERG unterscheidet sich auch im Hippocampus deutlich von dem der anderen beiden Proteinen. Während sich die Pyramidenzellen der CA1-Region fast hell gegenüber dem Hintergrund abheben (Abb. XVII, C), sie sind trotzdem eindeutig immunopositiv, ist in diesem Bereich vor allem das Neuropil des *Stratum oriens*, des *Stratum lucidum* und des *Stratum radiatum* sehr stark gefärbt. Im *Gyrus dentatus*, dessen Körnerzellen starke RNA-Expression zeigen, ist vor allem das dendritische Neuropil der Molekularschicht (*Stratum moleculare*) und nicht die Axone dieser Zellen (Moosfasern) für rERG immunopositiv.



**Abb. XVIII Das hippocampale Feld CA1**

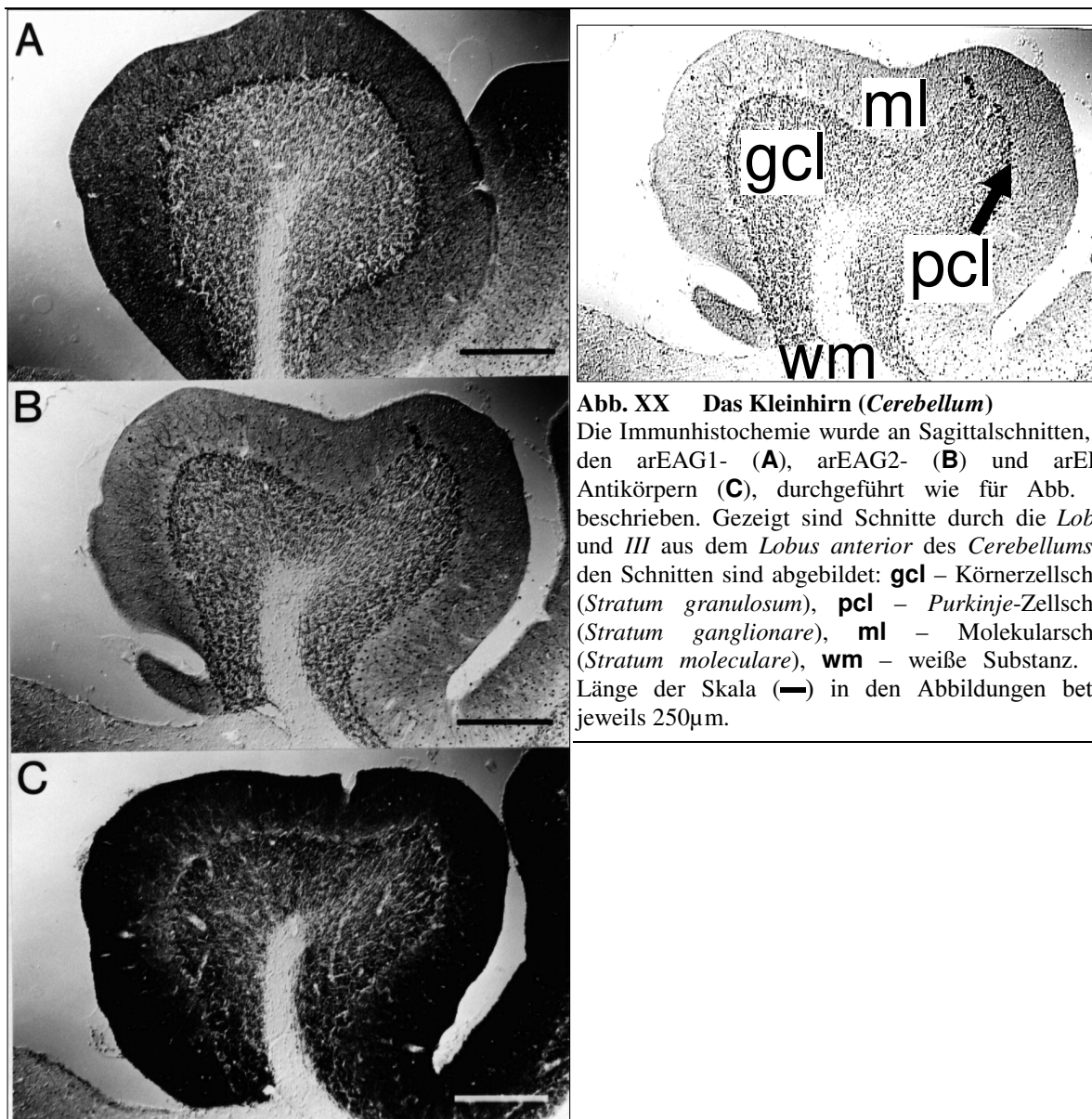
Die Immunhistochemie wurde an Sagittalschnitten mit den arEAG1- (a), arEAG2- (b) und arERG-Antikörpern (c) durchgeführt wie für Abb. XV beschrieben. In den Schnitten sind abgebildet: **PcL** – *Stratum pyramidale* des Hi, **so** – *Stratum oriens*, **sl** – *Stratum lucidum*, **sr** – *Stratum radiatum*. Die Pfeile in a und b weisen auf die apikalen Dendriten der Pyramidenzellen des *Stratum pyramidale*. In c weisen die Pfeile auf Dendriten, die sich im *Stratum lucidum* und *Stratum oriens* detektieren lassen, deren Zuordnung zu den Pyramidenzellen jedoch nicht eindeutig ist. Sie gehören möglicherweise zu den in diesen Schichten immunhistochemisch angefärbten interneuronalen Zellen. Die Länge der Skala (—) in den Abbildungen beträgt jeweils 100µm.



**Abb. XIX Das Septum**

Die Immunhistochemie wurde an Koronarschnitten, mit den arEAG1- (A), arEAG2- (B) und arERG-Antikörpern (C), durchgeführt wie für Abb. XV beschrieben. In den Schnitten sind abgebildet: **cc** – Balken (*Corpus callosum*), **SHi** – *Nucleus septohippocampalis*; **LS** – *Nucleus lateralis*; **LSI** – *Nucleus lateralis, Pars intermedia*; **LSV** – *Nucleus lateralis, Pars ventralis*; **LSD** – *Nucleus lateralis, Pars dorsalis*; **MS** – *Nucleus medialis*, **LV** – lateraler Ventrikel (*Ventriculus lateralis*). Die Länge der Skala (—) in den Abbildungen beträgt jeweils 1mm.

Ein Ausschnitt aus der hippocampalen CA1-Region (Abb. XVIII) zeigt noch einmal deutlich die Expression der Proteine rEAG1 (**A**) und rEAG2 (**B**) in den großen, primären Dendriten der Pyramidenzellen, während die rERG-IHC (**C**) ein dendritisches Verteilungsmuster aufweist, bei dem nur wenige der großen Dendriten (durch Pfeile markiert) deutlich hervortreten. Dafür sind die distalen Bereiche der Dendriten, deren Umrisse nicht mehr aufgelöst werden, und die daher allgemein als Neuropil bezeichnet werden, deutlich markiert. In der Abbildung des Septums (Abb. XIX) wird vor allem für rEAG1 (**A**) und rERG (**C**), der kontrastreiche Übergang von der Immunfärbung des dendritischen Neuropils des Septums zu den ungefärbten axonalen Bahnen des *Corpus callosum* deutlich. Zudem ist im Septum ein deutlicher Unterschied in der Expression von rEAG1 und rEAG2 (**B**) sichtbar.



**Abb. XX Das Kleinhirn (Cerebellum)**

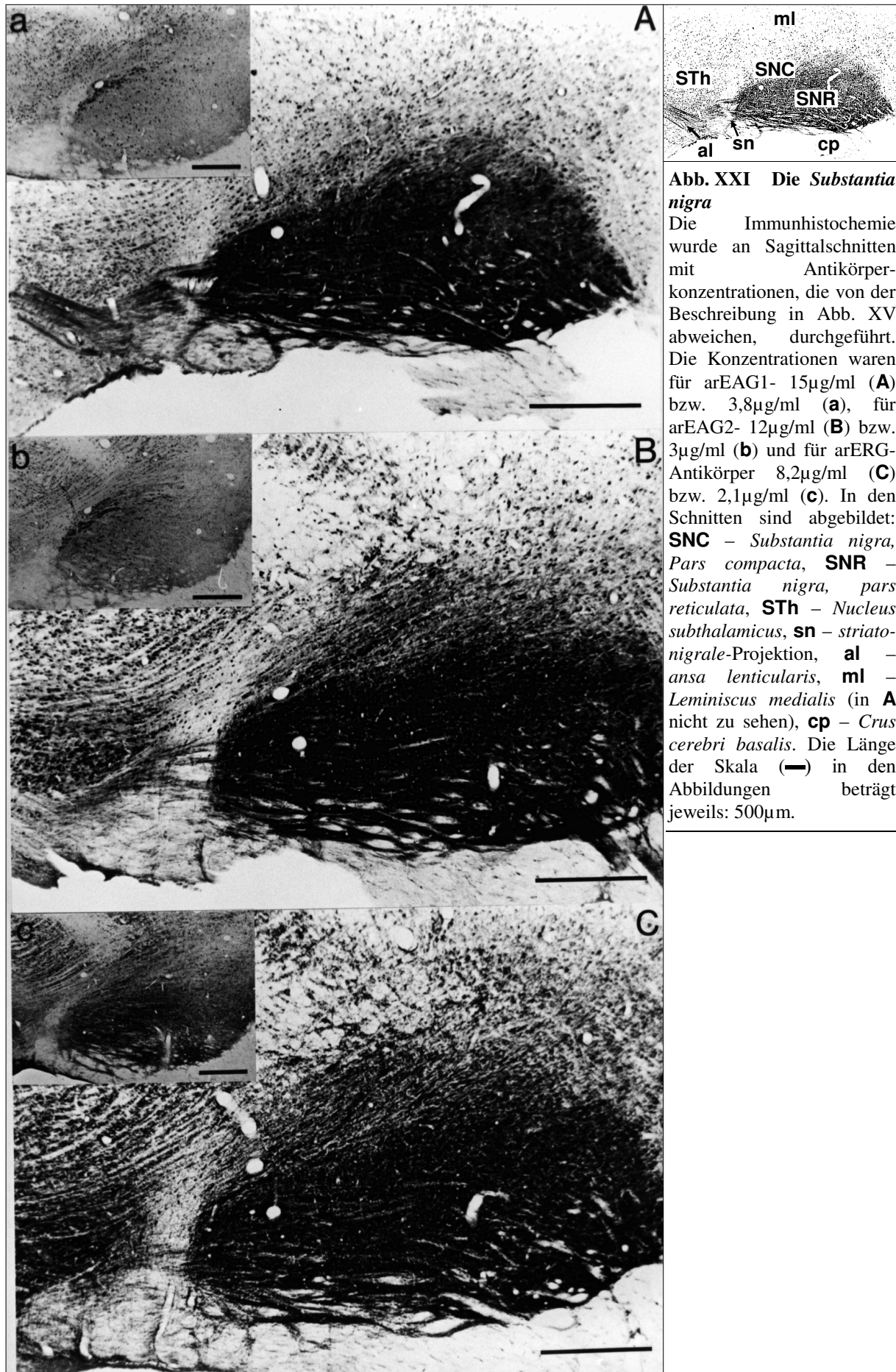
Die Immunhistochemie wurde an Sagittalschnitten, mit den arEAG1- (**A**), arEAG2- (**B**) und arERG-Antikörpern (**C**), durchgeführt wie für Abb. XV beschrieben. Gezeigt sind Schnitte durch die *Lobi II* und *III* aus dem *Lobus anterior* des *Cerebellums*. In den Schnitten sind abgebildet: **gcl** – Körnerzellschicht (*Stratum granulosum*), **pcl** – Purkinje-Zellschicht (*Stratum ganglionare*), **ml** – Molekularschicht (*Stratum moleculare*), **wm** – weiße Substanz. Die Länge der Skala (—) in den Abbildungen beträgt jeweils 250µm.

Im *Cerebellum* (Abb. XX) wird der Unterschied der Expression von von rEAG1 (**A**) und rEAG2 (**B**) gegenüber der rERG-Expression (**C**) vor allem im Kontrast der Färbung der *Purkinje*-Zellen deutlich. Der Unterschied zwischen der Expression von rEAG1 gegenüber rEAG2 ist weniger deutlich. In den Körnerzellen ist rEAG1 jedoch stärker exprimiert als rEAG2. Dies wird auch durch die stärkere immunhistochemische arEAG1-Färbung der Molekularschicht, wohin Parallelfasern, die Axone der Körnerzellen projizieren, deutlich. Die IHC-Färbung der Molekularschicht durch arERG beruht vor allem auf der Expression des Proteins in den Sternzellen, die in dieser Zellschicht liegen (vgl. Abb. XXIX, **A**).

Die IHC der *Substantia nigra* (Abb. XXI) wurde für die drei Proteine mit zwei verschiedenen Antikörperkonzentrationen durchgeführt. Es zeigt sich, daß die Expression, die mit den arEAG1- (**a**) und arEAG2-Antikörpern (**b**) detektiert wird, zunächst vor allem in den Zellkernen der *Substantia nigra, Pars compacta* (SNC) auftritt. Die Zellverteilung der SNC-Neuronen, deren Zellkerne gefärbt werden entspricht der Verteilung wie sie für die dopaminergen SNC-Neuronen bekannt ist<sup>120</sup>. Ein Teil dieser Neuronen, etwa 10%, befindet sich in der *Substantia nigra, Pars reticulata* (SNR) und wird als ventral-ausgelagerter-Anteil (*ventrally displaced*) dieser Neuronen bezeichnet. Erst bei einer höheren Konzentration der rEAG1- (**A**) und rEAG2-Antikörper (**B**) wird eine Färbung des Neuropils der SNR sichtbar. Zusammengenommen mit der Färbung, die dann auch in den Bereichen der *Ansa lenticularis* bzw. der *striato-nigralen* Projektionen sichtbar werden, deutet das auf eine axonale Lokalisation dieser Proteine. Auch das *Striatum* (nicht abgebildet) ist unter diesen Bedingungen deutlich stärker gefärbt. Die Somata und die Zellkerne der GABAergen SNR-Neurone werden in der IHC mit rEAG1- und rEAG2-Antikörpern kaum gefärbt.

Der deutliche Unterschied in der IHC-Färbung, wie bei unterschiedlichen Antikörperkonzentration gegen rEAG1 und rEAG2 in der *Substantia nigra* zu beobachten ist, ist für rERG nicht sichtbar (**C, c**). Auch die Färbung im Bereich der *Ansa lenticularis* bzw. der *striato-nigralen* Projektionen ist für rERG nicht (oder kaum) zu sehen.

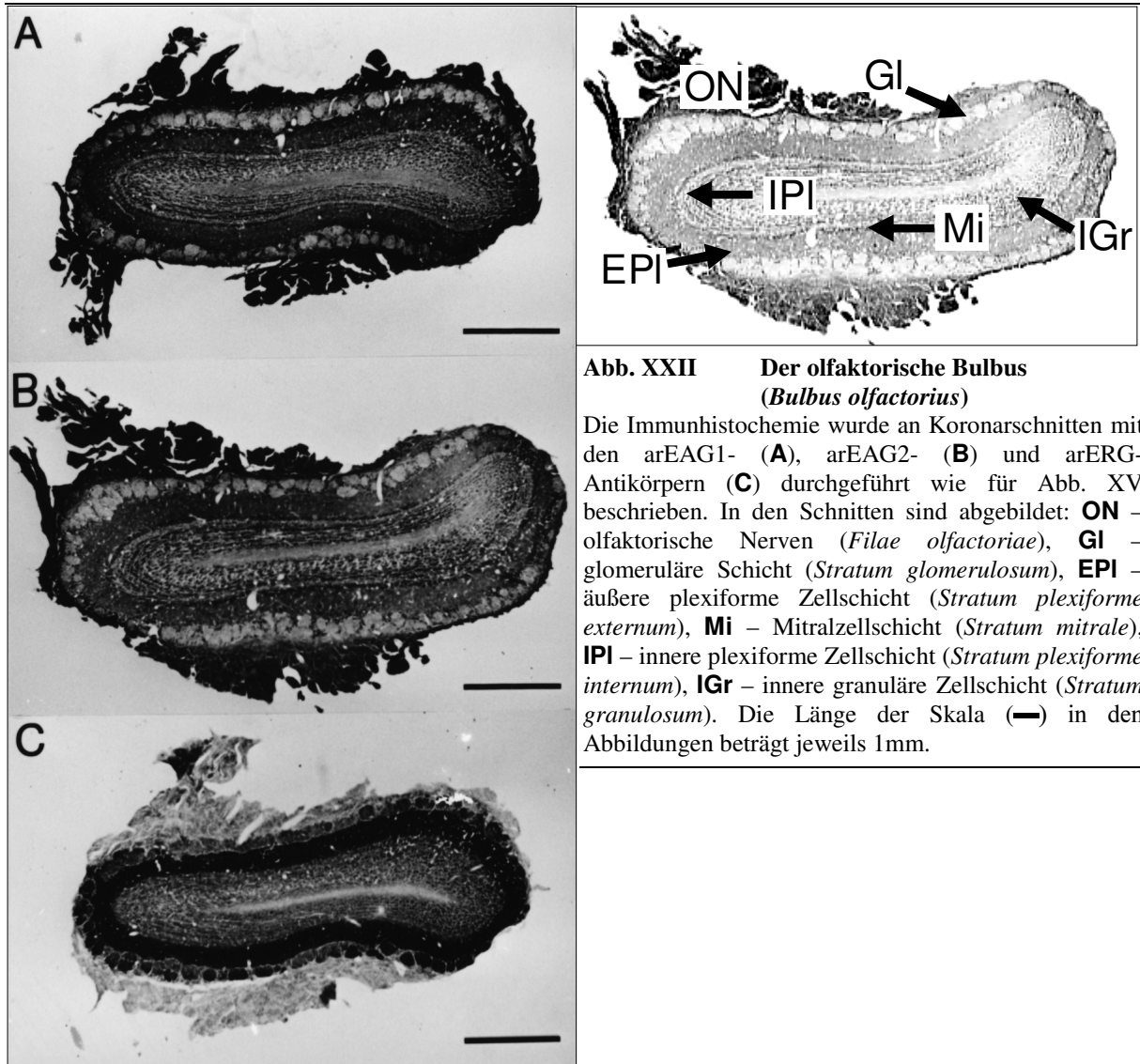




**Abb. XXI Die Substantia nigra**

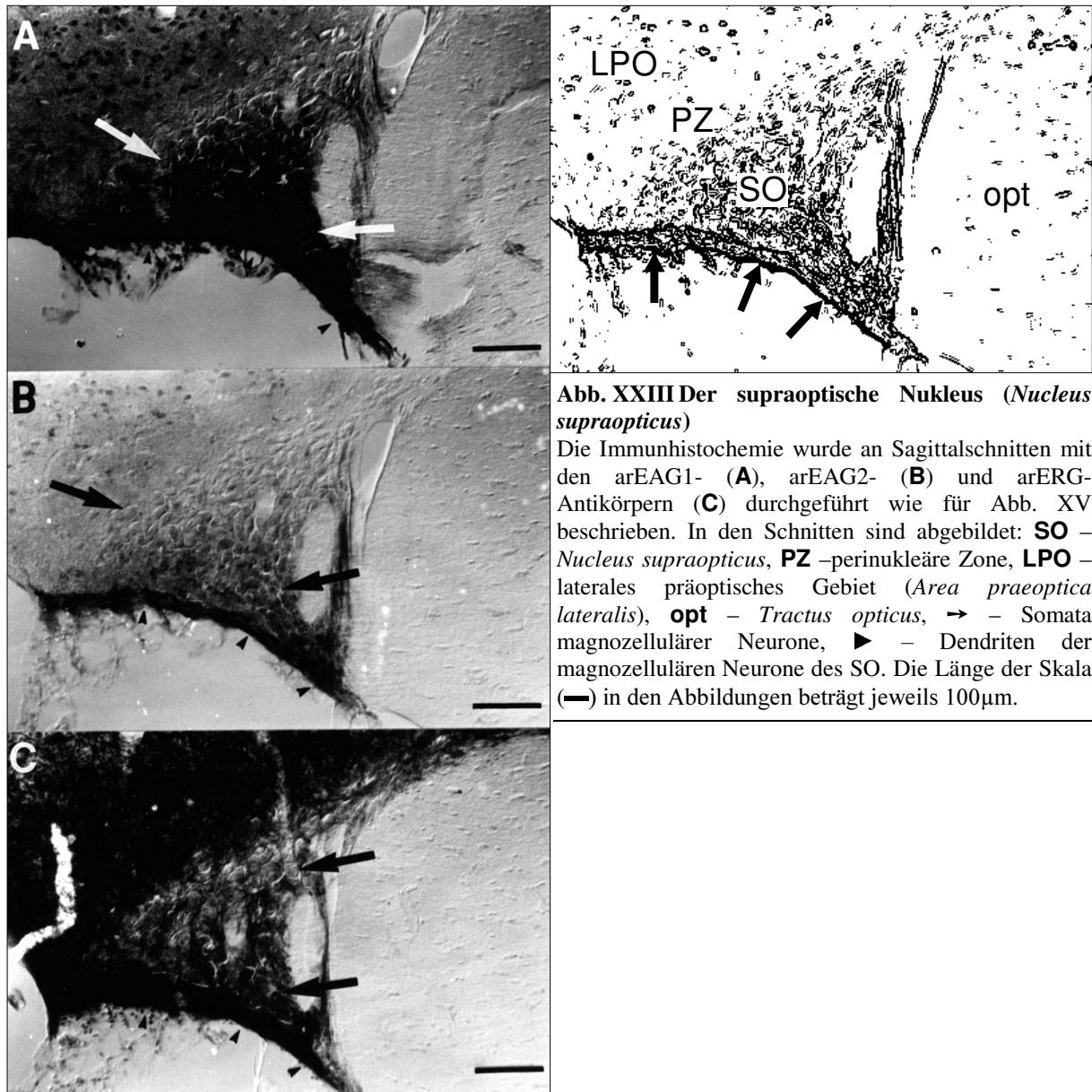
Die Immunhistochemie wurde an Sagittalschnitten mit Antikörperkonzentrationen, die von der Beschreibung in Abb. XV abweichen, durchgeführt. Die Konzentrationen waren für arEAG1- 15µg/ml (**A**) bzw. 3,8µg/ml (**a**), für arEAG2- 12µg/ml (**B**) bzw. 3µg/ml (**b**) und für arERG-Antikörper 8,2µg/ml (**C**) bzw. 2,1µg/ml (**c**). In den Schnitten sind abgebildet: **SNC** – Substantia nigra, Pars compacta, **SNR** – Substantia nigra, pars reticulata, **STh** – Nucleus subthalamicus, **sn** – striato-nigrale-Projektion, **al** – ansa lenticularis, **ml** – Leminiscus medialis (in **A** nicht zu sehen), **cp** – Crus cerebri basalis. Die Länge der Skala (—) in den Abbildungen beträgt jeweils: 500µm.

In den Abbildungen des *Bulbus olfactorius* (Abb. XXII) zeigt das axonale Gewebe der Riechnerven (*Filae olfactoriae*) eine deutliche Expression von rEAG1 und rEAG2, jedoch wenig (bis keine) Expression von rERG. Fast komplementär dazu die Färbung im *Stratum glomerulosum*. Das dendritische Geflecht der äußeren plexiformen Zellschicht (*Stratum plexiforme externum*) wiederum zeigt die stärkste rERG-Expression innerhalb des *Bulbus olfactorius*.



**Abb. XXII Der olfaktorische Bulbus (*Bulbus olfactorius*)**

Die Immunhistochemie wurde an Koronarschnitten mit den arEAG1- (**A**), arEAG2- (**B**) und arERG-Antikörpern (**C**) durchgeführt wie für Abb. XV beschrieben. In den Schnitten sind abgebildet: **ON** – olfaktorische Nerven (*Filae olfactoriae*), **GI** – glomeruläre Schicht (*Stratum glomerulosum*), **EPI** – äußere plexiforme Zellschicht (*Stratum plexiforme externum*), **Mi** – Mitralzellschicht (*Stratum mitrale*), **IPI** – innere plexiforme Zellschicht (*Stratum plexiforme internum*), **IGr** – innere granuläre Zellschicht (*Stratum granulosum*). Die Länge der Skala (—) in den Abbildungen beträgt jeweils 1mm.



