

Aus der Fachrichtung 2.4 Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Bereich Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Identifizierung und Charakterisierung von Spleißvarianten der
CaV β 2-Untereinheit des spannungsabhängigen L-Typ Ca²⁺-Kanals
CaV1.2 in Mausherz**

*Dissertation zur Erlangung
des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES*

2009

vorgelegt von: Sabine Anna Maria Link

geb. am 8. Dezember 1981 in Ludwigshafen am Rhein

Inhaltsübersicht

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Inhaltsübersicht | I |
| Inhaltsverzeichnis | III |
| Abbildungsverzeichnis | XII |
| Tabellenverzeichnis | XVII |
| Abkürzungsverzeichnis | XXI |
| 1 Zusammenfassung | 1 |
| Summary | 4 |
| 2 Einleitung | 6 |
| 2.1 Ca ²⁺ -Kanäle..... | 6 |
| 2.2 Spannungsabhängige Ca ²⁺ -Kanäle | 6 |
| 2.3 HVA L-Typ Ca ²⁺ -Kanäle | 7 |
| 2.4 Aufbau des in Herzmuskelgewebe exprimierten HVA CaV1.2 L-Typ Kanals | 9 |
| 2.5 Bedeutung des HVA L-Typ Ca ²⁺ -Kanals für die embryonale Herzentwicklung | 16 |
| 2.6 Zielsetzung dieser Arbeit | 18 |
| 3 Material und Methoden | 22 |
| 3.1 Klonierungsexperimente | 22 |
| 3.2 Proteinbiochemie..... | 59 |
| 3.3 Elektrophysiologie | 60 |
| 3.4 Fluoreszenzexperimente..... | 63 |
| 3.5 Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer, Lösungen und Medien | 63 |
| 3.6 Chemikalien | 70 |
| 4 Ergebnisse | 71 |
| 4.1 Identifizierung, Klonierung und Charakterisierung von CaV β 2-Spleißvarianten in Mausherz..... | 71 |
| 4.2 Klonierung der CaV α _{1.2} -Untereinheit..... | 113 |
| 4.3 Fluoreszenzexperimente..... | 130 |
| 4.4 Anhang 1 | 141 |
| 4.5 Anhang 2 | 147 |
| 5 Diskussion | 150 |
| 5.1 Identifizierung von CaV β 2-Spleißvarianten | 150 |
| 5.2 Polymerase-Kettenreaktion mit isolierten Kardiomyozyten | 169 |

| | | |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.3 | Untersuchung der CaV β 2-Untereinheit auf Proteinebene | 172 |
| 5.4 | Funktionelle Charakterisierung der verschiedenen CaV β 2a-Varianten mittels elektrophysiologischer Untersuchungen | 173 |
| 5.5 | Klonierung der CaV α _{1.2} -Untereinheit..... | 185 |
| 5.6 | Fluoreszenzexperimente..... | 191 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 197 |
| 7 | Publikationen / Dank | 215 |
| 8 | Lebenslauf..... | 217 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Inhaltsübersicht | I |
| Inhaltsverzeichnis | III |
| Abbildungsverzeichnis | XII |
| Tabellenverzeichnis | XVII |
| Abkürzungsverzeichnis | XXI |
| 1 Zusammenfassung | 1 |
| Summary | 4 |
| 2 Einleitung | 6 |
| 2.1 Ca ²⁺ -Kanäle..... | 6 |
| 2.2 Spannungsabhängige Ca ²⁺ -Kanäle | 6 |
| 2.3 HVA L-Typ Ca ²⁺ -Kanäle | 7 |
| 2.4 Aufbau des in Herzmuskelgewebe exprimierten HVA CaV1.2 L-Typ Kanals | 9 |
| 2.4.1 CaV α_1 1.2-Untereinheit des L-Typ Ca ²⁺ -Kanals..... | 10 |
| 2.4.2 CaV β 2-Untereinheit des L-Typ Ca ²⁺ -Kanals..... | 11 |
| 2.4.2.1 Aufbau der CaV β 2-Untereinheit..... | 12 |
| 2.4.2.1.1. SH3- und NK-Domänen der CaV β 2-Untereinheit | 13 |
| 2.4.2.1.2. Interaktionsstellen der CaV β 2-Untereinheit mit der CaV α_1 - | |
| Untereinheit..... | 14 |
| 2.4.2.2 Funktion der CaV β 2-Untereinheit | 14 |
| 2.4.2.3 CaV $\alpha_2\delta$ -Untereinheit des L-Typ Ca ²⁺ -Kanals..... | 16 |
| 2.5 Bedeutung des HVA L-Typ Ca ²⁺ -Kanals für die embryonale Herzentwicklung | 16 |
| 2.5.1 Rolle der CaV α_1 -Untereinheit in der embryonalen Herzentwicklung | 17 |
| 2.5.2 Rolle der CaV β 2-Untereinheit in der embryonalen Herzentwicklung..... | 17 |
| 2.6 Zielsetzung dieser Arbeit | 18 |
| 3 Material und Methoden | 22 |
| 3.1 Klonierungsexperimente | 22 |
| 3.1.1 Bakterienstämme..... | 22 |
| 3.1.1.1 Genotyp und Eigenschaften | 22 |
| 3.1.1.2 Aufbewahrung | 22 |
| 3.1.1.2.1. Antibiotika..... | 23 |
| 3.1.1.3 Bestimmung der Zelldichte..... | 23 |

| | | |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.1.4 | Herstellung kompetenter Bakterienzellen | 24 |
| 3.1.1.4.1. | Herstellung kompetenter Zellen zur Hitzeschock-Transformation | 24 |
| 3.1.1.4.2. | Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation durch Elektroporation | 24 |
| 3.1.1.5 | Transformation kompetenter Zellen..... | 24 |
| 3.1.1.5.1. | Hitzeschocktransformation..... | 25 |
| 3.1.1.5.2. | Transformation durch Elektroporation..... | 25 |
| 3.1.2 | Vektoren..... | 25 |
| 3.1.3 | Isolierung, Reinigung und Charakterisierung von Nukleinsäuren | 26 |
| 3.1.3.1 | Isolierung von Ribonukleinsäuren | 26 |
| 3.1.3.1.1. | Isolierung der Gesamt-RNS aus intaktem Gewebe | 27 |
| 3.1.3.1.2. | Isolierung der Gesamt-RNS aus Zellkulturen | 27 |
| 3.1.3.1.3. | Isolierung der Poly(A) ⁺ RNS..... | 28 |
| 3.1.3.2 | cDNS-Synthese (Herstellung von Erststrang)..... | 29 |
| 3.1.3.3 | Isolierung von Desoxyribonukleinsäuren | 30 |
| 3.1.3.3.1. | Isolierung geringer Mengen Plasmid-DNS | 30 |
| 3.1.3.3.2. | Isolierung großer Mengen von Plasmid-DNS | 31 |
| 3.1.3.4 | Reinigung, Präzipitation und Konzentrationsbestimmung von Ribonukleinsäuren | 32 |
| 3.1.3.5 | Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren / Gewinnung einzelner Fragmente..... | 33 |
| 3.1.3.5.1. | Agarose-Gelelektrophorese | 33 |
| 3.1.3.5.2. | Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 34 |
| 3.1.3.5.3. | Färbung und Dokumentation der Gele | 35 |
| 3.1.3.5.4. | Größenstandards..... | 35 |
| 3.1.3.5.5. | Isolierung einzelner Nukleinsäurefragmente..... | 35 |
| 3.1.3.6 | Präparation von DNS-Fragmenten / Ligationsreaktion..... | 36 |
| 3.1.3.6.1. | Restriktion | 36 |
| 3.1.3.6.2. | Antarctic Phosphatase-Reaktion..... | 36 |
| 3.1.3.6.3. | Ligation von DNS-Fragmenten | 36 |
| 3.1.3.7 | Enzyme | 37 |
| 3.1.4 | Synthese radioaktiv markierter Nukleinsäuren | 37 |
| 3.1.4.1 | Synthese radioaktiv markierter DNS mit Zufallsprimern (Hybridisierungssonden)..... | 37 |

| | | |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.4.2 | Größenauftrennung der radioaktiv markierten DNS durch Säulenchromatographie | 38 |
| 3.1.5 | Northern Blot-Analyse..... | 39 |
| 3.1.5.1 | Immobilisierung von RNS auf Nylonmembranen | 39 |
| 3.1.5.2 | Prähybridisierung und Hybridisierung..... | 40 |
| 3.1.6 | Darstellung und Klonierung von cDNS in E.coli..... | 40 |
| 3.1.6.1 | Erstellung einer cDNS-Bibliothek | 40 |
| 3.1.6.1.1. | cDNS-Synthese | 41 |
| 3.1.6.1.2. | Adapterligation..... | 43 |
| 3.1.6.1.3. | Quantifizierung / TCA-Präzipitation..... | 43 |
| 3.1.6.1.4. | Größenauftrennung der cDNS..... | 44 |
| 3.1.6.1.5. | Ligation der cDNS | 46 |
| 3.1.6.1.6. | Transformation der in den pcDNAII-Vektor ligierten cDNS in E.coli mittels Elektroporation | 46 |
| 3.1.6.2 | Identifizierung und Isolierung von positiven Klonen | 49 |
| 3.1.6.2.1. | Herstellung eines spiegelgleichen Duplikats..... | 49 |
| 3.1.6.2.2. | Denaturierung und Fixierung der DNS | 50 |
| 3.1.6.2.3. | Hybridisierung der Filter mit radioaktiven Sonden..... | 50 |
| 3.1.6.2.4. | Isolierung positiver Klone | 51 |
| 3.1.6.2.5. | Darstellung reiner Klone | 52 |
| 3.1.7 | Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction (PCR))..... | 53 |
| 3.1.7.1 | Prinzipien der PCR | 53 |
| 3.1.7.2 | Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden | 53 |
| 3.1.7.3 | PCR-Polymerasen..... | 53 |
| 3.1.7.3.1. | Taq-Polymerase..... | 53 |
| 3.1.7.3.2. | Phusion-Polymerase | 54 |
| 3.1.7.4 | One-Step-RT-PCR..... | 56 |
| 3.1.7.5 | DNS-Sequenzierung mit dem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer | 57 |
| 3.1.8 | Isolierung von Mauskardiomyozyten..... | 58 |
| 3.1.8.1 | Isolierung embryonaler Maus-Kardiomyozyten | 58 |
| 3.1.8.2 | Isolierung adulter Mauskardiomyozyten | 59 |
| 3.2 | Proteinbiochemie..... | 59 |
| 3.2.1 | Co-Immunopräzipitation | 59 |
| 3.2.2 | Cross-Linking-Experiment mit BS ³ | 60 |
| 3.3 | Elektrophysiologie | 60 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.1 Zellkultur und Transfektion | 61 |
| 3.3.2 Elektrophysiologische Messungen..... | 61 |
| 3.3.2.1 Verwendete Pipetten | 61 |
| 3.3.2.2 Messprotokoll | 61 |
| 3.3.2.3 Messung und Auswertung der Einzelparameter | 62 |
| 3.4 Fluoreszenzexperimente | 63 |
| 3.4.1 Zellkultur und Transfektion | 63 |
| 3.5 Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer, Lösungen und Medien | 63 |
| 3.5.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden..... | 63 |
| 3.5.2 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden..... | 67 |
| 3.5.3 Puffer und Lösungen für elektrophysiologische Methoden | 67 |
| 3.5.4 Puffer und Lösungen zur Präparation eukaryotischer Zellen..... | 68 |
| 3.5.5 Medien | 68 |
| 3.5.5.1 Nähr- und Lagermedien | 68 |
| 3.5.5.1.1 Flüssigkultur..... | 68 |
| 3.5.5.1.2 Plattenkultur | 69 |
| 3.5.5.2 Lagermedien | 69 |
| 3.6 Chemikalien | 70 |
| 4 Ergebnisse..... | 71 |
| 4.1 Identifizierung, Klonierung und Charakterisierung von CaV β 2- Spleißvarianten in Mausherz..... | 71 |
| 4.1.1 Identifizierung von CaV β 2-Spleißvarianten | 71 |
| 4.1.1.1 Auswahl der Spezies für das zu untersuchende Herzgewebe | 72 |
| 4.1.1.2 Motivation zur Fokussierung auf die Identifikation von CaV β 2- Spleißvarianten | 72 |
| 4.1.1.2.1. Veränderung der CaV β 2-Laufeigenschaften im Gel durch posttranslationale Modifikationen..... | 73 |
| 4.1.1.2.2. Veränderung der CaV β 2-Laufeigenschaften im Gel durch Entwicklungsstadium-spezifische alternative Spleißvorgänge der CaV β 2-Untereinheit | 74 |
| 4.1.1.3 Nomenklatur der CaV β 2-Spleißvarianten..... | 75 |
| 4.1.1.4 Vorgehen zur Identifizierung von CaV β 2-Spleißvarianten in Mausherz... 76 | |
| 4.1.1.4.1. Nachweis von CaV β 2-mRNS in Mausherz..... | 76 |
| 4.1.1.4.2. Entscheidung zur Erstellung von cDNS-Bibliotheken als Methode der Wahl | 77 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1.1.4.3. Strategie zur Erstellung geeigneter cDNS-Bibliotheken..... | 78 |
| 4.1.1.4.4. cDNS-Synthese..... | 78 |
| 4.1.1.4.5. Screening der cDNS-Bibliothek auf CaV β 2-Klone..... | 79 |
| 4.1.1.4.6. Untersuchung der CaV β 3-Untereinheit..... | 79 |
| 4.1.1.5. Auswertung der mittels der cDNS-Bibliotheken erhaltenen CaV β 2- Klone..... | 81 |
| 4.1.1.5.1. Isolierung von vier N-terminalen Spleißvarianten der CaV β 2- Untereinheit aus Mausherzgewebe..... | 83 |
| 4.1.1.5.2. Definition der Exons, Exon-Intron-Grenzen und konstanten bzw. variablen Regionen der CaV β 2-Untereinheit..... | 83 |
| 4.1.1.5.3. Betrachtung der Aminotermini der CaV β 2-Untereinheit..... | 86 |
| 4.1.1.5.4. CaV β 2-N2..... | 87 |
| 4.1.1.5.5. N-terminale CaV β 2-Spleißvarianten und ihr Expressionsverhältnis in Mausherzgewebe unterschiedlicher Entwicklungsstadien..... | 88 |
| 4.1.2. Polymerase-Kettenreaktion mit isolierten Kardiomyozyten..... | 89 |
| 4.1.2.1. One-Step RT-PCR mit isolierten Kardiomyozyten..... | 89 |
| 4.1.2.1.1. One-Step RT-PCR mit aus adulten Tieren isolierten Kardiomyozyten..... | 91 |
| 4.1.2.1.2. One-Step RT-PCR mit Kardiomyozyten, die aus Mausembryonen (E13.5) isoliert wurden..... | 91 |
| 4.1.2.1.3. One Step RT-PCR mit ES-Zellen von Maus und mit Kardiomyozyten, die aus ES-Zellen differenziert wurden..... | 93 |
| 4.1.2.2. One-Step RT-PCR mit einzelnen isolierten Kardiomyozyten..... | 94 |
| 4.1.3. Untersuchung der CaV β 2-Varianten auf Proteinebene..... | 96 |
| 4.1.3.1. Expression der CaV β 2-Varianten und Western Blot–Untersuchungen..... | 97 |
| 4.1.3.2. Interaktion der CaV β 2–Isoformen untereinander..... | 98 |
| 4.1.3.2.1. Co-Immunopräzipitation von CaV β 2–Spleißvarianten..... | 98 |
| 4.1.3.2.2. Cross-linking-Experiment mit CaV β 2–Spleißvarianten..... | 100 |
| 4.1.4. Elektrophysiologische Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung der CaV β 2a-Spleißvarianten als Ca ²⁺ -Kanal- Untereinheiten..... | 101 |
| 4.1.4.1. Einfluss der CaV β 2a-Varianten auf die Strom-Spannungs-Kurve..... | 101 |
| 4.1.4.2. Einfluss der CaV β 2a-Varianten auf Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften des L-Typ Ca ²⁺ -Kanals..... | 103 |

| | | |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1.4.2.1. | Einfluss der CaV β 2a-Spleißvarianten auf die Steady-State Inaktivierung bzw. Aktivierung | 104 |
| 4.1.4.2.2. | Einfluss der CaV β 2a-Spleißvarianten auf die Inaktivierungs- und Aktivierungskinetik | 105 |
| 4.1.4.3 | Zusammenfassung der in den elektrophysiologischen Messungen erhaltenen Ergebnisse | 108 |
| 4.1.4.4 | Einfluss eines CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins auf die L-Typ Ca ²⁺ -Kanaleigenschaften..... | 109 |
| 4.1.4.4.1. | Auswirkungen des CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins auf die Strom-Spannungs-Kurve des L-Typ Ca ²⁺ -Kanals | 111 |
| 4.2 | Klonierung der CaV α _{1.2} -Untereinheit..... | 113 |
| 4.2.1 | Klonierungsstrategie | 114 |
| 4.2.2 | Ergebnisse der CaV α _{1.2} -Amplifikation aus Erststrang | 115 |
| 4.2.2.1 | Definition der Exons der CaV α _{1.2} -Untereinheit | 116 |
| 4.2.2.2 | Vergleich der erhaltenen CaV α _{1.2} -cDNS-Klone | 118 |
| 4.2.3 | Screening der zufallsgeprägten P7-cDNS-Bibliothek auf CaV α _{1.2} -Klone..... | 128 |
| 4.3 | Fluoreszenzexperimente..... | 130 |
| 4.3.1 | Klonierung von fluoreszenzmarkierten CaV α _{1.2} - und CaV β 2-Untereinheiten..... | 131 |
| 4.3.1.1 | Klonierungsstrategie zur Fusion der Fluoreszenzproteine mit den Untereinheiten..... | 132 |
| 4.3.1.2 | Transfektion, Expression und Lichtmikroskopie..... | 133 |
| 4.3.1.2.1. | Expression des CaV β 2a-mRFP-Fusionsproteins in HEK293-Zellen.... | 134 |
| 4.3.1.2.2. | Expression des CaV α _{1.2} -s-pHluorin-Fusionsproteins in HEK293-Zellen..... | 135 |
| 4.3.1.2.3. | Expression des CaV β 2a-N4-mRFP-Fusionsproteins in HEK293-Zellen in Anwesenheit einer nicht fluoreszenzmarkierten CaV α _{1.2} -Untereinheit..... | 136 |
| 4.3.1.2.4. | Expression des CaV α _{1.2} -s-pHluorin-Fusionsproteins in HEK293-Zellen in Anwesenheit einer nicht fluoreszenzmarkierten CaV β 2a-Untereinheit..... | 137 |
| 4.3.1.2.5. | Koexpression der CaV β 2a-N4-mRFP- und CaV α _{1.2a} -s-pHluorin-Fusionsproteine in HEK293-Zellen..... | 138 |

| | | |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.3.1.3 | Konfokalmikroskopische Aufnahmen des CaV α_1 1.2-s-pHluorin-Fusionsproteins in HEK293-Zellen | 139 |
| 4.4 | Anhang 1 | 141 |
| 4.4.1 | Auswirkungen des CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins auf die Steady-State Inaktivierung bzw. Aktivierung im Vergleich zu CaV β 2a-N1, CaV β 2a-N4 und CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4..... | 141 |
| 4.4.2 | Auswirkungen des CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins auf die Inaktivierungs- und Aktivierungskinetik im Vergleich zu CaV β 2a-N1, CaV β 2a-N4 und CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4 | 142 |
| 4.4.3 | Zusammenfassung der in den elektrophysiologischen Messungen erhaltenen Ergebnisse | 145 |
| 4.5 | Anhang 2 | 147 |
| 4.5.1 | Elektrophysiologische Untersuchungen der mit einem Fluoreszenzprotein fusionierten CaV α_1 1.2a- und CaV β 2-Untereinheiten..... | 147 |
| 5 | Diskussion | 150 |
| 5.1 | Identifizierung von CaV β 2-Spleißvarianten | 150 |
| 5.1.1 | Western Blot-Analyse - Vergleich mit den Ergebnissen von Haase et al. (61) | 150 |
| 5.1.1.1 | Einfluss posttranslationaler Modifikationen auf die Western Blot-Analyse | 152 |
| 5.1.1.2 | Existenz einer unbekanntes fetalen CaV β 2-Spleißvariante..... | 154 |
| 5.1.2 | Systematische Untersuchung von CaV β 2-Spleißvarianten - Methodik..... | 154 |
| 5.1.2.1 | Takahashi et al. (146)..... | 154 |
| 5.1.2.2 | Foell et al. (50)..... | 155 |
| 5.1.2.3 | Herzig et al. (67) | 155 |
| 5.1.2.4 | Harry et al. (63)..... | 155 |
| 5.1.2.5 | Methodenvergleich der vorgestellten Arbeiten..... | 156 |
| 5.1.3 | Vergleich identifizierter CaV β 2a-Spleißvarianten in Mausherz..... | 158 |
| 5.1.3.1 | N2-Terminus..... | 159 |
| 5.1.3.2 | N3-Terminus..... | 159 |
| 5.1.3.3 | V2-Region..... | 160 |
| 5.1.3.4 | V3-Region..... | 160 |
| 5.1.3.5 | Kopplung von Spleißvorgängen der V1- und V2-Region | 160 |

| | | |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.1.3.6 | Abschließende Bemerkungen zu in Herzgewebe vorhandenen CaV β 2-Spleißvarianten | 161 |
| 5.1.4 | Expressionsverhältnis der CaV β 2-Spleißvarianten in Mausherz | 161 |
| 5.1.4.1 | Untersuchung des entwicklungsabhängigen Expressionsverhältnisses der CaV β 2-Spleißvarianten..... | 161 |
| 5.1.4.1.1. | Zusammensetzung in der Western Blot-Analyse sichtbarer Banden erläutert anhand der Ergebnisse der cDNS-Bibliotheken..... | 162 |
| 5.1.4.1.2. | Veränderung des in der Western Blot-Analyse sichtbaren CaV β 2-Bandenmusters | 164 |
| 5.1.4.2 | Vergleich des aus den cDNS-Bibliotheken erhaltenen Expressionsverhältnisses der CaV β 2-Spleißvarianten mit der Publikation von Haase et al. (61)..... | 165 |
| 5.1.4.3 | Vergleich des aus den cDNS-Bibliotheken erhaltenen Expressionsverhältnisses der CaV β 2-Spleißvarianten mit der Publikation von Herzig et al. (67)..... | 167 |
| 5.1.5 | Rekonstituierung des Bandenmusters in der Western Blot-Analyse mit den durch die cDNS-Bibliotheken identifizierten CaV β 2-Spleißvarianten..... | 168 |
| 5.2 | Polymerase-Kettenreaktion mit isolierten Kardiomyozyten | 169 |
| 5.2.1 | One-Step RT-PCR mit isolierten Kardiomyozyten..... | 169 |
| 5.2.2 | One-Step RT-PCR mit einzelnen isolierten adulten Mauskardiomyozyten..... | 170 |
| 5.3 | Untersuchung der CaV β 2-Untereinheit auf Proteinebene | 172 |
| 5.3.1 | Interaktion der CaV β 2-Isoformen | 172 |
| 5.4 | Funktionelle Charakterisierung der verschiedenen CaV β 2a-Varianten mittels elektrophysiologischer Untersuchungen | 173 |
| 5.4.1 | Herzig et al. (67) | 173 |
| 5.4.2 | Takahashi et al. (146)..... | 174 |
| 5.4.3 | Foell et al. (50)..... | 175 |
| 5.4.4 | Zusammenfassung der Ergebnisse der zitierten Publikationen 50, 146 und 67 und Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit..... | 176 |
| 5.4.4.1 | Vergleich der aus den cDNS-Bibliotheken erhaltenen Expressionsverhältnisse mit den elektrophysiologischen Charakteristika der Ca ²⁺ -Ströme in Gegenwart der CaV β 2a-Spleißvarianten | 180 |

| | | |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.4.5 | Repräsentation physiologischer Vorgänge in nativen Kardiomyozyten durch heterologe Expressionssysteme | 181 |
| 5.4.6 | Vergleich der Eigenschaften der Ca^{2+} -Ströme in nativen Kardiomyozyten mit denen der Ca^{2+} -Ströme im heterologen Expressionssystem HEK293 | 182 |
| 5.4.7 | Einfluss des $\text{CaV}\beta 2\text{a-N1-CaV}\beta 2\text{a-N4}$ -Fusionsproteins auf die Eigenschaften des L-Typ Ca^{2+} -Stroms..... | 183 |
| 5.5 | Klonierung der $\text{CaV}\alpha_1 1.2$ -Untereinheit..... | 185 |
| 5.5.1 | Vergleich der Spleißmuster der $\text{CaV}\alpha_1 1.2$ -Untereinheit in glatter Muskulatur mit Herzmuskulatur | 185 |
| 5.5.1.1 | Vergleich des Spleißmusters des N-Terminus von $\text{CaV}\alpha_1 1.2$ | 186 |
| 5.5.1.2 | Vergleich des Spleißmusters des Exon 8 | 186 |
| 5.5.1.3 | Vergleich des Spleißmusters des Exon 9A | 187 |
| 5.5.1.4 | Vergleich des Spleißmusters von Exon 17 | 187 |
| 5.5.1.5 | Vergleich des Spleißmusters der Exons 21 und 22..... | 188 |
| 5.5.1.6 | Vergleich des Spleißmusters der Exons 31 und 32..... | 188 |
| 5.5.1.7 | Vergleich des Spleißmusters des Exon 33 | 189 |
| 5.5.2 | Vergleich der Spleißmuster der $\text{CaV}\alpha_1 1.2$ -Untereinheit in fetalem bzw. adultem Herzgewebe..... | 189 |
| 5.5.2.1 | Vergleich des Exon 16* mit der Literatur..... | 190 |
| 5.6 | Fluoreszenzexperimente | 191 |
| 5.6.1 | Expression eines $\text{CaV}\beta 2\text{a- mRFP}$ -Fusionsproteins in HEK293-Zellen..... | 191 |
| 5.6.2 | Expression des $\text{CaV}\alpha_1 1.2\text{-s-pHluorin}$ -Fusionsproteins in HEK-Zellen..... | 193 |
| 5.6.3 | Koexpression des $\text{CaV}\alpha_1 1.2\text{-s-pHluorin-}$ mit dem $\text{CaV}\beta 2\text{a-N4-mRFP}$ -Fusionsprotein in HEK293-Zellen | 193 |
| 5.6.4 | Konfokalmikroskopie der $\text{CaV}\alpha_1 1.2$ -Untereinheit | 195 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 197 |
| 7 | Publikationen / Dank | 215 |
| 8 | Lebenslauf..... | 217 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: Nomenklatur spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (modifiziert nach <i>Jurkat-Rott und Lehmann-Horn (75)</i> , bzw. <i>Ertel et al. (45)</i>)..... | 7 |
| Abbildung 2: schematischer Ablauf der elektromechanischen Kopplung | 8 |
| Abbildung 3: schematischer Aufbau des HVA Ca^{2+} -Kanals modifiziert nach <i>Stotz et al. (143)</i> | 10 |
| Abbildung 4: Aufbau der $\text{CaV}\alpha_1$ 1.2-Untereinheit des L-Typ Ca^{2+} -Kanals mit ihren zugehörigen Untereinheiten modifiziert nach <i>Stotz et al. (143)</i> | 11 |
| Abbildung 5: schematischer Aufbau der $\text{CaV}\beta$ 2-Untereinheit | 12 |
| Abbildung 6: Aufbau der $\text{CaV}\beta$ 2a-Untereinheit nach <i>van Petegem et al, 2004</i> | 12 |
| Abbildung 7: Western Blot mit mikrosomalen Proteinfractionen isoliert aus Herzgewebe von Mäusen unterschiedlicher Altersstufen..... | 19 |
| Abbildung 8: Versuchsablauf mit dem Rediprime II Random Prime Labelling System. | 38 |
| Abbildung 9: Elutionskurve der cDNS-Fragmente | 39 |
| Abbildung 10: Vorgehen zur Erstellung von Verdünnungsreihen | 47 |
| Abbildung 11: Schritte zur Erstellung einer cDNS-Bibliothek im Flussdiagramm | 48 |
| Abbildung 12: Fotografien eines bewachsenen Filters und des verwendeten Metallstempels (rechts)..... | 49 |
| Abbildung 13: Fotografie eines beispielhaft herausgegriffenen Röntgenfilms des ersten Screenings..... | 52 |
| Abbildung 14: Fotografie eines beispielhaft herausgegriffenen Röntgenfilms des zweiten Screenings | 52 |
| Abbildung 15: Westernblot mit mikrosomalen Proteinfractionen aus Herzgewebe von Tieren unterschiedlichen Alters, inkubiert mit Antikörpern, die gegen $\text{CaV}1.2$, $\text{CaV}\beta$ 2 und $\text{CaV}\beta$ 3 gerichtet sind..... | 73 |
| Abbildung 16: Northern Blot mit Mauserz-mRNS nach Hybridisierung mit einer $\text{CaV}\beta$ 2-spezifischen Sonde..... | 77 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 17: Lage des spezifischen Oligodesoxynukleotid-Primers (GSP) sowie der C1- bzw. C2-Sonde in Bezug auf die Regionen der CaV β 2-Untereinheit | 79 |
| Abbildung 18: Vergleich der C1-Region der CaV β 2- und CaV β 3-Untereinheit..... | 80 |
| Abbildung 19: Vergleich der C2-Region der CaV β 2- und CaV β 3-Untereinheit..... | 80 |
| Abbildung 20: Fragmentlängen der aus den cDNS-Bibliotheken isolierten CaV β 2-Klone | 81 |
| Abbildung 21: Vergleich der genomischen Sequenz des Exon 7C von Mensch und Maus; der Sequenzunterschied ist rot markiert. | 85 |
| Abbildung 22: Reihenfolge der Exons auf dem CaV β 2-Gen | 85 |
| Abbildung 23: Isolierte adulte Kardiomyozyten im Lichtmikroskop in unterschiedlicher Vergrößerung..... | 90 |
| Abbildung 24: Lage der Primer für die PCR mit isolierten Kardiomyozyten..... | 91 |
| Abbildung 25: Elektrophoretisch aufgetrennte DNS-Fragmente, die aus isolierten adulten Kardiomyozyten (m) bzw. mit dem jeweiligen Kontrollplasmid (c) als Matrize amplifiziert wurden..... | 91 |
| Abbildung 26: One-Step RT-PCR mit isolierten embryonalen Kardiomyozyten (E13.5)..... | 92 |
| Abbildung 27: CaV β 2a-N1-Amplifikate unterschiedlicher Größe | 92 |
| Abbildung 28: One Step RT-PCR mit zu Kardiomyozyten ausdifferenzierten bzw. undifferenzierten ES-Zellen..... | 94 |
| Abbildung 29: Einzelzell-PCR mit adulten Kardiomyozyten (Forward-Primer: CaV β 2a-N4 u. CaV β 2a-N1)..... | 95 |
| Abbildung 30: Einzelzell-PCR mit adulten Kardiomyozyten (CaV β 2a-N5 u. CaV β 2a-N1)..... | 95 |
| Abbildung 31: Westernblot-Analyse der in COS-Zellen exprimierten CaV β 2-Varianten | 97 |
| Abbildung 32: Co-Immunopräzipitation von CaV β 2-N1 und -N4-Untereinheiten | 99 |
| Abbildung 33: Cross-linking von CaV β 2a-N1 und -N4-Untereinheiten | 100 |
| Abbildung 34: Strom-Spannungs-Kurven bei Koexpression der CaV α 1.2-Untereinheit mit unterschiedlichen CaV β 2a-Isoformen..... | 102 |
| Abbildung 35: Beeinflussung der Steady-State Inaktivierung bzw. Aktivierung durch die CaV β 2a-Spleißvarianten..... | 104 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 36: Residualströme 400 ms nach Depolarisation in Abhängigkeit der CaV β 2a-Spleißvarianten..... | 105 |
| Abbildung 37: Einfluss der CaV β 2a-Spleißvarianten auf die Aktivierungskinetik der Ca ²⁺ -Ströme gemessen als Zeit, während der der Strom nach Depolarisation seine maximale Amplitude (peak) erreicht. | 106 |
| Abbildung 38: Einfluss der CaV β 2a-Spleißvarianten auf die Aktivierungszeitkonstante (τ_{act})..... | 107 |
| Abbildung 39: Aufbau des CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins..... | 110 |
| Abbildung 40: Einfluss des CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins auf die Strom- Spannungs-Kurve | 111 |
| Abbildung 41: Ergebnis der Erststrang-PCR für CaV α 1.2b bzw. -a | 115 |
| Abbildung 42: Transmembrantopologie von CaV1.2 von Maus mit Darstellung der Exons der Maus-CaV α 1.2-Untereinheit und der angegebenen Spleißorte..... | 117 |
| Abbildung 43: Alignment der aus Firststrand von Maus isolierten CaV α 1.2-cDNS dieser Arbeit mit den in GenBank publizierten CaV α 1.2-cDNS-Sequenzen. | 127 |
| Abbildung 44: unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung des Exon 50 mit Valin bzw. Alanin..... | 128 |
| Abbildung 45: Transportweg der CaV α 1.2-Untereinheit zur Plasmamembran (grau unterlegte Kompartimente) und der den Zellkompartimenten zugehörigen pH-Werte modifiziert nach <i>Grabe et al.</i> (56) | 132 |
| Abbildung 46: Expression von s- bzw. r-pHluorin in HEK293-Zellen..... | 134 |
| Abbildung 47: Expression des CaV β 2a-N1-mRFP-Fusionsproteins in HEK293-Zellen in Abwesenheit einer CaV α 1.2-Untereinheit. | 135 |
| Abbildung 48: Expression des CaV α 1.2a-s-pHluorin-Fusionsproteins in HEK293- Zellen. Das pHluorin ist in die extrazelluläre IIS5-IIS6-Schleife der CaV α 1.2a-Untereinheit integriert..... | 135 |
| Abbildung 49: Expression des CaV β 2a-N4-mRFP-Fusionsproteins in HEK293-Zellen in Anwesenheit der nicht fluoreszenzmarkierten CaV α 1.2-Untereinheit..... | 136 |
| Abbildung 50: Expression des CaV α 1.2a-s-pHluorin-Fusionsproteins, s-pHluorin im Extrazellulärloop, in HEK293-Zellen in Anwesenheit der nicht fluoreszenzmarkierten CaV β 2-N4-Untereinheit..... | 137 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 51: Koexpression des CaV β 2a-N4-mRFP- mit dem CaV α _{1.2} a-s-pHluorin-Fusionsprotein in HEK293-Zellen..... | 138 |
| Abbildung 52: Konfokalmikroskopische Aufnahmen des CaV α _{1.2} a-s-pHluorin-Fusionsproteins in HEK293-Zellen | 140 |
| Abbildung 53: Beeinflussung der Steady-State Inaktivierung bzw. Aktivierung des CaV1.2-Kanals in Gegenwart des CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins im Vergleich zu CaV β 2a-N1, CaV β 2a-N4 und CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4..... | 141 |
| Abbildung 54: Residualströme 400 ms nach Depolarisation in Abhängigkeit von dem CaV β 2a-N1- CaV β 2a-N4-Fusionsprotein im Vergleich zu CaV β 2a-N1, CaV β 2a-N4 und CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4 | 143 |
| Abbildung 55: Einfluss des CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins auf die Aktivierungskinetik der Ca ²⁺ -Ströme im Vergleich zu CaV β 2a-N1, CaV β 2a-N4 und CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4 gemessen als die Zeit, während der der Strom nach Depolarisation seine maximale Amplitude erreicht | 144 |
| Abbildung 56: Einfluss des CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins auf die Aktivierungszeitkonstante τ_{act} im Vergleich zu CaV β 2a-N1, CaV β 2a-N4 und CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4 | 145 |
| Abbildung 57: Vergleich der Western Blot-Analyse dieser Arbeit mit denen der Publikation von <i>Haase et al.</i> (61)..... | 151 |
| Abbildung 58: graphische Darstellung des Verlaufs der Signalstärken der beiden Banden in der Western Blot-Analyse | 166 |
| Abbildung 59: graphische Darstellung des Expressionsverhältnisses der CaV β -Spleißvarianten in adultem menschlichen Ventrikelmyokard nach <i>Herzig et al.</i> (67) | 167 |
| Abbildung 60: Vergleich von C-terminal mit einem Fluoreszenzprotein fusionierten CaV β 2a-Untereinheiten..... | 192 |
| Abbildung 61: Vergleich der Expression der mit einem Fluoreszenzprotein fusionierten CaV α _{1.2} -Untereinheiten | 193 |
| Abbildung 62: Koexpression der CaV α _{1.2} -s-pHluorin- mit dem CaV β 2a-mRFP-Fusionsprotein in HEK293-Zellen..... | 194 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 63: Vergleich konfokalmikroskopischer Bilder der in HEK293-Zellen transfizierten fluoreszenzmarkierten CaV α_1 1.2-Untereinheit..... | 196 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

Tabellenverzeichnis

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1: Gewebespezifische Expression von CaV β -Untereinheiten modifiziert nach <i>Birnbaumer et al.</i> (11)..... | 12 |
| Tabelle 2: Beispiel zur Bestimmung der zu verwendenden Elutionsfraktionen | 45 |
| Tabelle 3: Historie der cDNS-Klonierung der bekannten N-terminalen Spleißvarianten CaV β 2-N1, -N2, -N3, -N4, -N5 und -N6 der CaV β 2-Untereinheit aus verschiedenen Geweben; <i>Foell et al.</i> (50) und <i>Hullin et al.</i> (72) beschreiben zudem Varianten der V2-Region (CaV β 2a, b, c und d). | 75 |
| Tabelle 4: AS-Sequenzen alternativ gespleißter Exons der V2-Region (Quelle: menschliches Herzgewebe (50))..... | 76 |
| Tabelle 5: Nomenklatur der N-terminalen Spleißvarianten nach <i>Foell et al.</i> (50); das x steht für die Variabilität der V2-Region, da keine N-terminale Spleißform einer spezifischen V2-Variante zugeordnet werden kann. | 76 |
| Tabelle 6: Übersicht der erstellten cDNS-Bibliotheken..... | 82 |
| Tabelle 7: N-terminale AS-Sequenzen der aus Mauserz isolierten CaV β 2a- Spleißvarianten; die Aminosäurereste GSA bilden den N-terminalen Beginn der C1-Region, die in allen CaV β 2-Untereinheiten identisch ist..... | 83 |
| Tabelle 8: Definition der Exons des CaV β 2-Gens von Maus orientiert an den Nomenklatur von <i>Foell et al.</i> (50), die sich auf die Exons von Mensch bezieht..... | 84 |
| Tabelle 9: Exon–Intron-Grenzen des CaV β 2-Gens (Intronsequenzen in Kleinbuchstaben) | 86 |
| Tabelle 10: AS-Alignment der CaV β 2-N1, -N4 und - N4 N-Termini von Maus, Mensch, Ratte und Schimpanse; Aminosäureaustausche sind grün markiert | 87 |
| Tabelle 11: Vergleich der Aminosäuresequenz des ersten Exons des N2-Terminus unterschiedlicher Spezies; Aminosäureaustausche sind grün markiert | 88 |
| Tabelle 12: Vergleich der in der P7- bzw. Adult-GSP-cDNS-Bibliothek detektierten CaV β 2a-Spleißvarianten; in Klammern die jeweiligen Prozentsätze der Spleißvarianten in Bezug auf die Gesamtheit der analysierten Klone der cDNS-Bibliothek | 88 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabelle 13: Verhältnis aus den P7-GSP- bzw. -Random-cDNS-Bibliotheken isolierten CaV β 2a-Spleißvarianten..... | 89 |
| Tabelle 14: Insert eines CaV β 2a-N1-Klons; Stopkodons in Rot, Orange gekennzeichnet nicht eindeutig sequenzierte Nukleotide..... | 93 |
| Tabelle 15: Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse der Expression von CaV β 2-Spleißvarianten in Herz von Maus..... | 96 |
| Tabelle 16: Länge der Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen sowie Molekulargewichte der CaV β 2a-Spleißvarianten..... | 97 |
| Tabelle 17: Vergleich der Ca ²⁺ -Strom-Eigenschaften bei Koexpression der CaV α _{1.2} -Untereinheit mit verschiedenen CaV β 2a-Varianten..... | 103 |
| Tabelle 18: Beeinflussung der Steady-State Inaktivierung bzw. -Aktivierung des L-Typ Ca ²⁺ -Kanals durch die CaV β 2a-Spleißvarianten..... | 105 |
| Tabelle 19: Vergleich der Inaktivierungsraten r ₄₀₀ der CaV β 2a-Spleißvarianten für verschiedene Testpotenziale..... | 106 |
| Tabelle 20: Vergleich der Time-to-peak-Werte der Ca ²⁺ -Ströme in Gegenwart der CaV β 2a-Spleißvarianten bei den angegebenen Testpotenzialen..... | 107 |
| Tabelle 21: Werte der Aktivierungszeitkonstante τ_{act} für Ströme, die in Gegenwart der CaV β 2a-Spleißvarianten durch Depolarisation auf 0 mV aktiviert werden. ... | 108 |
| Tabelle 22: Kanal- und Stromeigenschaften, die durch einzelne CaV β 2a-Spleißvarianten signifikant beeinflusst werden..... | 109 |
| Tabelle 23: Vergleich der Ca ²⁺ -Strom-Eigenschaften des CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins im Vergleich zu CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4 sowie CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4..... | 112 |
| Tabelle 24: Definition der Exons der CaV α _{1.2} -Untereinheit in Maus nach <i>Soldatov et al.</i> (140)..... | 116 |
| Tabelle 25: Vergleich der erhaltenen CaV α _{1.2} Klone hinsichtlich differierender Exons .. | 118 |
| Tabelle 26: AS-Sequenzen der Exons 17* und 33*; die Unterschiede zu den Exons 17 und 33 sind rot markiert..... | 119 |
| Tabelle 27: Funktionen der jeweiligen Exon-Spleißorte..... | 120 |
| Tabelle 28: Übersicht über „Fundorte“ der Spleißvarianten in verschiedenen Spezies..... | 121 |
| Tabelle 29: Komplette Exonfolge der mittels Erststrangamplifikation erhaltenen Klone (in Ergänzung zu Tabelle 25)..... | 122 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabelle 30: publizierte Exonfolge der aus DNS-Teilfragmenten zusammengesetzten CaV α_1 1.2-Untereinheiten | 123 |
| Tabelle 31: Exonfolge der aus der zufallsgeprimerten P7-Bank erhaltenenen cDNS-CaV α_1 1.2-Klone; Exons, die Spleißvorgängen unterliegen, sind rot markiert, nicht eindeutig sequenzierte Exons in orange..... | 129 |
| Tabelle 32: Vergleich der P7-CaV α_1 1.2-Klone in Bezug auf spleißrelevante Exons | 129 |
| Tabelle 33: AS-Sequenz des Exon 16* | 130 |
| Tabelle 35: Beeinflussung der Steady-State Inaktivierung bzw. -Aktivierung des L-Typ Ca ²⁺ -Kanals durch das Fusionsprotein im Vergleich zu CaV β 2a-N1, CaV β 2a-N4 und CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4 | 142 |
| Tabelle 35: Vergleich der Inaktivierungsraten r_{400} für verschiedene Testpotenziale unter Einfluss des CaV β 2a-N1- CaV β 2a-N4-Fusionsproteins im Vergleich zu CaV β 2a-N1, CaV β 2a-N4 und CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4..... | 143 |
| Tabelle 36: Vergleich der Time-to-peak-Werte der Ströme bei 0 mV Testpotenzial in Gegenwart des CaV β 2a-N1- CaV β 2a-N4-Fusionsproteins im Vergleich zu CaV β 2a-N1, CaV β 2a-N4 und CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4..... | 144 |
| Tabelle 37: Werte der Aktivierungszeitkonstante τ_{act} für Ströme, die durch Depolarisation auf 0 mV aktiviert werden, in Gegenwart des CaV β 2a-N1- CaV β 2a-N4-Fusionsproteins im Vergleich zu CaV β 2a-N1, CaV β 2a-N4 und CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4 | 145 |
| Tabelle 38: Kanal- und Stromeigenschaften, die durch das CaV β 2a-Fusionsproteins im Vergleich zu CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4, CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4 unterschiedlich beeinflusst werden..... | 146 |
| Tabelle 39: Vergleich der gemessenen Parameter in Gegenwart des CaV β 2a-N1-mRFP-Fusionsproteins und CaV α_1 1.2a bzw. CaV β 2a-N1 und CaV α_1 1.2a | 147 |
| Tabelle 40: Vergleich der gemessenen Parameter in Gegenwart des CaV β 2a-N4-mRFP-Fusionsproteins und CaV α_1 1.2a bzw. CaV β 2a-N4 und CaV α_1 1.2a | 148 |
| Tabelle 41: Vergleich des $I_{Ca,0mV}$ in Gegenwart des CaV α_1 1.2a-s-pHluorin- (Fusion des pHluorins in der Extrazellulärschleife) und CaV β 2a-N4-mRFP-Fusionsproteins bzw. CaV α_1 1.2a und CaV β 2a-N4 | 149 |
| Tabelle 42: Aminosäuresequenzen der N-Termini der CaV β 2a-Spleißvarianten mit farbig markierten Phosphorylierungskonsensusstellen..... | 153 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabelle 43: Aussagen, die aufgrund der gewählten experimentellen Vorgehensweise in den gesamten Untersuchungen möglich sind..... | 156 |
| Tabelle 44: Vergleich der mittels cDNS-Bibliotheken erhaltenen für CaV β 2-Spleißvarianten kodierenden Klone..... | 163 |
| Tabelle 45: Relativer Anteil der in den cDNS-Bibliotheken gefundenen Klone an dem 68 kDa- bzw. 74 kDa-Protein | 165 |
| Tabelle 46: Relative Signaldichte der 90 und 85 kDa Proteine im Western Blot nach <i>Haase et al. (61)</i> | 165 |
| Tabelle 47: Zusammenfassung der Ergebnisse von <i>Herzig et al. (67)</i> | 174 |
| Tabelle 48: Einfluss der CaV β 2a-Spleißvarianten auf die Aktivierungseigenschaften des L-Typ Ca ²⁺ -Kanals nach <i>Takahashi et al. (146)</i> | 175 |
| Tabelle 49: Einfluss der CaV β 2a-Spleißvarianten auf die Inaktivierungseigenschaften des L-Typ Ca ²⁺ -Kanals nach <i>Takahashi et al. (146)</i> | 175 |
| Tabelle 50: Zusammenfassung der Ergebnisse bei <i>Foell et al. (50)</i> | 176 |
| Tabelle 51: Vergleich der wichtigsten Parameter der zitierten Studien 50, 146, 67 und dieser Arbeit | 177 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| AMPA | α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure |
| ANOVA | analysis of variance |
| AID | α -interaction domain |
| ABP | α -binding pocket |
| AS | Aminosäure(n) |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | base pairs |
| BS ³ | Bis(Sulfosuccinimidyl) Suberat |
| bspw. | beispielsweise |
| bzw. | beziehungsweise |
| C-Terminus | Carboxylterminus |
| Ca ²⁺ | Calciumion(en) |
| CaMKII | Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Kinase II |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| CaV | calcium channel voltage-dependent |
| cDNS | complementary DNS |
| cmp | counts per minute |
| Cn | konstante Region n |
| COS | cells being CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40 genetic material |
| DBM | Diazobenzylloxymethyl |
| dCTP | Desoxycytosintriphosphat |

| | |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------|
| Da | Dalton |
| DEPC | Diethylenpyrocarbonat |
| d.h. | das heißt |
| DHP | Dihydropyridin |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DNA | deoxyribonucleic acid |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure(n) |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| ddNTP | Didesoxynukleosidtriphosphat |
| DTT | Dithiothreitol; Cleland's Reagenz |
| E.coli | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| eGFP | enhanced GFP |
| En | Embryonaltag n |
| ER | endoplasmatisches Reticulum |
| E_{rev} | Umkehrpotential |
| ES-Zellen | embryonale Stammzellen |
| et al. | et alii (Maskulinum) bzw. et aliae (Femininum) oder et alia (Neutrum) |
| Etbr | Ethidiumbromid |
| EtOH | Ethanol |
| F | Fraktion |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| G_{max} | maximale Leitfähigkeit |
| GMP | Guanosinmonophosphat |
| GTC | Guanidiumthiozyanat |

| | |
|------------------|----------------------------------------|
| H ₂ O | Wasser |
| HEK | human embryonic kidney |
| HPSF | high purity salt free |
| HPLC | high purity liquid chromatography |
| HVA | high voltage activated |
| Hz | Hertz |
| I _{Ca} | Calciumstrom |
| k | Steilheitsfaktor |
| kD | Kilodalton |
| LB | Luria Bertani |
| LTCC | L-type calcium channel |
| LVA | low voltage activated |
| M | Molar |
| MAGUK | membranassoziierte Guanylatkinasen |
| MCS | multiple cloning site |
| µg | Mikrogramm |
| mg | Milligramm |
| min | Minute(n) |
| µl | Mikroliter |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| MOPS | (N-Morpholino)-Propansulfonsäure |
| mRFP | monomeres rot fluoreszierendes Protein |
| mRNS | messenger RNS |
| ms | Millisekunde(n) |

| | |
|-----------------|---------------------------------------------------------------|
| mV | Millivolt |
| Na ⁺ | Natriumion(en) |
| N-Terminus | Aminoterminus |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| NK | Nukleotidkinase |
| NTI-Modul | N-Terminus inhibitorisches Modul |
| nm | Nanometer |
| pA | Picoampère |
| pF | Picofarad |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCR | polymerase chain reaction |
| Pn | postnatal day / Postnataltag n |
| PSD-95 | Postsynaptic density 95 |
| r400 | Inaktivierungsrate nach 400 ms Testpotential |
| RIPA | Radio Immuno Precipitation Assay |
| RNA | ribonucleic acid |
| RNS | Ribonukleinsäure(n) |
| rpm | rounds per minute |
| RT | Raumtemperatur |
| RT | Reverse Transkriptase |
| SA | intrinsische Aktivität |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfate |
| SH3 | Src-homology 3 |
| SNARE | soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor |
| SOC | Super Optimal catabolite repression |

| | |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| sog. | sogenannt/e/er/es |
| SSC | sodium citrate standard |
| STE-Puffer | Sodium Chloride–Tris–EDTA |
| STET-L | Saccharose, Tris-Cl, EDTA, Triton X-100, Lysozym |
| T_{act} | Aktivierungskonstante |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TEN-Puffer | siehe STE-Puffer TES |
| tRNS | Transfer-RNS |
| $V_{1/2, \text{act}}$ | benötigte Spannung zur halbmaximalen Kanalaktivierung aus dem Steady-State |
| $V_{1/2, \text{ss-act}}$ | benötigte Spannung zur halbmaximalen Kanalaktivierung aus dem Steady-State |
| $V_{1/2, \text{ss-inact}}$ | benötigte Spannung zur halbmaximalen Kanalinaktivierung aus dem Steady-State |
| vgl. | vergleiche |
| Vn | variable Region n |
| z.B. | zum Beispiel |

Die elektrophysiologischen Messungen in dieser Arbeit wurden von Frau Dr. Brigitte Held aus der Arbeitsgruppe durchgeführt.

Die proteinbiochemischen Experimente wurden von Herrn Dr. Marcel Meissner aus der Arbeitsgruppe durchgeführt.

Die Isolierung embryonaler Kardiomyozyten von Maus wurde von Frau Dr. Petra Weissgerber in der Arbeitsgruppe durchgeführt.

1 Zusammenfassung

Die Kontraktion des Herzens erfordert einen Ca^{2+} -Einstrom von extrazellulär in die Zellen des Arbeitsmyokards, der die Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher initiiert und die Calciumkonzentration im Cytosol kurzfristig stark ansteigen lässt. Als Folge binden Calciumionen an Troponin C und die Herzkontraktion wird eingeleitet. Während der Embryonalentwicklung ist jedoch das sarkoplasmatische Retikulum, welches den intrazellulären Ca^{2+} -Speicher bildet, noch nicht ausgereift. Somit sind embryonale Kardiomyozyten zunächst allein auf einen, durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vermittelten, Ca^{2+} -Einstrom von außen in die Zellen angewiesen, um die zur Herzkontraktion benötigten Calciumionen bereitzustellen. In adulten Herzmuskelzellen dient der Ca^{2+} -Einstrom dagegen, wie beschrieben, vorwiegend der Initiierung der Ca^{2+} -Ausschüttung aus den internen Speichern. Dies bedeutet, dass sich die Anforderungen an die Leitungseigenschaften des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals, CaV1.2, im Verlauf der Herzentwicklung verändern; so müssen in Embryonalstadien große Ca^{2+} -Ströme gewährleistet sein, um die intrazellulär benötigten Calciumionen zur Verfügung zu stellen, während zur Initiierung der Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, wie dies in adulten Herzmuskelzellen geschieht, weit geringere Ca^{2+} -Ströme notwendig sind. Die Größe des Ca^{2+} -Einstroms kann sowohl über die Einzelkanalleitfähigkeit und -offenwahrscheinlichkeit als auch über die Zahl funktioneller Kanäle in der Membran reguliert werden. In dieser Hinsicht ist die CaV β 2-Untereinheit der wichtigste physiologische Modulator des CaV1.2-Kanals, da sie starken Einfluss auf die Leitungseigenschaften und Membranexpression nimmt und somit eine zentrale Rolle in der entwicklungsabhängigen Regulation CaV1.2 vermittelter Ca^{2+} -Ströme besitzt.

Im Herzen werden CaV β 2-Spleißvarianten exprimiert, es ist aber nicht geklärt, weshalb dies der Fall ist und inwieweit sich das Expressionsverhältnis dieser Spleißvarianten abhängig von der normalen Entwicklung oder bei Krankheit ändert. In der Western Blot-Analyse mit Proteinfractionen aus Herz von Maus von Embryonaltag 11.5 bis Postnataltag 27 wandelt sich das Proteinmuster für die CaV β 2-Untereinheit von einem Protein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 74 Kilodalton zu einem von etwa 68 Kilodalton. Inwieweit es sich dabei um die Expression einer bisher unbekanntenen CaV β 2-Untereinheit handelt oder entwicklungsabhängige Spleißvorgänge eine Rolle spielen war bisher nicht bekannt.

Mausmodelle spielen eine zunehmend wichtige Rolle in der präklinischen Forschung und Ergebnisse zur Regulation und Modulation von Ca^{2+} -Strömen sind aktuell publiziert worden, ohne dass klar ist, welche $\text{CaV}\beta 2$ -Spleißvarianten im Herz von Maus exprimiert werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Identifizierung, Klonierung und funktionelle Expression aller in Herzgewebe vorhandenen $\text{CaV}\beta 2$ -Spleißvarianten. Im Rahmen dieser Zielsetzung wurden copy-Desoxyribonukleinsäure (cDNS)-Bibliotheken aus Herzgewebe sieben Tage alter sowie adulter Mäuse erstellt und auf das Vorhandensein von $\text{CaV}\beta 2$ -Varianten hin systematisch analysiert. Insgesamt wurden 60 $\text{CaV}\beta 2$ -cDNS-Klone identifiziert und sequenziert. Es fanden sich vier Spleißvarianten, die ausschließlich in ihrer aminoterminalen Nukleotidsequenz differierten; die relative Häufigkeit der einzelnen Varianten gab gleichzeitig ein Maß für deren Expressionsverhältnis. Des Weiteren konnte das von Antikörpern in Proteinfractionen von Herzmuskel erkannte Proteinmuster im Western Blot rekonstituiert werden, indem die von den cDNS-Klonen gebildeten rekombinanten Proteine untereinander gemischt wurden. Somit wurde gezeigt, dass das spezifische Proteinmuster Folge eines sich ändernden Expressionsverhältnisses der $\text{CaV}\beta 2$ -Spleißvarianten ist und nicht Folge der Expression eines bisher nicht bekannten $\text{CaV}\beta 2$ -Proteins.

Um zu überprüfen, ob die isolierten $\text{CaV}\beta 2$ -Spleißvarianten tatsächlich alle in Kardiomyozyten exprimiert werden und nicht zum Teil aus Fibroblasten oder Zellen der das Herz versorgenden Gefäße stammen, wurden $\text{CaV}\beta 2$ -cDNS-Fragmente aus einzelnen Kardiomyozyten amplifiziert. Dabei wurden cDNS-Fragmente von drei der vier durch die cDNS-Bibliotheken identifizierten $\text{CaV}\beta 2$ -Spleißvarianten nachgewiesen. Ein weiterer, bisher unbekannter Aspekt der durch die Polymerase Ketten-Reaktion erhaltenen Ergebnisse war der Nachweis einer Koexpression mehrerer $\text{CaV}\beta 2$ -Spleißvarianten in einer einzigen Herzmuskelzelle. In proteinbiochemischen Versuchen konnte mittels Co-Immunopräzipitation und Cross-Linking-Experimenten die Interaktion von zwei nativen $\text{CaV}\beta 2$ -Spleißvarianten *in vitro* gezeigt werden. Möglicherweise liegt ein Teil der $\text{CaV}\beta 2$ -Proteine als Dimer vor.

Zusätzlich musste die ionenleitende Pore des Kanals, $\text{CaV}\alpha_1 1.2$, aus Herz von Maus zunächst kloniert werden, um die einzelnen Spleißvarianten funktionell als Kanaluntereinheit exprimieren zu können. Vollängenklone dieser etwa 6500 bp umfassenden cDNS waren zu diesem Zeitpunkt nirgends verfügbar. Insgesamt wurden sechs Vollängen-cDNS kloniert und sequenziert; die Klone konnten entsprechend ihrer Exon-Usage bzw. Exonfolge in zwei Gruppen eingeteilt werden, in $\text{CaV}1.2a$ und $\text{CaV}1.2b$. Durch Koexpression mit der $\text{CaV}1.2a$ -Pore konnten im nächsten Schritt die vier $\text{CaV}\beta 2$ -Varianten hinsichtlich ihrer regulierenden Wirkung auf den Ca^{2+} -Strom charakterisiert werden, wobei sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der

Regulation der Ca^{2+} -Strom-Eigenschaften in Gegenwart der jeweiligen Spleißvariante ergaben. Des Weiteren wurden in vivo-Untersuchungen mit $\text{CaV}\beta 2$ - und $\text{CaV}\alpha_1$ -Untereinheiten, die mit Fluoreszenzproteinen fusioniert waren, begonnen, um den Transport der Untereinheiten vom endoplasmatischen Retikulum über die verschiedenen Zellkompartimente hin zur Membran aufzuzeigen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass durch differenzielle Expression von $\text{CaV}\beta 2$ -Spleißvarianten die Eigenschaften spannungsabhängiger Ca^{2+} -Ströme an sich verändernde Anforderungen des Herzmuskels während der Entwicklung angepasst werden.

Summary

Cardiac contractions require Ca^{2+} influx in cardiomyocytes from the extracellular fluid which leads to Ca^{2+} release from internal stores and a marked increase in intracellular Ca^{2+} concentration for short periods of time. An increased intracellular Ca^{2+} concentration results in Ca^{2+} binding by Troponin C and consequently cardiac contraction. However, in vertebrate embryonic stages, the sarcoplasmic reticulum, the intracellular Ca^{2+} store, is not fully developed. Hence embryonic cardiomyocytes depend on extracellular Ca^{2+} influx mediated by voltage-activated Ca^{2+} channels to provide calcium ions needed for cardiac contraction. By contrast, in adult cardiomyocytes, Ca^{2+} influx mediated by the voltage-activated Ca^{2+} channel CaV1.2 serves predominantly to initiate Ca^{2+} release from internal stores. This suggests that the properties of Ca^{2+} currents change during heart development; during embryonic stages there is a demand for large Ca^{2+} currents to achieve the required intracellular Ca^{2+} concentration whereas in adult cardiomyocytes initiation of Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum only needs small Ca^{2+} currents. The magnitude of Ca^{2+} currents is regulated by the conductance and the open probability of single channels, as well as by the number of channels in the plasma membrane. In this respect, the strongest modulator of voltage-gated Ca^{2+} channels is the CaV β 2 subunit, which affects kinetics and characteristics of Ca^{2+} currents as well as membrane expression of channels and therefore plays a central role in development-dependent regulation of Ca^{2+} currents mediated by CaV1.2.

Several CaV β 2 splice variants are expressed in heart tissue, but it is not evident why there is more than one splice variant. Also, there is only little information about changes in expression ratio of these variants during normal development or under pathophysiological conditions. Western blot analysis using protein fractions from murine hearts of different ages (embryonic day 11.5 to postnatal day 27) shows modification of the CaV β 2 protein during development. There is a change from one protein with a molecular weight of about 74 kilodalton to another of about 68 kilodalton. It is unclear if this is due to the expression of an unknown splice variant or if splicing dependent on development plays a role in this issue.

In preclinical investigations, there is an increasing use of mouse models and recent publications show regulation and modulation of Ca^{2+} -channels by CaV β 2 subunits, but it is unknown which splice variants are expressed in mouse heart. The aim of this study was the identification, cloning and functional expression of CaV β 2 splice variants in mouse heart. Therefore,

seven day old and adult mice were used to generate copy-desoxyribonucleic acid (cDNA) libraries from heart tissue. cDNA libraries were systematically screened for CaV β 2 splice variants whereby 60 CaV β 2 cDNA clones were isolated and their sequence analysed. Four different CaV β 2 isoforms were identified, which differed only in their aminoterminal sequence. The number of clones, which contained DNA sequences coding for specific splice variants allowed an estimate of the expression ratio. To reconstitute the CaV β 2 protein pattern detected by antibodies in protein fractions of mouse heart, recombinant CaV β 2 proteins derived from clones of the cDNS-libraries were used in different mixtures for Western Blot analysis. In this way we could reconstitute the CaV β 2 protein pattern and showed that expression of different CaV β 2 proteins and not the expression of an unknown CaV β 2 splice variant caused these changes in the CaV β 2 protein pattern of mouse heart.

To test whether the four CaV β 2 splice variants are expressed in cardiomyocytes and are not derived from fibroblasts or vascular cells that are also part of heart tissue, cardiomyocytes were isolated and used for polymerase chain reaction (PCR). cDNA fragments coding for three out of four CaV β 2 splice variants were obtained with PCR. PCR results also showed expression of more than one CaV β 2 splice variant in a single cardiomyocyte, which was not known previously. Additional proteinbiochemical approaches showed interaction of two native CaV β 2 splice variants by co-immunoprecipitation and cross-linking experiments. Possibly some of the CaV β 2 subunits form dimers.

We attempted the functional expression of CaV β 2 splice variants as channel subunits in further experiments. This approach required coexpression of the pore forming CaV α _{1.2} subunit cloned from mouse heart, which was not available as a full length cDNA-clone. Overall, six full length cDNS were cloned and their sequence analysed; clones could be distinguished into groups of CaV1.2a and CaV1.2b depending on exon usage. Following coexpression of the CaV1.2a pore and CaV β 2 showed splice variant specific regulation and modulation of Ca²⁺ currents with significant differences in characteristics of Ca²⁺ currents in the presence of distinct splice variants. Furthermore we started investigations of CaV β 2 and CaV α _{1.2} subunit interaction in vivo. Therefore subunits were fused with fluorescent proteins to visualize trafficking of the subunits from the endoplasmic reticulum through different cell compartments to the membrane.

Combined the results of this study we show that a varying expression pattern of CaV β 2 splice variants is used to adapt properties of voltage-activated Ca²⁺ channels to changing myocardial requirements during development.

2 Einleitung

2.1 Ca²⁺-Kanäle

Ca²⁺-vermittelte Signaltransduktionswege nehmen in der Zellphysiologie eine zentrale Stellung ein. Die Geschichte ihrer Entdeckung ist lang und reicht bis in das 19. Jahrhundert zurück. *Sidney Ringer* (128) erkannte 1883 die Notwendigkeit extrazellulärer Calciumionen für die Kontraktionsfähigkeit des Myokards. Im Zuge dieser Entdeckung kam der Gedanke auf, dass Calciumionen als ein Botenstoff agieren könnten. 1947 erbrachten *Heilbrunn und Wiercinski* (65) den Beweis, dass es sich hierbei um einen intrazellulären Signaltransduktionsvorgang handelt. Diese Erkenntnis wies indirekt auf die Existenz und Notwendigkeit von Ca²⁺-Kanälen in der Plasmamembran von Herzmuskelzellen hin. Im Jahre 1967 gelang es *Reuter* (125), Ca²⁺-Ströme in Zellen des Reizleitungssystems des Herzens aufzuzeigen und aufzuzeichnen. Nach zahlreichen funktionellen Untersuchungen wurde 1984 durch *Curtis et al.* (34) das molekularbiologische Korrelat des spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanals aus den transversalen Tubuli des Skelettmuskels isoliert. Im selben Jahr zeigten *Flockerzi et al.* (34), dass aus diesem in vitro ein funktionsfähiger Kanal rekonstituiert werden kann. Insbesondere diese Veröffentlichungen dienten in den folgenden Jahren als Basis für eine Vielzahl von Forschungsansätzen im Bereich Ca²⁺-Kanal-vermittelter Vorgänge.

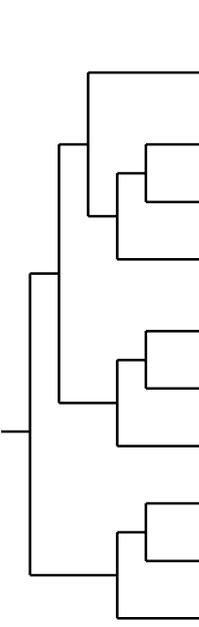
Aktuell unterscheidet man spannungsabhängige, d.h. durch elektrische Stimuli aktivierte, von nicht-spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen, welche unter anderem durch intra- und extrazelluläre Botenstoffe sowie chemische, mechanische und osmotische Reize reguliert werden (118).

2.2 Spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle

Die hier vorgelegte Arbeit fokussiert spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle, die den Haupteintrittsweg für extrazelluläre Calciumionen unterschiedlichster Zelltypen darstellen. Sie werden durch Membrandepolarisationen aktiviert und vermitteln eine chemische Antwort in Form von Ca²⁺-Influx als Folge des elektrischen Stimulus (22). Spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle werden in low voltage activated (LVA) und high voltage activated (HVA) Ca²⁺-Kanäle unterschieden. Die LVA oder T-Typ Kanäle, die die CaV3-Familie bilden, sind unter anderem in

neuronaalem Gewebe vorhanden. Auf diesen Kanaltyp wird im Weiteren nicht näher eingegangen, da er für die Thematik der hier vorgelegten Arbeit keine Rolle spielt.