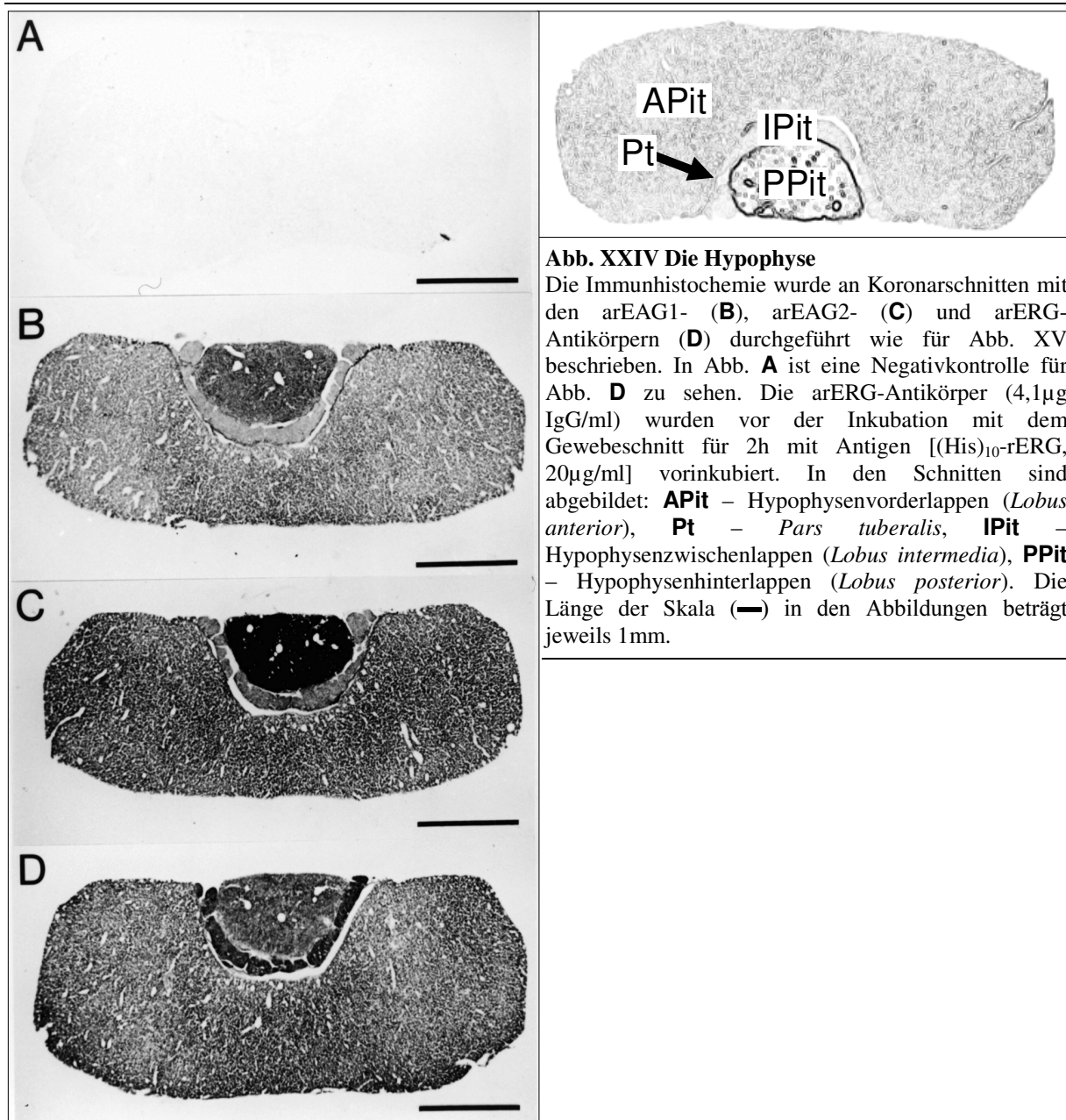
**Abb. XXIII Der supraoptische Nucleus (*Nucleus supraopticus*)**

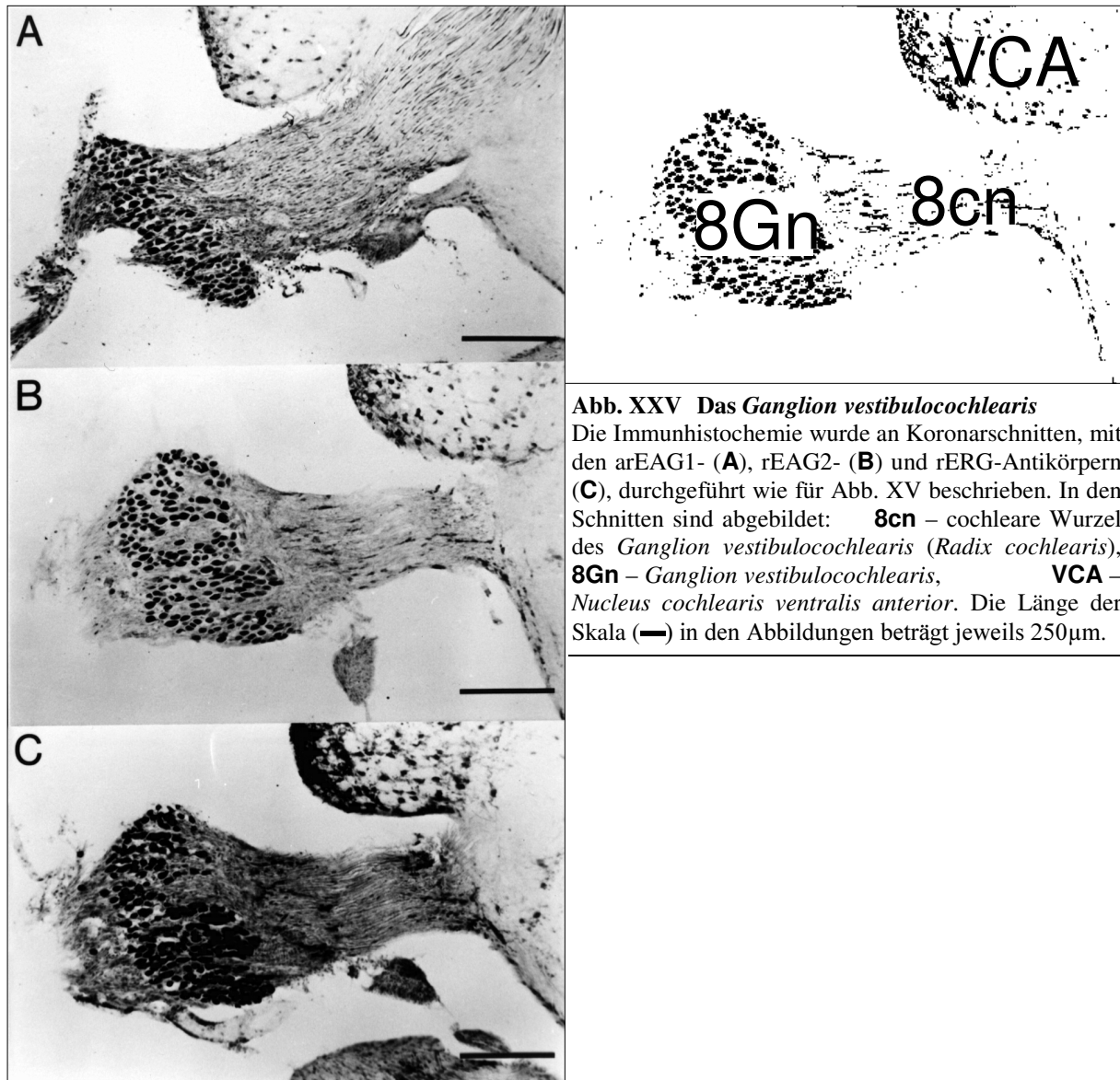
Die Immunhistochemie wurde an Sagittalschnitten mit den arEAG1- (A), arEAG2- (B) und arERG-Antikörpern (C) durchgeführt wie für Abb. XV beschrieben. In den Schnitten sind abgebildet: SO – *Nucleus supraopticus*, PZ – perinukleäre Zone, LPO – laterales präoptisches Gebiet (*Area praeoptica lateralis*), opt – *Tractus opticus*, → – Somata magnocellulärer Neurone, ► – Dendriten der magnocellulären Neurone des SO. Die Länge der Skala (—) in den Abbildungen beträgt jeweils 100μm.

Die Verteilung aller drei untersuchten Proteine ist in den magnocellulären Neuronen des *Nucleus supraopticus* (SO, Abb. XXIII) nicht gleichmäßig. Vielmehr unterliegt die Verteilung einem Gradienten, durch den die posteroventralen Neuronen (in der Abb. Unten rechts) stärker als die anterodorsalen Neuronen (Oben links) immunhistochemisch gefärbt werden. In den SO-Neuronen wird Oxytocin (OX) und Arginin-Vasopressin (AVP) synthetisiert. Dabei wird OX mehr in den anterodorsalen, AVP in den posteroventralen Neuronen produziert<sup>164,172</sup>. Die AVP-Immunreaktivität, vor allem der basalen Zellen, ist in den sich basal zum SO verzweigenden Dendriten des SO sehr stark<sup>164,172</sup>. Diese sind in Abb. XXIII durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Das Neuropil zeigt auch ein deutliches Vorhandensein der drei untersuchten Proteine. Die Färbung der Zellkerne, die die arEAG1- und arEAG2-Immunhistochemie im ZNS häufig dominiert, macht im SO nur einen geringen Anteil der Gesamtfärbung aus.



Die Axone der magnozellularären Neuronen des SO projizieren über den supraoptico-neurohypophysalen Trakt in den Hinterlappen der Hypophyse. In diesem Teil der Hypophyse, der Neurohypophyse, gelangen die im SO synthetisierten Proteine in große Axonterminale. Die Hypophyse (Abb. XXIV) zeigt ein sehr unterschiedliches Bild der Expression der untersuchten Proteine. Die Expression von rEAG1 (**B**) ist in der Neurohypophyse (PPit) nur wenig stärker als in der Adenohypophyse (APit). Im Zwischenlappen der Hypophyse (IPit) ist nur sehr wenig arEAG1-Immunreaktivität sichtbar. Die arEAG2-Immunreaktivität (**C**) ist insgesamt höher und vor allem in der PPit besonders hoch. Mit den arEAG2-Antikörpern wird dort die stärkste Immunreaktivität des gesamten untersuchten Gewebes gefunden. Die Expression von rERG (**D**) wiederum, ist im Zwischenlappen am stärksten ausgeprägt.

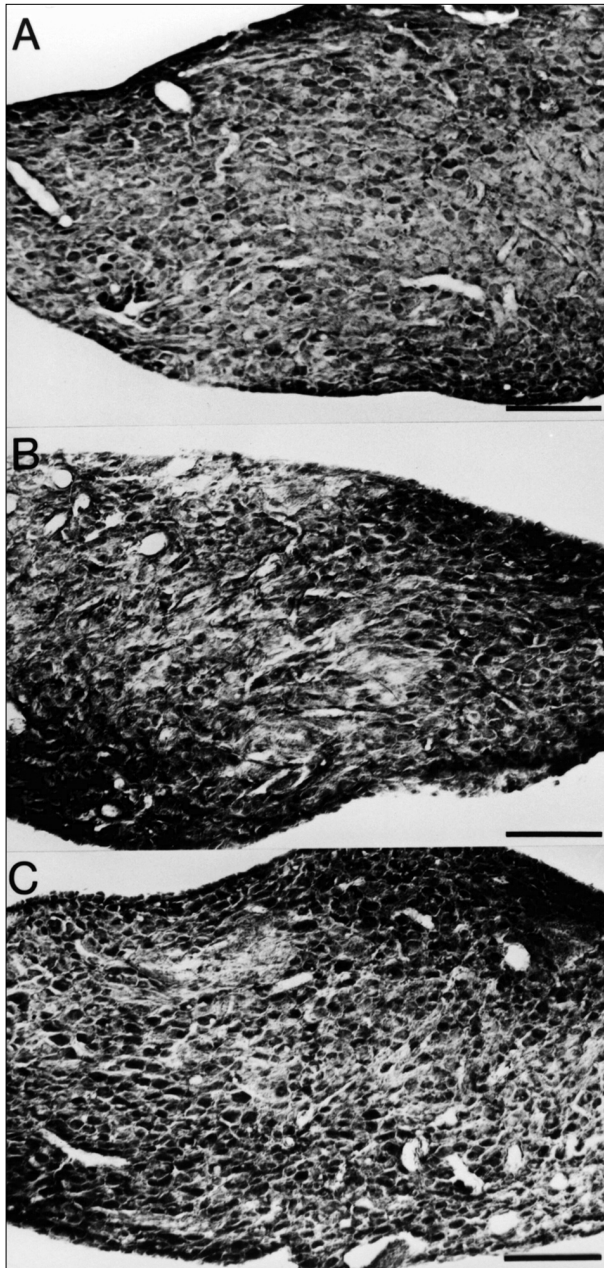




**Abb. XXV Das Ganglion vestibulocochlearis**

Die Immunhistochemie wurde an Koronarschnitten, mit den arEAG1- (A), rEAG2- (B) und rERG-Antikörpern (C), durchgeführt wie für Abb. XV beschrieben. In den Schnitten sind abgebildet: **8cn** – cochleare Wurzel des Ganglion vestibulocochlearis (*Radix cochlearis*), **8Gn** – Ganglion vestibulocochlearis, **VCA** – *Nucleus cochlearis ventralis anterior*. Die Länge der Skala (—) in den Abbildungen beträgt jeweils 250μm.

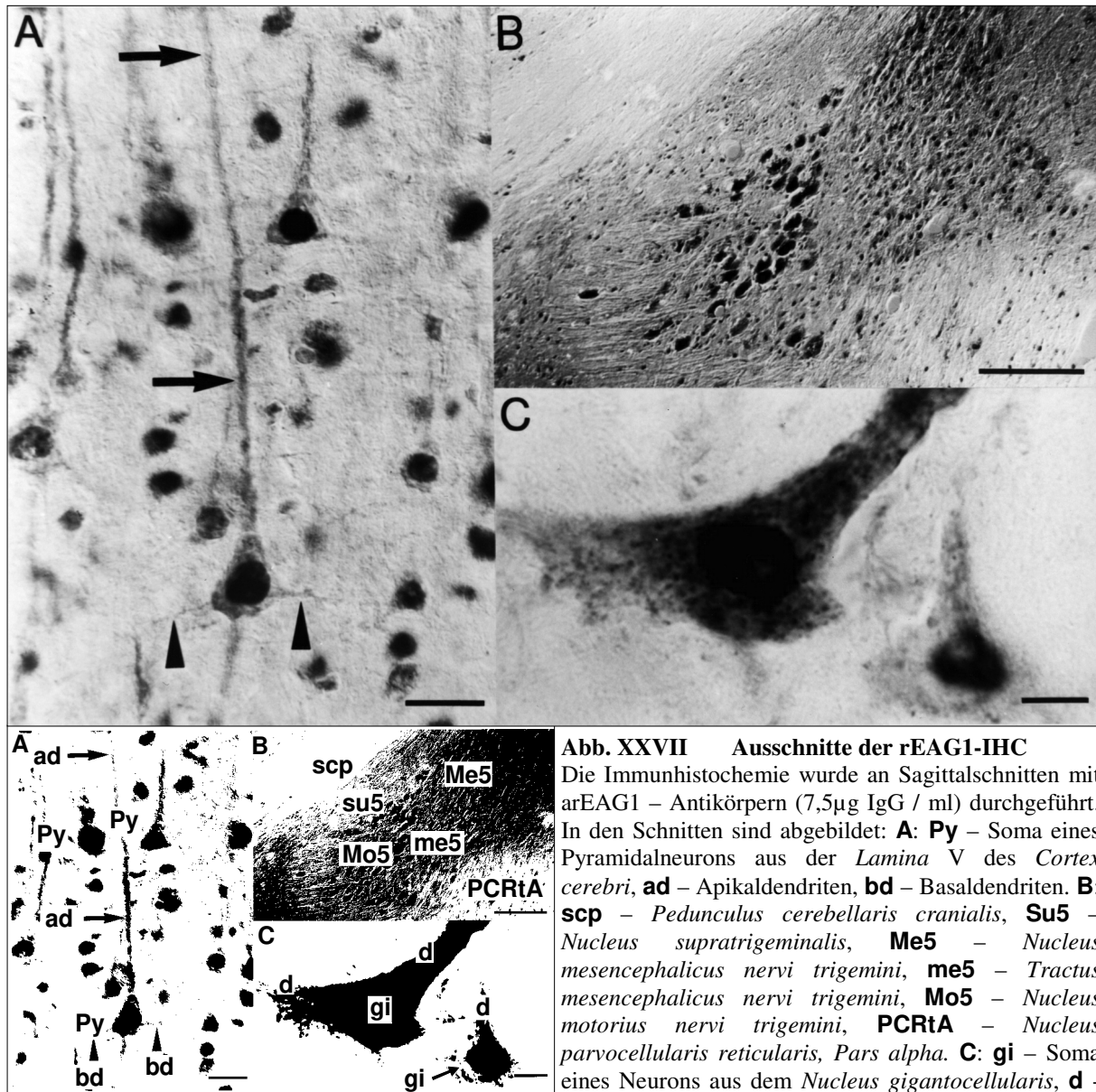
In der Abb. XXV und der Abb. XXVI sind zwei Nervenknoten (Ganglien), die außerhalb des zentralen Nervensystems liegen, das *Ganglion cervicale superior* (SCG) und das *Ganglion vestibulocochlearis* (8Gn) zu sehen. Die Verteilung der drei Proteine innerhalb eines Ganglions ist sehr ähnlich, während die Expression zwischen den Ganglien recht unterschiedlich ist. Im 8Gn sind die drei Proteine auf den Zellen und in den Bahnen der cochlearen Wurzel zu erkennen, was einer axonalen Lokalisation der Proteine entspricht. Im SCG werden durch die Antikörper die Zellen und das dendritische Neuropil gefärbt. Dies entspricht einer somatodendritischen Lokalisation der Proteine.



**Abb. XXVI Das *Ganglion cervicale superior***

Die Immunhistochemie wurde, mit den arEAG1- (**B**), arEAG2- (**C**) und arERG-Antikörpern (**D**), durchgeführt wie für Abb. XV beschrieben. Die Länge der Skala (—) in den Abbildungen beträgt jeweils 250 $\mu$ m.

Die immunhistochemische Färbung der Zellkerne, die in Zellen des ZNS durch die arEAG1- und arEAG2-Antikörper generiert wird, tritt in den Ganglien nicht (oder kaum) auf. Im 8Gn ist dies, durch die starke Schwärzung der Zellkörper nicht eindeutig zu identifizieren.

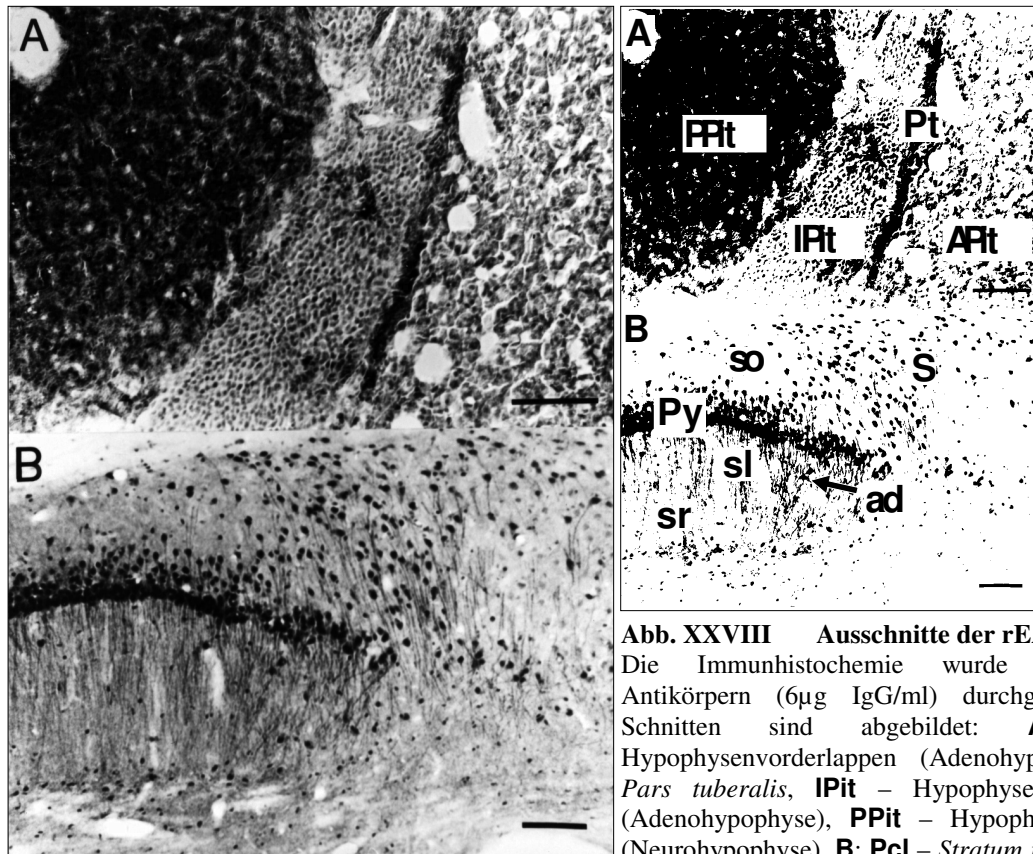


**Abb. XXVII Ausschnitte der rEAG1-IHC**

Die Immunhistochemie wurde an Sagittalschnitten mit arEAG1 – Antikörpern (7,5µg IgG / ml) durchgeführt. In den Schnitten sind abgebildet: **A:** **Py** – Soma eines Pyramidalneurons aus der *Lamina V* des *Cortex cerebri*, **ad** – Apikaldendriten, **bd** – Basaldendriten. **B:** **scp** – *Pedunculus cerebellaris cranialis*, **Su5** – *Nucleus supratrigeminalis*, **Me5** – *Nucleus mesencephalicus nervi trigemini*, **me5** – *Tractus mesencephalicus nervi trigemini*, **Mo5** – *Nucleus motorius nervi trigemini*, **PCRtA** – *Nucleus parvocellularis reticularis, Pars alpha*. **C:** **gi** – Soma eines Neurons aus dem *Nucleus gigantocellularis*, **d** – Dendrit. Die Länge der Skala (—) in den Abbildungen beträgt in **A:** 25µm, in **B:** 250µm und in **C:** 10µm

Die Ausschnitte der rEAG1-IHC (Abb. XXVII) verdeutlichen noch einmal, daß das IHC-Signal in Zellkernen auftritt. Sowohl die Pyramidenzellen der corticalen *Lamina V* (**A**), als auch die gezeigten Zellen des gigantozellularen Feldes (**C**) zeigen eine immunhistochemische Färbung des Zellkerns. Trotzdem sind in diesen Zellen auch die Membranen, der von den Zellkörpern abgehenden Dendriten, positiv für rEAG1. Bei den Pyramidenzellen ist eine Färbung sowohl der Apikaldendriten (Pfeile) als auch der Basaldendriten (Pfeilspitzen) zu sehen.

In der Abb. **B** sind die Kerne der Zellen des *Nucleus mesencephalicus nervi trigemini* (**Me5**) wiederum deutlich stärker gefärbt als die Zellmembran. Für die Zellen des *Nucleus motorius nervi trigemini* (**Mo5**) gilt dies allerdings nicht. Hier tritt die Färbung der Zellmembranen deutlich hervor.

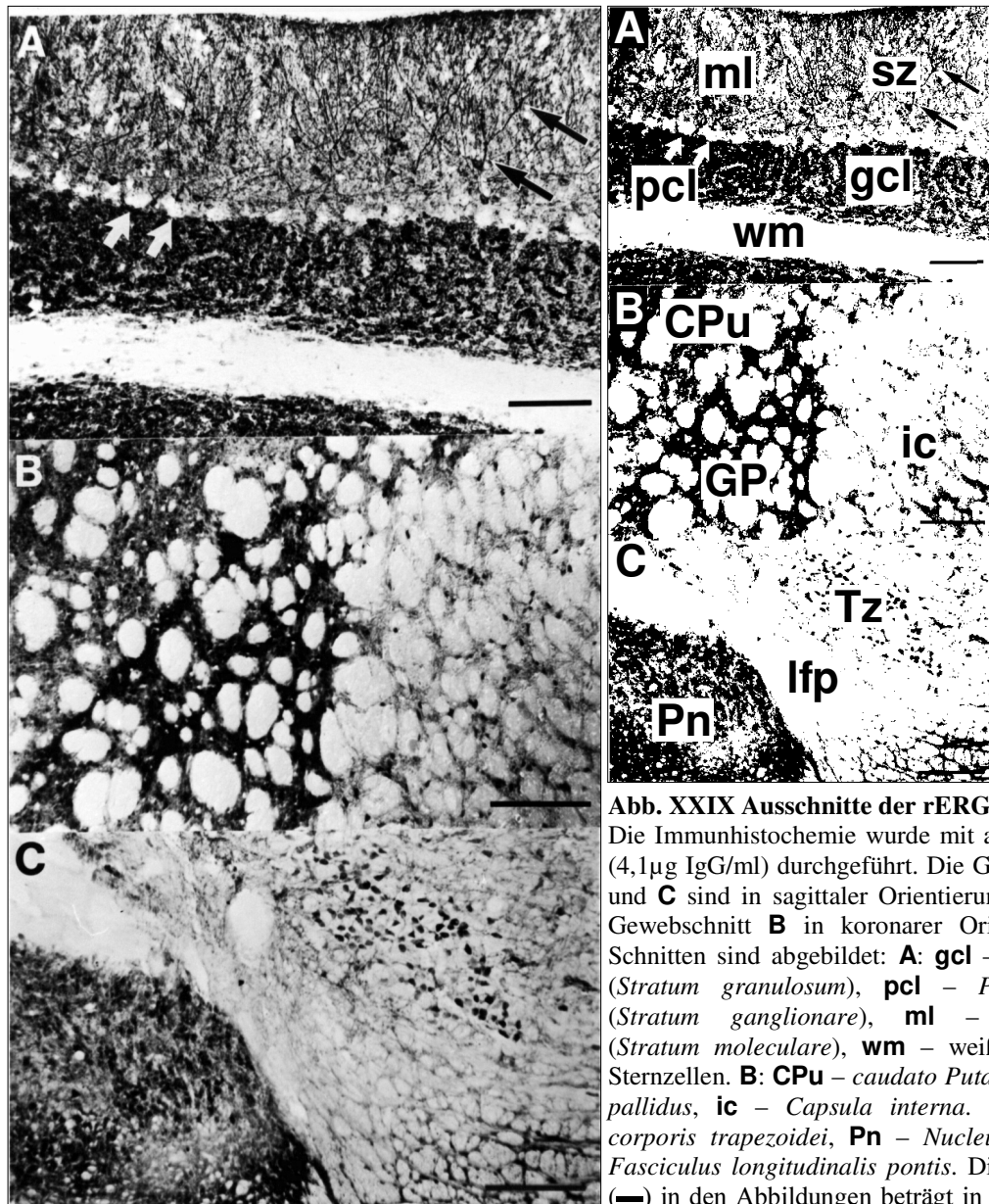


**Abb. XXVIII** Ausschnitte der rEAG2-IHC

Die Immunhistochemie wurde mit arEAG2-Antikörpern (6µg IgG/ml) durchgeführt. In den Schnitten sind abgebildet: **A:** **APit** – Hypophysenvorderlappen (Adenohypophyse), **Pt** – *Pars tuberalis*, **IPit** – Hypophysenzwischenlappen (Adenohypophyse), **PPit** – Hypophysenhinterlappen (Neurohypophyse). **B:** **Pcl** – *Stratum pyramidale*, **so** –

*Stratum oriens*, **sl** – *Stratum lucidum*, **sr** – *Stratum radiatum*, **ad** – Apikaldendriten der Pyramidenzellen des CA1-Feldes des Hippocampus. Die Länge der Skala (—) in den Abbildungen beträgt jeweils 100µm.

Die Ausschnitte der rEAG2-IHC (Abb. XXVIII) zeigen einen Anteil der Hypophyse (**A**) und des hippocampalen CA1-Feldes und des Subiculums (**B**). Die Neurohypophyse ist das Areal des untersuchten Gewebes, das die stärkste arEAG2-Immunreaktivität zeigt. Während die arEAG2 Immunreaktivität in den Pyramidenzellen des Hippocampus und in den Zellen des Subiculums eine Färbung des Kerns und der Apikaldendriten erkennen läßt, ist in der Hypophyse eine Färbung des Neuropils zu erkennen.



**Abb. XXIX** Ausschnitte der rERG-IHC

Die Immunhistochemie wurde mit arERG-Antikörpern (4,1µg IgG/ml) durchgeführt. Die Gewebsschnitte in **A** und **C** sind in sagittaler Orientierung angefertigt. Der Gewebsschnitt **B** in koronarer Orientierung. In den Schnitten sind abgebildet: **A**: **gcl** – Körnerzellschicht (*Stratum granulosum*), **pcl** – *Purkinje*-Zellschicht (*Stratum ganglionare*), **ml** – Molekularschicht (*Stratum moleculare*), **wm** – weiße Substanz, **sz** - Sternzellen. **B**: **CPu** – *caudato Putamen*, **GP** – *Globus pallidus*, **ic** – *Capsula interna*. **C**: **Tz** – *Nucleus corporis trapezoidei*, **Pn** – *Nucleus pontinus*, **lfp** – *Fasciculus longitudinalis pontis*. Die Länge der Skala (—) in den Abbildungen beträgt in **A** 100µm sowie in **B** und **C** 250µm

Die Ausschnitte der rERG-IHC (Abb. XXIX) zeigen eine Färbung der Sternzellen in der Molekularschicht des Cerebellums (schwarze Pfeile, **A**) und die Abwesenheit einer Färbung der *Purkinje*-Zellen (weiße Pfeile, **A**). In Abb. XXIX **B** wird deutlich, daß rERG in den Bahnen des Frontalhirns, die in dieser Schnittebene als runde Strukturen sichtbar sind, nicht vorkommt. In Abb. XXIX **C** ist die rERG-Expression im *Nucleus corporis trapezoidei* (**Tz**) und *Nucleus pontinus* (**Pn**) zu sehen. Im Gegensatz zur Expression in den meisten Arealen des ZNS, wo das Neuropil gegenüber den Somata hervortritt, werden hier, vor allem im **Tz**, durch die IHC mit den arERG-Antikörpern die Somata deutlich gefärbt.

Eine komplette Auswertung der Ergebnisse der IHC für rEAG1, rEAG2 und rERG ist in Abschnitt 4.8 in Tab. III aufgeführt.



## 4.8 Tabellarische Auswertung der arEAG1, arEAG2 und rERG IHC-Signale im ZNS

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die, in der arEAG1-, arEAG2- und arERG-Immunhistochemie bestimmte Verteilung der Expression der Proteine rEAG1, rEAG2 und rERG des zentralen Nervensystems der Ratte.

	rEAG 1		rEAG 2		rERG	
	Zellen	Neuropil	Zellen	Neuropil	Zellen	Neuropil
<b>Hirnareal</b>						
<b>I. Prosencephalon</b>						
<i>A Areae olfactorius</i>						
1 <i>Bulbus olfactorius</i>						
<i>Stratum glomerulosum</i>	++	++	+++	++	+++	++
<i>Stratum plexiforme externum</i>	○	+++	+	+++	○	+++
<i>Stratum mitrale</i>	+	++	+++	+++	+	○
<i>Stratum fibrosum internum</i>	+++	++	+++	++	++	++
<i>Stratum granulosum</i>	+++	++	+++	++	+++	+++
2 <i>Nucleus olfactorius anterior</i>						
	++	++	++	++	++	+++
3 <i>Bulbus olfactorius accessorius</i>						
<i>Stratum glomerulosum</i>	+++	+++	+++	++	+	+++
<i>Stratum granulosum</i>	+	++	+++	+	++	+++
<b>B Septum</b>						
1 <i>Nucleus lateralis</i>						
<i>Pars dorsalis</i>	+++	+++	+	+++	○	+++
<i>Pars medialis</i>	○	–	+	○	–	○
<i>Pars ventralis</i>	○	+	+	+	○	+
2 <i>Nucleus medialis</i>						
3 <i>Nucleus septohippocampalis</i>						
4 Subfornikalorgan						
	+++	+++	++	++	+++	+++
<b>C Cortex cerebri</b>						
1 <i>Cortex parietalis (Par1)</i>						
<i>Lamina I</i>	–	+++	–	++	–	+++
<i>Lamina II</i>	++	++	++	++	++	+++
<i>Lamina III</i>	++	++	++	++	++	+++
<i>Lamina IV</i>	++	+	++	+	+	+
<i>Lamina V</i>	++	+	++	+	+++	+
<i>Lamina VI</i>	++	+	++	+	++	+
2 <i>Cortex perirhinalis</i>						
	++	++	++	++	++	+++
3 <i>Cortex piriformis</i>						
	++	++	+++	++	+++	+++

Hirnareal	rEAG 1		rEAG 2		rERG	
	Zellen	Neuropil	Zellen	Neuropil	Zellen	Neuropil
<b>D Hippocampus</b>						
<b>1 Regio CA1</b>						
<i>Stratum lacunosum-moleculare</i>	+	++	○	++	-	+++
<i>Stratum radiatum</i>	-	+	○	○	+	○
<i>Stratum pyramidalis</i>	+++	++	+	+	+++	+++
<i>Stratum oriens</i>	+	++	+	++	-	+++
<b>2 Regio CA2</b>						
<i>Stratum lacunosum-moleculare</i>	+	++	○	++	-	+++
<i>Stratum radiatum</i>	-	+	○	○	+	+
<i>Stratum pyramidalis</i>	+++	++	+	+	+++	+++
<i>Stratum oriens</i>	+	++	+	++	-	+++
<b>3 Regio CA3</b>						
<i>Stratum lacunosum-moleculare</i>	+	++	○	++	-	++
<i>Stratum radiatum</i>	-	+	○	○	+	+
<i>Stratum pyramidalis</i>	+++	++	+++	++	+++	++
<i>Stratum oriens</i>	+	++	+	++	-	++
<b>4 Gyrus dentate</b>						
<i>Stratum moleculare</i>	○	+++	-	+	-	++++
<i>Stratum granulosum</i>	++	+++	+++	++	+++	+++
<i>Stratum multiforme</i>	++	++	+	++	+	++
<b>5 Area entorhinalis</b>						
<i>Lamina I</i>	○	++	○	++	-	+++
<i>Lamina II</i>	+++	+	+++	++	+	++
<i>Lamina III</i>	++	+	++	+	+	+
<i>Lamina IV-VI</i>	++	+	+	+	++	+
<b>6 Subiculum</b>						
	+++	+	+++	+	++	++
<b>7 Praesubiculum</b>						
	++	+	++	+	++	+
<b>8 Indusium griseum</b>						
	+++	+++	+++	+++	○	+++
<b>E Formatio amygdaloidea</b>						
<b>1 Nucleus medialis amygdalae</b>						
	++	+	+	+	-	+++
<b>2 Nucleus centralis amygdalae</b>						
	+	+	+	+	-	+++
<b>3 Nucleus tractus olfactorius lateralis</b>						
<i>Lamina I</i>	○	++	-	++	-	++
<i>Lamina II</i>	++	++	+	+	++	++
<i>Lamina III</i>	++	+	++	+	++	+
<b>4 Nucleus basolateralis</b>						
	++	+	++	+	-	++
<b>5 Area amygdalohippocampalis</b>						
	++	++	++	++	○	+++



Hirnnareal	rEAG 1		rEAG 2		rERG	
	Zellen	Neuropil	Zellen	Neuropil	Zellen	Neuropil
<b>F Basalganglien</b>						
<b>1 Striatum</b>						
<i>caudato Putamen</i>	++	+	++	+	+	++
<i>Fundus striati</i>	++	+	++	+	+	+++
Calleja-Inseln	++	++	+++	+	+++	++
Calleja-Hauptinsel	+	++	+++	+	++	+
<b>2 Pallidum</b>						
<i>Globus pallidus</i>	+	+	++	+	+	+
<i>Nucleus entopeduncularis</i>	+	+	++	+	+	+
<i>Substantia Nigra, Pars reticulata rostralis</i>	+	+	++	++	○	++
<i>Substantia Nigra, Pars reticulata dorsalis</i>	+	+	++	++	○	++
<b>3 Substantia nigra, Pars compacta</b>						
<i>Substantia nigra lateralis</i>	+	+	++	+	○	++
<i>Area tegmentalis ventralis</i>	+	+	++	+	+	++
<i>Nucleus paranigralis</i>	+	+	++	+	○	++
<b>4 Claustrum</b>						
	++	+	++	+	+	+
<b>5 Nucleus endopiriformis dorsalis</b>						
	++	+	++	+	++	+
<b>G Hypothalamus</b>						
<b>1 Area praeoptica</b>						
<i>Nucleus periventricularis praeoptica</i>	++	+++	++	++	○	++
<i>Nucleus commissuralis anterior</i>	++	+	++	+	○	++
<i>Nucleus praeopticus magnocellularis</i>	++	+	++	+	+	+
<b>2 Area anterioris</b>						
<i>Nucleus periventricularis anterior</i>	++	+	++	++	○	+
<i>Nucleus paraventricularis</i>	++	+	++	++	+	+++
<i>Nucleus suprachiasmaticus</i>	++	++	++	++	++	+
<i>Nucleus area hypothalami anterior</i>	++	+	++	+	+	++
<i>Nucleus supraopticus</i>	+++	+++	+++	+++	○	+
<i>Area hypothalami lateralis</i>	++	+	+	+	++	+
<b>3 Tuber cinereum</b>						
<i>Nucleus periventricularis intermedialis</i>	++	+++	+	++	○	++
<i>Nucleus arcuatus</i>	+++	+++	++	++	+	+++
<i>Nucleus dorsomedialis</i>	++	++	++	+	+	+
<i>Nucleus lateralis magnocellularis</i>	++	+	++	○	-	+
<i>Area lateralis hypothalami</i>	+	+	+	○	+	+

Hirnareal	rEAG 1		rEAG 2		rERG	
	Zellen	Neuropil	Zellen	Neuropil	Zellen	Neuropil
<b>4 Corpora mamillaris</b>						
<i>Nucleus periventricularis posterior</i>	++	+	+	+	+	++
<i>Nucleus tuberomamillaris</i>	++	+	+++	++	○	++
<i>Nucleus supramamillaris</i>	++	++	++	+	○	++
<i>Nucleus mamillaris lateralis</i>	++	+	+	++	○	++
<b>5 Zona incerta</b>						
<i>Zona incerta dorsalis</i>	++	+	+	+	○	+
<i>Zona incerta ventralis</i>	+	+	+	+	○	+
<b>6 Eminentia mediana</b>						
	++	+++	+	++	○	+++
<b>H Thalamus</b>						
<b>1 Nuclei anterior thalami</b>						
<i>Nucleus anteriodorsalis</i>	++	+	++	+	+	++
<b>2 Nuclei lateralis thalami</b>						
<i>Nucleus angularis</i>	++	+	++	+	+	+
<i>Nucleus lateroposterior</i>	++	+	++	+	+	+++
<b>3 Nuclei ventrali thalami</b>						
<i>Nucleus ventralis posteromedialis</i>	++	+	++	+	+	+
<i>Nucleus ventralis posterior</i>	++	+	++	+	+	+
<i>Nucleus gustatorius</i>	++	+	++	+	+	++
<b>4 Nuclei mediale thalami</b>						
<i>Nucleus paraventricularis</i>	++	+	++	+	+	++
<i>Nucleus interstitialis rostralis</i>	++	+	++	+	+	+
<i>Nucleus intermediodorsalis</i>	++	+	++	+	+	+
<i>Nucleus centromedianus</i>	++	+	++	+	+	++
<i>Nucleus rhomboideus</i>	++	+	++	+	+	+
<b>5 Nuclei intralaminare thalami</b>						
<i>Nucleus centrolateralis</i>	++	+	++	+	+	+
<i>Nucleus parafascicularis</i>	++	+	++	+	+	+
<b>6 Corpus geniculatum medium</b>						
<i>Pars dorsalis</i>	++	+	++	+	+	+
<i>Pars medialis</i>	++	+	++	+	+	+
<i>Pars ventralis</i>	++	+	++	+	+	+
<b>7 Corpus geniculatum lateralis</b>						
<i>Pars dorsalis</i>	++	++	++	+	+	++
<i>Pars ventralis</i>	++	++	++	+	○	++
<i>Nucleus subgeniculatus</i>	++	+	++	+	+	+
<b>8 Nucleus reticulari thalami</b>						
	++	+	++	+	○	+
<b>I Epithalamus</b>						
1 <i>Nucleus medialis habenulae</i>	++	++	++	++	○	+
2 <i>Nucleus lateralis habenulae</i>	○	○	+	+	+	+

Hirnareal	rEAG 1		rEAG 2		rERG	
	Zellen	Neuropil	Zellen	Neuropil	Zellen	Neuropil
<b>II. Rhombencephalon</b>						
<i>A sensorisch</i>						
<b>1 visuell</b>						
<i>Area praetectalis</i>						
<b>i</b> <i>Nucleus olivari praetectalis</i>	+	+	++	+	+	○
<b>ii</b> <i>Nucleus tractus opticus</i>	++	+	++	+	+	○
<b>iii</b> <i>Nucleus praetectalis anteriodorsalis</i>	+++	+	++	+	++	○
<i>Nucleus terminalis medialis Tractus opticus accessorii</i>	++	+	++	++	+	+
<i>Colliculus cranialis</i>						
<b>i</b> <i>Stratum zonale cranialis</i>	+	+++	++	+++	–	+++
<b>ii</b> <i>Stratum griseum superficiale</i>	++	+++	++	+++	○	+++
<b>iii</b> <i>Stratum opticum</i>	+++	++	++	++	+	++
<b>iv</b> <i>Stratum griseum medium</i>	++	++	+++	++	+	++
<b>v</b> <i>Stratum medullare medium</i>	+	+	++	+	+	+
<b>vi</b> <i>Stratum griseum profundum</i>	++	+	++	+	+	+
<b>vii</b> <i>Stratum medullare profundum</i>	+	+	+	+	+	+
<b>2 somatosensorisch</b>						
<i>Nucleus mesencephalicus nervi trigemini</i>	+++	+	++	++	+++	+
<i>Nucleus pontinus principalis nervi trigemini</i>	+	+	+++	○	○	+++
<i>Nucleus gracilis</i>	+	+	+	+	+	+++
<i>Nucleus cuneatus</i>	+	+	++	+	++	+++
<b>3 motorisch</b>						
<i>Nucleus ruber</i>						
<b>i</b> <i>pars magnocellularis</i>	++	+	++	+	++	++
<b>ii</b> <i>pars parvocellularis</i>	+++	+	++	+	++	++
<i>Nucleus pontinus</i>	+++	++	++	++	+	+++
<i>Nucleus nervi oculomotorii</i>	+++	+	++	++	+	++
<i>Nucleus accessorius nervi oculomotorii</i>	++	+	+	++	+	+++
<i>Edinger–Westphal</i>	++	+	+	++	+	+++
<i>Nucleus nervi trochlearis</i>	+	+	++	+	+	++
<i>Nucleus motorius nervi trigemini</i>	+++	+	+++	+	++	+
<i>Nucleus abducentis</i>	○	+	+	○	○	+
<i>Nucleus facialis</i>	+++	++	++	+	+	○
<b>4 auditorisch</b>						
<i>Nucleus cochlearis</i>						
<b>i</b> <i>dorsalis</i>	++	+++	++	+++	++	+++
<b>ii</b> <i>ventralis</i>	++	+	++	+	++	+
<i>Nucleus corporis trapezoidei</i>	+	+	++	+	+++	+
<i>Oliva superior lateralis</i>	○	○	○	○	○	○
<i>Nucleus leminisci lateralis ventralis</i>	+	+	+		++	++

	rEAG 1		rEAG 2		rERG	
	Zellen	Neuropil	Zellen	Neuropil	Zellen	Neuropil
<b>Hirnareal</b>						
<i>Colliculus caudalis</i>						
i	Cortex externae colliculus caudalis	+	+	+	+	+
ii	Nucleus brachialis colliculus caudalis	+	+	+	+	++
	Nucleus subbrachialis	+	+	+	+	○
<b>5 vestibulär</b>						
i	Nucleus medialis	+	+++	++	+	+++
ii	Nucleus lateralis	+	+	++	+	+
	Nucleus Y	++	++	++	+	++
	Nucleus praepositus hypoglossi	++	+++	++	++	+++
<b>6 visceral</b>						
	Nucleus parabrachialis lateralis	+++	+	++	++	○
	Nucleus parabrachialis medialis	+++	+	++	++	○
<b>B Formatio reticularis</b>						
<b>1 Griseum centralis</b>						
	Nucleus tegmentalis anterior	+++	++	++	++	+
	Nucleus tegmentalis dorsalis					
i	centralis	++	++	++	+++	+
ii	pericentralis	++	++	++	+++	+
<b>2 Nuclei raphe</b>						
	Nucleus linearis caudalis	++	++	++	+	○
	Nucleus raphe dorsalis	+++	++	+++	++	+
	Nucleus raphe caudalis	+++	++	+++	+	+
<b>3 Area interpeduncularis</b>						
	Nucleus interfascicularis	++	+++	++	+++	+
	Nucleus interpeduncularis	++	+++	++	+++	+
<b>4 Formatio reticularis pontis paramedians</b>						
	Nucleus cuneatus	++	++	++	++	++
	Nucleus reticularis tegmenti pontis	+	+	+	+	+
	Nucleus reticularis pontis oralis	++	+	+	+	+
	Nucleus reticularis gigantocellularis	++	+	++	+	+
<b>III. Cerebellum</b>						
<b>A Nuclei cerebellares</b>						
		+	+	+	+	++
<b>B Cortex cerebelli</b>						
<b>1 Stratum moleculare</b>						
		+	++++	++	++	○
<b>2 Stratum ganglionare</b>						
		+	+++	+	+	+
<b>3 Stratum granulosum</b>						
		+++	○	++	○	++
	Körnerzellen	+++	○	++	○	++
	Golgi-Zellen	++	○	+	○	++

Hirnareal	rEAG 1		rEAG 2		rERG	
	Zellen	Neuropil	Zellen	Neuropil	Zellen	Neuropil
<b>IV. Hypophyse</b>						
<i>A Lobus posterior</i>	+++	+++	+++	++++	+	++
<i>B Lobus anterior</i>	+++	++	+++	++	+++	+
<i>C Lobus intermedia</i>	+++	+++	++	++	++	++

**Tab. III Die immunhistochemischen Signale von rEAG1, rEAG2 und rERG im ZNS der Ratte**

Beschreibung der immunhistochemischen Signale: ++++ – die für das Antigen stärkste Anfärbung des untersuchten Gewebes; +++ – starkes immunhistochemisches Signal; ++ – deutliches immunhistochemisches Signal; + – schwaches immunhistochemisches Signal; ○ – sehr geringes oder nicht eindeutig identifizierbares Signal; – – kein Signal.

## 5 Diskussion

### 5.1 rEAG2

Die rEAG2-Aminosäuresequenz läßt die Einordnung des Proteins in die Strukturklasse der Kaliumkanäle mit sechs Transmembransegmenten, intrazellulärem Amino- und Carboxyterminus, Spannungssensor in der vierten Transmembranregion und einer Porenregion, die größtenteils durch ein hydrophobes Segment zwischen der fünften und sechsten Transmembranregion gebildet wird, zu.

Das rEAG2-Protein ist mit einer Sequenzlänge von 988 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 111.724Da ein typischer Vertreter der *eag*-Genfamilie. Der sich über etwa 500 Aminosäuren erstreckende, konservierte Bereich der rEAG2-Aminosäuresequenz, vom Aminoterminus bis zum carboxyterminalen Sequenzmotiv mit Ähnlichkeiten zu Bindungsstellen für zyklische Nukleotide (cNBD), besitzt zu den Proteinen der *eag*-Subfamilien *erg* und *elk* 40-50% Aminosäureidentität und 50-60% Sequenzähnlichkeit. Ein Vergleich dieser Sequenzbereiche mit dem EAG-Protein aus *Drosophila* zeigt 67% Identität und 76% Ähnlichkeit. Ein Vergleich mit rEAG1, dem anderen Protein der *eag*-Subfamilie der Ratte, zeigt 74% Identität und 80% Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz. Die Vergleiche demonstrieren, daß die Einordnung von rEAG2 in die *eag*-Subfamilie gerechtfertigt ist.

### 5.2 Sequenzmotive in rEAG2

In der rEAG2-Sequenz sind die für Proteine der *eag*-Genfamilie bekannten Sequenzmerkmale vorhanden. Das ist zum einen die cNBD und zum anderen das Sequenzmotiv GFGN in der Porenregion.

Das Sequenzmotiv eines *bipartite-nuclear-targeting-signals* (*bnts*) ist in den Proteinen der *eag*-Subfamilie, dEAG, rEAG1 und rEAG2, konserviert. Der Bereich der EAG-Proteine, in dem das *bnts* vorkommt ist der postulierte cytoplasmatische Carboxyterminus.

Die *bnts*-Sequenz ist dafür verantwortlich, daß im Cytosol synthetisierte Proteine, die dieses Motiv enthalten, in den Zellkern gelangen<sup>79</sup>. Kaliumkanäle sind Membranproteine und sollten daher nicht in den Kern transportiert werden.

Proteinkinasen, wie PKA<sup>15,113,174</sup>, Caseinkinase II<sup>133,134</sup> oder *mitosis-promoting-factor* (MPF)<sup>79</sup>, spielen bei der Regulation des Proteinimports in den Zellkern eine wichtige Rolle<sup>79</sup>. Durch MPF, auch  $cdk^{2+}/cdc28$  protein kinase, Growth-associated histone H1 kinase oder Cyclin-dependent Kinase *cdc2* genannt<sup>122</sup>, kann der Strom, der nach rEAG1-mRNA Injektion in *Xenopus*-Oocyten von rEAG1 vermittelt wird, unterdrückt werden<sup>21</sup>. In rEAG1 und rEAG2 kommen Konsensussequenzen für die Phosphorylierung durch MPF vor. Die möglichen MPF-Phosphorylierungsstellen T105, T205 und S872 in rEAG1 sind in rEAG2, T103, T202 und S883, konserviert. Die letztere, konservierte, mögliche MPF-Phosphorylierungsstelle befindet sich wie das *bnts* im Bereich des Carboxyterminus der Proteine. In der rEAG1- und rEAG2-Sequenz sind auch Konsensussequenzen für die Phosphorylierung durch PKA und Caseinkinase II enthalten.

Die Proteine *c-Fos* und *v-Fos* enthalten ein *bnts*. Das Protein *c-Fos* bleibt nach Phosphorylierung durch PKA im Cytosol, während *v-Fos* durch eine Mutation der PKA-

Phosphorylierungsstelle konstitutiv im Zellkern lokalisiert ist<sup>138,169</sup>. Daß das Vorkommen eines *bnts* in einem Protein nicht zwangsläufig eine Kernlokalisierung zur Folge haben muß, ergibt sich auch aus der Tatsache, daß in 4,2% der Proteine, die keine Kernlokalisierung besitzen, ein *bnts* enthalten ist<sup>43</sup>.

Ein weiteres Motiv, das in dEAG, rEAG1, rEAG2 und rERG unter Umständen enthalten ist, ist ein hydrophober *Zipper*. Der Prototyp des hydrophoben *Zippers*, der *Leucine-Zipper* (LZ), vermittelt die Dimerisierung von Proteinuntereinheiten<sup>97,99</sup>. In rEAG2 ist die Konsensussequenz des *Leucine-Zipper*-Motivs,  $(\mathbf{L}[\mathbf{X}]_6)_3\mathbf{-L}$ , enthalten (L910, L917, L924, L931). Die Leucine des *Leucine-Zippers* bilden eine räumliche Anordnung der Seitenketten hydrophober Aminosäuren, ein hydrophobes *Cluster*. Der LZ vermittelt durch hydrophobe Wechselwirkung der in einer Helix angeordneten Leucin-Seitenketten die Dimerisierung zweier parallel angeordneter Proteinuntereinheiten<sup>97</sup>. Einer exakteren Definition nach ist die Struktur, in der die hydrophoben Aminosäuren eines LZ angeordnet sind, ein *coiled-coil*. Das ist eine rechtsgehende,  $\alpha$ -helicale Sekundärstruktur, der eine leichte, linksgehende Drehung überlagert ist, so daß nicht wie in einer  $\alpha$ -Helix 3,6, sondern nur 3,5 Aminosäuren pro helikaler Windung angeordnet sind<sup>115</sup>.

Eine Voraussetzung dafür, daß dieser Bereich in den Proteinen der *eag*-Familie einen hydrophoben *Zipper* ausbilden könnte, wäre eine helikale Sekundärstruktur. Dies erscheint nach den Strukturvoraussagen mit den Methoden von Chou-Fasman<sup>32</sup> und Garnier-Osguthorpe-Robson<sup>56</sup> wahrscheinlich. Sowohl eine Anordnung in  $\alpha$ -helikaler als auch in *coiled-coil*-Struktur, könnte für die Proteine der *eag*-Familie zur Ausbildung eines hydrophoben *Zippers* führen.

Eine weitere Voraussetzung ist die Beteiligung der neben Leucin anderen hydrophoben Aminosäuren, Isoleucin, Methionin und Valin, an der Bildung des *Zippers*. In Untersuchungen, die mit dem Kernprotein C/EBP<sup>98,103</sup> gemacht wurden, das über einen LZ dimerisiert, wurden Leucine innerhalb des LZ durch die anderen hydrophoben Aminosäuren, Methionin, Isoleucin und Valin, substituiert<sup>97</sup>. Die Dimerisierung der Proteinuntereinheiten wurde durch die Aminosäuresubstitutionen in der Reihenfolge Leucin < Methionin < Isoleucin < Valin zunehmend beeinträchtigt<sup>97</sup>. Die Stabilisierung der Protein-Protein-Interaktion im LZ involviert auch hydrophobe Aminosäuren, die nicht direkt zum LZ-Motiv gehören, in der  $\alpha$ -helicalen Sekundärstruktur allerdings in der Nähe der LZ-Leucine angeordnet sind<sup>115</sup>.

Für die Proteine der Strukturklasse der  $K^+$ -Kanäle mit sechs Transmembrandomänen sind intermolekulare Interaktionsdomänen (*Assembly*-Domänen) verschiedenen Bereichen zugeordnet worden. In den spannungsgesteuerten  $K^+$ -Kanälen der  $K_v$ -Familien sind aminoterminal Domänen charakterisiert worden, die für die Tetramerisierung zu funktionellen Kanälen verantwortlich sind (NAD)<sup>101,150</sup>. In Proteinen der *eag*-Familie sind aminoterminal (hERG<sup>1-153</sup>)<sup>102</sup> und carboxyterminale (rEAG1<sup>897-937</sup>)<sup>105</sup> Domänen beschrieben worden, die zur Anlagerung der Proteinuntereinheiten zu funktionellen Kanälen beitragen. Die aminoterminal hERG-Domäne hERG<sup>1-153</sup>, bis auf eine Aminosäure (P151S) identisch mit rERG<sup>1-153</sup>, ist in Lösung selbst-tetramerisierend<sup>102</sup>. Allerdings können auch hERG-Proteine, die diese Domäne nicht besitzen, Ströme vermitteln<sup>158,147</sup>. Die Aminotermini der

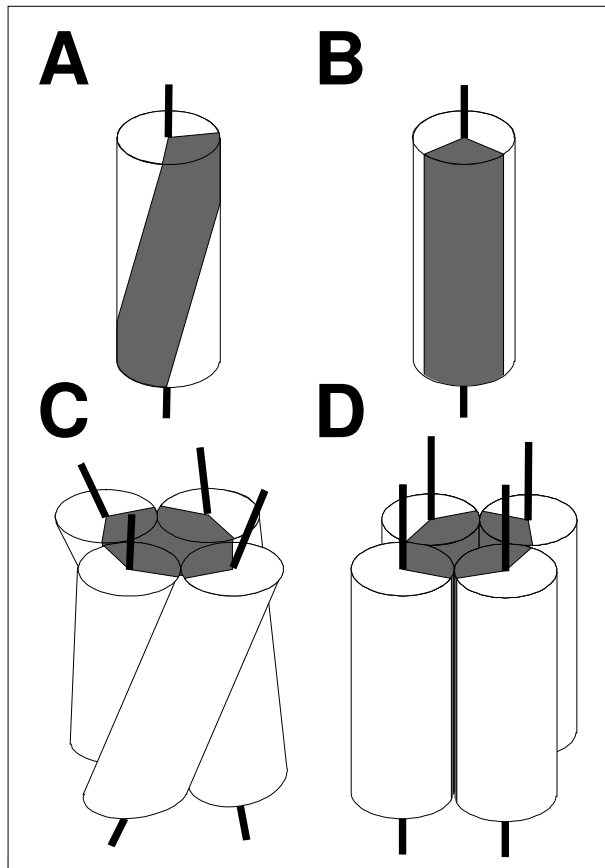
Proteine der *eag*-Subfamilie, rEAG1<sup>1-147</sup> und rEAG2<sup>1-145</sup>, besitzen 58% Sequenzähnlichkeit zu dieser Domäne.