In Bezug auf HVA Kanäle werden Kanäle unterschieden, die der CaV1- bzw. der CaV2-Familie angehören. Der CaV1-Familie zugehörige Kanäle finden sich vor allem in Muskelgewebe, wohingegen CaV2-Kanäle bevorzugt in neuronalen Geweben exprimiert werden (Abbildung 1). Calciumionen, welche durch spannungsabhängige HVA L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (CaV1-Familie) in die Zelle gelangen, dienen als sekundärer Botenstoff für die Verarbeitung elektrischer Signale und Initiation intrazellulärer Vorgänge wie Kontraktion, Sekretion, synaptische Übertragung und Genexpression. Im Gegensatz dazu vermittelt die CaV2-Familie der HVA Ca^{2+} -Kanäle N-, P/Q- und R-Typ Ca^{2+} -Ströme, welche eine oft G-Protein- bzw. SNARE-Protein-modulierte synaptische Übertragung ermöglichen (22).



| Protein | Primärgewebe | Ca^{2+} -Strom |
|---------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| CaV1.1 | Skelettmuskulatur | L-Typ |
| CaV1.2 | Herzmuskulatur, glatte Muskulatur ferner: Herz, Hypophyse, Nebenniere | L-Typ |
| CaV1.3 | Hirn, Pankreas, Niere, Ovarien | L-Typ |
| CaV1.4 | Retina | L-Typ |
| CaV2.1 | Hirn, Cochlea, Hypophyse | P/Q-Typ |
| CaV2.2 | Hirn, Nervensystem | N-Typ |
| CaV2.3 | Hirn, Cochlea, Retina, Herz, Hypophyse | R-Typ |
| CaV3.1 | Hirn, Nervengewebe | T-Typ |
| CaV3.2 | Hirn, Herz, Niere, Leber | T-Typ |
| CaV3.3 | Hirn | T-Typ |

Abbildung 1: Nomenklatur spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (modifiziert nach *Jurkat-Rott und Lehmann-Horn (75)*, bzw. *Ertel et al. (45)*)

2.3 HVA L-Typ Ca^{2+} -Kanäle

Die $\text{CaV}\alpha_1$ -Untereinheiten der L-Typ Kanäle werden von vier verschiedenen Genen kodiert, CaV1.1 bis CaV1.4 (45), die jeweils durch alternative Spleißvorgänge auf Transkriptionsebene zu zahlreichen Varianten führen. Die Bezeichnung des L-Typ Kanal Subtyps erfolgt nach seiner $\text{CaV}\alpha_1$ -Untereinheit, beispielsweise enthält CaV1.2 die $\text{CaV}\alpha_{1.2}$ -Untereinheit.

Die Gruppe der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle zeichnet sich durch Aktivierung bei Depolarisationen ab etwa -50 mV (deshalb high voltage activated), große Einzelkanalleitfähigkeit, langsame spannungsabhängige sowie schnelle Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung - mit Ausnahme von CaV1.4 -, eine Modulation durch cAMP-abhängige Protein-Phosphorylierungs-Signalwege und spezifische Inhibition durch Ca^{2+} -Kanal-Blocker vom Dihydropyridin-, Phenylalkalamin- und Benzothiazepin-Typ aus (22, 126). Der Name L-Typ ergibt sich aus der Eigenschaft der Ströme dieser Kanäle, mit Bariumionen als Ladungsträger langsam zu inaktivieren, das heißt, sie sind „long lasting“ (112). Die für die Thematik der Arbeit relevante Isoform ist der CaV1.2 L-Typ Kanal. Im Myokard exprimiert (144), sind Kanäle dieses Subtyps involviert in den Vorgang der elektromechanischen Kopplung und somit der Herzkontraktion (44).

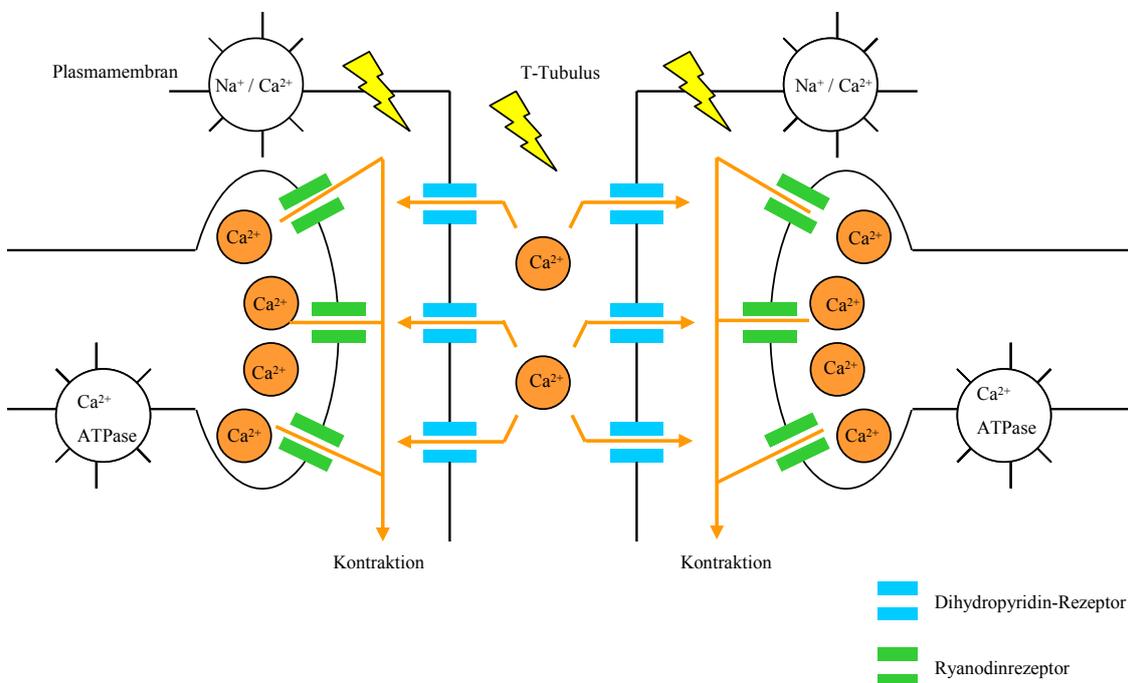


Abbildung 2: schematischer Ablauf der elektromechanischen Kopplung

Aus Abbildung 2 wird deutlich, dass durch L-Typ-Ströme initiierte Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration obligat für den Ablauf der elektromechanischen Kopplung sind. Die Kopplung zwischen elektrischem Stimulus und mechanischer Antwort erfolgt durch Calciumionen: Depolarisation der Plasmamembran im Zuge eines Aktionspotenzials bedingt die Aktivierung spannungsabhängiger L-Typ Ca^{2+} -Kanäle, der sogenannten Dihydropyridin (DHP)-Rezeptoren, in der Membran der T-Tubuli, woraufhin ein Ca^{2+} -Einstrom entlang des Konzentrationsgradienten ins Zytosol erfolgt. Dieser Ca^{2+} -Einstrom bewirkt in Herzmuskelzellen eine Aktivierung der Ryanodin-Rezeptormoleküle, die Kanäle öffnen, worauf Ca^{2+} -Ionen durch diese Kanäle entlang ihres Konzentrationsgradienten vom sarkoplasmatischen Retikulum ins

Zytosol strömend die Ca^{2+} -Konzentration dort erhöhen. Als Folge binden Calciumionen an Troponin C und die Kontraktion der Herzmuskelzelle wird eingeleitet. Bei Absinken der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration bindet Troponin C nicht länger Calciumionen, Troponin I und Tropomyosin lagern sich um, so dass Aktin nicht mehr mit Myosin interagieren kann und der Muskel erschlafft. Das Absinken der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ist bedingt durch eine Wiederaufnahme von Ca^{2+} -Ionen in die intrazellulären Speicher durch die SR Ca^{2+} -ATPase 2a. Gleichzeitig werden die Ca^{2+} -Ionen mittels des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers und einer weiteren Ca^{2+} -ATPase in der Plasmamembran aus der Zelle ausgeschleust und dadurch die niedrige Ca^{2+} -Ausgangskonzentration von $\leq 10^{-7}$ M wieder hergestellt (44).

L-Typ Kanäle bedingen zusätzlich das Ausmaß des Ca^{2+} -Plateaus während eines Aktionspotenzials in Kardiomyozyten. Dies wiederum besitzt Auswirkungen auf die Kontraktilität und Reizleitung des Myokards und ermöglicht eine Anpassung an die aktuellen Leistungsanforderungen des Organismus (44). Im Reizleitungssystem des Herzens, insbesondere im Sinus- und Atrioventrikularknoten, sind L-Typ Ca^{2+} -Kanäle für die Aktionspotenziale verantwortlich - anders als im Arbeitsmyokard, wo der schnelle Na^+ -Einwärtsstrom für die Anfangsphase des Aktionspotenzials verantwortlich ist (95, 158).

2.4 Aufbau des in Herzmuskelgewebe exprimierten HVA CaV1.2 L-Typ Kanals

HVA Ca^{2+} -Kanäle bestehen aus einer $\text{CaV}\alpha_1$ -, $\text{CaV}\alpha_2\delta$ -, $\text{CaV}\beta$ - und in manchen Geweben einer $\text{CaV}\gamma$ -Untereinheit (79) (Abbildung 3). Die $\text{CaV}\alpha_1$ -Untereinheit bildet die Kanalpore und ist verantwortlich für die Ionenleitfähigkeit, agiert als Spannungssensor und ist Bindungsstelle für Ca^{2+} -Kanal-spezifische Toxine und Medikamente. Die zytoplasmatische $\text{CaV}\beta$ - sowie die extrazelluläre $\text{CaV}\alpha_2\delta$ -Untereinheit wirken modulierend auf die Ca^{2+} -Strom-Eigenschaften und spielen für den Membrantransport der $\text{CaV}\alpha_1$ -Untereinheit vom endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran eine wichtige Rolle (15). Die $\text{CaV}\gamma$ -Untereinheit wurde erstmals in Skelettmuskel- Ca^{2+} -Kanälen detektiert (19), ist aber auch Bestandteil neuronaler Ca^{2+} -Kanäle, wo sie für den Pathomechanismus der Epilepsie bzw. Ataxie Relevanz hat (87). Bisher sind acht Isoformen der $\text{CaV}\gamma$ -Untereinheit bekannt (51), wobei aber die meisten eher mit den Glutamat-Rezeptorkanälen vom AMPA-Typ als mit spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen assoziiert sind (24). Aktuell bestehen wenig Hinweise auf die Expression der $\text{CaV}\gamma$ -Untereinheit in Kardiomyozyten (15), die Untersuchungsobjekt der hier dargestellten Arbeit sind. Folglich wird auf die $\text{CaV}\gamma$ -Untereinheit nicht weiter eingegangen.

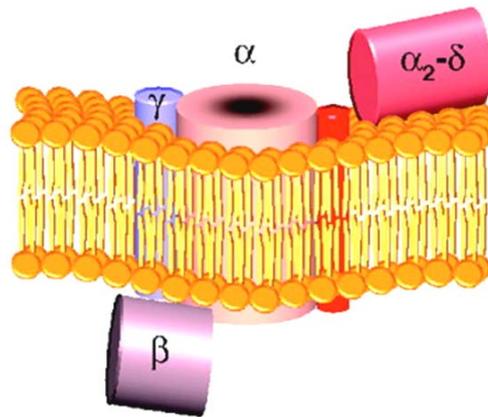


Abbildung 3: schematischer Aufbau des HVA Ca²⁺-Kanals modifiziert nach *Stotz et al.* (143)

2.4.1 CaV α_1 1.2-Untereinheit des L-Typ Ca²⁺-Kanals

Die CaV α_1 1.2-Untereinheit ist ein Protein von etwa 220 000 Dalton (104). Das CaV α_1 1.2-Gen ist zahlreichen Spleißvorgängen unterworfen, die für die Feinregulierung der Kanaleigenschaften eine wichtige Rolle spielen (78, 164, 141). Wie in Abbildung 4 dargestellt, zeigt die CaV α_1 1.2-Untereinheit den typischen Aufbau eines spannungsabhängigen Kanals mit vier zueinander ähnlichen Sequenzmotiven (I – IV) und einem langen zytosolischen Amino- bzw. Carboxylterminus (78). Die Motive I bis IV bestehen jeweils aus sechs Transmembransegmenten, den α -Helices S1 bis S6, mit variablen Schleifen zwischen S5 und S6 und stehen über die intrazellulären Schleifen L1 bis L3 miteinander in Verbindung.

Die CaV α_1 1.2-Untereinheit formt eine asymmetrische Pore hoher Ca²⁺-Selektivität. Diese wird durch vier konservierte Glutamat-Reste vermittelt, die den Ionen-Selektivitätsfilter zwischen S5 und S6 jedes Motivs bilden (80, 103, 81). Das S4-Segment agiert als Spannungssensor und initiiert eine Konformationsänderung, die die Öffnung der Kanalpore ermöglicht (22). Im Bereich der L1-Schleife befindet sich die AID (alpha interaction domain) der CaV α_1 1.2-Untereinheit, welche eine hochaffine Bindung mit der alpha binding pocket (ABP) (siehe 2.4.2.1.2) der CaV β -Untereinheit eingeht (43, 157). Die 18 konservierte Aminosäuren umspannende AID enthält einen Tryptophanrest, der entscheidend für die Bindung der CaV β -Untereinheit ist (86). Für die Modulation der Kanaleigenschaften durch zytoplasmatische CaV β -Untereinheiten sowie den Transport der CaV α_1 1.2-Untereinheit zur Plasmamembran ist diese Interaktion essentiell. Lediglich eine CaV β 2-Variante, die membranassoziierte CaV β 2-N3 scheint auch ohne Interaktion mit der AID die Kanaleigenschaften modulieren zu können,

während für den Transport der $\text{CaV}\alpha_1.2$ -Untereinheit zur Plasmamembran eine Interaktion von $\text{CaV}\beta_2\text{-N3}$ und AID wahrscheinlich notwendig ist (86).

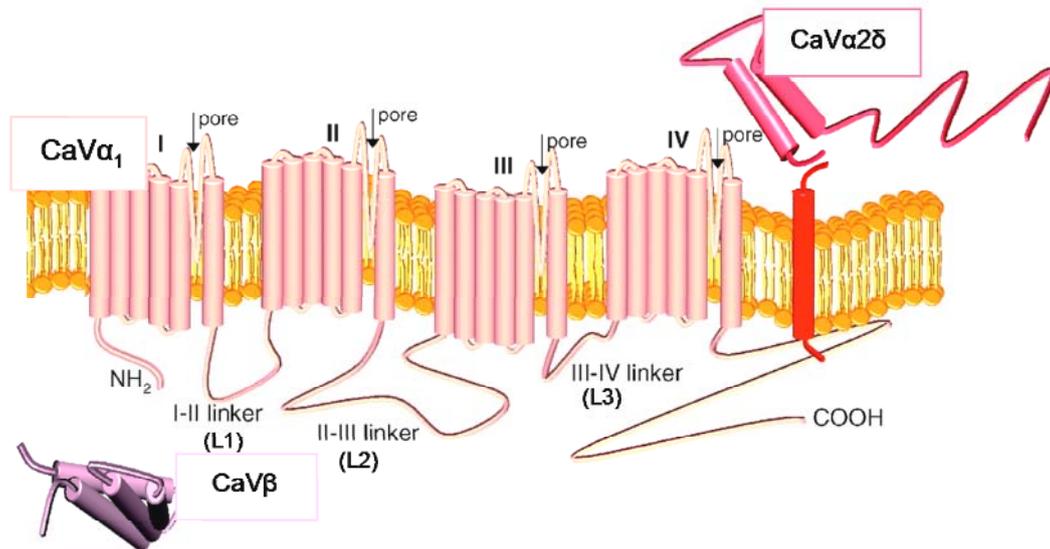


Abbildung 4: Aufbau der $\text{CaV}\alpha_1.2$ -Untereinheit des L-Typ Ca^{2+} -Kanals mit ihren zugehörigen Untereinheiten modifiziert nach *Stotz et al.* (143)

Die Oberflächenexpression der $\text{CaV}\alpha_1$ -Untereinheiten ist wahrscheinlich durch eine Reihe von ER-Retentionssignalen beschränkt. Die akzessorische $\text{CaV}\beta$ -Untereinheit könnte über Bindung an die AID eines dieser Signale abschirmen und auf diese Weise zum Transport der $\text{CaV}\alpha_1$ -Untereinheit zur Plasmamembran und zum korrekten Einbau der Kanalpore in die Membran beitragen (7, 33).

Während der ABP-AID-Komplex eine hochaffine Bindungsstelle darstellt (157), sind weitere, weniger affine Interaktionsstellen der $\text{CaV}\beta$ -Untereinheit beschrieben, zum Beispiel im Bereich der L1-Schleife der $\text{CaV}\alpha_1$ -Untereinheit (160, 94). Jüngste Studien allerdings widersprechen der Existenz einer weiteren Interaktionsstelle in der L1-Schleife neben der AID (18).

2.4.2 $\text{CaV}\beta_2$ -Untereinheit des L-Typ Ca^{2+} -Kanals

$\text{CaV}\beta$ -Untereinheiten sind hydrophile Proteine, die keine Transmembrandomänen besitzen und intrazellulär lokalisiert sind (119, 21). Bislang sind vier Subtypen bekannt ($\text{CaV}\beta_1$ - $\text{CaV}\beta_4$), die durch vier Gene kodiert werden und gewebespezifische Expressionsmuster zeigen (Tabelle 1). In Herzgewebe wird, wie aus Tabelle 1 ersichtlich, die $\text{CaV}\beta_2$ -Untereinheit exprimiert und stellt somit die wesentliche mit der $\text{CaV}\alpha_1.2$ -Untereinheit interagierende $\text{CaV}\beta$ -Untereinheit in diesem Gewebe dar.

| CaV β -Subtyp | Expressionsort |
|-----------------------------|----------------------------------------------|
| CaV β 1- Untereinheit | Skelettmuskulatur, Hirn |
| CaV β 2- Untereinheit | Herz, Hirn, glatter Muskel, Pankreas, Retina |
| CaV β 3- Untereinheit | Hirn, glatter Muskel, Pankreas, Retina |
| CaV β 4- Untereinheit | Hirn |

Tabelle 1: Gewebespezifische Expression von CaV β -Untereinheiten
modifiziert nach *Birnbaumer et al.* (11)

2.4.2.1 Aufbau der CaV β 2-Untereinheit

Abbildung 5 zeigt den Aufbau der CaV β 2-Untereinheit. Wie die übrigen drei CaV β -Untereinheiten ist sie aus drei variablen (V1, V2, V3) und zwei konstanten Regionen (C1, C2) (43) aufgebaut.



Abbildung 5: schematischer Aufbau der CaV β 2-Untereinheit

Die einzelnen Regionen beinhalten verschiedene funktionelle Motive, hierunter die alpha binding pocket (ABP), eine hochaffine Interaktionsstelle der CaV β - mit der CaV α ₁-Untereinheit am distalen Ende der Nukleotidkinase (NK)-Domäne sowie die Src homology domain 3 (SH3)- und NK-Domänen (entsprechend C1 bzw. C2) (Abbildung 6).

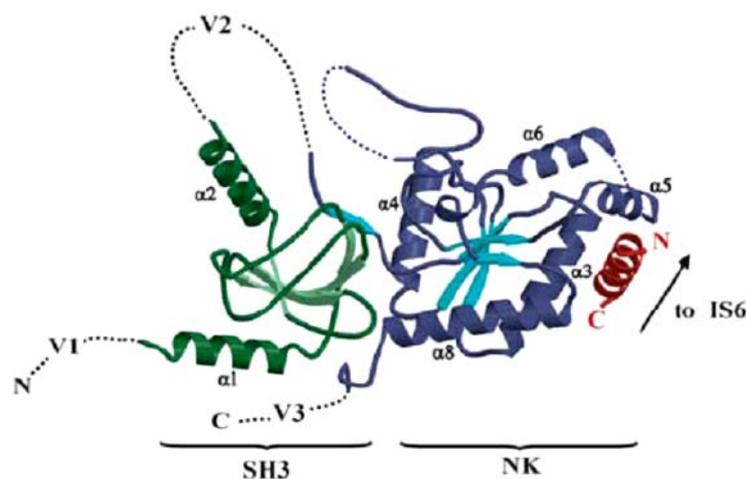


Abbildung 6: Aufbau der CaV β 2a-Untereinheit nach *van Petegem et al.*, 2004.

In Abbildung 6 markieren die gestrichelten Linien die variablen Regionen der CaV β 2a-Untereinheit, deren dreidimensionale Struktur bisher nicht bekannt ist. Die AID ist rot markiert.

2.4.2.1.1. SH3- und NK-Domänen der CaV β 2-Untereinheit

SH3- (Src homology domain 3) und NK- Domänen sind typische Merkmale der Proteinfamilie der membranassoziierten Guanylatkinasen (MAGUK). CaV β 2-Untereinheiten teilen strukturelle Merkmale mit den MAGUK, besitzen aber gleichzeitig auch relevante Unterschiede, beispielsweise eine unterschiedliche Orientierung der SH3- und NK-Domänen; auch fehlen einige essentielle MAGUK-Domänen (155, 26). SH3-Domänen binden typischerweise an kurze Prolin-reiche Sequenzabschnitte (98), allerdings fehlen dieser Domäne sowohl bei den MAGUK als auch den CaV β 2-Untereinheiten die in der klassischen SH3-Domäne zur Ligandenbindung notwendigen aromatischen Aminosäurereste. Zusätzlich ist im CaV β 2-Protein der entsprechende Sequenzabschnitt durch die α 2-Helix blockiert (149, 100) und steht für die Bindung eines weiteren Proteinpartners wahrscheinlich nicht zur Verfügung.

Die Nukleotidkinase-Domäne der MAGUK ist homolog zu derjenigen der Guanylatkinasen und vermittelt die Bindung von Guanosinmonophosphat (GMP), jedoch fehlen ihr die essentiellen Subdomänen, die die enzymatische Funktion bedingen (149): So fehlt die β -Faltblatt-Struktur, die als Nukleotidkinasesubdomäne bei den MAGUK die GMP-Bindung bewirkt. Des Weiteren verdecken zwei CaV β 2-Schleifen Teile der GMP-Bindungsstelle (155). Somit scheint die Nukleotidkinase-Domäne der CaV β 2-Untereinheiten ihre Fähigkeit zur Bindung von Nukleotiden und zur enzymatischen Aktivität verloren zu haben.

Nix et al. (111) berichten von einer intramolekularen und in geringem Maße auch einer intermolekularen Interaktion der SH3- und NK-Domänen der MAGUK, obwohl die NK-Domäne keine Prolin-reichen Sequenzen enthält, wie sie normalerweise für eine SH3-Bindung benötigt werden (99). Anhand der Kristallstruktur von PSD-95 (postsynaptic density-95), dem Prototyp eines MAGUK-Proteins, zeigten *McGee et al.* (101), dass die β -Stränge der SH3-Domäne nicht kontinuierlich aufeinander in der Aminosäuresequenz folgen, sondern einer der Stränge hinter der NK-Domäne lokalisiert ist. Diese β -Stränge bilden zwei Subdomänen, die sich in einer intra- oder intermolekularen Form zusammenlagern können, um die SH3-Faltung zu vervollständigen. Somit betrifft die SH3-NK-Interaktion nicht zwei unabhängige Domänen, sondern ist Teil des Faltungsprozesses der SH3-Domäne. Die C1- und C2-Domänen der CaV β -Untereinheiten lagern sich auf sehr ähnliche Weise zusammen, was auf eine intra- und intermolekulare Interaktion dieser Untereinheiten hindeutet (101).

MAGUK sind Scaffolding-Proteine, die intrazelluläre Signaltransduktionswege durch zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen (68). Dabei scheint insbesondere die zweite variable Region, die sogenannte Hook-Region, ein wichtiger Regulator zu sein und könnte auch in den CaV β -Untereinheiten eine ähnliche regulatorische Funktion erfüllen (42, 115).

2.4.2.1.2. Interaktionsstellen der CaV β 2-Untereinheit mit der CaV α ₁-Untereinheit

2004 veröffentlichten drei Arbeitsgruppen (155, 26, 114) die Kristallstrukturen der konstanten Regionen der CaV β -Untereinheit. Dabei zeigte sich, dass eine bestimmte 41 Aminosäuren umfassende Region, genannt BID (β -interaction domain) (40), von der man eine Interaktion mit der AID der CaV α ₁-Untereinheit annahm, vollständig im Zentrum der NK-Domäne eingeschlossen war und somit nicht die entsprechende Interaktionsstelle sein konnte. Kristallstrukturanalysen des CaV β -AID-Komplexes enthüllten eine Bindung der AID in einer konservierten, tiefen Tasche am distalen Ende der CaV β -NK-Domäne, der bereits oben erwähnten α -binding pocket (ABP).

Van Petegem et al. (156) nennen weitere potentielle Interaktionsstellen der CaV β - und CaV α ₁-Proteine. Eine befindet sich beispielsweise in einer Tasche zwischen der SH3- und der GK-Domäne. Auch die variablen Regionen der CaV β -Untereinheit sind wahrscheinliche Kandidaten für eine Interaktion mit der CaV α ₁-Untereinheit.

In Bezug auf die Interaktion zwischen CaV α ₁- und CaV β -Untereinheit ist bisher nicht geklärt, ob sie in einem Verhältnis von 1:1 stattfindet oder ob mehrere CaV β -Untereinheiten an eine CaV α ₁-Untereinheit binden. Eine Studie von *Dalton et al.* (35) deutet darauf hin, dass eine einzige CaV β -Untereinheit für die regelrechte Kanalfunktion einer CaV α ₁-Untereinheit ausreichend ist, was aber die parallele Kanalmodulation durch mehrere CaV β -Untereinheiten nicht ausschließt.

Bisher fand sich kein Hinweis auf eine strikte Assoziation einer bestimmten CaV α ₁- und einer CaV β -Untereinheit (22). Nach welchen Regeln die Zusammenlagerung dieser Untereinheiten in vivo erfolgt und welche Kombinationen vorliegen bzw. ausgeschlossen sind, ist noch Gegenstand der Forschung.

2.4.2.2 Funktion der CaV β 2-Untereinheit

Eine Bindung der CaV β 2-Untereinheit an die CaV α _{1.2}-Untereinheit moduliert die Kanalfunktion, indem sie eine Verschiebung des Schwellenpotenzials zu hyperpolarisierenden Potenzialen bewirkt, wodurch die Kanalöffnung erleichtert und die Inaktivierungs- und Aktivie-

rungeigenschaften des Kanals verändert werden (43). Zusätzlich zu diesen modulatorischen Eigenschaften spielt die CaV β 2-Untereinheit eine Rolle beim Transport der CaV α _{1.2}-Untereinheit zur Membran (127). Ob die Modulation der Kanalfunktion getrennt von der Regulierung des Membrantransports über unterschiedliche Interaktionsstellen gesteuert wird, ist nicht geklärt (94, 86, 18). Des Weiteren spielt die CaV β 2-Untereinheit eine Rolle in Bezug auf Apoptosevorgänge in Kardiomyozyten (25), Zelltod (32), adrenerge Regulation der L-Typ Ca²⁺-Ströme (52) und Modulation der Ca²⁺/Calmodulin abhängigen Kinase II-Aktivität (CaMKII) (57).

Die CaV β 2-Untereinheit unterliegt einer posttranslationalen Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen, beispielsweise durch die Ca²⁺/Calmodulin abhängige Kinase II. 2006 konnten *Grueter et al.* (57) zeigen, dass CaMKII an die CaV β 2-N3-Untereinheit bindet und bevorzugt den Threoninrest 498 phosphoryliert, was sich auf die Modulation der Ca²⁺-Ströme auswirkt. Die jüngste Publikation von *Yang et al.* (169) gibt Hinweis auf eine Proteinkinase G-abhängige Phosphorylierung der CaV β 2-Untereinheit mit Auswirkung auf die Ca²⁺-Kanal-Inaktivierung.

Eine aktuelle Veröffentlichung von *Hullin et al.* (73) weist auf eine Rolle der CaV β 2-Untereinheit hinsichtlich der Pathophysiologie kardialer Erkrankungen hin. *Hullin et al.* konnten zeigen, dass die Expressionsrate von CaV β -Untereinheiten bei physiologischen sowie pathophysiologischen Vorgängen im Hinblick auf die Regulation von L-Typ Ca²⁺-Kanälen (LTCC) eine entscheidende Rolle spielt. Sie wiesen eine gesteigerte Expression von CaV β 2-Isoformen bei bestehender Herzinsuffizienz nach, welche eine für diese Erkrankung pathognomonische Erhöhung der Einzelkanalaktivität bedingen. *Hullin et al.* (73) fanden eine erhöhte Expression nicht allein für eine bestimmte Spleißvariante, was auf eine Verschiebung des physiologischen Expressionsverhältnisses der Spleißvarianten hindeuten würde, sondern für alle untersuchten CaV β 2-Spleißvarianten (CaV β 2-N1, -N2, -N3, -N4).

Aufgrund der oben beschriebenen Modulation des L-Typ Ca²⁺-Kanals sollten CaV β 2-Untereinheiten auch Effekte auf die Wechselwirkungen des Kanals mit Ca²⁺-Kanalblockern haben; so binden Blocker vom Dihydropyridin-Typ, wie beispielsweise Nifedipin (Adalat[®]), bevorzugt an inaktivierte Ca²⁺-Kanäle. Ihre Fähigkeit, die Kanäle zu blockieren, wird indirekt durch die CaV β 2-Untereinheiten beeinflusst, aufgrund deren unterschiedlicher Effekte auf die Inaktivierung des Kanals (6, 84, 163, 171).

2.4.2.3 CaV $\alpha_2\delta$ -Untereinheit des L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanals

Die CaV α_2 -Untereinheit ist ein extrazellulär lokalisiertes Membran-assoziiertes Protein, welches durch eine Disulfidbrücke mit der CaV δ -Untereinheit, einem integralen Membranprotein, in der Membran verankert ist. CaV α_2 - und CaV δ -Untereinheit werden durch eine gemeinsame mRNA kodiert. Die reifen Proteine entstehen durch posttranslationale Proteolyse und bleiben über eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verknüpft (22).

Die CaV $\alpha_2\delta$ -Untereinheit spielt für die Funktion des L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanals nur eine untergeordnete Rolle (22). Sie führt unter anderem zu einer Erhöhung funktionaler Kanäle in der Membran, allerdings in wesentlich geringerem Maße als die CaV β -Untereinheit (69, 71, 88).

2.5 Bedeutung des HVA L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanals für die embryonale Herzentwicklung

In embryonalen Herzen sind die intrazellulären Ca $^{2+}$ -Speicher noch nicht vollständig ausgebildet und L-Typ Ca $^{2+}$ -Ströme tragen proportional mehr zur elektromechanischen Kopplung bei als im adulten Herz (16, 123). Das embryonale Herz ist deshalb im Vergleich zum adulten Herz wesentlich stärker von extrazellulärem Ca $^{2+}$ -Influx abhängig, um seine Kontraktilität aufrechtzuerhalten. In Entwicklungsstadien des (Maus-) Herzens, in denen die Pumpfunktion des Herzens hinsichtlich des benötigten Blutflusses für das weitere Wachstum und Überleben des Embryos bestimmend wird, sind L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanal-Ströme lebensnotwendig. Zuvor wird der Embryo durch passive Diffusionsvorgänge versorgt. L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanal-Ströme beeinflussen ebenfalls das Herzwachstum in Bezug auf die Entwicklung von Form und Funktion der Herzkammern und die Reifung des Gefäßsystems (131, 162).

L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanäle scheinen ab Embryonaltag (E)11.0 im embryonalen Mauserz gut entwickelt zu sein. Ihre biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften gleichen sehr denen der Kanäle neonataler und adulter Herzen; so existiert beispielsweise die typische Ca $^{2+}$ -abhängige Inaktivierung bereits in diesen frühen Entwicklungsstadien (36). Im Verlauf der Embryonalentwicklung steigt die L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanal-Dichte im Vergleich zum Anstieg der Anzahl an Na $^+$ -Kanälen nur moderat an. Dies lässt vermuten, dass L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanäle in frühen Entwicklungsstadien eine vorherrschende Rolle für die Erregungsbildung in Kardiomyozyten spielen (36). In Knock-out-Tiermodellen von Maus für die CaV α_1 1.2- und die CaV β 2-Untereinheiten, den im Herzen vorwiegend exprimierten Untereinheit-Subtypen des L-Typ

Ca²⁺-Kanals, wurden die Folgen des Ausfalls in mehreren Veröffentlichungen beschrieben (siehe 2.5.1 und 2.5.2.).

2.5.1 Rolle der CaV α_1 -Untereinheit in der embryonalen Herzentwicklung

So beeinträchtigt die gezielte Ausschaltung des CaV α_1 1.2-Gens von Maus überraschend nicht die frühe embryonale Herzfunktion und -morphogenese. Die Herzen solcher CaV α_1 1.2-defizienter Embryonen kontrahieren an E12.5 mit identischer Frequenz im Vergleich zu heterozygoten Herzen oder Herzen von Wildtyptieren und besitzen dieselben elektrophysiologischen Eigenschaften. Allerdings sterben die CaV α_1 1.2-defizienten Embryonen vor E14.5 (136).

2003 zeigten *Xu et al.* (166) in diesen CaV α_1 1.2-defizienten Tieren einen kompensatorischen Anstieg des CaV1.3, in geringerem Maße auch des CaV1.1 und CaV3.1. Im Rahmen der Publikation wurde das Expressionsverhältnis spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung beschrieben. Es stellte sich in Bezug auf die L-Typ Kanäle heraus, dass in frühen Embryonalstadien Transkripte von CaV1.1, CaV1.2 und CaV1.3 in relativ äquivalentem Verhältnis koexprimiert werden. Ab E12.5 und insbesondere ab E14 erfolgt jedoch ein rascher Anstieg der CaV1.2-Expression, während die Expression der anderen Kanal-Subtypen kaum zunimmt. Bis zu diesem Zeitpunkt scheint eine kompensatorische Überexpression insbesondere von CaV1.3 das fehlende CaV1.2-Protein in gewissem Maß ersetzen zu können. Diese Kompensation genügt ab E14 nicht mehr, um die für die weitere Entwicklung an Relevanz zunehmende physiologische Pumpfunktion aufrecht zu erhalten, weshalb die Embryonen zu diesem Zeitpunkt absterben.

2.5.2 Rolle der CaV β_2 -Untereinheit in der embryonalen Herzentwicklung

Einen anderen Ansatz zur Evaluierung der Rolle von HVA Ca²⁺-Kanälen für die embryonale Herzentwicklung wählten *Weissgerber et al.* (162). Um die kompensatorische Substitution einer CaV α_1 -Untereinheit durch eine andere zu vermeiden, verwendeten sie ein CaV β_2 -Knock-out-Modell als Versuchsansatz, um eine signifikante Reduktion der L-Typ Ca²⁺-Ströme zu erreichen.

An E9.5 beginnt das Herz von Wildtyptieren regelmäßig zu schlagen und die L-Typ Ca²⁺-Stromdichte steigt von E9.5 auf E10.5 stark an. Wie *Weissgerber et al.* zeigten, führt ein

CaV β 2-/- Genotyp zu reduzierten L-Typ Ca²⁺-Strömen ab E9.5 mit in Folge verminderter Herzkontraktilität bzw. Herzfrequenz. Dies hat eine fehlerhafte bis ausbleibende Reifung des intra- und extrakardialen Gefäßsystems zur Folge, welche normalerweise durch den beginnenden Blutfluss stimuliert wird. Die Gefäßfehlbildungen entstehen sekundär durch Pumpversagen und sind nicht direkt durch das Fehlen der CaV β 2-Untereinheit in den vaskulären Zellen bedingt, da nach Kardiomyozyten-spezifischer Ausschaltung des CaV β 2-Gens derselbe Phänotyp zu beobachten ist. Die Embryonen sterben an E10.5 aufgrund von Herzversagen mit konsekutivem Perikarderguss infolge der funktionellen Herzinsuffizienz. Die Zellmorphologie der Kardiomyozyten an sich ist intakt.

Eine aktuelle Arbeit von *Nguemo et al.* (110) weist auf die Notwendigkeit zunehmender CaV1.2-Dichte für die Ausbildung der Ca²⁺-abhängigen Kanalinaktivierung während der Embryonalentwicklung hin. Hierbei beschleunigt sich die schnelle, Ca²⁺-abhängige Inaktivierung aufgrund einer im Verlauf der Entwicklung steigenden subsarkolemmalen Ca²⁺-Konzentration von frühen zu späten Embryonalstadien, während die langsame, spannungsabhängige Inaktivierung unverändert bleibt. Da die Kanaloffenwahrscheinlichkeit ebenfalls unverändert ist, liegt nahe, dass die erhöhte subsarkolemmale Ca²⁺-Konzentration durch eine erhöhte Zahl an L-Typ Ca²⁺-Kanälen zustande kommt. Auch hier ist zu vermuten, dass die CaV β 2-Untereinheit eine wichtige Rolle in der Initiierung und Aufrechterhaltung verstärkter Membranexpression der CaV α ₁-Untereinheit spielt (siehe 2.4.1).

2.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Zielsetzung dieser Forschungsarbeit war primär die Identifikation der in Mausherz exprimierten CaV β 2-Spleißvarianten. Insbesondere die N-terminale Region der CaV β 2-Untereinheit ist alternativen Spleißvorgängen unterworfen. Für diese Region sind bereits mehrere CaV β 2-Isoformen beschrieben (Perez-Reyes, 72, 96, 1, 50), deren Vorkommen sowie spezifische Funktion in Mausherzgewebe bisher weitgehend ungeklärt ist.

Mittels Western Blot mit einem Antikörper gegen das CaV β 2-Protein konnte beobachtet werden, dass sich das elektrophoretische Verhalten der CaV β 2-Proteine während der Entwicklung verändert (Abbildung 7). Inwieweit hierbei Spleißvorgänge und/oder posttranslationale Modifikationen eine Rolle spielen war allerdings unklar. Die Veränderungen sind nicht auf fehlende Spezifität und Sensitivität des Antikörpers zurückzuführen, der zuvor mittels Proteinfractionen von CaV β 2-defizienten Tieren rigoros validiert wurde (162). Bei Auswertung der CaV β 2-Expression in adultem Herz (vier Monate alter Mäuse), embryonalem Herz (E (Embryonal-

tag)11.5, E12.5, E13.5, E14.5 und E17.5), neonatalem Herz (P0) und Herzen von 7 Tage (P7) und 28 Tage alten Mäusen (P28) zeigten sich an den Zeitpunkten E17.5, P0 und P7 zwei CaV β 2-Proteine von ~69 und ~74 kDa. Mit steigendem Alter der Maus beobachtete man eine Umstellung des vom Antikörper erkannten Proteinmusters vom ~74 kDa-Protein, das in der frühen Embryonalentwicklung des Herzens dominiert, zu einem ~69 kDa-Protein, das in den postnatalen Stadien und insbesondere an P28 am deutlichsten erkannt wird. Offensichtlich werden verschiedene CaV β 2-Proteine exprimiert (Abbildung 7).

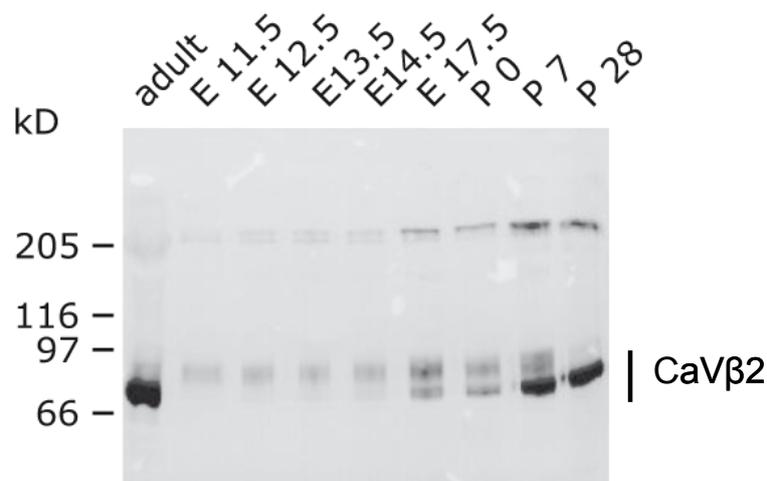


Abbildung 7: Western Blot mit mikrosomalen Proteinfractionen isoliert aus Herzgewebe von Mäusen unterschiedlicher Altersstufen (adult, erwachsene Maus - circa vier Monate; P0, am Tag der Geburt; P7 und P28, sieben bzw. 28 Tage nach der Geburt)

Im Rahmen hier vorgestellter Forschungsarbeiten wurden fünf Ziele verfolgt:

- Analyse der in Mauserzgewebe vorhandenen CaV β 2-Spleißvarianten
Der Schwerpunkt lag hierbei auf der Identifikation einer fetalen bzw. neonatalen CaV β 2-Spleißvariante sowie der Bestimmung des Expressionsverhältnisses der in Herzmuskelzellen vorhandenen CaV β 2-Spleißvarianten während unterschiedlicher Entwicklungsstadien. Dieses Forschungsziel wurde mittels der Erstellung von cDNS-Bibliotheken und nachfolgendem Screening mit spezifischen Hybridisierungssonden angegangen.
- Nachweis der CaV β 2-Spleißvarianten in isolierten Kardiomyozyten
Um die Existenz der mit Hilfe der cDNS-Bibliotheken isolierten CaV β 2-Spleißvarianten in Kardiomyozyten zu bestätigen, wurden PCR mit isolierten Kardiomyozyten durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die Untersuchung auf das gleichzeitige Vorkommen mehrerer Spleißvarianten in einer Herzmuskelzelle.

- Rekonstitution des Bandenmusters des - in Abbildung 7 gezeigten - Western Blots
Die in Herzmuskelgewebe identifizierten Spleißvarianten sollten exprimiert und im Western Blot analysiert werden, um zu untersuchen, ob diese Proteine das durch mikrosomale Proteinfractionen von Mausherz erhaltene Bandenmuster rekonstituieren können.
- Interaktion nativer CaV β 2-Spleißvarianten
Des Weiteren erfolgte die Untersuchung der Interaktion von CaV β 2-Spleißvarianten auf Proteinebene. Durch Anwendung zweier unabhängiger Methoden, von Co-Immunopräzipitation und Protein-Cross-Linking, sollte eine mögliche Interaktion zwischen nativen CaV β 2-Spleißvarianten nachgewiesen werden.
- Funktionelle Charakterisierung der CaV β 2-Spleißvarianten
Um ihren Einfluss auf die Funktion des Ca²⁺-Kanals zu untersuchen, wurden die CaV β 2-Spleißvarianten mit der CaV α _{1.2}-Untereinheit koexprimiert und L-Typ Ca²⁺-Ströme elektrophysiologisch untersucht. Dabei sollte geprüft werden, ob sich die Änderungen des Expressionsverhältnisses der Spleißvarianten auf die Kanaleigenschaften auswirken. Ebenfalls sollten die Auswirkungen der gleichzeitigen Wirkung zweier CaV β 2-Spleißvarianten auf die Ca²⁺-Kanalfunktion betrachtet werden.
- Klonierung der CaV α _{1.2}-Untereinheit
Die Klonierung der CaV α _{1.2}-Untereinheit von Maus war Voraussetzung für die elektrophysiologischen Messungen sowie die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen und damit ebenfalls Teil der Ziele dieser Arbeit.
- In vivo-Betrachtungen des CaV β 2-vermittelten Membrantransports der CaV α _{1.2}-Untereinheit
Zusätzlich zu den Untersuchungen der entwicklungspezifischen Veränderungen des Expressionsmusters des CaV β 2-Proteins sollten abschließend fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur in vivo-Betrachtung der Interaktion von CaV β 2- und CaV- α _{1.2}-Untereinheit begonnen werden.

Entsprechend dieser Ziele sind die Ergebnisse in drei Teilen, Kapitel 4.1, 4.2 und 4.3, zusammengefasst.

Das Kapitel 4.1 (Teil 1) beschreibt die Identifizierung, Klonierung und funktionelle Expression von CaV β 2-Varianten in Herz von Maus.

Das Kapitel 4.2 (Teil 2) umfasst die gezielte Klonierung von Vollängen-cDNAs, die für die Varianten der CaV α _{1.2}-Untereinheit in Mausherz kodieren. Die einzelnen Sequenzen werden

hinsichtlich alternativ gespleißter Exonabschnitte charakterisiert und im Kontext bekannter Sequenzen diskutiert.

Das Kapitel 4.3 (Teil 3) zeigt erste Experimente und Vorgehensweisen, die zur Charakterisierung der CaV α_1 1.2-CaV β 2-Interaktion in vivo durchgeführt wurden und deren Fortsetzung für die Zukunft geplant ist.

3 Material und Methoden

Lösungen, Puffer und Medien, die in den hier durchgeführten Experimenten verwendet wurden, sind am Ende des Kapitels 3 in Abschnitt 3.5 aufgelistet.

3.1 Klonierungsexperimente

3.1.1 Bakterienstämme

3.1.1.1 Genotyp und Eigenschaften

- *E.coli XL1-Blue* (Stratagene)

recA1 end A1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F^c proAB lacI ZΔM15 Tn10 (Tetr)]

XL1-Blue ist geeignet für das Blau-Weiß-Screening (β-Galaktosidase-Abbau) rekombinanter Plasmide und für Routineklonierungen mit Verwendung von Plasmiden oder λ-Vektoren. Der Stamm ist Tetrazyklin-resistent und Endonuklease-defizient, was die Qualität der MiniPrep-DNS erhöht, sowie Rekombinations-defizient, was die Stabilität des Inserts im Vektor erhöht.

- *ElectroMAXTM DH10BTM Cells* (Invitrogen)

F-mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC)Φ80lacZΔM15ΔlacX74recA1endA1 araD139Δ(ara,leu)7697 galU galK λ- rpsL nupG

Dieser Bakterienstamm kann nur mittels Elektroporation und nicht mittels Hitzeschock transformiert werden. Er ist sowohl zur Klonierung prokaryoter als auch eukaryoter DNS geeignet. Auch ein Blau/Weiß-Screening ist möglich. Die Zellen wurden bereits im kompetenten Zustand erworben und konnten direkt zur Transformation eingesetzt werden.

3.1.1.2 Aufbewahrung

Zur Aufbewahrung wurden die Stämme, ausgebracht auf Luria-Bertani (LB)-Platten oder als dicht bewachsene Flüssigkultursuspensionen in Glasröhrchen, bei 4 °C bis zu mehreren Wo-

chen gelagert. Sowohl die Platten als auch das Flüssigmedium enthielten 50 µg/ml bzw. 100 µg/ml Ampicillin.

Bei langfristiger Aufbewahrung wurde 1 ml der Flüssigkultursuspension bei 3500 rpm drei Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, das Bakteriensediment in 1 ml Bakterienlagermedium resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

Eine andere Möglichkeit der Aufbewahrung über mehrere Monate war das Versetzen der Flüssigkultursuspension mit einem äquivalenten Volumen einer LB/Glyzerol-Suspension und anschließende Lagerung bei -80 °C.

3.1.1.2.1. Antibiotika

- *Ampicillin*

Ampicillin hemmt die Synthese der bakteriellen Zellwand durch Blockierung des Enzyms D-Alanin-Transpeptidase; es wirkt bakterizid und ist ein häufig verwendetes Selektionsmittel. Nur diejenigen Bakterienzellen können überleben, die bei der Transformation den Vektor aufgenommen haben, der die Ampicillin-Resistenz (β -Lactamase-Gen) trägt.

Ampicillin wurde in einer Endkonzentration von 50 µg/ml bzw. 100 µg/ml den jeweiligen Nährmedien zugesetzt. Ampicillin-Aliquots wurden bei -20 °C gelagert.

- *Chloramphenicol*

Chloramphenicol hemmt die bakterielle Proteinbiosynthese. Es findet keine Zellteilung mehr statt. Da die Transkription nicht inhibiert wird, werden die in den Zellen vorhandenen Plasmide noch einige Zeit weiter amplifiziert, so dass ihre Zahl pro Zelle ansteigt (Clewell *et al.* (31)). Dies wurde zur Vergrößerung der Signale beim Screening der cDNS-Bibliotheken ausgenutzt.

Den Nährmedien wurde Chloramphenicol als Lösung (100 mg/ml in 100 % Ethanol) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben. Aliquots dieser Lösung wurden, wie auch für Ampicillin beschrieben, bei -20 °C gelagert.

3.1.1.3 Bestimmung der Zelldichte

Mit jeweils 1 ml der Bakteriensuspension wurden Trübungsmessungen durchgeführt. Die Proben wurden im Ultrospec3000-Photometer (Pharmacia Biotech) bei 578 nm in 1 ml-Kunststoff-Küvetten gegen LB-Medium gemessen.

3.1.1.4 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Kompetente Zellen besitzen die Fähigkeit fremde DNS, beispielsweise Plasmide, aus der Umgebung aufnehmen zu können.

3.1.1.4.1. Herstellung kompetenter Zellen zur Hitzeschock-Transformation

Es wurde die TSS-Puffer-Methode (nach *Chung und Miller* (29, 30)) verwendet, um kompetente Zellen zur Hitzeschock-Transformation zu erzeugen. Die Zellen werden bei diesem Verfahren mit 50 mM MgCl₂-Lösung behandelt. Durch diesen Überschuss an Magnesiumionen wird die Zellmembran durchlässiger, die Aufnahmefähigkeit für Fremd-DNS steigt. Der dahinter stehende Mechanismus ist bisher nicht geklärt.

Nach Selektion einer einzelnen E.coli XL1-Blue-Kolonie und Überführung in ein 5 ml LB-Medium enthaltendes Glasröhrchen, wurde eine Bakteriensuspension durch Schütteln bei 37 °C über etwa 16 Stunden erzeugt. 1 ml dieses Ansatzes wurde in einen 500 ml Erlenmeyer-Kolben (gefüllt mit 100 ml LB-Medium) pipettiert und im Schüttelinkubator bis zu einer optischen Dichte von 0,5-0,6 (bei 578 nm) belassen. Nach Erreichen der gewünschten Dichte erfolgte eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 6000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment in 15 ml TSS-Puffer auf Eis resuspendiert. Die Suspension verteilte man in 0,3 ml-Portionen auf im Eisbad vorgekühlte Reaktionsgefäße, anschließend wurden diese mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

3.1.1.4.2. Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation durch Elektroporation

Die hier verwendeten ElectroMAX™ DH10B™ Cells (Invitrogen) wurden bereits im kompetenten Zustand erworben und konnten direkt zur Transformation eingesetzt werden.

3.1.1.5 Transformation kompetenter Zellen

Man bezeichnet die Aufnahme von freier DNS durch Bakterien als Transformation. Im Labor wird die Transformation im Sinne von Plasmidaufnahme in die Zelle gezielt mittels Hitzeschock oder Elektroporation induziert.

Ein so übertragenes Plasmid wird stabil innerhalb der wachsenden Bakterienkolonie vererbt und kann durch Marker, wie beispielsweise eine neu erworbene Antibiotikaresistenz, nachgewiesen werden.

3.1.1.5.1. Hitzeschocktransformation

Zum Ligationsansatz (20 μ l, 3.1.3.6.3) wurden auf Eis 300 μ l der Suspension kompetenter Zellen (von -80 °C aufgetaut auf Eis) zugegeben und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz für eine Minute in ein 42 °C warmes Wasserbad überführt, erneut zwei Minuten auf Eis gekühlt, mit 900 μ l LB-Medium versetzt und eine Stunde unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Ein Aliquot von 150 μ l wurde auf einer LB-Agar-Platte mit einem Glasspatel ausgestrichen, der übrige Ansatz für drei Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert, ein Großteil des Überstands dekantiert und das Sediment im übrigen Medium resuspendiert. Diese Suspension wurde ebenfalls auf einer LB-Agar-Platte homogen verteilt. Die Platten enthielten ein Antibiotikum (Ampicillin), um das Wachstum nichttransformierter Bakterien zu unterdrücken. Um ausreichend große Kolonien zu erhalten, wurden die Platten 16 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Effizienz der Transformation lag bei 9×10^6 – 2×10^7 unabhängigen Kolonien je μ g Plasmid-DNS.

3.1.1.5.2. Transformation durch Elektroporation

20 μ l der Suspension kompetenter Zellen wurden mit 1 μ l des Ligationsansatzes (Gesamtvolumen des Ligationsansatzes hier 5 μ l; da nach Ethanol-Präzipitation des eigentlichen Ligationsansatzes dieser in 5 μ l H₂O resuspendiert wurde) in einem Reaktionsgefäß auf Eis inkubiert und der gesamte Inhalt in eine 1 mm-Elektroporationsküvette (Peqlab) überführt. Die Elektroporation erfolgte mit einem BioRad Gene-Pulser bei 1.8 kV, 100 Ω und 25 μ F. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium zu den elektroporierten Zellen und Inkubation bei 37 °C für eine Stunde im Bakterienschüttler erfolgte das Ausbringen der Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin.

3.1.2 Vektoren

Ein Vektor stellt ein Transportvehikel zur Übertragung von Fremd-DNS in eine lebende Empfängerzelle dar. Vektoren können unterschiedlichen Art sein, beispielsweise Plasmide, Cosmide, YACs oder virale Vektoren. Im Weiteren sind nur die Plasmidvektoren von Relevanz.

- *pBluescript*

Der pBluescript ist ein Vektor von 2961 bp Länge und geeignet für DNS-Klonierungsexperimente, DNS-Sequenzierung, in vitro-Mutagenese und in vitro-Transkription. pBluescript KS bzw. SK unterscheiden sich in der Orientierung ihrer multiple cloning site (MCS). (+) und (-) zeigen die Orientierung der cloned phage f1 interge-

nic (IG) region auf, welche die benötigten Sequenzen für Start- und Endpunkt der Phagen fl DNS Synthese und des Verpackens der Bakteriophagenpartikel beinhaltet.

- *pCAGGS_M2 / pCAGGS_M1*

Der pCAGGS-Vektor von 4828 bp Länge besitzt einen β -actin Promotor, welcher die besondere Eigenschaft hat, dass für Proteine kodierende DNS, in diesen Vektor kloniert, unter anderem auch in nativen Kardiomyozyten transkribiert und translatiert werden kann. Dies ist mit Vektoren, welche beispielsweise einen CMV-Promotor besitzen, nicht möglich. Die pCAGGS_M1 bzw. -M2-Vektoren unterscheiden sich voneinander in Bezug auf die Sequenzen ihrer MCS, die den Verdau durch verschiedene Restriktionsenzyme ermöglicht.

Alle cDNS-Sequenzen zu exprimierender Proteine dieser Arbeit wurden in pCAGGS-Vektoren dargestellt.

- *pcDNA II* (Invitrogen)

Dieser Klonierungsvektor von 3013 bp Länge besitzt einen dem pBluescript sehr ähnlichen Aufbau mit einer großen MCS, einem Ampicillinresistenz- und LacZ-Gen sowie einem F1-origin und T7-Promotor.

In dieser Arbeit wurde der Vektor zur Herstellung der cDNS-Bibliotheken verwendet.

3.1.3 Isolierung, Reinigung und Charakterisierung von Nukleinsäuren

3.1.3.1 Isolierung von Ribonukleinsäuren

In Bezug auf die Arbeit mit Ribonukleinsäuren (RNS) müssen besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden, da die RNS degradierenden Ribonukleasen ubiquitär vorhanden sind. Aufgrund der besonderen Stabilität der Ribonukleasen wurden alle Glaswaren vor Verwendung bei 250 °C für mindestens acht Stunden hitzesterilisiert und alle anderen Geräte soweit möglich autoklaviert. Zusätzlich wurden ausschließlich RNase-freie Lösungen verwendet und Handschuhe getragen.

Mittels der modifizierten Guanidinthiocyanat (GTC)/ Phenol-Methode (ursprünglich nach *Chirgwin et al. (28)*) wurden die bei Extraktion der RNS im Gewebe vorhandenen Ribonukleasen schnellstmöglich inaktiviert und somit der RNS-Abbau verhindert.

3.1.3.1.1. Isolierung der Gesamt-RNS aus intaktem Gewebe

- *Homogenisieren:* Frisch präpariertes Gewebe wurde zuerst in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder direkt weiterverarbeitet. Es erfolgte die Zugabe von peqGold RNAPure (PeqLab; 1 ml pro 50-100 mg Gewebe). Die Suspension wurde mit Hilfe eines Polytron bzw. im Potter-Elvehjem-Glas-Teflonhomogenisator homogenisiert.
- *Phasentrennung:* Um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten, wurde die Suspension fünf Minuten bei RT (Raumtemperatur) inkubiert und anschließend je eingesetztem Milliliter peqGold RNAPure 0,2 ml Chloroform zugeben. Die Proben wurden für 15 Sekunden kräftig invertiert und ruhten erneut für drei bis zehn Minuten bei RT. Eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 10000 rpm führte zur Trennung der Probe in drei Phasen: eine untere gelbe Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischenliegende trübe Interphase. Die RNS reichert sich ausschließlich in der wässrigen Phase an, während sich die DNS und die Proteine in der Interphase und der Phenolphase befinden. Die wässrige Phase nimmt dabei etwa 60% des Probenvolumens ein.
- *RNS-Präzipitation:* Die wässrige Phase wurde in ein frisches Röhrchen überführt und die RNS mit 0,5 ml Isopropanol pro eingesetztem Milliliter peqGold RNAPure versetzt und nach Inkubation für 15 Minuten bei RT bei der anschließenden Zentrifugation für zehn Minuten bei 10000 rpm und 4 °C präzipitiert. Das RNS-Präzipitat lag nun als Niederschlag gelartiger Konsistenz an der unteren Seite des Röhrchens vor.
- *Waschen der RNS:* Nach vorsichtigem Abziehen des Isopropanolüberstands erfolgte das Waschen des Präzipitats durch Zugabe von 5 ml einer 75 %igen Ethanollösung, Vortexen und anschließende Zentrifugation (zehn Minuten, 10000 rpm, 4 °C).
- *Lösen der RNS:* Das RNS-Präzipitat wurde kurz bei RT getrocknet und die RNS im Folgenden durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette in RNase-freiem Wasser gelöst.
- *Konzentrationsbestimmung:* Als letzter Schritt erfolgte die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNS.

3.1.3.1.2. Isolierung der Gesamt-RNS aus Zellkulturen

Von Herrn Prof. Dr. Fleischmann (Institut für Physiologie der Universität Bonn) erhielten wir Zellen, die zur Konservierung der RNS bereits in Trizol (Invitrogen) gelöst tiefgefroren zu uns geschickt wurden. Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Kanüle lysiert, fünf Minuten bei RT inkubiert und pro Milliliter Trizol 0,2 ml Chloroform zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz erneut bei RT für

drei bis zehn Minuten inkubiert und dann für zehn Minuten bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Ab hier war das weitere Vorgehen wie unter 3.1.3.1.1. beschrieben.

3.1.3.1.3. Isolierung der Poly(A)⁺RNS

Die im oben beschriebenen Schritt gewonnene Gesamt-RNS muss im Weiteren weiter aufgereinigt werden, da sie neben der mRNA (messenger-RNS) auch einen großen Anteil an ribosomaler RNS (rRNS) sowie in geringerem Maße heterogen-nukleare RNS (hnRNS) und Transfer-RNS (tRNS) enthält. Die Anreicherung der hier benötigten mRNA erfolgte auf Basis der Oligo(dT)-Affinitäts-Chromatographie nach *Aviv und Leder* (4). Dieses Verfahren beruht auf der Tatsache, dass fast alle eukaryotischen mRNA-Moleküle am 3'-Ende ein Poly-Adenylat, den sogenannten Poly-A-Schwanz besitzen. Mittels komplementärer Oligo-Thymidylat (Oligo(dT))-Moleküle, die an Cellulose gebunden sind, wird die mRNA aus dem RNS-Gemisch durch Bindung des Poly-A-Schwanzes an die Oligo(dT)-Moleküle abgetrennt. Diese Bindung bleibt mit Puffern hoher Salzkonzentration weitgehend stabil, während die anderen Bestandteile von der Cellulose entfernt werden können. Durch Elution mit Puffern niedriger Salzkonzentration oder Wasser wird die Bindung zwischen mRNA-Molekülen und Cellulose destabilisiert und die Poly(A)⁺RNS gewonnen.

- *Aufquellen und Äquilibrieren der Oligo(dT)-7-Cellulose:* 1 g Cellulose wurde mit 3 ml H₂O-DEPC versetzt und quellen gelassen. Danach erfolgte eine Zentrifugation für drei Minuten bei 1000 rpm; der Überstand wurde dekantiert. 3 ml Waschpuffer wurden zugegeben und erneut für drei Minuten bei 1000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit Waschpuffer auf 20 ml Volumen aufgefüllt und die Cellulose resuspendiert. Daraus wurden 40 x 500 µl Aliquots hergestellt; die Lagerung erfolgte bei 4 °C.
- *Poly(A)⁺-Präparation:* Es wurden 500-1000 µg Gesamt-RNS verwendet, die mit TES-Puffer auf ein Volumen von 600 µl adjustiert wurden. Anfangs erfolgte eine Inkubation für zehn Minuten bei 65°C im Wasserbad, danach wurde der Ansatz direkt auf Eiswasser (0 °C) abgekühlt. Anschließend wurden 75 µl 5 M NaCl (RNase-frei) zugegeben, der gesamte Ansatz in ein Reaktionsgefäß mit 500 µl äquilibrierter Oligo(dT)-7-Cellulose überführt und für 15 Minuten bei RT im Bakterienschüttler bei 250 rpm inkubiert. Nach Zentrifugation für zwei Minuten bei 3000 rpm und RT wurde der Überstand abpipettiert. Zur sedimentierten Oligo(dT)-7-Cellulose gab man 1 ml eiskalten Waschpuffer zu und schüttelte den Ansatz von Hand für zwei Minuten bei Raumtemperatur. Danach zentrifugierte man erneut für zwei Minuten bei 3000 rpm und RT, der Überstand wurde dekantiert. Dieser Waschschritt war zweimal zu wiederholen. Anschließend wurde die Oligo(dT)-7-

Cellulose in 1 ml eiskaltem H₂O-DEPC resuspendiert und sofort für zwei Minuten bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde dekantiert. Zur Elution der RNS gab man 400 µl H₂O-DEPC zu, inkubierte den Ansatz für fünf Minuten bei 55 °C im Wasserbad und überführte ihn direkt auf Eis. Nun wurde abermals für zwei Minuten bei 3000 rpm und RT zentrifugiert, der Überstand (=Eluat) in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und auf Eis gestellt, dieser Elutionsschritt noch zweimal wiederholt und die Eluate vereinigt.

- *Konzentrationsbestimmung:* Zur Bestimmung der Konzentration wurde eine 1:1 Verdünnung hergestellt (40 µl H₂O-DEPC, 40 µl Eluat) und die Absorption mit einer Quarzküvette bei 260 nm gemessen.
- *Präzipitation und Aufbewahrung:* Die RNS wurde mit Ethanol präzipitiert und jeweils in H₂O-DEPC auf eine Konzentration von 2 µg/µl eingestellt. Die Proben wurden bei – 80 °C aufbewahrt.

3.1.3.2 cDNS-Synthese (Herstellung von Erststrang)

Die Amplifikation zu untersuchender Nukleotidsequenzen mittels PCR erfolgte nicht unmittelbar aus der aufgereinigten Poly(A)⁺ RNS, sondern über den Zwischenschritt der Erststrang-cDNS-Synthese, bei der die RNS in complementary bzw. copy (c) DNS umgeschrieben wird. Die cDNS-Synthese wurde mit dem SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR durchgeführt. Grundlage des Verfahrens ist eine von *Gubler et al.* (59) entwickelte Methode zur Erststrangsynthese.

Zunächst wurde ein Ansatz aus 500 ng Poly(A)⁺mRNS (gelöst in 1 µl H₂O-DEPC), 1 µl 10 mM dNTPs, 1 µl 2 µM Gen-spezifischer Primer (GSP) und 7 µl H₂O-DEPC hergestellt. Dieser wurde bei 65 °C für fünf Minuten inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 2 µl 10 x RT Puffer, 4 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl RNase Out erfolgte die Inkubation im Heizblock für zwei Minuten. Nun wurde noch 1 µl SuperScript Reverse Transkriptase zugefügt und der Ansatz weitere 50 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Inkubation bei 70°C für 15 Minuten inaktiviert, nach Abkühlen 1 µl RNase H zum Abbau des RNS-Anteils der entstandenen RNS/DNS-Hybriden zugegeben und bei 37°C für 20 Minuten inkubiert. Der Ansatz konnte direkt für die PCR verwendet werden, wobei je PCR-Ansatz 1,5-2 µl des Erststrangansatzes eingesetzt wurden.

Entsprechende Kontrollen in Bezug auf korrekt erfolgte Erststrangsynthese wurden parallel durchgeführt.

3.1.3.3 Isolierung von Desoxyribonukleinsäuren

Desoxyribonukleinsäuren enthalten die genetische Information für die biologische Entwicklung von Zellen und einigen Viren. DNS-Moleküle sind wesentlich stabiler als RNS-Moleküle und stellen im Labor insbesondere in Form von Plasmiden ein wichtiges Instrument für viele molekularbiologische Anwendungen dar.

3.1.3.3.1. Isolierung geringer Mengen Plasmid-DNS

- *klassische Mini-Prep*

Das folgende Protokoll (modifiziert nach *Sambrook, Russel (134)*), die sogenannte Mini-Prep dient zur Gewinnung geringer Plasmid-DNS-Mengen aus Bakterienklonen.

Ist superhelikale DNS längere Zeit Hitze ausgesetzt, wird sie irreversibel denaturiert (159). Infolgedessen kann sie nicht mehr durch Restriktionsenzyme geschnitten werden, zeigt andere Laufeigenschaften im Gel und lässt sich kaum mit Ethidiumbromid anfärben. Bei Plasmid-DNS hingegen erfolgt diese irreversible Denaturierung wesentlich langsamer und sie kann so durch ihre differierenden Eigenschaften von der restlichen DNS durch Zentrifugation abgetrennt werden. Zusätzlich zugefügtes Lysozym optimiert das Aufbrechen der Zellwände und somit den Plasmid-DNS-Gewinn.

Ein isolierter Klon wurde in eine 5 ml LB-Kultur mit entsprechender Menge Antibiotikum überimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator belassen. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml der Bakteriensuspension bei 3500 rpm fünf Minuten zentrifugiert und das Sediment in 300 µl STETL-Puffer resuspendiert. Anschließendes Kochen der Suspension für eine Minute bei 100 °C diente der Denaturierung der genomischen DNS und anderer Zellbestandteile, danach erfolgte die Abkühlung auf Eis für zwei bis drei Minuten und Zentrifugation (15 Minuten, 12000 rpm, RT). Die sedimentierten Bakterienbestandteile entfernte man mit einem sterilen Zahnstocher, gab je Probe 300 µl Isopropanol zu und zentrifugierte erneut für 30 Minuten bei 12000 rpm und RT. Folgend wurde der Überstand dekantiert und das Sediment mit je 1 ml einer 70 %igen Ethanollösung gewaschen und zentrifugiert (15 Minuten, 12000 rpm, RT). Das Sediment wurde getrocknet und in 50 µl RNase-H₂O resuspendiert. Zur Analyse der Plasmid-DNS der einzelnen Klone erfolgte eine entsprechende Restriktion, für welche je 5 µl der DNS-Lösung verwendet wurden.