Daß der Bereich, in dem sich das postulierte, LZ-artige, hydrophobe *Cluster* in rEAG1 befindet, eine Protein-Protein-Interaktion vermittelt, ergibt sich aus dem Umstand, daß die Domäne (rEAG1<sup>895-931</sup>) fast Deckungsgleich mit der experimentell bestimmten, carboxyterminalen rEAG1-*Assembly*-Domäne (rEAG1<sup>899-937</sup>)<sup>105</sup> ist. Die Annahme, daß der zur rEAG1-CAD homologe Bereich in rEAG2 auch für diese Proteinuntereinheit eine Protein-Protein-Interaktion vermittelt, erscheint durch das konservierte Motiv des möglichen hydrophoben *Zipper*s und vergleichbare Strukturvoraussagen gerechtfertigt. Auch in den entsprechenden homologen Sequenzbereichen der Proteine dEAG und rERG sind hydrophobe Aminosäuren in den Positionen, die für die Bildung eines hydrophoben *Zipper* notwendig wären, konserviert. Allerdings sind in dEAG alle entsprechenden Positionen, welche in rEAG2 zum *Leucine-Zipper*-Motiv gehören, nicht mit Leucin, sondern jeweils mit einer der anderen drei hydrophoben Aminosäuren besetzt.

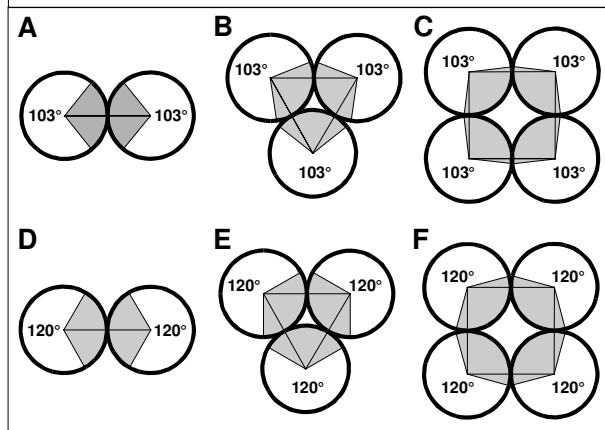
Experimentell wurde durch Mutationsanalyse die Bedeutung einiger Aminosäuren aus dem Bereich der rEAG1-CAD für die Wechselwirkung zwischen rEAG1-Untereinheiten bestimmt. Die vierfach-Mutation der rEAG1-Aminosäuren L900, V902, L906 und I910 jeweils zu Alanin, von denen V902, L906 und I910 im vorgeschlagenen hydrophoben *Zipper*, sowohl im  $\alpha$ -helikalen als im auch *coiled-coil*-Modell, enthalten wären, beeinträchtigte die rEAG1/rEAG1-Assoziation stark<sup>105</sup>. Die Mutationen L928A/L931A, die in der  $\alpha$ -helikalen Konformation die letzten beiden Positionen des hydrophoben *Zipper*s einnehmen würden, beeinflussten die Assoziation der rEAG1-Untereinheiten kaum<sup>105</sup>. Im Modell der *coiled-coil*-Konformation würde L928A keine Position des *Zipper*s einnehmen. Innerhalb der rEAG1-CAD führten Punktmutationen der Aminosäuren mit geladenen Seitenketten zu einer geringen Beeinträchtigung der rEAG1/rEAG1-Interaktion<sup>105</sup>.

Ein weiterer Befund zur Struktur der rEAG1-CAD ist, daß es sich bei der CAD-vermittelten Wechselwirkung zwischen rEAG1-Proteinuntereinheiten um homophile Bindungen der CAD-Teilbereiche A und B handelt, A-A und B-B, so daß beim Zusammenlagern von rEAG1-Untereinheiten jeweils der aminoternale Bereich der CAD der einen rEAG1-Untereinheit mit dem aminoternalen Bereich der zweiten rEAG1-Untereinheit wechselwirkt als auch die jeweiligen carboxyterminalen Bereiche der CAD miteinander in Wechselwirkung treten<sup>105</sup>. Dies entspricht der Art der Dimerisierung durch *Leucine-Zipper*<sup>118</sup>. Unter der Annahme der *coiled-coil*-Sekundärstruktur ergibt sich in den Proteinen der *eag*-Familie eine Zweiteilung des hydrophoben *Zipper*s. Der aminoternale Bereich des hydrophoben *Clusters* (**A**) wäre dabei gegen den carboxyterminalen Bereich (**B**) um eine Position auf der Helix verschoben. In beiden Bereichen sind jeweils zwei der sieben Positionen der Helix mit hydrophoben Aminosäuren besetzt. Der Bereich **A** umfaßt für rEAG1 die Aminosäuren rEAG1<sup>895-906</sup> und der Bereich **B** die Aminosäuren rEAG1<sup>909-931</sup>. Die Bereiche stimmen mit den experimentell bestimmten Bereichen der rEAG1-CAD, deren Bereich **A** die Aminosäuren rEAG1<sup>897-917</sup> und Bereich **B** die Aminosäuren rEAG1<sup>918-937</sup> umfaßt<sup>105</sup>, weitgehend überein. Die mögliche Anordnung der hydrophoben Domänen ist in rEAG2 (**A** rEAG2<sup>906-917</sup> und **B** rEAG2<sup>920-942</sup>) und dEAG (**A** dEAG<sup>893-904</sup> und **B** dEAG<sup>907-929</sup>) weitgehend konserviert. Auch in rERG (**A**





**Abb. XXX:** Modell der Ausdehnung und des Verlaufs der möglichen hydrophoben Cluster der Proteine der *eag*-Familie auf der Helixoberfläche, in *coiled-coil* (A)  $\alpha$ -helikaler (B) Sekundärstruktur und daraus resultierende räumliche Anordnung der Helices im Falle der Ausbildung eines tetrameren hydrophoben *Zipper*.



**Abb. XXXI:** Skizzierte Beispiele der Überlappung der hydrophoben Cluster der möglichen *Zipper* der Proteine der *eag*-Familie bei Ausbildung von Di-, Tri- oder Tetrameren. Ausdehnung auf der Helixoberfläche: in *coiled-coil* Sekundärstruktur (A-C), in der zwei von sieben Helixpositionen besetzt würden, und in  $\alpha$ -helikaler Sekundärstruktur (D-F), in der sechs der 18 Helixpositionen besetzt würden.

rERG<sup>1042-1056</sup> und B rERG<sup>1060-1078</sup>) ist diese Domäne konserviert. Die Sequenz und die Anordnung weicht jedoch von Proteinen der *eag*-Subfamilie ab.

Unter der Annahme der  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur würden sich in den Proteinen für den gesamten Bereich ein durchgehendes, auf dem Helixcylinder 120° umspannendes, hydrophobes Cluster ausbilden (rEAG1<sup>895-931</sup>, rEAG2<sup>906-942</sup>, dEAG<sup>893-929</sup> und rERG<sup>1042-1078</sup>).

Da die Ausdehnung des hydrophoben Clusters im möglichen *Zipper* der *eag*-Familie in  $\alpha$ -helikaler Anordnung größer ist als im *Leucine-Zipper*, bestünde die Möglichkeit, daß sie anstatt die Bildung von Dimeren, die Bildung von Tri- oder Tetrameren ermöglichen (Abb. XXX). In der *coiled-coil*-Anordnung wären die *Zipper* zumindest länger als die *Leucine-Zipper*.

Nimmt man für die Assoziation von rEAG2-Untereinheiten einen homophilen Mechanismus an, wie er für rEAG1 beschrieben wurde, und die Analogie der Orientierung der  $\alpha$ -Helices zu den DNA-bindenden Proteinen, so könnte es sich bei der, durch den hydrophoben *Zipper* vermittelten, intermolekularen Assoziation (Abb. XXX) um eine Assoziation handeln, die zur Bildung eines homotetrameren rEAG1- oder rEAG2-Kanals führt.

Da es andererseits im humanen ERG, einem Protein der *eag*-Familie, wie in den Kaliumkanälen der K<sub>v</sub>-Familie<sup>101,150</sup>, im, innerhalb der betrachteten Proteine der *eag*-Familie deutlich konservierten, Aminoterminus, eine Domäne gibt<sup>102</sup>, die für ein *Assembly* zu funktionellen Kanälen verantwortlich sein könnte, ist es vorstellbar, daß der mögliche hydrophobe *Zipper* eine Assoziation von Kanal-zu-Kanal vermittelt. Dies könnte zur Bildung von *Kanalclustern*

beitragen wie sie z. B. für NMDA-Rezeptoren<sup>91</sup> und Kaliumkanäle der Shaker-Familie<sup>88</sup> beschrieben worden sind. Im Unterschied zu diesen *Clustern*, die durch Bindung an ein drittes Protein vermittelt wird, wären am *Clustering* durch die hydrophoben *Zipper* nur die Ionenkanal-bildenden Proteine selbst beteiligt.

Der Unterschied des Modells der Kanal-zu-Kanal-Interaktion der hydrophoben *Zipper*, zum Modell der Poren-bildenden Interaktion besteht darin, daß die  $\alpha$ -Helices in der Kanal-zu-Kanal-Assoziation, gegenüber der Kanal-formenden Assoziation, in der z-Achse, der Achse senkrecht zur Ebene der Membran, gegen die Transmembransegmente gedreht wären.

Einschränkend sei angemerkt, daß eine Koexpression des gesamten rEAG1-Proteins mit carboxyterminalen Bereichen, die die CAD enthalten, einen dominant-negativen Effekt auf den von rEAG1 vermittelten Strom hat<sup>105</sup>. Ein Befund, der die Funktion der CAD mit einem Kanal-formenden *Assembly* verknüpft.

Die vorgeschlagene Interaktion über ein hydrophobes *Cluster*, welches einen hydrophoben *Zipper* ausbildet, stellt möglicherweise einen, für die Proteine der *eag*-Familie spezifischen Mechanismus der Multimerenbildung dar.

### 5.3 Die Antikörper gegen rEAG1, rEAG2 und rERG

Es wurden polyklonale Antikörper gegen Fusionsproteine carboxyterminaler Sequenzbereiche aus rEAG1, rEAG2 und rERG generiert. Die Sequenzbereiche waren so gewählt worden, daß sie untereinander eine möglichst geringe Sequenzähnlichkeit aufweisen, um in den erzeugten Antikörpern einen geringen Anteil an Kreuzreaktivität zu bekommen. Die Fusionsproteine sollten außerdem hydrophil sein, damit sie möglichst in Lösung zur Affinitätsreinigung der Antikörper eingesetzt werden konnten.

#### 5.3.1 Western-Blots mit arEAG1- und arEAG2-Antikörpern

Die Antikörper gegen rEAG1 und rEAG2 erkennen im *Western-Blot* von S3-Membranfraktionen aus Geweben des zentralen Nervensystems der Ratte, spezifisch Proteine, deren apparentes Molekulargewicht dem aus dem Leserahmen der cDNA dieser Proteine abgeleiteten Molekulargewicht entspricht.

Der Nachweis von rEAG2 im *Western-Blot* von S3-Membranfraktionen aus nativem Gewebe, erfolgt im Grenzbereich der Sensitivität des ECL-Detektionssystems ( $\leq 1$ ng Protein). Das rEAG2-Protein bindet möglicherweise nur schlecht an NC- und PVDF-Blotmembranen. Für eine Detektion von rEAG2 muß die Konzentrationen des Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers sehr niedrig gewählt werden (5ng/ml), damit möglichst wenig Peroxidaseaktivität, durch unspezifische Bindung an den Blot, in der ECL-Reaktion einen Hintergrund erzeugen kann und so die Expositionsdauer der Blots auf ECL-Film auf mehr als eine Halbwertszeit der ECL-Reaktion ( $\approx 30$ min) ausgedehnt werden kann. Diese technischen Probleme gelten in ähnlichem Maße auch für die Detektion von rEAG1 in Membranfraktionen aus nativem Gewebe.

Qualitativ stimmen die Ergebnisse von *in-situ*-Hybridisierung- und *Western-Blot* überein: rEAG1 und rEAG2 werden im ZNS der Ratte exprimiert, in Herz und Leber jedoch nicht. Die quantitativen Resultate der *Western-Blots* mit arEAG1- und arEAG2-Antikörpern, weichen von den Ergebnissen der Immunhistochemie mit diesen Antikörpern und der *in-situ*-

Hybridisierung mit *reag1*- und *reag2*-Antisense-Sonden ab. Dies lässt sich entweder darauf zurückführen, daß im Gewebe nur sehr wenig Protein vorhanden ist, welches detektiert werden könnte, oder die Proteine nur in sehr geringem Umfang an die Blotmembranen binden. Da daher die Detektion der Proteine am Rande der Sensitivität des ECL-Systems liegt, wird das Ergebnis aufgrund des geringen Signal-Rausch-Verhältnisses variabel.

Um was für ein Protein, mit einem apparenten Molekulargewicht von 60kDa, es sich bei dem von den arEAG2-Antikörpern in der Leber detektiertem Protein handelt ist unbekannt.

### **5.3.2 Western-Blots mit arERG-Antikörpern**

Von den arERG-Antikörpern werden in den S3-Membranfraktionen verschiedener Areale des Gehirns der Ratte mindestens zwei Proteine erkannt. Das apparente Molekulargewicht der Proteine im *Western-Blot* liegt bei etwa 115kDa bzw. 130kDa. Beide Proteine könnten das Protein sein, welches sich mit 126.951Da aus dem Leserahmen der rERG-cDNA ableiten läßt. Dabei ist es nicht klar, ob die zweite Proteinbande von einer unterschiedlichen postrationalen Modifikation von rERG bestimmt ist, ob sie durch eine Splicevariante des bekannten rERG-Gens oder durch das Produkt eines verwandten rERG-Gens zustande kommt oder ob sie durch eine Kreuzreaktion der Antikörper mit einem nicht-rERG-verwandten Protein verursacht wird. Die ähnliche Größe und die Blockierbarkeit mit dem rERG-Antigen legt jedoch nahe, daß es sich um ein Protein der rERG-Familie handelt. Es handelt sich dabei jedoch nicht um rEAG1 oder rEAG2, da zum einen das apparente Molekulargewicht dieser Proteine im *Western* etwas geringer ist, zum anderen der kreuzreaktive Titer der affinitätsgereinigten Antikörper mindestens 300fach unter dem arERG Titer liegt.

### **5.3.3 Blockieren der arEAG1-, arEAG2- und arERG-Immunreaktivität durch Vorinkubation der Antikörper mit dem Antigen**

Affinitätsgereinigte arEAG1- bzw. rEAG2-Antikörper erkennen überexprimierte rEAG1- bzw. rEAG2-Fusionsproteine spezifisch. Ein Blockieren der Immunreaktivität gegen überexprimierte rEAG1- und rEAG2-Fusionsproteine ist durch Vorinkubation der Antikörper mit dem Antigen im *Dot-Blot* möglich. Ebenso kann die Erkennung der Antigene in S3-Membranfraktionen aus rEAG1- und rEAG2-überexprimierenden Zellen im *Western-Blot* blockiert werden.

Die Immunreaktivität der Antikörper nach Vorinkubation mit dem Antigen, nimmt in der Immunhistochemie eher zu als ab (nicht gezeigt). Das Fusionsprotein, gegen welches die Antikörper gegen rEAG1 generiert wurden enthielt die CAD. Das Fusionsprotein, gegen das die rEAG2-Antikörper generiert wurden enthielt den zur rEAG1-CAD homologen Bereich. Daß die entsprechende Immunreaktivität der Antikörper nach Vorinkubation mit dem Antigen, in der Immunhistochemie auf eine Bindung des Antikörper-gebundenen Antigens an die entsprechenden Proteine im Gewebe zurückzuführen ist, kann vermutet werden. Die Immunreaktivität der arERG-Antikörper ließ sich in der Immunhistochemie durch Vorinkubation mit dem Antigen vollständig blockieren. Das entsprechende rERG-Fusionsprotein enthielt nur die erste Hälfte der zur rEAG1-*Assembly*-Domäne homologen Domäne.

Allerdings ließ sich die Antigenerkennung der affinitätsgereinigten arEAG1- und arEAG2-Antikörper durch Vorinkubation mit dem Antigen auch im kompetitiven ELISA nur mit einer wesentlich höheren Antigenkonzentrationen unterdrücken, als das für die affinitätsgereinigten arERG-Antikörper der Fall war. Trotzdem konnten für die Immunhistochemie Antigen/Antikörper-Verhältnisse ( $\mu\text{g IgG}/\mu\text{g Fusionsprotein}$ ) eingesetzt werden, bei der sich im kompetitiven ELISA für alle Antikörper die gleiche prozentuale Abnahme der Antigenerkennung ergab. Nur für die arERG-IHC führte dies zu einer Blockierung des Signals. Da es im kompetitiven ELISA zur Assoziation des Antikörper gebundenen Antigens mit dem im ELISA vorliegenden Antigen kommen kann, so wie dies im immunhistochemisch untersuchten Gewebe der Fall sein könnte, kann keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob die Unmöglichkeit der Blockierung der arEAG1- und arEAG2-Antigenizität darauf beruht.

#### 5.4 Anmerkungen zur arEAG1- und arEAG2-Immunhistochemie

Die Antigene, die immunhistochemisch mit den arEAG1- und arEAG2- Antikörpern im ZNS detektiert werden, sind in vielen Zellen des ZNS im Zellkern lokalisiert. Für einen Ionenkanal ist die Lokalisation im Kern einer Zelle nicht plausibel. Da die Immunhistochemie mit Antikörpern gegen rEAG1 und rEAG2 in vielen Zellen des ZNS jedoch gerade dort ein Signal zeigt, wurden die Inkubationsbedingungen der Antikörper mit dem Gewebe vielfach modifiziert<sup>59,60,175</sup>, um eine unspezifische Adsorption der Antikörper an Kernproteine auszuschließen. Die Parameter, die während der Inkubation der Antikörper mit den Gewebsschnitten variiert wurden:

- Veränderung der Ionenstärke ( $c_{[\text{NaCl}]}$ ,  $c_{[\text{Lysin}]}$  oder  $c_{[\text{Aspartat}]}$   $\downarrow\uparrow$ )<sup>60</sup>
- Veränderungen des pHs ( $\downarrow\uparrow$ )
- Voradsorption der Antikörper mit einem Acetonextract aus Rattenleberproteinen<sup>1,60</sup>
- Voradsorption der Antikörper an ein Formaldehyd-fixiertes oder autoklaviertes *E.coli*-Bakterienpellet<sup>61</sup>
- Zugabe verschiedener Detergenzien (Triton-X-100, Saponin, Tween 20) in unterschiedlichen Konzentrationen zur Inkubationslösung<sup>57</sup>
- Zugabe eines veränderten Carrierproteins (acetyliertes BSA) zur Inkubationslösung
- Zugabe eines Farbstoffs, der in der Immunocytochemie chromaffiner Zellen die unspezifische Adsorption von Antikörpern an Kernproteine unterbindet (Chromotrop 2R)<sup>22, 80, 51, 26</sup>
- oder ein Zentrifugationsschritt (60min, 40.000 $\times$ g) vor der Zugabe der Antikörper zu den Gewebsschnitten

Mit all diesen Methoden, mit denen man ggf. Protein-Protein-Wechselwirkungen unterschiedlichen Charakters voneinander unterscheiden kann, führten zu keiner Veränderung der relativen Signalintensitäten der Färbung des membranständigen Antigens verglichen mit dem im Zellkern befindlichen Antigen. Allein die Gesamtintensität der Färbung variierte. Einzig die Variation der Fixierungsmethode, die Zugabe von 0,2% Pikrinsäure<sup>157</sup>, führte zu einem eindeutig abweichenden Ergebnis, nämlich ein Verschwinden der Immunantwort in den Zellmembranen. Dies geschieht vermutlich durch eine Maskierung der Antigene durch den Fixierungsprozeß.

Eine unspezifische Reaktion der arEAG1- und rEAG2-Antikörper, aufgrund der Wechselwirkung einer anderen als der Antigen erkennenden Domäne der Antikörper, mit Proteinen des Zellkerns, kann daher so gut wie ausgeschlossen werden.

## 5.5 Immuncytochemie

Mit den arEAG1-, arEAG2- und arERG-Antikörpern ließen sich in HEK 293- Zellen, die transient mit den Vektoren, die die korrespondierende cDNA enthielten, transfiziert worden waren, Proteine detektieren. In HEK 293-Zellen die nicht transfiziert worden waren, wurden von den Antikörpern keine Proteine erkannt.

## 5.6 Die Verteilung der Proteine im ZNS

Die arEAG1-, die arEAG2- und die arERG-Antikörper zeigen in der Immunhistochemie im ZNS der Ratte eine weitverbreitete Expression der korrespondierenden Antigene.

### 5.6.1 rEAG1 und rEAG2

Die arEAG1- und arEAG2-Antikörper zeigen ein sehr ähnliches Verteilungsmuster. Von diesen Antikörpern werden in Zellmembranen Antigene erkannt, die den Rückschluß zulassen, daß beide Proteine sowohl somatodendritisch und auch axonal lokalisiert sein können. Von beiden Antikörpern werden auch in den Zellkernen vieler Zellen des ZNS Proteine erkannt.

In den Pyramidenzellen der Lamina V des cerebralen Cortex zeigen die *in-situ*-Hybridisierungen eine deutliche Expression der rEAG1- und rEAG2-RNA. In der Immunhistochemie ist eine Färbung der Zellsomata sowie der basalen und apikalen Dendriten dieser Zellen zu erkennen. Auch die Zellen des *Stratum pyramidale* des Hippocampus zeigen eine Expression der rEAG1- und rEAG2-RNA und die Zellsomata sowie die Apikaldendriten sind immunopositiv. Das Zusammentreffen von RNA-Expression, die sich diesen Zellen zuordnen läßt, und dem Vorkommen der Proteine in den Membranen der Somata und den Dendriten dieser Zellen, paßt mit der Zuordnung einer somatodendritischen Lokalisation der Proteine zusammen.

Die Expression der rEAG1- und der rEAG2-RNA im *Corpus striatum* korrespondiert in der Immunhistochemie mit Färbungen der striato-nigralen-Projektionen und der *Substantia nigra*, *Pars reticulata*. Dies entspricht einer axonalen Lokalisation der Proteine. Desweiteren sind im *Stratum lucidum* in der hippocampalen CA3-Region die Moosfasern, axonale Projektionen der Körnerzellen des *Gyrus dentate* und auch die Axone der olfaktorischen Nerven (*Filae olfactoriae*), die den *Bulbus olfactorius* erreichen, für rEAG1 und rEAG2 immunopositiv.

Während eine axonale Zuordnung eindeutig sein kann, wenn sowohl die RNA-exprimierenden Zellen in der *in-situ*-Hybridisierung und die entsprechenden Projektionen sowie die Projektionsgebiete in der Immunhistochemie eindeutig zugeordnet werden können, ist die Zuordnung einer dendritischen Lokalisation, im ZNS weitverbreitet exprimierter Proteine, oft nicht eindeutig. Für viele Kaliumkanäle, deren Lokalisation im zentralen Nervensystem der Ratte (oder Maus) immunhistochemisch bestimmt wurde, sind Areale axonaler und Areale somatodendritischer Lokalisation bestimmt worden<sup>131,176,180,185</sup>. Eine exklusives Vorkommen in nur einem Kompartiment, dem Axonalen, wie sie für den Ca<sup>2+</sup>-aktivierten Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit (BK) beschrieben wurde<sup>94</sup>, ist die Ausnahme.

Die immunhistochemischen Signale, die die arEAG1- und arEAG2-Antikörper in den Axonterminalen der Hypophyse generieren, sind zumindest teilweise auf die Expression der RNA in den magnozellularen Neuronen des *Nucleus supraopticus* zurückzuführen. Das

immunhistochemische Signal dieser Antikörper im dendritischen Geflecht der magnozellulären Neuronen des *Nucleus supraopticus* (SO) ist jedoch nicht eindeutig zuzuordnen. Es kann sich um eine dendritische Lokalisation der Proteine in den Neuronen des SO oder um eine präsynaptische Lokalisation handeln, wenn Proteine von Neuronen des Hirnstamms dorthin projiziert werden. Eine gleichmäßige Expression der *reag1*- und der *reag2*-RNA im SO gegenüber der graduieren, immunhistochemischen Färbung legen jedoch die Vermutung der präsynaptischen Lokalisation nahe.

Die dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra, Pars compacta*, die Pyramidenzellen der Lamina V des cerebralen Cortex und die Pyramidenzellen im Hippocampus sind Beispiele für die im ZNS weitverbreitete, dominante arEAG1- und arEAG2-Immunreaktivität in den Zellkernen. In Zellen des *Nucleus supraopticus*, in denen die Proteine einem axonalen Transport unterliegen, ist das Ausmaß der Kernablagerungen deutlich geringer.

Während die IHC von rEAG1 und rEAG2 in den meisten Arealen des ZNS ein weitgehend ähnliches Verteilungsmuster aufweist, unterscheidet sich die Expression der beiden Kanäle im Septum und in der Neurohypophyse deutlich. Im *Nucleus septohippocampalis* und in den septalen Nuklei ist rEAG1 deutlich stärker exprimiert als rEAG2. Umgekehrt ist die rEAG2-Immunreaktivität in der Neurohypophyse deutlich höher als die rEAG1-Immunreaktivität.