- *Qiaprep Spin Miniprep*

Eine weitere Methode zur Isolierung geringer Mengen Plasmid-DNS ist die Aufreinigung der DNS mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit, wobei dieses einen sehr hohen Reinheits-

grad erzielt, so dass aus diesen DNS-Lösungen direkt eine Sequenzierung der isolierten DNS mit dem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer erfolgen kann, was mit der klassischen Miniprep-Methode nicht möglich ist. Die Methode der Qiaprep Spin Miniprep beruht auf alkalischer Lyse (nach *Birnboim, Doly* (12)), bei welcher die Bakterienzellwand aufgebrochen wird, die superhelikale DNS und Proteine denaturiert werden und in großen Komplexen präzipitieren. Die Plasmid-DNS hingegen wird nicht irreversibel geschädigt, da der alkalische pH-Wert zwar alle DNS-Doppelbindungen zerstört, doch aufgrund der verflochtenen Struktur der Plasmide sich diese nur in sehr geringem Maße trennen, solange die Inkubationszeit im alkalischen Milieu nicht zu lange gewählt wird. Durch Zentrifugation erfolgt eine Abtrennung der denaturierten Komplexe und die Plasmid-DNS kann aus dem Überstand gewonnen werden. Bei der Qiaprep Spin Miniprep erfolgt die Aufreinigung spezifisch auf Säulen, die Silikonmembranen enthalten, auf denen die Plasmide unter Konditionen hoher Salzkonzentration gebunden sind. RNS, Proteine und andere Metaboliten haften nicht an diesen Membranen und werden abgewaschen.

Ein einzelner Klon wurde in eine 5 ml LB-Kultur mit entsprechender Menge Antibiotikum überimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator belassen. 1,5 ml der Bakterien-suspension wurde am nächsten Tag bei 3500 rpm fünf Minuten zentrifugiert und das Sediment in 250 µl P1-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 250 µl alkalischem P2-Puffer, Invertieren der Reaktionsgefäße zur gleichmäßigen Durchmischung und Inkubation bei RT für fünf Minuten. Daraufhin wurden 350 µl P3-Puffer zur Neutralisation zugegeben, mehrmals kräftig invertiert und der Ansatz für zehn Minuten bei 12000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die Säule gegeben, bei 12000 rpm und RT für eine Minute zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im nächsten Schritt wurden 750 µl PE-Puffer auf die Säule pipettiert und nochmals unter gleichen Konditionen zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule erneut eine Minute zentrifugiert. Zur Elution der DNS erfolgte nun die Zugabe von 50 µl EB-Puffer auf die Säule, Inkubation für eine Minute bei RT und Zentrifugation. Das Eluat wurde in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt und zur Analyse der Plasmid-DNS verwendet.

3.1.3.3.2. Isolierung großer Mengen von Plasmid-DNS

Das folgende Protokoll, die sog. Maxi-Prep, dient zur Gewinnung großer Mengen (Milligramm-Bereich) hochreiner Plasmid-DNS. Die Maxi-Prep wurde mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit durchgeführt. Grundlage ist auch hier die alkalische Lyse (12), gefolgt von Bindung der Plasmid-DNS an eine Anionen-Austauscher-Säule unter Bedingungen niedriger Salzkonzentration und entsprechendem pH-Wert. Durch einen Waschschrift mit Puffern mittlerer

Salzkonzentration werden RNS, Proteine und andere Unreinheiten entfernt, anschließend die Plasmid-DNS unter Bedingungen hoher Salzkonzentration eluiert und mittels Isopropanol-Präzipitation konzentriert und entsalzt.

Ein isolierter Klon wurde in eine 5 ml LB-Kultur mit entsprechender Menge Antibiotikum überimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator belassen. Von dieser Bakteriensuspension wurde 1 ml entnommen, in einen 1000 ml Erlenmeyerkolben (mit 400 ml LB-Medium und Antibiotikum) überimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag überführte man diese Bakterienkultur unter sterilen Bedingungen in einen Zentrifugenbecher und zentrifugierte für 15 Minuten bei 6000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde dekantiert, das Sediment in 10 ml P1-Puffer resuspendiert und in ein 30 ml-Corex-Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 ml alkalischem P2-Puffer, Invertieren der Suspension und Inkubation bei RT für höchstens fünf Minuten. Die Neutralisation wurde durch Zugabe von 10 ml P3-Puffer und kräftigem Invertieren der Suspension nach Ablauf der fünf Minuten erzielt. Nach Zentrifugation für 30 Minuten bei 12000 rpm und 4 °C wurde der entstandene Überstand auf eine vorher mit 10 ml QBT-Puffer equilibrierte Qiagen-Säule gegeben. Nach Durchlauf des gesamten Überstands erfolgten zwei Waschschriffe mit je 30 ml QC-Puffer. Anschließend wurde die Plasmid-DNS mit 15 ml QF-Puffer in ein neues Corex-Röhrchen von der Säule eluiert, mit 10,5 ml Isopropanol versetzt und für 30 Minuten bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Danach kam noch ein Waschschriff mit einer 70 %igen Ethanollösung hinzu, um den Salzgehalt der aufgereinigten Plasmid-DNS zu verringern. Das Sediment wurde nun getrocknet, in einem angemessenen Volumen H₂O resuspendiert und mittels photometrischer Messung und anschließender entsprechender Verdünnung die DNS-Konzentration der Lösung auf 1 µg/µl eingestellt. Die gewonnene Plasmid-DNS wurde mittels Restriktion und Sequenzierung analysiert.

3.1.3.4 Reinigung, Präzipitation und Konzentrationsbestimmung von Ribonukleinsäuren

- *Phenol-Chloroform-Extraktion:* Mit Hilfe von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI)-Gemischen können Proteine aus wässrigen Nukleinsäurelösungen entfernt werden, wobei das Phenol zur Denaturierung der Proteine dient.

Es wurden zu der in 400 µl H₂O gelösten aufzureinigenden DNS 400 µl PCI gegeben, der Ansatz durchmischt und fünf Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert, wodurch zwei Phasen entstanden. Die wässrige Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl Diethylether versetzt, gevortext, bei 12000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und die

entstandene Oberphase abpipettiert und verworfen. Dieser Waschschrift wurde wiederholt und das Reaktionsgefäß anschließend für 15 Minuten mit geöffnetem Deckel bei RT inkubiert, um die vollständige Verflüchtigung des Ethers zu gewährleisten.

- *Präzipitation:* Zur Konzentration und/oder Reinigung von Nukleinsäuren durch Ethanolpräzipitation wurde folgendes Protokoll (nach *Sambrook, Russell* (134)) verwendet:

Die DNS-Lösung wurde mit 5 M NaCl oder 7,5 M NH₄OAc auf eine Salzkonzentration von 0,5 M bzw. 2 M eingestellt. Danach wurde das 2,5-fache des Volumens der Lösung an 100 % Ethanol (-20 °C) zugegeben und nach mehrmaligem Invertieren 30 Minuten bei 12000 rpm und RT zentrifugiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift durch Zugabe von 1 ml 70 % Ethanol, erneute Zentrifugation für 15 Minuten bei 12000 rpm und Trocknen des Sediments nach Dekantieren des Überstands bei RT.

- *Konzentrationsbestimmung:* Die Extinktion der Lösungen wurde in entsprechender Verdünnung bei 260 nm in einer Quarzküvette gegen H₂O als Referenz gemessen (Gene Quant II, Pharmacia Biotech). Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine gemessene Extinktion von 1 einer RNS-Konzentration von 40 µg/ml bzw. einer DNS-Konzentration von 50 µg/ml.

3.1.3.5 Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren / Gewinnung einzelner Fragmente

3.1.3.5.1. Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren im Bereich von 200 bp bis 10000 bp lassen sich mittels Agarosegelen sowohl für analytische als auch präparative Zwecke gut auftrennen.

Zur Herstellung der Gele wurde eine entsprechende Menge Agarose im zugehörigen Volumen 1 x TBE gelöst und in einem Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle geschmolzen. Nach Abkühlung auf 50 °C und Zugabe von Ethidiumbromid (0,05 µg/ml final) wurde die Lösung in den Gelträger ausgegossen (modifiziert nach *Sambrook, Russell* (134)) und erstarren gelassen. Fertige Gele konnten bei 4 °C bis zu mehreren Wochen gelagert werden.

- *Denaturierende Agarosegele*

Denaturierende Agarosegele lösen durch denaturierende Agentien Sekundärstrukturen in RNS-Molekülen und trennen DNS-Doppelstränge. Sie dienen vor allem der Analyse von RNS-Proben.

0,69 g Agarose wurden mit 80 ml H₂O-DEPC und 8 ml 10 x MOPS (RNase frei) zum Lösen der Agarose in einem Becherglas erhitzt. Nach Abkühlung auf ca. 55 °C wurden 3,6 ml Formaldehyd hinzugefügt, das Gel in eine mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂ : H₂O = 1:30) vorbehandelte Form gegossen und erkalten gelassen.

Eine entsprechende Menge zu analysierender RNS wurde mit 6,25 µl deionisiertem Formamid, 2,0 µl Formaldehyd, 1,25 µl 10 x MOPS und 1,0 µl Ethidiumbromid (Etbr : H₂O = 1:20) versetzt, 15 Minuten bei 55 °C im Wasserbad zur Denaturierung der RNS in Einzelstränge inkubiert, anschließend auf Eis für fünf Minuten abgekühlt, mit 2,5 µl RNase-freiem Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Von dem RNS-Größenstandard (0,24–9,5 Kb RNA-Ladder, 1 µg/µl (Invitrogen)) wurde ein Aliquot von 2 µl ebenfalls im Wasserbad denaturiert und auf das Gel aufgetragen.

- *Nichtdenaturierende Agarosegele*

Nichtdenaturierende Agarosegele kamen sowohl für analytische also auch präparative Zwecke zum Einsatz. Das DNS-Probenvolumen lag zwischen 10 und 100 µl und wurde zum Auftragen mit 1/10 Volumen DNS-Auftragspuffer versetzt. Es wurden 0,8 und 2,0 % Agarosegele benutzt, als Elektrophoresepuffer diente 1 x TBE. Die Auftrennung erfolgte je nach Agarosekonzentration anfangs bei 80-95 V, danach bei 120-150 V.

3.1.3.5.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

DNS-Fragmente von bis zu 1000 bp können mit Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt werden. Es wurden 7% Gele von 1 mm Dicke für analytische Zwecke verwendet.

Zusammensetzung der Gellösung:

- 10 % 10 x TBE
- 5,8 % Acrylamid 40 %
- H₂O

Kurz vor dem Ausgießen wurden 0,1 % (G/V) APS und 0,15 % (V/V) TEMED zugefügt und zur vollständigen Polymerisierung das Gel nach dem Gießen mindestens eine halbe Stunde ruhen gelassen.

Als Elektrophoresepuffer wurde 1 x TBE benutzt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in einer Vertikalapparatur bei anfangs 180 V, dann 220 V.

3.1.3.5.3. Färbung und Dokumentation der Gele

Der Interkalationsfarbstoff Ethidiumbromid (Etbr) wurde zur Sichtbarmachung der im Gel aufgetrennten Nukleinsäuren verwendet. Im UV-Licht können die Einlagerungskomplexe durch ihre violette Fluoreszenz detektiert werden (*Sharp et al.* (137)). In den Agarosegelen wurde das Ethidiumbromid bereits bei der Herstellung des Gels zugegeben (0,05 µg/ml). Die Polyacrylamidgele wurden nachträglich fünf bis 15 Minuten in einer Etbr-Lösung (0,5 µg/ml) gefärbt und anschließend mit destilliertem Wasser gespült, um überschüssiges Ethidiumbromid zu entfernen.

Zur Dokumentation dienten Fotografien der Gele im UV-Licht.

3.1.3.5.4. Größenstandards

Um die Größe der aufgetrennten Nukleinsäurefragmente abschätzen zu können, wurde bei jeder Elektrophorese ein Größenmarker aufgetragen, der ein Gemisch aus Nukleinsäurestücken bekannter Länge darstellt. Als RNS-Größenmarker wurde der 0,24–9,5 Kb RNA-ladder (Invitrogen), als DNS-Größenmarker die in unserem Labor selbst hergestellten pUC18- bzw. M9-Größenmarker verwendet.

- RNA ladder: 0,24 - 1,35 - 2,37 - 4,4 - 7,46 - 9,49 kb
- pUC18: 65 - 75 - 220 - 396 - 517 - 1412 kb
- M9: 348 - 469 - 1138 - 1326 - 2088 - 3334 - 4724 - 6100 - 9745 kb

3.1.3.5.5. Isolierung einzelner Nukleinsäurefragmente

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNS-Fragmente muss das gewünschte Fragment wieder aus dem Gel isoliert werden. Dies geschah hier mittels der sog. Elektroelution (modifiziert nach *Davis et al.* (37)). Die entsprechende Bande wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten, das Gelfragment in einen Dialysierschlauch überführt und 300 µl 1 x TBE zugegeben. Die Enden des Schlauchs wurden mit Kunststoffklammern verschlossen und der Schlauch in eine Elektrophoresekammer mit 1 x TBE eingebracht. Die DNS wurde bei RT und 135 mA in 30 Minuten eluiert. Anschließend wurde die wässrige DNS-Lösung aus dem Schlauch entnommen, dieser mit 100 µl 1 x TBE gespült und die Lösungen vereinigt. Die DNS wurde mit Ethanol präzipitiert.

3.1.3.6 Präparation von DNS-Fragmenten / Ligationsreaktion

3.1.3.6.1. Restriktion

Bei der Restriktion wird die DNS an bestimmten Stellen durch Restriktionsenzyme geschnitten. Jedes Enzym erkennt eine meist palindromische Sequenz von vier bis acht Basenpaaren, innerhalb der es die DNS schneidet. Die Auswahl des Enzyms richtet sich danach, welche Fragmente man aus der DNS erhalten möchte, was durch die festgelegte Klonierungsstrategie oder Analysemethode vorgegeben wird. In dieser Arbeit wurden Restriktionsenzyme zur Präparation von DNS-Fragmenten für Klonierungszwecke sowie zum Screening von Bakterienklonen und Analyse von DNS-Fragmenten verwendet.

Beispiele der verwendeten Restriktionsenzyme:

- Erzeugung glatter Enden: EcoRV, SmaI
- Erzeugung überhängender Enden: BamHI, EcoRI, BstXI, KpnI, XhoI

Zur Restriktion für weiterführende Klonierungsexperimente wurden je 10 µg einer Maxi-Prep mit 4 µl des gewünschten Enzyms und entsprechendem Restriktionspuffer in einem 100 µl-Ansatz inkubiert.

Die Restriktion von PCR-Fragment-Lösungen unbekannter Konzentration erfolgte unter denselben Bedingungen.

3.1.3.6.2. Antarctic Phosphatase-Reaktion

Das Enzym Antarctic Phosphatase katalysiert die Entfernung von 5' Phosphat-Gruppen der DNS. Da den mit diesem Enzym behandelten Fragmenten die 5'-Phosphoryl-Termini, welche von den Ligasen benötigt werden, fehlen, erfolgt keine Selbstligation der Fragmente, wodurch die Menge an Leervektoren bei Ligierungsexperimenten erheblich reduziert werden kann.

Dazu wurden 1-5 µg DNS in 26 µl H₂O gelöst, 3 µl Antarctic Phosphatase-Puffer und 1 µl Antarctic Phosphatase zugegeben und der Ansatz eine Stunde bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Danach erfolgte die Inaktivierung des Enzyms bei 65 °C für fünf Minuten.

3.1.3.6.3. Ligation von DNS-Fragmenten

Bei der Ligationsreaktion werden mit Hilfe des Enzyms T4 DNA Ligase Phosphodiesterbrücken zwischen 5'-Phosphoryl- und 3'-Hydroxyl-Termini doppelsträngiger DNS erzeugt. Das Enzym verknüpft sowohl glatte als auch überhängende Enden miteinander.

Der Ligationsansatz umfasste stets 20 µl, wovon 1 µl Ligase und 2 µl Ligasepuffer waren und das übrige Volumen durch Fragment und Vektor in Lösung sowie H₂O gestellt wurde.

3.1.3.7 Enzyme

Für bereits beschriebene und folgende Arbeitsprotokolle im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von Enzymen unterschiedlicher Herkunft und Verwendungszwecke benötigt. Die verschiedenen Funktionen der verwendeten Enzyme werden im jeweiligen zugehörigen Abschnitt kurz erörtert.

3.1.4 Synthese radioaktiv markierter Nukleinsäuren

3.1.4.1 Synthese radioaktiv markierter DNS mit Zufallsprimern (Hybridisierungssonden)

Feinberg und Vogelstein (47) führten als erste die Verwendung von Zufallsprimern zur Initiierung der DNS-Synthese an zahlreichen Orten entlang der Sequenz des denaturierten Matrizenstrangs ein. Der Primer-Matrizen-Komplex ist dabei ein Substrat für das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I. Dieses besitzt alle Eigenschaften der DNA Polymerase I bis auf die 5'-3' Exonukleaseaktivität. Durch gezielte Mutation des Klenow-Fragments, welches im verwendeten Rediprime II Random Prime Labelling System (Amersham Biosciences) enthalten ist, fehlt diesem ebenfalls die 3'-5' Exonukleaseaktivität. Nicht radioaktiv markiertes Cytosin wird durch sein radioaktives Äquivalent im Reaktionsansatz ersetzt, dadurch werden die durch das Klenow-Fragment neu synthetisierten DNS-Fragmente radioaktiv. Die Fragmente können nun als sehr sensitive Hybridisierungsproben für entsprechende Filter und Membranen verwendet werden.

Zur Herstellung dieser radioaktiv markierten Fragmente wurde das Rediprime II Random Prime Labelling System (Amersham Biosciences) verwendet. Für ein korrektes Labelling war es wichtig, dass die DNS-Matrize in 45 µl TE-Puffer gelöst war. Zuerst wurde die zu markierende DNS bei 97 °C für fünf Minuten im Heizblock denaturiert, sofort auf Eis gestellt, um eine erneute Zusammenlagerung der DNS-Einzelstränge zu verhindern und anschließend in ein vorgefertigtes Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden 5 µl Redivue [32P] dCTP (mit rotem Farbstoff) zugegeben und die Lösung mehrmals auf- und abpipettiert, bis sich das blaue Reaktionsgemisch am Boden des Reaktionsgefäßes vollständig gelöst hatte und der Ansatz eine violette Farbe zeigte (Abbildung 8). Es erfolgte eine Inkubation im Wasserbad bei 37 °C für 30 Minuten.

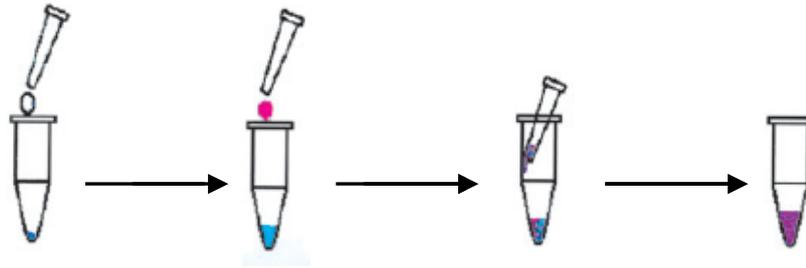


Abbildung 8: Versuchsablauf mit dem Rediprime II Random Prime Labelling System (modifiziert nach Rediprime II Random Prime Labelling System Product Booklet RPN 1633, RPN 1634, Amersham Biosciences, GE Healthcare).

3.1.4.2 Größenauftrennung der radioaktiv markierten DNS durch Säulenchromatographie

Die Größenauftrennung der erhaltenen radioaktiven DNS-Fragmente erfolgte mittels Säulenchromatographie. Hierzu wurden NickTM Columns von Amersham Biosciences verwendet. Das Prinzip der Auftrennung begründet sich darin, dass DNS-Fragmente verschiedener Größe unterschiedlich schnell durch die Gelmatrix der Säule wandern; große Moleküle laufen rasch hindurch, kleinere verfangen sich in den Strukturen der Matrix. Diese Methode ermöglicht die Abtrennung unerwünschter freier radioaktiver Nukleotide sowie zu kurzer DNS-Fragmente.

Nach Abkippen des Ethanol von der Säule wurde diese mit TE-Puffer (doppeltes Säulenvolumen) äquilibriert. Nun wurde der Ansatz mit den radioaktiv markierten DNS-Fragmenten auf die Säule gegeben und vollständig ins Gelbett einlaufen gelassen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 400 µl TE-Puffer; der Durchfluss wurde in einem Reaktionsgefäß F1 (Fraktion 1) gesammelt. Anschließend wurden 200 µl TE-Puffer auf die Säule gegeben und die Fraktion in einem neuen Reaktionsgefäß (F2) aufgefangen. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt. Zur Bestimmung der Stärke des radioaktiven Signals wurde aus jedem der sechs Reaktionsgefäße je 1 µl entnommen, in ein spezielles Plastikgefäß mitsamt der Pipettenspitze überführt und im Szintillationszähler (Wallac 1410 von Perkin Elmer) ausgezählt. Fraktionen mit mehr als 10^5 Counts/min (meist Fraktionen 2 und 3, siehe auch Abbildung 9) konnten für die spätere Hybridisierung verwendet werden.

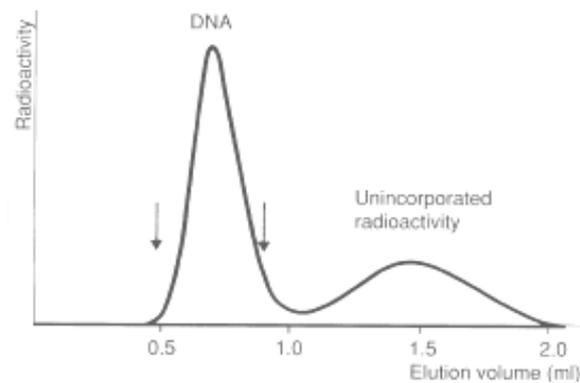


Abbildung 9: Elutionskurve der cDNS-Fragmente modifiziert nach NickTM Columns Product Booklet, Amersham Biosciences, GE Healthcare

3.1.5 Northern Blot-Analyse

Der Northern Blot ist eine Methode zur Übertragung von gelelektrophoretisch aufgetrennter RNS auf eine Membran aus Nitrocellulose oder Nylon. Auf der Membran erfolgt anschließend die spezifische Markierung von RNS-Sequenzen durch Hybridisierung mit radioaktiven DNS-Sonden.

Abhängig von der Einstellung der Temperatur und Salzkonzentration können auch Proben hybridisieren, die nur teilweise komplementär zur Sequenz der Hybridisierungssonden sind. Hochstringente Bedingungen unterbinden diese Interaktionen. Die Northern Blot Methode wurde von *Alwine et al.* (2) für Diazobenzylloxymethyl-(DBM)-Papier entwickelt und von *Thomas* (151) auf Nitrocellulose umgestellt.

3.1.5.1 Immobilisierung von RNS auf Nylonmembranen

Das Verfahren zur Immobilisation von RNS auf Membranen wurde von *Williams et al.* (165) entwickelt und fand hier in modifizierter Form Anwendung. Aufgrund größerer Stabilität und höherer Sensitivität wurden keine Nitrocellulose-, sondern Nylonmembranen eingesetzt.

Die in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennten RNS-Fragmente wurden durch kapillaren Transfer auf die Membran übertragen (Versuchsordnung modifiziert nach *Sambrook, Russell* (134)) und nach 24 Stunden die RNS durch UV-Bestrahlung (30 Sekunden, 365 nm, STRATALINKERTMStratagene) und Erhitzen (zwei Stunden, 80 °C) fixiert. Für die spätere Hybridisierung wurde die Membran in einen Plastikbeutel eingeschweißt.

3.1.5.2 Prähybridisierung und Hybridisierung

Vor der eigentlichen Hybridisierung wurde der Nylonfilter mit einer Prähybridisierungslösung für drei Stunden inkubiert, um Reagenzienreste aus dem Gel zu entfernen und unspezifische Bindungsplätze zu blockieren. Danach erfolgte die Hybridisierung über Nacht in einer Lösung, in der die radioaktive Sonde enthalten, die aber ansonsten mit der Prähybridisierungslösung identisch war (Zusammensetzung der Lösungen: siehe 3.1.6.2.3). Die radioaktiv markierten Sonden wurden in einer Konzentration von 2×10^6 - 2×10^7 cpm/ml in der Hybridisierungslösung eingesetzt. Die Sonden wurden vor der Verwendung für fünf Minuten bei 97 °C denaturiert, direkt auf Eis gekühlt und danach zur Hybridisierungslösung zugegeben. Die Nylonmembran wurde bei jedem Lösungswechsel in einen frischen Beutel luftblasenfrei eingeschweißt und im Wasserbad inkubiert. Der nichtgebundene Überschuss an Sonde wurde nach der Hybridisierung durch vier aufeinanderfolgende Waschschriffe mit 0,5 x SSC und 0,1 % SDS entfernt.

3.1.6 Darstellung und Klonierung von cDNS in E.coli

Als Klonierung wird eine Methode bezeichnet, bei der ein spezifisches DNS-Fragment in einen Vektor (beispielsweise ein Plasmid) integriert und von der Wirtszelle vervielfältigt wird. So erhält man eine Population von Zellen, die alle eine Kopie des originalen DNS-Fragments enthalten.

Um das gewünschte cDNS-Fragment zu erhalten, benötigt man Boten-Ribonukleinsäuren, messenger (m)RNS, welche durch Transkription von DNS-Sequenzen in Zellen entstehen. Diese werden isoliert und mittels des Enzyms Reverse Transkriptase in den Erststrang der cDNS (Komplementärstrang) umgeschrieben. Anschließend wird durch die DNS-Polymerase der Zweitstrang synthetisiert. Nach Erhalt dieser doppelsträngigen cDNS erfolgt die Klonierung in einen entsprechenden Vektor. In Vektoren integrierte cDNS-Fragmente können nun amplifiziert und analysiert werden.

3.1.6.1 Erstellung einer cDNS-Bibliothek

Eine cDNS-Bibliothek repräsentiert in Form der copy- bzw. complementary-RNS idealerweise das gesamte Transkriptom einer Zelle oder eines Gewebes. Das Kollektiv der Klone der Bibliothek kann mit Hilfe von radioaktiv markierten Sonden durchmustert werden (sogenanntes Screening). Klone, welche die gewünschte cDNS enthalten, werden zur späteren Sequenzierung und Analyse isoliert und vermehrt.

Jede cDNS-Bibliothek muss einige Grundvoraussetzungen erfüllen. Zum einen sollte sie groß genug sein, um alle in der Zelle vorhandenen Transkripte zu repräsentieren. Andererseits sollte sie möglichst wenig Klone, die sehr kleine DNS-Fragmente und damit wenig Information (< 500 bp) besitzen, einschließen. Außerdem ist es wünschenswert, dass ein großer Anteil an Vollängenkopien der mRNA repräsentiert ist; letztere sind Grundlage der zu analysierenden cDNS und notwendig, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

Die hier beschriebene cDNS-Bibliothek wurde mit dem SuperScript™ Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning (Invitrogen) erstellt. Abbildung 11 zeigt eine Zusammenfassung der gesamten Vorgehensweise.

3.1.6.1.1. cDNS-Synthese

Die cDNS-Synthese erfolgte mit Abweichungen nach dem von *Gubler* (59) beschriebenen Verfahren. Durch reverse Transkription der mRNA mit dem Enzym Superscript™II-Reverse Transkriptase in DNS erhielt man den Erststrang. Die Superscript™ II Reverse Transkriptase ist eine modifizierte Version der Moloney Murine Leukemia Virus Reversen Transkriptase mit verringerter RNase-Aktivität. Es wurden sequenzspezifische Primer - im Folgenden als Gen-spezifische Primer (GSP) bezeichnet - bzw. Zufallsprimer verwendet, die an die mRNA binden und als Startpunkt für die reverse Transkription dienen.

Der Gen-spezifische Primer umfasste 15 Nukleotide komplementär zum Beginn der zweiten konstanten Region der CaV β 2-Untereinheit mit resultierender Schmelztemperatur von 48°C und besaß einen zusätzlichen Phosphatrest am 5'-Terminus. Die Phosphorylierung des GSP war hier nicht zwingend notwendig, da die verwendeten BstXI-Adapter (Invitrogen) am 5'-Terminus phosphoryliert waren, was für eine erfolgreiche Ligationsreaktion ausreichend war. Die nicht-phosphorylierten Zufallsprimer bestanden jeweils aus sechs Nukleotiden, wobei deren Nukleotidzusammensetzung und -reihenfolge untereinander differierte. Aus den vier Basen Thymin, Adenin, Guanin und Cytosin ergeben sich bei hexameren Molekülen 46 = 4096 mögliche Varianten, die an unterschiedlichste Sequenzen der RNS binden können. Somit können durch Zufallsprimer auch unbekannte RNS-Sequenzen in die cDNS-Synthese einbezogen werden. Zur Synthese des Zweitstrangs dient der zuvor synthetisierte Erststrang als Vorlage. Die Zweitstrangsynthese wurde durch das Enzym E.coli DNA Polymerase I in Kombination mit E.coli RNase H und E.coli DNA Ligase katalysiert. Die E.coli DNA Polymerase zeigt eine 5'- 3'-Endonuklease-Aktivität. Diese Eigenschaft ermöglicht den Abbau des bestehenden RNS-Stranges, der mit dem Matrizenstrang gepaart ist, während ein neuer DNS-Strang gebildet wird (sog. nick translational replacement). Zugabe von E.coli DNA Ligase steigert

die Klonierungseffizienz von doppelsträngiger cDNS, die aus langen (> 2000 bp) mRNA synthetisiert wurde. Um sicherzustellen, dass die synthetisierte cDNS glatte Enden besitzt, wurde T4 DNA Polymerase zugefügt.

- *Synthese des Erststrangs:* Zuerst wurden in einem RNase-freien Reaktionsgefäß 2 µl sequenzspezifischer Primer (GSP, 0,5 µg/µl) - (bzw. 1 oder 2 µl Zufallsprimer (50 ng/µl) - und 5 µl Poly(A)⁺RNS (1 µg/µl) bei 70 °C für zehn Minuten inkubiert und danach direkt auf Eis überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von

- 4 µl First Strand Buffer
- 2 µl 0,1 M DTT
- 1 µl 10 mM dNTP Mix
- 1 µl [³²P] dCTP

und eine Inkubation bei 37 °C für zwei Minuten. Nun gab man noch 5 µl SuperScript II Reverse Transkriptase hinzu und inkubierte den Ansatz bei 37 °C für eine Stunde. 2 µl des Ansatzes wurden zur späteren Bestimmung der Ausbeute an Erststrang in ein separates Reaktionsgefäß mit 43 µl 20 mM EDTA und 5 µl yeast tRNA überführt.

- *Synthese des Zweitstrangs:* Auf Eis erfolgte die Zugabe von (zu den 18 µl aus dem Erststrang-Ansatz)

- 93 µl H₂O-DEPC
- 30 µl 5 x second strand buffer
- 3 µl 10mM dNTP Mix
- 1 µl E.coli DNA Ligase (10 U/µl)
- 4 µl E.coli DNA Polymerase I (10 U/µl)
- 1 µl E.coli RNase H (2 U/µl)

Dieser Ansatz wurde bei 16°C für zwei Stunden inkubiert.

- *Glätten der cDNS-Enden:* Nach Zugabe von 2 µl T4 DNA Polymerase und Inkubation bei 16 °C für fünf Minuten wurde der Ansatz direkt auf Eis überführt.

- *Reinigung und Präzipitation der cDNS:* Es erfolgte die Zugabe von

- 10 µl 0,5 M EDTA
- 150 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol

mit anschließender Zentrifugation bei 12000 rpm für fünf Minuten bei RT. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt (140 µl) und Ethanol-präzipitiert.

3.1.6.1.2. Adapterligation

Das Produkt der Erst- und Zweitstrang-Reaktion ist doppelsträngige cDNS mit glatten Enden. Um die Ligationseffizienz zu steigern, fügt man an die cDNS Adapter an. Diese Adapter sind kurze doppelsträngige Oligomere, die einen glatten Terminus und am anderen Terminus eine 5'-Verlängerung besitzen. Die Ligation dieser Adapter wird unter Adapterüberschuss durchgeführt.

In diesem Fall wurden BstXI-Adapter (Invitrogen) mit 5'-Verlängerung verwendet, wobei sich die überlappenden Enden der Adapter mit den überlappenden Enden von BstXI-geschnittenem Vektor wieder zu einer BstXI-Schnittstelle zusammenlagern. Die Adapter haben vorgefertigte 5'-Verlängerungen und brauchen nicht geschnitten zu werden.

Auf Eis erfolgte die Zugabe von (zum cDNS-Ansatz aus 3.1.6.1.1)

- 25 µl H₂O-DEPC
- 10 µl 5 x T4 DNA Ligase Buffer
- 10 µl BstXI Adapter
- 5 µl T4 DNA Ligase

und eine Inkubation über Nacht bei 16 °C mit nachfolgender Aufreinigung und Ethanolpräzipitation der cDNS.

3.1.6.1.3. Quantifizierung / TCA-Präzipitation

Um die Ausbeute an Erst- bzw. Zweitstrang quantifizieren zu können, wurde die Signalstärke der in die cDNS eingebauten radioaktiven Nukleotide bestimmt.

Zur Bestimmung der Erststrang-Syntheserate wurden 10 µl-Aliquots der verdünnten Probe (die in 3.1.6.1.1 abgenommen wurde) auf zwei Glasfaserfilter pipettiert. Einer der Filter wurde bei RT getrocknet. Der andere Filter wurde dreimal je fünf Minuten in einem Becherglas mit 50 ml eiskalter 10 % TCA-Lösung mit 1 % Natriumpyrophosphat gewaschen (Kühlraum 4 °C). Darauf folgte ein weiterer Waschschrift mit 100 % Ethanol für zwei Minuten bei RT und Trocknen des Filters bei RT.

Beide Filter wurden in Szintillationsflüssigkeit ausgezählt.

- trockener Filter = Gesamtcounts
- gewaschener Filter = Ausbeute an Erststrang

Die restlichen 30 µl wurden einer Ethanolpräzipitation unterzogen, das Präzipitat mit einer 70 % Ethanol (EtOH)-Lösung gewaschen, der Überstand dekantiert, das Reaktionsgefäß bei 37 °C für zehn Minuten getrocknet und ebenfalls die Counts im Szintillationszähler ausgezählt. Dasselbe Vorgehen wurde zur Bestimmung der Synthese-Effizienz des Zweitstrangs verwendet.

Um nun den Betrag der erhaltenen cDNS in Mikrogramm ausrechnen zu können, bedienen wir uns folgender Formeln:

$$\text{SA (cpm/ pmol CTP)} = (\text{cpm/ 10}\mu\text{l}) / (\text{200 pmol dCTP / 10 }\mu\text{l}) \quad \text{SA} = \text{spezifische Aktivität}$$

$$\text{cDNS-Gehalt } (\mu\text{g}) = (\text{cpm} \times (\text{50 }\mu\text{l/ 10}\mu\text{l}) \times (\text{150 }\mu\text{l/ 10}\mu\text{l}) \times (\text{4 pmol dNTP/pmole dCTP})) /$$

$$(\text{cpm/ pmole dCTP}) \times (\text{3,030 pmole dNTP/ }\mu\text{g cDNS})$$

3.1.6.1.4. Größenauftrennung der cDNS

Da der cDNS-Ansatz nach der Adapterligation noch große Mengen an freien Adaptern, die die Ligationseffizienz verschlechtern und cDNS kleiner Größe (< 500 bp) enthält, vollzieht man eine Größenauftrennung der cDNS. Dies geschieht mittels Säulen-Gelchromatographie, wobei kleine cDNS-Moleküle (< 500 bp) und Adapter durch Größenfraktionierung von der gewünschten cDNS getrennt werden, indem sie langsamer durch das Säulenmaterial wandern als längere Fragmente. Somit enthalten die Fraktionen cDNS abnehmender Länge, d.h. die ersten Fraktionen enthalten die längsten cDNS-Moleküle.

Zur präzipitierten cDNS aus 3.1.6.1.2 wurden 100 µl TEN-Puffer zugegeben und das Präzipitat auf Eis gelöst. Währenddessen erfolgte die Äquilibration der Säule mit insgesamt 3,2 ml TEN Puffer. Man gab nun den gesamten cDNS-Ansatz auf die Säule und ließ ihn einlaufen; der Durchfluss wurde in Reaktionsgefäß Nr.1 gesammelt. Anschließend gab man erneut 100 µl TEN Puffer auf die Säule und sammelte den Durchfluss in Reaktionsgefäß Nr.2; die Säule wurde stets komplett leer tropfen gelassen. Mit dem nächsten 100 µl Aliquot TEN-Puffer begann das Sammeln von Einzeltropfen-Fraktionen (ca. 35 µl) in ein jeweils neues Reaktionsgefäß, bis 18 Tropfen aufgefangen waren, gegebenenfalls wurden nochmals neue 100 µl Aliquots TEN-Puffer auf die Säule gegeben.

Eine anschließende Volumenbestimmung der Tropfenfraktionen in den Reaktionsgefäßen diente der Berechnung des Gesamtvolumens und dem Bestimmen der Fraktion, bei welcher das Gesamtvolumen annähernd 550 µl betrug; nachfolgende Fraktionen wurden nicht für die weiteren Arbeitsschritte verwendet, da sie die kleinen cDNS-Fragmente und Adapter enthielten (Tabelle 2).

| Nr. | Fraktionsvolumen (µl) | Gesamtvolumen (µl) | Cerenkow counts (cpm) | cDNS-Gehalt (ng) | cDNS-Konzentration (ng/µl) |
|-----|-----------------------|--------------------|-----------------------|------------------|----------------------------|
| 1 | 95 | 95 | 25 | | |
| 2 | 97 | 192 | 30 | | |
| 3 | 34 | 226 | 32 | | |
| 4 | 30 | 256 | 20 | | |
| 5 | 35 | 291 | 29 | | |
| 6 | 33 | 324 | 32 | | |
| 7 | 34 | 358 | 43 | | |
| 8 | 34 | 392 | 125 | 3,3 | 0,1 |
| 9 | 36 | 428 | 625 | 16 | 0,44 |
| 10 | 34 | 462 | 1196 | 32 | 0,94 |
| 11 | 34 | 496 | 1740 | 46 | 1,4 |
| 12 | 34 | 530 | 1523 | 40 | 1,2 |
| 13 | 34 | 564 | | | |
| 14 | 30 | 594 | | | |
| 15 | 33 | 627 | | | |
| 16 | 35 | 662 | | | |
| 17 | 32 | 694 | | | |
| 18 | 36 | 730 | | | |
| 19 | 34 | 764 | | | |
| 20 | 35 | 799 | | | |

Tabelle 2: Beispiel zur Bestimmung der zu verwendenden Elutionsfraktionen

Nach Auszählen der verbleibenden Fraktionen in einem Szintillationszähler mit Erhalt der Cerenkov-Counts kalkulierte man den cDNS-Gehalt für jede Fraktion mittels der unten aufgeführten Formel. Aus dem errechneten cDNS-Gehalt und dem Fraktionsvolumen wurde anschließend die Konzentration jeder Fraktion bestimmt. Es wurden nur die Fraktionen berücksichtigt, die eine angemessene Anzahl an Cerenkov-Counts aufwiesen. Die ersten Fraktionen mit geringem radioaktiven Signal wurden verworfen.

Zur Berechnung des cDNS-Gehalts der eluierten Fraktionen diene folgende Formel:

$$\text{cDNS-Gehalt (ng)} = (\text{Cerenkov cpm}) \times 2 \times (4 \text{ pmol dNTP/ pmol dCTP}) \times (1000 \text{ ng/}\mu\text{g ds cDNS}) /$$

$$\text{SA (cpm/ pmol dCTP)} \times (1,515 \text{ pmol dNTP/ }\mu\text{g ds cDNS})$$

Für die Vektorligation im nächsten Schritt musste eine Konzentration der cDNS von 10 ng cDNS in höchstens 14 μl TEN-Puffer erreicht werden. Somit wurden Fraktionen mit niedrigem cDNS-Gehalt vereinigt, präzipitiert und in einem entsprechenden Volumen $\text{H}_2\text{O-DEPC}$ resuspendiert um diese Anforderung zu erfüllen.

Abschließend erfolgte eine Aufreinigung und Präzipitation der cDNS und Lagerung des Ansatzes über Nacht bei -20°C .

3.1.6.1.5. Ligation der cDNS

Als Klonierungsvektor diene mit dem Restriktionsenzym BstXI linearisierter pcDNAII-Vektor (Invitrogen). 10–20 ng cDNS reichen aus, um 50 ng Vektor bei der Ligation zu sättigen, eine Erhöhung der cDNS-Menge bringt kaum eine weitere Erhöhung der Ligationseffizienz.

In ein neues Reaktionsgefäß wurden

- 4 μl 5 xT4 DNA Ligase Puffer
- 1 μl BstXI-geschnittener Vektor (50 ng/ μl)
- 10 ng cDNA ($\geq 0,7$ ng/ μl)
- $\text{H}_2\text{O-DEPC}$ ad 19 μl
- 1 μl T4 DNA Ligase

zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 4°C inkubiert.

3.1.6.1.6. Transformation der in den pcDNAII-Vektor ligierten cDNS in E.coli mittels Elektroporation

Nach Ethanolpräzipitation der ligierten cDNS wurde diese in 5 μl H_2O resuspendiert. Die Elektroporation erfolgte nach dem Protokoll aus 3.1.1.5.2. Von jedem Elektroporationsansatz wurde eine Verdünnungsreihe auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausgebracht und durch die Anzahl der gewachsenen Kolonien das Volumen an Bakteriensuspension berechnet, welches benötigt wurde, um eine Zahl von 20000 Kolonien je Agarplatte zu erlangen (siehe Abbildung 10).

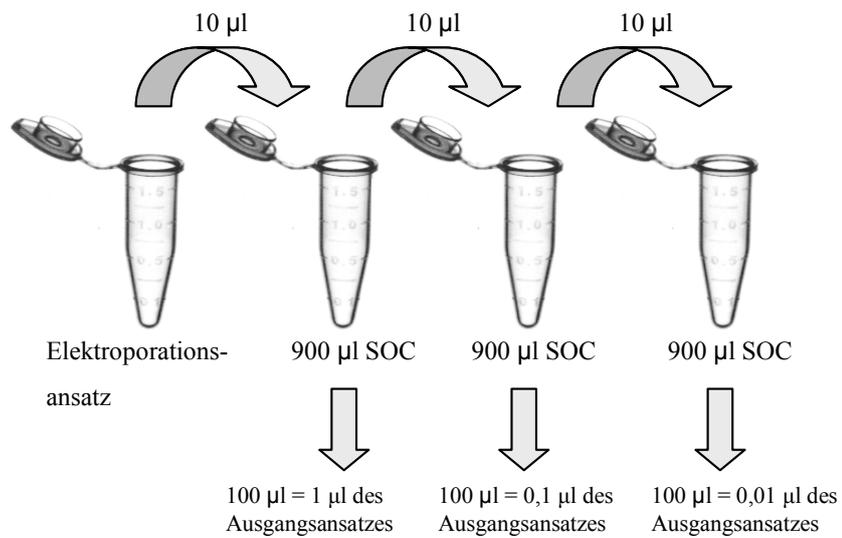


Abbildung 10: Vorgehen zur Erstellung von Verdünnungsreihen

Das entsprechende Volumen der Bakteriensuspension wurde auf einem Nylon-Filter (Duralon UVTM, (Stratagene)), der auf einer LB-Ampicillin-Agarplatte auflag, mit dem Drigalski-Spatel ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank war ein dichter Bewuchs der Platten mit Bakterienkolonien von 0,3–1 mm Durchmesser zu erkennen.

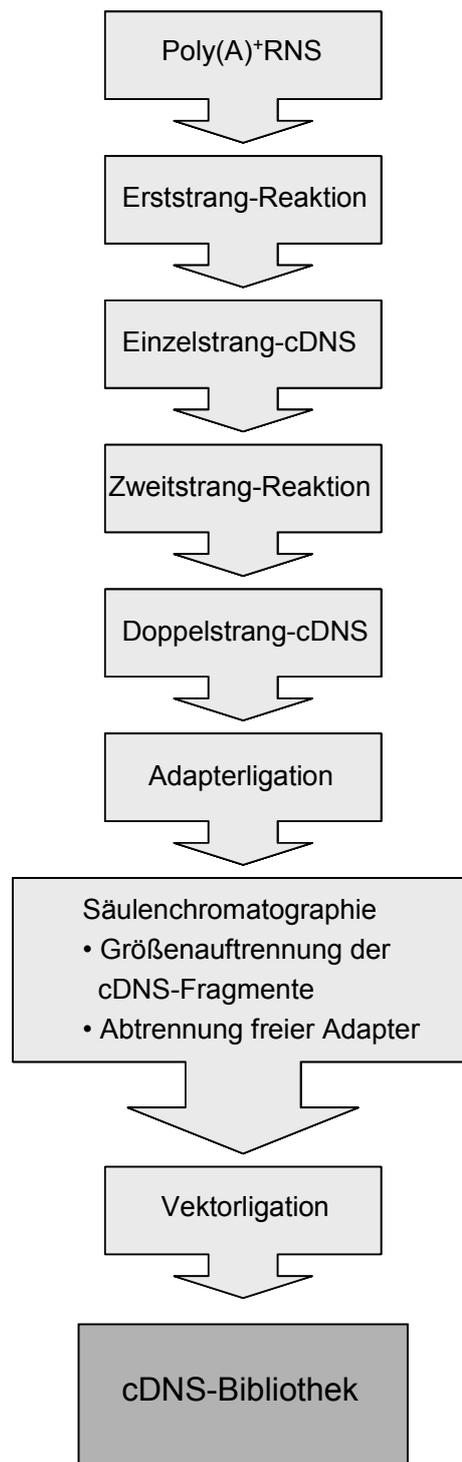


Abbildung 11: Schritte zur Erstellung einer cDNS-Bibliothek im Flussdiagramm

3.1.6.2 Identifizierung und Isolierung von positiven Klonen

Zum Durchmustern der cDNS-Bibliothek mit radioaktiven Sonden benötigt man Duplikate der auf den Platten wachsenden Bakterienklone, welche analysiert werden können. Um später auf positive Kolonien wieder Zugriff zu haben, werden die sogenannten Masterplatten mit den vitalen Originalklonen gelagert. Die Herstellung eines Duplikats geschieht, indem ein spiegelgleicher Abdruck der Platten hergestellt wird (Replikaplatten, nach *Grunstein und Hogness* (58)).

3.1.6.2.1. Herstellung eines spiegelgleichen Duplikats

Die deckungsgleiche Replikation der Bakterienkolonien auf den Nylonfiltern erfolgte angelehnt an eine Methode von *Hanahan und Meselson* (62). Der bewachsene Nylonfilter wurde von der Agarplatte mit einer Pinzette vorsichtig abgehoben und so auf ein Stück 3MM-Whatman-Papier transferiert, dass die gewachsenen Kolonien obenauf lagen. Nun wurde ein neuer Nylonfilter auf den ersten gelegt und beide Filter mit einem Stahlstempel angedrückt. Durch das Andrücken wurde gewährleistet, dass von jeder der Kolonien Klone am Replikafilter haften blieben (Abbildung 12). Um später die Filter wieder zur Deckung bringen zu können, wurde mit einer Kanüle an drei Stellen der Rand der Filter durchstochen. Nach Trennung der Filter wurden diese auf Agarplatten mit Ampicillin aufgebracht. Zur Regeneration der Masterplatten wurden diese zwei Stunden bei RT stehen gelassen und dann bei 4 °C aufbewahrt. Die Replikaplatten hingegen wurden vier Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, um die duplizierten Kolonien zu ausreichender Größe heranwachsen zu lassen. Die Replikafilter wurden anschließend über Nacht bei 37 °C auf Chloramphenicol/Ampicillin-Platten aufgelegt, um einen Stopp des Zellwachstums bei gleichzeitiger Vermehrung der Bakterienplasmide zu erreichen.



Abbildung 12: Fotografien eines bewachsenen Filters (links) und des verwendeten Metallstempels (rechts)

3.1.6.2.2. Denaturierung und Fixierung der DNS

Angelehnt an die von *Grunstein und Hogness* (58) beschriebene Methode der in-situ-Hybridisierung erfolgte die Hybridisierung der Nylon-Filter. Hierbei erfolgte die Lyse der Bakterienkolonien und Denaturierung ihrer DNS exakt an der Stelle der Kolonie.

Die Replikafilter wurden von den Ampicillin-/Chloramphenicolplatten abgelöst, kurz getrocknet und mit der bewachsenen Seite nach oben fünf Minuten lang in einer Metallwanne inkubiert, in der jeweils 900 µl einer 0,5 N NaOH-Lösung für jeden Filter aufgebracht waren. Die Lösung wurde von den trockenen Filtern fast vollständig aufgenommen. Durch das erzeugte alkalische Milieu wurden die DNS-Stränge denaturiert, die DNS blieb aber an der Stelle, wo die entsprechende Kolonie gewachsen war, am Filter haften. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Filter zum Trocknen auf Papiertücher gelegt und der Vorgang wiederholt. Des Weiteren schlossen sich im Vorgang identische Inkubationen mit 1 M Tris pH 7.5 (zweimal fünf Minuten) und 0,5 M Tris pH 7.5 / 1,5 M NaCl (einmal fünf Minuten) an, durch die die Neutralisierung der alkalischen Lösung erfolgte.

Nach dem Trocknen der Filter wurden diese zwischen Papiertücher gelegt und für drei Stunden bei 80°C gebacken.

3.1.6.2.3. Hybridisierung der Filter mit radioaktiven Sonden

- *Prähybridisierung*: Um Bakterienreste, die infolge der durchgeführten Lyse entstanden waren, zu entfernen, wurden die Filter mit 3 x SSC / 0,1 % SDS bei 60 °C im Schüttelwasserbad für eine Stunde gewaschen. Anschließend erfolgte die Prähybridisierung in 80 mm Petrischalen, wobei in jeder Schale ca. 15 Filter mit einem Volumen von 10,5 ml (0,7 ml Lösung pro Filter) inkubiert wurden. Die Prähybridisierungslösung setzte sich aus unten aufgelisteten Lösungen zusammen und die Prähybridisierung wurde bei 60 °C für drei Stunden im Schüttelwasserbad durchgeführt. Zusammensetzung der Prähybridisierungslösung (für 40 ml):
 - 6 ml 20 x SSC
 - 8 ml 50 x Denhardt'sche Lösung
 - 0,6 ml Lachs-Sperma-DNS 150 µg/µl (Denaturierung bei 97 °C für fünf Minuten, dann fünf Minuten auf Eis inkubieren)
 - 25,5 ml H₂O
- *Hybridisierung*: Nach erfolgter Prähybridisierung wurden die Filter aus den Petrischalen entnommen und mit 3 x SSC / 0,1 % SDS in einer Metallwanne gewaschen. Für die

Hybridisierung wurden neue Petrischalen mit Hybridisierungslösung gefüllt, die von der Zusammensetzung der Prähybridisierungslösung entsprach, jedoch die radioaktive Sonde in einer Konzentration von ca. 5×10^5 cpm/ml enthielt. Das dem Sondenansatz entsprechende Volumen wurde an H₂O weniger zugegeben. Die Sonde sowie die Lachssperma-DNS wurden vor Zugabe zur Hybridisierungslösung denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 50–55 °C.

- *Entfernung unspezifisch gebundener Sonden:* Um bei der späteren Autoradiographie Stör-signale soweit möglich zu vermeiden, wurden die Filter mit Waschlösungen verschiedener Zusammensetzung von unspezifisch gebundenen Sonden gereinigt. Reihenfolge der Waschschrte:

| Waschlösung | Zeit | Temperatur | Anzahl der Waschschrte |
|----------------------|--------|-------------------|------------------------|
| 3 x SSC; 0,1 % SDS | 5 min | RT (Wippe) | 2 x |
| 1 x SSC; 0,1 % SDS | 10 min | RT (Wippe) | 2 x |
| 0,3 x SSC; 0,1 % SDS | 10 min | 60° C (Wasserbad) | 1 x |

Die durch unterschiedliche Lösungen und Temperatureinstellungen erzeugten stringenten Bedingungen wurden so gewählt, dass falsch gebundene Sonden möglichst abgewaschen, leichte Sequenzunterschiede (im Hinblick auf Spleißvarianten) jedoch toleriert wurden. Vor Trocknen der feuchten Filter wurden diese auf einen mit Plastikfolie überzogenen Pappkarton gelegt, mit Plastikfolie abgedeckt und acht bzw. 16 Stunden bei -80 °C auf einen Röntgenfilm aufgelegt.

3.1.6.2.4. Isolierung positiver Klone

Die Röntgenfilme wurden mit Hilfe einer Entwicklermaschine entwickelt und nicht abgebildete Umriss- und Markierungen der Filter zur späteren Orientierung auf die Röntgenfilme übertragen (Abbildung 13). So konnten sie mit den Masterplatten verglichen und die auf dem Röntgenfilm signalgebenden Bakterienkolonien mit einem sterilen Zahnstocher isoliert und in ein Reaktionsgefäß mit 500 µl LB-Medium überführt werden. Man erkennt in Abbildung 13, dass sich auf den meisten Filtern deutliche punktförmige Schwärzungen zeigen, die Sondenmarkierter DNS positiver Kolonien entsprechen. Im Durchschnitt wiesen ein bis zwei Kolonien pro Filter ein radioaktives Signal auf.

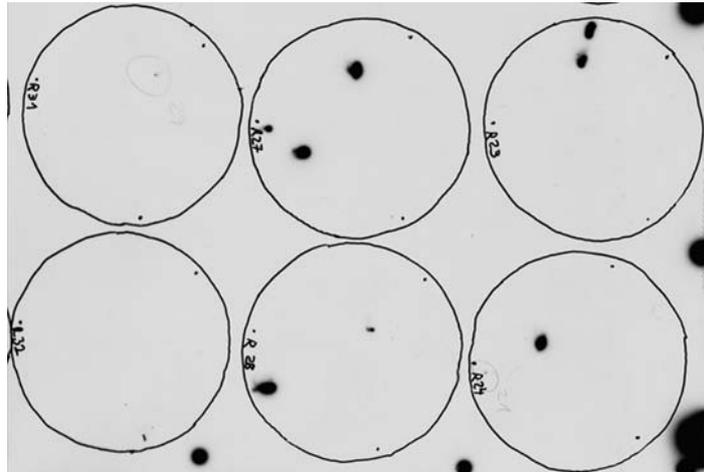


Abbildung 13: Fotografie eines beispielhaft herausgegriffenen Röntgenfilms des ersten Screenings

3.1.6.2.5. Darstellung reiner Klone

Aufgrund der hohen Koloniedichte der Masterfilter enthielten die Bakteriensuspensionen der meisten isolierten positiven Klone in der Regel auch Zellen benachbarter Kolonien. Zur Darstellung reiner Klone wurden die Suspensionen in Verdünnung ausplattiert und erneut wie oben beschrieben gescreent. Wie in Abbildung 14 zu sehen, erhielten wir beim Screening der neuen Platten eine große Anzahl positiver identischer Klone pro Filter, so dass die am besten einzeln zu isolierenden Klone gezielt entnommen werden konnten. Diese wurden diesmal direkt zur Gewinnung und Analyse der Plasmid-DNS mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung verwendet. Es war kein erneutes Screening vonnöten.

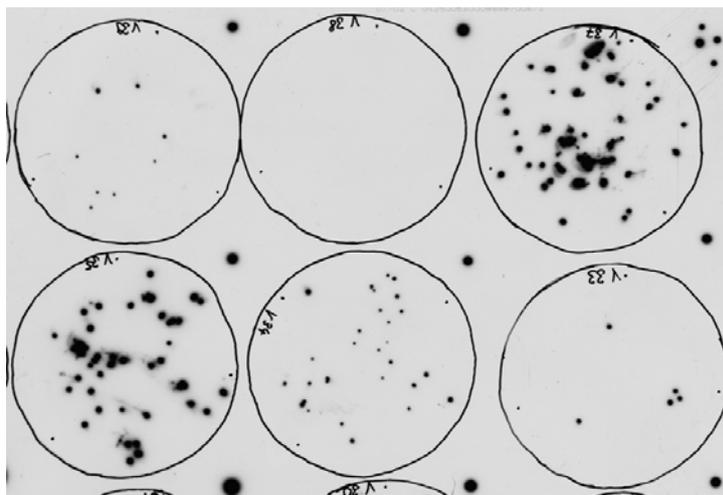


Abbildung 14: Fotografie eines beispielhaft herausgegriffenen Röntgenfilms des zweiten Screenings

3.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction (PCR))

3.1.7.1 Prinzipien der PCR

Die 1988 von *Saiki et al.* beschriebene „Primer-Directed Enzymatic Amplification of Dna with A Thermostable Dna-Polymerase“ (133) (PCR) ist eine Methode, um DNS ohne Zuhilfenahme eines lebenden Organismus zu vervielfältigen. Grundlage ist die Amplifikation eines DNS-Fragments durch zwei flankierende Primer mittels einer thermostabilen DNS-Polymerase, die beim Erhitzen während der PCR-Zyklen nicht zerstört wird. Der Amplifikationsprozess umfasst ca. 30 Zyklen, die in einem Thermocycler durchgeführt werden. Jeder Zyklus besteht aus Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation. Die PCR hat vielfältige Anwendungsgebiete wie die Klonierung von Genen, Mutagenese, Erkennung von Krankheiten oder in der Forensik zur Darstellung des sogenannten genetischen Fingerabdrucks.

3.1.7.2 Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG/Operon synthetisiert, dort bereits High Purity Salt Free (HPSF) oder - im Fall von phosphorylierten Primern - High Performance Liquid Chromatography (HPLC) aufgereinigt und im lyophilisierten Zustand verschickt. Die Primer wurden vor Gebrauch in einem entsprechenden Volumen H₂O in einer Konzentration von 10 pmol/μl gelöst.

3.1.7.3 PCR-Polymerasen

PCR-Polymerasen sind thermostabile DNS-Polymerasen, d.h. Enzyme, die auch bei Temperaturen um 100 °C, die für die PCR benötigt werden, ihrer Aktivität beibehalten. Sie wurden unter anderem aus den Bakterien *Thermus aquaticus* und *Pyrococcus furiosus* isoliert (85, 129) und sind die Grundlage für den breiten Einsatz der PCR in der molekularbiologischen Forschung.

3.1.7.3.1. Taq-Polymerase

Taq-Polymerase, isoliert aus dem in heißen Quellen lebenden Bakterium *Thermus aquaticus*, war die erste identifizierte hitzestabile Polymerase. Sie besitzt eine hohe Prozessivität - 1000 Basen werden in 30 Sekunden synthetisiert - aber auch eine hohe Fehlerrate - vier Basen werden im Durchschnitt in einer Sequenz von 1000 Basen falsch eingebaut-, da diese Polymerase über keine 3'-5' Proofreading-Aktivität verfügt. Deshalb ist die Taq-Polymerase für Klonie-

rungsexperimente, bei denen die identische genetische Sequenz benötigt wird, weniger geeignet. Zudem erzeugt sie DNS-Fragmente mit Adenin-Überhängen, was die Klonierung der Fragmente verkompliziert. Die Taq-Polymerase wurde in dieser Arbeit verwendet, um bestimmte cDNS-Sequenzen in einem Erststranggemisch nachzuweisen, da sie eine gute Prozessivität aufweist.

- *Protokoll für eine PCR-Reaktion mit Taq-Polymerase:*
 - 5 -10 ng Matrizen-DNS
 - 2,5 µl Forward-Primer (10 pmol/µl)
 - 2,5 µl Reverse-Primer (10 pmol/ µl)
 - 5 µl 10 x PCR Puffer
 - 1 µl dNTPs (Gemisch aus dATPs, dGTPs, dCTPs und dTTPs) (10 mM)
 - 1 µl Taq-Polymerase
 - Mit H₂O auf 50 µl Gesamtvolumen auffüllen
- *Beispielhafter Zyklus für ein Fragment von 1000 bp Länge:*

| | | | |
|----------------------|---------------|---------------------------------|-----------|
| 94 °C | Denaturierung | 3 Minuten | } 30-35 x |
| 94 °C | Denaturierung | 30 Sekunden | |
| T _M -4 °C | Annealing | 30 Sekunden | |
| 72 °C | Elongation | 30 Sekunden pro 1000 Basenpaare | |
| 72 °C | Elongation | 7 Minuten | |

Die Primer-Annealing-Temperatur wird dem jeweiligen Primerpaar, die Elongationszeit der Länge der DNS-Matrize individuell angepasst. Dabei bestimmt sich die Annealing-Temperatur aus der Primersequenz, indem man für jedes Thymin bzw. Cytosin 2°C, für jedes Adenin bzw. Guanin 4°C annimmt, die Werte addiert und somit die Schmelztemperatur T_M berechnet. Von der erhaltenen Temperatur werden 5°C abgezogen, womit man die Annealing-Temperatur erhält. Die Elongationszeit berechnet sich aus der Länge des zu amplifizierenden Fragments, da die Polymerase etwa 30 Sekunden zur Synthese von 1000 Basenpaaren benötigt.

3.1.7.3.2. Phusion-Polymerase

Die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) stellt eine Hybridpolymerase dar, bei welcher die Pyrococcus DNA-Polymerase mit einer Doppelstrang-DNS-bindenden Domä-

ne fusioniert wurde. Dadurch erlangt diese Polymerase eine hohe Prozessivität (ungefähr 1000 Basenpaare in 15 Sekunden) und sehr niedrige Fehlerrate ($4,4 \times 10^{-7}$ in HF-Puffer) sowie eine hohe Ausbeute an Amplifikat bei sehr geringer Matrizenzahl. Außerdem erzeugt sie DNS-Fragmente mit glatten Enden, was die Klonierung der Fragmente in entsprechende Vektoren erleichtert. In dieser Arbeit wurde die Phusion-Polymerase zur Amplifizierung von DNS-Sequenzen aus Erststrang mit einer Länge von bis zu 6500 bp verwendet, sowie für die Herstellung aller mittels PCR erzeugten DNS-Fragmente für Klonierungsexperimente.

- *Protokoll für eine PCR-Reaktion mit der Phusion-Polymerase:*
 - 1 ng Matrizen-DNS bzw. 1,5-2 μ l Erststrang
 - 2,5 μ l Forward-Primer (10 pmol/ μ l)
 - 2,5 μ l Reverse-Primer (10 pmol/ μ l)
 - 10 μ l HF-Puffer (Finnzymes Oy, Espoo, Finnland)
 - 1 μ l dNTPs (Gemisch aus dATPs, dGTPs, dCTPs und dTTPs) (10 mM)
 - 0,5 μ l Phusion-Polymerase (2 U/ μ l)
 - mit H₂O auf 50 μ l Gesamtvolumen auffüllen
- *Beispielhafter Zyklus für ein Fragment von 1000 bp Länge:*

| | | | |
|----------------------|---------------|---------------------------------|-----------|
| 98 °C | Denaturierung | 1 Minute | } 30-35 x |
| 98 °C | Denaturierung | 5 Sekunden | |
| T _M -4 °C | Annealing | 10 Sekunden | |
| 72 °C | Elongation | 10 Sekunden pro 1000 Basenpaare | |
| 72 °C | Elongation | 2 Minuten | |

Es wurde stets HF-Puffer verwendet, da das Enzym in diesem Puffer eine geringere Fehlerrate besitzt als im alternativ möglichen GC-Puffer (Finnzymes Oy, Espoo, Finnland), der die Prozessivität steigert. Auch hier wurde die Hybridisierungstemperatur dem jeweiligen Primerpaar und die Elongationszeit der Länge der DNS-Matrize individuell angepasst. Bei sehr langen zu amplifizierenden Sequenzen (> 6000 bp) wurde die Elongationszeit jedes Zyklus um fünf Sekunden verlängert, um die abnehmende Enzymaktivität zu kompensieren.

3.1.7.4 One-Step-RT-PCR

Bei der One-Step-RT-PCR werden sowohl cDNS-Synthese (aus Gesamt-RNS oder Poly(A)⁺RNS) als auch die nachfolgende Amplifikation der Fragmente mittels PCR im selben Reaktionsgefäß unmittelbar hintereinander im Thermocycler durchgeführt. Hier wurde das SuperScriptTM One-Step-RT-PCR mit Platinum Taq System (Invitrogen) verwendet. Der RT/Platinum Taq Mix ist eine Mischung aus SuperScriptTM Reverser Transkriptase und rekombinanter Taq-Polymerase, welche mittels eines spezifischen Antikörpers inaktiviert bleibt, bis nach Vervollständigung der cDNS-Synthese die Temperatur auf 94 °C zum Beginn der folgenden PCR-Zyklen ansteigt. Hierbei löst sich der Antikörper von der Polymerase und diese wird aktiv.

Es wurden jeweils ein Kardiomyozyt bis maximal zwölf isolierte Kardiomyozyten direkt für die Reaktion verwendet, ohne vorher die RNS zu isolieren. Zusätzlich zugegebenes RNaseOut (Invitrogen) schützte die RNS vor der Degradierung durch in der Zelle vorhandene RNasen. Die Zellen wurden zuvor mittels Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und Wiederauftauen aufgebrochen.

- *Protokoll für eine PCR-Reaktion mit dem One-Step-RT-PCR-Kit (Invitrogen)*
 - 1 -12 isolierte Kardiomyozyten
 - 2,5 µl Forward-Primer (10 pmol/µl)
 - 2,5 µl Reverse-Primer (10 pmol/µl)
 - 1,5 µl RNase Out (Invitrogen)
 - 25 µl 2 x Reaction Mix (Puffer mit 0,4 mM jedes dNTP; 2,4 mM MgSO₄)
 - 1 µl RT/Platinum Taq Mix

- *Thermocycler-Protokoll:*

| | | | |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-----------|
| 50 °C | Reverse Transkription | 25 Minuten | |
| 94 °C | Aktivierung der PCR-Polymerase ; Inaktivierung der reversen Transkriptase; Denaturierung | 2 Minuten | |
| 94 °C | Denaturierung | 30 Sekunden | } 35-40 x |
| TM - 4 °C | Annealing | 30 Sekunden | |
| 72 °C | Elongation | 30 Sekunden | |
| 72 °C | Elongation | 7 Minuten | |

Die Annealing-Temperatur wurde individuell dem jeweiligen Primerpaar und den Stringenzbedingungen angepasst. Nach Amplifikation wurde aus jedem PCR-Ansatz eine entsprechende Menge entnommen und auf ein Agarosegel zur Analyse der erhaltenen DNS-Fragmente aufgetragen.

3.1.7.5 DNS-Sequenzierung mit dem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer

Seit 1975 wurden verschiedene Methoden zur raschen Sequenzierung von DNS-Abschnitten entwickelt. Die Methoden von *Maxam et al.* (97) (Sequenzierung mittels chemischer DNS-Spaltung) und *Sanger* (135) (Kettenabbruchsverfahren) gelten dabei als Pionierverfahren. Heute sind automatisierte DNS-Sequenzierungsverfahren wie das Cycle Sequencing (nach *Murray et al.* (108)) in Gebrauch. Sie verwenden mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierte Dideoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs). Dabei wird jedes der vier ddNTPs mit einem unterschiedlichen Farbstoff gekoppelt. So können alle vier ddNTPs in ein Reaktionsgefäß zugegeben werden. Es ist keine Aufspaltung in getrennte Ansätze sowie Markierung mit Radioisotopen notwendig, wie dies bei älteren Verfahren der Fall war. Der PCR-Reaktionsansatz besteht aus DNS-Matrize, Primer, hitzestabiler Polymerase, Puffer, nichtmarkierten dNTPs, fluoreszenzmarkierten ddNTPs und H₂O. Den Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten ddNTPs fehlt eine 3' OH-Gruppe, so dass nach ihrem Einbau kein weiteres Nukleotid mehr an die entstehende Polynukleotidkette angebaut werden kann; somit bricht die Sequenz dort ab. Nach Beendigung der PCR erhält man PCR-Fragmente verschiedener Längen, da überall dort, wo ein ddNTP eingebaut wurde, die Elongation stoppt. Mittels Kapillarelektrophorese werden die entstandenen Kettenabbruchprodukte aufgetrennt und mit einem Laser zur Fluoreszenz angeregt. Jedes ddNTP am Ende jedes DNS-Fragments zeigt die spezifische Fluoreszenz des gekoppelten Farbstoffs und kann so detektiert und analysiert werden. Die Nukleotidsequenz des sequenzierten DNS-Stranges wird durch ein Chromatogramm wiedergegeben. Das Cycle-Sequencing erfolgte mit dem BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems.

Zur Sequenzierung einer DNS-Sequenz wurden 1 µg einer Maxi-Prep bzw. 3 µl einer Miniprep, 1,5 µl BigDye Terminator, 1 µl des gewünschten Primers (10 pmol/µl) mit einem entsprechenden Volumen HPLC-H₂O vorgelegt, um ein Gesamtvolumen von 12 µl zu erreichen. Anschließend wurde eine PCR im Thermocycler (GeneAmp[®] PCR System 9700) unter folgenden Konditionen durchgeführt:

| | | | |
|-------|--------------------------|---------------------------|-------|
| 95 °C | Denaturierung | 1 Minute | } 30x |
| 95 °C | Denaturierung | 10 Sekunden | |
| 55 °C | Annealing und Elongation | 2 Minuten und 30 Sekunden | |

Parallel zur PCR erfolgte die Äquilibration der Sepharose, indem in jede Vertiefung der Quellplatte 300 µl HPLC-H₂O pipettiert wurden. Anschließend wurde die Sepharose drei Stunden bei RT inkubiert.

Um den Reaktionsansatz nach erfolgter PCR aufzureinigen, wurde die Sepharose zunächst fünf Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert, in jede Vertiefung 150 µl HPLC-H₂O zugegeben und unter gleichen Konditionen erneut zentrifugiert. Nun wurden die Reaktionsansätze auf je ein Sepharose-well pipettiert und in neue 0,2 ml Reaktionsgefäße, die mit 8 µl Hi-Di™ Formamid versehen waren, zentrifugiert. Formamid senkt die Schmelztemperatur von DNS-Komplexen, d.h. die Trennung doppelsträngiger DNS in Einzelstränge findet bei niedrigeren Temperaturen statt. So wird garantiert, dass die zu sequenzierenden DNS-Einzelstränge keine unspezifischen Bindungen eingehen und die Sequenzierung beeinträchtigen. Das Eluat konnte direkt zur Sequenzierung eingesetzt oder über mehrere Tage bei 4 °C gelagert werden.

3.1.8 Isolierung von Mauskardiomyozyten

3.1.8.1 Isolierung embryonaler Maus-Kardiomyozyten

Eine schwangere Maus (definierter Embryonaltag 13.5) wurde durch zervikale Dislokation getötet. Es folgte die vorsichtige Eröffnung des Bauchraums und Freilegung des Uterus. Der komplette Uterus wurde entnommen und in eine Petrischale mit ADS-Puffer überführt. Die einzelnen Embryonen wurden mit der Schere vorsichtig abgetrennt und in neue Petrischalen überführt. Nun schnitt man die Uteruswand auf und öffnete vorsichtig die Eihaut, wobei der Embryo freigelegt wurde. Unter dem Stereomikroskop wurde das gesamte Herz des Embryos herauspräpariert und in ein Reaktionsgefäß mit 0,5 ml Kollagenase-Lösung gegeben. Der Verdau erfolgte für 15 Minuten bei 37 °C im Heizblock unter Schütteln (500 rpm). Nach dem 15-minütigen Verdau wurden 0,5 ml DMEM hinzupipettiert und die Gewebestückchen durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette suspendiert.

Die Suspension wurde in eine Petrischale mit Polylysin-beschichteten Glasplättchen (mit 2 ml DMEM-Medium) gegeben (1 Schale pro Embryo) und bis zum nächsten Morgen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Nach 48 Stunden wur-

den einzelne, teils kontrahierende Kardiomyozyten unter dem Mikroskop mit einer Glaskapillare aufgesaugt, in ein PCR-Reaktionsgefäß ausgeblasen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung (PCR) aufbewahrt.

3.1.8.2 Isolierung adulter Mauskardiomyozyten

Die isolierten adulten Kardiomyozyten erhielten wir von Herrn Prof. Dr. Lipp vom Institut für Anatomie und Zellbiologie in Homburg. Das Herz einer vier bis acht Wochen alten Maus wurde mit einer Kollagenaselösung perfundiert. Danach konnten die einzelnen Kardiomyozyten durch leichtes Rütteln in entsprechender Lösung herausgelöst werden. Wie die embryonalen Kardiomyozyten wurden auch die adulten mittels einer Glaskapillare aus den Petrischalen aufgesammelt (vgl. 3.1.8.1).

3.2 Proteinbiochemie

3.2.1 Co-Immunopräzipitation

COS-Zellen wurden unter sterilen Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden mittels Transfektionsagens FuGENE 6 (Roche) mit einer CaV β 2a-N1-3 x FLAG- bzw. CaV β 2a-N4-Untereinheit im Verhältnis 1:1 transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, mit PBS gewaschen, zentrifugiert und das Zellpellet in RIPA-Puffer mit zugegebenen Proteaseinhibitoren solubilisiert. Hierzu wurden die Zellen mit einer dünnen Kanüle geschert und für 15 Minuten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ geschüttelt. Der entstandene Überstand wurde zu äquilibrierter Sepharose gegeben und für zwei Stunden bei 4°C unter Schütteln inkubiert mit nachfolgender Zentrifugation bei 4000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für drei Minuten. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ein CaV β 2-Antikörper zugegeben. Unter Schütteln wurde das Gemisch über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die erneute Zugabe äquilibrierter Sepharose und eine Inkubation des Ansatzes für zwei Stunden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf dem Rüttler mit anschließender Zentrifugation für drei Minuten bei 4000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Der Überstand wurde verworfen und die Sepharose viermal mit RIPA-Puffer gewaschen. Nun wurde der Puffer abpipettiert und 2 x Laemmli-Puffer zur Sepharose zugegeben. Nach einer Inkubation von fünf Minuten bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde die Probe auf ein SDS-Gel aufgetragen.

3.2.2 Cross-Linking-Experiment mit BS³

Das Cross-Linking-Experiment wurde modifiziert nach der von *Tsuruda et al.* (153) beschriebenen Methode durchgeführt. Bis(Sulfosuccinimidyl)suberat (BS³) enthält einen Sulfo-NHS(N-Hydroxysulfosuccinimid)-Ester, der mit Molekülen, die primäre Amine enthalten, reagiert. Proteine besitzen im Allgemeinen mehrere primäre Amine in den Seitengruppen von Lysinresten und sind so geeignete Ziele für NHS-Ester-Crosslinking-Agenzien. Mit dieser Methode kann unter anderem eine Interaktion eng benachbarter Proteine nachgewiesen werden, wie sie hier für CaV β 2-Untereinheiten gezeigt werden soll.

Die Zellen wurden mittels Transfektionsagens FuGENE 6 mit einer CaV β 2a-N1 bzw. CaV β 2a-N4-Untereinheit im Verhältnis 1:1 transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und mit PBS und 1 % Triton solubilisiert. Proteaseinhibitoren wurden ebenfalls zugegeben. Anschließend wurde die Suspension mit einer dünnen Kanüle geschert, für zehn Minuten bei 4 °C geschüttelt und dann für 15 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 125 mM BS³ (Pierce) zugegeben und unter Schütteln für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1M Tris pH 7.5 in das Reaktionsgefäß und einer Inkubation unter Schütteln für 15 Minuten, wurde abschließend 2 x Laemmli-Puffer hinzupipettiert und die Probe für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert, bevor sie auf ein SDS-Gel aufgetragen wurde.

3.3 Elektrophysiologie

Die Patch-Clamp-Technik wurde 1976 von *Erwin Neher und Bert Sakmann* entwickelt (109). Dabei werden Ströme über Zellmembranen mittels zweier Mikroelektroden gemessen. Die erste Elektrode stellt eine mit einer leitfähigen Lösung gefüllte Glaskapillare dar, in die ein beschichteter Silberdraht eintaucht. In der Badlösung liegt eine zweite Elektrode. Die Glaspipette wird vorsichtig auf die intakte Zelle gedrückt und ein leichter Unterdruck erzeugt, wodurch ein elektrischer Widerstand zwischen dem Inneren der Pipette und der Außenlösung erzeugt wird. Aufgrund des hohen Widerstands muss ein Strom, der durch einen Ionenkanal innerhalb Membranstücks, welches von der Glaskapillare abgedichtet ist, fließt, auch durch den Pipetteninhalt fließen, was eine Messung des Stroms ermöglicht. Durch diese Technik wurde die systematische Erforschung der Ionenströme der Zellen ermöglicht.

Die Patch-Clamp-Technik wird in verschiedenen Konfigurationen angewendet, in dieser Arbeit waren alle Messungen Ganzzellmessungen. Bei Ganzzellmessungen besteht eine Verbin-

dung zwischen dem Inneren der Glaskapillare und dem Inneren der Zelle. In dieser Konfiguration wird von der gesamten Zellmembran abgeleitet. Über die Pipettenlösung besteht zusätzlich die Möglichkeit, die Zelle von innen zu manipulieren.

Für alle Messungen wurden HEK293-Zellen verwendet.

3.3.1 Zellkultur und Transfektion

Human Embryonic Kidney Cells (HEK293-Zellen) wurden unter sterilen Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden mittels Transfektionsagens FuGENE 6 (Roche) mit einer $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit, $\text{CaV}\beta_2\text{a}$ -Untereinheit und eGFP (enhanced GFP) im Verhältnis 1:1:1 in Anlehnung an eine Arbeit von *Gerster et al.* (53) kotransfiziert. Dabei wurden pro Schale jeweils 0,7 μl , entsprechend 0,7 μg , der einzelnen Plasmide und 6 μl FuGENE verwendet. Dies galt auch für das $\text{CaV}\beta_2\text{a-N1-CaV}\beta_2\text{a-N4}$ -Fusionsprotein. Nach 24 Stunden wurden die Zellen vereinzelt, um die für die elektrophysiologischen Untersuchungen benötigten einzelnen Zellen zu erhalten. Weitere 24 bis 48 Stunden später wurden die Ca^{2+} -Ströme gemessen. Es wurden ausschließlich kräftig grün fluoreszierende Zellen für die Untersuchungen verwendet. Ohne GFP ergab sich eine sehr geringe Erfolgsquote im Hinblick auf Messung von Ca^{2+} -Strömen, so dass die Unterscheidung von korrekt transfizierten Zellen von unvollständig bzw. nichttransfizierten durch das GFP erleichtert wurde.

3.3.2 Elektrophysiologische Messungen

3.3.2.1 Verwendete Pipetten

Es wurden Borosilikat-Glaskapillaren (BioMedical Instruments) verwendet, die Widerstände von 2.0 bis 4.0 $\text{M}\Omega$ besaßen.

3.3.2.2 Messprotokoll

Die Ca^{2+} -Ströme wurden alle fünf Sekunden ausgehend vom Haltepotenzial (-90 mV) mit Testpotenzialen (400 ms) von -70 bis +70 mV in 10 mV-Schritten induziert, gemessen und aufgezeichnet.

In HEK293-Zellen, die mit der $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit und GFP, nicht aber mit der $\text{CaV}\beta_2\text{a}$ -Untereinheit transfiziert waren, zeigte sich ein kleiner, aber deutlich vorhandener Ca^{2+} -Strom ($I_{\text{Ca}, 0\text{mV}}$: -1.371 pA/pF \pm 0.447, $n = 23$), ebenso bei Messungen an nichttransfizierten HEK293-Zellen ($I_{\text{Ca}, 0\text{mV}}$: -1.094 pA/pF \pm 0.596, $n = 15$). Deshalb wurden nur Zellen, die eine Strom-

dichte von mehr als -3.5 pA/pF besaßen, in die Analyse einbezogen, um sicherzugehen, dass sowohl die CaV α_1 1.2- als auch die CaV β 2a-Untereinheit in der Zelle vorhanden waren.

3.3.2.3 Messung und Auswertung der Einzelparameter

Die Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit der Ca²⁺-Kanäle lässt sich messen, indem durch ein hinreichend negatives Haltepotenzial alle Kanäle in den aktivierbaren Zustand versetzt werden. Daraufhin wird die Spannung sprunghaft auf ein positiveres Potenzial gesetzt, wodurch sich ein Teil der Kanäle öffnet (siehe 3.3.2.2). Ein Maß, wie viele Kanäle bei der eingesetzten Testspannung gleichzeitig offen waren, ist die gemessene Stromamplitude. Die Messungen werden für verschiedene Potenziale wiederholt und die Messwerte in Abhängigkeit von der Spannung aufgetragen. Aus diesen Werten erhielten wir die Strom-Spannungs-Beziehung bzw. -Kurve. Die Strom-Spannungs-Beziehungen einzelner Zellen wurden nach der Formel $I = G(V - E_{rev}) / (1 + \exp(-(V - V_{1/2,act})/k))$ (Pearson und Dolphin, 1993, (117)) ausgewertet, um die maximale Ganzzelleleitfähigkeit G_{max} , das Umkehrpotenzial E_{rev} , die benötigte Spannung zur halbmaximalen Aktivierung des Ca²⁺-Kanals $V_{1/2,act}$ und den Steilheitsfaktor k zu erhalten. Dabei ist das Umkehrpotenzial E_{rev} der Schnittpunkt der Strom-Spannungs-Kurve mit der Spannungsachse. $V_{1/2,act}$ bezeichnet die Spannung, bei der genau die Hälfte der Kanäle aktiviert wird. Um diesen Wert zu bestimmen, werden die Amplituden oder Leitfähigkeiten der Ströme auf ihren Maximalwert (100%) normiert und an diese Kurve die obige Boltzmann-Funktion angepasst. Der Steilheitsfaktor k beschreibt die Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der Spannung und wird ebenfalls aus der Boltzmann-Funktion erhalten. Die Time-to-peak wurde ab 1,2 ms nach Beginn der Depolarisation gemessen, um Kapazitätsartefakte zu vermeiden. Die Erstellung der Steady-State Aktivierungskurve erfolgte durch Normalisierung der Stromdichte gemessen zwischen -70 mV und 0 mV zu der bei 0 mV gemessenen und Auswertung mittels einer Boltzmann-Gleichung ($I/I_{0mV} = 1 + (A-1)/(1 + \exp((V-V_{1/2})/k))$), mit $V_{1/2}$ als Spannung zur halbmaximalen Aktivierung und k als Steilheitsparameter. Die Steady-State Inaktivierung wurde mit einem Doppelpulsprotokoll gemessen, bei dem die Zellen in 10 mV-Schritten auf Potenziale von -100 bis $+40$ mV depolarisiert wurden. Während des nachfolgenden Sprungs zu 0 mV für 400 ms wurde der Ca²⁺-Strom gemessen. Die Steady-State Inaktivierungskurven wurden in Bezug zu dem Strom nach dem Vorpuls auf -100 mV normalisiert, der Durchschnitt ermittelt und mit oben aufgeführter Boltzmann-Funktion (siehe Steady-State Aktivierung) ausgewertet. Bei allen Messungen wurde ein P/4-Protokoll verwendet, um lineare Leckströme und die Kapazität zu subtrahieren. Die Tail-Currents wurden während eines 100 ms dauernden Schritts auf -50 mV nach einer 20 ms-Depolarisation auf Potenziale von -40 bis $+120$ mV bei $0,2$ Hz aufgezeichnet. Spitzen-Tail-Currents wurden in Bezug zur nach

einem Depolarisationsschritt auf +90 mV gemessenen Stromdichte normalisiert und mit einer Boltzmann-Funktion ausgewertet.

Die Daten wurden mit GraphPad Prism verglichen und mittels one-way ANOVA-Test bzw. T-Test hinsichtlich signifikanter Unterschiede zwischen den Spleißvarianten ausgewertet.

3.4 Fluoreszenzexperimente

An große Moleküle kann mittels verschiedener Methoden ein fluoreszierendes Protein kovalent fusioniert werden, das dann als sehr sensitiver Marker für dieses Molekül dient.

Fluoreszierende Proteine wie das Green Fluorescent Protein (GFP) können zur Beobachtung biologischer Vorgänge innerhalb der Zellen herangezogen werden und eine *in vivo*-Beobachtung des markierten Proteins ermöglichen. Für die folgenden Experimente wurden verschiedene Fluoreszenzproteine verwendet. Die CaV β 2a-Untereinheit wurde mit dem monomeren rotfluoreszierenden Protein (mRFP) (20) fusioniert, während an die CaV α _{1.2}-Untereinheit ein grün fluoreszierendes supereklipisches bzw. ratiomerisches pHluorin (s-pHluorin bzw. r-pHluorin) gekoppelt wurde (102, 3).

3.4.1 Zellkultur und Transfektion

Human Embryonic Kidney Cells (HEK293-Zellen) wurden unter sterilen Bedingungen kultiviert. Die Zellen einer Schale wurden bei Transfektion einer Untereinheit (CaV β 2a bzw. CaV α _{1.2}) mit 2 μ g des Plasmids und 6 μ l FuGENE transfiziert. Bei Kotransfektion beider Untereinheiten wurde jede Schale mit jeweils 1 μ g Plasmid je Untereinheit und 6 μ l FuGENE versetzt. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop unter Zuhilfenahme von spezifischen Farbfiltern fotografiert.

3.5 Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer, Lösungen und Medien

3.5.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

Für Puffer und Lösungen wurde entionisiertes autoklaviertes Wasser verwendet und, falls nicht anders angegeben, bei 121 °C und 1 bar für 20 Minuten autoklaviert. Die Zusammensetzung

zung der Pufferlösungen richtet sich im Allgemeinen nach *Sambrook, Russell* (134), zum Teil fanden laborinterne Modifikationen der Protokolle statt.

50 x Denhardt

- 5 g Ficoll
- 5 g Polyvinylpyrrolidon
- in 200 ml H₂O suspendieren
- 5 g BSA (getrennt in 250 ml H₂O lösen)
- Lösungen vereinigen und mit H₂O auf 500 ml auffüllen
- sterilfiltrieren über 45 µm Filter

10 x DNS-Auftragspuffer

- 0,25% Bromophenolblau
- 0,25% Xylencyanol FF
- 0,01 M Tris, pH 7.0 bei RT
- 0,05 M EDTA; pH 8.0
- 40 % (w/v) Harnstoff
- 40 % (w/v) Glycerin, wasserfrei

MOPS Elektrophoresepuffer

- 20 mM MOPS (pH 7.0, RT)
- 2 mM Natriumacetat
- 1 mM EDTA (pH 8.0)
- Lichtgeschützte Lagerung bei 4°C

Puffer für PCR mit Taq-Polymerase

- 100 mM Tris (pH 8,3, RT)
- 15 mM MgCl₂
- 500 mM KCl

RNS-Auftragspuffer

- 95 % (v/v) deionisiertes Formamid (Deionisationsmatrix Amberlite*MB-1 (Fisher Chemicals))
- 0,025 % (w/v) Bromophenolblau
- 0,025 % (w/v) Xylencyanol FF
- 5 mM EDTA (pH 8.0)
- 0,025 % (w/v) SDS

20 x SSC

- 175,3 g NaCl
- 88,2 g Na-Citrat
- 800 ml H₂O
- pH Einstellung auf 7.0 mit HCl
- auf ein Liter Volumen mit H₂O auffüllen

STET-L-Puffer

- 0,05 M Tris-Cl; pH 8.0 bei RT
- 0,05 M EDTA; pH 8.0
- 5 % (v/v) Triton X-100
- 8 % (w/v) Saccharose
- Vor Gebrauch Zugabe von Lysozym (10 µl 10 mg/ml Lysozym-Lösung pro ml STET)
- Lysozym-Lösung: 10 mg/ml Lysozym

TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer, pH 8.0 bei RT

- 0,089 M Tris
- 0,089 M Borsäure
- 0,001 M EDTA

TE-Puffer (10x Tris EDTA)

- 100 mM Tris-Cl
- 10 mM EDTA

TEN-Puffer:

- 10 mM Tris-HCl (pH 7.5, RT)
- 0,1 mM EDTA
- 25 mM NaCl

TES-Puffer

- 10mM Tris-HCl; pH 7.5 bei RT
- 1mM EDTA; pH 7.5
- 0,1% SDS

TSS-Puffer

- 10 % (w/v) PEG 3350
- 5 % (v/v) DMSO
- 1 % Caseinhydrolysat (Roth)
- 1 % NaCl
- 0,5 % Hefeextrakt (Roth)
- 50 mM MgCl₂

Waschpuffer zur Isolierung der Poly(A)⁺-RNS

- TES-Puffer
- 0,5M NaCl

3.5.2 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden

Soweit nicht anders angegeben, diente entionisiertes Wasser als Lösungsmittel

PBS

- 0,14 M NaCl
- 2,7 mM KCl
- 1,5 mM KH_2PO_4
- 8 mM Na_2HPO_4

RIPA-Puffer

- 150 mM NaCl
- 50 mM Tris-HCl ,pH 8 bei 4°C
- 5 mM EDTA
- 1% Nonidet P40
- 0,1% SDS
- 0,5% Na-Deoxycholat

3.5.3 Puffer und Lösungen für elektrophysiologische Methoden

Pipettenlösung pH 7.4

- 20 mM CsCl
- 3 mM MgCl_2
- 5 mM Mg-ATP
- 10 mM EGTA
- 5 mM HEPES
- pH-Wert-Einstellung auf pH 7.4 mit CsOH

Badlösung pH 7.4

- 140 mM Tetraethylammonium (TEA)-Chlorid
- 1 mM MgCl₂
- 1.8 mM CaCl₂
- 10 mM HEPES
- pH-Wert-Einstellung auf pH 7.4 mit TEA-OH

3.5.4 Puffer und Lösungen zur Präparation eukaryotischer Zellen**ADS-Puffer** (Isolierung embryonaler Kardiomyozyten von Maus, 3.1.8.1)

- 116 ml 1M NaCl
- 10 ml 0,1M NaH₂PO₄
- 5 ml 1M KCl
- 8 ml 0,1M MgSO₄
- 4,77 g HEPES
- 0,99 g Glukose
- pH-Wert mit NaOH auf 7.35 einstellen (RT)

3.5.5 Medien**3.5.5.1 Nähr- und Lagermedien****3.5.5.1.1. Flüssigkultur**

- *Luria-Bertani (LB)-Medium*
 - 10 g Trypton / Pepton
 - 5 g Hefeextrakt
 - 10 g NaCl
 - pH 7.4 mit NaOH

LB-Medium ist ein komplexes Medium, das ein rasches Wachstum aller in dieser Arbeit verwendeten E.coli-Stämme gewährleistet.

- *SOC-Medium*

- 20 g Trypton / Pepton
- 5 g Hefeextrakt
- 0,5 g NaCl
- 2,5 ml 1M KCl
- pH-Einstellung auf 7.0 mit 5 N NaOH
- vor Verwendung Zugabe von 5 ml 2 M MgCl₂ (autoklaviert) und 20 ml 1M Glukose

Dieses Medium wurde für die elektrokompetenten Zellen nach Elektroporation verwendet, um das Überleben möglichst vieler transformierter Bakterienzellen zu sichern.

3.5.5.1.2. Plattenkultur

Zur Herstellung von Agar-Platten wurde LB-Medium verwendet, welchem pro Liter Ansatz 15 g Agar zugesetzt wurden. Der Ansatz wurde autoklaviert und das Medium nach Abkühlung auf 50 °C mit einem Antibiotikum versetzt und in sterile Petrischalen ausgegossen. Die Aufbewahrung der erkalteten Platten erfolgte bei 4 °C.

3.5.5.2 Lagermedien

- *Bakterienlagermedium* (100 ml)
 - 0,7 mg K₂HPO₄
 - 0,3 mg KH₂PO₄
 - 0,05 mg Na₃-Citrat x 2 H₂O
 - 0,01 mg MgSO₄
 - auf 50 ml mit H₂O auffüllen
 - autoklavieren
 - 50 ml Glyzerin (getrennt autoklavieren)
 - beide Ansätze vereinigen; Lagerung bei 4 °C
- *LB / Glyzerol-Suspension*
 - 40 % Glyzerol
 - 60 % LB-Medium

3.6 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen GE Healthcare (München), Invitrogen (Karlsruhe), New England Biolabs (Schwalbach), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (München) bezogen.

4 Ergebnisse

Teil 1

4.1 Identifizierung, Klonierung und Charakterisierung von CaV β 2-Splei β varianten in Mausherz

Teil 1 der Ergebnisse umfasst folgende Abschnitte:

- 1 Identifizierung von CaV β 2-Splei β varianten in Mausherz unterschiedlicher Entwicklungsstadien mittels cDNS-Bibliotheken
- 2 Amplifizierung von CaV β 2-Varianten mittels Polymerase-Kettenreaktion aus isolierten Kardiomyozyten
- 3 Interaktion von CaV β 2-Splei β varianten
- 4 Elektrophysiologische Untersuchungen zur Charakterisierung der verschiedenen CaV β 2-Splei β varianten

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Begriffe „Splei β variante“ und „Isoform“ synonym verwendet.

4.1.1 Identifizierung von CaV β 2-Splei β varianten

Die CaV β 2-Untereinheit stellt die dominierende CaV β -Untereinheit des L-Typ Ca²⁺-Kanals in Herzwewebe dar (11). Zahlreiche CaV β 2-Splei β varianten wurden aus verschiedenen Geweben isoliert, allerdings erfolgte in den einzelnen Publikationen meist keine systematische Untersuchung bezüglich im jeweiligen Gewebetyp vorhandener CaV β 2-Splei β varianten (72, 96, 1). Erst in den letzten Jahren wurden vermehrt Methoden wie die PCR-Amplifikation von cDNS-Fragmenten angewendet, um die Vielfalt alternativ gesplei β ter CaV β 2-Transkripte in Herzwewebe genauer zu analysieren (50, 67). Aktuell finden sich in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf die Expression verschiedener CaV β 2-Splei β varianten und deren zahlenmäßigem Verhältnis in Herzwewebe (siehe 5.1.3.1 bzw. 5.1.3.2). Auch gibt es hinsichtlich

entwicklungsabhängiger Veränderungen der Expression von CaV β 2- Spleißvarianten und deren Expressionsverhältnis nur wenige Informationen.

Ziel der in 4.1.1 erläuterten Forschungsarbeiten ist die Identifizierung der vorhandenen CaV β 2-Spleißvarianten in neonatalem bzw. adultem Mauserzgewebe. Ein Schwerpunkt liegt hierbei insbesondere auf der Identifizierung einer fetalen bzw. neonatalen Spleißvariante sowie Veränderungen des Expressionsverhältnisses der in Herzmuskelzellen vorkommenden CaV β 2-Spleißvarianten im Laufe der Mausentwicklung.

4.1.1.1 Auswahl der Spezies für das zu untersuchende Herzgewebe

Für die Untersuchungen wurde Herzgewebe von Maus gewählt, da zum einen die Western Blot-Untersuchungen aus Kapitel 2.6 (Abbildung 7) aus Mauserz isolierte Proteine zur Grundlage hatten und die beobachteten Veränderungen des CaV β 2-Proteinmusters zeigten. Zum zweiten spielt die Maus in der heutigen Forschung eine wichtige Rolle, insbesondere hinsichtlich zahlreicher existierender Modelle, bei denen mittels homologer Rekombination gezielt Gene deletiert oder in einzelnen Abschnitten mutiert werden können. Diese sogenannten Knock-out-Tiermodelle bieten einen mit anderen Methoden nicht erreichten Einblick in physiologische Vorgänge höherer Organismen. Des Weiteren arbeitet das Institut für Pharmakologie der Universität des Saarlandes intensiv mit Mausmodellen und es stehen eine Vielzahl von Antikörpern, Knock-out-Modellen etc. bereit.

4.1.1.2 Motivation zur Fokussierung auf die Identifikation von CaV β 2-Spleißvarianten

Die Motivation für die Forschungsarbeiten mit dem Ziel der Identifizierung entwicklungspezifischer CaV β 2-Spleißvarianten und -Expressionsverhältnisse in Mauserzgewebe begründet sich vor allem auf dem Resultat der in Kapitel 2.6 beschriebenen Western Blot-Analyse (Abbildung 7). Abbildung 15 zeigt ein ähnliches Experiment. Mikrosomale Proteinfractionen von Herzgewebe verschiedener Entwicklungsstadien der Maus wurden auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Filter transferiert und die CaV α _{1.2}- und CaV β 2-Proteine mit Antikörpern detektiert. Erneut wird deutlich, dass der Antikörper für die CaV β 2-Untereinheit mindestens zwei CaV β 2-Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts erkennt; deren Signalstärke ändert sich im Verlauf der Herzentwicklung (siehe Abbildung 15). Als Ursachen dieser Veränderung kamen vorrangig posttranslationale Modifikationen des CaV β 2-Proteins sowie alternatives Spleißen des CaV β 2-Transkripts in Frage.

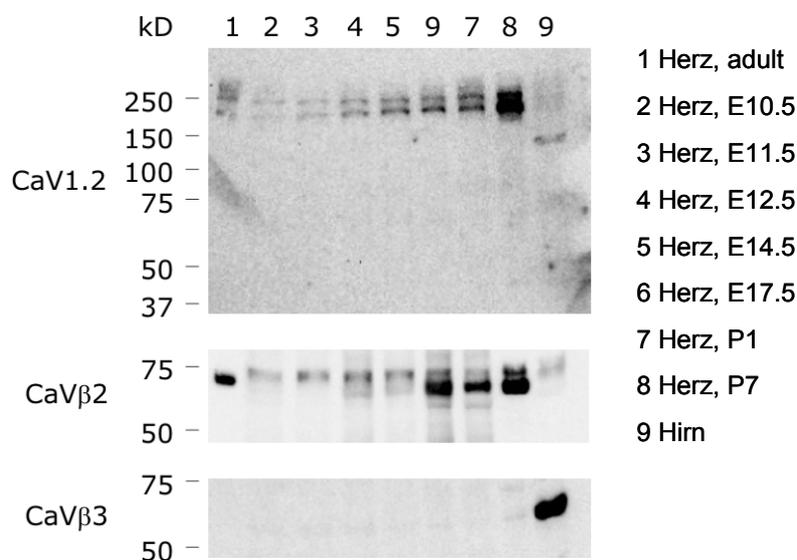


Abbildung 15: Westernblot mit mikrosomalen Proteinfraktionen aus Herzgewebe von Tieren unterschiedlichen Alters, inkubiert mit Antikörpern, die gegen CaV1.2 (oben), CaVβ2 (Mitte) und CaVβ3 (unten) gerichtet sind.

4.1.1.2.1. Veränderung der CaVβ2-Laufeigenschaften im Gel durch posttranslationale Modifikationen

Posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung oder Palmitoylierung können Laufunterschiede ein- und desselben Proteins in der Gelelektrophorese hervorrufen und ein differierendes Molekulargewicht des Proteins im Western Blot vortäuschen.

Die zahlreichen identifizierten potentiellen Phosphorylierungs-Konsensus-Stellen des CaVβ2-Proteins (72, 169, 57) liegen ausschließlich innerhalb von Regionen, die keinen Spleißvorgängen unterworfen sind. Die einzige Ausnahme bildet das Ergebnis einer Publikation von *Harry et al.* (63), siehe 4.1.1.5.2. Deshalb kann angenommen werden, dass unter den in diesen Regionen identischen Proteinen kein so gravierend differierendes Phosphorylierungsschema vorliegt, was zu Proteinen unterschiedlichen Laufverhaltens führen könnte.

Des Weiteren ist vom Aminoterminus Typ N3 der CaVβ2-Untereinheit bekannt, dass er einer posttranslationalen Palmitoylierung unterliegt (11). Aufgrund differierender Ergebnisse in verschiedenen Veröffentlichungen ist jedoch nicht abschließend geklärt, ob diese Spleißvariante überhaupt in Herzgewebe exprimiert wird (siehe 5.1.3.2). Weiterhin gilt, dass Laufunterschiede in der SDS-Gelelektrophorese der Größenordnung wie in oben gezeigter Western Blot-Analyse sichtbar, nicht allein durch Phosphorylierung oder Palmitoylierung hervorgerufen werden können, sondern beispielsweise durch abweichende Aminosäuresequenzen von

CaV β 2-Isoformen. Solche Isoformen zu identifizieren war das erste Ziel. Somit wurden für die weiteren Untersuchungen des in der Western Blot-Analyse beobachteten Proteilmusters posttranslationale Modifikationen als Ursache zurückgestellt.

4.1.1.2.2. Veränderung der CaV β 2-Laufeigenschaften im Gel durch Entwicklungsstadium-spezifische alternative Spleißvorgänge der CaV β 2-Untereinheit

Ausgegangen wurde von der Arbeitshypothese, dass den vom Antikörper gegen die CaV β 2-Untereinheit erkannten Proteinen und ihrer Entwicklungsstadium-spezifischen Expression alternative Spleißvorgänge der CaV β 2-prä-mRNS zugrunde liegen. Im Laufe der Herzentwicklung führt dies zu einem Wechsel der Expression von einer größeren zu einer kleineren CaV β 2-Isoform. Dieser Unterschied in der elektrophoretischen Mobilität weist auf Molekulargewichte der Proteine von ~68 kDa und ~74 kDa hin. Nicht auszuschließen ist, dass sich hinter einer Bande im Western Blot mehrere CaV β 2-Spleißvarianten verbergen, da einige der CaV β 2-Isoformen ein sehr ähnliches Molekulargewicht besitzen und somit im Gel nicht fein genug aufgetrennt werden, um sie als einzelne Banden identifizieren zu können (siehe 4.1.3.1). Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, ist alternatives Spleißen von CaV β 2-Transkripten im Kontext verschiedener Spezies und Gewebe beschrieben. Es erschienen allerdings nur wenige Publikationen, in denen eine Untersuchung von CaV β 2-Spleißvarianten in Mausgewebe durchgeführt wurde. Bisher existiert keine Forschungsarbeit, in der ein systematisches Screening erfolgte, welche CaV β 2-Spleißvarianten in Mausherz exprimiert werden.

Das CaV β 2-Protein besitzt die drei variablen Regionen V1 (N-terminal), V2 (die sogenannte „hook“-Region) und V3 (C-terminal) (Abbildung 5), von denen die V1-Region die höchste Sequenzvariabilität zeigt und bereits sechs N-terminale CaV β 2-Spleißvarianten in der Literatur beschrieben sind (CaV β 2-N1 bis -N6 in Tabelle 3). Über ein alternatives Spleißen der V2-Region in Mausherzgewebe berichten in der Literatur *Hullin et al.* (72) sowie *Foell et al.* (50). Vier mögliche Spleißvarianten sind für diese Region beschrieben und als CaV β 2a, 2b, 2c und 2d benannt (siehe Tabelle 4). Die Variante CaV β 2a wird in allen untersuchten Gewebetypen exprimiert, während die Variante CaV β 2b bisher nur in Kaninchen- bzw. Maushirn und menschlichem Herz detektiert wurde. Die cDNS der Varianten CaV β 2c und 2d wurden von *Foell et al.* aus menschlichem Herzgewebe amplifiziert (siehe Tabelle 3). Die entsprechenden Exons finden sich alle im CaV β 2-Gen von Maus wieder. Bisher ist nur die Expression der Variante CaV β 2a in Mausherz beschrieben (96). Potenzielle alternative Spleißvorgänge der V1- und V2-Region wurden in den folgenden Untersuchungen berücksichtigt.

| CaV β 2-Isoform | Spezies | Gewebe | Referenz |
|--------------------------------|-----------|-------------|--------------------------|
| CaV β 2a-N3 | Ratte | Hirn | Perez-Reyes 1992 (119) |
| CaV β 2a-N4 | Kaninchen | Herz | Hullin R. 1992 (72) |
| CaV β 2a-N2 | | „ | „ |
| CaV β 2b-Nx | Kaninchen | Hirn | „ |
| CaV β 2a-N5 | Maus | Hirn / Herz | Massa E. 1995 (96) |
| CaV β 2b-N5 | Maus | Hirn | „ |
| CaV β 2a-N3 | Mensch | Hirn | Williams M.E. 1997 (150) |
| CaV β 2a-N1 | Mensch | Herz | Allen T. 1998 (1) |
| CaV β 2x-N3 | Mensch | Herz | Yamaguchi H. 2000 (168) |
| CaV β 2a-N3 | Mensch | Herz | Yamada, Y. 2001 (167) |
| CaV β 2 - diverse | Mensch | Herz | Foell J. 2004 (50) |
| CaV β 2e-N1 ^a | Mensch | Herz | Harry J. 2004 (63) |
| CaV β 2f-N6 ^a | „ | „ | „ |

x bezeichnet eine in der entsprechenden Publikation nicht analysierte V1- oder V2-Region;
^a Nomenklatur der Spleißvarianten von *Harry et al.* (63) ist dem Schema von *Foell et al.* (50) angepasst; CaV β 2e-N1 wurde von *Harry et al.* als CaV β 2f und CaV β 2f-N6 als CaV β 2g bezeichnet.

Tabelle 3: Historie der cDNS-Klonierung der bekannten N-terminalen Spleißvarianten CaV β 2-N1, -N2, -N3, -N4, -N5 und -N6 der CaV β 2-Untereinheit aus verschiedenen Geweben; *Foell et al.* (50) und *Hullin et al.* (72) beschreiben zudem Varianten der V2-Region (CaV β 2a, b, c und d).

4.1.1.3 Nomenklatur der CaV β 2-Spleißvarianten

Die Nomenklatur der CaV β 2-Spleißformen orientiert sich in dieser Arbeit am Vorschlag von *Foell et al.* (50). Dabei bezeichnet der Kleinbuchstabe nach CaV β 2 die in der Isoform vorhandene Konfiguration der alternativ gespleißten V2-Region, während sich die dem N folgende Zahl nach dem spezifischen ebenfalls alternativ gespleißten Aminoterminus (N-Terminus bzw. V1-Region) richtet (Tabelle 4 und Tabelle 5).

Foell. et al. (50) untersuchten CaV β 2-Spleißvarianten in menschlichem Herzgewebe. Die in den Tabellen 4 und 5 dargestellten Aminosäuresequenzen, die der hier verwendeten Nomenklatur zugrunde liegen, sind vom menschlichen CaV β 2-Gen abgeleitet. Die Darstellung der entsprechenden weitgehend homologen Maus-Aminosäuresequenzen folgt in Abschnitt 4.1.1.5.1 bzw. 4.1.1.5.2 dieser Arbeit.

| | |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CaV β 2a | ...AIDIDATGLDAEENDIPANHRSPKPSANSVTSPHSKEKRMPFFKK...(Exon 7A) |
| CaV β 2b | ...AKQKQKS... (Exon 7B) |
| CaV β 2c | ...GAKSADEQDQWKTAGLFWRFT...(Exon 7C) |
| CaV β 2d | Exon 7 ist in der Sequenz nicht enthalten; dies führt zu Verschiebung des Leserahmens mit Entstehung eines Stopkodons in Exon 8 (DRAHSSV*) und insgesamt zu einem trunkierten CaV β 2-Protein |

Tabelle 4: AS-Sequenzen alternativ gespleißter Exons der V2-Region (Quelle: menschliches Herzgewebe (50))

| Bezeichnung der CaV β 2- Isoform | Sequenz des N-Terminus ^a |
|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| CaV β 2x-N1 | MVQRDMSKSPPTAAAAVAQEIQMELLE NVAPAGALGAAAQSYGKG ARRKNRFGSDGSTSSD TTSNSFLRQ |
| CaV β 2x-N2 | MNQGSGLDLLKISYGKGARRKNRFGSDGSTSSD TTSNSFVRQ |
| CaV β 2x-N3 | MQCCGLVHRRRVRVSY ^b |
| CaV β 2x-N4 | MLDRRLIAPQTKYIIPG |
| CaV β 2x-N5 | MKATWIRLLKRAKGGRLKNSDIC |

^a Die Aminosäuresequenz dieser Tabelle bezieht sich auf die von *Foell et al.* (50) in menschlichem Herz gefundenen CaV β 2-Isoformen;

^b Die palmitoylierte CaV β 2x-N3 wurde von *Foell et al.* (50) nicht aus menschlichem Herz isoliert, dies gelang jedoch *Yamaguchi et al.* (168)

Tabelle 5: Nomenklatur der N-terminalen Spleißvarianten nach *Foell et al.* (50); das x steht für die Variabilität der V2-Region, da keine N-terminale Spleißform einer spezifischen V2-Variante zugeordnet werden kann.

4.1.1.4 Vorgehen zur Identifizierung von CaV β 2-Spleißvarianten in Mausherz

4.1.1.4.1. Nachweis von CaV β 2-mRNS in Mausherz

Anhand des Ergebnisses des Northern Blots (Abbildung 16) ist zu sehen, dass sich in der aufgetrennten Mausherz-mRNS (aus Gewebe adulter Mäuse) bei Verwendung einer CaV β 2-spezifischen Sonde mehrere Banden zeigen (Abbildung 16, Pfeile). Das stärkste Signal ist bei einer mRNS-Länge von ca. 3000 bp zu erkennen. Korrelierend mit dem Ergebnis sind in der Literatur Maus-CaV β 2-mRNS mit 3254 bp (CaV β 2a-N5; GenBank Accession-Nr. AB109465) bzw. 2970 bp (CaV β 2a-N1; GenBank Accession-Nr. NM_023116) beschrieben.

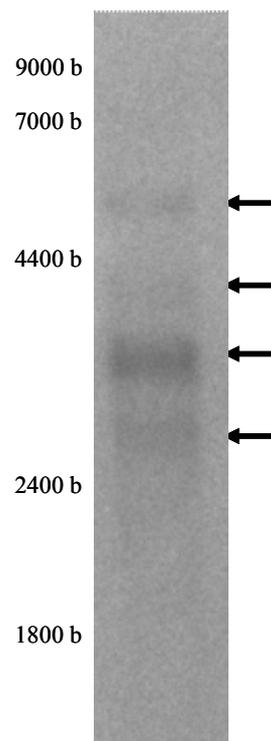


Abbildung 16: Northern Blot mit Mauserz-mRNS nach Hybridisierung mit einer CaVβ2-spezifischen Sonde

Ein Northern Blot kann zeigen, ob die mRNA für ein bestimmtes Protein in einer Zelle transkribiert wird, und falls ja, in welchem Ausmaß. Die Transkription der CaVβ2-mRNA wurde hier anhand des Northern Blots nachgewiesen. Obwohl mehrere Banden sichtbar sind, lässt dies allerdings keine Schlüsse zu, ob Spleißvarianten bestehen, wieviele davon in einem Gewebe vorhanden sind und wo die Sequenzunterschiede liegen. Dafür sind andere Methoden vonnöten.

4.1.1.4.2. Entscheidung zur Erstellung von cDNS-Bibliotheken als Methode der Wahl

Eine cDNS-Bibliothek ist eine Sammlung vieler cDNS, die über reverse Transkription aus der mRNA einer bestimmten Zelle oder eines Gewebes gewonnen wurden und repräsentiert im Idealfall die Gesamtheit aller exprimierten Gene, das sogenannte Transkriptom, der untersuchten Zellen bzw. Gewebe.

Im Zentrum des Interesses standen die Identifizierung der in Mauserz exprimierten CaVβ2-Spleißvarianten und deren Expressionsverhältnis. Für hier dargestellte Forschungsziele war die

Erstellung von cDNS-Bibliotheken und nachfolgendem Screening mittels Hybridisierungssonden deshalb die Methode der Wahl.

4.1.1.4.3. Strategie zur Erstellung geeigneter cDNS-Bibliotheken

4.1.1.4.4. cDNS-Synthese

Ausgangsmaterial für die Untersuchungen war Poly(A)⁺RNS aus Herzen von adulten sowie sieben Tage alten Mäusen (P7). Es wurde P7 gewählt, weil zu diesem Zeitpunkt sowohl die 68 kDa- als auch die 74 kDa CaV β 2-Variante im Western Blot (siehe Abbildungen 7 und 15) detektiert wurden und die Herzen eine angemessene Größe zur Materialgewinnung hatten, so dass die besten Voraussetzungen zur Identifizierung aller potentiellen Isoformen gegeben waren.

Um möglichst spezifisch mRNA-Transkripte der CaV β 2-Untereinheit zu amplifizieren, wurde die Erststrang-Synthese aus der mRNA adulter sowie P7-Herzen mit einem für die CaV β 2-Untereinheit Gen-spezifischen Primer (GSP) vollzogen. Dieser Oligodesoxynukleotid-Primer war komplementär zu einer DNS-Sequenz, die für den N-terminalen Teil der NK- bzw. C2-Region kodiert (siehe Abbildung 17). Der Gen-spezifische Primer wurde deshalb komplementär zum Beginn der zweiten konstanten Region (NK- bzw. C2-Domäne) der CaV β 2-Untereinheit gewählt und somit nicht zu weit entfernt vom N-Terminus, um einen möglichst großen Anteil an CaV β 2-Klonen im Erststrangpool zu gewinnen, die die vollständige N-terminale Sequenz enthalten. Gleichzeitig können aber mit dem Gen-spezifischen Primer in dieser Position auch Unterschiede in der zweiten variablen Region V2 der CaV β 2-Untereinheit, der sogenannten Hook-Region, miterfasst werden. Zusätzlich wurde eine Erststrangsynthese mit Poly(A)⁺RNS von P7 mit Hexanukleotidprimern durchgeführt. Eine Erststrangsynthese mit diesen Zufallsprimern bot die Möglichkeit, alle vorhandenen Spleißvarianten zu erfassen, also auch solche, die nicht den zum Gen-spezifischen Primer komplementären Sequenzabschnitt enthalten. Ein Ansatz mit Gen-spezifischem Primer mit mRNA adulter Mauserherzen diente als Kontrolle und Vergleich bei der späteren Auswertung der aus den P7-cDNS-Bibliotheken gewonnenen Ergebnisse.

Im Weiteren werden folgende Bezeichnungen für die drei cDNS-Bibliotheken verwendet:

- Mit Zufallsprimern und Herz-mRNA von P7-Mäusen erstellte cDNS-Bibliothek: P7-Random-cDNS-Bibliothek
- Mit Gen-spezifischem Primer und Herz-mRNA von P7-Mäusen erstellte cDNS-Bibliothek: P7-GSP-cDNS-Bibliothek

- Mit Gen-spezifischem Primer und Herz-mRNS adulter Mäuse erstellte cDNS-Bibliothek:
Adult-GSP-cDNS-Bibliothek

4.1.1.4.5. Screening der cDNS-Bibliothek auf CaV β 2-Klone

Die Sequenzen der Hybridisierungssonden zum Screening der cDNS-Bibliotheken waren homolog zu weiten Teilen der ersten bzw. zweiten konstanten Region (SH-Domäne bzw. NK-Domäne), um alle in den variablen Regionen unterschiedlichen Konstellationen von CaV β 2-Isoformen optimal detektieren zu können (Abbildung 17). In der Publikation von *Harry et al.* (63) werden zwei CaV β 2-Isoformen beschrieben, bei denen entweder der Großteil der konstanten Regionen (CaV β 2e-N1) oder beide konstanten Regionen vollständig (CaV β 2f-N6) fehlen. CaV β 2e könnte mit der C1-Sonde eventuell erfasst werden, da sie 243 von den 431 bp (base pairs) enthält, die die Sonde besitzt. CaV β 2f dagegen kann mit unseren Sonden nicht detektiert werden. Die Herstellung der Sonden mittels PCR bzw. Restriktionsverdau erfolgte aus einer im Institut für Pharmakologie (Universität des Saarlandes) bereits klonierten Maus-CaV β 2-Untereinheit (CaV β 2a-N5; nach der Sequenz von *Massa et al.* (96)). Die Länge der Hybridisierungssonden betrug 431 bp (C1) bzw. 591 bp (C2). Die P7-GSP-cDNS-Bibliothek wurde im Weiteren nur mit der Sonde für die C1-Region gescreent.

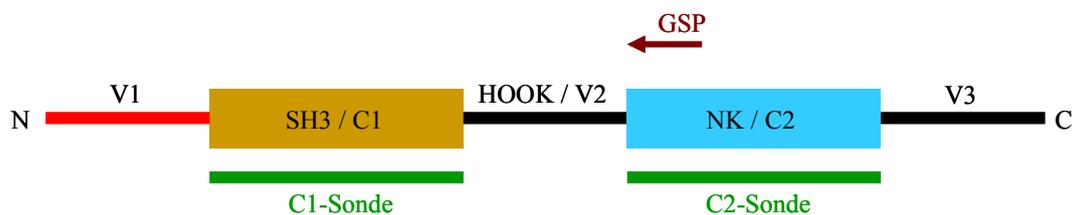


Abbildung 17: Lage des spezifischen Oligodesoxynukleotid-Primers (GSP) sowie der C1- bzw. C2-Sonde in Bezug auf die Regionen der CaV β 2-Untereinheit

4.1.1.4.6. Untersuchung der CaV β 3-Untereinheit

Für embryonale Maus-Kardiomyozyten wurde zusätzlich zur CaV β 2-Untereinheit auch die Expression der CaV β 3-Untereinheit nachgewiesen. In adulten Kardiomyozyten konnte diese hingegen nicht mehr detektiert werden (Abbildung 15, (162)). CaV β -Untereinheiten weisen untereinander teilweise hohe Sequenzhomologien auf. Um zu überprüfen, ob mit den für die cDNS-Bibliotheken konstruierten Sonden (C1- und C2-Sonde) auch ein paralleles Screening der CaV β 3-Expression erfolgen könnte, wurden die konstanten Regionen der CaV β 2- und CaV β 3-Untereinheit miteinander verglichen.

```

C1-RegionCaVβ2      GSADSYTSRPS-SDVSL EEDREAVRREAERQAQLEKAKTKPVAFVAVRTNVRYSAAQE 59
C1-RegionCaVβ3      GSADSYTSRPSLSDVSL EEDRESARREVESQAQQQLERAKHKPVAFVAVRTNVS YCGVLD 60
*****
*****:.* ** **:* ** ***** *.:. :

C1-RegionCaVβ2      DDVPVPGMAISFEAKDFLHVKEKFNNDWWIGRLVKEGCEIGFIPSPVKLENMRLQHEQRA 119
C1-RegionCaVβ3      EECVPVQASGVNFEAKDFLHIKEKYSNDWWIGRLVKEGGAIAFIPSPQRLESIRLKQEQKA 120
:.* ** .:.* *****:***: ***** * .***** :*.:**:*:*:*

C1-RegionCaVβ2      KQGKFYSSKSGNSSSSLGDIVPSSRKSTPPSS 152
C1-RegionCaVβ3      R-----RSG--NPSSLGDIG--FRRSPPPSL 142
:.* ** .***** *:*.***

```

Abbildung 18: Vergleich der C1-Region der CaVβ2- und CaVβ3-Untereinheit

```

C2-RegionCaVβ2      TEHTPPYDVVPSMRPVVLVGP SLKGYEVTDMMQKALFDFLKHREFGRISITRV TADISLA 60
C2-RegionCaVβ3      -EHVPPYDVVPSMRPVVLVGP SLKGYEVTDMMQKALFDFLKHREFDGRISITRV TADLSLA 59
** .*****:*****:***

C2-RegionCaVβ2      KRSVLNNPSKHAIERSNTRSSLAEVQSEIERIFELARTLQLVVL DADTINHPAQLSKTS 120
C2-RegionCaVβ3      KRSVLNNPGKRTIERS SARSSIAEVQSEIERIFELAKSLQLVVL DADTINHPAQLAKTS 119
*****.*:.* ** .:***:*****:*****:*****:***

C2-RegionCaVβ2      LAP IIVVKISSPKVLQRLIKSRGKSQAKHLNVQMVAADKLAQC P P QESFDVILDENQLE 180
C2-RegionCaVβ3      LAP IIVFVKVSSPKVLQRLIRSRGKSQMKHLTVQMMAYDKLVQC PP-ESFDAILDENQLE 178
*****:***:*****:***** ** **:* ** * .***** ** * .*****

C2-RegionCaVβ2      DACEHLADYLEAYWKATHPPSGNLPNP-LLSRTLASSTLPLSPTLASNSQ 229
C2-RegionCaVβ3      DACEHLAEYLEVWRATHHP---APGPGLLGPPSAIPGLQ----- 215
*****:***.***:*** * *. * . * . *

```

Abbildung 19: Vergleich der C2-Region der CaVβ2- und CaVβ3-Untereinheit

Wie aus Abbildung 18 bzw. Abbildung 19 zu erkennen, existiert für beide Regionen eine Homologie in der Aminosäuresequenz mit 97 von 152 (CaVβ2) bzw. 142 (CaVβ3) übereinstimmenden Aminosäuren für die C1-Region und 179 von 229 (CaVβ2) bzw. 215 (CaVβ3) Aminosäuren für die C2-Region. Auf Nukleinsäureebene ergibt sich eine Sequenzübereinstimmung für die C1-Region mit 310 von 456 (CaVβ2) bzw. 426 (CaVβ3) Basenpaaren und 458 von 687 (CaVβ2) bzw. 645 (CaVβ3) Basenpaaren für die C2-Region. Obwohl 90 cDNS-Klone aus den genannten Bibliotheken isoliert und sequenziert wurden, konnte kein CaVβ3-spezifischer Klon detektiert werden. Wahrscheinlich ist an P7 und bei adulten Mäusen die CaVβ3-Expression im Herzen nicht vorhanden oder so niedrig, dass keine CaVβ3-cDNS gefunden wurden. Weiterhin ist es gut möglich, dass die oben genannte Sequenzidentität nicht ausreicht, um unter den hier gewählten Stringenzbedingungen ein paralleles Screening der CaVβ3-Untereinheit zu ermöglichen, da die Bindung zwischen den Sonden und der CaVβ3-cDNS nicht stabil genug ist. Um ein zuverlässiges Screening bei hoher Stringenz zu gewährleisten, sollte eine Sequenzübereinstimmung von $\geq 95\%$ vorliegen; alternativ könnte die Stringenz der Hybridisierungsbedingungen drastisch reduziert werden, um weitere

CaV β -cDNS zu finden. Dieser Ansatz wurde hier nicht verfolgt, aber z.B. von *Hullin et al.* (72).

4.1.1.5 Auswertung der mittels der cDNS-Bibliotheken erhaltenen CaV β 2-Klone

Abbildung 20 zeigt in Ergänzung zu Tabelle 6 die durchschnittlichen Fragmentlängen der aus den drei cDNS-Bibliotheken isolierten CaV β 2-Klone nach elektrophoretischer Auftrennung. Man erkennt eine durchschnittliche Fragmentlänge von etwa 800 - 1000 bp.

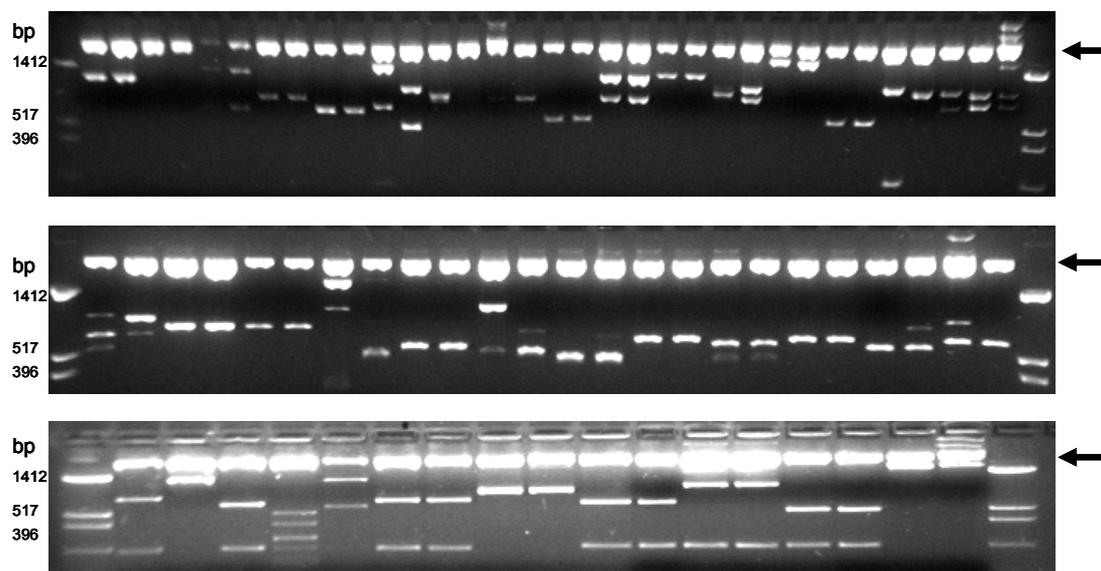


Abbildung 20: Fragmentlängen der aus den cDNS-Bibliotheken isolierten CaV β 2-Klone.

Die Pfeile kennzeichnen den Klonierungsvektor pcDNA II,
die DNS-Banden darunter repräsentieren die CaV β 2-Fragmente.

Tabelle 6 fasst die Eigenschaften und Ergebnisse der cDNS-Bibliotheken, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, zusammen. Die Zahlen verdeutlichen den hohen Screeningaufwand - es erfolgte ein Screening von insgesamt 2.7 Millionen Einzelklonen, aus denen die 82 erhaltenen CaV β 2-Klone isoliert werden mussten. Hierzu waren 160 einzelne Filter vonnöten, die einer ersten Durchmusterung unterzogen wurden, für das zweite Screening wurden weitere 130 Filter verwendet. Die längsten isolierten cDNS-Fragmente umfassen mehr als 2000 bp, was für eine intakte, nicht degradierte Poly(A)⁺RNS spricht, welche das Ausgangsmaterial zur Erstellung der Bibliotheken darstellt.

| | P7-Random | P7-GSP | Adult GSP |
|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <i>Ausbeute an cDNS</i> | | | |
| Erststrang | 1,72 µg | 0,896 µg (+ 1,84 µg Zweitstrang) | 0,61 µg |
| Nach Säulen-Gelchromatographie | 0,769 µg | 0,909 µg | 0,319 µg |
| <i>Kolonienzahl</i> | | | |
| Angestrebt pro Filter | 15.000 | 20.000 | 15.000 |
| Anzahl der Filter | 70 | 60 | 30 |
| Angestrebte Gesamtkolonien | 1.050.000 | 1.200.000 | 450.000 |
| Erhalten pro Filter | 100 - 5000 | 500 - 5000 | 100 - 5000 |
| Gesamtkolonien erhalten | ~ 200.000 | ~ 200.000 | ~ 90.000 |
| <i>Durchmusterung</i> | | | |
| Anzahl positiver Signale im ersten Screening | 50 | 49 | 31 |
| Anzahl positiver Signale im zweiten Screening | 44 | 34 | 25 |
| Anzahl sequenzierter Klone | 37 | 33 | 20 |
| Anzahl durch Sequenzierung bestätigter CaVβ2-Klone | 33 | 33 | 18 |
| <i>Klone</i> | | | |
| Längster Klon | Exon 2A bis 3' untranslatierte Region; ~ 2500 bp | 5' untranslatierte Region + Exon 2D bis Exon 10; ~ 1500 bp | Exon 2C bis 3' untranslatierte Region; ~ 2500 bp |
| Kürzester Klon | Exon 6 + nachfolgende Intronsequenz; ~ 280 bp | Exon 2C bis Exon 3 + 5' untranslatierte Region; ~320 bp | Exon 7 und 8; ~ 220 bp |
| Anzahl der Klone, die die N-terminale V1-Sequenz enthalten | 20 | 27 | 13 |

Tabelle 6: Übersicht der erstellten cDNS-Bibliotheken

4.1.1.5.1. Isolierung von vier N-terminalen Spleißvarianten der CaV β 2-Untereinheit aus Mausherzgewebe

Insgesamt wurden 84 CaV β 2-Klone isoliert, von denen 60 die N-terminale V1-Sequenz enthielten. Die Sequenzauswertung der 60 cDNS-Klone ergab, dass sie unabhängig voneinander waren und vier verschiedene CaV β 2-Isoformen repräsentierten, die sich nur in ihrer N-terminalen Sequenz unterscheiden (siehe Tabelle 7). Benannt wurden diese CaV β 2-Varianten nach der in 4.1.1.3 beschriebenen Nomenklatur von *Foell et al.* (50). Da sich bei der Sequenzierung der V2-Region nur Klone fanden, die das Exon 7A nicht aber Exon 7B, 7C oder kein Exon 7 enthielten, werden alle hier beschriebenen Isoformen als CaV β 2a bezeichnet. CaV β 2a-N1 ist die mit Abstand längste gefundene Variante und die einzige, deren Aminoterminus durch zwei aufeinander folgende Exons kodiert ist, während die Aminotermini der anderen Varianten jeweils nur durch ein Exon kodiert sind.

| Bezeichnung der aus Mausherz isolierten CaV β 2- Isoform | N- terminale Sequenz |
|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| CaV β 2a-N1 | MVQSDTSKSPVAAVAQESQMELLESAAPAGALGAQSYGKG ARRKNRFKGS DGTSSD TTSNSFVRCAG GSA |
| CaV β 2a-N3 | MQCCGLVHRRRVRSY GSA |
| CaV β 2a-N4 | MLDRQLVSSQTQSSIPG GSA |
| CaV β 2a-N5 | MKATWIRLLKRAKGGRLKSSDIC GSA |

Tabelle 7: N-terminale AS-Sequenzen der aus Mausherz isolierten CaV β 2a-Spleißvarianten; die Aminosäurereste GSA bilden den N-terminalen Beginn der C1-Region, die in allen CaV β 2-Untereinheiten identisch ist.

Sowohl aus den GSP-cDNS-Bibliotheken als auch aus der Random-cDNS-Bibliothek konnten Klone isoliert werden, die 5'- bzw. 3'-nichttranslatierte Sequenzabschnitte enthielten, womit es möglich war, die komplette zusammenhängende Exonfolge der N-terminalen Spleißvarianten zu analysieren. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den sequenzierten Klonen ab Exon 3. Wie bereits erwähnt, enthielten alle CaV β 2-Klone Exon 7A.

4.1.1.5.2. Definition der Exons, Exon-Intron-Grenzen und konstanten bzw. variablen Regionen der CaV β 2-Untereinheit

Das Gen, das für die CaV β 2-Untereinheit in Maus kodiert, umfasst ~ 383500 bp mit bisher insgesamt 20 Sequenzabschnitten, für die - mit Ausnahme von Exon 1B und 7C - der Nachweis erbracht wurde, in vivo transkribierte Exons von Maus kodieren (Ergebnisse dieser Arbeit, (96)) (Gen: *Cacnb2*, Ensembl Gene ID ENSMUSG00000057914). In Tabelle 8 sind diese Exons der CaV β 2-Untereinheit aufgelistet. Auch im Rahmen dieser Forschungsarbeit nicht

isolierte, aber in Publikationen beschriebene Exons wurden berücksichtigt (Exons 1B, 7B, 7C). Einzig die von *Harry et al.* (63) beschriebenen alternativ gespleißten Exons 3 und 14 der CaV β 2f-Spleißvariante wurden in Tabelle 8 nicht eingetragen, da sie nicht die typische ag-gt-Konfiguration, die Exon-Intron-Grenzen kennzeichnet, besitzen und das entsprechende Transkript zu einem Stopkodon 150 bp nach dem Startmethionin führt. Somit bleibt dessen Expression als funktionelle CaV β 2-Untereinheit fraglich.

| | | | |
|----------------|-----------------|----------------|----------------|
| Exon 1A | MVQSD....ALGAQ | Exon1B | MDQASGLDLLKI |
| Exon 2A | SYGKG....SFVRQ | Exon 2B | MQCCG....VRVSY |
| Exon 2C | MLDRQ....SSIPG | Exon 2D | MKATW....SSDIC |
| Exon 3 | GSADS....LEKAK | Exon 4 | TKPVA....LHVKE |
| Exon 5 | KFNND....GKFYSS | Exon 6 | KSGGN....TPPSS |
| Exon 7A | AIDID....PFFKK | Exon 7B | AKQKQKS |
| Exon 7C | GAKSAD....FGGL | Exon 8 | TEHTP....LKGYE |
| Exon 9 | VTDMM....RFEGR | Exon 10 | ISITR....TRSSL |
| Exon 11 | AEVQS....ISSPK | Exon 12 | VLQRL....AQCPP |
| Exon 13 | QESFD....ASNSQ | Exon 14 | GSQGD....YIRQ* |

Tabelle 8: Definition der Exons des CaV β 2-Gens von Maus orientiert an den Nomenklatur von *Foell et al.* (50), die sich auf die Exons von Mensch bezieht.

Bislang ist die Expression des Exon 7C in Mausgewebe nicht nachgewiesen. Wie in Abbildung 21 zu sehen, wurde die Sequenz des menschlichen Exon 7C in einer Datenbank (NCBI (National Center for Biotechnology Information); Nucleotide BLAST) auf eine entsprechende Homologie im Mausgenom untersucht. Dabei zeigte sich, dass in der genomischen Mausequenz ein Thymin fehlt, welches im menschlichen Gen vorhanden ist. Im Schimpansen-Genom findet sich wie im menschlichen Genom das Thymin. Für Ratte, als naher Verwandter der Maus, konnte ein entsprechender genomischer Abschnitt in der Datenbank nicht identifiziert werden (das Rattengenom ist bislang nicht vollständig sequenziert). Die Expression dieses Exons in Maus würde zu einer Verschiebung des Leserahmens führen mit einem vorzeitigen Abbruch der Translation infolge eines Stopkodons in Exon 8:

AS-Sequenz ab Exon 7C:

*GAKSADEQDQWKTAGLFGGLLQSTLLLMMWYLPCDQWCWWARL**

Somit zeigt sich eine relevante Differenz der Exon 7C-Sequenzen von Maus und Mensch, was Hinweis auf eine speziesspezifische Expression bestimmter Exons der CaV β 2-Untereinheit gibt.

```

>ref|NT_039202.7|Nm2_39242_37 D Mus musculus chromosome 2 genomic contig, strain C57BL/6J
Length=19347252
Features in this part of subject sequence:
  calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit

Score = 110 bits (59), Expect = 1e-22
Identities = 62/63 (98%), Gaps = 1/63 (1%)
Strand=Plus/Plus
Query 1      GGTGC AAAATCTGCAGATGAACAAGACCAGTGGAAAAC TGCAGGCTTGT TTGGGGTII 60
Sbjct 11890322 GGTGC AAAATCTGCAGATGAACAAGACCAGTGGAAAAC TGCAGGCTTGT TTGGGGTII 11890380
Query 61      ACT 63
Sbjct 11890381 ACT 11890383

>ref|NW_001030686.1|Nm2_11168231_37 D Mus musculus chromosome 2 genomic contig, alternate assembly
(based on Celera assembly)
Length=34874695
Features in this part of subject sequence:
  calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit

Score = 110 bits (59), Expect = 1e-22
Identities = 62/63 (98%), Gaps = 1/63 (1%)
Strand=Plus/Plus
Query 1      GGTGC AAAATCTGCAGATGAACAAGACCAGTGGAAAAC TGCAGGCTTGT TTGGGGTII 60
Sbjct 11869726 GGTGC AAAATCTGCAGATGAACAAGACCAGTGGAAAAC TGCAGGCTTGT TTGGGGTII 11869784
Query 61      ACT 63
Sbjct 11869785 ACT 11869787
    
```

Abbildung 21: Vergleich der genomischen Sequenz des Exon 7C von Mensch und Maus; der Sequenzunterschied ist rot markiert.