### 5.6.2 rERG

Die von den arERG-Antikörpern im ZNS der Ratte erkannten Proteine, sind in den meisten Zellen, wenn nicht allen, in denen sie exprimiert werden, somatodendritisch lokalisiert. Das von diesen Antikörpern generierte Muster ist praktisch komplementär zu einer Färbung nach dem Loyez-Verfahren, bei dem das Myelin, welches Axone umgibt, gefärbt wird<sup>14</sup>. Die Somata der meisten rERG-exprimierenden Zellen des ZNS heben sich nicht gegenüber dem Neuropil ab. Hingegen ergibt sich in vielen Arealen ein eindeutiger Kontrast der Färbung des Neuropils zu den ungefärbten axonalen Bahnen. Beispiele sind das Septum, wo der Kontrast zum rostral des Septums verlaufenden Balken (*Corpus callosum*) deutlich ist, die durch das Striatum verlaufenden Bahnen des Frontalhirns und die Axone der olfaktorischen Nerven (*Filae olfactoriae*), die den *Bulbus olfactorius* erreichen.

Die deutlichste rERG-Expression wird im *Stratum moleculare* des *Gyrus dentate*, im Hippocampus, dem *Cortex cerebri* und dem *Stratum plexiforme externum* des olfaktorischen Bulbus detektiert. Die starke arERG-Immunreaktivität im *Stratum moleculare* des Cerebellums wird von der Expression des Proteins in den Sternzellen bestimmt.

Im *Nucleus pontinus* und im *Nucleus corporis trapezoidaei* heben sich die Somata der Zellen gegenüber dem Neuropil ab. Allein die Axone der striato-nigralen Projektionen und die *Radix cochlearis* des *Ganglion vestibulocochlearis* sind mögliche Gebiete einer axonalen Lokalisation des rERG-Proteins.

## 5.7 arEAG1- und arEAG2- Immunreaktivität in Zellkernen? Eine Hypothese

Die Aminosäuresequenz von rEAG1 und rEAG2 läßt sich in zwei Bereiche untergliedern, die die Einordnung in zwei unterschiedliche Proteinklassen rechtfertigen würde. Erstens ein Kaliumkanal mit sechs Transmembranregionen, cytoplasmatischem Amino- und Carboxyterminus einschließlich des Sequenzbereichs mit Ähnlichkeiten zu Proteinbindungsstellen für zyklische Nukleotide. Dieser Bereich umfaßt die Aminosäuren rEAG1<sup>1-667</sup> und rEAG2<sup>1-672</sup>. Zweitens, carboxyterminal zu diesem Bereich, ein Protein, daß eine Kernlokalisierung besitzt. Dazu gehört das *bnts* und der mögliche hydrophobe *Zipper*. Dieser Bereich umfaßt die Aminosäuren rEAG1<sup>671-962</sup> und rEAG2<sup>675-988</sup>. Mit dieser Zweiteilung korreliert im ZNS der Ratte auch die Immunhistochemie der Proteine. Die arEAG1- und arEAG2-Antikörper erkennen Antigene einerseits in den Zellmembranen vieler Zellen, andererseits aber auch in Zellkernen.

Angemerkt sei, daß das *bnts* kein Bestandteil der Fusionsproteine ist, gegen die die Antikörper generiert wurden. Die Sequenz des hydrophoben *Zippers* allerdings ist Teil dieser Fusionsproteine. Trotzdem ist die Frage offen, ob es sich bei den im Kern detektierten Proteinen um translatierte Bereiche des rEAG1- und rEAG2-Gens handelt oder um einen Artefakt, der mit den rEAG-Genen in keinem Zusammenhang steht und auf Kreuzreaktivitäten der Antikörper mit Zellkernproteinen, z. B. mit *Leucine-Zipper*-enthaltenden Proteinen, beruht.

Eine Annahme, die man machen muß, damit sich die experimentellen Ergebnisse einordnen lassen, ist, daß die Bereiche der cytosolischen rEAG1- und rEAG2-Carboxytermini proteolytisch vom Kanalprotein abgespalten werden. Dann ist es denkbar, daß diese Proteinfragmente durch das *bnts* zum Kernporenkomplex (*nuclear pore complex*, NPC) gelangen und dann in den Zellkern importiert werden<sup>79</sup>. Im Zellkern binden die proteolytischen rEAG1- und rEAG2-Fragmente, aufgrund des hydrophoben *Zippers*, mit sich selbst oder mit Kernproteinen, die einen hydrophoben *Leucine-Zipper* enthalten. Die rEAG1-rEAG1-Aggregation dieser carboxyterminalen Domänen ist experimentell in *Overlay-Blot* gezeigt worden<sup>105</sup>. Der Befund, daß sich mit den Antikörpern gegen carboxyterminale Bereiche aus rEAG1 und rEAG2 im *Western-Blot* in den S3-Membranfraktionen nur sehr wenig Protein nachweisen läßt, ließe sich dann auch so erklären, daß ein Großteil der in der Membran befindlichen Proteine den aus dem Leserahmen der cDNA-Sequenz bestimmten Carboxyterminus nicht mehr besitzt.

Ist der *Turnover* der rEAG-Aggregate im Zellkern geringer, als der *Turnover* der kompletten, in den Zellmembranen enthaltenen Kanalproteine und geringer als der *RNA-Turnover*, korreliert das *in-situ*-Hybridisierungsmuster nicht mit dem immunhistochemischen Verteilungsmuster, da letzteres größtenteils von den in den Zellkernen detektierten Proteinen bestimmt wird.

Die Frage die sich daraus ergeben würde ist: besitzt ein solcher Mechanismus eine physiologische Bedeutung? Ein Argument dafür ist die Konservierung des *bnts* und des möglichen *Zippers* zwischen *Drosophila* und der Ratte.

Oder handelt es sich bei dem postulierten Mechanismus um eine physiologisch unerwünschte Proteinablagerungen im Zellkern, gegebenenfalls mit pathologischer Relevanz?

Die Kerne von Zellen, die sich mitotisch teilen, unterliegen in den meisten eukaryontischen Zellen der Auflösung<sup>4</sup>. Für die anschließende Rekonstitution müssen die meisten Zellkernproteine erneut zum NPC dirigiert werden und durch diesen in den Kern gelangen<sup>81</sup>. Dadurch ist die Möglichkeit zu einer Regeneration der Population der Zellkernproteine gegeben. Die biologische Notwendigkeit einer Erhaltung der Zellen des ZNS schließt es aus, das sich die Zellen nach der Differenzierung mitotisch teilen. Vermutlich ist neuronales Gewebe deshalb im Allgemeinen, und die Kerne dieser Zellen im Besonderen, anfällig für Proteinablagerungen. Die molekularen Grundlagen der Neuropathologie der Alzheimer-Krankheit<sup>189</sup>, der Creutzfeldt-Jacob-Krankheit (CJD) sowie dem erblichen Veitstanz (*Chorea Huntington*) beruhen auf der Unfähigkeit einiger neuronaler Zellpopulationen bestimmte Proteine richtig zu prozessieren<sup>28,123</sup>. Bei *Chorea Huntington* aggregieren Huntingtin-Proteine über einen hydrophilen *Zipper*, in  $\beta$ -Faltblattstruktur angeordneter Polyglutamin-Bereiche, im Zellkern<sup>123</sup>. Die Proteolysegeschwindigkeit dieser Aggregate ist in den betroffenen Zellen des zentralen Nervensystems dann so gering ist, daß es in diesen Neuronen letztlich zu Proteinablagerungen in cytotoxischen Konzentrationen kommt<sup>37,146</sup>.

Die Modulation des rEAG1-vermittelten Stroms in der Expression in *Xenopus* Oocyten durch MPF<sup>21</sup>, welches eine wichtige Rolle in der Regulation des Imports von Proteinen in den Zellkern hat<sup>79</sup>, ist ein weiteres Indiz für eine, zumindest indirekte, Interaktion von Proteinen der *eag*-Familie und Regulationsmechanismen, die am Import von Proteinen in den Zellkern beteiligt sind<sup>79</sup>.

Solange experimentell allerdings nicht geklärt ist, welcher Natur die Proteine sind, die von den arEAG-Antikörpern in den Zellkernen erkannt werden, handelt es sich nur um Spekulationen.

## **5.8 In welchem Gewebe besteht die Chance der elektrophysiologischen Charakterisierung eines nativen rEAG2 vermittelten K<sup>+</sup>-Stroms?**

Die Neurohypophyse scheint mir das neuronale Gewebe der Ratte zu sein, welches für die elektrophysiologische Charakterisierung eines nativen rEAG2-vermittelten Stroms am erfolgversprechendsten ist. rEAG2 ist dort deutlich stärker exprimiert als rEAG1. In den großen Axonterminalen dieses Gewebes ist ein K<sup>+</sup>-vermittelter Strom elektrophysiologisch charakterisiert worden<sup>87</sup>, der dem von rEAG2 in heterologer Expression vermittelten Strom ähnlich ist<sup>159</sup>. Dieser K<sup>+</sup>-Strom ist wie rEAG2 langsam aktivierend und für 4-Aminopyridin nicht sensitiv<sup>87,159</sup>.



## 5.9 Ausblick

Ist die *erg*-Subfamilie der Ratte genauer charakterisiert, könnten Antikörper generiert werden, die zwischen den beiden im *Western*-Blot detektierbaren Proteinen diskriminieren und die Verteilung der rERG-Proteine im ZNS der Ratte präziser bestimmt werden.

Um die Frage zu adressieren, ob es sich bei den von den arEAG1- und arEAG2-Antikörpern in Zellkernen detektierten Antigenen um rEAG1- und rEAG2-Fragmente handelt oder ob die Antikörper mit anderen Proteinen des Zellkerns kreuzreagieren, können Extrakte aus den Hirnarealen, in denen diese Antigene auftreten mit Matrix-gebundenen arEAG1- und arEAG2-Antikörpern affinitätsgereinigt werden. Eine anschließende Ansequenzierung der isolierten Proteine könnte dann Aufschluß darüber geben, was die Antikörper in den Zellkernen detektieren.

Da eine Wechselwirkung des MPF mit rEAG1 in *Xenopus*-Oocyten<sup>21</sup> nachgewiesen wurde, ist dieses Zellsystem ein möglicher Kandidat zur Untersuchung des *Kerntargetings*.

Die immunocytochemische Untersuchung transient-transfizierter, carboxyterminaler rEAG1- und rEAG2-Proteinfragmente, die die *bnts* und den Bereich des möglichen hydrophoben *Zippers* enthalten, könnten klären, ob die Expression dieser Proteinfragmente zu einer Kernlokalisierung führt.

Eine Trennung der immunhistochemischen arEAG1- und arEAG2-Signale in den Zellmembranen der Zellen des ZNS der Ratte, von den Signalen in den Zellkernen könnte möglicherweise mit Antikörpern gegen aminoterminalen Bereiche von rEAG1 und rEAG2 vorgenommen werden.

Die Konservierung der hydrophoben Aminosäuren in der möglichen Struktur des hydrophoben *Zippers* innerhalb verschiedener Proteine der *eag*-Familie gibt Anlaß zu der Spekulation, daß dieser Bereich neben einem homomeren *Assembly* eventuell auch eine Assoziation verschiedener Mitglieder der *eag*-Familie vermitteln könnte. Besonders die hohe Sequenzähnlichkeit von rEAG1 und rEAG2 und das sehr ähnliche Verteilungsmuster in der IHC des ZNS der Ratte, legen die Vermutung nahe, daß die beiden Proteinuntereinheiten heteromultimere Kanäle ausbilden könnten. In *Overlay*-Blot Experimenten könnten diese Fragestellungen biochemisch adressiert werden. Alternativ könnte nach Kotransfektion von HEK293-Zellen mit *pcreag1* und *pcreag2* eine elektrophysiologische Charakterisierung der K<sup>+</sup>-Ströme, die durch Koexpression von rEAG1 und rEAG2 generiert werden, Aufschluß darüber geben, ob die beiden Proteinuntereinheiten sich zu heteromeren Kanälen zusammenlagern.

## 6 Zusammenfassung

Die 988 Aminosäuren lange Sequenz des EAG2-Proteins der Ratte (rEAG2) besitzt Merkmale, die die Einordnung des Proteins in die Strukturklasse der Kaliumkanäle mit sechs Transmembrandomänen und die *eag*-Subfamilie der *eag*-Genfamilie rechtfertigen.

Die Sequenz des Proteins besitzt in der vierten Transmembrandomäne ein Spannungssensormotiv, zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne ein Porenmotiv und im Carboxyterminus eine Domäne mit Homologie zu den Bindungsstellen für zyklische Nukleotide. Amino- und Carboxyterminus des Proteins liegen wahrscheinlich intrazellulär. Die Sequenz besitzt auch Konsensussequenzen für die Glykosylierung und Konsensussequenzen mehrerer Proteinkinasen.

Zusätzlich beinhaltet die rEAG2-Proteinsequenz noch zwei Sequenzbereiche wie sie in Proteinen, die im Zellkern lokalisiert sind, vorkommen. Das ist zum einen ein *bipartite-nuclear-targeting-signal* (*bnts*), das auch im *Drosophila* EAG und im EAG1 der Ratte vorkommt. Zum anderen ist das ein Bereich des Proteins, der homolog zur carboxyterminalen *Assembly*-Domäne in rEAG1 ist, und der unter Umständen einen hydrophoben *Zipper* ausbilden könnte. Die Voraussetzung dafür wäre entweder eine  $\alpha$ -helikale oder *coiled-coil* Sekundärstruktur dieser, dem *Leucine-Zipper* ähnlichen, Domäne. Nach Strukturvorausagen von Chou-Fasman und Garnier-Osguthorpe-Robson ist für diesen Bereich eine  $\alpha$ -helikale Anordnung dieses hydrophoben *Clusters* wahrscheinlich. Die für dieses Strukturmotiv notwendige Anordnung der hydrophoben Aminosäuren ist in den Sequenzen von rEAG1, dEAG und rERG konserviert.

In heterologer Expression wird von rEAG2 ein spannungsabhängiger, nicht-inaktivierender  $K^+$ -selektiver Strom vermittelt, dessen Aktivierungskinetik von der extrazellulären  $Mg^{2+}$ -Konzentration und vom Vorpulspotential abhängig ist. Der Kanal kann durch physiologische intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen (direkt oder indirekt) blockiert werden. Ein pharmakologisches Merkmal des Kanals ist die relative Insensitivität gegenüber dem  $K^+$ -Blocker 4-Aminopyridin. Die Neurohypophyse ist ein Gewebe, in dem unter Umständen ein nativer rEAG2-Strom charakterisiert werden kann.

Es wurden polyklonale Antikörper gegen Fusionsproteine carboxyterminaler Sequenzbereiche aus rEAG1, rEAG2 und rERG generiert. Die Charakterisierung der Antikörper zeigte, daß diese im *Western-Blot*, in S3-Membranfraktionen verschiedener Hirnareale der Ratte, Proteine detektieren können, die dem apparenten Molekulargewicht nach, der Größe der Proteine entspricht, die aus dem Leserahmen der jeweiligen cDNA abgeleitet werden können. In der *in-situ*-Hybridisierung und der Immunhistochemie konnte eine weitverbreitete Expression der RNA und der Proteine festgestellt werden. Während rERG fast ausschließlich eine somato-dendritische Lokalisation aufweist, werden die Proteine rEAG1 und rEAG2, deren Expression in weiten Teilen des ZNS ein übereinstimmendes Muster zeigt, sowohl in axonaler als auch in somato-dendritischer Lokalisation gefunden.

Die Immunhistochemie mit arEAG1- und arEAG2-Antikörpern detektiert zudem Antigene in den Zellkernen vieler Zellen des ZNS. Die auch in diesen Proteinen vorhandenen Zellkernprotein-spezifischen Sequenzmotive, geben Anlaß zu Spekulationen über eine mögliche Interaktion der Proteine, oder Fragmenten dieser Proteine, und dem Zellkern.

---

## 7 Literatur

- 1 Aarli, J. A., Aparicio, S. R., Lumsden, C. E. und Tönder, O. (1975). Binding of Normal Human IgG to Myelin Sheaths, Glia and Neurons. *Immunology*, **28**: 171-185.
  - 2 Abastado, J.-P., Miller, P. F., Jackson, B. M. und Hinnebusch, A. G. (1991). Suppression of Ribosomal Reinitiation at Ustream Open Reading Frames in Amino Acid-Starved Cells Forms the Basis for GCN4 Translational Control. *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 486-496.
  - 3 Adelman, J. P., Bond, C. T., Pessia, M. und Maylie, J. (1995). Episodic Ataxia Results from Voltage-Dependent Potassium Channels with Altered Function. *Neuron*, **15**: 1449-1454.
  - 4 Agutter, P. S. und Prochnow, D. (1994). Nucleocytoplasmic Transport. *Biochem J.*, **300**: 609-618.
  - 5 Anderson, J. A., Huprikar, S. S., Kochian, L. V., Lucas, W. J. und R. F. Gaber (1992). Functional Expression of a Probable *Arabidopsis thaliana* Potassium Channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **89**: 3736-3740.
  - 6 Atkinson, N., Robertson, G. und Ganetzky, B. (1991). A Structural Component of Calcium Activated Potassium Channels Encoded by the *Drosophila slo* Locus. *Science*, **253**: 551-555.
  - 7 Bairoch, A. (1991). Prosite: a Dictionary of Sites and Patterns in Proteins. *Nucleic Acids Res.*, **19**: 2241-2245.
  - 8 Baldwin, T. J., Tsaour, M.-L., Lopez, L. A., Jan, Y. N. und Jan, L. Y. (1991). Characterization of a Mammalian cDNA for an Inactivating Voltage-Sensitive K<sup>+</sup> Channel. *Neuron*, **7**: 471-483.
  - 9 Bauer, C. K., Engeland, B., Wulfsen, I., Ludwig, J., Pongs, O. und Schwarz, J. R. (1997). Evidence that the Potential-Dependent Inward-Rectifying K<sup>+</sup> Current in Clonal Rat Pituitary Cells is Induced by the Rat Homologue of h-erg. *Receptors and Channels*, submitted.
  - 10 Baumann, A., Frings, S., Godde, M., Seifert, R. und Kaupp, U. B. (1994). Primary Structure and Functional Expression of a *Drosophila* Cyclic Nucleotide-Gated Channel Present in Eyes and Antennae. *EMBO J.*, **13**: 5040-5050.
  - 11 Baumann, A., Grupe, A., Ackermann, A. und Pongs, O. (1988). Structure of the Voltage-Dependent Potassium Channel is Highly conserved from *Drosophila* to Vertebrate Central Nervous System. *EMBO J.*, **7**: 2457-2463.
  - 12 Baumann, A., Krah-Jentgens, I., Müller, R., Müller-Holtkamp, Seidel, R., Kecskemethy, N., Casal, J., Ferrus, A. und Pongs, O. (1987). Molecular Organization of the Maternal Effect Region of the *Shaker* Complex of *Drosophila*:
-

- Characterization of an I(A) Channel Transcript with Homology to Vertebrate Na Channel. *EMBO J.* **6**: 3419-3429.
- 13 Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M. und Romey, G. (1996).  $K_v$ LQT1 and IsK (minK) Proteins Associate to form the  $I_{Ks}$  Cardiac Potassium Current. *Nature*, **384**: 78-80.
  - 14 Bellofatto, V., Torres-Muñoz, J. E. und Cross, G. A. M. (1991). Stable Transformation of *Leptomonas seymouri* by Circular Extrachromosomal Elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 6711-6715.
  - 15 Berrios, M. und Fisher, P.A. (1986). A Myosin Heavy Chain-Like Polypeptide is Associated with the Nuclear Envelope in Higher Eukaryotic Cell. *J. Cell Biol.*, **103**: 711-724.
  - 16 Birnboim, H. C. und Doly, J. A. (1979). A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**: 1513-1523.
  - 17 Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Häsler, K., Fleckenstein, B. und Schaffner, W. (1991). A Very Strong Enhancer Is Located Upstream of an Immediate Early Gene of Human Cytomegalovirus. *Cell*, **41**: 521-530.
  - 18 Bradford, M. M. (1976). A Rrapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgramm Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
  - 19 Browne, D. L. Gancher, S. T., Nutt, J. G., Ewout, R., Brunt, P., Smith, E. A., Kramer, P. und Litt, M. (1994). Episodic Ataxia/Myokymia Syndrome is Associated with Point Mutations in the Human Potassium Channel *KCNA1*. *Nature Genetics*, **8**: 136-140.
  - 20 Brüggemann, A., Pardo, L. A., Stühmer, W. und Pongs, O. (1993). *Ether-à-go-go* Encodes a Voltage-Gated Channel Permeable to  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  and Modulated by cAMP. *Nature*, **365**: 445-448.
  - 21 Brüggemann, A., Stühmer, W. und Pardo, L. A. (1997). Mitosis-Promoting Factor-Mediated Supression of a Cloned Delayed Rectifier Potassium Channel Expressed in *Xenopus* Oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 537-542.
  - 22 Buffa, R., Crivelli, O., Fiocca, R., Fontana, P. und Solcia, E. (1979). Complement-Mediated Unspecific Binding of Immunoglobulins to Some Endocrine Cells. *Histochemistry*, **63**: 15-21.
  - 23 Butler, A., Wei, A., Baker, K. und Salkoff, L. (1989). A Family of Putative Potassium Channels in *Drosophila*. *Science*, **243**: 943-947.
  - 24 Butler, A., Wei, A. und Salkoff, L. (1990). *Shal*, *Shab*, and *Shaw*: Three Genes Encoding for Potassium Channels in *Drosophila*. *Nucleic. Acids Res.* **18**: 2173-2174.
-

- 
- 25 Butler, A., Tsunoda, S., Mc Cobb, D. P., Wei, A. und Salkoff, L. (1993). *mSlo*, a Complex Mouse Gene Encoding „maxi“ Calcium-Activated Potassium Channels. *Science*, **261**: 221-224.
- 26 Capel, P. J. A. (1974). A Quantitative Immunofluorescence Method Based on the Covalent Coupling of Protein to Sepharose Beads. *J. Immunol. Meth.*, **5**: 165-178.
- 27 Castellano, A., Chiara, M. D., Mellstöm, B., Molina, A., Monje, F., Naranjo, J. R. und López-Barneo, J. (1997). Identification and Functional Characterization of a K<sup>+</sup> channel  $\alpha$ -subunit with regulatory Properties Specific to Brain. *J. Neurosci.*, **15(12)**: 4652-4661.
- 28 Caughey, B. und Chesebro, B. (1997). Prion Protein and the Transmissible Spongiform Encephalopathies. *Trends Cell. Biol.*, **7**: 56-62.
- 29 Chandy, K. G. und Gutman, G. A. (1995). Voltage Gated K<sup>+</sup>-Channels. In *CRC Handbook of Receptors and Channels* (Hrsg.: North, P. A.). S. 1-71. CRC Press, Boca Raton.
- 30 Chen, C. und Okayama, H. (1987). High-Efficiency Transformation of Mammalian Cells by Plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.*, **7(8)**: 2745-2752.
- 31 Chen, M.-L., Hoshi, T. und Wu, C.-F. (1996). Heteromultimeric Interactions Among K<sup>+</sup> Channel Subunits from *Shaker* and *eag* Families in *Xenopus* Oocytes. *Neuron*, **17**: 535-542.
- 32 Chou, P. Y. und Fasman, G. (1978). Prediction of the Secondary Structure of Proteins from their Amino Acid Sequence. *Adv. Enzymol.*, **47**: 145-147.
- 33 Citovsky, V., Zupan, J., Warnick, D. und Zambryski, P. (1992). Nuclear Localization of *Agrobacterium* VirE2 Protein in Plant Cells. *Science*, **256**: 1802-1805.
- 34 Curran, M. E., Splawski, I., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Green, E. D. und Keating, M. T. (1995). A molecular Basis for Cardiac Arrhythmia: *HERG* Mutations Cause long QT Syndrome. *Cell*, **80**: 795-804.
- 35 Chouinard, S. W., Wilson, G. F., Schlimgen, A. K. und Ganetzky, B. (1995). A Potassium Channel  $\beta$  Subunit Related to Aldo-Keto Reductase Superfamily is Encoded by the *Drosophila* hyperkinetik locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 6762-6767.
- 36 Covarrubias, M., Wei, A., Salkoff, L. und Vyas, T. B. (1994). Elimination of Rapid Potassium Channel Inactivation by Phosphorylation of the Inactivation Gate. *Neuron*, **13**: 1403-1412.
- 37 Davies, S. W., Turmaine, M., Cozens, B. A., DiFiglia, M., Sharp, A. H., Ross, C. A., Scherzinger, E., Wanker, E. E., Mangiarini, L. und Bates, G. P. (1997). Formation of Neuronal Intranuclear Inclusions Underlies Neurological Dysfunction in Mice Transgenic for the HD Mutation. *Cell*, **90**: 537-548.
-

- 
- 38 Dayhoff, M. O., Schwartz, R. M und Orcutt, B. C. (1978). In: Atlas of Protein Sequence and Structure, **5(3)**. (Hrsg.: Dayhoff, M. O.). *National Biomedical Research Foundation*, Silver Spring, MD, S. 345-352.
- 39 DeBiasi, M., Drewe, J. A., Kirsch, G. E. und Brown, A. M. (1993). Histidine Substitution Identifies a Surface Position and Confers Cs<sup>+</sup> Selectivity on a K<sup>+</sup> Pore. *Biophys. J.*, **65**: 1235-1242.
- 40 Deveraux, J., Haeberli, P. und Smithies, O. (1984). A Comprehensive Set of Sequence Analysis Programms for the VAX. *Nucl. Acids Res.*, **12**: 387-395.
- 41 Dhallan, R. S., Yau, K. W., Chrader, K. A. und Reed, D. D. (1990). Primary Structure and Functional Expression of a Cyclic Nucleotide-Activated Channel from Olfactory Neurons. *Nature*, **347**: 184-187.
- 42 Dingwall, C. und Laskey, R. A. (1986). Protein Import into the Cell Nucleus. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **2**: 367-390.
- 43 Dingwall, C. und Laskey, R. A. (1991). Nuclear Targeting Sequences – a Consensus? *TIBS*, **16**: 478-481.
- 44 Dolly, J. O. (1997). Subunit Combinations Unveiled for K<sup>+</sup> Channel Sub-Types in Mammalian Brain. *Pflügers Archiv*, **434(5) [Suppl.]**: R82.
- 45 Drain, P., Dubin, A. E. und Aldrich, R. W. (1994). Regulation of Shaker K<sup>+</sup> Channel Inactivation Gating by the cAMP-Dependent Protein Kinase. *Neuron*, **12**: 1097-1109.
- 46 Du, J., Zhang, L., Weiser, M., Rudy, B. und McBain, C. J. (1996). Developmental Expression and Functional Characterization of the Potassium-Channel Subunit Kv3.1b in Parvalbumin-Containing Interneurons of the Rat Hippocampus. *J. Neurosci.*, **16(2)**: 506-518.
- 47 Elkins, T. und Ganetzky, B. (1990). Conduction in the Giant Nerve Fiber Pathway in Temperature Sensitive Paralytic Mutants of *Drosophila*. *J. Neurogenet.*, **6**: 207-209.
- 48 Elkins, T., Ganetzky, B. und Wu, C.-F. (1986). A *Drosophila* Mutation that Eliminates a Calcium-Dependent Potassium Current. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 8415-8419.
- 49 Engvall, E. und Pearlman, P. (1971). Enzyme-linked Immunosorbend Assay (ELISA). Quantitative Assay of Immunglobulin G. *Immunochem.*, **8**: 871-879.
- 50 Frangioni, J. V. und Neel, B. G. (1993). Solubilization and Purification of Enzymatically Active Glutathion-S-Transferase (pGEX) Fusion Protein. *Anal. Biochem.*, **210**: 179-187.
- 51 Franklin, R. M. (1979). Pre-Embedding Staining for Immunocytochemistry at the Light Microscopic Level. In: Immunocytochemistry, (2<sup>nd</sup> edn.). *John Wiley and Sons, New York*, **Band I**: 251-267.
-