Eine Übersicht über die Zuordnung der Exons zu den zwei konstanten und drei variablen Regionen der CaVβ2-Untereinheit ist in Abbildung 22 dargestellt. Die Zuordnung der Exons zu den variablen und konstanten Regionen der CaVβ2-Untereinheit orientiert sich an *Hullin et al.* (72)

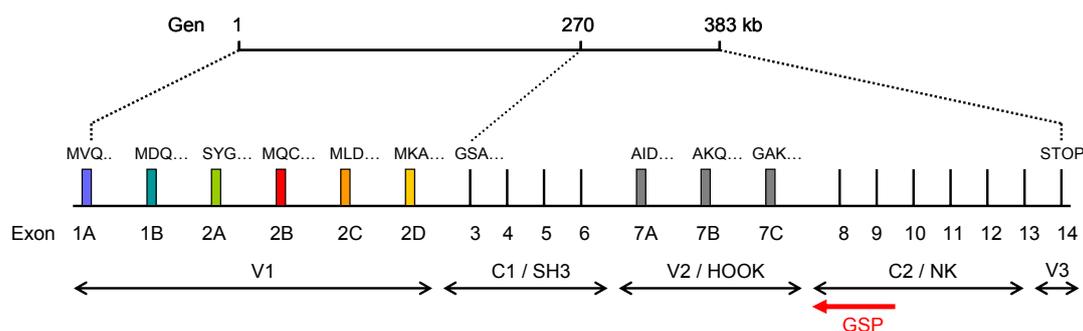


Abbildung 22: Reihenfolge der Exons auf dem CaVβ2-Gen

Wie in Tabelle 9 dargestellt, zeigen auch die Exon-Intron-Grenzen des Exons 7C statt der typischen Spleißdomänen- und Akzeptormotive ag bzw. gt eine ta- bzw. gt-Sequenz, was gegen eine Expression dieses Exons in Mausgewebe spricht. Auch die mittels BLAST in der NCBI-Datenbank durchgeführte Suche nach expressed sequence tags, sog. EST-cDNS-Klonen von Maus, die die Sequenz des Exon 7C enthalten, verlief negativ.

| | |
|----------------|----------------------------------------------------------------------|
| Exon 1A | 5'-nichttranslatierte Sequenz ATGGTCCAAA....CGGAGCACAG gtagccactg |
| Exon 1B | 5'-nichttranslatierte Sequenz ATGGACCAGGC.....TTGGGAGC gtagtccgggceg |
| Exon 2A | ttttatgtag TCCTATGGAA....TGTCCGCCAG gtaagtgagt |
| Exon 2B | 5'-nichttranslatierte Sequenz ATGCAGTGCT....GGTGCCTAT gtaagttct |
| Exon 2C | 5'-nichttranslatierte Sequenz ATGCTTGACA....TATTCCTGGG gtaagcaggc |
| Exon 2D | 5'-nichttranslatierte Sequenz ATGAAGGCCA....GGACATCTGT gtaagcgaga |
| Exon 3 | tcctctgcag GGTTCGGCAG....AAAAGCAAAG gtaaaccac |
| Exon 4 | cccttttag ACAAACCTG....TGTTAAAGAA gtaaggagaa |
| Exon 5 | ttgtgtgtag AAATTTAATA....TCTATTCCAG gtagtaacaa |
| Exon 6 | tttcctcag TAAATCAGGA....CCGTCATCTG gtagtagg |
| Exon 7A | ctgtatatag CTATAGACAT....CTTTAAGAAG gtaaccecaa |
| Exon 7B | gctgctgtag CAAAGCAGAAGCAGAAGTCG gtaagtgac |
| Exon 7C | aatccatta GGTGCAAAATCT.....GGCGGTTTACT gtagtttt |
| Exon 8 | ttctctgcag ACAGAGCACA....GGGGTATGAG gtagttgg |
| Exon 9 | tcaattacag GTCACAGATA....TTGAAGGGCG gtaagtatt |
| Exon 10 | tcccaacag GATATCCATC....TCCAGCTTAG gtaagtcagc |
| Exon 11 | acctttacag CGGAAGTTCA....TTCTCCCAAG gtaagcgggt |
| Exon 12 | ccctttcag GTTTTACAAA....ATGTCCTCCG gtaagttatc |
| Exon 13 | cttactttag CAGGAATCAT....TAATTCACAG gtaagagcac |
| Exon 14 | tttgctcag GGTTCTCAAG....CCGCCAATGA 3' untranslatierte Sequenz |

Tabelle 9: Exon–Intron-Grenzen des CaV β 2-Gens (Intronsequenzen in Kleinbuchstaben)

4.1.1.5.3. Betrachtung der Aminotermini der CaV β 2-Untereinheit

Wie aus Abbildung 22 ersichtlich, umfasst das CaV β 2-Gen von Maus etwa 383.000 bp. Davon enthalten die ersten 270.000 bp die Sequenzen, welche die verschiedenen Aminotermini kodieren. Die 14 folgenden Exons liegen innerhalb der verbleibenden 113.000 bp. Die vier hier relevanten N-terminalen CaV β 2-Spleißvarianten CaV β 2-N1, CaV β 2-N3, CaV β 2-N4 und CaV β 2-N5 besitzen eine weitgehend konservierte Aminosäuresequenz zwischen unterschiedlichen Spezies (siehe Tabelle 10).

| CaV β 2a-N1 | Aminosäuresequenz |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Maus | MVQSDTSKSP..PVAA~VAQE..SQMELLESAA..PAGALG~AQ..SYGKGARRKN RFKGS DGSTS SDTTSNSFVRQ |
| Ratte | MVQSDTSKSP..PI..AA~VAQE..SQMELLESAA..PAGALG~AQ..SYGKGARRKN RFKGS DDSTS SDTTSNSFVRX |
| Schimpanse | MVQRDM SKSP..PTAAA AVAQE..IQMELLENVA..PAGALGAAAQ..SYGKGARRKN RFKGS NGSTS SDTTSNSFVRQ |
| Mensch | MVQRDM SKSP..PTAAA AVAQE..IQMELLENVA..PAGALGAAAQ..SYGKGARRKN RFKGS NGSTS SDTTSNSFVRQ |
| CaV β 2a-N3 | Aminosäuresequenz |
| Maus | MQCCGLVHRRRVRVSY |
| Ratte | MQCCGLVHRRRVRVSY |
| Mensch | MQCCGLVHRRRVRVSY |
| CaV β 2a-N4 | Aminosäuresequenz |
| Maus | MLDRQLVSSQ TQSSIPG |
| Ratte | MLDRQLVSSQ TQSSIPG |
| Mensch | MLDRRLI APQ TKYI IPG |
| CaV β 2a-N5 | Aminosäuresequenz |
| Maus | MKATWIRLLKRAKGGRLKSSDIC |
| Ratte | MKATWIRLLKRAKGERLKDASDIC |
| Mensch | MKATWIRLLKRAKGGRLKNSDIC |

Tabelle 10: AS-Alignment der CaV β 2-N1, -N4 und -N4 N-Termini von Maus, Mensch, Ratte und Schimpanse; Aminosäureaustausche sind grün markiert

Man erkennt aus Tabelle 10, dass für CaV β 2-N1 und CaV β 2-N4 deutliche Sequenzunterschiede im Vergleich von Mensch und Maus vorhanden sind. Die Sequenzen von nahe verwandten Lebewesen wie Maus und Ratte oder Mensch und Schimpanse weisen hingegen nahezu identische Aminotermini auf. Die N-terminalen Sequenzen von CaV β 2-N5 und CaV β 2-N3 sind für hier untersuchte Spezies identisch.

4.1.1.5.4. CaV β 2-N2

Der N2-Terminus setzt sich zusammen aus Exon 1B und Exon 2A. Das im Maus-CaV β 2-Gen ebenfalls identifizierte, bisher aber nicht aus Mausgewebe als cDNA klonierte Exon 1B zeigt eine hohe Homologie zu den entsprechenden Sequenzen im CaV β 2-Gen von Mensch bzw. Kaninchen. Für Mensch und Kaninchen wurde die Expression des N2-Terminus bereits nach-

gewiesen (72, 50). Der entsprechende Sequenzabschnitt im CaV β 2-Gen von Maus folgt auf Exon 1A und liegt vor Exon 2A

(Referenz GenBank: NT_039202.7/Mm2_39242_37; Beginn Exon 1A: 11526078, Exon 1B: 11526568, Exon 2A: 11535891).

| | Aminosäuresequenz CaV β 2a-N2 |
|------------------|-------------------------------------|
| Maus | MDQASGLDRLKI |
| Mensch | MNQSGLDLLKI |
| Kaninchen | MNQASGLDRLKI |

Tabelle 11: Vergleich der Aminosäuresequenz des ersten Exons des N2-Terminus unterschiedlicher Spezies; Aminosäurenaustausche sind grün markiert

Die cDNS für die N-terminale Sequenz der CaV β 2-N2-Spleißvariante, das Exon 1B, wurde in keinem der aus den cDNS-Bibliotheken isolierten Klone gefunden.

4.1.1.5.5. N-terminale CaV β 2-Spleißvarianten und ihr Expressionsverhältnis in Mausherzgewebe unterschiedlicher Entwicklungsstadien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Methode zur Erstellung und zum Screening der cDNS-Bibliotheken gab Aufschluss über in Mausherz exprimierte CaV β 2-Spleißvarianten sowie deren Expressionsverhältnis in verschiedenen Entwicklungsstadien der Maus. Die Anzahl von Klonen der CaV β 2-Spleißvarianten sollte das natürliche Verhältnis der im untersuchten Herzgewebe neonataler bzw. adulter Mäuse vorhandenen CaV β 2-Transkripte, das CaV β 2-Transkriptom, widerspiegeln.

| | P7-GSP-cDNS-Bibliothek | Adult-GSP-cDNS-Bibliothek |
|-----------------------------------|------------------------|---------------------------|
| CaVβ2a-N1 | 4 / 27 (15%) | 2 / 13 (15%) |
| CaVβ2a-N3 | - | 1 / 13 (8%) |
| CaVβ2a-N4 | 20 / 27 (74%) | 8 / 13 (62%) |
| CaVβ2a-N5 | 3 / 27 (11%) | 2 / 13 (15%) |

Tabelle 12: Vergleich der in der P7- bzw. Adult-GSP-cDNS-Bibliothek detektierten CaV β 2a-Spleißvarianten; in Klammern die jeweiligen Prozentsätze der Spleißvarianten in Bezug auf die Gesamtheit der analysierten Klone der cDNS-Bibliothek

Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse der beiden GSP-cDNS-Bibliotheken im Vergleich. Wie man der Tabelle entnehmen kann, wurden 27 Klone der P7-GSP-cDNS-Bibliothek analysiert, von denen 20 auf die Variante CaV β 2a-N4, vier auf CaV β 2a-N1 und drei auf CaV β 2a-N5 entfie-

len. Die Auswertung der Adult-GSP-cDNS-Bibliothek ergab ein ähnliches Resultat. Von 13 analysierten Klonen repräsentierten acht die CaV β 2a-N4, zwei die CaV β 2a-N1, zwei die CaV β 2a-N5 und einer die CaV β 2-N3. Die in Klammern stehenden Prozentangaben verdeutlichen, dass in beiden cDNS-Bibliotheken die Anzahl der CaV β 2a-N4-Klone überwiegt, während CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N5 in annähernd äquivalentem Maße jeweils ungefähr 14% der isolierten Klone darstellen. CaV β 2a-N3 ist nur einmal in der Adult-GSP-cDNS-Bibliothek vertreten.

| | P7-GSP-cDNS-Bibliothek | P7-Random-cDNS-Bibliothek |
|-------------------|------------------------|---------------------------|
| CaV β 2a-N1 | 4 / 27 | 10 / 20 |
| CaV β 2a-N4 | 20 / 27 | 10 / 20 |
| CaV β 2a-N5 | 3 / 27 | - |

Tabelle 13: Verhältnis aus den P7-GSP- bzw. -Random-cDNS-Bibliotheken isolierten CaV β 2a-Spleißvarianten

Mittels der P7-Random-cDNS-Bibliothek konnten anders als mittels der P7-GSP-cDNS-Bibliothek die Varianten CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4 im Verhältnis 1:1, jeweils zehn von 20 ausgewerteten Klonen, nachgewiesen werden (Tabelle 13).

Insgesamt zeigt sich, dass CaV β 2a-N4 (P7: 30 von 47 isolierten Klonen; Adult: acht von 13 isolierten Klonen) die dominierende Form in Herzmuskelgewebe darstellt, gefolgt von CaV β 2a-N1 (P7: 14 von 47 isolierten Klonen, Adult: zwei von 13 isolierten Klonen). CaV β 2a-N5 wird in geringerem Maße im Herzgewebe exprimiert. Die Expression der CaV β 2a-N3 in Herzmuskelgewebe ist fraglich, da sich bei der Auswertung der Ergebnisse der cDNS-Bibliotheken nur ein einziger Klon von insgesamt 60 isolierten Klonen fand. Zudem sprechen frühere Veröffentlichungen dafür, dass diese Variante vorwiegend in neuronalen Geweben exprimiert wird (150, 119). In der Literatur wird ihre Expression in Bezug auf Herzgewebe kontrovers diskutiert (siehe 5.1.3.2). Die Fragestellung nach der Expression der CaV β 2a-N3 in Kardiomyozyten wird in 4.1.2.1 nochmals aufgegriffen.

4.1.2 Polymerase-Kettenreaktion mit isolierten Kardiomyozyten

4.1.2.1 One-Step RT-PCR mit isolierten Kardiomyozyten

Für die Erstellung der cDNS-Bibliotheken benötigte mRNA wurde aus dem gesamten Herzgewebe gewonnen, also aus Myozyten, Fibroblasten wie auch aus Zellen des Reizleitungssystems und Zellen der Blutgefäße, die das Herz versorgen. Das Reizleitungssystem des Herzens

bzw. die glatte Muskulatur der Blutgefäße enthalten L-Typ Ca^{2+} -Kanäle mit den entsprechenden Untereinheiten, unter anderem $\text{CaV}\beta 2$ (141, 154). Da die Zahl der Zellen des Reizleitungssystems und der glatten Muskulatur der Gefäße im Vergleich zur Zahl der Zellen des Arbeitsmyokards gering ist, spiegelt das durch die cDNS-Bibliotheken ermittelte Expressionsverhältnis der $\text{CaV}\beta 2$ -Spleißvarianten wesentlich die Verhältnisse im Arbeitsmyokard wider. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass die Variante $\text{CaV}\beta 2\text{a-N3}$, die nur durch einen einzigen Klon in der Adult-GSP-cDNS-Bibliothek vertreten ist, aus Zellen des Reizleitungsgewebes oder der Gefäßmuskulatur stammen könnte. Mittels Amplifikation von DNS-Fragmenten aus isolierten Kardiomyozyten, die die verschiedenen $\text{CaV}\beta 2\text{a}$ -Isoformen kodieren, wurde nachgewiesen, welche der isolierten $\text{CaV}\beta 2$ -Spleißvarianten definitiv in Kardiomyozyten exprimiert werden. Im Einzelnen wurden für diese Experimente Kardiomyozyten verwendet, die akut aus adulten Tieren isoliert wurden, weiter Kardiomyozyten, die aus Mausembryonen isoliert wurden, sowie embryonale Stammzellen (ES-Zellen) von Maus und Kardiomyozyten, die sich aus diesen ES-Zellen differenzieren lassen. Die isolierten adulten Kardiomyozyten wurden uns von Herrn Prof. Dr. Lipp (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Homburg) zur Verfügung gestellt. Aufgrund ihrer Stäbchenform und charakteristischen Anordnung der Myofibrillen waren sie leicht zu identifizieren (Abbildung 23).



Abbildung 23: Isolierte adulte Kardiomyozyten im Lichtmikroskop in unterschiedlicher Vergrößerung

Embryonale Kardiomyozyten wurden aufgrund ihrer Kontraktion und Form ausgewählt. Fibroblasten, die bei der Präparation ebenfalls isoliert werden, kontrahieren nicht und besitzen eine flachere Form. Jeweils zehn bis zwölf Zellen wurden in einem Reaktionsgefäß vereint und eine One-Step RT-PCR mit spezifischen Forward-Primern (rot dargestellt in Abbildung 24) durchgeführt. Die Primer waren jeweils spezifisch für die in den cDNS-Bibliotheken identifizierten N-terminalen Spleißvarianten der $\text{CaV}\beta 2$ -Untereinheit. Der Reverse-Primer lag in der konstanten Region, um ausreichend große Fragmente zu erhalten und wurde für alle PCR-Ansätze verwendet.



Abbildung 24: Lage der Primer für die PCR mit isolierten Kardiomyozyten.

4.1.2.1.1. One-Step RT-PCR mit aus adulten Tieren isolierten Kardiomyozyten

In Abbildung 25 sind auf einem 2% Agarosegel Aliquots der amplifizierten DNS-Fragmente aufgetragen. Wie man anhand der Abbildung erkennt, wurden mit den CaVβ2a-N4-, CaVβ2a-N1- und CaVβ2a-N5-spezifischen Forward-Primern DNS-Fragmente identischer Länge und erwarteter Größen (Abbildung 24) von Kardiomyozyten (m) und Plasmiden (co) amplifiziert, wohingegen ein CaVβ2a-N3-spezifisches Amplifikat mit isolierten adulten Kardiomyozyten nicht zu erkennen war. Der Befund, dass CaVβ2a-N3 mit dieser Vorgehensweise nicht nachgewiesen werden konnte, bestätigt die Interpretation der oben beschriebenen Klonierungsexperimente; CaVβ2a-N3 ist im Arbeitsmyokard nicht exprimiert.

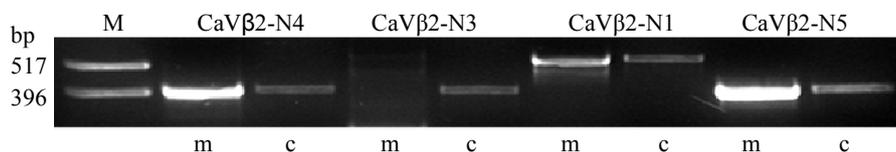


Abbildung 25: Elektrophoretisch aufgetrennte DNS-Fragmente, die aus isolierten adulten Kardiomyozyten (m) bzw. mit dem jeweiligen Kontrollplasmid (c) als Matrize amplifiziert wurden.

4.1.2.1.2. One-Step RT-PCR mit Kardiomyozyten, die aus Mausembryonen (E13.5) isoliert wurden

Abbildung 26 zeigt zwei 2% Agarose-Gele, auf welchen jeweils Proben zweier PCR-Ansätze von embryonalen Kardiomyozyten für jede CaVβ2-Spleißvariante aufgetragen sind. In zwei Experimenten wurde jeweils die meiste DNS von CaVβ2a-N4 amplifiziert. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der cDNS-Bibliotheken, in denen am häufigsten die CaVβ2a-N4-Spleißvariante gefunden wurde. Für CaVβ2a-N1 und CaVβ2a-N5 konnte in zwei Ansätzen

jeweils ein Amplifikat der erwarteten Größe erhalten werden. Dies korreliert mit ihrer geringeren Expression in Herzgewebe: Erneut konnte keine CaV β 2a-N3-DNS amplifiziert werden.

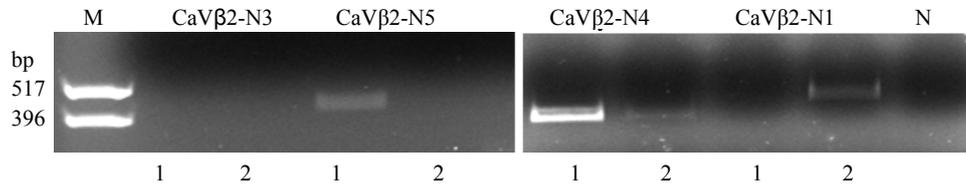


Abbildung 26: One-Step RT-PCR mit isolierten embryonalen Kardiomyozyten (E13.5), M = Größenstandard, N = Negativkontrolle; Experimente 1 und 2

Die angewendete Methode ist bestenfalls semiquantitativ; die Zahl der Zellen oder der Zellaufschluss kann variieren, die Menge der amplifizierten DNS wurde nicht gegenüber einer Standard-DNS quantifiziert. Dennoch erlaubt sie die qualitative Aussage, dass Transkripte von CaV β 2a-N1, -N4 und -N5 exprimiert werden, von CaV β 2a-N3 dagegen nicht.

Die PCR-Ansätze mit isolierten embryonalen Kardiomyozyten wurden als Matrize für eine zweite PCR mit einer jeweils zur ersten PCR identischen Primerkonstellation verwendet, um DNS-Fragmente, die in den Reaktionsansätzen in geringer Zahl vorhanden waren und deshalb im Gel nicht detektierbar sind, nochmals zu amplifizieren. Dabei ergab sich als Ergebnis eines CaV β 2a-N1-PCR-Ansatzes ein DNS-Fragment, das etwas langsamer als für CaV β 2a-N1 erwartet lief (Abbildung 27).

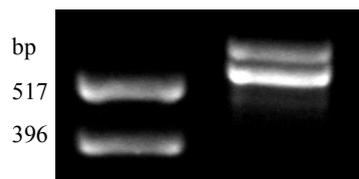


Abbildung 27: CaV β 2a-N1-Amplifikate unterschiedlicher Größe

Nach Isolierung und Subklonierung des Fragments ergab die Sequenzierung, dass es sich um CaV β 2a-N1-DNS handelt, wobei ein unbekanntes 64 bp Insert nach dem von Exon 1A und 2A gebildeten N-terminus und vor der mit den Aminosäureresten GSA (Exon 3) beginnenden konstanten Region integriert war. Die entsprechende Sequenz fand sich auf dem CaV β 2-Gen zwischen Exon 2A und 2B wieder (Tabelle 14). Wie aus Tabelle 14 ersichtlich, ist das Insert von konventionellen Spleißdonor- und Akzeptormotiven flankiert (ag-gt). Die amplifizierte DNS von Exon 1A, Exon 2A und dem 64 bp Insert führt allerdings zu einem Leseraster-sprung, so dass in Exon 3 ein Stopkodon nach wenigen Aminosäuren folgt. Hinter dem Stop-

kodon beginnt die Aminosäuresequenz zwar wieder mit einem Methionin, allerdings kodiert die cDNS durch die Rasterverschiebung nach wenigen Aminosäuren bereits für das nächste Stopkodon. Es scheint somit eher unwahrscheinlich, dass ein funktionsfähiges CaV β 2-Protein mit diesem 64 bp Insert entsteht. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der cDNS-Bibliotheken, die keinen Hinweis auf die Expression eines Transkripts, welches dieses Insert enthält, ergeben.

| | |
|------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nukleotidsequenz | AGT TCT CTC AGT CCT GAG ATG AAG GAA TTG ATG AGA CAT CTC ATT TCG GAT TGA ATG TTC CAA G |
| Aminosäuresequenz (Insert + Exon 3) | SSLSPMKELMRHLISD*MFQGFGRLLHQPPIRFCVFRGPGGST*RS* AAGTGTVGKSK |
| Exon-Intron-Grenzen | ctctttgcag AGTTCT.....TCCAAG gtctcttact |

Tabelle 14: Insert eines CaV β 2a-N1-Klons; Stopkodons in Rot, Orange kennzeichnet nicht eindeutig sequenzierte Nukleotide

4.1.2.1.3. One Step RT-PCR mit ES-Zellen von Maus und mit Kardiomyozyten, die aus ES-Zellen differenziert wurden

Die oben genannten Zellen (83) wurden von Herrn Prof. Dr. Berndt Fleischmann (Institut für Physiologie, Bonn) bereitgestellt. Ausgangsmaterial waren neun Millionen undifferenzierte ES-Zellen, sogenannte alpha-PIG Zellen. Diese Zellen tragen unter Kontrolle des herzspezifischen Promotors für die Myosin-schwere-Kette (α -MHC-Promotor) zwei Transgene, das Gen für die Puromycin-Resistenz PAC und nach einer internal ribosomal entry site das Gen für das Grün-fluoreszierende Protein GFP bzw. in diesem Fall das Gen für enhanced GFP (eGFP). Diese Zellen können zu Kardiomyozyten differenziert und gleichzeitig in Gegenwart von Puromycin selektioniert werden. Hier verwendete Zellen waren über neun Tage in Gegenwart von Puromycin kultiviert und für insgesamt 19 Tage differenziert. In der tiefgefrorenen Zellsuspension befanden sich etwa zwei Millionen Zellen, von denen aufgrund der genannten Selektion in Gegenwart von Puromycin mindestens 90% Kardiomyozyten waren.

Aus Abbildung 28 lässt sich erkennen, dass DNS-Fragmente von CaV β 2a-N1, -N4 und -N5 mit ausdifferenzierten ES-Zellen amplifiziert werden konnten. Im PCR-Ansatz mit Primern für die CaV β 2a-N3 ist zwar ein DNS-Fragment zu sehen; es entspricht aber nicht der erwarteten Größe von 403 bp. Wahrscheinlich handelte es sich um eine unspezifische Amplifikation einer unbekannt RNS. CaV β 2a-N1-, -N4- und -N5-spezifische Fragmente werden auch mit den Ausgangs-ES-Zellen amplifiziert (Abbildung 28, ES), allerdings in geringerem Ausmaß.



Abbildung 28: One Step RT-PCR mit zu Kardiomyozyten ausdifferenzierten bzw. undifferenzierten ES-Zellen

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass auch in diesen Kardiomyozyten dieselben CaV β 2-Untereinheiten wie in nativen Kardiomyozyten exprimiert werden. Übereinstimmend mit den in 4.1.2.1.1 und 4.1.2.1.2 beschriebenen Ergebnissen wird die CaV β 2a-N3-Spleißvariante in den ES-Zell-abgeleiteten Kardiomyozyten nicht exprimiert. Angesichts des identischen CaV β 2-Expressionsmusters überrascht es nicht, dass *Kolossov et al.* (82) vergleichbare Ca²⁺-Ströme in ES-Zell-abgeleiteten α -PIG-Kardiomyozyten und „normalen“ embryonalen Kardiomyozyten finden.

4.1.2.2 One-Step RT-PCR mit einzelnen isolierten Kardiomyozyten

Die Ergebnisse aus 4.1.2.1 zeigen, dass CaV β 2-N4 aus jedem untersuchten Kardiomyozyten-Pool von zehn bis zwölf Zellen amplifiziert werden konnte, während dies für CaV β 2-N1 bzw. CaV β 2-N5 nur in der Hälfte der PCR-Ansätze der Fall war und CaV β 2-N3-spezifische Fragmente überhaupt nicht detektiert wurden. Unbekannt war die Antwort auf die Frage, ob einzelne Kardiomyozyten mehrere CaV β 2-Spleißvarianten gleichzeitig exprimieren oder ob jeweils ein Kardiomyozyt eine bestimmte CaV β 2-Spleißvariante exprimiert. So ist denkbar, dass jeder Kardiomyozyt jeweils nur eine Spleißvariante enthält, abhängig von seiner Lokalisation innerhalb des Herzens (Atrium vs. Ventrikel, Endokard vs. Epikard etc.). Um dies näher zu untersuchen, wurden einzelne Kardiomyozyten von adulten Tieren isoliert und jeweils eine Herzmuskelzelle pro PCR-Ansatz verwendet. Jeder PCR-Ansatz enthielt zwei Forward-Primer für unterschiedliche CaV β 2-Varianten. Da der Reverse-Primer in der ersten konstanten Region bindet, die bei allen CaV β 2-Varianten identisch ist, war hier kein zweiter vonnöten. Die Forward-Primer enthielten die Anfangssequenzen der CaV β 2a-N1 (erwartete Fragmentgröße: 553 bp) und CaV β 2a-N4 (erwartete Fragmentgröße: 406 bp) bzw. CaV β 2-N5 (erwartete Fragmentgröße: 424 bp), da sich die PCR-Amplifikate der N-Termini dieser Isoformen in ihrer Länge ausreichend unterscheiden, um sie später im Gel auftrennen zu können. Zudem sind sie die drei häufigsten CaV β 2-Varianten, die im Rahmen dieser Forschungsarbeiten identifiziert wurden. Die PCR-Fragmente für CaV β 2a-N3 (403 bp), -N4 (406 bp) und -N5 (424 bp) besit-

zen untereinander zu geringe Größenunterschiede; sie können mittels ihres Laufverhaltens im Gel nicht unterschieden werden. Deshalb wurde keine PCR mit Kombinationen dieser Forward-Primer durchgeführt.

Abbildung 29 zeigt die Ergebnisse der Einzelzell-PCR: Ansätze identischer Zusammensetzung (Spuren eins bis drei bzw. eins bis zehn) und jeweils eine Negativkontrolle (Ansatz ohne Kardiomyozyt; Spur vier bzw. elf (N)) wurden aufgetragen. Als Forward-Primer dienten CaV β 2a-N1- und CaV β 2a-N4-N-Terminus-spezifische Primer.

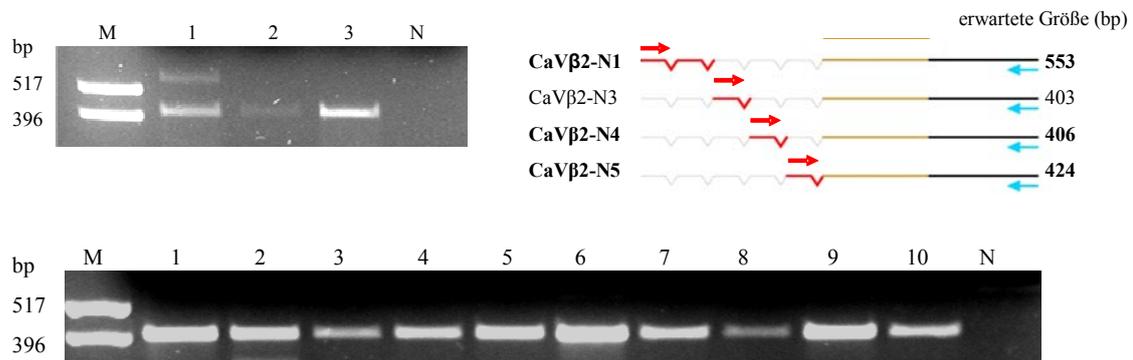


Abbildung 29: Einzelzell-PCR mit adulten Kardiomyozyten
(Forward-Primer: CaV β 2a-N4 u. CaV β 2a-N1)

Man erkennt in Spur eins im oben gezeigten Gel zwei Fragmente, nämlich CaV β 2a-N1 (553 bp) und CaV β 2a-N4 (406 bp), in anderen jedoch nur eines der beiden erwarteten Fragmente (CaV β 2a-N4) und zwar jeweils in deutlichen Mengen. Eine Koexpression von CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4 ist somit möglich, scheint aber nicht in jeder Zelle der Fall zu sein. Dagegen wurde CaV β 2a-N4 in allen untersuchten Zellen exprimiert. Ein ähnliches Experiment wurde mit CaV β 2a-N1- und CaV β 2a-N5-spezifischen Primern durchgeführt.

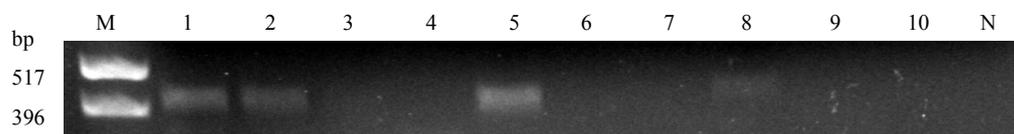


Abbildung 30: Einzelzell-PCR mit adulten Kardiomyozyten (CaV β 2a-N5 u. CaV β 2a-N1)

Man erkennt in Abbildung 30 in den Spuren eins, zwei, fünf und acht Amplifikate mit der zu CaV β 2a-N5 korrespondierenden Höhe; ein sichtbares Amplifikat für CaV β 2a-N1 wurde nicht erzielt, obwohl im vorhergehenden Experiment in Kombination mit dem CaV β 2a-N4-spezifischen Primer ein Amplifikat erhalten wurde. CaV β 2a-N5 scheint somit in einigen, aber

nicht allen Kardiomyozyten exprimiert zu werden. Die Koexpression von CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N5 ebenso wie die Expression von CaV β 2a-N1 allein konnten nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 15 fasst die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen hinsichtlich der Expression der CaV β 2-Spleißvarianten in Herz von Maus zusammen. Die Expression im Herzgewebe ist für die CaV β 2-Spleißvarianten CaV β 2-N1, -N4 und -N5 eindeutig nachgewiesen, während CaV β 2-N2 und CaV β 2-N3 nicht exprimiert werden. Da für CaV β 2-N2 kein Klon aus den cDNS-Bibliotheken isoliert werden konnte, schlossen die sich den cDNS-Bibliotheken anschließenden PCR-Untersuchungen diese Spleißvariante nicht mit ein.

| Zellen/Gewebe | Klone | CaV β 2(a)-N1 | CaV β 2(a)-N2 | CaV β 2(a)-N3 | CaV β 2(a)-N4 | CaV β 2(a)-N5 |
|-------------------------------------------|-------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| P7-Random-cDNS-Bibliothek | 27 | 4 | - | | 20 | 3 |
| P7-GSP-cDNS-Bibliothek | 20 | 10 | - | | 10 | - |
| Adult-GSP-cDNS-Bibliothek | 13 | 2 | - | 1 | 8 | 2 |
| Einzelne, adulte Kardiomyozyten | | positiv | Nicht untersucht | negativ | positiv | positiv |
| Einzelne, embryonale Kardiomyozyten E13.5 | | positiv | Nicht untersucht | negativ | positiv | positiv |
| ES-Zellen | | positiv | Nicht untersucht | negativ | positiv | positiv |
| α -PIG-Zellen | | positiv | Nicht untersucht | negativ * | positiv | positiv |

* Amplifikation eines DNS-Fragments, das nicht der erwarteten Größe entspricht

Tabelle 15: Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse der Expression von CaV β 2-Spleißvarianten in Herz von Maus

4.1.3 Untersuchung der CaV β 2-Varianten auf Proteinebene

Die bisher beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass im Herz von Maus drei Spleißvarianten der CaV β 2-Untereinheit exprimiert werden, die sich im Aminoterminus unterscheiden, CaV β 2-N1, -N4 und -N5. Die Variante CaV β 2-N3 wird dagegen höchstwahrscheinlich nicht in Kardiomyozyten exprimiert. Dafür sprechen die Ergebnisse der cDNS-Bibliotheken sowie der Untersuchungen mit einzelnen Kardiomyozyten. Im nächsten Schritt sollte versucht werden,

die klonierten CaV β 2-Proteine den im Herzen exprimierten CaV β 2-Proteinen mittels Western Blot mit spezifischen Anti-CaV β 2-Antikörpern zuzuordnen.

| | Kodierende cDNS (bp) | Aminosäurereste | Errechnetes Molekulargewicht (kDa) |
|-------------------|----------------------|-----------------|------------------------------------|
| CaV β 2a-N1 | 1974 | 658 | 73,1 |
| CaV β 2a-N3 | 1815 | 605 | 68,1 |
| CaV β 2a-N4 | 1818 | 606 | 68,0 |
| CaV β 2a-N5 | 1836 | 612 | 68,8 |

Tabelle 16: Länge der Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen sowie Molekulargewichte der CaV β 2a-Spleißvarianten

4.1.3.1 Expression der CaV β 2-Varianten und Western Blot-Untersuchungen

Hierzu wurden CaV β 2a-N1, -N4 und -N5 in COS-Zellen exprimiert. Die Proteine der Zellysate wurden einzeln und in verschiedenen Kombinationen vereinigt mittels eines SDS-PAGE-Gels elektrophoretisch getrennt und auf Nitrocellulosefilter geblottet. Anschließend wurden CaV β 2-Proteine mit Antikörpern detektiert. Abbildung 31 zeigt das Ergebnis. In den Spuren zwei, drei und vier wurden Zellysate mit je einer der CaV β 2-Spleißvarianten aufgetragen, in den Spuren fünf bis sieben jeweils ein Gemisch aus zwei bzw. drei CaV β 2-Varianten und als Referenzen in Spur eins eine Proteinfraktion von Herzen adulter Mäuse sowie in Spur neun Proteinfraktionen von sieben Tage alten Mäusen.

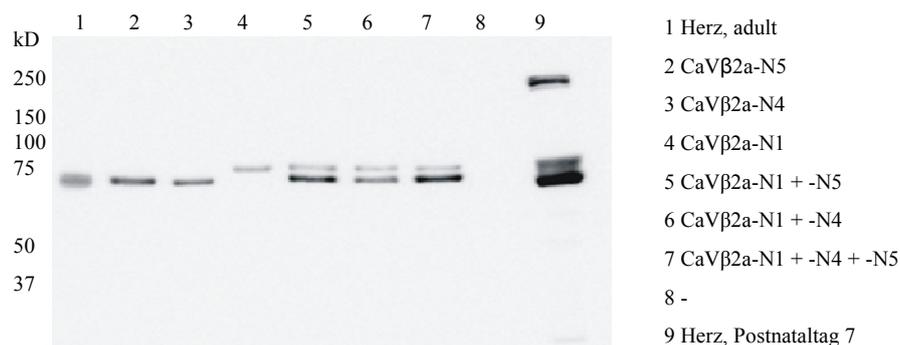


Abbildung 31: Westernblot-Analyse der in COS-Zellen exprimierten CaV β 2-Varianten

Abbildung 31 zeigt, dass die rekombinanten CaV β 2-Proteine in den Spuren zwei und drei das gleiche Laufverhalten wie das CaV β 2-Protein in Proteinfraktionen von Herzen adulter Mäuse (Spur eins) aufweisen. Ebenso haben die rekombinanten CaV β 2-Proteine in den Spuren fünf, sechs und sieben das gleiche Laufverhalten wie das CaV β 2-Protein in Proteinfraktionen von

Herzen sieben Tage alter Mäuse (Spur neun). Die in den Spuren vier bis acht zu sehende jeweils obere Bande läßt sich eindeutig der CaV β 2a-N1 zuordnen, während die untere durch CaV β 2a-N4 und/oder CaV β 2a-N5 gebildet wird. Die Größenunterschiede zwischen CaV β 2a-N4 und CaV β 2a-N5 sind zu gering, um sie über ihr elektrophoretisches Laufverhalten zu unterscheiden (Tabelle 16). Zusammen mit den Ergebnissen der cDNS-Klonierung der Spleißvarianten über cDNS-Bibliotheken sprechen diese Ergebnisse dafür, dass in Herzen von sieben Tage alten Mäusen CaV β 2a-N1, CaV β 2a-N4 und / oder CaV β 2a-N5 exprimiert werden. Dagegen werden in Herzen von adulten Mäusen, den Ergebnissen des Western Blots folgend, nur CaV β 2a-N4 und / oder CaV β 2a-N5 exprimiert, obwohl die Auswertung der cDNS-Bibliotheken ebenfalls eine Expression von CaV β 2a-N1 ergibt, die in etwa der von CaV β 2a-N5 entspricht.

4.1.3.2 Interaktion der CaV β 2-Isoformen untereinander

Die Ergebnisse, die in Abschnitt 4.1.2.2 beschrieben sind sprechen dafür, dass in einer Zelle mehr als eine CaV β 2-Variante exprimiert wird. Es stellt sich die Frage, ob jede einzelne CaV β 2-Variante jeweils eine spezifische Funktion ausübt, ob beispielsweise die eine den Membrantransport, die andere die Modulation der Ca²⁺-Kanaleigenschaften reguliert. Es ist auch vorstellbar, dass miteinander interagierende CaV β 2-Untereinheiten Membrantransport und Kanalmodulation gemeinsam steuern, wobei jedes Protein seinen speziellen Beitrag leistet. Voraussetzung wäre eine unmittelbar benachbarte Lokalisation oder eine Zusammenlagerung der CaV β 2-Untereinheiten und eine direkte Interaktion.

McGee et al. (101) untersuchten eine solche Interaktion mittels CaV β -Proteinen, die eine Mutation entweder der SH3- oder der NK-Domäne besaßen, wodurch die intramolekulare Assoziation der SH3- mit der NK-Domäne und eine funktionelle Beeinflussung des CaV2.1-Kanals nicht mehr möglich war. Nach Co-Expression der reziproken Mutationen in einer zweiten CaV β -Untereinheit konnte die CaV β -Modulation des Ca²⁺-Stroms rekonstituiert werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass es zu intermolekularen Wechselwirkungen von CaV β 2-Proteinen kommt. Inwiefern allerdings die nicht-mutierten CaV β -Proteine untereinander interagieren wurde bisher nicht gezeigt. Im Folgenden wurde deshalb untersucht, ob native CaV β 2-Untereinheiten miteinander interagieren.

4.1.3.2.1. Co-Immunopräzipitation von CaV β 2-Spleißvarianten

Die Co-Immunopräzipitation ist ein etabliertes Verfahren zur Untersuchung von Proteinwechselwirkungen und ist hier Methode der Wahl, um die Interaktion zwischen verschiedenen

CaV β 2a-Untereinheiten zuverlässig nachzuweisen. Dazu wurde CaV β 2a-N1 N-terminal mit einem Epitop fusioniert, das für die Co-Immunopräzipitation genutzt wurde (siehe linker Teil der Abbildung 32). Bei dem Epitop handelt es sich um die Aminosäuresequenz N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C, die auch als „FLAG“ bezeichnet wird und die aufgrund ihrer hohen Hydrophilie eine ideale antigene Determinante repräsentiert. Aufgrund der Aminosäuresequenzverlängerung durch das fusionierte Epitop ergab sich eine Erhöhung des Molekulargewichts im Vergleich zu den anderen Spleißvarianten, was als positiven Nebeneffekt eine verbesserte Trennung der CaV β 2a-Proteinbanden in der Western Blot-Analyse zur Folge hatte. Untersucht wurde die Interaktion von den in Kardiomyozyten häufigsten Spleißvarianten CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4.

CaV β 2a-N4 und FLAG-CaV β 2a-N1 wurden in COS-Zellen koexprimiert, die FLAG-CaV β 2a-N1 mittels des Anti-FLAG-Antikörpers präzipitiert, die präzipitierten Proteine auf SDS-PAGE aufgetrennt und auf Membranen transferiert. Mit Hilfe des Anti-CaV β 2-Antikörpers, der alle CaV β 2-Varianten erkennt, wurden im anschließenden Western Blot sowohl FLAG-CaV β 2a-N1 als auch CaV β 2a-N4 nachgewiesen (Abbildung 32).

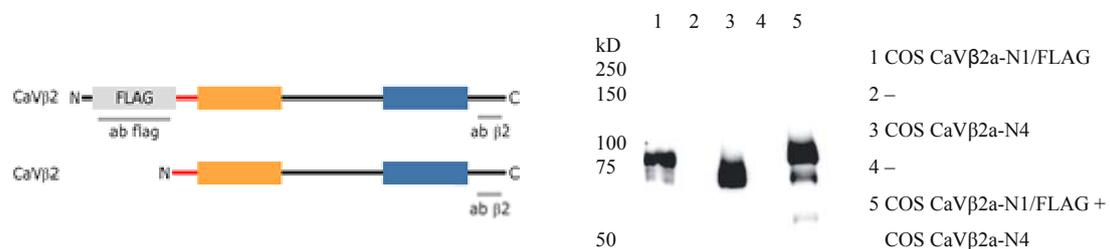


Abbildung 32: Co-Immunopräzipitation von CaV β 2-N1 und -N4-Untereinheiten

Im linken Teil der Abbildung 32 sind die beiden CaV β 2-Varianten FLAG-CaV β 2-N1 und CaV β 2a-N4 mit dem FLAG-Epitop, den variablen Regionen und den drei konstanten Regionen sowie das Epitop für den Anti-CaV β 2-Antikörper (ab β 2), der alle CaV β 2-Varianten erkennt, gezeigt. Im rechten Teil der Abbildung 32 ist in Spur eins und drei die Expression der einzeln exprimierten CaV β 2a-Spleißvarianten im Western Blot gezeigt. In Spur 5 sind die Proteine erkennbar, die durch den Anti-FLAG-Antikörper (ab flag) präzipitiert werden: das CaV β 2a-N1-Protein und das CaV β 2a-N4-Protein. Da nur das CaV β 2a-N1-Protein das FLAG-Epitop besitzt, muss die CaV β 2a-N4 an CaV β 2a-N1 binden, um präzipitiert zu werden.

Zusammenfassend zeigt das Ergebnis eine Interaktion zwischen CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4 nach Koexpression beider Proteine in COS-Zellen und legt eine Interaktion verschiedener CaV β 2-Untereinheiten *in vivo* nahe.

4.1.3.2.2. Cross-linking-Experiment mit CaV β 2-Spleißvarianten

Eine unabhängige weitere Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen stellt die Quervernetzung, das sog. Cross-Linking primärer Amine von Aminosäuren-Seitengruppen der interagierenden Proteine durch BS³ dar (153). BS³ ist ein bifunktionaler Hydroxysuccinimidester, der die primären Amine von Aminosäureresten benachbarter Proteine kovalent verbindet.

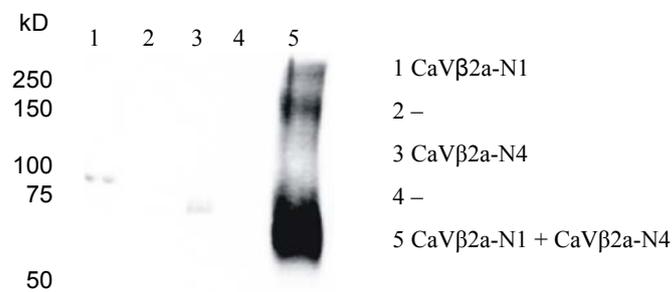


Abbildung 33: Cross-linking von CaV β 2a-N1 und -N4-Untereinheiten

Das Ergebnis eines solchen Experiments mit BS³ deutet ebenfalls auf eine intermolekulare Interaktion der CaV β 2-Untereinheiten hin (Abbildung 33). Zur kovalenten Vernetzung wurden Zelllysate von COS-Zellen, die CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4 koexprimieren mit BS³ inkubiert, die Proteine anschließend auf SDS-PAGE aufgetrennt, auf Filter transferiert und mit dem CaV β 2-Antikörper inkubiert. Die Spuren eins und drei zeigen die einzeln aufgetragenen CaV β 2-Spleißvarianten CaV β 2a-N1 (Spur eins) und CaV β 2a-N4 (Spur drei), welche als Referenz dienen. Wie in Spur fünf zu sehen, detektiert der CaV β 2-Antikörper eine prominente Bande bei 68 bis 85 kDa, was den überexprimierten CaV β 2-Monomeren entspricht. Des Weiteren erkennt der Antikörper ein Protein bei ca. 150 kDa und ein weiteres bei 260 kDa; diese Proteine stellen Dimere und höher molekulare Oligomere der beiden CaV β 2-Varianten dar. Das Ergebnis zeigt, dass sich auch mit dieser Methode eine Interaktion von CaV β 2-Proteinen nachweisen lässt.

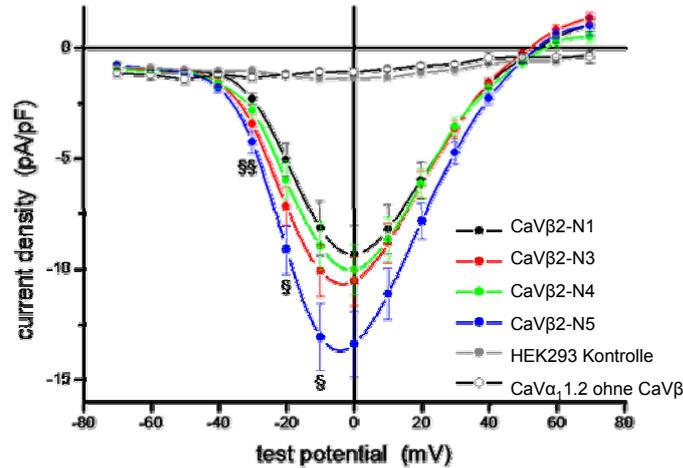
4.1.4 Elektrophysiologische Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung der CaV β 2a-Spleißvarianten als Ca $^{2+}$ -Kanal-Untereinheiten

Wie in der Einleitung dargestellt, beeinflussen CaV β -Untereinheiten die Spannungsabhängigkeit, Kinetik und Stromleitungseigenschaften des L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanals (43). Alle CaV β -Untereinheiten verursachen eine Verschiebung des Schwellenpotenzials in hyperpolarisierender Richtung und erhöhen dadurch die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals (43). Gleichzeitig sind signifikante Unterschiede in den modulatorischen Eigenschaften zwischen verschiedenen CaV β -Untereinheiten beschrieben. Dies wird erklärt über ihre Verteilung im Gewebe (92, 120), subzelluläre Lokalisation (32) und Auswirkungen auf die L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanal-Inaktivierungseigenschaften (32, 161). *Takahashi et al.* (146) fanden signifikante Unterschiede zwischen den fünf N-terminalen CaV β 2-Spleißvarianten von Mensch hinsichtlich ihres Einflusses auf die Ca $^{2+}$ -Ströme. Die in dieser Arbeit identifizierten Mausproteine sind bis auf CaV β 2a-N5 bisher nicht hinsichtlich der Regulation bzw. Modifikation von Ca $^{2+}$ -Strömen untersucht worden. Im Folgenden sind die elektrophysiologischen Untersuchungen zugänglichen modulatorischen Eigenschaften der aus den cDNS-Bibliotheken isolierten CaV β 2a-Spleißvarianten beschrieben. Für die Messungen wurde CaV α_1 1.2 mit der jeweiligen CaV β 2a-Variante koexprimiert. Die CaV $\alpha_2\delta$ -Untereinheit wurde nicht koexprimiert, da eine Publikation von *Yamada et al.* (167) zeigt, dass diese Untereinheit zwar die Zahl funktioneller Kanäle in der Membran erhöht, jedoch keine Auswirkungen auf die untersuchten Eigenschaften des Ca $^{2+}$ -Kanals besitzt. Die Klonierung und Charakterisierung der verwendeten CaV α_1 1.2-Untereinheit von Maus ist in Teil 2 dieser Arbeit beschrieben. Von den sechs klonierten Voll-längen-CaV1.2-cDNS (siehe Teil 2) wurde CaV1.2a Klon 2 für die funktionellen Untersuchungen exprimiert.

4.1.4.1 Einfluss der CaV β 2a-Varianten auf die Strom-Spannungs-Kurve

Die Strom-Spannungs-Kurve eines Kanals beschreibt dessen Eigenschaft, Strom (hier Calciumionen) in Abhängigkeit von der Spannung zu leiten. Abbildung 34 zeigt die Strom-Spannungs-Kurven der CaV β 2a-Spleißvarianten im Vergleich. Man erkennt, dass alle Kurven ab etwa -40 mV einen kontinuierlich zunehmenden Ca $^{2+}$ -Strom zeigen, der im Bereich um 0 mV sein Maximum erreicht und ab diesem Punkt wieder stetig abfällt, bis das Umkehrpotenzial bei etwa +40 bis +50 mV erreicht ist. Vergleichbare Ströme sind in nicht transfizierten HEK293-Zellen (schwarze offene Kreise in Abbildung 34) bzw. in HEK293-Zellen, die

CaV1.2 - aber keine CaV β 2-Untereinheit - exprimieren (graue gefüllte Kreise in Abbildung 34), nicht detektierbar.



CaV β 2a-N1 vs. CaV β 2a-N5: § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$

Abbildung 34: Strom-Spannungs-Kurven bei Koexpression der CaV α 1.2-Untereinheit mit unterschiedlichen CaV β 2a-Isoformen

Tabelle 17 fasst die Charakteristika der einzelnen Stromkurven der Abbildung 34 zusammen. I_{Ca} steht dabei für die Stromdichte in pA/pF bei einem Potenzial von 0 mV, G_{max} (nS/pF) für die maximale Zelleitfähigkeit, E_{rev} für das Umkehrpotential in mV, $V_{1/2,act}$ für dasjenige Potential in mV, bei dem 50% der Kanäle aktiviert sind und k die Steilheit der Stromaktivierung, ein Maß für die Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der Spannung.

Wie Abbildung 34 und Tabelle 17 veranschaulichen, ist der Ca^{2+} -Strom (I_{Ca}) in Anwesenheit von CaV β 2a-N5 an der überwiegenden Zahl der Messpunkte größer als der I_{Ca} in Anwesenheit der anderen CaV β 2a-Varianten. Die in Tabelle 17 gezeigten I_{Ca} -Werte wurden bei einem Testpotential von 0 mV ermittelt. Für CaV β 2a-N1, CaV β 2a-N3 und CaV β 2a-N4 erhält man hier Ca^{2+} -Ströme vergleichbarer Größe, die jedoch geringer sind als der Ca^{2+} -Strom moduliert durch CaV β 2a-N5. Allerdings ist dieser Unterschied nicht statistisch signifikant. Lediglich in negativen Bereichen des Testpotenzials (-30, -20 und -10 mV) ergibt sich ein signifikanter Unterschied des Ca^{2+} -Stroms zwischen CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N5, was dafür spricht, dass CaV β 2a-N5-modulierte CaV1.2-Kanäle bereits bei negativen Potenzialen einen beträchtlichen Ca^{2+} -Strom leiten. Für die maximale Leitfähigkeit G_{max} besteht, wie aus Tabelle 17 ersichtlich, kein signifikanter Unterschied zwischen den Spleißvarianten. Das Umkehrpotential E_{rev} bezeichnet das Membranpotential, bei dem kein Nettostromfluss durch den Kanal mehr stattfindet und ist die wichtigste Messgröße zur Bestimmung der Ionenselektivität eines Kanals. Es

ergeben sich für E_{rev} die in Tabelle 17 eingetragenen Werte, die im Vergleich der CaV β 2a - Spleißvarianten keine signifikanten Unterschiede zeigen. Zusätzlich wurde für jede Messreihe die Spannung bestimmt, bei der genau die Hälfte der Kanäle aktiviert wird ($V_{1/2,act}$). Die Spanne für $V_{1/2,act}$ lag zwischen -16.9 mV für CaV β 2a-N1 und -20.3 mV für CaV β 2a-N5. Dieser Unterschied war in der Auswertung signifikant und spiegelt die Unterschiede in der Stromdichte bei negativen Potenzialen wider (Abbildung 34). Die Werte der anderen Spleißvarianten für $V_{1/2,act}$ lagen zwischen diesen beiden Werten und ergaben im Vergleich keine signifikanten Unterschiede.

| | n | $I_{Ca^{2+}0\text{ mV}}$ (pA/pF) | G_{max} (nS/pF) | E_{rev} (mV) | $V_{1/2,act}$ (mV) | k (mV) |
|------------------|----|-------------------------------------|----------------------|-------------------|-----------------------|-----------------|
| CaV β 2-N1 | 24 | -9.34 \pm 1.31 | 0.19 \pm 0.03 | 57.88 \pm 1.96 | -16.91 \pm 1.02 | 9.23 \pm 0.65 |
| CaV β 2-N3 | 28 | -10.52 \pm 1.12 | 0.22 \pm 0.03 | 53.42 \pm 1.66 | -19.39 \pm 0.60 | 8.78 \pm 0.54 |
| CaV β 2-N4 | 26 | -10.03 \pm 1.16 | 0.18 \pm 0.02 | 58.37 \pm 1.45 | -19.79 \pm 0.84 | 8.98 \pm 0.60 |
| CaV β 2-N5 | 28 | -13.39 \pm 1.48 | 0.26 \pm 0.03 | 55.53 \pm 1.76 | -20.29 \pm 0.79 | 8.04 \pm 0.33 |
| N1 vs N3 | | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| N1 vs N4 | | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| N1 vs N5 | | n.s. | n.s. | n.s. | p<0.05 | n.s. |
| N3 vs N4 | | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| N3 vs N5 | | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| N4 vs N5 | | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |

Tabelle 17: Vergleich der Ca²⁺-Strom-Eigenschaften bei Koexpression der CaV α _{1.2}-Untereinheit mit verschiedenen CaV β 2a-Varianten

4.1.4.2 Einfluss der CaV β 2a-Varianten auf Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften des L-Typ Ca²⁺-Kanals

Takahashi et al. (146) berichten in ihrer Publikation von 2003, dass sich die menschlichen CaV β 2a-Spleißvarianten nach ihrer subzellulären Lokalisation in zwei Gruppen gliedern und jede Gruppe die Aktivierung und Inaktivierung der Ca²⁺-Ströme unterschiedlich beeinflusst. Dabei bilden die in der Arbeit von *Takahashi et al.* als membranassoziiert bezeichneten Isoformen CaV β 2a-N3 und CaV β 2a-N5 eine Gruppe. Die andere Gruppe setzt sich aus den als zytoplasmatische Isoformen benannten CaV β 2a-N1, -N2 und N4 zusammen. Die postulierte unterschiedliche Modulation der Inaktivierungs- und Aktivierungseigenschaften des Ca²⁺-Kanals durch die verschiedenen CaV β 2a-Spleißvarianten wurde in den folgenden Experimenten für die CaV β 2a-Spleißvarianten von Maus untersucht.

4.1.4.2.1. Einfluss der CaV β 2a-Splei β varianten auf die Steady-State Inaktivierung bzw. Aktivierung

Durch depolarisierende Vorpulse und anschließende Testsprünge auf ein immer gleiches, weit depolarisierendes Testpotential kann man die sog. Steady-State Inaktivierung bestimmen, ein Maß für den maximalen Effekt der spannungsabhängigen Inaktivierung.

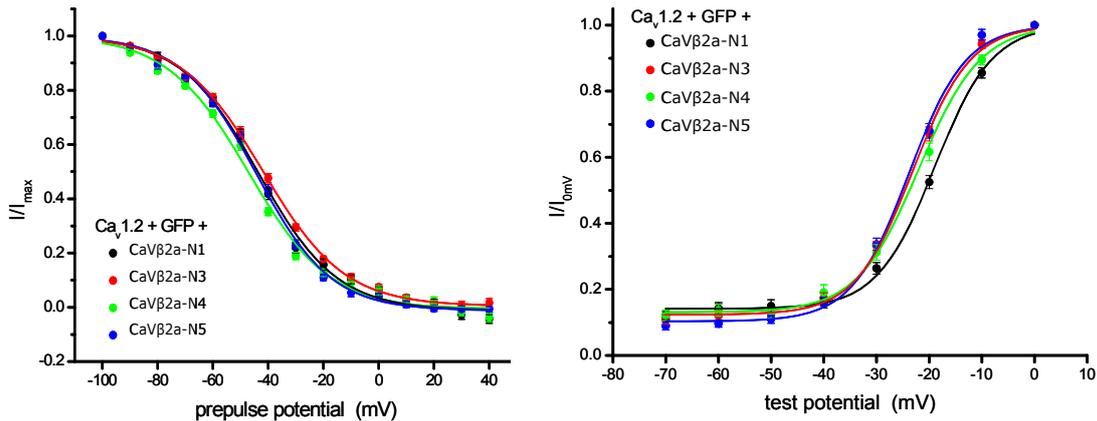


Abbildung 35: Beeinflussung der Steady-State Inaktivierung (links) bzw. Aktivierung (rechts) durch die CaV β 2a-Splei β varianten

Die Auswertung des Einflusses der CaV β 2a-Splei β varianten auf die Steady-State Inaktivierung ist in Abbildung 35a graphisch dargestellt. Die Kurven erreichen $V_{1/2, \text{inact}}$ bei Testspannungen zwischen -47 und -42 mV und nähern sich beim Übergang zu positiven Potenzialen dem Nullwert des Netto-Ca $^{2+}$ -Stroms an. Man erkennt für CaV β 2a-N4 eine relative Linksverschiebung bzw. für CaV β 2a-N3 Rechtsverschiebung der Kurve im Vergleich zu den anderen beiden Splei β varianten. Abbildung 35b lässt erkennen, dass die Aktivierungskurven ausgehend von einem Basisstrom von 0,1 I/I_{0mV} ab etwa -40 mV steil ansteigen und bei einem Testpotential von 0 mV ihr Maximum erreichen. Man sieht, dass unter Einfluss von CaV β 2a-N1 eine Rechtsverschiebung der Kurve erfolgt, was einen späteren Anstieg der Kurve im Vergleich zu den anderen Splei β varianten bedingt. Diese Experimente sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Aus Tabelle 18 wird deutlich, dass der Wert $V_{1/2, \text{ss-inact}}$ für CaV β 2a-N4 im Vergleich zu CaV β 2a-N1 bzw. -N3 um $\sim 3,6$ bzw. $\sim 5,1$ mV zu hyperpolarisierenden Potenzialen verschoben ist, während der Wert für $V_{1/2, \text{ss-act}}$ als Maß für die Steady-State Aktivierung nach Expression von CaV β 2a-N1 signifikant zu weniger negativen Potenzialen im Vergleich zu CaV β 2a-N4 (~ 3 mV), -N3 ($\sim 4,1$ mV) bzw. -N5 ($\sim 4,9$ mV) verschoben ist.

| | n | Steady-State Inaktivierung, $V_{1/2,ss-inact}$ (mV) | Steady-State Aktivierung, $V_{1/2,ss-act}$ (mV) |
|-------------------|----|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| CaV β 2a-N1 | 24 | -43.47 \pm 1.09 | -18.96 \pm 0.58 |
| CaV β 2a-N3 | 28 | -41.91 \pm 0.71 | -23.07 \pm 0.47 |
| CaV β 2a-N4 | 26 | -47.05 \pm 0.72 | -21.96 \pm 0.75 |
| CaV β 2a-N5 | 28 | -44.36 \pm 0.92 | -23.84 \pm 0.57 |
| N1 vs N3 | | n.s. | P<0.001 (N3 um ~ 4,1 mV nach links) |
| N1 vs N4 | | P<0.05 (N4 um 3,6 mV nach links) | P<0.01 (N4 um ~ 3 mV nach links) |
| N1 vs N5 | | n.s. | P<0.001 (N5 um ~ 4,9 mV nach links) |
| N3 vs N4 | | P<0.001 (N4 um 5,14 mV nach links) | n.s. |
| N3 vs N5 | | n.s. | n.s. |
| N4 vs N5 | | n.s. | n.s. |

Tabelle 18: Beeinflussung der Steady-State Inaktivierung bzw. -Aktivierung des L-Typ Ca²⁺-Kanals durch die CaV β 2a-Spleißvarianten

4.1.4.2.2. Einfluss der CaV β 2a-Spleißvarianten auf die Inaktivierungs- und Aktivierungskinetik

Um die Kinetik der Inaktivierung zu bestimmen, wurde anschließend der residuale Strom 400 ms nach Beginn der Depolarisation in Prozent der maximalen Stromamplitude als r400 bestimmt. Für die Aktivierungskinetik wurde die Zeit gemessen, während der der Strom nach Depolarisation seine maximale Amplitude erreicht, die sogenannte „Time-to-peak“.

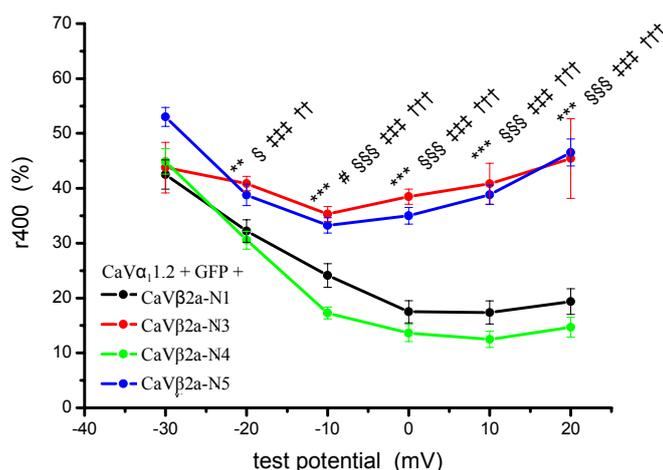


Abbildung 36: Residualströme 400 ms nach Depolarisation in Abhängigkeit der CaV β 2a-Spleißvarianten

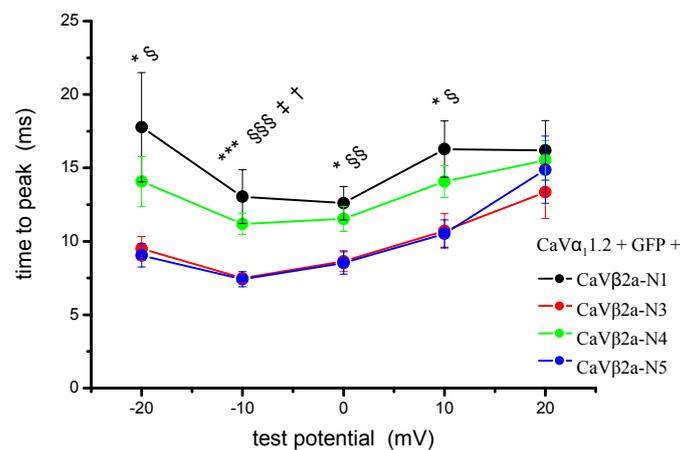
Wie man in Abbildung 36 erkennt, scheinen die CaV β 2a-Spleißvarianten in Bezug auf die Inaktivierungsrate r400 zwei Gruppen mit jeweils ähnlichen r400-Werten zu bilden. Die eine

Gruppe, bestehend aus CaV β 2a-N3 und CaV β 2a-N5, zeigt eine geringere zeitabhängige Inaktivierung, als die zweite Gruppe mit CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

| | n | Inaktivierungsrate bei -10 mV | Inaktivierungsrate bei 0 mV | Inaktivierungsrate bei +10 mV |
|-------------------|----|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| CaV β 2a-N1 | 24 | 24.11 \pm 2.17 | 17.50 \pm 2.03 | 17.37 \pm 2.11 |
| CaV β 2a-N3 | 28 | 35.30 \pm 1.37 | 38.47 \pm 1.38 | 40.84 \pm 3.74 |
| CaV β 2a-N4 | 26 | 17.28 \pm 1.05 | 13.63 \pm 1.58 | 12.47 \pm 1.46 |
| CaV β 2a-N5 | 28 | 33.23 \pm 1.38 | 34.99 \pm 1.52 | 38.38 \pm 1.75 |
| N1 vs N3 | | p < 0.001 (N1/N3 ~ 11,2 mV) | p < 0.001 (N1/N3 ~ 21 mV) | p < 0.001 (N1/N3 ~ 23 mV) |
| N1 vs N4 | | p < 0.05 (N1/N4 ~ 6,8 mV) | n.s. | n.s. |
| N1 vs N5 | | p < 0.001 (N1/N5 ~ 9,1 mV) | p < 0.001 (N1/N5 ~ 17,5 mV) | p < 0.001 (N1/N5 ~ 21 mV) |
| N3 vs N4 | | p < 0.001 (N3/N4 ~ 18 mV) | p < 0.001 (N3/N4 ~ 24,8 mV) | p < 0.001 (N3/N4 ~ 28,4 mV) |
| N3 vs N5 | | n.s. (N3/N5 ~ 2,1 mV) | n.s. | n.s. |
| N4 vs N5 | | p < 0.001 (N4/N5 ~ 16 mV) | p < 0.001 (N4/N5 ~ 21,4 mV) | p < 0.001 (N4/N5 ~ 25,9 mV) |

Tabelle 19: Vergleich der Inaktivierungsraten r400 der CaV β 2a-Spleißvarianten für verschiedene Testpotenziale

Für die Aktivierungskinetik des Ca²⁺-Stroms, gemessen als Time-to-peak nach Depolarisationen auf verschiedene Testpotenziale ergaben sich folgende Ergebnisse (Abbildung 37):



CaV β 2a-N1 vs. CaV β 2a-N3: ** p<0.01, *** p<0.001; CaV β 2a-N1 vs. CaV β 2a-N4: # p<0.05; CaV β 2a-N1 vs. CaV β 2a-N5: § p<0.05, §§§ p<0.001; CaV β 2a-N3 vs. CaV β 2a-N4: ††† p<0.001; CaV β 2a-N4 vs. CaV β 2a-N5: †† p<0.01, ††† p<0.001

Abbildung 37: Einfluss der CaV β 2a-Spleißvarianten auf die Aktivierungskinetik der Ca²⁺-Ströme gemessen als Zeit, während der der Strom nach Depolarisation seine maximale Amplitude (peak) erreicht.