- 
- 52 Frech, G. C., VanDongen, A. M. J., Schuster, G., Brown, A. M. und Joho, R. H. (1989). A Novel Potassium Channel with Delayed Rectifier Properties Isolated from Rat Brain by Expression Cloning. *Nature*, **340**: 642-645.
- 53 Friedberg, E. C. (1992). Nuclear Targeting Sequences. *TIBS*, **17**: 347.
- 54 Fujimori, A., Harker, W. G., Kohlhagen, G., Hoki, Y., und Pommier, Y. (1995). Mutation at the Catalytic Site of Topoisomerase I in CEM/C2, a Human Cancer Leukemia Cell Line Resistant to Camphotericin. *Cancer Res.*, **55**(6): 1339-1346.
- 55 Ganetzky, B. und Wu, C.-F. (1983). Neurogenetic Analysis of Potassium Currents in *Drosophila*: Synergistic Effects on Neuromuscular Transmission in Double Mutants. *J. Neurogenet.* **1**: 17-28.
- 56 Garnier, J., Osguthorpe, D. J. und Robson, B. (1978). Analysis of the Accuracy and Implication of Simple Methods for Predicting the the Secondary Structure of Globular Proteins. *J. Mol. Biol.*, **125**: 357-386.
- 57 Goldenthal, K. L., , Hedman, K., Chen, J. W., August, J. T. und Willingham M. C. (1985). Postfixation Detergent Treatment for Immunofluorescence Suppresses Localization of Some Integral Membrane Proteins. *J. Histochem. Cytochem.*, **33**: 813-820.
- 58 Gordon-Weeks, P. R. (1987). Isolation of Synaptosomes, Growth Cones and their Subcellular Components. In: *Neurochemistry: a Practical Approach.* (Hrsg.: Turner, A. J. und Bachelards, H. S.) *IRL Press*, Oxford, S. 1-26.
- 59 Grube, D. (1980). Immunoreactivities of Gastrin (G-) Cells. II: Non-Specific Binding of Immunoglobulins to G-Cells by Ionic Interaction. *Histochemistry*, **66**: 149-167.
- 60 Grube, D. und Weber, E. (1980). Immunoreactivities of Gastrin (G-) Cells. I. Dilution-Dependent Staining of G-Cells by Antisera and Non-Immune Sera. *Histochemistry*, **65**: 223-237.
- 61 Gruber, A. und Zingales, B., (1995). Alternative Method to Remove Antibacterial Antibodies from Antisera Used for Screening of Expression Libraries. *BioTechniques*, **19**: 28-30.
- 62 Gültekin, H. und Heermann, K. H. (1987). The Use of Polyvinylidenedifluorid as a General Blotting Matrix. *Anal. Biochem.*, **172**: 320-329.
- 63 Guy, H. R., Durell, S. R., Warmke, J., Drysdale, R. und Ganetzky, B. (1991). Similarities in Amino Acid Sequences of *Drosophila eag* and Cyclic Nucleotide-Gated Channels. *Science*, **254**: 730.
- 64 Harlow, E. und Lane, D. (1988). *Antibodies. A Laboratory Manual.* *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, Cold Spring Harbour, N. Y.
- 65 Hille, B. (1992). *Ionic channels of Excitable Membranes.* (2<sup>nd</sup> edn.). *Sinauer Associates*, Sunderland, Massachusetts.
-

- 
- 66 Hinnebusch, A. G. (1984). Evidence for Translational Regulation of the Activator of General Amino Acid Control in Yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**(20): 6442-6446.
- 67 Huang, X.-Y., Morielli, A. D. und Peralta, E. (1993). Tyrosin Kinase-Dependent Suppression of a Potassium Channel by the G Protein-Coupled m1 Muscarinic Acetylcholine Receptor. *Cell*, **75**: 1145-1156.
- 68 Huang, C. L., Slesinger, P. A., Casey, P. J., Jan, Y. N. und Jan, L. Y. (1995). Evidence that Direct Binding of G $\beta$  to GIRK 1 G Protein-Gated Inwardly Rectifying K $^+$  Channel is Important for Channel Activation. *Neuron*, **15**: 1133-1143.
- 69 Hugnot, J. P., Salinas, M., Lesage, F., Guillemare, E., de Wille, J., Heurteaux, C., Mattei, M. G. und Lazdunski, M. (1996). Kv8.1, a Neuronal Potassium Channel Subunit with Specific Inhibitory Properties Towards *Shab* and *Shaw* Channels. *EMBO J.*, **15**: 3322-3331.
- 70 Hwang, P. M., Glatt, C. E., Brecht, D. S., Yellen, G. und Snyder, S. H. (1992). A Novel K $^+$  Channel with Unique Localization in Mammalian Brain: Molecular Cloning and Characterization. *Neuron*, **8**: 473-481.
- 71 Ikeda, K. und Kaplan, W. D. (1970). Patterned Neuronal Activity of a Mutant *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **66**: 765-772.
- 72 Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H. (1990). High Efficiency Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *Gene*, **96**: 23-28.
- 73 Jackson, M. B., Konnerth, A. und Augustine, G. J. (1991). Action Potential Broadening and Frequency-Dependent Facilitation of Calcium Signals in Pituitary Nerve Terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 380-384.
- 74 Jackson, F. R., Wilson, S. D., Stricharz, G. R. und Hall, L. M. (1984). Two Types of Mutants Affecting Voltage-Sensitive Sodium Channels in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, **308**: 189-191.
- 75 Jackson, F. R., Gitschier, J., Stricharz, G. R. und Hall, L. M. (1985). Genetic Modifications of Voltage-Sensitive Sodium Channels in *Drosophila*: Gene Dosage Studies of the seizure Locus. *J. Neurosci.*, **5**: 1144-1151.
- 76 Jan, L. Y. und Jan, Y. N. (1997). Cloned Potassium Channels from Eukaryotes and Prokaryotes. *Annu. Rev. Neurosci.*, **20**: 91-123.
- 77 Janin, J. Wodak, S., Levitt, M und Maigret, B. (1978). Conformation of Amino Acid Side-chains in Proteins. *J. Mol. Biol.*, **125**: 357-386.
- 78 Janknecht, R., de Martynoff, G., Lou, J., Hipskind, R. A., Nordheim, A. und Stunnenberg, H. G. (1991). Rapid and Efficient Purification of Native Histidine-Tagged Protein Expressed by Recombinant Vaccinia Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 8972-8976.
-



- 
- 79 Jans, D. A. und Hübner, S. (1996). Regulation of Protein Transport to the Nucleus: Central Role of Phosphorylation. *Physiol. Rev.*, **76**(3): 651-685.
- 80 Johnston, N. W. und Bienstock, J. (1974). Abolition of Non-Specific Fluorescent Staining of Eosinophils. *J. Immunol. Meth.*, **4**: 189-194.
- 81 Jonas, E. A. und Kaczmarek, L. K. (1996). Regulation of Potassium Channels by Protein Kinases. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **6**: 318-323.
- 82 Kamb, A., Iverson, L. E. und Tanouye, M. A. (1987). Molecular Characterization of *Shaker*, a *Drosophila* Gene that Encodes a Potassium Channel. *Cell*, **50**: 405-413.
- 83 Kaplan, W. D. und Trout, W. E. (1969). The Behavior of Four Neurological Mutants of *Drosophila*. *Genetics*, **61**: 399-409.
- 84 Kaupp, U. B., Niidome, T., Tanabe, T., Terada, S., Bönigk, W., Stühmer, W., Cook, N. J., Kangawa, K., Matsuo, H., Hirose, T., Miata, T. und Numa, S. (1989). Primary Structure and Functional Expression from Complementary DNA of the Rod Photoreceptor Cell Cyclic GMP-Gated Channel. *Nature* **342**: 762-766.
- 85 Keating, M. T. und Sanguinetti, M. C. (1996). Molecular Genetic Insights into Cardiovascular Disease. *Science*, **272**: 681-685.
- 86 Kiefer, P., Acland, P., Pappin, D., Peters, G und Dickson, C. (1994). Competition Between Nuclear Localization and Secretory Signals Determines the Fate of a Single CUG-Initiated Form of FGF3. *EMBO J.*, **13**: 4126-4136.
- 87 Killic, G., Stolpe, A. und Lindau, M. (1996). A Slowly Activating Voltage-Dependent K<sup>+</sup> Current in Rat Pituitary Nerve Terminals. *J. Physiol.*, **497**(3): 711-725.
- 88 Kim, E., Niethammer, M., Rothschild, A., Jan, Y. N. und Sheng, M. (1995). Clustering of Shaker-type K<sup>+</sup> Channels by Interaction with a Family of Membrane Associated Guanylate Kinases. *Nature*, **378**: 85-88.
- 89 Kirsch, G. E., Drewe, J. A., Hartmann, H. A., Tagliatela, M., DeBiasi, M., Brown, A. M. und Joho, R. H. (1992). Differences Between Deep Pores of K<sup>+</sup> Channels Determined by an Interacting Pair of Nonpolar Amino Acids. *Neuron*, **8**: 499-505.
- 90 Knaus, H.-G., Schwarzer, C., Koch, R. O. A., Eberhardt, A., Kacorowski, G. J., Glossmann, H., Wunder, F., Pongs, O., Garcia, M., L. und Sperk, G. (1996). Distribution of High-Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels in Rat Brain: Targeting to Axons and Nerve Terminals. *J. Neurosci.*, **16**(3): 955-963.
- 91 Kornau, H.-C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B. und Seeburg, P. H. (1995). Domain Interaction Between NMDA Receptor Subunits and the Postsynaptic Density Protein PSD-95. *Science*, **269**: 1737-1740.
- 92 Körschen, H. G., Illing, M., Seifert, R., Sesti, F., Williams, A., Gotzes, S., Colville, C., Müller, F., Dose, A., Godde, M, Molday, L., Kaupp, U. B. und Molday, R. S.
-

- (1995). A 240kDa Protein Represents the Complete  $\beta$  Subunit of the Cyclic Nucleotide-Gated Channel from Rod Photoreceptor. *Neuron*, **15**: 627-636.
- 93 Kozak, M. (1996). Point Mutations Define a Sequence Flanking the AUG Initiator Codon that Modulates Translation by Eukaryotic Ribosomes. *Cell*, **44**: 283-292.
- 94 Knaus, H.-G., Schwarzer, C., Koch, R. O. A., Eberhardt, A., Kaczorowski, G. J., Glossmann, H., Wunder, F., Pongs, O., Garcia, M. L., und Sperk, G. *J. Neurosci.*, Distribution of High-Conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -Activated  $\text{K}^+$  Channels in Rat Brain: Targeting to Axons and Nerve Terminals. *J. Neurosci.*, **16(3)**: 955-963.
- 95 Kyte, J. und Doolittle, R. F. (1982). A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. *J. Mol. Biol.*, **157**: 105-132.
- 96 Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- 97 Landschulz, W. H., Johnson, P. F. und McKnight, S. L. (1989). The DNA Binding Domain of the Rat Liver Nuclear Protein C/EBP is Bipartite. *Science*, **243**: 1681-1688.
- 98 Landschulz, W. H., Johnson, P. F., Adashi, E. Y., Graves, B. J. und McKnight, S. L. (1988). Isolation of a Recombinant Copy of the Gene Encoding C/EBP. *Genes Dev.*, **2**: 786.
- 99 Landschulz, W. H., Johnson, P. F. und McKnight, S. L. (1988). The Leucine Zipper: A Hypothetical Structure Common to a New Class of DNA Binding Proteins. *Science*, **240**: 1759-1764.
- 100 Lesage, F. Duprat, F., Fink, M., Guillemare, E., Coppola, T., Lazdunski, M, Hugnot, J.-P. (1994). Cloning Provides Evidence for a Family of Inward Rectifier and G-Protein Coupled  $\text{K}^+$  Channels in the Brain. *FEBS Letters*, **353**: 37-42.
- 101 Li, M., Jan, Y. N. und Jan, L. Y. (1992). Specification of Subunit Assembly by the Hydrophilic Amino-Terminal Domain of the Shaker Potassium Channel. *Science*, **257**: 1225-1230.
- 102 Li, X., Xu, J. und Li, M. (1997). The Human  $\Delta 1261$  Mutation of the *Herg* Potassium Channel Results in a Truncated Protein That Contains a Subunit Interaction Domain and Decreases the Channel Expression. *J. Biol. Chem.*, **272(2)**: 705-708.
- 103 Lincoln, A. J., Williams, S. C. und Johnson, P. F. (1994). A Revised Sequence of the Rat *c/ebp* Gene. *Genes Dev.*, **8(9)**: 1131-1132.
- 104 Logothetis, D. E., Movahedi, S., Satler, C., Lindpaintner, K. und Nadal-Ginard, B. (1992). Incremental Reductions of Positive Charge within the S4 Region of a Voltage-Gated  $\text{K}^+$  Channel Result in Corresponding Reduction in Gating Charge. *Neuron*, **8**: 531-540.
-

- 
- 105 Ludwig, J., Owen, D. und Pongs, O. (1997). Carboxy-Terminal Domain Mediates Assembly of the Voltage-Gated Rat *ether-à-go-go* Potassium Channel. *EMBO J.*, **16**: in press.
- 106 Ludwig, J., Terlau, H., Wunder, F., Brüggemann, A., Pardo, L. A., Marquardt, A., Stühmer, W. und Pongs, O. (1994). Functional Expression of a Rat Homologue of the Voltage Gated Ether à gogo Potassium Channel Reveals Differences in Selectivity and Activation Kinetics Between the *Drosophila* Channel and its Mammalian Counterpart. *EMBO J.*, **13**: 4451-4458.
- 107 Ludwig, J., Weseloh, R., Liu, Q., Netzer, R., Stansfeld, C., Karschin, C. und Pongs, O. (1997). Characterization of rat EAG2, a New Member of the *ether-à-go-go* Family of Potassium Channels, *Soc. Neurosci. Abstr.*, **23(2)**: 1195.
- 108 Maki, Y., Bos, T. J., Davis, C., Starbuck, M. und Vogt, P. K. (1987). Avian Sarcoma Virus 17 Carries the jun Oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 2848-2852.
- 109 McDonald, T. V., Yu, Z., Ming, Z., Palma, E., Meyers, M. B., Wang, K.-W., Goldstein, S. A. N. und Fishman, G. I. (1997). A minK-HERG Complex Regulates the Cardiac Potassium Current  $I_{Kr}$ . *Nature*, **388**: 289-292.
- 110 McKinnon, R. (1991). Determination of the Subunit Stoichiometry of a Voltage Activated Potassium Channel. *Nature*, **350**: 232-235.
- 111 Milligan, J. F., Groebe, D. R., Witherell, G. W. und Uhlenbeck, O. C. (1987) Oligoribonukleotide Synthesis Using T7 RNA Polymerase and Synthetic DNA Template. *Nucl. Acids Res.*, **15**: 8783-8798.
- 112 Moreno, H., Kentros, C., Bueno, E., Weiser, M., Hernandez, A., De Miera, E.-S., Ponce, A., Thornhill, W. und Rudy, B. (1995). Thalamocortical Projections have a  $K^+$  Channel that is Phosphorylated and Modulated by cAMP-Dependent Protein Kinase. *J. Neurosci.*, **15**: 5486-5501.
- 113 Mosialos, G., Hamer, P., Capobianco, J., Laursen, R. A. und Gilmore, T. D. (1991). A Protein-Kinase-A Recognition Sequence is Structurally Linked to Transformation by  $p59^{v-rel}$  and Cytoplasmic Retention of  $p68^{c-rel}$ . *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 5867-5877.
- 114 Nauta, W. J. H. und Feirtag, M. (1990). Neuroanatomie: Eine Einführung. S. 53. *Spektrum-der-Wissenschaften-Verlag*, Heidelberg.
- 115 O'Shea, E. K., Rutkowski, R. und Kim, P. S. (1989). Evidence That the Leucine Zipper is a Coiled Coil. *Science*, **243**: 538-542.
- 116 Pak, M. D., Covarrubias, M., Butler, A., Ratcliffe, A. und Salkoff, L. (1991). A Mouse Brain Homolog of the *Drosophila Shab*  $K^+$  Channel with Conserved Delayed Rectifier Properties. *J. Neurosci.*, **11**: 869-880.
- 117 Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Tempel, B. L., Jan, Y. N. und Jan, L. Y. (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a Putative Potassium Channel Gene from *Drosophila*. *Science*, **237**: 749-753.
-

- 118 Papazian, D. M., Timpe, L. C., Jan, Y. N und Jan, L. Y. (1991). Alteration of Voltage-Dependence of *Shaker* Potassium Channel by Mutations in the S4 Sequence. *Nature*. **369**: 289-294.
- 119 Patil, N., Cox, D. R., Bhat, D., Faham, M., Myers, R. M. und Peterson, A. S. (1995). A Potassium Channel Mutation in Weaver Mice Implicates Membrane Excitability in Granule Cell Differentiation. *Nature Genetics*, **11**: 126-129.
- 120 Paxinos, G. (Hrsg.) (1995). The Rat Nervous System (2<sup>nd</sup> Ed.). *Academic Press*, Sydney, Australia.
- 121 Paxinos, G. und Watson, C. (1986). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates (2<sup>nd</sup> Ed.). *Academic Press*, Sydney, Australia.
- 122 Pearson, R. B. und Kemp, B. E. (1991). Protein Kinase Phosphorylation Site Sequences and Consensus Specificity Motifs: Tabulations. *Meth. enzymol.*, **200**: 62-81.
- 123 Perutz, M. F., Johnston, T., Suzuki, M. und Finch, J. T. (1996). Glutamine Repeats as Polar Zippers: their Possible Role in Neurogenerative Diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 5355-5358.
- 124 Pongs, O. (1993). Shaker Related K Channels. *The Neurosciences*, **5**: 93-100.
- 125 Pongs, O., Kecskemethy, N., Müller, R., Krah-Jentgens, I., Baumann, A., Kiltz, H.-H., Canal, I., Llamazares, S. und Ferrus, A. (1988). *Shaker* Encodes a Family of Putative Potassium Channel Proteins in the Nervous System of *Drosophila*. *EMBO J.* **7**: 1087-1096.
- 126 Qiagen (1992a). Qiagen Plasmid Handbook.
- 127 Qiagen (1992b). Qiaex Handbook.
- 128 Rastinejad, F., Perlman, T., Evans, R. M. und Sigler, P. B. (1995). Structural Determinants of Nuclear Receptor Assembly on DNA Repeats. *Nature*, **375**: 203-211.
- 129 Rettig, J., Wunder, F., Stocker, M., Lichtinghagen, R., Mastiaux, F., Beckh, S., Kues, W., Pederazani, P, Schröter, K. H., Ruppertsberg, J. P., Veh, R. und Pongs, O. (1992). Characterization of a *Shaw* Related Potassium Channel Family in Rat Brain. *EMBO J.*, **11**: 2473-2486.
- 130 Rettig, J., Heinemann, S. H., Wunder, F., Lorra, C., Parcej, D. N., Dolly, J. O. und Pongs, O. (1994). Inactivation Properties of Voltage Gated K<sup>+</sup> Channels Altered in the Presence of  $\beta$ -Subunit. *Nature*, **369**: 289-294.
- 131 Rhodes, K. J., Keilbaugh, S. A., Barrezueta, N. X., Lopez, K. L. und Trimmer, J. S. (1995). Association and Colocalization of K<sup>+</sup> Channel  $\alpha$ - and  $\beta$ - Subunit Polypeptides in Rat Brain. *J. Neurosci.*, **15(7)**: 5360-5371.
- 132 Richter, D. Niegemann, E. und Brendel, M. (1992). Molecular Structure of the DNA Cross-Link Repair Gene SNM1 (PSO2). *Mol. Gen. Genet.*, **231 (2)**: 194-200.
-

- 133 Rihs, H.-P., Jans, D. A., Fan, H. und Peters, R. (1991). The Rate of Nuclear Cytoplasmic Protein Transport is Determined by a Casein Kinase II Site Flanking the Nuclear Localization Sequence of the SV40 T-Antigen. *EMBO J.*, **10**: 633-639.
- 134 Rihs, H.-P. und Peters, R. (1989). Nuclear Transport Kinetics Depend on Phosphorylation-Site-Containing Sequences Flanking the Karyophilic Signal of Simian Virus 40 T-Antigen. *EMBO J.*, **8**: 1479-1484.
- 135 Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A. und Dingwall, C. (1991). Two Interdependent Basic Domains in Nucleoplasmin Nuclear Targeting Sequence: Identification of a Class of Bipartite Nuclear Targeting Sequence. *Cell*, **64**: 615-623.
- 136 Rogowski, P. M., Powell, B. S., Shirasu, K., Lin, T. S., Morel, P., Zyprian, E. M., Steck, T. R. und Kado, C. I. (1990). Molecular Characterization of the VIR Regulon of *Agrobacterium tumefaciens*: Complete Nucleotide Sequence and Gene Organization of the 28.63-kBp Regulon Cloned as a Single Unit. *Plasmid*, **23**(2): 85-106.
- 137 Roeper, J., Lorra, C. und Pongs, O. (1997). Frequency-Dependent Inactivation of Mammalian A-type K<sup>+</sup> Channel K<sub>v</sub>1.4 Regulated by Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin Dependent Protein Kinase. *J. Neurosci.*, **17**(10): 3379-3391.
- 138 Roux, P., Blanchard, J.-M., Fernandez, A., Lamb, N., Jeanteur, P. und Piechaczyk, M. (1990). Nuclear Localization of *c-fos*, but not *v-fos* Proteins, is Controlled by Extracellular Signals. *Cell*, **63**: 341-351.
- 139 Rudy, B. (1988). Diversity and Ubiquity of K<sup>+</sup> Channels. *Neuroscience*, **25**: 729-749.
- 140 Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Ehrlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487-491.
- 141 Salkoff, L. und Jegla, T. (1995). Surfing the DNA Databases for K<sup>+</sup> Channel Nets yet More Diversity. *Neuron*, **15**: 489-492.
- 142 Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning – a Laboratory Manual (2<sup>nd</sup> Edition). Cold Spring Harbor Laboratory.
- 143 Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463-5467.
- 144 Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Zou, A., Shen, J., Spector, P. S., Atkinson, D. L. und Keating, M. T. (1996). Coassembly of K<sub>v</sub>LQT and minK (IsK) Proteins to Form Cardiac I<sub>Ks</sub> Potassium Channel. *Nature*, **384**: 80-83.
- 145 Sanguinetti, M. C. und Spector, P. S. (1997). Potassium Channelopathies. *Neuropharmacology*, **6**: 755-762.
- 146 Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., Bates, G. P., Davies, S. W., Lehrbach, H. und Wanker, E. E. (1997). Huntingtin-
-

- Encoded Polyglutamine Expansions Form Amyloid-like Protein Aggregates In Vitro and In Vivo. *Cell*, **90**: 549-558.
- 147 Schönherr, R. und Heinemann, S. H. (1996). Molecular Determinants for Activation and Inactivation of HERG, a Human Inward Rectifier Potassium Channel. *J. Physiol.*, **493**: 635-642.
- 148 Schröter, K.-H., Ruppertsberg, J.-P., Wunder, F., Rettig, J., Stocker, M., und Pongs, O. (1991). Cloning and Functional Expression of a TEA-sensitive A-type Potassium Channel from Rat Brain. *FEBS Lett.*, **278**: 211-216.
- 149 Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J., Gaymard, F. und Grignon, C. (1992). Cloning and Expression in Yeast of a Plant Potassium Transport System. *Science* **256**: 663-665.
- 150 Shen, N. V., Chen, X., Boyer, M. M. und Pfaffinger, P. J. (1993). Deletion Analysis of the K<sup>+</sup> Channel Assembly. *Neuron*, **11**: 67-76.
- 151 Sheng, M., Tsaur, M. L., Jan, Y. N. und Jan, L. Y. (1992). Subcellular Segregation of Two A-type K<sup>+</sup> Channel Proteins in Rat Central Neurons. *Neuron*, **9**: 271-284.
- 152 Sheng, M., Tsaur, M. L., Jan, Y. N. und Jan, L. Y. (1994). Contrasting Subcellular Localization of the K<sub>v</sub>1.2 K<sup>+</sup> Channel Subunit in Different Neurons in Rat Brain. *J. Neurosci.*, **14**: 2408-2417.
- 153 Simon, D. B., Karet, F. E., Soriano, J. R., Hamdan, J. H., DiPietro, A., Trachtman, H., Sanjad, S. A., und Lifton, R. P. (1996). Genetic Heterogeneity of Bartter's Syndrome Revealed by Mutations in the K<sup>+</sup> Channel ROMK. *Nature Genetics*, **14**: 152-156.
- 154 Singh, S. und Wu, C.-F. (1989). Complete Separation of Four K<sup>+</sup> Currents in *Drosophila*. *Neuron*, **2**: 1325-1329.
- 155 Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988). Single-Step Purification of Polypeptides Expressed in *Escherichia coli* as Fusions with Glutathion-S-Transferase. *Gene*, **67**: 31-40.
- 156 Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.*, **150**: 76-85.
- 157 Somogyi, P. und Takagi, H. (1982). A Note on the Use of Picric Acid-Paraformaldehyde-Glutaraldehyde Fixative for Correlated Light and Electron Microscopic Immunocytochemistry. *Neuroscience*, **7**: 1779-1783.
- 158 Spector, P. S., Curran, M. E., Zou, A., Keating, M. T. und Sanguinetti, M. C. (1996). Fast Inactivation Causes Rectification of the I<sub>Kr</sub> Channel. *J. Gen. Physiol.*, **107**: 611-619.
-