Auch für diese Parameter bilden die vier CaV β 2a-Spleißvarianten die bereits beschriebenen Gruppen mit CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4 bzw. CaV β 2a-N3 und CaV β 2a-N5. In Gegenwart von CaV β 2a-N3 und CaV β 2a-N5 erreichen die Ströme signifikant rascher ihr Maximum, insbesondere nach Depolarisationen auf Potenziale von - 20 bis + 10 mV, als in Gegenwart von CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4. Tabelle 20 fasst diese Ergebnisse zusammen und zeigt, dass insbesondere bei Depolarisationen auf - 10 mV ein signifikanter Unterschied im Einfluss der CaV β 2a-Untereinheiten beider Gruppen detektierbar ist.

| | n | time-to-peak (ms) bei -20 mV | time-to-peak (ms) bei -10 mV | time-to-peak (ms) bei 0 mV | time-to-peak (ms) bei +10 mV |
|-----------------------------------|----|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| CaVβ2a-N1 | 24 | 17.78 \pm 3.73 | 13.04 \pm 1.83 | 12.6 \pm 1.14 | 16.28 \pm 1.92 |
| CaVβ2a-N3 | 28 | 9.51 \pm 0.83 | 7.49 \pm 0.34 | 8.65 \pm 0.71 | 14.07 \pm 1.08 |
| CaVβ2a-N4 | 26 | 14.08 \pm 1.69 | 11.18 \pm 0.72 | 11.54 \pm 0.85 | 10.71 \pm 1.19 |
| CaVβ2a-N5 | 28 | 9.04 \pm 0.79 | 7.42 \pm 0.51 | 8.53 \pm 0.76 | 10.53 \pm 0.92 |
| N1 vs N3 | | p<0.05 | p<0.001 | p<0.05 | p<0.05 |
| N1 vs N4 | | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| N1 vs N5 | | p<0.05 | p<0.001 | p<0.01 | p<0.05 |
| N3 vs N4 | | n.s. | p<0.05 | n.s. | n.s. |
| N3 vs N5 | | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| N4 vs N5 | | n.s. | p<0.05 | n.s. | n.s. |

Tabelle 20: Vergleich der Time-to-peak-Werte der Ca²⁺-Ströme in Gegenwart der CaV β 2a-Spleißvarianten bei den angegebenen Testpotenzialen.

Im Folgenden wurden zusätzlich Werte für die Aktivierungszeitkonstante der vier CaV β 2a-Spleißvarianten bestimmt:

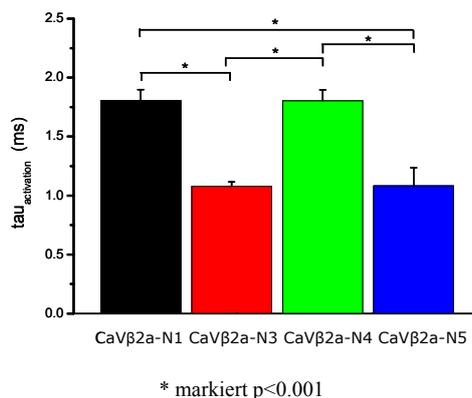


Abbildung 38: Einfluss der CaV β 2a-Spleißvarianten auf die Aktivierungszeitkonstante (τ_{act})

Die Bestimmung der Aktivierungszeitkonstanten ergibt ähnliche Resultate: Die CaV β 2a-Spleißvarianten zeigen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Aktivierungszeitkonstante τ_{act} des L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanals, wie in Abbildung 38 dargestellt. Wieder verhalten sich CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4 sowie CaV β 2a-N3 und CaV β 2a-N5 ähnlich; die Zeitkonstanten für Ströme, die in Gegenwart von CaV β 2a-N3 und CaV β 2a-N5 gemessen wurden sind kürzer als die Konstanten der Ströme, die in Anwesenheit von CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4 gemessen wurden (Abbildung 38 und Tabelle 21).

| | n | τ_{act} bei 0 mV (1/ms) | |
|-------------------|----|------------------------------|-------------------------------------|
| CaV β 2a-N1 | 24 | 1.81 \pm 0.09 | N1 vs N3 p<0.001 |
| CaV β 2a-N3 | 28 | 1.08 \pm 0.04 | N1 vs N4 n.s. N1 vs N5 p<0.001 |
| CaV β 2a-N4 | 26 | 1.80 \pm 0.09 | N3 vs N4 p < 0.001 |
| CaV β 2a-N5 | 28 | 1.08 \pm 0.15 | N3 vs N5 n.s. N4 vs N5 p < 0.001 |

Tabelle 21: Werte der Aktivierungszeitkonstante τ_{act} für Ströme, die in Gegenwart der CaV β 2a-Spleißvarianten durch Depolarisation auf 0 mV aktiviert werden.

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Werte der Aktivierungszeitkonstante τ_{act} zwischen CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N3 bzw. CaV β 2a-N5, sowie zwischen CaV β 2a-N4 und CaV β 2a-N3 bzw. CaV β 2a-N5. Zwischen CaV β 2a-N3 und CaV β 2a-N5 bzw. CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4 ergaben sich dagegen keine signifikanten Unterschiede.

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen zusammengefasst.

4.1.4.3 Zusammenfassung der in den elektrophysiologischen Messungen erhaltenen Ergebnisse

Abbildung 34 zeigt, dass nach Expression von CaV α 1.2 alleine nur ein sehr geringer Strom im Vergleich zu nicht-transfizierten HEK293-Zellen zu detektieren ist. Die Koexpression einer CaV β 2-Untereinheit vergrößert den detektierbaren Strom dramatisch (Abbildung 34), unabhängig davon, welche der vier CaV β 2a-Varianten, die in dieser Arbeit identifiziert wurden, koexprimiert wurde. Allerdings modulieren die einzelnen CaV β 2a-Varianten einzelne Komponenten der Kanalfunktion und der Ströme signifikant in unterschiedlicher Weise (Tabelle 22), was allein auf die jeweiligen N-Termini zurückzuführen ist, in denen sie sich unterscheiden.

| | |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $I_{Ca:0\text{ mV}}$ | nein (nur bei negativen Potenzialen signifikant größere Stromdichte in Gegenwart von CaV β 2a-N5) |
| G_{max} | nein |
| E_{rev} | nein |
| $V_{1/2,\text{act}}$ | Spannung zur halbmaximalen Aktivierung bei CaV β 2a-N5 mit signifikant negativerem Wert als bei CaV β 2a-N1 |
| k | nein |
| Steady-State-Inaktivierung | $V_{1/2,\text{ss-inact}}$ für CaV β 2a-N4 vs. CaV β 2a-N1 bzw. -N3 signifikant mit $\sim 3,6$ bis $\sim 5,14$ mV zu hyperpolarisierenden Potenzialen verschoben |
| Steady-State-Aktivierung | $V_{1/2,\text{ss-act}}$ für CaV β 2a-N1 vs. CaV β 2a-N3, -N4, -N5 signifikant, um ~ 3 bis $\sim 4,9$ mV zu weniger positiven Potenzialen verschoben |
| Inaktivierungsrate r400 | Zeitabhängige Inaktivierung signifikant geringer bei Kanälen mit CaV β 2a-N3 und -N5 gegenüber Kanälen mit CaV β 2a-N1 und -N4 |
| Time-to-peak (bei 0 mV) | In Gegenwart von CaV β 2a-N3 und -N5 erreichen die Ströme signifikant rascher ihr Maximum als in Gegenwart von CaV β 2a-N1 und -N4 |
| τ_{act} | Die Aktivierungszeitkonstanten τ_{act} sind für Ströme, die in Gegenwart von CaV β 2a-N3 und -N5 gemessen wurden signifikant geringer als für Ströme, die in Gegenwart von CaV β 2a-N1 und -N4 gemessen wurden. |

Tabelle 22: Kanal- und Stromeigenschaften, die durch einzelne CaV β 2a-Spleißvarianten signifikant beeinflusst werden

Man erkennt aus Tabelle 22, dass sich entsprechend der Parameter Inaktivierungsrate r_{400} , Time-to-peak und Aktivierungszeitkonstante τ_{act} eine Gliederung der CaV β 2a-Spleißvarianten in zwei Gruppen ergibt, die erste mit CaV β 2a-N1 und -N4 und die zweite mit CaV β 2a-N3 und -N5. Für weitere Messparameter (beispielsweise G_{max} , E_{rev} , $V_{1/2,\text{ss-act}}$) ergab sich ebenfalls der Trend zur Aufteilung in diese zwei Gruppen, allerdings waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant. Zudem scheinen einzelne CaV β 2a-Spleißvarianten spezifische Auswirkungen auf manche der Parameter zu haben. So liegt der Wert der halbmaximalen Aktivierung $V_{1/2}$ sowie der $V_{1/2,\text{ss-act}}$ für CaV β 2a-N1 bei signifikant positiveren Potenzialen als für andere CaV β 2a-Spleißvarianten. Dies spricht für eine Aktivierung des CaV β 2a-N1-modulierten L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanals bei im Vergleich positiveren Potenzialen. CaV β 2a-N4 verschiebt $V_{1/2,\text{ss-inact}}$ zu negativeren Potenzialen, als dies für die übrigen Spleißvarianten der Fall ist, was mit einer früheren Inaktivierung des Kanals einhergeht.

4.1.4.4 Einfluss eines CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins auf die L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanaleigenschaften

In den oben beschriebenen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass CaV β 2a-N4 mit CaV β 2a-N1 co-immunopräzipitiert werden kann (Abbildung 32). Die Ergebnisse der Einzelzell-PCR,

die in Kapitel 4.1.2.2 beschrieben sind, zeigen, dass mehrere CaV β 2-Varianten gleichzeitig in einer Zelle exprimiert sind. Diese Befunde ließen die Frage aufkommen, ob eventuell mehrere CaV β 2a-Spleißvarianten gleichzeitig die Ca²⁺-Kanalfunktion modulieren. Um den Einfluss parallel exprimierter CaV β 2a-Spleißvarianten auf den Kanal zu untersuchen, wurde ein Fusionsprotein aus zwei CaV β 2a-Spleißvarianten hergestellt. Die Methodik zur Herstellung des Fusionsproteins war angelehnt an eine Publikation von *Mori et al.* (106), die Calmodulin mit dem C-Terminus der CaV α_1 1.2-Untereinheit des L-Typ Ca²⁺-Kanals über Glycinreste unterschiedlicher Anzahl (mindestens 24 AS) fusionierten. Der Glycin-Linker verleiht den beiden gekoppelten Proteinen einen gewissen Freiraum, so dass die Fusion die Funktion der einzelnen Partner möglichst wenig beeinträchtigt. Für die direkte Fusion zweier Proteine ohne Linker, wie beispielsweise von *Dalton et al.* (35) vorgenommen, ist fraglich, ob nicht doch Einschränkungen in der Funktion des N-Terminus der zweiten CaV β 2a-Untereinheit entstehen. Aus diesem Grund wurden die beiden Proteine über 14 Glycinreste fusioniert. Die Fusion der Untereinheiten sollte sicherstellen, dass sich bei den späteren elektrophysiologischen Messungen beide Varianten in unmittelbarer Kanalnähe und Nachbarschaft befinden.

Für das Fusionsprotein wurden CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4 verwendet, da diese nach den oben beschriebenen Ergebnissen die am häufigsten vorkommenden CaV β 2a-Spleißvarianten in Herzgewebe von Maus darstellen. Die cDNS beider Varianten, verbunden über 42 Basenpaare, die für die 14 Glycinreste kodieren, wurden unter die Kontrolle des β -actin-Promotors in den eukaryotischen Expressionsvektor pCAGGS_M2 kloniert (Abbildung 39). Indem das Stopkodon in der CaV β 2a-N1-cDNS eliminiert wurde, ergab sich ein durchgängiger Leserahmen von Beginn der CaV β 2a-N1 bis zum Stopkodon der CaV β 2a-N4-DNS.

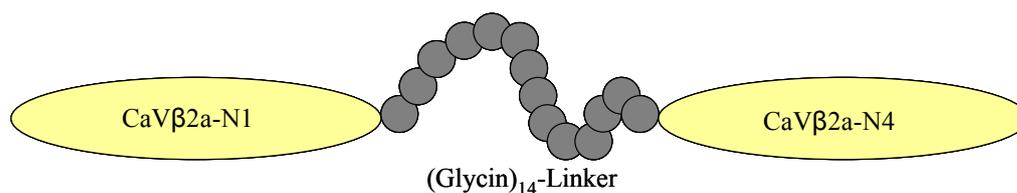


Abbildung 39: Aufbau des CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins

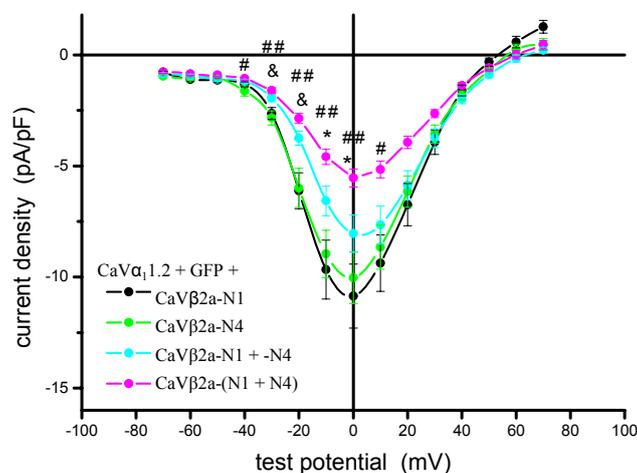
Das Fusionsprotein wurde für die folgenden Messungen zusammen mit der CaV α_1 1.2-Untereinheit in HEK 293-Zellen exprimiert. Parallel wurden Zellen mit den einzelnen cDNS von CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4 mit CaV α_1 1.2 kotransfiziert. Anschließend wurden die Ca²⁺-Ströme gemessen und die Messwerte in Gegenwart des Fusionsproteins sowie der Kotransfektion der CaV β 2a-Untereinheiten miteinander verglichen. Ebenso wurden die oben beschriebene

nen Ergebnisse der Experimente, bei denen nur einzelne CaV β 2a-Varianten (CaV β 2a-N1 bzw. CaV β 2a-N4) mit CaV α _{1.2} koexprimiert wurden, in die Auswertung miteinbezogen.

4.1.4.4.1. Auswirkungen des CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins auf die Strom-Spannungs-Kurve des L-Typ Ca²⁺-Kanals

Im Folgenden werden die Abkürzungen CaV β 2a-(N1 + N4) für das CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsprotein und CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4 für die Kotransfektion von CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4 mit der CaV α _{1.2}-Untereinheit verwendet.

Abbildung 40 demonstriert die Strom-Spannungskurven, die nach Expression von CaV α _{1.2} mit CaV β 2a-N1, CaV β 2a-N4, CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4 oder CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusion erhalten wurden. Man erkennt, dass im Bereich ab -40mV der Ca²⁺-Strom deutlich zunimmt, beim Übergang zu positiven Testpotenzialen die höchsten Werte zeigt, um bis zum Erreichen des Umkehrpotenzials bei etwa +60 mV wieder abzufallen. In Gegenwart des Fusionsproteins erreicht der Strom deutlich niedrigere Werte im Vergleich zu den Strömen, die in Gegenwart von CaV β 2a-N1 und -N4 gemessen wurden. Die Ströme, die in Gegenwart von CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4 gemessen wurden, sind intermediär.



CaV β 2a-N1 vs. CaV β 2a-(N1+N4): * p<0.05; CaV β 2a-N4 vs. CaV β 2a-(N1+N4): # p<0.05, ## p<0.01; CaV β 2a-N4 vs. CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4: & p<0.05

Abbildung 40: Einfluss des CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins auf die Strom-Spannungs-Kurve

Tabelle 23 fasst die Daten zusammen. Es zeigt sich, dass der Wert für $V_{1/2,act}$ in Anwesenheit von CaV β 2a-N4 signifikant bei mehr hyperpolarisierenden Potentialen liegt als in Gegenwart des des CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins (~ 4,9 mV Differenz) und CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4 (~ 4,28 mV Differenz).

| | n | $I_{Ca, 0\text{ mV}}$ (pA/pF) | G_{max} (nS/pF) | $E_{\text{re}}V$ (mV) | $V_{1/2,\text{act}}$ (mV) | k (mV) |
|-------------------------------------|----|----------------------------------|-----------------------------|--------------------------|------------------------------|------------------|
| CaV β 2-N1 | 24 | -9.34 \pm 1.31 | 0.19 \pm 0.03 | 57.88 \pm 1.96 | -16.91 \pm 1.02 | 9.23 \pm 0.65 |
| CaV β 2-N4 | 26 | -10.03 \pm 1.16 | 0.18 \pm 0.02 | 58,37 \pm 1.45 | -19.79 \pm 0.84 | 8.98 \pm 0.60 |
| CaV β 2-N1 + CaV β 2-N4 | 27 | -8.04 \pm 0.84 | 0.17 \pm 0.02 | 60.22 \pm 1.44 | -15.51 \pm 1.02 | 9.55 \pm 0.56 |
| CaV β 2a(N1 + N4) | 26 | -5.54 \pm 0.4 | 0.12 \pm 0.01 | 60.18 \pm 2.12 | -14.86 \pm 0.89 | 11.08 \pm 0.55 |
| N1 vs. (N1+N4) | | p<0.05; | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| N4 vs. (N1+N4) | | p<0.01; | n.s. | n.s. | p < 0.01 | n.s. |
| N1 vs. N1 + N4 | | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| N4 vs. N1 + N4 | | n.s. | n.s. | n.s. | p < 0.01 | n.s. |
| N1 + N4 vs. (N1 + N4) | | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |

Tabelle 23: Vergleich der Ca²⁺-Strom-Eigenschaften des CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins im Vergleich zu CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4 sowie CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4

In weiteren Experimenten wurden jeweils für Zellen, die CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4 zusammen mit CaV α _{1.2} exprimieren sowie für Zellen, die CaV β 2a(N1+N4) zusammen mit CaV α _{1.2} exprimieren, Ca²⁺-Ströme im Hinblick auf die Steady-State Aktivierung, Steady-State Inaktivierung sowie Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik untersucht. Die Ergebnisse wurden verglichen mit den Ergebnissen der Ströme, die nach Expression von CaV β 2a-N1 und CaV α _{1.2} bzw. von CaV β 2a-N4 und CaV α _{1.2} erhalten wurden und die in Abbildung 54 bis 56 und Tabelle 35 bis 38 im Anhang 1 am Ende des Ergebnisteils dargestellt sind. Es zeigte sich, dass sich die Ströme, die nach Expression von CaV α _{1.2} und dem CaV β 2a(N1+ N4)-Fusionskonstrukt gemessen wurden, sich hinsichtlich ihrer Steady-State Aktivierung und Inaktivierung sehr ähnlich zu Strömen verhielten, die nach Koexpression von CaV α _{1.2} und den beiden CaV β 2a-Varianten CaV β 2a-N1 und -N4 gemessen wurden. Ströme unter beiden genannten Bedingungen waren wiederum ähnlicher zu Strömen, die nach Expression von CaV α _{1.2} und CaV β 2a-N1 gemessen wurden, wohingegen Ströme, die in Gegenwart von CaV α _{1.2} und CaV β 2a-N4 gemessen wurden, signifikante Unterschiede aufweisen, z.B. $V_{1/2}$ Steady-State Aktivierung: CaV β 2a-N4: -21.96 \pm 0.75, n = 26; CaV β 2a(N1 + N4): -18.74 \pm 0.56, n = 26; p < 0.01 (siehe Abbildung 55 und Tabelle 36 im Anhang 1). Auch hinsichtlich der Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik verhalten sich CaV β 2a(N1+N4)-Ströme eher wie CaV β 2a-N1-Ströme; die Inaktivierung ist bei CaV β 2a-(N1+N4)- sowie CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4-Strömen am geringsten ausgeprägt. Die Aktivierungskonstante τ ist für CaV β 2a-(N1+N4) sowie für CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4 -Ströme größer; dies bedeutet, dass die CaV β 2a-(N1+N4)-Ströme und die CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4-Ströme langsamer aktivieren

und insgesamt in geringerem Ausmaß inaktivieren, insbesondere im Vergleich zu CaV β 2a-N4-Strömen.

Teil 2

4.2 Klonierung der CaV α _{1.2}-Untereinheit

Für die in 4.1.4 beschriebenen elektrophysiologischen Untersuchungen und folgende Fluoreszenzexperimente wurde zusätzlich zu den CaV β 2-Untereinheiten die Kanalpore-bildende CaV α _{1.2}-Untereinheit benötigt. Diese wurde hierfür, wie im Weiteren beschrieben, aus Mausherz-mRNS adulter Mäuse kloniert.

Die CaV α _{1.2}-Untereinheit wird in hohem Maße im Herzmuskel exprimiert (104, 22) und bildet den Großteil der L-Typ- Ca²⁺-Kanal-assoziierten CaV α ₁-Untereinheiten in Säugerherz und -gefäßmuskulatur (144). Obwohl ein und dasselbe Gen für die CaV α ₁-Untereinheiten dieser zwei klinisch wichtigen Gewebe kodiert, differieren die Eigenschaften des kardialen L-Typ Kanals von dem in glatter Muskulatur exprimierten (5). Eine wichtige Rolle spielt dabei unter anderem der Aminoterminus der CaV α _{1.2}-Untereinheit, die vielfältigen Spleißvorgängen unterworfen ist. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass eine Variante mit langem N-Terminus (CaV α _{1.2a}) vor einer anderen kurzen N-terminalen Variante (CaV α _{1.2b}) der CaV α _{1.2}-Untereinheit in kardialem Gewebe dominiert (104, 14). *Kanevsky et al.* (78) konnten nachweisen, dass dieser lange N-Terminus ein N-Terminus-inhibitory (NTI)-Modul enthält, welches den CaV β -induzierten Anstieg des Ca²⁺-Stroms beeinflusst. Zu Beginn dieser Arbeit war kein vollständiger CaV α _{1.2} cDNS-Klon von Maus - auch von anderen Arbeitsgruppen im In- und Ausland - verfügbar. Die Sequenzen in der Datenbank waren virtuell aus EST-Klonen und publizierten Teilsequenzen zusammengesetzt. Die zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit einzige beschriebene CaV1.2 cDNS aus Mausgewebe wurde 1992 von der Arbeitsgruppe *Uhler* (93) beschrieben. Die Gesamtlängen-cDNS war aus Teilklonen einer ZNS-cDNS-Bibliothek zusammengesetzt. Auf Anfrage teilte Herr Uhler mit, dass die cDNS nicht mehr existieren würde. Sowohl CaV α _{1.2a} als auch CaV α _{1.2b} wurden deshalb in dieser Arbeit mit Erststrang-DNS, die mit Poly(A)⁺RNS von Mausherz synthetisiert wurde, amplifiziert und kloniert. Für die Untersuchungen in 4.1.4 und 4.3 wurde allerdings nur CaV α _{1.2a} verwendet, da diese die dominierende Variante in Herzmuskelzellen darstellt (144) und somit zu den durch native Kanäle vermittelten Ca²⁺-Strömen vergleichbare Ca²⁺-Strom-Eigenschaften

aufweisen sollte. Auch an anderen Stellen des $\text{CaV}\alpha_11.2\text{a}$ -Proteins finden Modifikationen durch alternative Spleißvorgänge statt (90). Bisher gibt es allerdings kein eindeutiges Schema, welches Spleißmuster in Kardiomyozyten bevorzugt exprimiert wird (148, 90, 147, 41).

Unabhängig davon wurden im Folgenden die durch PCR-Amplifikation erhaltenen Klone sequenziert und auf Sequenzunterschiede bzw. alternative Spleißvorgänge analysiert. Im Mittelpunkt des Interesses stand die Frage nach einer herzspezifischen Exonkonfiguration der $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit. Bei der Untersuchung auf herzspezifische Spleißmuster wurden auch Klone berücksichtigt, die den $\text{CaV}\alpha_11.2\text{b}$ -Terminus enthielten, der ebenfalls in kardialem Gewebe exprimiert wird, aber, wie bereits erwähnt, dort zahlenmäßig eine untergeordnete Rolle spielt (148).

4.2.1 Klonierungsstrategie

Die N- und C-terminalen Sequenzen von Maus- $\text{CaV}\alpha_11.2\text{a}$ bzw. - $\text{CaV}\alpha_11.2\text{b}$ sind in einer Veröffentlichung von *Murakami et al.* beschrieben (107), auf Basis derer die Ableitung spezifischer Primer für die verschiedenen N-Termini erfolgte. Ziel war es, Vollängen-cDNS-Klone der $\text{CaV}\alpha_11.2\text{a}$ bzw. -b durch PCR-Amplifikation zu erhalten, um so cDNS mit der nativen Exonfolge zu gewinnen. Da die $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit ein großes Protein mit einer sehr langen Nukleotidsequenz von etwa 6400 bp darstellt, wurden in manchen Publikationen jeweils bestimmte Sequenzabschnitte der $\text{CaV}1.2\alpha_1$ -Untereinheit getrennt amplifiziert und mögliche Kombinationen von Exons dargestellt. Ob alle denkbaren Kombinationen, die man durch Zusammenfügen von Teilfragmenten erhält, wirklich in vivo exprimiert werden, ist unklar. Deshalb wurden in dieser Forschungsarbeit Vollängen-cDNS-Klone der $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit mit einem Gen-spezifischem Primer (GSP) amplifiziert, um aus Erststrang, der mit Poly(A)⁺RNS aus Mausherz synthetisiert wurde, authentische cDNS-Vollängenklone zu erhalten.

Zur Erststrangsynthese mit einem Gen-spezifischem Primer komplementär zur 3'-untranslatierten Region von $\text{CaV}\alpha_11.2$ wurde mRNA aus Herzgewebe adulter Mäuse verwendet. Die Länge der zu amplifizierenden Nukleotidsequenz stellte hohe Anforderungen an die für die PCR benötigte hitzestabile Polymerase in Bezug auf möglichst geringe Fehlerrate, hohe Prozessivität und lange Halbwertszeit bei hohen Temperaturen. In dieser Arbeit wurde hierfür die PhusionTM-DNA Polymerase (siehe 3.1.7.3.2), aufgrund ihrer besonderen Eignung hinsichtlich oben genannter Anforderungen verwendet. Durch Heißstart und kontinuierliche Verlängerung der Elongationszeit um fünf Sekunden pro Zyklus bei insgesamt 40 Zyklen

konnte, wie in Abbildung 41 zu erkennen, eine ausreichende Menge DNS > 6000 bp amplifiziert werden.

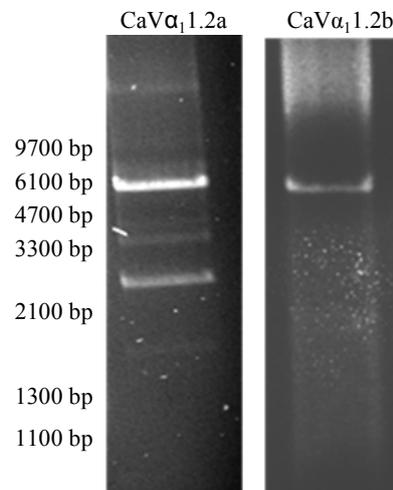


Abbildung 41: Ergebnis der Erststrang-PCR für CaV α _{1.2b} bzw. -a (0,8% Agarose-Gel)

Für das Vollängenamplifikat wurde eine Größe von ca. 6400 bp erwartet. In Abbildung 41 ist jeweils eine deutliche Bande in der analytischen Gelelektrophorese sichtbar. Weitere vorhandene Banden konnten durch die Auftrennung in einem 0,8% Agarosegel von den gewünschten Banden ausreichend separiert werden. Die DNS-Fragmente wurden aus dem Gel isoliert, in den pCAGGS_M2-Vektor kloniert und anschließend doppelsträngig sequenziert.

4.2.2 Ergebnisse der CaV α _{1.2}-Amplifikation aus Erststrang

Die erhaltenen cDNS kodieren die CaV α _{1.2a}- und CaV α _{1.2b}-Proteine. Jeweils drei Klone wurden vollständig sequenziert und hinsichtlich ihrer Exonfolge und möglicher Sequenzfehler durch die DNS-Polymerase während der PCR-Amplifikation untersucht. Es fanden sich beim Vergleich der entsprechenden genomischen Sequenzabschnitte (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=12288) mit den Sequenzen der erhaltenen Klone keine Hinweise auf durch die Polymerase verursachte Basenaustausche. Das Gen für CaV1.2 von Maus umfasst ~ 753700 kb und liegt auf Chromosom 6 (GenBank NT_039353.7). Die Exonfolgen der untersuchten Klone waren untereinander in keinem Fall identisch (siehe Tabelle 25 und Tabelle 29) und zeigen den auf Spleißvorgänge zurückzuführenden Polymorphismus der CaV α _{1.2a}-Untereinheit auf.

4.2.2.1 Definition der Exons der CaV α_1 1.2-Untereinheit

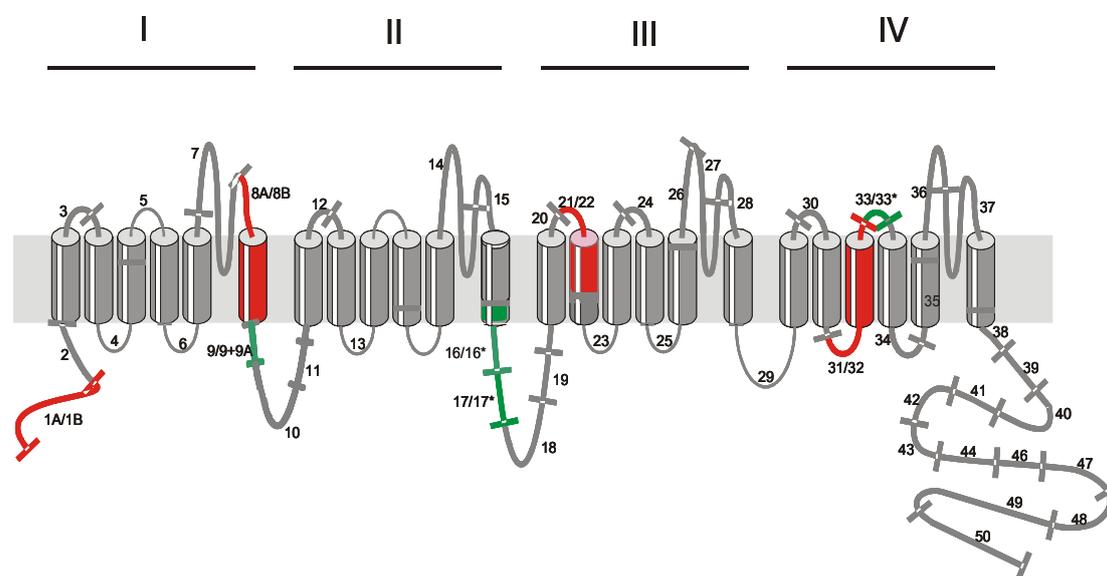
Die Definition der Exons der CaV α_1 1.2-Untereinheit erfolgte nach *Soldatov et al.* (140), dessen Nomenklatur der Exons des menschlichen L-Typ Ca²⁺-Kanals als Referenz in aktuellen Publikationen zu diesem Thema dient.

| | | | |
|-----------------|----------------|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Exon 1A | MIRAF....YISPG | Exon 1B | MVNEN....EENHQ |
| Exon 2 | GSNYG....IVEWK | Exon 3 | PFEII....TNSNL (S oder P); in dieser Arbeit sequenzierte Klone enthalten den Prolinrest (P) P: NM_009781.2; S: NW_001030811.1, Mm6_1111831_36; NT_039353.7, Mm6_39393_37 |
| Exon 4 | ERVEY....IVVVG | Exon 5 | LFSAI....VSGVP |
| Exon 6 | SLQVV....QEGII | Exon 7 | DVPAE....DVLYW |
| Exon 8A | MQDAM....GVLSG | Exon 8B | VNDAV....GVLSG |
| Exon 9 | EFSKE....DKPRN | Exon 9A | RGAPA....STETH |
| Exon 10 | MSMPT....CGARL | Exon 11 | AHRISKSKFS (das erste Nukleotid des für den Alaninrest kodierenden Triplets stammt von Exon 10) |
| Exon 12 | RYWRR....LTEVQ | Exon 13 | DTANK....FKITR |
| Exon 14 | YWNLS....LTVFQ | Exon 15 | ILTGE....FICGN |
| Exon 16 | YILLN....KKLAR | Exon 16* | YTTRY....GQPG* |
| Exon 17 | TASPE....PPTTK | Exon 17* | PARTA....PPTTK |
| Exon 18 | INMDD....NPDTA | Exon 19 | GEEDE....SPNNR |
| Exon 20 | FRLQC....SFRNH | Exon 21 | ILFYF....EIALK |
| Exon 22 | ILGNA....EILK | Exon 23 | MTAYG....SFGIQ |
| Exon 24 | SSAIN....AKGLK | Exon 25 | HVVQC....VQLFK |
| Exon 26 | GKLYT....EAECK | Exon 27 | GNYIT....EGWPE |
| Exon 28 | LLYRS....LDKNQ | Exon 29 | RQCVE....CLAMQ |
| Exon 30 | HYGQS....AFKPK | Exon 31 | GYFSD....LSETN |
| Exon 32 | HYFCD....ITEVH | Exon 33 | PAEHTQCSPSM |
| Exon 33* | PAEHT....VSCAR | Exon 34 | SAEEN....IKSFQ |
| Exon 35 | ALPYV....VIGMQ | Exon 36 | VFGKI....LLLFR |
| Exon 37 | CATGE....LCAFL | Exon 38 | IINLF....DPEAK (E oder K) Alle hier analysierten Klone enthalten den Glutamatrester E |
| Exon 39 | GRIKH....RVACK | Exon 40 | RLSVM....RIKTE |
| Exon 41 | GNLEQ....VPPAG | Exon 42 | DDEVT....ALSLQ |
| Exon 43 | AGLRT....DDIFR | Exon 44 | RAGGL....LSSKR |
| Exon 46 | CHSRE....LSTDM | Exon 47 | FSYQE....RSASL |
| Exon 48 | GRRAS....LVHHQ | Exon 49 | ALAV....SLVEA |
| Exon 50 | VLISE....VSNL# | | |

Tabelle 24: Definition der Exons der CaV α_1 1.2-Untereinheit in Maus nach *Soldatov et al.* (140)

Die Expression von Exon 45 ist für den menschlichen L-Typ Ca²⁺-Kanal von *Soldatov et al.* beschrieben, in den Untersuchungen dieser Arbeit zeigte sich jedoch keine Expression des

Exons in Maus und fehlt deshalb in Tabelle 24. Mit einem Stern sind Exons markiert, die auf unterschiedliche Weise gespleißt werden, d.h. in ihrer DNS- bzw. Aminosäuresequenz hinsichtlich der Länge variieren. Der Buchstabe A bzw. B hinter der Zahl des Exons bedeutet, dass es sich hierbei um ein alternativ gespleißtes Exon handelt. Sind von einem Exon die Varianten A und B vorhanden, ist hier mindestens eine der beiden in der $CaV\alpha_1.2$ -mRNS erhalten, während dies in anderen Arbeiten, in denen die Sequenz von Mensch beschrieben ist, nicht zwingend der Fall ist (147). Exon 9* bzw. 9A ist ein eigenständiges Exon und nicht etwa eine Verlängerung des Exon 9, wie durch die Kennzeichnung als 9* in der Literatur impliziert wird. Es kodiert nicht wie Exon 1A und 1B oder Exon 8A und 8B alternativ, sondern zusätzlich zu Exon 9 und sollte deshalb mit einer eigenen Zahl - eigentlich Exon 10 - in der Nummerierung erscheinen. Um jedoch im Konsens mit der Nomenklatur von *Soldatov et al.* (140) und der weiteren Veröffentlichungen zu bleiben, wird dieses Exon hier als Exon 9A bezeichnet. Der „*“ bei *Soldatov et al.* wurde durch ein „A“ ersetzt, da ein „*“ in der Nomenklatur dieser Arbeit anzeigt, dass es sich um ein und dasselbe auf unterschiedliche Weise gespleißte Exon handelt, wohingegen mit A bzw. B betitelte Exons jeweils eigene Exon-Intron-Grenzen besitzen, wie das bei Exon 9A der Fall ist.



rot = alternativ gespleißtes Exon; grün = unterschiedliche Spleißvorgänge an ein und demselben Exon

Abbildung 42: Transmembrantopologie von $CaV1.2$ von Maus mit Darstellung der Exons der Maus- $CaV\alpha_1.2$ -Untereinheit und der angegebenen Spleißorte

Abbildung 42 zeigt, dass im Rahmen dieser Arbeit mindestens 13 Exons der $CaV\alpha_1.2$ -Untereinheit von Maus Spleißvorgängen ausgesetzt sind: drei davon sind unterschiedlichen

Spleißvorgängen ausgesetzte Exons, wodurch ihre AS-Sequenz-Länge variiert (Exons 16, 16*, 17, 17*, 33, 33*); acht sind alternativ gespleißte Exons, d.h., dass in der Sequenz nur das eine oder das andere Exon auftritt (1A/1B, 8A/8B, 21/22, 31/32); Exon 9A und Exon 33 bzw. 33* können auch ganz fehlen.

4.2.2.2 Vergleich der erhaltenen CaV α_1 1.2-cDNS-Klone

Das in Tabelle 24 beschriebene Exon 16* wurde ausschließlich aus einem Klon der cDNS-Bibliothek isoliert und wird gesondert in Kapitel 5.2.3 besprochen. Alle in Tabelle 25 aufgelisteten Klone enthalten Exon 16.

Es wurden jeweils drei Vollmächtigklone der CaV α_1 1.2a- bzw. CaV α_1 1.2b-Spleißvariante komplett sequenziert und ausgewertet. Dabei ergaben sich einige Unterschiede hinsichtlich der Nukleotidsequenz, die in Tabelle 25 dargestellt sind.

| | 1A / 1B | 8A / 8B | 9 / 9+ 9A | 17 / 17* | 21 / 22 | 31 / 32 | 33 / 33* |
|-----------------------------|---------|---------|--------------|----------|---------|---------|----------|
| CaV α_1 1.2a-Klon 2 | 1A | 8A | 9 | 17 | 21 | 32 | 33 |
| CaV α_1 1.2a-Klon 7 | 1A | 8A | 9 + 9A | 17 | 21 | 31 | 33 |
| CaV α_1 1.2a-Klon 15 | 1A | 8A | 9 | 17 | 21 | 31 | 33 |
| CaV α_1 1.2b-Klon 4 | 1B | 8B | 9 + 9A | 17 | 21 | 31 | - |
| CaV α_1 1.2b-Klon 26 | 1B | 8B | 9 + 9A | 17* | 21 | 31 | - |
| CaV α_1 1.2b-Klon 29 | 1B | 8B | 9 + 9A | 17 | 22 | 32 | 33* |

Tabelle 25: Vergleich der erhaltenen CaV α_1 1.2 Klone hinsichtlich differierender Exons

Unterschiede im N-Terminus (Exon 1A bzw. 1B) ergaben sich aufgrund der Auswahl der jeweils Aminoterminus-spezifischen Sequenz der Forward-Primer und waren somit vorgegeben.

Es fanden sich weitere Unterschiede:

- im Bereich des Segments IS5; hier zeigt sich ein alternatives Spleißen der Exons 8A bzw. 8B abhängig vom Aminoterminus des Klons; auf den CaV α_1 1.2a-Terminus folgt stets Exon 8A, auf den CaV α_1 1.2b-Terminus Exon 8B;
- in der L1-Schleife zwischen IS6 und IIS1; bei allen CaV α_1 1.2b-Klonen findet sich zusätzlich das Exon 9A, hingegen ist es bei den CaV α_1 1.2a-Klonen nur einmal vorhanden
- in der L2-Schleife zwischen IIS6 und IIIS1; bei einem der CaV α_1 1.2b-Klone ist das Exon 17 um neun Nukleotide verlängert (Exon 17*); alle anderen CaV α_1 1.2a- und CaV α_1 1.2b-Klone kodieren für Exon 17

- im Übergang von IIS1 zu IIS2 und IIS2 selbst; einer der $\text{CaV}\alpha_11.2\text{b}$ -Klone kodiert für Exon 22; alle anderen Klone von $\text{CaV}\alpha_11.2\text{a}$ - und $\text{CaV}\alpha_11.2\text{b}$ tragen die Sequenz von Exon 21;
- im Bereich des Übergangs von IVS2 zu IVS3 und IVS3 selbst; bei jeweils einem Klon der $\text{CaV}\alpha_11.2\text{a}$ - bzw. $\text{CaV}\alpha_11.2\text{b}$ -Klone findet sich Exon 32, alle anderen zeigen Exon 31
- im Übergang von IVS3 zu IVS4; alle $\text{CaV}\alpha_11.2\text{a}$ -Klone kodieren für Exon 33, wohingegen bei zwei der $\text{CaV}\alpha_11.2\text{b}$ -Klone Exon 33 völlig fehlt und bei dem dritten Exon 33 um 171 Nukleotide (57 AS) verlängert ist (Exon 33*).

Aus den Ergebnissen bestätigt sich ein gekoppeltes Auftreten der Exons 1A und 8A bzw. 1B und 8B. Zudem zeigt sich eine vorwiegende Expression der alternativ gespeißtes Exons 21 bzw. 31 in Herzgewebe. In Kombination mit dem $\text{CaV}\alpha_11.2\text{b}$ -N-Terminus scheint Exon 9A gehäuft aufzutreten, während die Expression von Exon 33 mit der Expression des $\text{CaV}\alpha_11.2\text{a}$ -N-Terminus korreliert.

Tabelle 26 verdeutlicht nochmals die Variabilität von Exon 17/17* und 33/33* durch unterschiedliche Spleißvorgänge. Für die Exons 17* und 33* ergibt sich jeweils eine Verlängerung der ursprünglichen Aminosäuresequenz um drei bzw. 57 Aminosäuren. Im Fall von Exon 17* bzw. 33* resultiert daraus keine Verschiebung des Leserahmens.

| Exon | AS-Sequenz | Unterschied zum „herkömmlichen“ Exon |
|------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| 17* | PARTASPE...PPTTK | Hier ist das Exon zu Anfang um neun Nukleotide verlängert, der Leserahmen bleibt erhalten. |
| 33* | PAEHTQCSPSMVRTTLQTTFPASVAPPLATHVLS TLISRALGTQPSSCMWPPCPLCALTACAHVSCAR | Das Exon 33 ist am Ende um 57 Aminosäuren verlängert. |

Tabelle 26: AS-Sequenzen der Exons 17* und 33*; die Unterschiede zu den Exons 17 und 33 sind rot markiert.

In Tabelle 27 sind die Spleißorte/Exons mit ihren potentiellen Funktionen aufgelistet - inwiefern sich die Spleißvorgänge auf Eigenschaften und Funktion der $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit auswirken, wird in 5.5.1 und 5.5.2 näher erörtert.

| Gespleißtes Exon | Lokalisation | Funktion |
|------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1A / 1B | N-Terminus | Exon 1A mit „NT inhibitory (NTI) module“; unterschiedliche Regulierung des $P_{0,max}$ durch die CaV β -UE (78) |
| 8A / 8B | IS5 | Interaktion mit Dihydropyridinen; Exon 8B > 8A (164) |
| 9 / 9 + 9A | L1-Schleife | AID innerhalb Exon 9 lokalisiert (39); Exon 9A liegt 3' der AID; wichtig für Inaktivierungseigenschaften des Kanals (142) |
| 17 / 17* | L2-Schleife | CaV2.2 (N-Typ): Einfluss auf die spannungsabhängige Inaktivierung, pharmakologische Eigenschaften und Syntaxin-Bindung (77); für CaV1.2 noch Gegenstand der Forschung |
| 21 / 22 | Übergang IIS1 zu IIS2 und IIS2 selbst | Einfluss auf die spannungsabhängige Wirkung der Dihydropyridine (141) (Exon 22 >21) |
| 31 / 32 | Übergang IVS2 zu IVS3 und IVS3 selbst | Einfluss auf die spannungsabhängige Aktivierung des Kanals (147); Änderung des Expressionsmusters während der Entwicklung (fetales Rattenherz: Exon 31, 32 gleichermaßen exprimiert; adultes Rattenherz: Exon 32 dominiert) bzw. unter pathophysiologischen Bedingungen (54); Yang <i>et al.</i> (170): Exon 31 in menschlichem adulten Myokard vorherrschend, bei Herzinsuffizienz ist Exon 32 zweimal häufiger |
| 33 / 33* | Übergang IVS3 zu IVS4 | Einfluss auf die spannungsabhängige Aktivierung des Kanals (147) - zunehmende Länge des Verbindungsstücks geht einher mit Rechtsverschiebung der Aktivierungskurve; allerdings sehen Soldatov <i>et al.</i> (141) hier keinen Unterschied. |

Tabelle 27: Funktionen der jeweiligen Exon-Spleißorte

Man erkennt aus Tabelle 28, dass die CaV α_1 1.2-Untereinheit in diversen Geweben zahlreichen Spleißvorgängen unterworfen ist. Es zeigt sich jedoch kein eindeutiges gewebe- oder entwicklungspezifisches Spleißmuster. Teilweise sind die publizierten Ergebnisse widersprüchlich und stimmen mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht überein, so beispielsweise die Expressionshäufigkeit des Exon 31 / 32 in fetalem bzw. adultem Herzgewebe (147, 170). Ein Grund dafür ist sicher die verwendete Spezies (Maus, Ratte, Kaninchen oder Mensch), ein anderer, dass in der Regel - anders als in dieser Arbeit beschrieben - keine Vollängentranskripte/cDNS amplifiziert wurden, sondern lediglich DNS-Teilfragmente.

| Gespleißtes Exon | Lokalisation | Kloniert aus (Auswahl) | Volllängen-cDNS |
|------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| 1A / 1B | N-Terminus | Mausherz adult / neonatal (1A und 1B) (diese Arbeit) Menschliches Herz adult / fetal (1A und 1B) (147) Menschliches Hirn adult / fetal (1B) (147) | Ja / Nein Nein Nein |
| 8A / 8B | IS5 | Mausherz adult (8A und 8B) / neonatal (8A) (diese Arbeit) Menschliches Herz adult / fetal (1A und 1B) (147) Menschliches Hirn adult / fetal (1A und 1B) (147) | Ja / Nein Nein Nein |
| 9A | L1-Schleife | Mausherz adult (RGAPA) (diese Arbeit) Glatte Muskulatur (Zelllinie A7R ₅ , Ratte) (10) --> beginnt RGTPA: T hier Phosphorylierungssubstrat für Proteinkinase A; in Maus durch A ersetzt (RGAPA); Kaninchenlunge (RGTPA) (8) Maushirn (RGAPA) (93) Menschliches adultes Herz (RGTPA) (147) | Ja Nein Nein Nein Nein |
| 17* | L2-Schleife | Mausherz adult/neonatal (diese Arbeit) 17* kloniert aus Rattenhirn durch <i>Snutch et al.</i> (139) und Maushirn (Ma et al. (93)) | Ja / Nein |
| 21 / 22 | Übergang IIIS1 zu IIIS2 und IIIS2 selbst | Mausherz adult (21 und 22) / neonatal (22) (diese Arbeit) Menschliches Herz adult (21 und 22) / fetal (21) (147) Menschliches Hirn adult (22) / fetal (21 und 22) (147) | Ja / Nein Nein Nein |
| 31 / 32 | Übergang IVS2 zu IVS3 und IVS3 selbst | Mausherz adult (31 und 32) / neonatal (32) (diese Arbeit) Menschliches Herz adult / fetal (31 und 32) (147) Menschliches Hirn adult / fetal (31 und 32) (147) | Ja / Nein Nein Nein |
| 33 / 33* | Übergang IVS3 zu IVS4 | 33* bisher in Literatur nicht beschrieben Mausherz adult / neonatal (33 und 33*) (diese Arbeit) | Ja / Nein |

Tabelle 28: Übersicht über „Fundorte“ der Spleißvarianten in verschiedenen Spezies

Die Auswertung der in dieser Arbeit beschriebenen cDNS-Bibliotheken sowie Literaturrecherche lässt vermuten, dass die meisten Spleißvarianten in mehreren Geweben gewebe- und entwicklungsspezifisch in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert werden. Im Folgenden (Tabelle 29) ist die Exonfolge der in dieser Arbeit aus Herz von Maus klonierten CaV α_1 1.2 cDNS

nocheinmal zusammengefasst. Im Vergleich dazu die Exonfolge der in GenBank hinterlegten $CaV\alpha_1.2$ cDNS-Sequenzen (GenBank AY728090, BC138031, NM_009781, AB259049) von Maus, die jeweils aus cDNS-Fragmenten zusammengesetzt wurden (Tabelle 30).

| | Abfolge der Exons |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CaV1.2a Klon 2 | 1A - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8A - 9 - 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18 - 19 - 20 - 21 - 23 - 24 - 25 - 26 - 27 - 28 - 29 - 30 - 32 - 33 - 34 - 35 - 36 - 37 - 38 - 39 - 40 - 41 - 42 - 43 - 44 - 46 - 47 - 48 - 49 - 50 |
| CaV1.2a Klon 7 | 1A - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8A - 9 - 9A - 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18 - 19 - 20 - 21 - 23 - 24 - 25 - 26 - 27 - 28 - 29 - 30 - 31 - 33 - 34 - 35 - 36 - 37 - 38 - 39 - 40 - 41 - 42 - 43 - 44 - 46 - 47 - 48 - 49 - 50 |
| CaV1.2a Klon 15 | 1A - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8A - 9 - 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18 - 19 - 20 - 21 - 23 - 24 - 25 - 26 - 27 - 28 - 29 - 30 - 31 - 33 - 34 - 35 - 36 - 37 - 38 - 39 - 40 - 41 - 42 - 43 - 44 - 46 - 47 - 48 - 49 - 50 |
| CaV1.2b Klon 4 | 1B - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8B - 9 - 9A - 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18 - 19 - 20 - 21 - 23 - 24 - 25 - 26 - 27 - 28 - 29 - 30 - 31 - 34 - 35 - 36 - 37 - 38 - 39 - 40 - 41 - 42 - 43 - 44 - 46 - 47 - 48 - 49 - 50 |
| CaV1.2b Klon 26 | 1B - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8B - 9 - 9A - 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16 - 17* - 18 - 19 - 20 - 21 - 23 - 24 - 25 - 26 - 27 - 28 - 29 - 30 - 31 - 34 - 35 - 36 - 37 - 38 - 39 - 40 - 41 - 42 - 43 - 44 - 46 - 47 - 48 - 49 - 50 |
| CaV1.2b Klon 29 | 1B - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8B - 9 - 9A - 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18 - 19 - 20 - 22 - 23 - 24 - 25 - 26 - 27 - 28 - 29 - 30 - 32 - 33* - 34 - 35 - 36 - 37 - 38 - 39 - 40 - 41 - 42 - 43 - 44 - 46 - 47 - 48 - 49 - 50 |

Tabelle 29: Komplette Exonfolge der mittels Erststrangamplifikation erhaltenen Klone (in Ergänzung zu Tabelle 25)

Man erkennt aus Tabelle 30, dass je zwei Klone den durch Exon 1A ($CaV\alpha_1.2a$) bzw. 1B ($CaV\alpha_1.2b$) kodierten N-Terminus enthalten; allerdings besitzen alle Klone Exon 8A - also auch die Klone, die Exon 1B enthalten -, welches nach den Ergebnissen dieser Arbeit mit Exon 1A gekoppelt ist, während Exon 1B mit Exon 8B korreliert. Zieht man bei der Beurteilung den Gewebetyp mit ein, dem der Klon entstammt, zeigt sich die typische vorwiegende Expression des Exon 1A in Herzgewebe, während Exon 1B in Hirngewebe dominiert. Keiner der Klone besitzt das Exon 9*, Exon 17* oder 33*. In allen Klonen ist Exon 22 - und nicht Exon 21 - sowie Exon 33 enthalten. Die $CaV\alpha_1.2$ -Klone beinhalten Exon 31 und nicht Exon 32, während die $CaV\alpha_1.2b$ -Klone Exon 32 und nicht Exon 31 besitzen.

| | Abfolge der Exons |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AY728090: Mus musculus neuronal CaV1.2 (Gewebetyp : Hirn) | 1B - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8A - 9 - 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18 - 19 - 20 - 22 - 23 - 24 - 25 - 26 - 27 - 28 - 29 - 30 - 32 - 33 - 34 - 35 - 36 - 37 - 38 - 39 - 40 - 41 - 42 - 43 - 44 - 46 - 47 - 48 - 49 - 50 |
| BC138031: Mus musculus calcium channel (Gewebetyp: Hirn) | 1B - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8A - 9 - 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18 - 19 - 20 - 22 - 23 - 24 - 25 - 26 - 27 - 28 - 29 - 30 - 32 - 33 - 34 - 35 - 36 - 37 - 38 - 39 - 40 - 41 - 42 - 43 - 44 - 46 - 47 - 48 - 49 - 50 |
| NM_009781: Mus musculus calcium channel (Gewebetyp nicht näher genannt) | 1A - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8A - 9 - 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18 - 19 - 20 - 22 - 23 - 24 - 25 - 26 - 27 - 28 - 29 - 30 - 31 - 33 - 34 - 35 - 36 - 37 - 38 - 39 - 40 - 41 - 42 - 43 - 44 - 46 - 47 - 48 - 49 - 50 |
| AB259049: Mus musculus CaV1.2-a (Gewebetyp : Herz) | 1A - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8A - 9 - 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18 - 19 - 20 - 22 - 23 - 24 - 25 - 26 - 27 - 28 - 29 - 30 - 31 - 33 - 34 - 35 - 36 - 37 - 38 - 39 - 40 - 41 - 42 - 43 - 44 - 46 - 47 - 48 - 49 - 50 |

Tabelle 30: publizierte Exonfolge der aus DNS-Teilfragmenten zusammengesetzten $CaV\alpha_11.2$ -Untereinheiten

Zusammenfassend wurde die Exonfolge der zusammengeführten Klone in keinem der mittels Erststrangamplifikation erhaltenen Klone wiedergefunden. So zeigen die Klone AY728090 und BC138031 eine Kombination von Exon 1B und Exon 8A, während die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Exon 1B stets mit Exon 8B gekoppelt auftritt. Die Klone NM_009781 und AB259049 gleichen weitgehend $CaV\alpha_11.2a$ -Klon 15, jedoch enthält dieser - wie alle in dieser Arbeit analysierten $CaV\alpha_11.2a$ -Klone - Exon 21 und nicht Exon 22. Da insgesamt nur sechs der mittels Erststrangamplifikation erhaltenen Klone durchsequenziert wurden, ist nicht auszuschließen, dass zumindest teilweise die durch Zusammenfügen von Teilfragmenten erhaltenen Exonfolgen auch physiologischerweise vorkommen. Zudem muss berücksichtigt werden, dass in dieser Arbeit die Identifikation einer herzspezifischen Exonfolge von Interesse war, während dies in den Arbeiten, für welche oben genannte Klone hergestellt wurden, nicht der Fall war und auch nicht ausschließlich Herzgewebe zur Gewinnung der für die Klonierung benötigten mRNS verwendet wurde.

Exon 1A / 1B

CaV1.2b-Klon26 ---MVNENTRMYVPEENHQ-----GSNYGSPRPAHANM 30
 CaV1.2b-Klon29 ---MVNENTRMYVPEENHQ-----GSNYGSPRPAHANM 30
 AY728090 ---MVNENTRMYVPEENHQ-----GSNYGSPRPAHANM 30
 CaV1.2a-Klon15 MIRAFVQPPSTPPYQPLSSHSSEETERKFKGKVVHEAQLNCFYISPGGSNYGSPRPAHANM 60
 AB259049 MIRAFVQPPSTPPYQPLSSHSSEETERKFKGKVVHEAQLNCFYISPGGSNYGSPRPAHANM 60
 :*: . * * * . * . * . * . *

CaV1.2b-Klon26 NANAAGLAP EHIPTPGAALSWQAIDAARQAKLMGSAGNATISTVSSTQRRKQQYGKPK 90
 CaV1.2b-Klon29 NANAAGLAP EHIPTPGAALSWQAIDAARQAKLMGSAGNATISTVSSTQRRKQQYGKPK 90
 AY728090 NANAAGLAP EHIPTPGAALSWQAIDAARQAKLMGSAGNATISTVSSTQRRKQQYGKPK 90
 CaV1.2a-Klon15 NANAAGLAP EHIPTPGAALSWQAIDAARQAKLMGSAGNATISTVSSTQRRKQQYGKPK 120
 AB259049 NANAAGLAP EHIPTPGAALSWQAIDAARQAKLMGSAGNATISTVSSTQRRKQQYGKPK 120

CaV1.2b-Klon26 KQGGTTATRPPRALLCLTLKNPIRRACISIVEWKPF EIIILLTIFANCVLAIYIPFPED 150
 CaV1.2b-Klon29 KQGGTTATRPPRALLCLTLKNPIRRACISIVEWKPF EIIILLTIFANCVLAIYIPFPED 150
 AY728090 KQGGTTATRPPRALLCLTLKNPIRRACISIVEWKPF EIIILLTIFANCVLAIYIPFPED 150
 CaV1.2a-Klon15 KQGGTTATRPPRALLCLTLKNPIRRACISIVEWKPF EIIILLTIFANCVLAIYIPFPED 180
 AB259049 KQGGTTATRPPRALLCLTLKNPIRRACISIVEWKPF EIIILLTIFANCVLAIYIPFPED 180

CaV1.2b-Klon26 DSNATNSNLERVEYLFLLIIFVVEAFKVIAYGLLHPNAYLRNGWNLDFIIVVVG L FSA 210
 CaV1.2b-Klon29 DSNATNSNLERVEYLFLLIIFVVEAFKVIAYGLLHPNAYLRNGWNLDFIIVVVG L FSA 210
 AY728090 DSNATNSNLERVEYLFLLIIFVVEAFKVIAYGLLHPNAYLRNGWNLDFIIVVVG L FSA 210
 CaV1.2a-Klon15 DSNATNSNLERVEYLFLLIIFVVEAFKVIAYGLLHPNAYLRNGWNLDFIIVVVG L FSA 240
 AB259049 DSNATNSNLERVEYLFLLIIFVVEAFKVIAYGLLHPNAYLRNGWNLDFIIVVVG L FSA 240

CaV1.2b-Klon26 ILEQATKADGANALGGKAGFDVKALRAFVRPLRPLRVSGVPSLQVVLNSI IKAMVPLLH 270
 CaV1.2b-Klon29 ILEQATKADGANALGGKAGFDVKALRAFVRPLRPLRVSGVPSLQVVLNSI IKAMVPLLH 270
 AY728090 ILEQATKADGANALGGKAGFDVKALRAFVRPLRPLRVSGVPSLQVVLNSI IKAMVPLLH 270
 CaV1.2a-Klon15 ILEQATKADGANALGGKAGFDVKALRAFVRPLRPLRVSGVPSLQVVLNSI IKAMVPLLH 300
 AB259049 ILEQATKADGANALGGKAGFDVKALRAFVRPLRPLRVSGVPSLQVVLNSI IKAMVPLLH 300

CaV1.2b-Klon26 IALLVLFVII IYAIIGLELFMGKMHKTCYNQEGIIDVPAEEDPSPCALETGHRQCQNGT 330
 CaV1.2b-Klon29 IALLVLFVII IYAIIGLELFMGKMHKTCYNQEGIIDVPAEEDPSPCALETGHRQCQNGT 330
 AY728090 IALLVLFVII IYAIIGLELFMGKMHKTCYNQEGIIDVPAEEDPSPCALETGHRQCQNGT 330
 CaV1.2a-Klon15 IALLVLFVII IYAIIGLELFMGKMHKTCYNQEGIIDVPAEEDPSPCALETGHRQCQNGT 360
 AB259049 IALLVLFVII IYAIIGLELFMGKMHKTCYNQEGIIDVPAEEDPSPCALETGHRQCQNGT 360

Exon 8A / 8B

CaV1.2b-Klon26 VCKPGWDGPKHGITNFDNFAPAMLTVFQCI TMEGWTDVLYWVNDVAVGRDWPVIYFVTLII 390
 CaV1.2b-Klon29 VCKPGWDGPKHGITNFDNFAPAMLTVFQCI TMEGWTDVLYWVNDVAVGRDWPVIYFVTLII 390
 AY728090 VCKPGWDGPKHGITNFDNFAPAMLTVFQCI TMEGWTDVLYWVNDVAVGRDWPVIYFVTLII 390
 CaV1.2a-Klon15 VCKPGWDGPKHGITNFDNFAPAMLTVFQCI TMEGWTDVLYWVNDVAVGRDWPVIYFVTLII 420
 AB259049 VCKPGWDGPKHGITNFDNFAPAMLTVFQCI TMEGWTDVLYWVNDVAVGRDWPVIYFVTLII 420
 *****: : * * * : * * : * * : * * : * *

CaV1.2b-Klon26 IGSFFVLNLVGLVSGEFSKEREKAKARGDFQKLRKQQL EEDLKG YLDWITQAEDIDPE 450
 CaV1.2b-Klon29 IGSFFVLNLVGLVSGEFSKEREKAKARGDFQKLRKQQL EEDLKG YLDWITQAEDIDPE 450
 AY728090 FGSFFVLNLVGLVSGEFSKEREKAKARGDFQKLRKQQL EEDLKG YLDWITQAEDIDPE 450
 CaV1.2a-Klon15 FGSFFVLNLVGLVSGEFSKEREKAKARGDFQKLRKQQL EEDLKG YLDWITQAEDIDPE 480
 AB259049 FGSFFVLNLVGLVSGEFSKEREKAKARGDFQKLRKQQL EEDLKG YLDWITQAEDIDPE 480
 :*****

Exon 9A

CaV1.2b-Klon26 NEDEGMDEDKPRNRGAPAGLHDQKKGKFAWF SHSTETHMSMPTSETESVNTENVAGGDIE 510
 CaV1.2b-Klon29 NEDEGMDEDKPRNRGAPAGLHDQKKGKFAWF SHSTETHMSMPTSETESVNTENVAGGDIE 510
 AY728090 NEDEGMDEDKPRN-----MSMPTSETESVNTENVAGGDIE 485
 CaV1.2a-Klon15 NEDEGMDEDKPRN-----MSMPTSETESVNTENVAGGDIE 515
 AB259049 NEDEGMDEDKPRN-----MSMPTSETESVNTENVAGGDIE 515