- 159 Stansfeld, C. E., Röper, J., Ludwig, J., Weseloh, R. M., Marsh, S. J., Brown, D. A. und Pongs, O. (1996). Elevation of Intracellular Calcium by Muscarinic Receptor Activation Induces a Block of Voltage-Activated Rat Ether-à-go-go Channels in a Stably Transfected Cell Line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 9910-9914.
- 160 Stanton, L. W., Fahrlander, P. D., Tesser, P. M. und Marcu, K. B. (1984). Nucleotide Sequence Comparison of Normal and Translocated Murine c-myc Genes. *Nature*, **310**: 423-425.
- 161 Stern, M. und Ganetzky, B. (1989). Altered Synaptic Transmission in *Drosophila Hyperkinetik* Mutants. *J. Neurogenetics*, **5**: 2 15-228.
- 162 Studier, W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. und Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes. *Meth. Enzymol.*, **185**: 60-89.
- 163 Stühmer, W., Ruppertsberg, J. P., Schröter, K. H., Sakmann, B., Stocker, M., Glese, K. P., Perschke, A., Baumann, A. und Pongs, O. (1989). Molecular Basis of Functional Diversity of Voltage-Gated Potassium Channels in Mammalian Brain. *EMBO J.*, **8**: 3235-3244.
- 164 Swaab, D. R., Pool, L. W. und Nijveldt, F. (1975). Immunofluorescence of Vasopressin and Oxytocin in the Rat Hypothalamo-Neurohypophyseal System. *J. Neurosci.*, **8**: 1940-1950.
- 165 Tabor, S. und Richardson, C. C. (1987). DNA-Sequence Analysis with a Modified Bacteriophage T7 DNA Polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 4767-4771.
- 166 Terlau, H., Ludwig, J., Steffan, R., Pongs, O., Stühmer, W. und Heinemann, S. H. (1996). Extracellular Mg<sup>2+</sup> Regulates Activation of Rat *eag* Potassium Channel. *Pfügers Arch.*, **432**: 301-312.
- 167 Titus, S. A., Warmke, J. W. und Ganetzky, B. (1997). The *Drosophila erg* K<sup>+</sup> Channel Polypeptide Is Encoded by the Seizure Locus. *J. Neurosci.*, **17**(3): 875-881.
- 168 Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**(9): 4350-4354.
- 169 Tratner, I., Ofir, R. und Verma, I. M. (1992). Alteration of a Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase Phosphorylation Site in the *c-Fos* Protein Augments its Transformation Potential. *Mol. Cell. Biol.*, **12**: 998-1006.
- 170 Tseng-Crank, J., Godinot, N., Johansen, T. E., Ahring, P. K., Strøbæk, D., Mertz, R., Foster, C. D., Olesen, S.-P. und Reinhart, P. H. (1996). Cloning, Expression, and Distribution of a Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channel  $\beta$ -Subunit from Human Brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 9200-9205.
- 171 Van Beveren, C., van Straaten, F., Curran, T., Muller, R. und Verma, I. M. (1983). Analysis of FBJ-MuSV Provirus and c-fos (Mouse) Gene Reveals that the Viral and Cellular fos Gene Products have Different Carboxy Termini. *Cell*, **32**(4): 1241-1255.
-

- 172 Vandensande, F. und Dierckxs, K. (1975). Identification of the Vasopressin Producing and of the Oxytocin Producing Neurons in the Hypothalamic Magnocellular System of the Rat. *Cell. Tiss. Res.*, **164**: 153-162.
- 173 Van der Krol, A. R. und Chua, N.-H. (1991). The Basic Domain of Plant B-ZIP Proteins Facilitates Import of a Reporter Protein into Plant Nuclei. *Plant Cell*, **3**: 667-675.
- 174 Vandromme, M., Garnac, G., Gauthier-Rouvierre, C., Fesquet, D. und Lamb, N. (1994). Nuclear Import of the Factor MyoD Requires cAMP-Dependent Protein Kinase Activation but not Direct Phosphorylation of MyoD. *J. Cell. Sci.*, **107**: 624-631.
- 175 Van Leeuwen, F. (1979). Specific Immunocytochemical Localization of Neuropeptides: A Utopian Goal?. In: Immunocytochemistry, (2<sup>nd</sup> edn.). *John Wiley and Sons, New York*, **Band I**: 283-301.
- 176 Veh, R.W., Lichtinghagen, R., Sewing, S., Wunder, F., Grumbach, I. und Pongs, O. (1995). Immunohistochemical Localisation of Five Members of the K<sub>v</sub>1 Channel Subunits: Contrasting Subcellular Locations and Neuron-Specific Co-Localisation in Rat Brain. *Eur. J. Neurosci.*, **7**: 2189-2205.
- 177 Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979). Preparative and Analytical Purification of DNA from Agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 615-619.
- 178 Wang, H., Kunkel, D. D., Schwartzkroin, P. A. und Tempel, B. L. (1994). Localization of K<sub>v</sub>1.1 and K<sub>v</sub>1.2, two K<sup>+</sup> Channel Proteins, to Synaptic Terminals, Somata, and Dendrites in the Mouse Brain. *J. Neurosci.*, **14**: 4588-4599.
- 179 Wang, Q., Curran, M. E., Splawski, I., Burn, T. C., Millholland, J. M., VanRaay, T. J., Shen, J., Timothy, K. W., Vincent, G. M., de Jager, T., Schwartz, P. J., Towbin, 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<sub>v</sub>LQT1 Mutations Cause Cardiac Arrhythmia, long QT Syndrome. *Nature Genetics*, **12**: 17-23.
- 180 Wang, H., Kunkel, D. D., Martin, T. M., Schwartzkroin, P. A. und Tempel, B. L. (1994). Localization of K<sub>v</sub>1.1 and K<sub>v</sub>1.2 two K<sup>+</sup> channel proteins, to synaptic terminals somata, and dendrites in the mouse brain. *J. Neurosci.*, **14**: 4588-4599.
- 181 Warmke, J., Drysdale, R. und Ganetzky, B. (1991). A Distinct Potassium Channel Polypeptide Encoded by the *Drosophila eag* Locus. *Science* **252**: 1560-1562.
- 182 Warmke, J. W. und Ganetzky, B. (1994). A Family of Potassium Channel Genes Related to *eag* in *Drosophila* and Mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 3438-3442.
- 183 Wei, A., Covarrubias, M., Butler, A., Baker, K., Pak, M. und Salkoff, L. (1990). K<sup>+</sup> Current Diversity is Produced by an Extended Gene Family Conserved in *Drosophila* and Mouse. *Science*, **248**: 599-603.
-



- 
- 184 Wei, A., Jegla, T. und Salkoff, L. (1996). Eight Potassium Channel Families Revealed by the *C. elegans* Genome Project. *Neuropharmacology*, **35(7)**: 805-829.
- 185 Weiser, M., Bueno, E., Sekirnjak, C., Martone, M. E., Baker, H., Hillman, D., Chen, S., Thornhill, W., Ellisman, M. und Rudy, B. (1995). The Potassium Channel Subunit Kv3.1b Is Localized to Somatic and Axonal Membranes of Specific Populations of CNS Neurons. *J. Neurosci.*, **15(6)**: 4298-4314.
- 186 Weseloh, R. (1994). Klonierung eines *eag* homologen Kaliumkanals aus der Ratte. Diplomarbeit, Universität Hannover.
- 187 Wu, C.-F., Ganetzky, B., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Benzer, S. (1978). A *Drosophila* Mutant with a Temperature Sensitive Block in Nerve Conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 4047-4051.
- 188 Wu, C.-F. und Ganetzky, B. (1986). Genes and Ionic Channels in *Drosophila*. In: Ion Channels in Neural Membranes (Hrsg.: Ritchie, J. M., Keynes, R. D. und Bolis, L.). *Alan R. Liss Inc.*, New York.
- 189 Yan, S. D., Fu, J., Soto, C., Chen, X., Zhu, H., Al-Mohanna, F., Collison, K., Zhu, A., Stern, E., Saido, T., Tohyama, M., Ogawa, S., Roher, A. und Stern D. (1997). An Intracellular Protein that Binds Amyloid- $\beta$  Peptide and Mediates Neurotoxicity in Alzheimer's Disease. *Nature*, **389**: 689-695.
- 190 Zhong, Y. und Wu, C.-F. (1991). Alteration of Four Identified K<sup>+</sup> Currents in *Drosophila* Muscle by Mutations in *eag*. *Science*, **252**: 1562-1564.
- 191 Zhong, Y. und Wu, C.-F. (1993). Modulation of Different K<sup>+</sup> currents in *Drosophila*: a Hypothetical Role for the Eag Subunit in Multimeric K<sup>+</sup> Channels. *J. Neurosci.* **13**: 4669-4697.
-

## 8 Anhang

### 8.1 Primer

Nr.	Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')	Beschreibung	Orientierung
1	M13-20	GTAAAACGACGGCCAG	pBluescript- Sequenzierprimer	-
2	Revers	AACAGCTATGACCATG	pBluescript- Sequenzierprimer	-
3	SP6	CGAGGCTGATCAGCGACGT	pcDNA3 Sequenzierprimer	AS
4	pGEX S	ATAGCATGGCCTTTGCA	pGEX-Squenzierprimer	S
5	pGEX AS	CTGCATGTGTCAGAGGT	pGEX-Squenzierprimer	AS
6	124	GCCAGGCTCGAGGCCGAGAGAG	PCR-Primer	S
7	125	CTTTGCGCTCAGCAGGGTCGCC	PCR-Primer	AS
8	128	AAGGAGCTCGAGAACCAGGGC	PCR-Primer	S
9	129	TTTCTCCTCGAGAGCCCCCAT	PCR-Primer	AS
10	433	ACCGCCGCCTCCACCTCCCTTCAGCGTGGC CTCG	PCR-Primer	AS
11	434	GGAGGTGGAGGCGGCGGTAAGGCCTTGAAT GCCA	PCR-Primer	S
12	435	GGAATTCGCTCAGCTCACTCACACGTGTCC TGC	PCR-Primer	AS
13	436	GTTCAAACATATGGGATCCCTGAGGAACCA GGGCT	PCR-Primer	S
14	437	ACCGCCGCCTCCACCTCCCCTTAAGGGGTT CTTG	PCR-Primer	AS
15	438	GGAGGTGGAGGCGGCGGTCAGCTGCTGCTG AGCTGCA	PCR-Primer	S
16	439	GCCTCGAGAAAGGATCCAGGCTGGCAGCCG	PCR-Primer	AS
17	440	GCCTCGAGAAAGGATCCAGGCTGGCAGCCG	PCR-Primer	S
18	PS	GCGGATCCCTCGAGTGGTCTAGCCTGGAG	PCR-Primer	S
19	PAS	GGAATTCGCTCAGCTCAGTCTGCACTTAGC CG	PCR-Primer	AS

## 8.2 Vektoren und Proteine

In den Abbildungen sind die Restriktionsschnittstellen der folgenden Restriktionsenzyme aufgeführt: *Bam*HI, *Bpu*1102I, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Nde*I, *Pst*I, *Not*I, *Sac*I, *Xho*I.

### 8.2.1 reag1-Vektoren

#### 8.2.1.1 pcreag1

**Beschreibung:** Vektor zur Überexpression des rEAG1-Proteins in eukaryotischen Zellen, unter Kontrolle des CMV-Promotors

**Verwendung:** Der Vektor wurde zur Etablierung einer stabilen HEK 293-Zelllinie eingesetzt

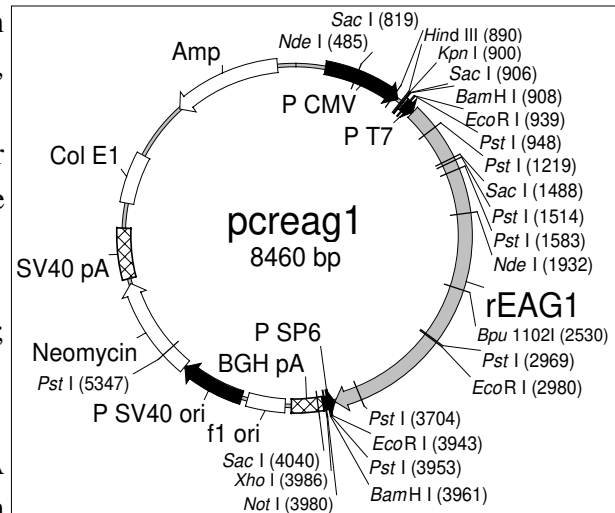
**Vektor:** pcDNA3

**Insert:** kompletter ORF der *reag1*-cDNA; Nukleotide -67-2905 bezogen auf den ORF

**ORF<sub>(rEAG1)</sub>:** Nukleotide 1017 - 3902

**Klonierung:** *Avi*II/*Not*I aus der *reag1*-cDNA [Klon 14.2 in SK<sup>-106</sup>] ausgeschnitten; in pcDNA3 *Eco*RV/*Not*I inkloniert.

**cDNA-Sequenz:** Acc. No. Z34264

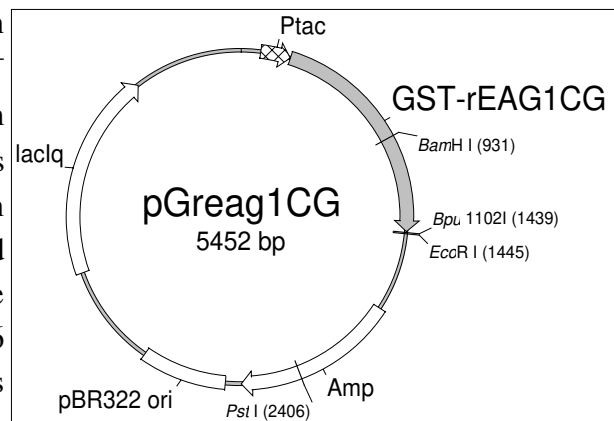


#### 8.2.1.2 rEAG1-Proteindaten

<b>Proteinsequenz</b>	:	Acc. No. Z34264
<b>Molekulargewicht</b>	:	108290.18
<b>Aminosäuren</b>	:	962
<b>Nettoladung</b>	:	2
<b>Isoelektrischer Punkt</b>	:	7,63
<b>Extinktionskoeffizient (280nm)</b>	:	123610
<b>Ausgewählte Konzentrationen</b>	:	108µg/ml => 1µM
		1µg/ml => 9,2nM
		1µg => 9,2pmol

### 8.2.1.3 pGreag1CG

**Beschreibung:** Vektor zur Überexpression des Fusionsproteins GST-rEAG1<sup>Δ724-858-G<sub>6</sub>-Δ911-945</sup>, kurz rEAG1CG, mit einem aminoterinalen Fusionsanteil, bestehend aus der GST, und einem carboxyterminalen Anteil, bestehend aus den AS 724-858 und 911-945 des rEAG1-Carboxyterminus. Die beiden Bereiche aus rEAG1 sind über 6 Glycine miteinander verbunden. Das Fusionsprotein besitzt zwischen dem GST-



Anteil und dem fusionierten Anteil aus rEAG2 eine Erkennungssequenz zur proteolytischen Spaltung durch Thrombin.

**Verwendung:** Das Fusionsprotein wurde zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt.

**Vektor:** pGEX 2T

**Insert:** Nukleotide 2170-2574 (ORF) der reag1-cDNA

**ORF** (GST-rEAG 1CG): Nukleotide 258 - 1433

**Klonierung:** *Overlap-PCR* (3.3.7.2) auf der reag1 cDNA. Teil I: mit den Primern 440/433 (2a) und 434/435 (2b); Teil II: Fragment A und B; Primer 440/435. Restriktionsverdau mit *BamHI/EcoRI*. In pGEX 2T/*BamHI/EcoRI* einkloniert.

### 8.2.1.4 GST-rEAG 1CG

**Proteinsequenz:**

MSPILGYWKI	KGLVQPTRL	LEYLEEKYEE	HLYERDEGDK	WRNKKFELGL	<b>50</b>
EFPNLPYYID	GDVKLTQSM	IIRYIADKHN	MLGGCPKERA	EISMLEGAVL	<b>100</b>
DIRYGVSR	ISKDFETLKV	DFLSKLPPEML	KMFEDRLCHK	TYLNGDHVTH	<b>150</b>
PDFMLYDALD	VVLYMDPMCL	DAFPKLVCFK	KRIEAIQID	KYLKSSKYIA	<b>200</b>
WPLQGWQATF	GGGDHPPKSD	LVPRGSRLAA	<b>ERGGRDLDDL</b>	<b>DVEKGNALTD</b>	<b>250</b>
<b>HTSANHSLVK</b>	<b>ASVVTVRESP</b>	<b>ATPVSFQAAS</b>	<b>TSTVSDHAKL</b>	<b>HAPGSECLGP</b>	<b>300</b>
<b>KAGGGDPAKR</b>	<b>KGWARFKDAC</b>	<b>GKGEDWNKVS</b>	<b>KAESMETLPE</b>	<b>RTKASGEATL</b>	<b>350</b>
<b>KGGGGGGKAL</b>	<b>NAKMTSIEKQ</b>	<b>LSEILRILMS</b>	<b>RGSSQSPQDT</b>	<b>CE</b>	<b>392</b>

Die rEAG1-spezifischen Aminosäuren sind **fett** hervorgehoben

<b>Molekulargewicht</b>	:	43623,50
<b>Aminosäuren</b>	:	392
<b>Nettoladung</b>	:	-1
<b>Isoelektrischer Punkt</b>	:	7,23
<b>Extinktionskoeffizient (280nm)</b>	:	52480
<b>Ausgewählte Konzentrationen</b>	:	43,6µg/ml => 1µM
		1µg/ml => 23nM
		1µg => 23pmol

### 8.2.1.5 pEreag1C

**Beschreibung:** Vektor zur Überexpression des Fusionsproteins His<sub>10</sub>-rEAG1<sup>Δ724-945</sup>, kurz rEAG1C, mit einem aminoterminalen Fusionsanteil, der zehn aufeinanderfolgende Histidine (His<sub>10</sub>-Tag) enthält, und einem carboxyterminalen Anteil, bestehend aus den AS 724-945 des rEAG1-Carboxyterminus. Das Fusionsprotein besitzt zwischen dem His<sub>10</sub>-Tag und dem fusionierten Anteil aus rEAG1 eine Erkennungssequenz zur proteolytischen Spaltung durch Faktor Xa.

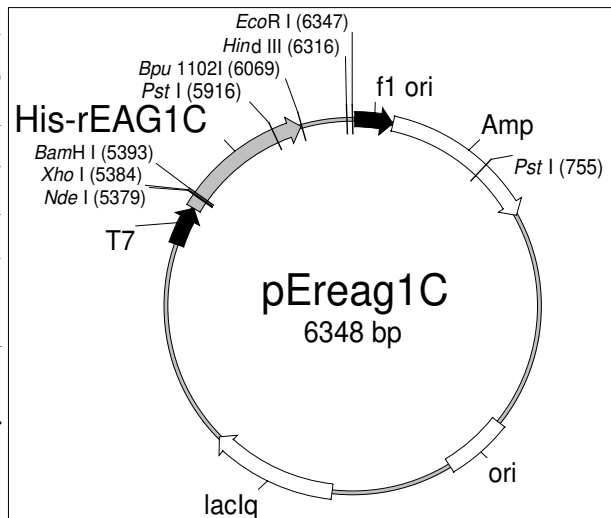
**Verwendung:** Die mit rEAG1C als Antigen generierten Antikörper wurden mit dem überexprimierten Fusionsprotein rEAG1C affinitätsgereinigt.

**Vektor:** pET 16b

**Insert:** Nukleotide 2170-2835 (ORF) der reag1-cDNA

**ORF**<sub>[(His)<sub>10</sub>-rEAG1C]</sub>: Nukleotide 5317 - 6063

**Klonierung:** PCR mit der reag1-cDNA und den Primern 440/435. Restriktionsverdau des PCR-Fragments/*Xho*I/*Bpu*1102I. In pcDNA3/*Xho*I/*Bpu*1102I inkloniert.



### 8.2.1.6 (His)<sub>10</sub>-rEAG1C

**Proteinsequenz:**

```

MGHHHHHHHHH  HHSSGHIEGR  HMLEGSRLAA  ERGGRDLDDL  DVEKGNALTD  50
HTSANHSLVK   ASVVTVRESP  ATPVSFQAAS  TSTVSDHAKL  HAPGSECLGP  100
KAGGGDPAKR   KGWARFKDAC  GKGEDWNKVS  KAESMETLPE  RTKASGEATL  150
KKT DSCDSGI  TKSDLRLDNV  GEARSPOQRS  PILAEVKHSF  YPIPEQTLQA  200
TVLEVKHELK   EDIKALNAKM  TSIEKQLSEI  LRILMSRGSS  QSPQDTCE    248
  
```

Die rEAG1-spezifischen Aminosäuren sind **fett** hervorgehoben

<b>Molekulargewicht</b>	:	26958,83
<b>Aminosäuren</b>	:	248
<b>Nettoladung</b>	:	-3
<b>Isoelektrischer Punkt</b>	:	7,15
<b>Extinktionskoeffizient (280nm)</b>	:	12900
<b>Ausgewählte Konzentrationen</b>	:	27µg/ml => 1µM
		1µg/ml => 37nM
		1µg => 37pmol

### 8.2.1.7 pSr1ISH

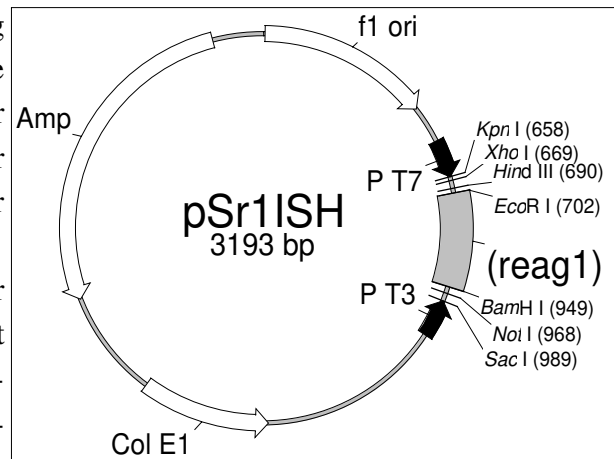
**Beschreibung:** Für die *in-situ*-Hybridisierung sollte aus der reag1-cDNA eine Sense-Sonde hergestellt werden, die aus dem Bereich der cDNA stammt, der für die Generierung der Antikörper verwandt wurde, die in der Immunhistochemie eingesetzt wurden.

**Verwendung:** Nach Linearisierung der Plasmid-DNA, durch Restriktionsverdau mit *Bam*HI, wurde durch die T7-RNA-Polymerase von der reag1-cDNA eine  $\alpha$ - $[^{33}\text{P}]$ -UTP markierte RNA-Sense-Sonde für die *in-situ*-Hybridisierung hergestellt.

**Vektor:** pBluescript SK<sup>-</sup>

**Insert:** Nukleotide 2473-2461 aus dem ORF der reag1 cDNA

**Klonierung:** Die reag1-cDNA wurde mit den Primern 124 und 125 in einer PCR amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde *Bam*HI/*Eco*RI restriktionsverdaut und in pBluescript SK<sup>-</sup>/*Bam*HI/*Eco*RI einkloniert.



### 8.2.1.8 pKr1ISH

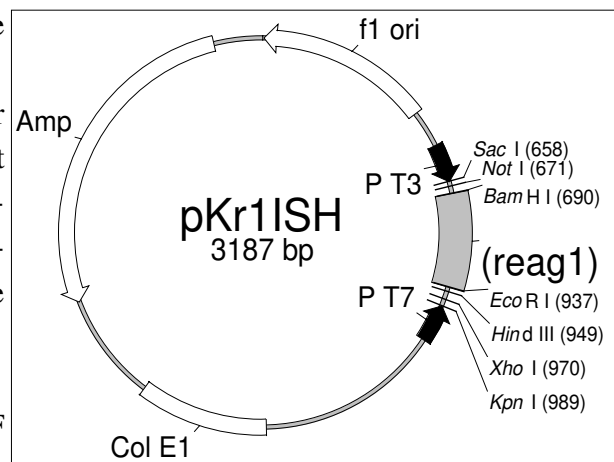
**Beschreibung:** S. pSr1ISH, nur daß eine Antisense-Sonde hergestellt wurde.

**Verwendung:** Nach Linearisierung der Plasmid-DNA, durch Restriktionsverdau mit *Bam*HI, wurde durch die T7-RNA-Polymerase von der reag1-cDNA eine  $\alpha$ - $[^{33}\text{P}]$ -UTP markierte RNA-Antisense-Sonde für die *in-situ*-Hybridisierung hergestellt.

**Vektor:** pBluescript KS<sup>+</sup>

**Insert:** Nukleotide 2473-2461 aus dem ORF der reag1 cDNA

**Klonierung:** Die reag1-cDNA wurde mit den Primern 124 und 125 in einer PCR amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde *Bam*HI/*Eco*RI restriktionsverdaut und in pBluescript KS<sup>+</sup>/*Bam*HI/*Eco*RI einkloniert.



## 8.2.2 reag 2-Vektoren

### 8.2.2.1 pcreag2

**Beschreibung:** Vektor zur Überexpression des rEAG2-Proteins in eukaryotischen Zellen, unter Kontrolle des CMV-Promotors

**Verwendung:** Der Vektor wurde zur Etablierung einer stabilen HEK 293-Zelllinie eingesetzt

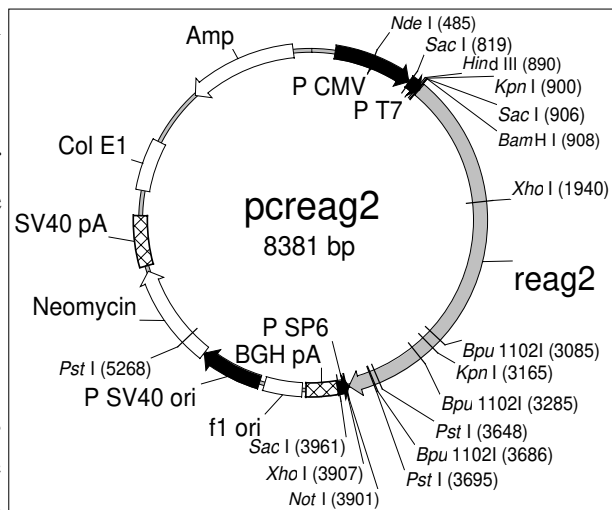
**Vektor:** pcDNA3

**Insert:** kompletter ORF der reag2-cDNA

**ORF<sub>(rEAG2)</sub>:** Nukleotide 916 - 3879

**Klonierung:** Am 5'-Ende des Leserahmens der reag2-cDNA (in pBluescript SK<sup>+</sup>) wurde durch *in vitro*-Mutagenese mittels PCR eine

*Bam*HI Schnittstelle und eine Konsensus-sequenz für den Transkriptionsstart<sup>93</sup>, und am 3'-Ende eine *Hind*III Schnittstelle, eingefügt. Die cDNA wurde mit *Hind*II restriktionsverdaut, das überhängende Ende aufgefüllt und mit *Bam*HI aus dem Vektor ausgeschnitten. Das cDNA-Fragment wurden in pcDNA3/*Bam*HI/*Eco*RV einkloniert.