CaV1.2b-Klon26 GENCGARLAHRISKSKFSRYWRRWRF CRRK CRAAVKSNVFWLVI FLVFLNLT LTIA SEH 569
 CaV1.2b-Klon29 GENCGARLAHRISKSKFSRYWRRWRF CRRK CRAAVKSNVFWLVI FLVFLNLT LTIA SEH 569
 AY728090 GENCGARLAHRISKSKFSRYWRRWRF CRRK CRAAVKSNVFWLVI FLVFLNLT LTIA SEH 545
 CaV1.2a-Klon15 GENCGARLAHRISKSKFSRYWRRWRF CRRK CRAAVKSNVFWLVI FLVFLNLT LTIA SEH 574
 AB259049 GENCGARLAHRISKSKFSRYWRRWRF CRRK CRAAVKSNVFWLVI FLVFLNLT LTIA SEH 575

```
CaV1.2b-Klon26 YNQPHWLTEVQDTANKALLALFTAEMLLKMYSLGLQAYFVSLFNRFDCFIVCGGILETIL 629
CaV1.2b-Klon29 YNQPHWLTEVQDTANKALLALFTAEMLLKMYSLGLQAYFVSLFNRFDCFIVCGGILETIL 629
AY728090 YNQPHWLTEVQDTANKALLALFTAEMLLKMYSLGLQAYFVSLFNRFDCFIVCGGILETIL 605
CaV1.2a-Klon15 YNQPHWLTEVQDTANKALLALFTAEMLLKMYSLGLQAYFVSLFNRFDCFIVCGGILETIL 634
AB259049 YNQPHWLTEVQDTANKALLALFTAEMLLKMYSLGLQAYFVSLFNRFDCFIVCGGILETIL 635
*****

CaV1.2b-Klon26 VETKIMSPLGISVLRVRLLRIFKITYWNSLNLVASLLNSVRSIASLLLLLFLFIIIF 689
CaV1.2b-Klon29 VETKIMSPLGISVLRVRLLRIFKITYWNSLNLVASLLNSVRSIASLLLLLFLFIIIF 689
AY728090 VETKIMSPLGISVLRVRLLRIFKITYWNSLNLVASLLNSVRSIASLLLLLFLFIIIF 665
CaV1.2a-Klon15 VETKIMSPLGISVLRVRLLRIFKITYWNSLNLVASLLNSVRSIASLLLLLFLFIIIF 694
AB259049 VETKIMSPLGISVLRVRLLRIFKITYWNSLNLVASLLNSVRSIASLLLLLFLFIIIF 695
*****

CaV1.2b-Klon26 SLLGMQLFGGKFNFDQMTRRSTFDNFPQSLLTVFQILTGEDWNSVMYDGIIMAYGGPSFP 749
CaV1.2b-Klon29 SLLGMQLFGGKFNFDQMTRRSTFDNFPQSLLTVFQILTGEDWNSVMYDGIIMAYGGPSFP 749
AY728090 SLLGMQLFGGKFNFDQMTRRSTFDNFPQSLLTVFQILTGEDWNSVMYDGIIMAYGGPSFP 725
CaV1.2a-Klon15 SLLGMQLFGGKFNFDQMTRRSTFDNFPQSLLTVFQILTGEDWNSVMYDGIIMAYGGPSFP 754
AB259049 SLLGMQLFGGKFNFDQMTRRSTFDNFPQSLLTVFQILTGEDWNSVMYDGIIMAYGGPSFP 755
*****

Exon 17*
CaV1.2b-Klon26 GMLVCIYFIIILFCIGNYILLNVFLAIVDNLADAESLTSAQKEEEEEKERKKLARPARTA 809
CaV1.2b-Klon29 GMLVCIYFIIILFCIGNYILLNVFLAIVDNLADAESLTSAQKEEEEEKERKKLAR---TA 806
AY728090 GMLVCIYFIIILFCIGNYILLNVFLAIVDNLADAESLTSAQKEEEEEKERKKLAR---TA 782
CaV1.2a-Klon15 GMLVCIYFIIILFCIGNYILLNVFLAIVDNLADAESLTSAQKEEEEEKERKKLAR---TA 811
AB259049 GMLVCIYFIIILFCIGNYILLNVFLAIVDNLADAESLTSAQKEEEEEKERKKLAR---TA 812
*****

CaV1.2b-Klon26 SPEKKQEVMEKPAVEESKEEKIELKSIADGESPTTKINMDDLQPSNEDKSPHSNPDT 869
CaV1.2b-Klon29 SPEKKQEVMEKPAVEESKEEKIELKSIADGESPTTKINMDDLQPSNEDKSPHSNPDT 866
AY728090 SPEKKQEVMEKPAVEESKEEKIELKSIADGESPTTKINMDDLQPSNEDKSPHSNPDT 842
CaV1.2a-Klon15 SPEKKQEVMEKPAVEESKEEKIELKSIADGESPTTKINMDDLQPSNEDKSPHSNPDT 871
AB259049 SPEKKQEVMEKPAVEESKEEKIELKSIADGESPTTKINMDDLQPSNEDKSPHSNPDT 872
*****

CaV1.2b-Klon26 AGEDEEEPEMPVGPRPRPLSELHLKEKAVMPPEASAFFIFSPNNRFRLQCHRIVNDTIF 929
CaV1.2b-Klon29 AGEDEEEPEMPVGPRPRPLSELHLKEKAVMPPEASAFFIFSPNNRFRLQCHRIVNDTIF 926
AY728090 AGEDEEEPEMPVGPRPRPLSELHLKEKAVMPPEASAFFIFSPNNRFRLQCHRIVNDTIF 902
CaV1.2a-Klon15 AGEDEEEPEMPVGPRPRPLSELHLKEKAVMPPEASAFFIFSPNNRFRLQCHRIVNDTIF 931
AB259049 AGEDEEEPEMPVGPRPRPLSELHLKEKAVMPPEASAFFIFSPNNRFRLQCHRIVNDTIF 932
*****

Exon 31 / 32
CaV1.2b-Klon26 TNLILFFILLSSISLAAEDPVQHTSFRNHILFYFDIVFTTIFTEIALKMTAYGAFLHK 989
CaV1.2b-Klon29 TNLILFFILLSSISLAAEDPVQHTSFRNHILGNADYVFTSIFTEIILKMTAYGAFLHK 986
AY728090 TNLILFFILLSSISLAAEDPVQHTSFRNHILGNADYVFTSIFTEIILKMTAYGAFLHK 962
CaV1.2a-Klon15 TNLILFFILLSSISLAAEDPVQHTSFRNHILFYFDIVFTTIFTEIALKMTAYGAFLHK 991
AB259049 TNLILFFILLSSISLAAEDPVQHTSFRNHILGNADYVFTSIFTEIILKMTAYGAFLHK 992
*****

CaV1.2b-Klon26 SFCRNYFNILDLLVSVSLISFGIQSSAINVVKILRVLVLRPLRAINRAKGLKHVVQCV 1049
CaV1.2b-Klon29 SFCRNYFNILDLLVSVSLISFGIQSSAINVVKILRVLVLRPLRAINRAKGLKHVVQCV 1046
AY728090 SFCRNYFNILDLLVSVSLISFGIQSSAINVVKILRVLVLRPLRAINRAKGLKHVVQCV 1022
CaV1.2a-Klon15 SFCRNYFNILDLLVSVSLISFGIQSSAINVVKILRVLVLRPLRAINRAKGLKHVVQCV 1051
AB259049 SFCRNYFNILDLLVSVSLISFGIQSSAINVVKILRVLVLRPLRAINRAKGLKHVVQCV 1052
*****

CaV1.2b-Klon26 FVAIRTIGNIVIVTTLQFMFACIGVQLFKGKLYTCSOSSKQTEAECKGNITYKDGVEVD 1109
CaV1.2b-Klon29 FVAIRTIGNIVIVTTLQFMFACIGVQLFKGKLYTCSOSSKQTEAECKGNITYKDGVEVD 1106
AY728090 FVAIRTIGNIVIVTTLQFMFACIGVQLFKGKLYTCSOSSKQTEAECKGNITYKDGVEVD 1082
CaV1.2a-Klon15 FVAIRTIGNIVIVTTLQFMFACIGVQLFKGKLYTCSOSSKQTEAECKGNITYKDGVEVD 1111
AB259049 FVAIRTIGNIVIVTTLQFMFACIGVQLFKGKLYTCSOSSKQTEAECKGNITYKDGVEVD 1112
*****

CaV1.2b-Klon26 HPPIQPRSWENSKFDFDNVLAAMMALFTVSTFEGWPELLYRSIDSHTEDKGPIYNYRVEI 1169
CaV1.2b-Klon29 HPPIQPRSWENSKFDFDNVLAAMMALFTVSTFEGWPELLYRSIDSHTEDKGPIYNYRVEI 1166
AY728090 HPPIQPRSWENSKFDFDNVLAAMMALFTVSTFEGWPELLYRSIDSHTEDKGPIYNYRVEI 1142
CaV1.2a-Klon15 HPPIQPRSWENSKFDFDNVLAAMMALFTVSTFEGWPELLYRSIDSHTEDKGPIYNYRVEI 1171
AB259049 HPPIQPRSWENSKFDFDNVLAAMMALFTVSTFEGWPELLYRSIDSHTEDKGPIYNYRVEI 1172
*****
```

| | | |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| CaV1.2b-Klon26 | SIFFIYIIIIAFFMNI FVGFVIVTFQEQQEYKNC ELDKNQRQCVEYALKARPLRRY | 1229 |
| CaV1.2b-Klon29 | SIFFIYIIIIAFFMNI FVGFVIVTFQEQQEYKNC ELDKNQRQCVEYALKARPLRRY | 1226 |
| AY728090 | SIFFIYIIIIAFFMNI FVGFVIVTFQEQQEYKNC ELDKNQRQCVEYALKARPLRRY | 1202 |
| CaV1.2a-Klon15 | SIFFIYIIIIAFFMNI FVGFVIVTFQEQQEYKNC ELDKNQRQCVEYALKARPLRRY | 1231 |
| AB259049 | SIFFIYIIIIAFFMNI FVGFVIVTFQEQQEYKNC ELDKNQRQCVEYALKARPLRRY | 1232 |
| ***** | | |
| CaV1.2b-Klon26 | IPKNQH QYK V W Y V V N S T Y F E Y L M F V L I L L N T I C L A M Q H Y G Q S C L F K I A M N I L N M L F T G L F | 1289 |
| CaV1.2b-Klon29 | IPKNQH QYK V W Y V V N S T Y F E Y L M F V L I L L N T I C L A M Q H Y G Q S C L F K I A M N I L N M L F T G L F | 1286 |
| AY728090 | IPKNQH QYK V W Y V V N S T Y F E Y L M F V L I L L N T I C L A M Q H Y G Q S C L F K I A M N I L N M L F T G L F | 1262 |
| CaV1.2a-Klon15 | IPKNQH QYK V W Y V V N S T Y F E Y L M F V L I L L N T I C L A M Q H Y G Q S C L F K I A M N I L N M L F T G L F | 1291 |
| AB259049 | IPKNQH QYK V W Y V V N S T Y F E Y L M F V L I L L N T I C L A M Q H Y G Q S C L F K I A M N I L N M L F T G L F | 1292 |
| ***** | | |
| Exon 33 / 33* | | |
| CaV1.2b-Klon26 | TVEMILKLI A F K P K G Y F S D P W N V F D L I V I G S I I D V I L S E T N ----- | 1331 |
| CaV1.2b-Klon29 | TVEMILKLI A F K P K H Y F C D A W N T F D A L I V G S I V D I A I T E V H P A E H T Q C S P S M V R T T L Q T | 1346 |
| AY728090 | TVEMILKLI A F K P K H Y F C D A W N T F D A L I V G S I V D I A I T E V H P A E H T Q C S P ----- | 1313 |
| CaV1.2a-Klon15 | TVEMILKLI A F K P K G Y F S D P W N V F D L I V I G S I I D V I L S E T N P A E H T Q C S P ----- | 1342 |
| AB259049 | TVEMILKLI A F K P K G Y F S D P W N V F D L I V I G S I I D V I L S E T N P A E H T Q C S P ----- | 1343 |
| ***** * . * . * . * * * * : * * * : : * . : . | | |
| ----- | | |
| CaV1.2b-Klon26 | -----S A E E N S R I S | 1340 |
| CaV1.2b-Klon29 | T F P A S V A P P L A T H V L S T L I S R A L G T Q P S S H C M W P P C P L C A L T A C A H V S C A R S A E E N S R I S | 1406 |
| AY728090 | -----S M S A E E N S R I S | 1324 |
| CaV1.2a-Klon15 | -----S M S A E E N S R I S | 1353 |
| AB259049 | -----S M S A E E N S R I S | 1354 |
| ***** | | |
| CaV1.2b-Klon26 | I T F F R L F R V M R L V K L L S R G E G I R T L L W T F I K S F Q A L P Y V A L L I V M L F F I Y A V I G M Q V F G K | 1400 |
| CaV1.2b-Klon29 | I T F F R L F R V M R L V K L L S R G E G I R T L L W T F I K S F Q A L P Y V A L L I V M L F F I Y A V I G M Q V F G K | 1466 |
| AY728090 | I T F F R L F R V M R L V K L L S R G E G I R T L L W T F I K S F Q A L P Y V A L L I V M L F F I Y A V I G M Q V F G K | 1384 |
| CaV1.2a-Klon15 | I T F F R L F R V M R L V K L L S R G E G I R T L L W T F I K S F Q A L P Y V A L L I V M L F F I Y A V I G M Q V F G K | 1413 |
| AB259049 | I T F F R L F R V M R L V K L L S R G E G I R T L L W T F I K S F Q A L P Y V A L L I V M L F F I Y A V I G M Q V F G K | 1414 |
| ***** | | |
| CaV1.2b-Klon26 | I A L N D T T E I N R N N N F Q T F P Q A V L L L F R C A T G E A W Q D I M L A C M P G K K C A P E S E P S N S T E G E | 1460 |
| CaV1.2b-Klon29 | I A L N D T T E I N R N N N F Q T F P Q A V L L L F R C A T G E A W Q D I M L A C M P G K K C A P E S E P S N S T E G E | 1526 |
| AY728090 | I A L N D T T E I N R N N N F Q T F P Q A V L L L F R C A T G E A W Q D I M L A C M P G K K C A P E S E P S N S T E G E | 1444 |
| CaV1.2a-Klon15 | I A L N D T T E I N R N N N F Q T F P Q A V L L L F R C A T G E A W Q D I M L A C M P G K K C A P E S E P S N S T E G E | 1473 |
| AB259049 | I A L N D T T E I N R N N N F Q T F P Q A V L L L F R C A T G E A W Q D I M L A C M P G K K C A P E S E P S N S T E G E | 1474 |
| ***** | | |
| CaV1.2b-Klon26 | T P C G S S F A V F Y F I S F Y M L C A P L I I N L F V A V I M D N F D Y L T R D W S I L G P H H L D E F K R I W A E Y | 1520 |
| CaV1.2b-Klon29 | T P C G S S F A V F Y F I S F Y M L C A P L I I N L F V A V I M D N F D Y L T R D W S I L G P H H L D E F K R I W A E Y | 1586 |
| AY728090 | T P C G S S F A V F Y F I S F Y M L C A P L I I N L F V A V I M D N F D Y L T R D W S I L G P H H L D E F K R I W A E Y | 1504 |
| CaV1.2a-Klon15 | T P C G S S F A V F Y F I S F Y M L C A P L I I N L F V A V I M D N F D Y L T R D W S I L G P H H L D E F K R I W A E Y | 1533 |
| AB259049 | T P C G S S F A V F Y F I S F Y M L C A P L I I N L F V A V I M D N F D Y L T R D W S I L G P H H L D E F K R I W A E Y | 1534 |
| ***** | | |
| CaV1.2b-Klon26 | D P E A K G R I K H L D V V T L L R R I Q P P L G F G K L C P H R V A C K R L V S M N M P L N S D G T V M F N A T L F A | 1580 |
| CaV1.2b-Klon29 | D P E A K G R I K H L D V V T L L R R I Q P P L G F G K L C P H R V A C K R L V S M N M P L N S D G T V M F N A T L F A | 1646 |
| AY728090 | D P E A K G R I K H L D V V T L L R R I Q P P L G F G K L C P H R V A C K R L V S M N M P L N S D G T V M F N A T L F A | 1564 |
| CaV1.2a-Klon15 | D P E A K G R I K H L D V V T L L R R I Q P P L G F G K L C P H R V A C K R L V S M N M P L N S D G T V M F N A T L F A | 1593 |
| AB259049 | D P E A K G R I K H L D V V T L L R R I Q P P L G F G K L C P H R V A C K R L V S M N M P L N S D G T V M F N A T L F A | 1594 |
| ***** | | |
| CaV1.2b-Klon26 | L V R T A L R I K T E G N L E Q A N E E L R A I I K K I W K R T S M K L L D Q V V P P A G D D E V T V G K F Y A T F L I | 1640 |
| CaV1.2b-Klon29 | L V R T A L R I K T E G N L E Q A N E E L R A I I K K I W K R T S M K L L D Q V V P P A G D D E V T V G K F Y A T F L I | 1706 |
| AY728090 | L V R T A L R I K T E G N L E Q A N E E L R A I I K K I W K R T S M K L L D Q V V P P A G D D E V T V G K F Y A T F L I | 1624 |
| CaV1.2a-Klon15 | L V R T A L R I K T E G N L E Q A N E E L R A I I K K I W K R T S M K L L D Q V V P P A G D D E V T V G K F Y A T F L I | 1653 |
| AB259049 | L V R T A L R I K T E G N L E Q A N E E L R A I I K K I W K R T S M K L L D Q V V P P A G D D E V T V G K F Y A T F L I | 1654 |
| ***** | | |
| CaV1.2b-Klon26 | Q E Y F R K F K K R K E Q G L V G K P S Q R N A L S L Q A G L R T L H D I G P E I R R A I S G D L T A E E E L D K A M K | 1700 |
| CaV1.2b-Klon29 | Q E Y F R K F K K R K E Q G L V G K P S Q R N A L S L Q A G L R T L H D I G P E I R R A I S G D L T A E E E L D K A M K | 1766 |
| AY728090 | Q E Y F R K F K K R K E Q G L V G K P S Q R N A L S L Q A G L R T L H D I G P E I R R A I S G D L T A E E E L D K A M K | 1684 |
| CaV1.2a-Klon15 | Q E Y F R K F K K R K E Q G L V G K P S Q R N A L S L Q A G L R T L H D I G P E I R R A I S G D L T A E E E L D K A M K | 1713 |
| AB259049 | Q E Y F R K F K K R K E Q G L V G K P S Q R N A L S L Q A G L R T L H D I G P E I R R A I S G D L T A E E E L D K A M K | 1714 |
| ***** | | |

| | | |
|----------------|----------------------------------------------------------------|------|
| CaV1.2b-Klon26 | EAVSAASEDDIFRRAGGLFGNHVTTYQSDSRGNFPQTFATQRPLHINKTGNNQADTESPS | 1760 |
| CaV1.2b-Klon29 | EAVSAASEDDIFRRAGGLFGNHVTTYQSDSRGNFPQTFATQRPLHINKTGNNQADTESPS | 1826 |
| AY728090 | EAVSAASEDDIFRRAGGLFGNHVTTYQSDSRGNFPQTFATQRPLHINKTGNNQADTESPS | 1744 |
| CaV1.2a-Klon15 | EAVSAASEDDIFRRAGGLFGNHVTTYQSDSRGNFPQTFATQRPLHINKTGNNQADTESPS | 1773 |
| AB259049 | EAVSAASEDDIFRRAGGLFGNHVTTYQSDSRGNFPQTFATQRPLHINKTGNNQADTESPS | 1774 |
| ***** | | |
| CaV1.2b-Klon26 | HEKLVDSFTFPSSYSSTGNSANINNANNTALGRFPHPAGYSSTVSTVEGHGPPLSPAARV | 1820 |
| CaV1.2b-Klon29 | HEKLVDSFTFPSSYSSTGNSANINNANNTALGRFPHPAGYSSTVSTVEGHGPPLSPAARV | 1886 |
| AY728090 | HEKLVDSFTFPSSYSSTGNSANINNANNTALGRFPHPAGYSSTVSTVEGHGPPLSPAARV | 1804 |
| CaV1.2a-Klon15 | HEKLVDSFTFPSSYSSTGNSANINNANNTALGRFPHPAGYSSTVSTVEGHGPPLSPAARV | 1833 |
| AB259049 | HEKLVDSFTFPSSYSSTGNSANINNANNTALGRFPHPAGYSSTVSTVEGHGPPLSPAARV | 1834 |
| ***** | | |
| CaV1.2b-Klon26 | QEAAWKLSSKRCHSRESQGATVNQEIFPDETRSVRMSSEAEYCSEPSLLSTDMFSYQEDE | 1880 |
| CaV1.2b-Klon29 | QEAAWKLSSKRCHSRESQGATVNQEIFPDETRSVRMSSEAEYCSEPSLLSTDMFSYQEDE | 1946 |
| AY728090 | QEAAWKLSSKRCHSRESQGATVNQEIFPDETRSVRMSSEAEYCSEPSLLSTDMFSYQEDE | 1864 |
| CaV1.2a-Klon15 | QEAAWKLSSKRCHSRESQGATVNQEIFPDETRSVRMSSEAEYCSEPSLLSTDMFSYQEDE | 1893 |
| AB259049 | QEAAWKLSSKRCHSRESQGATVNQEIFPDETRSVRMSSEAEYCSEPSLLSTDMFSYQEDE | 1894 |
| ***** | | |
| CaV1.2b-Klon26 | HRQLTCP EEDKREIQSPKRSFLRSASLGRRASFHLECLKRQKDQGGDISQKTALPLHLV | 1940 |
| CaV1.2b-Klon29 | HRQLTCP EEDKREIQSPKRSFLRSASLGRRASFHLECLKRQKDQGGDISQKTALPLHLV | 2006 |
| AY728090 | HRQLTCP EEDKREIQSPKRSFLRSASLGRRASFHLECLKRQKDQGGDISQKTALPLHLV | 1924 |
| CaV1.2a-Klon15 | HRQLTCP EEDKREIQSPKRSFLRSASLGRRASFHLECLKRQKDQGGDISQKTALPLHLV | 1953 |
| AB259049 | HRQLTCP EEDKREIQSPKRSFLRSASLGRRASFHLECLKRQKDQGGDISQKTALPLHLV | 1954 |
| ***** | | |
| CaV1.2b-Klon26 | HHQALAVAGLSPLLQRSHSPTTFPRPCPTPPVTPGSRGRPLRPIPTLRLEGAESESSEKINS | 2000 |
| CaV1.2b-Klon29 | HHQALAVAGLSPLLQRSHSPTTFPRPCPTPPVTPGSRGRPLRPIPTLRLEGAESESSEKINS | 2066 |
| AY728090 | HHQALAVAGLSPLLQRSHSPTTFPRPCPTPPVTPGSRGRPLRPIPTLRLEGAESESSEKINS | 1984 |
| CaV1.2a-Klon15 | HHQALAVAGLSPLLQRSHSPTTFPRPCPTPPVTPGSRGRPLRPIPTLRLEGAESESSEKINS | 2013 |
| AB259049 | HHQALAVAGLSPLLQRSHSPTTFPRPCPTPPVTPGSRGRPLRPIPTLRLEGAESESSEKINS | 2014 |
| ***** | | |
| CaV1.2b-Klon26 | SFPSIHCSWSSEETTACSGSSSMARRARPVSLTVPSQAGAPGRQFHGSASSLVEAVLISE | 2060 |
| CaV1.2b-Klon29 | SFPSIHCSWSSEETTACSGSSSMARRARPVSLTVPSQAGAPGRQFHGSASSLVEAVLISE | 2126 |
| AY728090 | SFPSIHCSWSSEETTACSGSSSMARRARPVSLTVPSQAGAPGRQFHGSASSLVEAVLISE | 2044 |
| CaV1.2a-Klon15 | SFPSIHCSWSSEETTACSGSSSMARRARPVSLTVPSQAGAPGRQFHGSASSLVEAVLISE | 2073 |
| AB259049 | SFPSIHCSWSSEETTACSGSSSMARRARPVSLTVPSQAGAPGRQFHGSASSLVEAVLISE | 2074 |
| ***** | | |
| CaV1.2b-Klon26 | GLGQFAQDPKFI EVTTQELADACDMTIEEMENAADNILSGGAQQSPNGTLLPFVNCRDPG | 2120 |
| CaV1.2b-Klon29 | GLGQFAQDPKFI EVTTQELADACDMTIEEMENAADNILSGGAQQSPNGTLLPFVNCRDPG | 2186 |
| AY728090 | GLGQFAQDPKFI EVTTQELADACDMTIEEMENAADNILSGGAQQSPNGTLLPFVNCRDPG | 2104 |
| CaV1.2a-Klon15 | GLGQFAQDPKFI EVTTQELADACDMTIEEMENAADNILSGGAQQSPNGTLLPFVNCRDPG | 2133 |
| AB259049 | GLGQFAQDPKFI EVTTQELADACDMTIEEMENAADNILSGGAQQSPNGTLLPFVNCRDPG | 2134 |
| ***** | | |
| CaV1.2b-Klon26 | QDRAVAPPEDESCAYALGRGRSEALADSRSYVSNL | 2155 |
| CaV1.2b-Klon29 | QDRAVAPPEDESCAYALGRGRSEALADSRSYVSNL | 2221 |
| AY728090 | QDRAVVPPEDESCAYALGRGRSEALADSRSYVSNL | 2139 |
| CaV1.2a-Klon15 | QDRAVAPPEDESCAYALGRGRSEALADSRSYVSNL | 2168 |
| AB259049 | QDRAVAPPEDESCAYALGRGRSEALADSRSYVSNL | 2169 |
| **** | | |

Der einzige Sequenzunterschied zwischen Klon AY728090 (V, Valin) und den anderen Klonen (A, Alanin), der nicht durch eine differierende Exonabfolge erklärt werden kann, ist schwarz umrandet (siehe auch Abbildung 44)

Abbildung 43: Alignment der aus Firststrand von Maus isolierten CaV α_1 1.2-cDNS dieser Arbeit mit den in GenBank publizierten CaV α_1 1.2-cDNS-Sequenzen

Abbildung 44 verdeutlicht, dass sowohl die Aminosäure Valin als auch die Aminosäure Alanin an Position 2126 in CaV1.2-Transkripten vorkommen und kein Klonierungsfehler - bei-

spielsweise durch die DNS-Polymerase bei der Vervielfältigung des cDNS-Fragments - die Ursache für den Unterschied in der Aminosäuresequenz zwischen den Klonen ist.

| |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AAA62612 murine erythro leukemia cardiac calcium channel, alpha 1C subunit |
| QDRAV ^V PEDESCAYALGRGRSEEALADSRSYVSNL |
| AAV59464 neuronal voltage-gated calcium channel alpha 1C subunit [Mus musculus] |
| QDRAV ^V PEDESCAYALGRGRSEEALADSRSYVSNL |
| NP_033911 voltage-dependent calcium channel splice variant 1.2-a [Mus musculus] |
| QDRAV ^A PEDESCAYALGRGRSEEALADSRSYVSNL |
| EDK99601 calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit, isoform CRA_a [Mus musculus] |
| QDRAV ^A PEDESCAYALGRGRSEEALADSRSYVSNL |

Abbildung 44: unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung des Exon 50 mit Valin bzw. Alanin (in Ergänzung zu Abbildung 43); alpha 1C und CaV1.2 werden hier synonym verwendet.

4.2.3 Screening der zufallsgeprinten P7-cDNS-Bibliothek auf CaV α_1 1.2-Klone

Die zufallsgeprinte P7-cDNS-Bibliothek wurde mittels dreier Sonden auf die CaV α_1 1.2-cDNS hin gescreent. Um möglichst alle Klone zu erfassen, waren die Sonden komplementär zu der 5'-kodierenden cDNS, dem mittleren Teil der CaV α_1 1.2-cDNS und der 3'-kodierenden cDNS. Die 5'-Sonde (610 bp) war komplementär zu einem Sequenzabschnitt 3' von Exon 1 und 2 und umfasste einen Teil von Exon 3 sowie die Exons 4 bis 7, die mittlere Sonde (634 bp) Teile von Exon 24, die Exons 25 bis 28 sowie Teile von Exon 29 und die 3'-Sonde (1517 bp) Teile von Exon 42 sowie die Exons 43 bis 50.

Nach insgesamt 142 erhaltenen positiven Signalen beim ersten Screening wurden 38 Kolonien isoliert, einem zweiten Screening unterzogen und 18 Klone für eine Analyse mittels Mini-Prep ausgewählt. Die Klone mit den längsten cDNS-Fragmenten wurden weiter untersucht. Insgesamt wurden elf cDNS sequenziert; ein Vollängenklon wurde bei dieser Vorgehensweise nicht erhalten; die längsten der elf Klone umfassten 20 (Klon 57-1) bzw. 19 Exons

(Klon 50-1), mit etwa 2400 bzw. 2000 Basenpaaren, die kürzesten umfassten drei (Klon 59-2) bzw. sechs Exons (Klon 37-1) mit ~ 600 bzw. 1000 Basenpaaren .

| Bezeichnung des Klons | Abfolge der Exons |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Klon 30-1 | 1A - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8A |
| Klon 36-2 | 1A - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 |
| Klon 37-1 | 1A - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 |
| Klon 59-2 | 1A - 2 - 3 (Exon 3 länger am 3' Terminus ; evtl. nicht korrekt gespleißt) |
| Klon 57-1 | 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16* - 17* - 18 - 19 - 20 - 22 - 23 - 24 - 25 - 26 - 27 - 28 - 29 - 30 |
| Klon 50-1 | 17 - 18 - 19 - 20 - 22 - 23 - 24 - 25 - 26 - 27 - 28 - 29 - 30 - 32 - 33 - 34 - 35 - 36 - 37 |
| Klon 63-3 | 33* - 34 - 35 - 36 - 37 - 38 - 39 - 40 - 41 - 42 - 43 - 44 |
| Klon 51-1 | 36 - 37 - 38 - 39 - 40 - 41 - 42 - 43 - 44 |
| Klon 46-1 | 37 - 38 - 39 - 40 - 41 - 42 - 43 - 44 |
| Klon 66-1 | 40 - 41 - 42 - 43 - 44 - 46 - 47 - 48 - 49 - 50 |
| Klon 55-1 | 40 - 41 - 42 - 43 - 44 - 46 - 47 |

Tabelle 31: Exonfolge der aus der zufallsgeprimerten P7-Bank erhaltenenen cDNS-CaV α_1 1.2-Klone; Exons, die Spleißvorgängen unterliegen, sind rot markiert, nicht eindeutig sequenzierte Exons in orange.

| | 1A / 1B | 8A / 8B | 9 / 9 + 9A | 16 / 16* | 17 / 17* | 21 / 22 | 31 / 32 | 33 / 33* | Exon 45 |
|------------------|---------|---------|---------------|----------|----------|---------|---------|----------|------------|
| Klon 30-1 | 1A | 8A | | | | | | | |
| Klon 36-2 | 1A | | | | | | | | |
| Klon 37-1 | 1A | | | | | | | | |
| Klon 59-2 | 1A | | | | | | | | |
| Klon 57-1 | | | | 16* | 17* | 22 | | | |
| Klon 50-1 | | | | | 17 | 22 | 32 | 33 | |
| Klon 63-3 | | | | | | | | 33* | |
| Klon 51-1 | | | | | | | | | |
| Klon 66-1 | | | | | | | | | nein |
| Klon 55-1 | | | | | | | | | nein |

Tabelle 32: Vergleich der P7-CaV α_1 1.2-Klone in Bezug auf spleißrelevante Exons

Die in der amplifizierten Vollängen-cDNS vorhandenen Exons 1B, 21 und 31 (Tabelle 25) fanden sich in den P7-cDNS-Klonen nicht wieder. Exon 1A wurde in allen Klonen, die die N-terminale Sequenz beinhalten, identifiziert, im Fall von Klon 30-1, der ein DNS-Fragment ausreichender Länge enthielt, das beide Exons umfasste, gekoppelt mit Exon 8A (siehe Tabelle 32). Weiterhin fanden sich ausschließlich Exon 22 bzw. 32; keiner der analysierten Klone besaß die entsprechende Sequenz für Exon 21 bzw. 31. Die beiden Klone, die den Sequenzab-

schnitt um Exon 33 enthielten, kodierten entweder für Exon 33 oder 33*; eine Sequenz ohne Exon 33 wurde nicht identifiziert. Bei einem Klon, Klon 57-1, fand sich ein längeres Exon 16*, durch welches ein Stopkodon in der Nukleotidsequenz entsteht, wodurch eine verkürzte CaV α _{1.2}-Untereinheit kodiert werden könnte (Tabelle 33), wie sie von *Fan et al.* (46) in der CaV α _{1.2} cDNS von Herz von Ratte und von *Yang et al.* (170) in Herz von Mensch bereits beschrieben ist. Darauf wird in 5.5.2.1 näher eingegangen.

| Exon | AS-Sequenz | Unterschied zum „herkömmlichen“ Exon |
|------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 16* | YTNRYPT ECVLGH CGGQPG* | Das Exon 16 ist um zehn Nukleotide verlängert (ctttaagagtggACACAAACAG), was zu einer Leserasterverschiebung und zum Translationsstop in Exon 16* durch das Codon TGA führt. |

Tabelle 33: AS-Sequenz des Exon 16*

Exon 16* beginnt zehn Nukleotide (ACACAAACAG) 5' vor Beginn der regulären Sequenz des Exon 16. Ein Thymin von Exon 15 ist Teil des Triplets, das die erste Aminosäure Tyrosin (Y) von Exon 16 kodiert; nach weiteren 18 Basentriplets entsteht ein Stopkodon; dies bedingt bei Expression dieser Exons ein trunkiertes Protein. Die 3'-Intron-Sequenz 5' von Exon 16* lautet „ctttaagagtgg“ und besitzt somit nicht die typische 3'-Spleißsequenz ag, weshalb nicht ausgeschlossen werden kann, dass Klon 57-1 einen in dieser Form nicht exprimierten Sequenzabschnitt beinhaltet. Allerdings sprechen die oben genannten Befunde aus Ratte (46) und Mensch (170) dafür, dass eine solche Spleißvariante tatsächlich existiert.

Teil 3

4.3 Fluoreszenzexperimente

Um Vorgänge des CaV β -Untereinheit-getriggerten Membrantransports der CaV α _{1.2}-Untereinheit in vivo untersuchen zu können, wurden die CaV α _{1.2}- und die CaV β ₂-Untereinheit jeweils mit einem Fluoreszenzprotein fusioniert, um diese Untereinheiten in der Zelle sichtbar zu machen. Der Vorteil dieser Vorgehensweise liegt darin, dass die Untereinheiten aufgrund des fusionierten Fluoreszenzproteins in lebenden Zellen sichtbar sind. Andere Methoden zum Nachweis - beispielsweise mit Antikörpern - können zu Artefakten führen, sei es aufgrund von Unzugänglichkeit des Epitops oder der unspezifischen Bindung an Proteine, die mit der CaV α _{1.2}- oder der CaV β ₂-Untereinheit nichts zu tun haben.

4.3.1 Klonierung von fluoreszenzmarkierten $\text{CaV}\alpha_11.2$ - und $\text{CaV}\beta 2$ -Untereinheiten

Um später bei Beobachtungen in der lebenden Zelle die $\text{CaV}\alpha_11.2$ - von der $\text{CaV}\beta 2$ -Untereinheit differenzieren zu können, wurde die $\text{CaV}\beta 2$ - mit einem roten Fluoreszenzprotein, dem monomeren rot-fluoreszierenden Protein (mRFP) (20) und die $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit mit einem grün fluoreszierenden pH-sensitiven Protein, dem supereklptischen bzw. ratiomerischen grün fluoreszierenden Protein, s- bzw. r-pHluorin (102, 3), fusioniert.

Das mRFP hat den Vorteil, im Gegensatz zu vielen anderen Fluoreszenzproteinen keine Dimerie zu bilden, welche die regelhafte funktionelle Expression der $\text{CaV}\beta 2$ -Untereinheit und ihre Interaktion mit der $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit behindern könnten. Von den pH-sensitiven Fluoreszenzproteinen wurde erhofft, anhand der pH-abhängigen Fluoreszenz auf die Zellkompartiment-Lokalisation der $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit in der Zelle schließen zu können. Das s-pHluorin ergibt das stärkste Signal im neutralen bis basischen Milieu und erfährt eine kontinuierliche Signalabschwächung bei Abfall des pH-Wertes, bis das Signal bei einem pH-Wert von sechs erlischt. Im Gegensatz dazu absorbiert das r-pHluorin wie Fura-2 (152) auf zwei verschiedenen Wellenlängen Licht, wobei mit fallendem pH-Wert die Absorption des Lichts der einen Wellenlänge zu- und der anderen abnimmt. Da das Intra- bzw. Extrazellulärmilieu sowie die verschiedenen Zellkompartimente innerhalb der Zelle unterschiedliche pH-Werte besitzen, wurden Änderungen der Signalstärke der Fluoreszenzproteine erwartet, die einen Aufschluss über die Lokalisation und den Transportweg der $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit zur Membran mit und ohne Einfluss der $\text{CaV}\beta 2$ geben sollten.

Man erkennt aus Abbildung 45, dass die $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit auf ihrem Weg zur Membran verschiedene Zellkompartimente durchwandert, beginnend im endoplasmatischen Retikulum (ER), pH 7.2, über den Golgi-Apparat, pH 6.4, und die Transportvesikel, pH 5.4, bis hin zur Plasmamembran, wo die pHluorin-markierte Extrazellulärschleife (siehe 4.6.1.1) im Extrazellulärmilieu, pH 7.4, zu liegen kommt. Der pH-Wert des ER ist noch im neutralen Bereich, während er im Golgi-Apparat und Transportvesikeln doch deutlich im sauren Bereich liegt. Erst bei Einbau in die Plasmamembran steigt der pH-Wert wieder an auf pH 7.4. Somit sollte sich für das s-pHluorin ein starkes Signal der $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit im ER zeigen, wohingegen dieses im Golgi-Apparat nur noch sehr schwach und in den Transportvesikeln nicht mehr detektierbar ist. Erst mit dem Einbau in die Plasmamembran ergäbe sich erneut ein starkes $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Signal. Für das r-pHluorin erfolgt eine Messung der Fluoreszenzintensität auf zwei Wellenlängen.

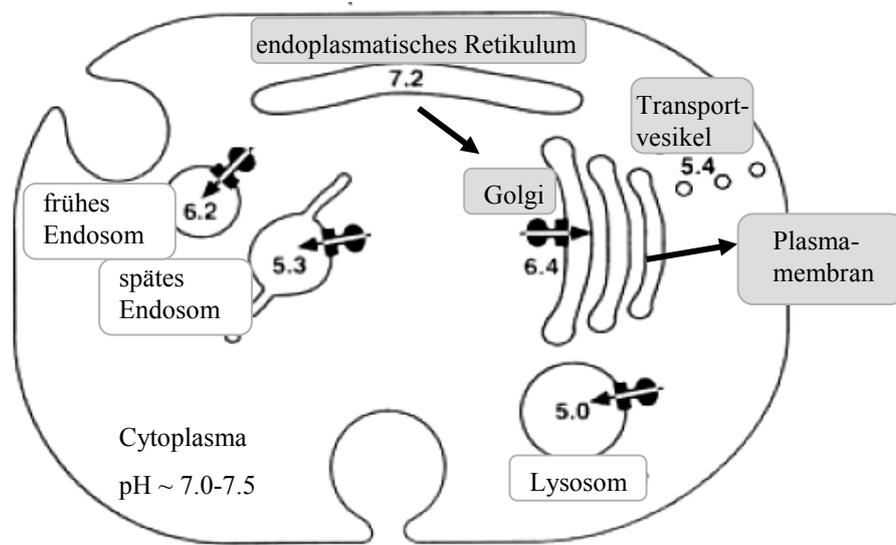


Abbildung 45: Transportweg der CaV α 1.2-Untereinheit zur Plasmamembran (grau unterlegte Kompartimente) und der den Zellkompartimenten zugehörigen pH-Werte modifiziert nach *Grabe et al.* (56)

Mit einem Lichtmikroskop sind solche feinen Beobachtungen zwar prinzipiell möglich, jedoch ist die Auflösung begrenzt. Eine Möglichkeit, diese Vorgänge besser darzustellen, ist die Konfokalmikroskopie, mit der das Bild in einer Ebene fokussiert werden kann und somit genauere *in vivo*-Studien dieses Transportweges durchgeführt werden können. Diese soll für die geplanten Betrachtungen zum Zuge kommen.

4.3.1.1 Klonierungsstrategie zur Fusion der Fluoreszenzproteine mit den Untereinheiten

Da sich die Sequenzunterschiede der CaV β 2-Varianten jeweils im Bereich des N-Terminus zeigen, wurde das mRFP mit dem C-Terminus fusioniert, um die vermutete spezifische Funktion der N-termini so wenig wie möglich zu beeinflussen. *Takahashi et al.* (146) fusionierten im Rahmen ihrer Publikation von 2003 ein grün fluoreszierendes Protein C-terminal der CaV β 2-Untereinheit, was keine Synthese- und/oder Funktionsbeeinträchtigung beider Proteine mit sich brachte. Somit schien C-terminal die optimale Lokalisation für die Fusion des Fluoreszenzproteins zu sein.

Es erfolgte die Herstellung von CaV β 2a-N1-, CaV β 2a-N4- als auch CaV β 2a-N5 - Fusionsproteinen, indem jeweils das Stopkodon der CaV β 2-Untereinheiten entfernt und das mRFP in dem nun offenen Leserahmen an die CaV β 2a angefügt wurde. Als Vektor wurde der pCAGGS_M2 - Vektor verwendet, in dem unter Kontrolle des starken β -actin-Promotor eine

Expression der cDNS in HEK293-Zellen, aber auch in primären Mauskardiomyozyten möglich ist (64). Die Integration des pH-sensitiven Fluoreszenzproteins in die $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit erfolgte im Bereich der Extrazellulärschleife zwischen IIS5 und IIS6 (113). Das Fluoreszenzprotein sollte nach Einbau der $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit in die Plasmamembran extrazellulär zu liegen kommen. Der korrekte Membraneinbau sollte über die Änderung des pH-Wertes aufgrund Differenz der pH-Werte von Transportvesikeln und Extrazellulärmilieu nachgewiesen werden. Ein weiterer positiver Aspekt des Fluoreszenzproteineinbaus in eine Extrazellulärschleife ist, dass man auf diese Weise den Weg der $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit durch die verschiedenen Kompartimente bis zum Einbau in die Membran verfolgen kann. Die Orientierung von Membranproteinen im endoplasmatischen Retikulum, Golgi-Apparat und Transportvesikeln ist entgegengesetzt der Orientierung in der Plasmamembran: Die extrazelluläre Seite ragt in das Kompartiment hinein („innen“), während die zytosolische Seite mit dem Zytosol in Kontakt ist („außen“). So kann anhand der oben beschriebenen pH-abhängigen Signalstärkeänderungen auf spezifische Kompartimente geschlossen werden.

In einer Veröffentlichung von *Obermair et al.* (113) wurde ein Fremdepitop, das von einem Antikörper erkannt wird, in die IIS5-IIS6 Schleife eingefügt und gezeigt, dass dadurch keine Funktionsunterschiede zum nativen Konstrukt entstehen und das Epitop in dieser Lokalisation für den Antikörper gut zugänglich ist. Allerdings war das hier verwendete Fluoreszenzprotein mit einem Molekulargewicht von ~ 25 kDa wesentlich größer als das Epitop für den Antikörper. Es konnte deshalb nicht sicher davon ausgegangen werden, dass das eingefügte Fluoreszenzprotein die $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit in ihrer Funktion nicht beeinträchtigen würde. So wurden als Alternativen zwei weitere Fusionsproteine mit einem C-terminal an die $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit fusionierten r- bzw. s-pHluorin angefertigt. Vorarbeiten (106, 35) legen nahe, dass die C-terminale Fusion eines Proteins an die $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit wenig Einfluss auf Faltung, Transport und Membraneinbau der $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit zu haben scheint. Eine N-terminale Fusion wurde aufgrund der Variabilität des N-terminus nicht in Betracht gezogen, um sequenzspezifische Eigenschaften möglichst wenig zu beeinträchtigen. Auch die cDNS der $\text{CaV}\alpha_11.2$ -pHluorin-Fusionsproteine wurden wie die cDNS der $\text{CaV}\beta_2a$ -mRFP-Fusionsproteine in einen pCAGGS_M2 Vektor kloniert.

4.3.1.2 Transfektion, Expression und Lichtmikroskopie

Die erhaltenen Konstrukte wurden in HEK293-Zellen exprimiert und die Zellen im Lichtmikroskop untersucht, um Informationen über die effektive Expression der Konstrukte zu erhalten. Zunächst wurde überprüft, ob die fluoreszenzmarkierten Untereinheiten einzeln exprimiert

werden können, in welchem Maß die Expression erfolgt und welche Lokalisation die Proteine in der Zelle haben. In weiteren Versuchen wurden die Fusionsproteine dann mit der jeweils zugehörigen nicht-fluoreszenzmarkierten Untereinheit koexprimiert, d.h. das CaV β 2a-mRFP-Fusionsprotein mit der CaV α _{1.2}-Untereinheit, das CaV α _{1.2}-pHluorin-Fusionsprotein mit der CaV β 2-Untereinheit und anschließend beide Fusionsproteine miteinander.

Um zu entscheiden, welches der beiden pH-sensitiven Fluoreszenzproteine für die Versuche in Bezug auf die Auswirkungen des Proteins auf die Zellen wie beispielsweise ihre Vitalität und die Signalstärke des GFP geeigneter war, wurden die Fluoreszenzproteine als Kontrolle vor Beginn der eigentlichen Versuche allein in HEK293-Zellen transfiziert. Abbildung 46 zeigt das Ergebnis einer solchen Transfektion. Die Transfektionseffizienz war zufriedenstellend und die Zellen zeigten keine Veränderung ihrer Morphologie im Vergleich zu den benachbarten untransfizierten Zellen. Beide Fluoreszenzproteine entwickelten eine intensive grüne Fluoreszenz. Aufgrund der einfacheren Messmethode wurde im Weiteren zunächst das CaV α _{1.2}-s-pHluorin-Fusionsprotein exprimiert.

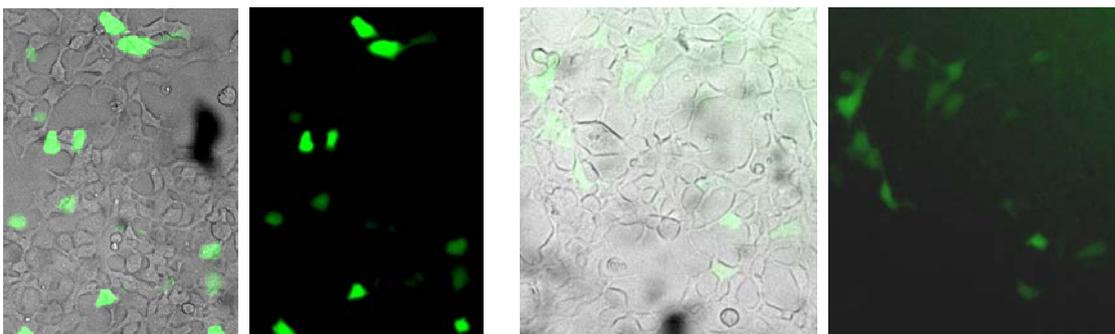


Abbildung 46: Expression von s- bzw. r-pHluorin in HEK293-Zellen; rechts, Grünfluoreszenz; links Durchlicht mit überlagerter Fluoreszenz. Links und Mitte links, s-pHluorin allein exprimiert in HEK293-Zellen; Mitte rechts und rechts, r-pHluorin allein exprimiert in HEK293-Zellen

4.3.1.2.1. Expression des CaV β 2a-mRFP-Fusionsproteins in HEK293-Zellen

Die Bilder in Abbildung 47 zeigen stellvertretend für alle mRFP-markierten CaV β 2a-Untereinheiten die Expression des CaV β 2a-N1-mRFP-Fusionsproteins in HEK293-Zellen. Man erkennt eine homogene intensive Rotfärbung der gesamten Zelle mit Aussparung des Kerns. Die Zellen erschienen vital und von gleicher Morphologie wie benachbarte nicht-transfizierte Zellen. Dies zeigt, dass das CaV β 2a-N1-mRFP-Fusionsprotein in den HEK293-Zellen gut exprimiert wird und die Zellen unter dieser Bedingung nicht beeinflusst erscheinen.

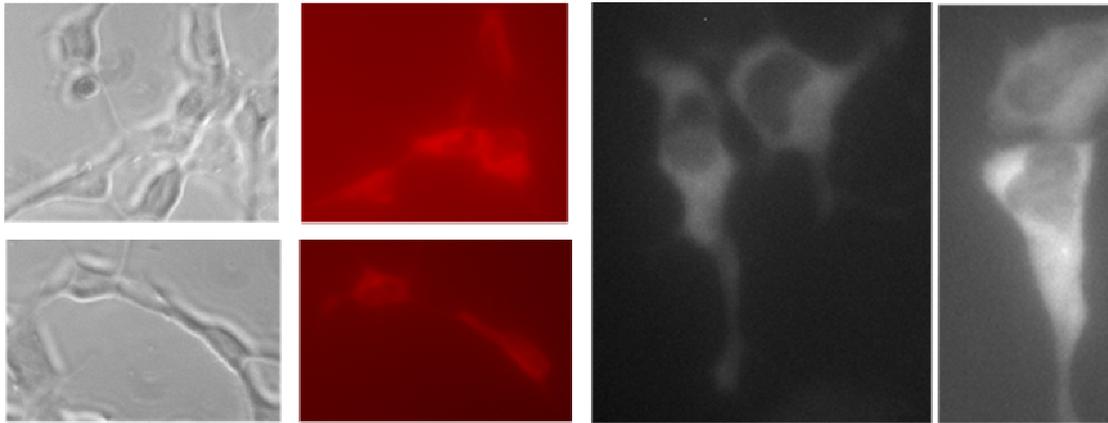


Abbildung 47: Expression des CaV β 2a-N1-mRFP-Fusionsproteins in HEK293-Zellen in Abwesenheit einer CaV α 1.2-Untereinheit. Links Mitte, mRFP-Fluoreszenz und korrespondierende Durchlichtbilder (links). Rechts, Vergrößerung von Zellen mit mRFP-Fluoreszenz.

4.3.1.2.2. Expression des CaV α 1.2-s-pHluorin-Fusionsproteins in HEK293-Zellen

Die Transfektion des CaV α 1.2- s-pHluorin-Fusionsproteins in HEK293-Zellen brachte in Abbildung 48 dargestelltes Ergebnis:

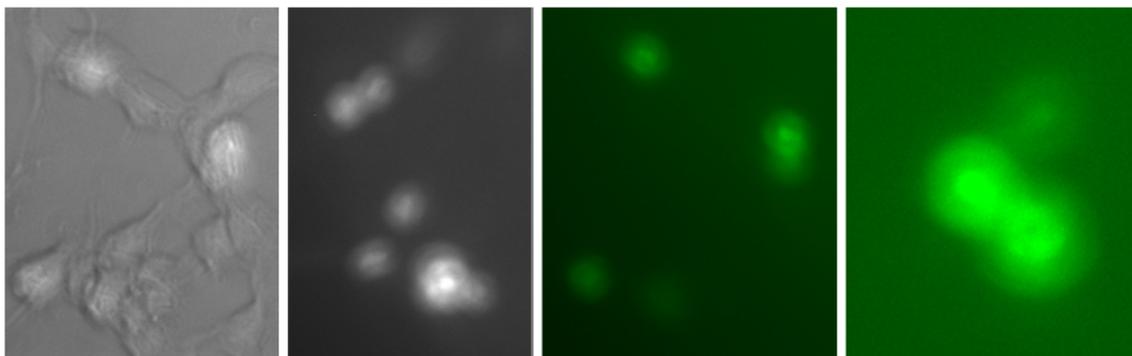


Abbildung 48: Expression des CaV α 1.2a-s-pHluorin-Fusionsproteins in HEK293-Zellen. Das pHluorin ist in die extrazelluläre IIS5-IIS6-Schleife der CaV α 1.2a-Untereinheit integriert. Links Durchlicht, Mitte links Zellen mit Grünfluoreszenz, Mitte rechts und rechts Grünfluoreszenz.

Die Zellen zeigen eine intensive grüne Färbung im Bereich der gesamten Zelle. Eine Aussparung des Zellkerns ist nicht zu erkennen. Zudem erscheinen die Zellen klein und abgerundet im Vergleich zu den benachbarten Zellen. Die Transfektionseffizienz war gering

4.3.1.2.3. Expression des CaV β 2a-N4-mRFP-Fusionsproteins in HEK293-Zellen in Anwesenheit einer nicht fluoreszenzmarkierten CaV α ₁.2-Untereinheit

Man erkennt in Abbildung 49, dass sich die mit dem CaV β 2a-N4-mRFP-Fusionsprotein und der nicht fluoreszenzmarkierten CaV α ₁.2-Untereinheit transfizierten Zellen in ihrem gesamten Bereich rot anfärben. Gleichzeitig sind Unterschiede in der Fluoreszenzintensität sichtbar. Besonders intensives Rot zeigt sich im Bereich der Plasmamembran sowie in einigen teils rundlichen, teils länglichen Strukturen im Zytoplasma der Zellen. Eine Aussparung des Zellkerns lässt sich in diesen Aufnahmen nicht eindeutig erkennen. Die Zellen sahen vital aus, sie unterschieden sich in Form und Größe nicht von den umgebenden nicht-transfizierten Zellen. Insgesamt war die Transfektionseffizienz leider gering.

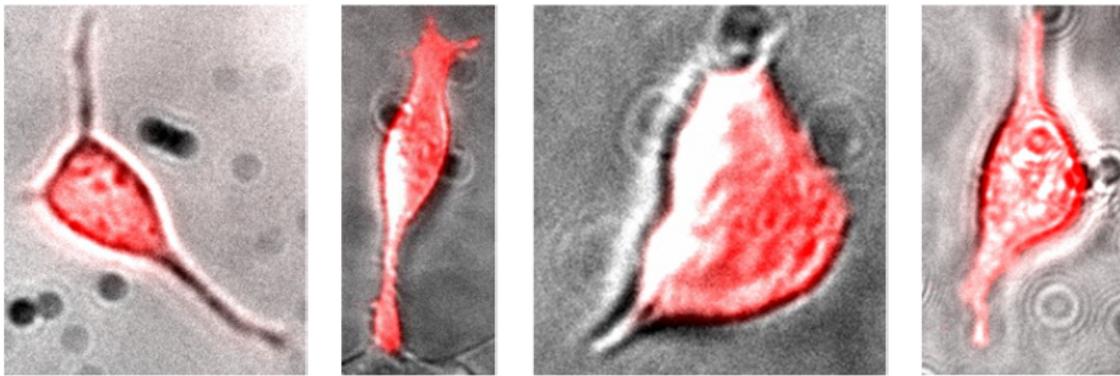


Abbildung 49: Expression des CaV β 2a-N4-mRFP-Fusionsproteins in HEK293-Zellen in Anwesenheit der nicht fluoreszenzmarkierten CaV α ₁.2-Untereinheit

Es fällt auf, dass sich die Bilder deutlich von denen der allein transfizierten CaV β 2a-Untereinheit in Abbildung 47 unterscheiden, in denen eine gleichmäßige Rotfärbung mit Aussparung des Kerns zu erkennen war. Die Abbildung zeigt eine schwerpunktmäßige Umverteilung der Fluoreszenz von gleichmäßiger Verteilung im Zytoplasma hin zu Akkumulation im Bereich der Plasmamembran und bestimmten Strukturen im Zytosol. Dies korreliert mit dem durch die CaV β 2a-Untereinheit vermittelten Einbau der CaV α ₁.2-Untereinheit in die Plasmamembran, wo CaV β 2a- und CaV α ₁.2-Untereinheit in unmittelbarer Nachbarschaft miteinander interagieren sowie der Co-Lokalisation beider Untereinheiten in Strukturen des endoplasmatischen Retikulums, wo die CaV β 2a-Untereinheit eine für den Membrantransport der CaV α ₁.2-Untereinheit wichtige Chaperonfunktion (siehe Kapitel 2.4) besitzt. Somit geben diese Bilder Hinweise auf Interaktion der CaV α ₁.2- und CaV β 2a-Untereinheiten, die durch die Fusion der CaV β 2a-Untereinheit mit mRFP nicht beeinträchtigt wird.

4.3.1.2.4. Expression des $\text{CaV}\alpha_11.2$ -s-pHluorin-Fusionsproteins in HEK293-Zellen in Anwesenheit einer nicht fluoreszenzmarkierten $\text{CaV}\beta_2\alpha$ -Untereinheit

Bei der Kotransfektion des $\text{CaV}\alpha_11.2$ -s-pHluorin-Fusionsproteins mit der nicht-fluoreszenzmarkierten $\text{CaV}\beta_2\alpha$ -N4-Untereinheit (Abbildung 50) zeigt sich die Akkumulation eines intensiv grünen Farbsignals besonders in zentralen Bereichen der Zelle, während periphere nur schwach oder nicht fluoreszierend sind. Eine verstärkte Signalintensität der Plasmamembran ist nicht sichtbar, wie dies bei der Kotransfektion des $\text{CaV}\beta_2\alpha$ -N4-mRFP-Fusionsproteins mit der nicht-fluoreszenzmarkierten $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit der Fall war. Der Zellkern kann auch hier nicht deutlich abgegrenzt werden.

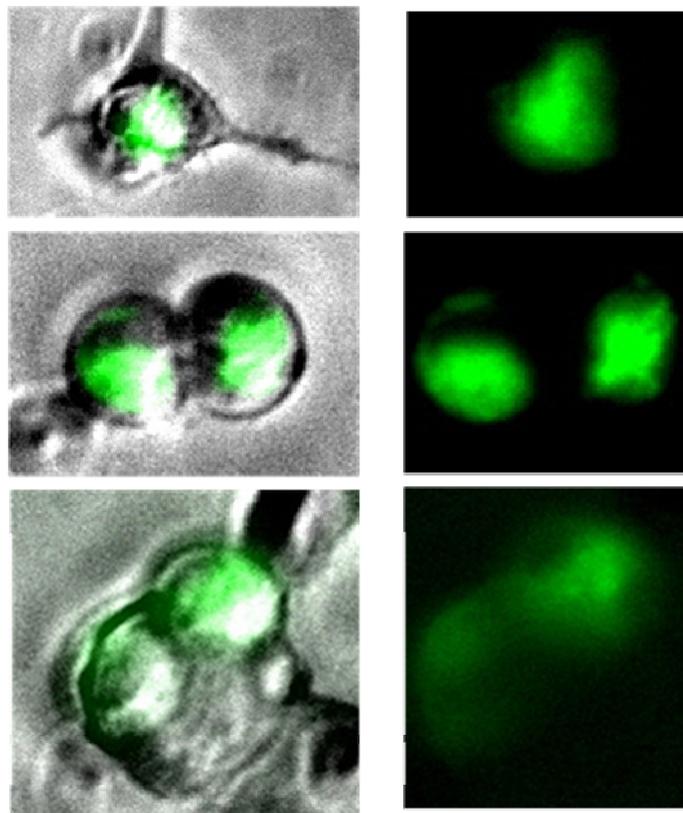


Abbildung 50: Expression des $\text{CaV}\alpha_11.2$ -s-pHluorin-Fusionsproteins, s-pHluorin im Extrazellulärloop, in HEK293-Zellen in Anwesenheit der nicht fluoreszenzmarkierten $\text{CaV}\beta_2\alpha$ -N4-Untereinheit

Für diesen Versuch wurde das s-pHluorin verwendet. So könnten schwächer fluoreszierende Bereiche auch mit einem saureren pH-Wert korrelieren. Um dies genauer beurteilen zu können, reicht jedoch die Auflösung des Lichtmikroskops nicht aus. Insgesamt waren die Zellen relativ klein und abgerundet im Vergleich zu den vorherigen betrachteten Zellen. Die Transfektionseffizienz war niedrig. Bei Betrachtung der Bilder scheint es, als würde der Großteil

der fluoreszenzmarkierten $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit in Strukturen des endoplasmatischen Retikulums akkumulieren, während als Folge eines geringen Transports nur ein kleiner Teil der $\text{CaV}1.2$ -Proteine die Plasmamembran erreicht.

4.3.1.2.5. Koexpression der $\text{CaV}\beta_2\alpha\text{-N4-mRFP-}$ und $\text{CaV}\alpha_11.2\alpha\text{-s-pHluorin-}$ Fusionsproteine in HEK293-Zellen

Für die Bilder in Abbildung 51 wurden die beiden mit einem Fluoreszenzprotein fusionierten Untereinheiten koexprimiert. Bei Überlagerung roter und grüner Farbsignale ergibt sich eine gelbe Färbung. Es wurden drei verschiedene Zellen jeweils unter einem spezifischen Filter im Lichtmikroskop betrachtet.

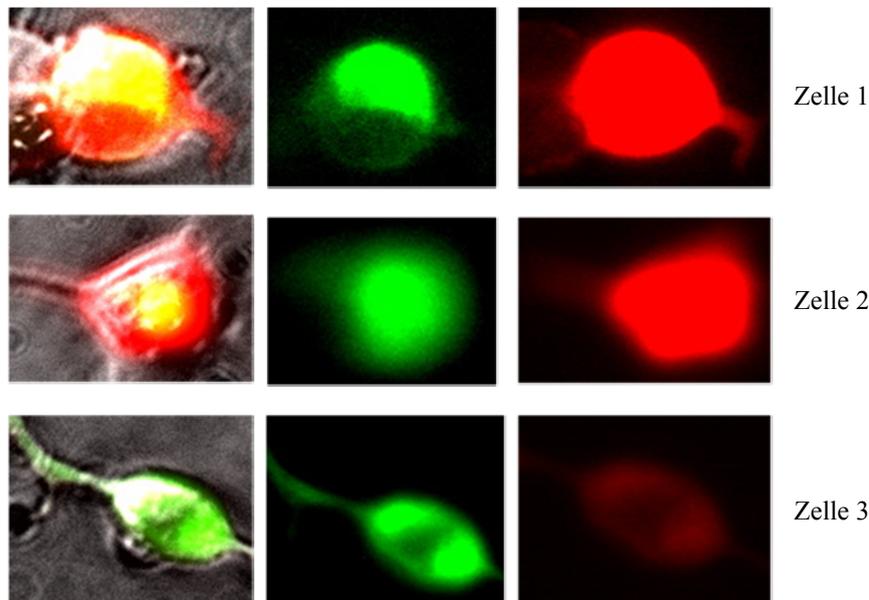


Abbildung 51: Koexpression des $\text{CaV}\beta_2\alpha\text{-N4-mRFP-}$ mit dem $\text{CaV}\alpha_11.2\alpha\text{-s-pHluorin-}$ Fusionsprotein in HEK293-Zellen

Man erkennt für die zwei oberen Zellen im jeweils rechten Bild der Abbildung 51 eine sehr intensive rote Färbung ($\text{CaV}\beta_2\alpha\text{-N4-mRFP}$) der gesamten Zelle. Ein Zellkern lässt sich nicht abgrenzen. Die Grünfärbung ($\text{CaV}\alpha_11.2\alpha\text{-s-pHluorin}$, mittlere Bilder) hingegen verteilt sich zwar auch über die gesamte Zelle, allerdings zeigen sich deutliche Intensitätsunterschiede mit einer Akkumulation von Grünfluoreszenz in vorwiegend zentralen Bereichen des Zellkörpers. Auch hier wurde das s-pHluorin verwendet, was einen Einfluss auf die Signalstärke abhängig vom pH-Wert zur Folge hat. Dieser Einfluss ist anhand lichtmikroskopischer Bilder schwer zu beurteilen, da die einzelnen Kompartimente nicht voneinander abgegrenzt werden können.

In den Bereichen maximaler Fluoreszenz des pHluorins zeigt sich bei Überlagerung mit der Fluoreszenz von mRFP eine Gelbfärbung. Prinzipiell müsste diese im Bereich der gesamten Zelle zu finden sein, allerdings scheint die hohe Signalstärke des mRFP die Signale des pHluorins in weiten Bereichen der Zelle zu überdecken. Die dritte Zelle in der unteren Reihe der Abbildung scheint auf den ersten Blick im linken Bild ausschließlich grün zu fluoreszieren. Bei näherer Betrachtung zeigt sich eine zusätzliche Gelbfärbung in vielen Bereichen der Zelle. Die grüne Fluoreszenz verteilt sich hier über die ganze Zelle mit Fluoreszenzmaxima am linken sowie rechten Pol der Zelle, während der zentrale Teil des Zellkörpers schwächer fluoresziert. Diese Zelle zeigt eine Dominanz der grünen Fluoreszenz im Vergleich zur Fluoreszenz des mRFP. Betrachtet man das rechte Bild der untersten Zeile, erkennt man eine deutlich sichtbare Rotfärbung der Zelle, jedoch wesentlich schwächer, als dies bei den oberen beiden Zellen der Fall ist. Interessanterweise ist hier die rote Fluoreszenz nicht gleichmäßig über die Zelle verteilt, sondern folgt der schwerpunktmäßigen Intensitätssteigerung des pHluorin-Signals an den beiden Zellpolen. Diese Beobachtung deutet auf eine Interaktion der $\text{CaV}\alpha_11.2$ - und der $\text{CaV}\beta_2\text{a}$ -Untereinheit hin, was bedeuten würde, dass die Fluoreszenzmarkierung der beiden Proteine ihre Interaktion nicht beeinträchtigt.

Die Morphologie der transfizierten Zellen war in Bezug zu benachbarten nicht-transfizierten Zellen kaum verändert; die Zellen erschienen etwas kleiner als die nichttransfizierten. Insgesamt war auch in diesem Versuch die Transfektionseffizienz sehr gering.

4.3.1.3 Konfokalmikroskopische Aufnahmen des $\text{CaV}\alpha_11.2$ -s-pHluorin-Fusionsproteins in HEK293-Zellen

Um die Verteilung der $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit in Kompartimenten der Zelle sowie Interaktionen zwischen $\text{CaV}\alpha_11.2$ - und $\text{CaV}\beta_2\text{a}$ -Untereinheit besser auflösen zu können, wurde nun die Konfokalmikroskopie benötigt. Um einen ersten Eindruck vom Auflösungsvermögen des Konfokalmikroskops unter hier gegebenen Bedingungen zu erlangen, wurden zunächst Zellen einer einfachen Transfektion mit dem $\text{CaV}\alpha_11.2$ -s-pHluorin-Fusionsprotein betrachtet (Abbildung 52).

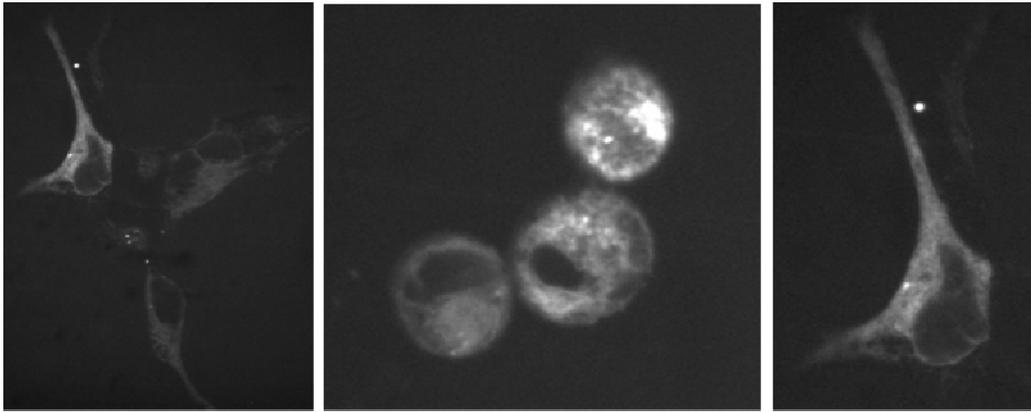


Abbildung 52: Konfokalmikroskopische Aufnahmen des $\text{CaV}\alpha_1.2a$ -s-pHluorin-Fusionsproteins in HEK293-Zellen

In Abbildung 52 zeigt sich eine Anfärbung der gesamten Zelle, wobei der Zellkern ausgespart bleibt. Innerhalb der Zelle befinden sich scharf begrenzte, rundliche Bereiche intensiver Färbung. Insgesamt haben Zellen mit starkem Signal eine rundliche Form, wohingegen Zellen mit schwächerem, aber deutlich sichtbarem Signal eine eher ovale Form mit Zellausläufern zeigten. Die Transfektionseffizienz war insgesamt gering, so dass es nicht möglich war, eine höhere Vergrößerung zu wählen, da dann die weit auseinanderliegenden fluoreszierenden Zellen nicht mehr im Fokus zu finden waren. Diese geringe Transfektionsquote war bei allen gezeigten Fluoreszenzbetrachtungen ein Problem und scheint nicht spezifisch für ein bestimmtes Konstrukt. Somit muss vor Weiterführung dieser vielversprechenden Fluoreszenzuntersuchungen eine Verbesserung der Transfektionseffizienz voranzustellen sein, möglicherweise durch Verwendung viraler Transfektionssysteme.

Erste elektrophysiologische Untersuchungen der mit Fluoreszenzproteinen fusionierten $\text{CaV}\alpha_1.2a$ - und $\text{CaV}\beta_2$ -Untereinheiten sind im Anhang 2 zusammengefasst.

4.4 Anhang 1

4.4.1 Auswirkungen des CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins auf die Steady-State Inaktivierung bzw. Aktivierung im Vergleich zu CaV β 2a-N1, CaV β 2a-N4 und CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4

Die Steady-State Inaktivierung in Gegenwart des CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins ist im linken Teil der Abbildung 53a graphisch dargestellt. Man erkennt eine relative Rechtsverschiebung der Kurve in Gegenwart des Fusionsproteins im Vergleich zu den anderen Kurven. Die Stromkurve in Anwesenheit von CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4 liegt eng der durch CaV β 2a-N1 modifizierten Kurve an, unterscheidet sich aber von der unter Einfluss des CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins. Abbildung 53b zeigt, dass in Gegenwart des Fusionsproteins bei negativen Testpotenzialen von -70 bis -30 mV ein größerer Ca²⁺-Strom als mit den anderen CaV β 2a-Konstrukten erreicht wird. Bei -35 mV kreuzt die Stromkurve unter Einfluss von CaV β 2a-N4 die in Gegenwart des Fusionsproteins erreichte Kurve und steigt im Folgenden steiler als diese an, während letztere sich immer mehr den Kurven in Gegenwart von CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4 annähert. Die Ergebnisse sind nochmals in Tabelle 34 zusammengefasst.