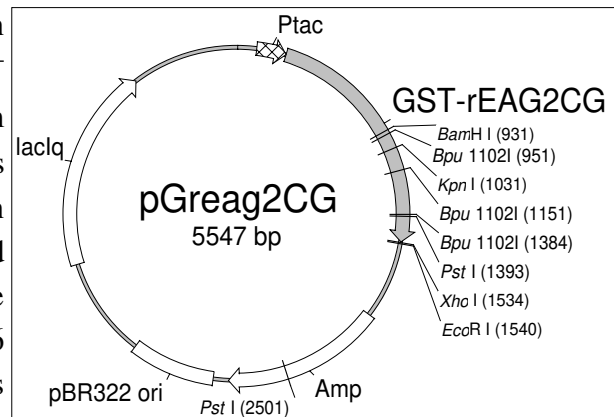


### 8.2.2.2 rEAG2-Proteindaten

<b>Proteinsequenz</b>	:	unter 4.1 abgebildet
<b>Molekulargewicht</b>	:	111724,46
<b>Aminosäuren</b>	:	988
<b>Nettoladung</b>	:	-1
<b>Isoelektrischer Punkt</b>	:	7,33
<b>Extinktionskoeffizient (280nm)</b>	:	126170
<b>Ausgewählte Konzentrationen:</b>	:	112µg/ml => 1µM; 1µg/ml=> 9,0nM; 1µg => 9,0pmol

### 8.2.2.3 pGreag2CG

**Beschreibung:** Vektor zur Überexpression des Fusionsproteins GST-rEAG2<sup>Δ719-859-G<sub>6</sub>-Δ922-972</sup>, kurz rEAG2CG, mit einem aminoterminalem Fusionsanteil, bestehend aus der GST, und einem carboxyterminalen Anteil, bestehend aus den AS 719-859 und 922-972 des rEAG2-Carboxyterminus. Die beiden Bereiche aus rEAG2 sind über 6 Glycine miteinander verbunden. Das Fusionsprotein besitzt zwischen dem GST-Anteil und dem fusionierten Anteil aus rEAG2 eine Erkennungssequenz zur proteolytischen Spaltung durch Thrombin.



**Verwendung:** Das Fusionsprotein wurde zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt.

**Vektor:** pGEX 2T

**Insert:** Nukleotide 2170-2574 (ORF) der reag2-cDNA

**ORF<sub>(GST-rEAG 2CG)</sub>:** Nukleotide 258 - 1529

**Klonierung:** Overlap-PCR (3.3.7.2) auf der reag1 cDNA. Teil I mit den Primern 436/437 (2a) und 438/439 (2b); Teil II: Fragment A und B und die Primer 436/439. Restriktionsverdau mit *BamHI/EcoRI*. In pGEX 2T/*BamHI/EcoRI* einkloniert.

### 8.2.2.4 GST-rEAG 2CG

#### Proteinsequenz:

MSPILGYWKI	KGLVQPTRL	LEYLEEKYEE	HLYERDEGDK	WRNKKFELGL	<b>50</b>
EFPNLPYYID	GDVKLTQSM	IIRYIADKHN	MLGGCPKERA	EISMLEGAVL	<b>100</b>
DIRYGVSRIA	YSKDFETLKV	DFLSKLP EML	KMFEDRLCHK	TYLNGDHVTH	<b>150</b>
PDFMLYDALD	VVLYMDPMCL	DAFPKLVCFK	KRIEAI PQID	KYLKSSKYIA	<b>200</b>
WPLQG WQATF	GGGDHPPKSD	LVPRGSLRNQ	<b>GSAQSDPERS</b>	<b>QLQVESRPLQ</b>	<b>250</b>
<b>NGASITGTSV</b>	<b>VTVSQITPIQ</b>	<b>TSLAYVKTSE</b>	<b>TLKQNNRDAM</b>	<b>ELKPNGGAEP</b>	<b>300</b>
<b>KCLKVNSPIR</b>	<b>MKNGNGKWL</b>	<b>RLKNNMGAHE</b>	<b>EKKEEWNVT</b>	<b>KAESMGLLSE</b>	<b>350</b>
<b>DPKGS DSENS</b>	<b>VTKNPLRGGG</b>	<b>GGGQLLSCRM</b>	<b>TALEKQVAEI</b>	<b>LKLLSEKSV P</b>	<b>400</b>
<b>QTSSPKPQIP</b>	<b>LQVPPQIPCQ</b>	<b>DIFS</b>			<b>424</b>

Die rEAG2-spezifischen Aminosäuren sind **fett** hervorgehoben

<b>Molekulargewicht</b>	:	47708,46
<b>Aminosäuren</b>	:	424
<b>Nettoladung</b>	:	2
<b>Isoelektrischer Punkt</b>	:	7,91
<b>Extinktionskoeffizient (280nm)</b>	:	53760
<b>Ausgewählte Konzentrationen:</b>	:	48µg/ml => 1µM
		1µg/ml => 21nM
		1µg => 21pmol



### 8.2.2.5 pEreag2C

**Beschreibung:** Vektor zur Überexpression des Fusionsproteins His<sub>10</sub>-rEAG2<sup>Δ719-972</sup>, rEAG2C mit einem aminoterminalen Fusionsanteil, mit zehn aufeinanderfolgenden Histidinen (His<sub>10</sub>-Tag), und einem carboxyterminalen Anteil, bestehend aus den AS 719-972 des rEAG2-Carboxyterminus. Das Fusionsprotein besitzt zwischen dem His<sub>10</sub>-Tag und dem fusionierten Anteil aus rEAG2 eine Erkennungssequenz zur proteolytischen Spaltung durch Faktor Xa.

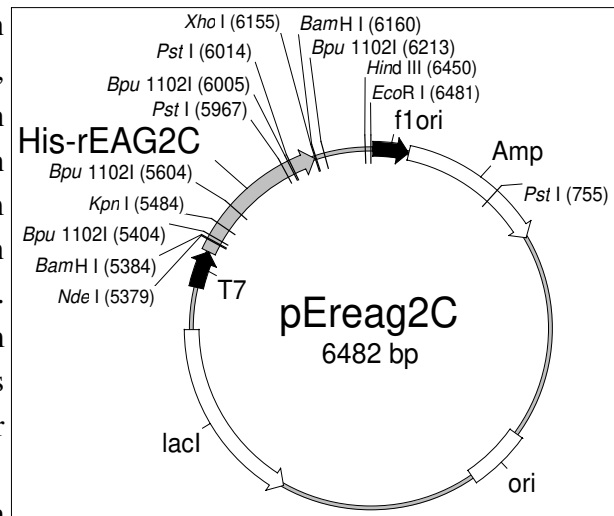
**Verwendung:** Die mit rEAG2CG als Antigen generierten Antikörper wurden mit dem überexprimierten Fusionsprotein rEAG1C affinitätsgereinigt.

**Vektor:** pET 16b

**Insert:** Nukleotide 2170-2835 (ORF) der reag1 cDNA

**ORF**<sub>[(His)<sub>10</sub>-rEAG 2C]</sub>: Nukleotide 5317 - 6015

**Klonierung:** PCR mit der reag2-cDNA und den Primern 436/439 und Restriktionsverdau mit *Bam*HI/*Xho*I. Einklonierung des PCR-Fragments in pET 16b/*Bam*HI/*Xho*I.



### 8.2.2.6 (His)<sub>10</sub>-rEAG 2C

**Proteinsequenz:**

```

MGHHHHHHHHH  HHSSGHIEGR  HMGSLRNQGS  AQSDPERSQL  QVESRPLQNG  50
ASITGTSVVT  VSQITPIQTS  LAYVKTSETL  KQNNRDAMEL  KPNGGAEPKC  100
LKVNSPIRMK  NGNGKGWLRL  KNNMGAHEEK  KEEWNNVTKA  ESMGLLSEDP  150
KGSDSENSVT  KNPLRKTDSC  DSGITKSDLA  LDKAGEARSP  LEHSPSQADA  200
KHPFYPIPEQ  ALQTTLQEVK  HELKEDIQLL  SCRMTALEKQ  VAEILKLLSE  250
KSVPQTSSPK  PQIPLQVPPQ  IPCQDIFS                                278
  
```

Die rEAG2-spezifischen Aminosäuren sind **fett** hervorgehoben

<b>Molekulargewicht</b>	:	30668,29
<b>Aminosäuren</b>	:	278
<b>Nettoladung</b>	:	0
<b>Isoelektrischer Punkt</b>	:	7,70
<b>Extinktionskoeffizient (280nm)</b>	:	14180
<b>Ausgewählte Konzentrationen</b>	:	31µg/ml => 1µM
		1µg/ml => 33nM
		1µg => 33pmol

### 8.2.2.7 pSr2ISH

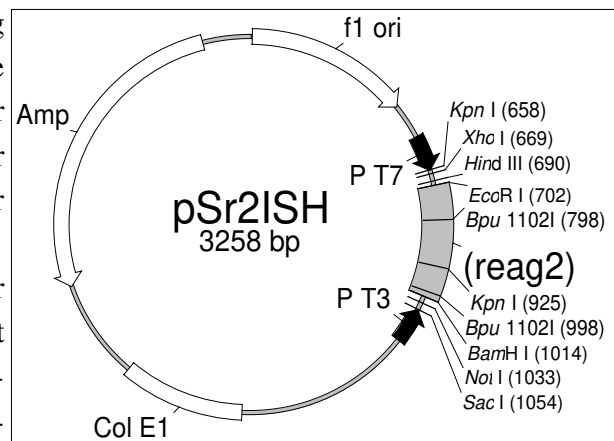
**Beschreibung:** Für die *in-situ*-Hybridisierung sollte aus der reag2-cDNA eine Sense-Sonde hergestellt werden, die aus dem Bereich der cDNA stammt, der für die Generierung der Antikörper verwandt wurde, die in der Immunhistochemie eingesetzt wurden.

**Verwendung:** Nach Linearisierung der Plasmid-DNA, durch Restriktionsverdau mit *Bam*HI, wurde durch die T7-RNA-Polymerase von der reag2-cDNA eine  $\alpha$ -[<sup>33</sup>P]-UTP markierte RNA-Sense-Sonde für die *in-situ*-Hybridisierung hergestellt.

**Vektor:** pBluescript SK<sup>-</sup>

**Insert:** Nukleotide 2160-2476 aus dem ORF der reag2 cDNA

**Klonierung:** Die reag2-cDNA wurde mit den Primern 128 und 129 in einer PCR amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde *Bam*HI/*Eco*RI restriktionsverdaut und in pBluescript KS<sup>+</sup>/*Bam*HI/*Eco*RI inkloniert.



### 8.2.2.8 pKr2ISH

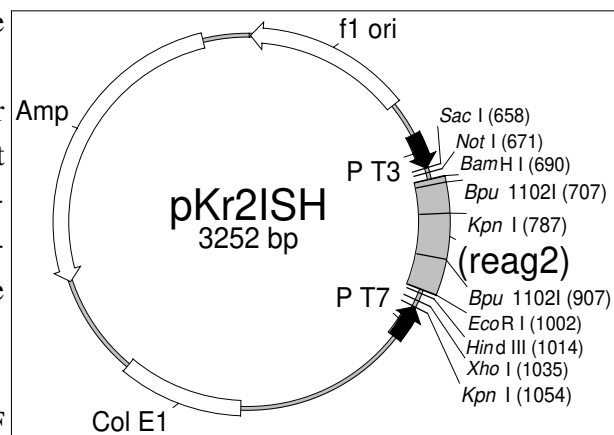
**Beschreibung:** S. pSr2ISH, nur daß eine Antisense-Sonde hergestellt wurde.

**Verwendung:** Nach Linearisierung der Plasmid-DNA, durch Restriktionsverdau mit *Bam*HI, wurde durch die T7-RNA-Polymerase von der reag2-cDNA eine  $\alpha$ -[<sup>33</sup>P]-UTP markierte RNA-Antisense-Sonde für die *in-situ*-Hybridisierung hergestellt.

**Vektor:** pBluescript KS<sup>+</sup>

**Insert:** Nukleotide 2160-2476 aus dem ORF der reag2 cDNA

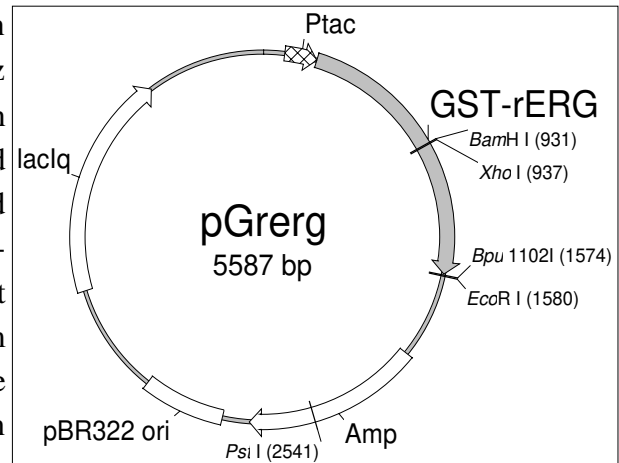
**Klonierung:** Die reag2-cDNA wurde mit den Primern 128 und 129 in einer PCR amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde *Bam*HI/*Eco*RI restriktionsverdaut und in pBluescript KS<sup>+</sup>/*Bam*HI/*Eco*RI inkloniert.



## 8.2.3 rerg-Vektoren

### 8.2.3.1 pGreg

**Beschreibung:** Vektor zur Überexpression des Fusionsproteins GST-rERG<sup>Δ855-1063</sup>, kurz GST-rERG, mit einem aminoterminalen Fusionsanteil, bestehend aus der GST, und einem carboxyterminalen Anteil, bestehend aus den AS 855-1063 des rERG-Carboxyterminus. Das Fusionsprotein besitzt zwischen dem GST-Anteil und dem fusionierten Anteil aus rERG eine Erkennungssequenz zur proteolytischen Spaltung durch Thrombin.



**Verwendung:** Das Fusionsprotein wurde zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt.

**Vektor:** pGEX 2T

**Insert:** Nukleotide 2155-2916 (ORF) der rerg-cDNA

**ORF<sub>(GST-rERG)</sub>:** Nukleotide 258 – 1568;

**Klonierung:** PCR mit der rerg-cDNA (Klon 5.1.1.2) und den Primern PS/PAS und Restriktionsverdau mit *NdeI/XhoI*. Einklonierung PCR-Fragments in pET 16b/*NdeI/XhoI*. Die gesamte *rerg* cDNA-Sequenz und rERG Proteinsequenz unter Acc. No.: z96106.

### 8.2.3.2 GST-rERG

**Proteinsequenz:**

MSPILGYWKI	KGLVQPTRL	LEYLEEKYEE	HLYERDEGDK	WRNKKFELGL	<b>50</b>
EFPNLPYYID	GDVKLTQSM	IIRYIADKHN	MLGGCPKERA	EISMLEGAVL	<b>100</b>
DIRYGVSRIA	YSKDFETLKV	DFLSKLPPEML	KMFEDRLCHK	TYLNGDHVTH	<b>150</b>
PDFMLYDALD	VVLYMDPMCL	DAFPKLVCFK	KRIEAIPOID	KYLKSSKYIA	<b>200</b>
WPLQGWQATF	GGGDHPPKSD	LVPRGSLEWS	<b>SLEITFNLRD</b>	<b>TNMIPGSPSS</b>	<b>250</b>
<b>AELESGFNRO</b>	<b>RKRKLSFRRR</b>	<b>TDKDTEQPGE</b>	<b>VSALGQGPAP</b>	<b>VGPGPSCRGO</b>	<b>300</b>
<b>PGGPWGESPS</b>	<b>SGPSSPESSE</b>	<b>DEGPGRSSSP</b>	<b>LRLVPFSSPR</b>	<b>PPGDSPPGEP</b>	<b>350</b>
<b>LTEDGEKSSD</b>	<b>TCNPLSGAFS</b>	<b>GVSNIFSWFG</b>	<b>DSRGRQYQEL</b>	<b>PRCPAPAPSL</b>	<b>400</b>
<b>LNIPLSSPGR</b>	<b>RSRGDVESRL</b>	<b>DALQRQLNRL</b>	<b>ETRLSAD*</b>		<b>437</b>

Die rERG-spezifischen Aminosäuren sind **fett** hervorgehoben

<b>Molekulargewicht</b>	:	48923,84
<b>Aminosäuren</b>	:	437
<b>Nettoladung</b>	:	4
<b>Isoelektrischer Punkt</b>	:	6,30
<b>Extinktionskoeffizient (280nm)</b>	:	59450
<b>Ausgewählte Konzentrationen:</b>	:	49µg/ml => 1µM
		1µg/ml => 20nM
		1µg => 20pmol

### 8.2.3.3 pEnerg

**Beschreibung:** Vektor zur Überexpression des Fusionsproteins His<sub>10</sub>-rEAG1<sup>Δ855-1063</sup>, kurz His-rERG, mit einem aminoterminalem Fusionsanteil, mit zehn aufeinanderfolgenden Histidinen (His<sub>10</sub>-Tag), und einem carboxyterminalen Anteil, bestehend aus den AS 855-1063 des rERG-Carboxyterminus. Das Fusionsprotein besitzt zwischen dem His<sub>10</sub>-Tag und dem fusionierten Anteil aus rERG eine Erkennungssequenz zur proteolytischen Spaltung durch Faktor Xa.

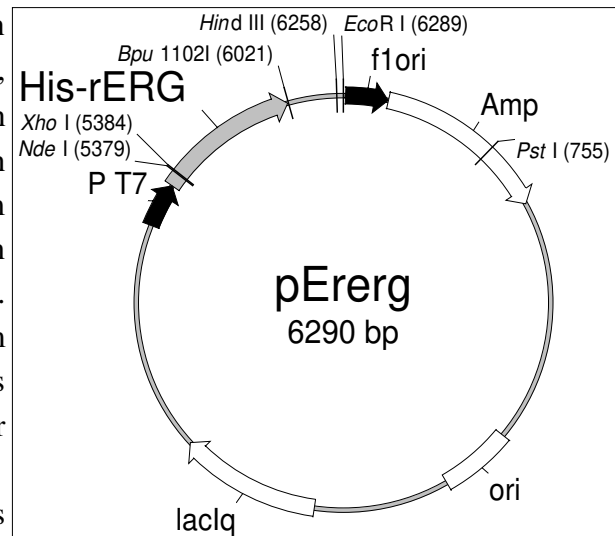
**Verwendung:** Die mit GST-rERG als Antigen generierten Antikörper wurden mit dem überexprimierten Fusionsprotein His-rERG affinitätsgereinigt.

**Vektor:** pET 16b

**Insert:** Nukleotide 2562-3189 (ORF) der *regg*-cDNA

**ORF**<sub>[(His)<sub>10</sub>-rERG]</sub>: Nukleotide 5317 - 6015

**Klonierung:** Das *regg*-cDNA-Fragment aus pETRERG wurde mit *Bam*HI/*Eco*RI ausgeschnitten und in den pGEX 2T/ *Bam*HI/*Eco*RI inkloniert.



### 8.2.3.4 (His)<sub>10</sub>-rERG

**Proteinsequenz:**

```

MGHHHHHHHHH  HHSSGHIEGR  HMLEWSSLEI  TFNLRDTNMI  PGSPSSAELE  50
SGFNRQRKRK   LSFRRRTDKD  TEQPGEVSAL  GQGPARGVGP  PSCRGQPGGP  100
WGESPPSSGPS  SPESSEDEGP  GRSSSPLRLV  PFSSPRPPGD  SPGGEPLTED  150
GEKSSDTCNP   LSGAFSGVSN  IFSFWGDSRG  RQYQELPRCP  APAPSLLNIP  200
LSSPGRRSRG   DVESRLDALQ  RQLNRLETRL  SAD          233
  
```

Die rEAG1-spezifischen Aminosäuren sind **fett** hervorgehoben

<b>Molekulargewicht</b>	:	25283,43
<b>Aminosäuren</b>	:	233
<b>Nettoladung</b>	:	-1
<b>Isoelektrischer Punkt</b>	:	7,39
<b>Extinktionskoeffizient (280nm)</b>	:	18530
<b>Ausgewählte Konzentrationen</b>	:	25µg/ml => 1µM
		1µg/ml => 40nM
		1µg => 40pmol

---

## Veröffentlichungen

---

C. Stansfeld, J. Röper, J. Ludwig, R. Weseloh, S. Marsh, D. Brown und O. Pongs (1996). Elevation of intracellular calcium by muscarinic receptor activation induces a block of voltage activated rat *ether-à-go-go* channels in a stably transfected cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **93**: 9910-9914.

C. Stansfeld, J. Ludwig, J. Röper, R. Weseloh, D. Brown und O. Pongs (1997). A physiological role for *ether-à-go-go* K<sup>+</sup> channels? *Trends Neurosci.*, **20(1)**: 13-14.

C. Stansfeld, J. Ludwig, J. Röper, R. Weseloh, D. Brown und O. Pongs (1997). (Does r-EAG contribute to the M-current?) Reply. *Trends Neurosci.*, **20(6)**: 243-244.

---

### Abstracts

J. Ludwig, H. Terlau, A. Brüggemann, R. Weseloh, F. Wunder, A. Martinez, W. Stühmer und O. Pongs (1994). Cloning and functional expression of a rat homologue of the voltage gated EAG ion channel. *Proceedings of the 22<sup>nd</sup> Göttingen Neurobiology conference*, **Vol. II**: 712.

J. Ludwig, H. Terlau, A. Brüggemann, R. Weseloh, F. Wunder, A. Martinez, W. Stühmer und O. Pongs (1994). Cloning and functional expression of a rat homologue of the voltage gated EAG ion channel. *Biophys. J.*, **66**: A426.

J. Ludwig, J. Röper, C. Stansfeld, R. Weseloh und O. Pongs (1995). Regulation of rat EAG potassium channels. *Biophys. J.*, **68(2)**: A268.

C. Stansfeld, J. Röper, J. Ludwig, R. Weseloh, S. Marsh, D. Brown und O. Pongs (1996). The rat brain *ether-à-go-go* potassium channel acts as a high affinity calcium sensor. *Biophys. J.*, **70(2)**: A239.

C. E. Stansfeld, J. Röper, J. Ludwig, R. M. Weseloh, S. J. Marsh, D. A. Brown und O. Pongs (1996). The rat brain *ether-à-go-go* potassium channel acts as a high affinity calcium sensor. *J. Physiol.*, **491**: 89P.

J. Ludwig, R. Weseloh, Q. Liu, R. Netzer, C. Stansfeld, C. Karschin und O. Pongs. (1997). Characterization of rat EAG2, a new member of the *ether-à-go-go* family of potassium channels. *Soc. Neurosci. Abstr.*, **23 (2)**: 1195.

C. E. Stansfeld, J. Ludwig, R. Weseloh und O. Pongs (1997). Rat *ether-à-go-go* splice variants differ in Mg<sup>2+</sup> sensitivity and activation kinetics. *Soc. Neurosci. Abstr.*, **23(2)**: 1478.

---

---

## Lebenslauf

**Name** Rüdiger Meinhard Weseloh

**Geburtsdatum** 11. Januar 1966

**Geburtsort** Braunschweig

**Familienstand** ledig

---

### Bildungsweg

#### Schule

1971 – 1972 Grund- und Hauptschule, Stöckheim bei Braunschweig

1972 – 1976 Hölty-Grundschule, Göttingen

1976 – 1982 Georg-Christoph-Lichtenberg Gesamtschule, Göttingen-Geismar

1982 – 1983 Schüleraustausch mit dem *afs*, Boise, Idaho, USA

1983 High School Diploma, Borah High School, Boise, Idaho, USA.

1983 – 1985 Erlangen der Hochschulreife, Georg-Christoph-Lichtenberg Gesamtschule, Göttingen-Geismar

---

#### Hochschule

Oktober 1987 – August 1989 Grundstudium der Biochemie, Universität Bayreuth

Oktober 1989 Vordiplom

Oktober 1989 – April 1990 Laborpraktikum, Instituto de Investigaciones Bioquímicas (Prof. Dr. F.-J. Barrantes), Bahía Blanca, Argentinien

Mai 1990 – Oktober 1990 Aufenthalt in den USA

Oktober 1990 – Juni 1993 Hauptstudium der Biochemie, Universität Hannover

Juli 1993 – Februar 1994 Diplomarbeit, Institut für neurale Signalverarbeitung (Prof. Dr. O. Pongs), Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Hamburg

Mai 1994 Diplom der Biochemie

April 1994 – August 1997 Durchführung von Arbeiten im Rahmen einer Promotion, Institut für neurale Signalverarbeitung (Prof. Dr. O. Pongs), Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Hamburg

18. Dezember 1997 Promotionsprüfung

---

#### Zivildienst

Januar 1986 – August 1987 Universitätsklinikum, Abteilung für klinische Biochemie (Prof. Dr. H.-D. Söling), Göttingen

---

Prof. Dr. Olaf Pongs danke ich für die Überlassung des, nach vielen Problemen, letztlich sehr interessanten Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit, in der Abteilung für neurale Signalverarbeitung am Zentrum für Molekulare Neurobiologie in Hamburg, durchführen zu können.

PD Dr. Walter Müller möchte ich für die unkomplizierte Übernahme der Betreuung der Arbeit und die stets freundliche Hilfe bei verwaltungstechnischen Details danken.

Mein Dank, der Dörte Clausen gilt, ist kaum in Worte zu fassen. Weder „stets und unermüdlich“ noch „fachkundig und prompt“ bringt deutlich genug zum Ausdruck, wie groß Ihr Einsatz bei der „Durchführung der fotografischen Arbeiten“ wirklich war. Darum einfach: VIELEN DANK!

Bei J. Ludwig, Cathy Stansfeld, Michaela Schweizer, Susanne Fehr, Christine Karschin und Qin Liu möchte ich mich für die Zusammenarbeit auf den Gebieten der *eag*-Klone, *eag*-Antikörper, *eag*-Ströme und *eag*-RNAs bedanken.

Für die Gespräche über das Leben im Allgemeinen sowie Problemklone und -antikörper im Besonderen, eben alles was das Leben im Labor lebenswert macht, bedanke ich mich bei Birgit Engeland und Christina Schmidt.

Für das mühevollen Korrekturlesen und wertvolle Formulierungshinweise bedanke ich mich bei Birgit Engeland, Thorsten Leicher und Prof. Dr. Olaf Pongs.

---

## **Eidesstattliche Erklärungen**

gemäß §4 (2) d), §5 (1) c) und §5 (1) d) der Gemeinsamen Ordnung der naturwissenschaftlichen Fachbereiche für die Promotion zum Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) an der Universität Hannover:

Ich habe weder früher noch gleichzeitig ein Promotionsverfahren bei einer anderen Hochschule oder einem anderen Fachbereich beantragt.

Ich versichere, daß ich die Dissertation selbständig verfaßt und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben habe.

Ich versichere, daß die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Dienstag, 3. Februar 1998

---