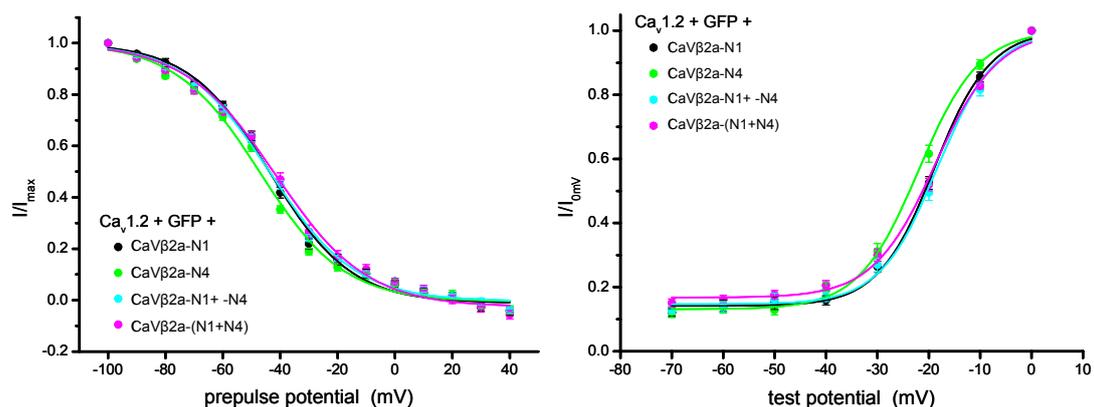


Abbildung 53: Beeinflussung der Steady-State Inaktivierung (links) bzw. Aktivierung (rechts) des CaV1.2-Kanals in Gegenwart des CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins im Vergleich zu CaV β 2a-N1, CaV β 2a-N4 und CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4

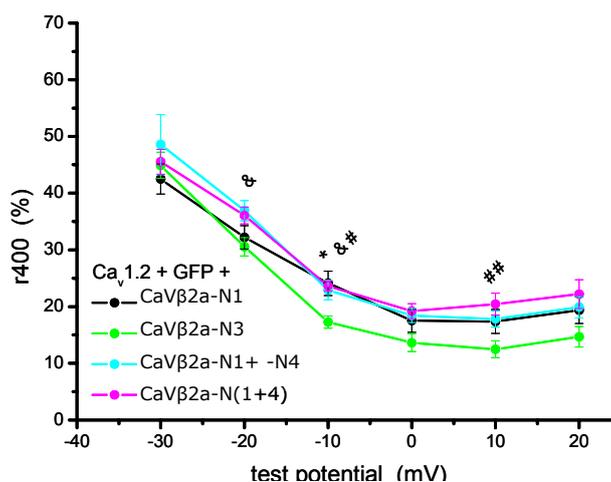
| | n | Steady-State Inaktivierung, $V_{1/2,ss-inact}$ (mV) | Steady-State Aktivierung, $V_{1/2,ss-act}$ (mV) |
|---------------------------------------|----|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| CaV β 2a-N1 | 24 | -43.47 \pm 1.09 | -18.96 \pm 0.58 |
| CaV β 2a-N4 | 26 | -47.05 \pm 0.72 | -21.96 \pm 0.75 |
| CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4 | 27 | -43.62 \pm 0.74 | -18.3 \pm 0.70 |
| CaV β 2a-(N1+N4) | 26 | -41.54 \pm 1.66 | -18.74 \pm 0.56 |
| N1 vs. (N1+N4) | | n.s. | n.s. |
| N4 vs. (N1+N4) | | p < 0.01 | p < 0.01 |
| N1 vs. N1 + N4 | | n.s. | n.s. |
| N4 vs. N1 + N4 | | n.s. | p < 0.001 |
| N1 + N4 vs. (N1 + N4) | | n.s. | n.s. |

Tabelle 35: Beeinflussung der Steady-State Inaktivierung bzw. -Aktivierung des L-Typ Ca²⁺-Kanals durch das Fusionsprotein im Vergleich zu CaV β 2a-N1, CaV β 2a-N4 und CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4

Aus Tabelle 34 wird deutlich, dass der Wert $V_{1/2,ss-inact}$ in Gegenwart von CaV β 2a-N4 signifikant bei negativeren Potentialen liegt als in Gegenwart des CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins. $V_{1/2,ss-act}$ ist in Anwesenheit von CaV β 2a-N4 im Vergleich zu CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4 und dem CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsprotein signifikant um 3.66 mV bzw. 3.22 mV zu hyperpolarisierenden Potentialen verschoben.

4.4.2 Auswirkungen des CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins auf die Inaktivierungs- und Aktivierungskinetik im Vergleich zu CaV β 2a-N1, CaV β 2a-N4 und CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4

Abbildung 54 zeigt, dass das Fusionsprotein hinsichtlich der Inaktivierungsrate r_{400} in Kapitel 4.1.4 beschriebenen Gruppe von CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4 zugeordnet werden kann. Im Verlauf zeigt sich eine signifikante Abweichung der Kurve des Fusionsproteins von der in Gegenwart von CaV β 2a-N4. Die Stromkurve in Gegenwart von CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4 gleicht ab -10 mV zunehmend der Kurve unter Einfluss von CaV β 2a-N1. Die Ergebnisse sind in Tabelle 35 zusammengefasst.



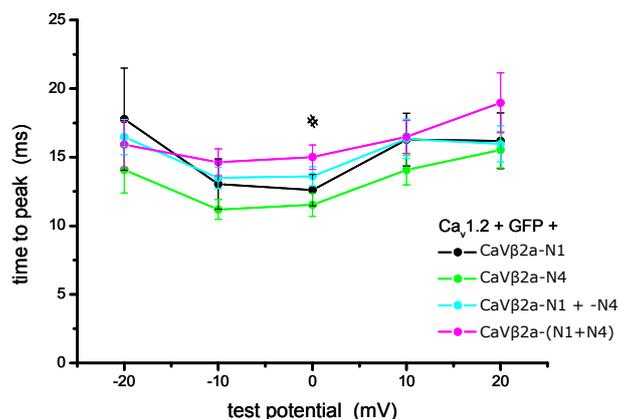
CaVβ2a-N1 vs. CaVβ2a-N4: * p<0.05 CaVβ2a-N4 vs. CaVβ2a-N1 + CaVβ2a-N4: & p<0.05; CaVβ2a-N4 vs. CaVβ2a-(N1-N4): # p<0.05, ## p<0.01

Abbildung 54: Residualströme 400 ms nach Depolarisation in Abhängigkeit von dem CaVβ2a-N1-CaVβ2a-N4-Fusionsprotein im Vergleich zu CaVβ2a-N1, CaVβ2a-N4 und CaVβ2a-N1 + CaVβ2a-N4

| | n | Inaktivierungsrate bei -20 mV | Inaktivierungsrate bei -10 mV | Inaktivierungsrate bei 0 mV | Inaktivierungsrate bei +10 mV |
|-----------------------|----|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| CaVβ2a-N1 | 24 | 32.20 ± 2.04 | 24.11 ± 2.17 | 17.5 ± 2.04 | 17.37 ± 2.11 |
| CaVβ2a-N4 | 26 | 30.55 ± 1.61 | 17.28 ± 1.05 | 13.63 ± 1.58 | 12.47 ± 1.46 |
| CaVβ2a-N1 + CaVβ2a-N4 | 27 | 36.91 ± 1.77 | 22.91 ± 1.76 | 18.44 ± 1.25 | 17.79 ± 1.43 |
| CaVβ2a-(N1+N4) | 26 | 36.07 ± 1.48 | 23.62 ± 0.90 | 19.2 ± 1.30 | 20.43 ± 1.94 |
| N1 vs. (N1+N4) | | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| N4 vs. (N1+N4) | | n.s. | p < 0.05 | n.s. | p < 0.01 |
| N1 vs. N1 + N4 | | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| N4 vs. N1 + N4 | | p < 0.05 | n.s. | n.s. | n.s. |
| N1 + N4 vs. (N1 + N4) | | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |

Tabelle 35: Vergleich der Inaktivierungsraten r400 für verschiedene Testpotenziale unter Einfluss des CaVβ2a-N1- CaVβ2a-N4-Fusionsproteins im Vergleich zu CaVβ2a-N1, CaVβ2a-N4 und CaVβ2a-N1 + CaVβ2a-N4

Für die Aktivierungskinetik des Ca²⁺-Stroms ergaben sich die in Abbildung 55 und Tabelle 36 dargestellten Ergebnisse: In Gegenwart von CaVβ2a-N4 erreichen die Ströme signifikant rascher ihr Maximum nach Depolarisation auf 0 mV als in Gegenwart des CaVβ2a-N1-CaVβ2a-N4-Fusionsproteins. Das Ergebnis ist in Tabelle 36 zusammengefasst.



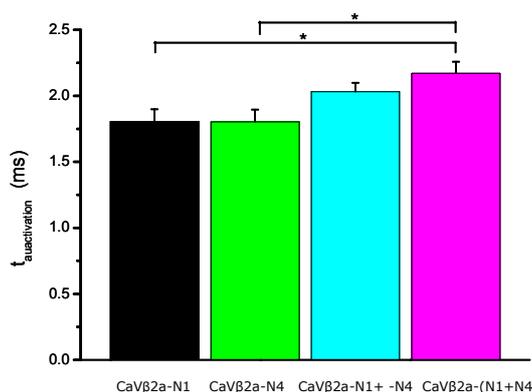
CaVβ2a-N4 vs. CaVβ2a-(N1 +N4): # p<0.05

Abbildung 55: Einfluss des CaVβ2a-N1-CaVβ2a-N4-Fusionsproteins auf die Aktivierungskinetik der Ca²⁺-Ströme im Vergleich zu CaVβ2a-N1, CaVβ2a-N4 und CaVβ2a-N1 + CaVβ2a-N4 gemessen als die Zeit, während der der Strom nach Depolarisation seine maximale Amplitude erreicht.

| | n | Time-to-peak bei 0 mV (ms) | |
|-----------------------|----|----------------------------|-------------------------|
| CaVβ2a-N1 | 24 | 12.6 ± 1.14 | N4 vs. (N1+ N4): p<0.05 |
| CaVβ2a-N4 | 26 | 11.54 ± 0.85 | |
| CaVβ2a-N1 + CaVβ2a-N4 | 27 | 13.61 ± 0.68 | |
| CaVβ2a-(N1+N4) | 26 | 15 ± 0.88 | |

Tabelle 36: Vergleich der Time-to-peak-Werte der Ströme bei 0 mV Testpotenzial in Gegenwart des CaVβ2a-N1- CaVβ2a-N4-Fusionsproteins im Vergleich zu CaVβ2a-N1, CaVβ2a-N4 und CaVβ2a-N1 + CaVβ2a-N4

Das CaVβ2a-N1-CaVβ2a-N4-Fusionsprotein zeigt einen signifikant unterschiedlichen Einfluss auf die Aktivierungszeitkonstante τ_{act} im Vergleich zu CaVβ2a-N1 und CaVβ2a-N4 (Abbildung 56). Dabei ist die Aktivierungszeitkonstante in Gegenwart von CaVβ2a-N1 + CaVβ2a-N4 signifikant kürzer als in Gegenwart des CaVβ2a-N1-CaVβ2a-N4-Fusionsproteins. Dieses Ergebnis ist in Tabelle 37 nochmals zusammengefasst.



* markiert $p < 0.05$

Abbildung 56: Einfluss des CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins auf die Aktivierungszeitkonstante τ_{act} im Vergleich zu CaV β 2a-N1, CaV β 2a-N4 und CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4

| | n | τ_{act} bei 0 mV | Signifikanter Unterschied bei 0 mV? |
|---------------------------------------|----|------------------------------|-------------------------------------|
| CaV β 2a-N1 | 24 | 1.81 ± 0.09 | N1 vs (N1+N4): $p < 0.05$ |
| CaV β 2a-N4 | 26 | 1.80 ± 0.09 | |
| CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4 | 27 | 2.03 ± 0.07 | N4 vs (N1+N4): $p < 0.05$ |
| CaV β 2a-(N1+N4) | 26 | 2.17 ± 0.09 | |

Tabelle 37: Werte der Aktivierungszeitkonstante τ_{act} für Ströme, die durch Depolarisation auf 0 mV aktiviert werden, in Gegenwart des CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins im Vergleich zu CaV β 2a-N1, CaV β 2a-N4 und CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4

4.4.3 Zusammenfassung der in den elektrophysiologischen Messungen erhaltenen Ergebnisse

Zusammenfassend wird deutlich, dass das Fusionsprotein im Vergleich zu CaV β 2-N1 bzw. CaV β 2a-N4 bei verschiedenen Testpotenzialen einen signifikant geringeren I_{Ca} aufweist und dass sich die CaV β 2a-(N1+N4)-Ströme als auch CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4 -Ströme in Bezug auf $V_{1/2}$ der Steady-State Aktivierung bzw. der Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik signifikant von CaV β 2a-N4-Strömen unterscheiden. Insgesamt betrachtet, verursachen das Fusionsprotein CaV β 2a-(N1+N4) und die Kotransfektion CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4 ähnliche Veränderungen der untersuchten Parameter (siehe Tabelle 38). Allerdings sind diese Veränderungen für das Fusionsprotein stärker ausgeprägt als bei der Kontransfektion, da durch die

Fusion der beiden CaV β 2-Varianten eher ein gleichzeitiges Wirken am Kanal geschieht als bei der Expression der einzelnen Proteine.

| | |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I_{Ca;0mV} | CaV β 2a-N1 vs. CaV β 2a-(N1+-N4) signifikant CaV β 2a-N4 vs. CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4 signifikant |
| G_{max} | nein |
| E_{rev} | nein |
| V_{1/2,act} | CaV β 2a-N4 vs. CaV β 2a-(N1+-N4) signifikant CaV β 2a-N4 vs. CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4 signifikant |
| k | nein |
| Steady-State-Inaktivierung | CaV β 2a-N4 vs CaV β 2a-(N1+-N4) signifikant |
| Steady-State-Aktivierung | V _{1/2,ss-act} für CaV β 2a-N4 vs. CaV β 2a -(N1+N4) signifikant V _{1/2,ss-act} für CaV β 2a-N4 vs.. CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4 signifikant |
| Inaktivierungsrate r400 | r400 für CaV β 2a-N4 vs. CaV β 2a-(N1+-N4) signifikant (bei -10, +20 mV) r400 für CaV β 2a-N4 vs.. CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4 signifikant (bei -20 mV) |
| time-to-peak | Time-to-peak für CaV β 2a-N4 vs.. CaV β 2a-(N1+ N4) signifikant |
| τ_{act} | τ_{act} für CaV β 2a-N1 vs. CaV β 2a-(N1+N4) signifikant τ_{act} für CaV β 2a-N4 vs. CaV β 2a-(N1+N4) signifikant |

Tabelle 38: Kanal- und Stromeigenschaften, die durch das CaV β 2a-Fusionsproteins im Vergleich zu CaV β 2a-N1 + CaV β 2a-N4, CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4 unterschiedlich beeinflusst werden

4.5 Anhang 2

4.5.1 Elektrophysiologische Untersuchungen der mit einem Fluoreszenzprotein fusionierten CaV α_1 1.2a- und CaV β 2-Untereinheiten

Um unabhängig von den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen die korrekte Funktion des CaV β 2a-mRFP- bzw. des CaV α_1 1.2a- pHluorin-Fusionsproteins zu überprüfen, wurden elektrophysiologische Messungen durchgeführt.

Elektrophysiologische Messungen an HEK293-Zellen nach Kotransfektion des CaV β 2a-N1- bzw. CaV β 2a-N4-mRFP-Fusionsproteins mit der nicht-fluoreszenzmarkierten CaV α_1 1.2a-Untereinheit ergaben folgende in Tabelle 39 und Tabelle 40 dargestellte Ergebnisse.

| | CaV β 2a-N1-mRFP-Fusionsprotein (n=8) | CaV β 2a-N1 (n=24) | CaV β 2a-N1-mRFP-Fusionsprotein vs. CaV β 2a-N1 |
|---------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------|
| I_{Ca, 0 mV} | -11.21 ± 3.18 | -9.34 ± 1.31 | n.s. |
| G_{max} | 0.26 ± 0.07 | 0.19 ± 0.03 | p < 0.036 |
| E_{rev} | 49.39 ± 2.27 | 57.88 ± 1.96 | n.s. |
| V_{1/2, act} | -16.94 ± 1.25 | -16.91 ± 1.02 | n.s. |
| k | 10.35 ± 1.54 | 9.23 ± 0.65 | n.s. |
| τ_{act} | 2.51 ± 0.47 | 1.81 ± 0.09 | p < 0.0001 |
| V_{1/2,ss-act} | -22.31 ± 0.91 | - 18.96 ± 0.58 | n.s. |
| V_{1/2,ss-inact} | -45.74 ± 2.25 | -43.47 ± 1.09* | n.s. |
| r400 -10mV | 15.4 ± 2.05 | 24.11 ± 2.17 | n.s. |
| r400 0mV | 8.27 ± 1.13 | 17.50 ± 2.03 | p < 0.0025 |
| r400 10 mV | 7.48 ± 1.98 | 17.37 ± 2.11 | n.s. |
| Time to peak -10 mV | 14.23 ± 1.4 | 13.04 ± 1.83 | p < 0.019 |
| Time to peak 0 mV | 13.38 ± 1.65 | 12.6 ± 1.14 | n.s. |
| Time to peak 10 mV | 17.15 ± 1.10 | 16.28 ± 1.92 | p < 0.0029 |

Tabelle 39: Vergleich der gemessenen Parameter in Gegenwart des CaV β 2a-N1-mRFP-Fusionsproteins und CaV α_1 1.2a bzw. CaV β 2a-N1 und CaV α_1 1.2a

| | CaV β 2a-N4-mRFP-Fusionsprotein (n = 8) | CaV β 2a-N4 (n=26) | CaV β 2a-N4-mRFP-Fusionsprotein vs. CaV β 2a-N4 |
|---------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------|
| I_{Ca,0 mV} | -9.92 ± 1.33 | -10.03 ± 1.16 | n.s. |
| G_{max} | 0.18 ± 0.02 | 0.18 ± 0.02 | n.s. |
| E_{rev} | 61.25 ± 1.78 | 58.37 ± 1.45 | n.s. |
| V_{1/2,act} | -15.73 ± 1.03 | -19.79 ± 0.84 | n.s. |
| k | 9.83 ± 0.78 | 8.98 ± 0.60 | n.s. |
| τ_{act} | 2.00 ± 0.1 | 1.80 ± 0.09 | n.s. |
| V_{1/2,ss-act} | -18.91 ± 0.86 | -21.96 ± 0.75 | n.s. |
| V_{1/2,ss-inact} | -43.15 ± 1.19 | -47.05 ± 0.72 | p < 0.026 |
| r400 -10mV | 16.57 ± 2.85 | 17.28 ± 1.05 | p < 0.0001 |
| r400 0mV | 12.52 ± 2.12 | 13.63 ± 1.58 | n.s. |
| r400 10 mV | 12.33 ± 1.67 | 12.47 ± 1.46 | n.s. |
| Time to peak -10 mV | 13.57 ± 0.91 | 11.18 ± 0.72 | n.s. |
| Time to peak 0 mV | 13.49 ± 1.39 | 11.54 ± 0.85 | p < 0.02 |
| Time to peak 10 mV | 15.25 ± 1.46 | 10.71 ± 1.19 | n.s. |

Tabelle 40: Vergleich der gemessenen Parameter in Gegenwart des CaV β 2a-N4-mRFP-Fusionsproteins und CaV α _{1.2a} bzw. CaV β 2a-N4 und CaV α _{1.2a}

Die Tabellen 39 und 40 zeigen, dass die Fusion des Fluoreszenzproteins mRFP sowohl bei C-terminaler Fusion mit CaV β 2a-N1 als auch CaV β 2a-N4 Auswirkungen auf die Modulation der Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken des Kanals in Gegenwart der Untereinheiten besitzt. Dabei zeigt der Kanal eine teils signifikant frühere Inaktivierung und spätere Aktivierung. In Bezug auf die anderen gemessenen Parameter I_{Ca}, G_{max} (für CaV β 2a-N4), E_{rev}, V_{1/2,act} und k ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

Die Kofusion des CaV α _{1.2a}-s-pHluorin- (Fusion des pHluorins in der Extrazellulärschleife) und CaV β 2a-N4-mRFP-Fusionsproteins für die Patch-clamp-Experimente zeigte - wie auch unter 4.3.1.2.4 beschrieben - leider nur eine sehr geringe Transfektionseffizienz. Einzelne Zellen wiesen eine rote, nicht aber eine grüne oder gelbe Färbung auf. Zum Teil konnte in den rot fluoreszierenden Zellen ein kleiner Ca²⁺-Strom gemessen werden. Das Ergebnis ist in Tabelle 41 im Vergleich zum gemessenen I_{Ca} in Gegenwart der nichtfluoreszenzmarkierten CaV α _{1.2a} und CaV β 2a-N4 gezeigt.

| | CaV$\alpha_1$1.2a-s-pHluorin + CaVβ2a-N4-mRFP (n=6) | CaV$\alpha_1$1.2a + CaVβ2a-N4 (n=26) |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| I_{Ca, 0 mV} | -1.86 \pm 0.29 | -10.03 \pm 1.16 |

Tabelle 41: Vergleich des I_{Ca, 0mV} in Gegenwart des CaV α_1 1.2a-s-pHluorin- (Fusion des pHluorins in der Extrazellulärschleife) und CaV β 2a-N4-mRFP-Fusionsproteins bzw. CaV α_1 1.2a und CaV β 2a-N4

5 Diskussion

Die Diskussion dieser Arbeit gliedert sich in sechs Abschnitte, die im Folgenden einzeln diskutiert werden. Die ersten vier Abschnitte beziehen sich auf Teil 1 der Ergebnisse und umfassen:

1. Identifizierung von CaV β 2-Splei β varianten in Mausherz unterschiedlicher Entwicklungsstadien
2. Amplifizierung von cDNS-Fragmenten aus isolierten Kardiomyozyten mittels Polymerase-Kettenreaktion
3. Interaktion von CaV β 2-Proteinen
4. Elektrophysiologische Untersuchungen zur Charakterisierung der verschiedenen CaV β 2-Splei β varianten

Der fünfte und sechste Abschnitt beziehen sich auf Ergebnisteil 2 und Ergebnisteil 3:

5. Klonierung und Sequenzanalyse der CaV α _{1.2}-Untereinheit
6. In vivo-Betrachtungen fluoreszenzmarkierter CaV α _{1.2}- und CaV β 2-Untereinheiten

5.1 Identifizierung von CaV β 2-Splei β varianten

5.1.1 Western Blot-Analyse - Vergleich mit den Ergebnissen von Haase et al. (61)

Die schon beschriebene Westernblot-Analyse (siehe Kapitel 2.6 und 4.1.1.2) im linken Teil der Abbildung 57 zeigt, dass die CaV β 2-Untereinheit im Verlauf der Herzentwicklung eine Modifikation unbekannter Art erfährt. Man sieht, dass die Antikörper-markierten CaV β 2-Proteine während früher Entwicklungsstadien im Gel deutlich höher bzw. langsamer laufen, als dies für die korrespondierenden in adulten Mausherzen (P28) der Fall ist. Im Übergang von fetalen zu postnatalen Stadien (E17.5 bis P7) sind beide Protein-Banden nebeneinander sichtbar. Bereits ab E11.5 ist ein Signal für die CaV β 2-Untereinheit bei ca. 74 kDa sichtbar. Ab E12.5 lässt sich zudem eine im Vergleich tiefer liegende Protein-Bande im Gel bei ca. 68 kDa

erkennen. An P0 zeigt sich eine in etwa äquivalente Signalstärke der beiden Banden, während an P7 bereits die Signalstärke der unteren Bande überwiegt und an P28 nur noch die ursprünglich tiefer liegende Bande sichtbar ist.

Eine ähnliche Western Blot-Analyse wurde bereits im Jahr 2000 von *Haase et al.* (61) mit Proteinfractionen aus Mausherzgewebe durchgeführt. *Haase et al.* können allerdings an E15 noch kein CaV β 2-Signal detektieren. An P1 bis 3 zeigen sich dagegen vier Banden unterschiedlicher Intensität, die stärkste bei etwa 85 kDa und zwei weitere schwache Banden bei etwa 90 bzw. 100 kDa sowie eine weitere bei etwa 50 kDa (siehe mittlerer Teil der Abbildung 57). Der rechte Teil der Abbildung 57 zeigt einen Western Blot von *Haase et al.* mit Proteinfractionen aus Rattenherzgewebe unterschiedlichen Alters. An Tag E14 wurde noch kein CaV β 2-Signal identifiziert. An E20 sieht man wie im mittleren Teil der Abbildung 57 drei Banden unterschiedlicher Signalstärke, wobei die 85 kDa-Bande die stärkste Signalintensität aufweist. Ab P14 sind nur noch die 85 kDa und 90 kDa Bande sichtbar. Letztere nimmt an Signalstärke kontinuierlich ab, bis sie an P72 kaum mehr erkennbar ist.

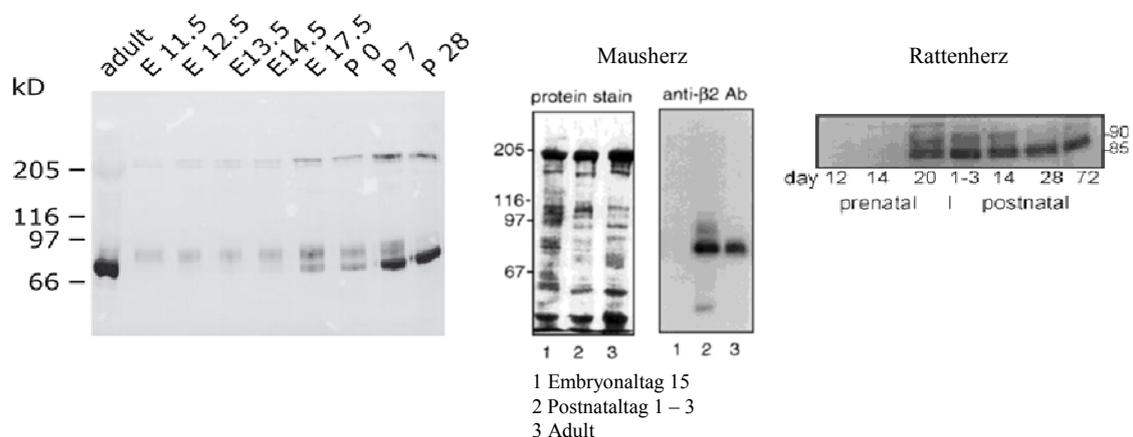


Abbildung 57: Vergleich der Western Blot-Analyse dieser Arbeit (links) mit denen der Publikation von *Haase et al.* (61) (Mitte und rechts)

Durch parallele Proteinfärbungen wie im mittleren Teil der Abbildung 57 zu sehen, versuchten *Haase et al.* die Signalstärke der Banden im Western Blot mit der Proteinexpression zu korrelieren. Der Vergleich zeigt, dass der in der hier vorgelegten Arbeit verwendete Antikörper wesentlich sensitiver ist, die CaV β 2-Untereinheit deutlich früher erkennt und diese somit nicht, wie von *Haase et al.* beschrieben, erst ab E15 bzw. postnatal (P1-3), sondern bereits an E11.5 detektiert.

Auf die Proteine, die in den Untersuchungen von dem Anti-CaV β 2-Antikörper erkannt werden, gehen *Haase et al.* nicht näher ein. Sie spekulieren lediglich über die Expression unterschiedlicher CaV β 2-Transkripte in fetalen und neonatalen Herzen im Vergleich zu adulten, in Anlehnung an eine Publikation von *Diebold et al.* (41), welche die Existenz entwicklungsabhängiger Expression zweier CaV α 1.2-Spleißvarianten aufzeigte.

Die unter 4.1.1.4 in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Untersuchung schließt die Expression einer spezifischen neonatalen Spleißvariante aus (siehe auch 5.1.1.2) und weist auf eine andere Ursache für die entwicklungsabhängige Veränderung des Proteinmusters im Western Blot hin (siehe 4.1.3.1 und 4.1.1.5). In dieser Arbeit dargestellte Ergebnisse zeigen, dass Spleißvarianten der CaV β 2-Untereinheit existieren und dass sich ändernde Expressionsverhältnisse der CaV β 2-Spleißvarianten eine plausible Erklärung für beobachtete Veränderungen des Proteinmusters sind. Andere Möglichkeiten sind auszuschließen und werden in den Abschnitten 5.1.1.1 und 5.1.1.2 diskutiert.

5.1.1.1 Einfluss posttranslationaler Modifikationen auf die Western Blot-Analyse

Laufunterschiede von Proteinen im SDS-Gel sind meist durch unterschiedliche Aminosäuresequenzlängen oder posttranslationale Modifikationen bedingt. CaV β 2-Untereinheiten sind Substrate für eine dynamische und reversible Phosphorylierung durch eine große Zahl von Proteinkinasen (43). *Hullin et al.* (72) identifizierten in der CaV β 2-Untereinheit von Kaninchen eine Phosphorylierungsdomäne der Proteinkinase A (Substratmotiv R/K X S/T, wobei S oder T phosphoryliert wird) unmittelbar vor Beginn der zweiten variablen Region sowie vier potentielle Proteinkinase C-Phosphorylierungsstellen (Substratmotiv: Ser/Thr-X-Lys/Arg), eine im Bereich der ersten konstanten Region, drei im Bereich der zweiten konstanten Region und vier Caseinkinase II -Konsensussequenzen (Substratmotiv: Ser/Thr-X-X-Asp/Glu), zwei in der ersten konstanten Region, zwei in der zweiten konstanten Region. Inzwischen sind noch weit mehr Phosphorylierungskonsensus-Stellen der CaV β 2-Untereinheit bekannt, z.B. in der CaV β 2-Untereinheit von Hund (60), Ratte (57, 17) und Kaninchen (169). Jüngste Publikationen weisen beispielsweise eine Phosphorylierung der CaV β 2-Untereinheit durch die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase II (57) sowie die Proteinkinase G (169) nach und zwar ebenfalls in Regionen des Proteins, die keinen alternativen Spleißvorgängen unterworfen sind.

Die Konsensusstellen befinden sich alle innerhalb von Regionen der CaV β 2-Untereinheit, für welche alle in dieser Arbeit identifizierten CaV β 2-Klone identische Sequenzen aufweisen und somit kein entsprechendes Korrelat für unterschiedliche Phosphorylierungsmuster der

CaV β 2a-Spleißvarianten bieten. Tatsächlich sind die genannten Phosphorylierungssequenzmotive in der Sequenz der CaV β 2-Untereinheit von Maus konserviert. In den variablen N-terminalen Sequenzabschnitten, die - wie in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt - durch alternatives Spleißen entstehen, lassen sich nur in der Sequenz des N1-Terminus drei Phosphorylierungssequenzmotive vorhersagen (Tabelle 42), für die übrigen N-Termini sind keine entsprechenden Konsensusstellen zu finden.

| CaV β 2-Isoform | N-terminale Sequenz |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| CaV β 2a-N1 | MVQSDTSKSPVAAVAQESQMELLESAAPAGALGAQSYGKGARRK NRFKGS DGS TSS D T T S N S F V R C A G G S A |
| CaV β 2a-N3 | MQCCGLVHRRRVRVSY GSA |
| CaV β 2a-N4 | MLDRQLVSSQTQSSIPG GSA |
| CaV β 2a-N5 | MKATWIRLLKRAKGGRLKSSDIC GSA |

Tabelle 42: Aminosäuresequenzen der N-Termini der CaV β 2a-Spleißvarianten mit farbig markierten Phosphorylierungskonsensusstellen (orange, Proteinkinase C; grün, Caseinkinase II); GSA (blau) kennzeichnet die ersten drei AS-Reste der ersten konstanten Region.

Ob eine vorhergesagte Konsensusregion allerdings wirklich einer *in vivo*-Phosphorylierung unterliegt, ist z.B. davon abhängig, ob die entsprechende Kinase Zugang zu diesem bestimmten Sequenzabschnitt besitzt. Somit kann über eine mögliche Phosphorylierung des N1-Terminus nur spekuliert werden, zumal eine spezifische Phosphorylierung nicht nachgewiesen wurde und auch die dreidimensionale Struktur dieses Proteinabschnitts unbekannt ist (155).

Die elektrophoretischen Laufeigenschaften im SDS-Gel von CaV β 2a-N1 und den übrigen Spleißvarianten lassen sich mit den errechneten Molekulargewichten (74 zu 68 kDa) der in dieser Arbeit identifizierten und klonierten cDNS erklären, könnten aber durch eine zusätzliche Phosphorylierung der CaV β 2a-N1 noch verändert werden. Primär verantwortlich für den beobachteten Unterschied bezüglich der Laufeigenschaften im Gel sind demnach die alternativen Spleißvorgänge, wobei CaV β 2a-N1 das deutlich höchste Molekulargewicht besitzt.

Vom N3-Terminus der CaV β 2-Untereinheit ist bekannt, dass er einer posttranslationalen Palmitoylierung unterliegt (11), die die Laufeigenschaften des Proteins im SDS-Gel beeinflussen könnte. Das Ergebnis der PCR mit isolierten Kardiomyozyten in dieser Arbeit (siehe 4.1.2) zeigt jedoch, dass diese Spleißvariante in Kardiomyozyten nicht exprimiert wird. Eine geringgradige Expression kann trotz der eindeutigen PCR-Resultate nicht vollständig ausgeschlossen werden; für den Fall einer solchen geringen Expression wäre ein Proteinnachweis im Western Blot eher nicht zu erwarten.

5.1.1.2 Existenz einer unbekanntenen fetalen CaV β 2-Spleißvariante

Die Existenz einer im fetalen und neonatalen Herz exprimierten unbekanntenen Spleißvariante konnte aufgrund der Ergebnisse des systematischen Screenings der P7-cDNS-Bibliotheken ausgeschlossen werden. Die Methodik zur Erstellung cDNS-Bibliotheken und Analyse der erhaltenen Transkripte war so gewählt, dass auch Spleißvarianten unbekannter Sequenz mit großer Wahrscheinlichkeit detektiert werden konnten, indem die Hybridisierungs sonden komplementär zu den konstanten Regionen der CaV β 2-Untereinheit waren (siehe 5.1.2.5 und 4.4.1.1.4.5). Die in den P7-cDNS-Bibliotheken als auch in der Adult-cDNS-Bibliothek isolierten CaV β 2-Transkripte/cDNS-Klone enthielten Sequenzabschnitte, die homolog zu Sequenzabschnitten waren, die als Teil von CaV β 2-Proteinen anderer Spezies identifiziert sind.

5.1.2 Systematische Untersuchung von CaV β 2-Spleißvarianten - Methodik

Zwar waren in Bezug auf die CaV β 2-Untereinheit zahlreiche Spleißvarianten bereits bekannt; eine systematische Untersuchung der in Mausherzgewebe vorkommenden Varianten und die Untersuchung deren Expressionsverhältnisses stand jedoch aus. Auch die im Rahmen dieser Forschungsarbeiten verwendete Methodik zur Erstellung und Durchmusterung der cDNS-Bibliotheken war bisher auf diese Fragestellung nicht angewendet worden. So gründen die jüngsten der in der Literatur dieses Thema betreffenden Veröffentlichungen auf der Methode der PCR-Amplifizierung von CaV β 2-Fragmenten aus cDNS. Diese Arbeiten werden in den folgenden Abschnitten hinsichtlich Methodik und Ergebnisse kurz vorgestellt und die jeweilige Vorgehensweise mit der in dieser Arbeit angewendeten Methode verglichen.

5.1.2.1 Takahashi et al. (146)

Takahashi et al. amplifizierten die CaV β 2-Spleißvarianten CaV β 2a-N1, -N2, -N3, -N5 bzw. CaV β 2a-N4 aus cDNS-Bibliotheken die mit mRNA von menschlichem Hirn- bzw. Herzgewebe von der Firma Clontech hergestellt waren.

Dabei wählte die Arbeitsgruppe folgendes Vorgehen: Die High Throughput Genomic Sequences (HGTS-) Datenbank enthält unvollständige cDNS-Sequenzen, die für BLAST homology searches zur Verfügung stehen und diese Datenbank wurde mittels der Nukleotidsequenzen der fünf bekannten, aus unterschiedlichen Spezies klonierten CaV β 2-Spleißvarianten nach entsprechenden menschlichen Sequenzabschnitten hin durchsucht. Anhand der gefundenen Sequenzen wurde ein Forward-Primer entsprechend der 5' kodierenden Sequenz jeder CaV β 2-

Spleißvariante hergestellt. Die Reverse-Primer waren jeweils komplementär zum 3' Ende der kodierenden Sequenzen. Mit diesen Primern wurden cDNS von CaV β 2-Spleißvarianten mittels PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert. Der Schwerpunkt dieser Veröffentlichung lag weniger auf der Identifizierung neuer CaV β 2-Spleißvarianten als mehr auf deren elektrophysiologischer Charakterisierung. Das Ergebnis der Publikation von *Takahashi et al.* zeigte aber erstmals, dass alle fünf identifizierten N-terminalen CaV β 2-Spleißvarianten innerhalb einer Spezies, in dieser Studie Mensch, vorkommen.

5.1.2.2 Foell et al. (50)

Foell et al. (50) untersuchten die Expression von CaV β 2-Spleißvarianten in menschlichem Ventrikelmyokard. Die Arbeitsgruppe benutzte fünf verschiedene Forward-Primer für die bekannten CaV β 2-Spleißvarianten. Die Reverse-Primer wurden stets so gewählt, dass sie die zweite variable Region mitumfassten. Nach Amplifikation und Sequenzierung der Fragmente konnten *Foell et al.* zeigen, dass eine Amplifizierung von vier der fünf Aminotermini in menschlichem Herzgewebe exprimiert sind. CaV β 2-N3-spezifische Fragmente konnten nicht amplifiziert werden. Zusätzlich konnte die Arbeitsgruppe cDNS-Fragmente amplifizieren, die sich in der Sequenz der V2-Region unterschieden.

5.1.2.3 Herzig et al. (67)

Wie *Foell et al.* (50) gingen auch *Herzig et al.* von aus menschlichem Ventrikelmyokard isolierter mRNA aus. Um Informationen über die quantitative Expression der CaV β 2-Spleißvarianten zu gewinnen, wurde eine Real-Time-PCR mit jeweils einem der fünf N-Terminus-spezifischen Forward-Primer durchgeführt. Der Reverse-Primer war komplementär zu einem Sequenzabschnitt der ersten konstanten Region. Es konnten alle fünf bekannten N-Termini der CaV β 2-Untereinheit mit dieser Vorgehensweise amplifiziert werden. Zudem erfolgte die Klonierung von Vollängenkonstrukten aus zwei Teilfragmenten. Eines umfasste jeweils die kodierende Sequenz des N-Terminus bis zum Ende der zweiten konstanten Region, das andere die kodierende Sequenz des C-Terminus (V3-Region) der CaV β 2-Untereinheit. *Herzig et al.* beschreiben keine Unterschiede in der V2-Region. Alle Klone enthielten das Exon 7A.

5.1.2.4 Harry et al. (63)

Harry et al. untersuchten CaV β 2-Spleißvarianten mittels Poly(A)⁺RNS von menschlichem Herz, die von BD Biosciences Clontech vertrieben wird. Die Arbeitsgruppe verwendete zur

cDNS-Synthese einen Primer komplementär zur 3'-untranslatierten Region der CaV β 2-Untereinheit. Für die PCR-Amplifikation von CaV β 2-Spleißvarianten aus der cDNS wurden spezifische Primer für die 5'-kodierende Sequenz der CaV β 2-N1 bzw. -N4-Spleißvariante gewählt. Der Reverse-Primer lag 5' zum Erststrang-Primer innerhalb der 3'-untranslatierten Region. Nach Durchführung der PCR wurden die einzelnen Ansätze einer zweiten Amplifikationsrunde unterzogen, wobei der Reverse-Primer jetzt komplementär zum 3'-Ende der kodierenden Sequenz gewählt wurde. Die erhaltenen Vollängenklone wurden kloniert und sequenziert. Dabei identifizierte die Arbeitsgruppe zwei bisher unbekannte CaV β 2-Transkripte, in denen die für die SH3- und NK-Domänen kodierenden Exons weitgehend bzw. vollständig fehlten.

5.1.2.5 Methodenvergleich der vorgestellten Arbeiten

In Tabelle 43 sind die in den vorgestellten Publikationen verwendeten Vorgehensweisen im Hinblick auf die mögliche Interpretation der erzielten Daten im Vergleich zur Vorgehensweise im Rahmen dieser Arbeit dargestellt.

| | Spezies | Erfassung nicht bekannter N-Termini (V1-Region) | Erfassung von alternativen Spleißvorgängen der V2-Region | Erfassung von alternativen Spleißvorgängen der V3-Region | Erfassung von Vollängenklonen | Erfassung des zahlenmäßigen Verhältnisses der Varianten zueinander |
|-------------------------------|---------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| diese Arbeit | Maus | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja |
| <i>Takahashi et al. (146)</i> | Mensch | Nein | Ja | Ja/Nein* | Ja | Nein |
| <i>Foell et al. (50)</i> | Mensch | Nein | Ja | Ja/Nein* | Nein | Nein |
| <i>Harry et al. (63)</i> | Mensch | Nein | Ja | Ja/Nein* | Ja | Nein |
| <i>Herzig et al. (67)</i> | Mensch | Nein | Ja/Nein | Nein | Nein | Ja |

* eingeschränkt möglich, s.u.

Tabelle 43: Aussagen, die aufgrund der gewählten experimentellen Vorgehensweise in den gesamten Untersuchungen möglich sind

Im Unterschied zu den publizierten Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Forschungsarbeit keine PCR-Amplifikationen zur Identifizierung von Spleißvarianten verwendet, sondern Hybridisierungs sonden zum Screening der cDNS-Bibliotheken eingesetzt, die zu den konstanten Regionen der CaV β 2-Spleißvarianten komplementär waren. Das Durchmustern der cDNS-Bibliotheken mit diesen Sonden erlaubte es, alle exprimierten CaV β 2-Spleißvarianten zu isolieren, ohne dass eine Notwendigkeit zur Kenntnis der Sequenz der variablen Regionen oder

des N-Terminus bestand. Die einzige Einschränkung ergab sich aus den Hybridisierungssonden, die die konstanten Regionen umfassten. Weiter erlaubte die hier verwendete Methode, ein zahlenmäßiges Verhältnis der CaV β 2-Spleißvarianten zu erhalten. Die Zahl der aus den cDNS-Bibliotheken isolierten Klone einzelner Varianten sollte deren Expressionsverhältnis widerspiegeln. So sollten Transkripte, die in großer Zahl in der Zelle vorkommen, entsprechend häufiger in der cDNS-Bibliothek repräsentiert sein und als Klone isoliert werden. Zusammenfassend bietet nur die Vorgehensweise der hier vorliegenden Arbeit die „un-biased“ Identifizierung von unabhängigen cDNS-Klonen und eine Abschätzung der Häufigkeit ihrer Transkripte *in vivo*.

Einen alternativen Ansatz zur Untersuchung des Expressionsverhältnisses auf Transkriptebene bietet die Real-Time-PCR, welche von *Herzig et al.* (67) durchgeführt wurde. Allerdings ist diese Vorgehensweise auf definierte Primerpaare angewiesen: Ein Vergleich der Ergebnisse von *Herzig et al.* (67) mit den Resultaten dieser Arbeit erfolgt in 5.1.4.3.

Da die CaV β 2-Untereinheiten in Herzgewebe im Bereich der den N-Terminus und die V2-Region-kodierenden Sequenzen variieren (50), war es leicht möglich, mit Hilfe von cDNS-Bibliotheken beide Regionen parallel zu untersuchen. Hierzu wurde der Primer zur Erstellung des Erststranges komplementär zur zweiten konstanten Region gewählt, so dass so die Mehrzahl der Klone sowohl die kodierende Sequenz der N-terminalen variablen Region als auch der V2-Region beinhaltet. Dadurch war die Beantwortung der Frage möglich, ob in kardialen CaV β 2-Untereinheiten alternative Spleißvorgänge der V2-Region stattfinden und in welcher Häufigkeit sie stattfinden. Die Möglichkeit allein zur Erfassung potentieller Spleißvorgänge der V2-Region bestand bei allen Vorgehensweisen der in Tabelle 43 aufgelisteten Arbeiten.

Die in dieser Arbeit verwendete Methode bot im Gegensatz zu den anderen Methoden weiterhin auch die Möglichkeit zur Isolierung unbekannter Spleißvarianten der V3-Region. Durch die Verwendung von Zufallsprimern war es möglich, die C-terminale Region unabhängig von einer bestimmten Primersequenz zu amplifizieren. Die Untersuchung der V3-Region war mit der von den Arbeitsgruppen *Foell et al.* (50), *Harry et al.* (63) und *Herzig et al.* (67) gewählten Methodik nur in begrenztem Maß möglich, da die jeweiligen Reverse-Primer komplementär zum 3'-Ende der V3-Region waren, die den C-Terminus der CaV β 2-Untereinheit kodiert. Von der Primersequenz abweichende Sequenzen können somit nicht erfasst werden. Die Untersuchung der V3-Region war nicht Schwerpunkt dieser Arbeit, da für die CaV β 2-Untereinheit keine Sequenzunterschiede in dieser Region bisher beschrieben sind. Trotzdem galt es, die C-terminalen Sequenzen der erhaltenen Klone systematisch zu analysieren, da beispielsweise für die CaV β 1-Untereinheit Spleißvorgänge der V3-Region bekannt sind (50,

70). Alle mittels der cDNS-Bibliotheken isolierten CaV β 2-Spleißvarianten besaßen eine identische V3-Region.

Ein kleiner Teil des GSP kann durchaus an mRNA-Transkripte binden, die nicht exakt komplementär sind. Es konnten aus den GSP-cDNS-Bibliotheken wie auch aus der P7-Random-cDNS-Bibliothek CaV β 2-Volllängklone erhalten werden, die weiteren Aufschluss über die Exonabfolgen der CaV β 2-Untereinheit gaben. Insgesamt wurden drei Klone, die Sequenzabschnitte 3' des GSP enthalten, aus den GSP-cDNS-Bibliotheken identifiziert - im Vergleich zu 36 spezifisch geprimten Klonen. Auch in den Arbeiten von *Takahashi et al.* (146) und *Harry et al.* (63) wurden Volllängklone analysiert, *Foell et al.* (50) sowie *Herzig et al.* (67) dagegen amplifizierten nur DNS-Fragmente, die die Sequenz des N-Terminus bis hin zur zweiten konstanten Region kodierten.

5.1.3 Vergleich identifizierter CaV β 2a-Spleißvarianten in Mauserherz

Es wurden vier verschiedene CaV β 2-Spleißvarianten identifiziert, die sich untereinander ausschließlich in ihrem Aminoterminus unterscheiden. Diese wurden anhand der Aminosäuresequenz ihres N-Terminus bzw. ihrer V2-Region nach der an *Foell et al.* (50) orientierten Nomenklatur als CaV β 2a-N1, CaV β 2a-N3, CaV β 2a-N4 und CaV β 2a-N5 benannt.

Bislang ist unklar, welche CaV β 2-Spleißvarianten in Herzgewebe koexprimiert sind und in welchem Verhältnis sie zueinander stehen. Teils kontroverse Resultate zu diesem Thema wurden in den letzten Jahren publiziert (168, 167, 50, 63). So sind beispielsweise die von *Harry et al.* (63) beschriebenen CaV β 2-Spleißvarianten (siehe 4.1.1.5.2) mit Hilfe zweier aufeinanderfolgender PCR-Reaktionen identifiziert worden; wenn überhaupt, werden sie nur in sehr geringen Mengen in Herzgewebe exprimiert. Die identifizierten Spleißvarianten besitzen keine C1- und C2-Regionen, die für viele Funktionen der CaV β 2-Untereinheit eine essentielle Rolle spielen (siehe 2.4.2.1.1 und 2.4.2.1.2); andere besitzen nur einen Anteil der C1- und C2-Region. Die von *Harry et al.* (63) als CaV β 2g bezeichnete Variante enthielt erst nach nachträglicher Deletion der ersten 91 Aminosäuren einen durchgängigen Leserahmen. Somit bleibt fraglich, ob die Spleißvarianten in dieser Form tatsächlich in vivo existieren und für funktionelle CaV β 2-Untereinheiten kodieren. Im Weiteren werden deshalb die Publikationen von *Foell et al.* (50) und *Herzig et al.* (67) zum Vergleich der Expression bestimmter CaV β 2-Spleißvarianten in Herzgewebe herangezogen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass Herzgewebe von Hund (50) und Mensch (50, 67) diesen Untersuchungen zugrunde lag.

Foell et al. (50) isolierten aus menschlichem Ventrikelmyokard vier der fünf bekannten CaV β 2-N-Termini. CaV β 2-N3 konnte nicht amplifiziert werden. Alle vier N-Termini kamen in Kombination mit Exon 7A vor. Zusätzlich fanden *Foell et al.* noch drei weitere Spleißvarianten der V2-Region. Hierbei trat Exon 7B ausschließlich zusammen mit dem N4-Terminus auf, während Exon 7C jeweils in Kombination mit dem N1-, N2- oder N4-Terminus gefunden wurde. Ein Klon mit N4-Terminus enthielt kein Exon 7. *Herzig et al.* (67) hingegen konnten alle fünf N-terminalen CaV β 2-Spleißvarianten aus menschlichem Ventrikelmyokard isolieren. Auch wurde das Expressionsverhältnis der Spleißvarianten bestimmt. Dabei war CaV β 2-N3 die am geringsten exprimierte Variante, wohingegen die Expression von CaV β 2-N4 vor CaV β 2-N2 an erster Stelle stand. Die V2-Region wurde bei allen Klonen durch Exon 7A repräsentiert.

In dieser Arbeit an Mauserherz fanden sich beim Screening der cDNS-Bibliotheken vier der fünf bekannten CaV β 2-N-Termini. Für den N2-Terminus konnte kein Klon isoliert werden. Auch für den N3-Terminus wurde lediglich ein Klon gefunden. Alle sequenzierten Klone enthielten einheitlich das Exon 7A unabhängig von ihrem N-Terminus.

5.1.3.1 N2-Terminus

Der Vergleich der Resultate von *Foell et al.* (50), *Herzig et al.* (67) und der Untersuchungen dieser Arbeit deutet darauf hin, dass speziesspezifische Unterschiede in Bezug auf die Expression verschiedener CaV β 2-Spleißvarianten vorhanden sind. So scheint der N2-Terminus in Herzgewebe von Maus nicht oder nur in sehr geringem Maße exprimiert zu sein, da ein solcher Klon aus unseren cDNS-Bibliotheken nicht isoliert werden konnte und auch in der Literatur kein Hinweis auf die Identifizierung des N2-Terminus in Mausgewebe existiert. Im Gegensatz dazu gibt es mehrere Publikationen, die eine Expression dieser N-terminalen Spleißvariante in Gewebe von Mensch und Kaninchen zeigen (67, 146, 72).

5.1.3.2 N3-Terminus

Die Frage nach der Expression des N3-Terminus in Herzgewebe bleibt weiterhin strittig. Beim Vergleich der Literatur gelang es Arbeitsgruppen, diese Spleißvariante aus Herzgewebe zu isolieren (67, 168, 119), während andere negative Amplifikationsergebnisse erzielten (121, 50). Mittels der cDNS-Bibliotheken wurde ein einziger Klon für CaV β 2-N3 gefunden, was für eine Expression in Herzgewebe auf sehr niedrigem Niveau oder in einem anderen Gewebe, z.B. in Gefäßmuskulatur oder Nerven spricht, da zur mRNS-Gewinnung das gesamte Herz

verwendet wurde. Allerdings lies sich mit einem ähnlichen methodischen Ansatz CaV β 2-N3 auch aus Kaninchenherz nicht isolieren (72, 121).

5.1.3.3 V2-Region

Auch die Frage nach CaV β 2-Spleißvarianten der V2-Region ist nicht eindeutig geklärt. Sowohl bei *Herzig et al.* (67) als auch in der vorliegenden Arbeit konnte nur Exon 7A aus Herzgewebe isoliert werden, wohingegen *Foell et al.* drei weitere Spleißvarianten der V2-Region (Exon 7B oder 7C oder kein Exon 7) nachweisen. Exon 7B wurde in früheren Veröffentlichungen bereits beschrieben, dabei allerdings ausschließlich aus neuronalen Geweben isoliert und zwar aus Kaninchen- (72), Maus- (96) und Rattenhirn sowie Hippocampus von Mensch (130). Ebenso wurde die Exon 7C-cDNS bereits 1993 von *Rosenfeld et al.* (130) mit Hilfe von mRNS aus menschlichem Hirn isoliert. Außer in der Untersuchung von *Foell et al.* (50) wurden Exon 7B und 7C bisher nicht im Herzen identifiziert. Das Herausspleißen des Exon 7 wurde ebenfalls bisher nur von *Foell et al.* beobachtet. Diese Arbeitsgruppe verwendete zur mRNS-Herstellung keine isolierten Kardiomyozyten, sondern intaktes Ventrikelgewebe, von Hunden oder von humanen Spenderherzen, die für eine Transplantation nicht mehr geeignet waren (vgl. 5.1.2.2). Möglicherweise enthielt dieses Ausgangsmyokard auch nicht-kardiale Gewebsanteile wie Nerven, Binde- und Fettgewebe.

Aufgrund der Ergebnisse in der vorgelegten Arbeit ist davon auszugehen, dass Exon 7A das dominierende Exon der V2-Region im Herz von Maus darstellt. Eine geringgradige Expression der anderen beschriebenen Spleißvarianten kann allerdings nicht ausgeschlossen werden.

5.1.3.4 V3-Region

Hinsichtlich der V3-Region scheint kein alternatives Spleißen der CaV β 2-Untereinheit stattzufinden, da sich weder in dieser Arbeit noch in der Literatur Hinweise darauf ergaben.

5.1.3.5 Kopplung von Spleißvorgängen der V1- und V2-Region

Hinsichtlich einer möglichen Kopplung von alternativen Spleißvorgängen zwischen N-Terminus und V2-Region ergibt sich weder in dieser Arbeit noch in der Publikation von *Herzig et al.* (67) eine Korrelation zwischen den Exons. Alle fünf CaV β 2-N-Termini werden zusammen mit Exon 7A der V2-Region exprimiert. *Foell et al.* (50) zeigen, dass der N4-Terminus zusätzlich zusammen mit Exon 7B, 7C oder ohne Exon 7 auftritt und der N1-Terminus mit Exon 7C. Ob die anderen N-Termini nicht mit diesen Spleißvarianten zusammen exprimiert werden, bleibt unklar, da der N4-Terminus entsprechend der hier aufgeführten

Resultate im Herz von Maus sowie der Veröffentlichung von *Herzig et al.* (67) im Herz von Mensch den am häufigsten exprimierten N-Terminus in diesen Geweben darstellt. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit, Spleißvarianten mit diesem N-Terminus zu entdecken. Es ist denkbar, dass in geringerem Maße exprimierte Spleißvarianten, die wiederum ein zu Exon 7A, nach unseren Ergebnissen das häufigste Exon der V2-Region in Herzgewebe, differierendes Exon besitzen, durchaus vorhanden sind, nur in sehr geringer Anzahl und bisher nicht detektiert wurden.

Insgesamt scheint somit keine Korrelation der Spleißvorgänge zwischen V1- und V2-Region zu bestehen.

5.1.3.6 Abschließende Bemerkungen zu in Herzgewebe vorhandenen CaV β 2-Spleißvarianten

Nach Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit sowie der oben aufgeführten Veröffentlichungen kann davon ausgegangen werden, dass die hier verwendete Methode, die Erstellung von cDNS-Bibliotheken und Durchmusterung mit Hybridisierungs sonden durchaus geeignet ist, um die dominierenden CaV β 2-Spleißvarianten in Herzgewebe sowie ihre relative Expressionshäufigkeit zu bestimmen. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber der in den anderen Studien verwendeten Methode der PCR-Amplifikation ist, dass keine limitierenden Vorgaben über die Wahl der Primer erfolgte und dass das relative Expressionsverhältnis der Spleißvarianten erhalten blieb. Bei alleiniger PCR-Amplifikation werden dagegen auch Transkripte, die physiologischerweise kaum in der Zelle exprimiert sind, vervielfältigt.

Das nächste Ziel wäre CaV β 2-Spleißvarianten als Vollängen-cDNS in einzelnen Kardiomyozyten zu identifizieren. Ein erster Schritt wurde in dieser Arbeit, wie in den Abbildungen 25, 26 sowie 28 bis 30 gezeigt, bereits durchgeführt, in dem - allerdings gezielt - mittels PCR einzelne CaV β 2-DNS-Fragmente aus isolierten Kardiomyozyten und aus zu Kardiomyozyten differenzierten embryonalen Stammzellen amplifiziert und sequenziert wurden.

5.1.4 Expressionsverhältnis der CaV β 2-Spleißvarianten in Mausherz

5.1.4.1 Untersuchung des entwicklungsabhängigen Expressionsverhältnisses der CaV β 2-Spleißvarianten

In Abschnitt 5.1.3 wurden die nach dem Ergebnis der cDNS-Bibliotheken in Maus-Herzgewebe exprimierten CaV β 2-Spleißvarianten dargestellt. Es ergab sich hierbei kein Hin-

weis auf eine spezifische fetale bzw. adulte Spleißvariante, die das sich verändernde Proteinmuster des oben beschriebenen Western Blots erklären könnte. Da das gleichzeitige Vorkommen verschiedener CaV β 2-Spleißvarianten in Herzgewebe beschrieben ist (50, 67) und durch die Ergebnisse des Screenings der cDNS-Bibliotheken bestätigt wurde, wurde davon ausgegangen, dass diese in einem bestimmten Expressionsverhältnis zueinander stehen, das sich altersabhängig ändert und zu dem im Western Blot sichtbaren Proteinmuster führt.

5.1.4.1.1. Zusammensetzung in der Western Blot-Analyse sichtbarer Banden erläutert anhand der Ergebnisse der cDNS-Bibliotheken

Es wurde erwartet, dass sich bei Analyse der cDNS-Klone aus den P7-cDNS-Bibliotheken ein verhältnismäßig höheres Vorkommen einer CaV β 2-Spleißvariante längerer Nukleotidsequenz ergibt, die dem in diesem Entwicklungsstadium sichtbaren 74 kDa-Protein entspricht. Dagegen sollte in der cDNS-Bibliothek aus adulter mRNA eher eine CaV β 2-Variante mit höherer elektrophoretischer Mobilität (68 kDa) identifiziert werden. Dies bedeutet, dass eine Variante mit kürzerer Nukleotidsequenz eher dominierend sein sollte. CaV β 2a-N1 ist ein Kandidat für die in fetalen und neonatalen Stadien dominierende Variante, da diese Variante ein entsprechendes Molekulargewicht von 74 kDa besitzt und mittels der cDNS-Bibliotheken isoliert werden konnte. Die in adultem Herzgewebe dominierende Form könnten CaV β 2a-N3 (68,1 kDa), CaV β 2a-N4 (68,0 kDa) oder auch CaV β 2a-N5 (68,8 kDa) darstellen; alle drei Transkripte dieser Spleißvarianten wurden in den cDNS-Bibliotheken nachgewiesen. CaV β 2a-N3 scheidet allerdings als möglicher Kandidat aufgrund des Befunds aus, dass nur einer von 13 cDNS-Klonen, die aus der Adult-GSP-cDNS-Bibliothek isoliert wurden, den CaV β 2a-N3 spezifischen N-Terminus kodierte. Dieses Ergebnis spricht gegen ein dominierendes Vorkommen der CaV β 2a-N3 in Mausherzgewebe, zumal auch in weiteren Versuchen mit isolierten Kardiomyozyten diese Variante nicht amplifiziert werden konnte.

| | P7-GSP-cDNS-Bibliothek | P7- Random-cDNS-Bibliothek | Adult-GSP-cDNS-Bibliothek |
|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| CaVβ2a-N1 | 4 / 27 | 10 / 20 | 2 / 13 |
| CaVβ2a-N3 | - | - | 1 / 13 |
| CaVβ2a-N4 | 20 / 27 | 10 / 20 | 8 / 13 |
| CaVβ2a-N5 | 3 / 27 | - | 2 / 13 |

Tabelle 44: Vergleich der mittels cDNS-Bibliotheken erhaltenen für CaV β 2-Spleißvarianten kodierenden Klone

Wie Tabelle 44 zeigt, wurden für die beiden P7-cDNS-Bibliotheken etwas unterschiedliche Ergebnisse erhalten. So zeigt sich in der P7-Random-cDNS-Bibliothek ein äquivalentes Verhältnis für ein Protein mit 74 kDa Molekulargewicht (CaV β 2a-N1) sowie eines mit 68 kDa Molekulargewicht (CaV β 2a-N4). Andere Varianten konnten nicht isoliert werden. Die Zusammenfassung der Ergebnisse der P7-GSP-cDNS-Bibliothek dagegen zeigt die dominierende Expression der CaV β 2a-N4 mit 20 von 27 analysierten Klonen; es folgen CaV β 2a-N1 bzw. CaV β 2a-N5, die mit vier bzw. drei Klonen vertreten sind. CaV β 2a-N3 wurde nicht gefunden. Insgesamt wurden in dieser Bibliothek 23 von 27 Klonen, die für ein Protein von 68 kDa kodieren sowie vier von 74 kDa Molekulargewicht, isoliert. Im Vergleich mit den Ergebnissen der Adult-GSP-cDNS-Bibliothek zeigt sich ein ähnliches Expressionsverhältnis der CaV β 2a-Spleißvarianten wie bei der P7-GSP-cDNS-Bibliothek mit CaV β 2a-N4 als dominierende Spleißvariante vor CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4. Die Spleißvarianten, die in der Western Blot-Analyse die untere Bande darstellen könnten (CaV β 2a-N3, CaV β 2a-N4, CaV β 2a-N5), zeigen auch hier eine zahlenmäßige Dominanz von 11 von 13 analysierten Klonen. CaV β 2a-N1 als „lange“ Variante ist lediglich mit zwei von 13 Klonen repräsentiert.

Das in der Western Blot-Analyse zu erkennende Proteinmuster der CaV β 2-Varianten wurde somit von der Adult-GSP-cDNS-Bibliothek nur teilweise bestätigt. Es wurde zwar eine Dominanz von Transkripten gefunden, die für das 68 kDa-Protein im Western Blot verantwortlich sind. Es wurden allerdings auch zwei CaV β 2a-N1-Klone isoliert, die für ein Protein von 74 kDa Molekulargewicht kodieren. Möglicherweise reicht die Expression von CaV β 2a-N1 nicht aus, um im Western Blot vom Antikörper erkannt zu werden. Da aus der P7-GSP-cDNS-Bibliothek aber ebenfalls nur vier von 27 Klonen CaV β 2a-N1-Klone repräsentieren, zum Zeitpunkt P7 das 74 kDa-Protein jedoch gut sichtbar ist, kann dieser Erklärungsansatz nur mit Vorbehalt in Betracht gezogen werden. Das Ergebnis des Western Blots hängt ab von der Expressionsrate des Proteins und der Sensitivität und Spezifität des verwendeten Antikörpers. Da

für die gezeigten Western Blots der gleiche Antikörper verwendet wurde, lässt sich aus der Häufigkeit der gefundenen Klone möglicherweise nicht auf die relative Expressionsrate schließen. Möglicherweise spiegelt die zufallsgeprimte Bibliothek die tatsächlichen Expressionsverhältnisse wider. Die „Zufallsprimer“ sind ein Gemisch aus Hexanukleotiden in den möglichen 4096 Kombinationen, die idealerweise in einem äquimolaren Verhältnis vorliegen und mit denen das Transkriptom repräsentativ in Erststrang umgeschrieben werden kann. Dagegen ist der Gen-spezifische Primer ein einziges Molekül, das komplementär zu einem Teil der CaV β 2-Sequenz ist, die allen CaV β 2-Varianten gemeinsam ist, das aber eventuell nicht in gleicher Weise an die komplementäre Sequenz gelangt - sei es wegen unterschiedlicher dreidimensionaler Struktur der RNS einzelner CaV β 2-Varianten, sei es wegen der gleichzeitigen Kreuzhybridisierung mit anderen Sequenzen.

5.1.4.1.2. Veränderung des in der Western Blot-Analyse sichtbaren CaV β 2-Bandenmusters

Ordnet man die gefundenen cDNS-Klone dem 74 kDa- (CaV β 2a-N1) und dem 68 kDa-Protein (CaV β 2a-N4 bzw. -N5) zu, berechnet dann das relative Verhältnis zueinander (Tabelle 45), sollte - entsprechend der Ergebnisse der zufallsgeprimten cDNS-Bibliothek - die beiden Proteinbanden im Western Blot identisch sein. Richtet man sich dagegen nach dem aus der P7-GSP-cDNS-Bibliothek erhaltenen Verhältnis, müsste das Signal der unteren Bande 5,7-fach stärker sein (0,85/0,15). Tatsächlich ist an P7 das 68 kDa-Protein deutlich stärker exprimiert. Entsprechend scheinen die Ergebnisse der P7-GSP-cDNS-Bibliothek eher das Proteinmuster der Western Blot-Analyse widerzuspiegeln, als die Ergebnisse des zufallsgeprimten P7-Ansatzes. Das Ergebnis der GSP-cDNS-Bibliothek-Adult ergibt ein deutliches Überwiegen der Anzahl der Klone, die für das 68 kDa-Protein verantwortlich sind. Hier berechnet sich die Intensität der unteren Bande (0,77/0,15) 5,1-fach stärker als diejenige der oberen Bande. Im Vergleich zur zufallsgeprimten P7-cDNS-Bibliothek hätte die 68 kDa-Bande im Verlauf an Signalstärke gewonnen, während sich eine deutliche Abnahme der Signalstärke der 74 kDa-Bande ergäbe. Dies korreliert gut mit der in Abbildungen 7 und 15 dargestellten Western Blot-Analyse, bei der die obere Bande an P28 nicht mehr sichtbar ist. Für die Ergebnisse der P7-GSP-cDNS-Bibliothek hingegen ergäbe sich bei Vergleich mit den Ergebnissen der GSP-cDNS-Bibliothek-Adult keine Veränderung des Proteinmusters, da sich das zahlenmäßige Verhältnis der Spleißvarianten, die die obere bzw. untere Bande bilden, im Verlauf kaum ändert. Dies entspricht nicht dem Ergebnis des wiederholt durchgeführten Western Blots (Abbildungen 7 und 15).

| | 68 kDa Bande | 74 kDa Bande |
|-------------------------|--------------|--------------|
| P7 Zufallsprimer | 10/20 = 0,5 | 10/20 = 0,5 |
| P7 GSP | 23/27 = 0,85 | 4/27 = 0,15 |
| Adult GSP | 10/13 = 0,77 | 2/13 = 0,15 |

Tabelle 45: Relativer Anteil der in den cDNS-Bibliotheken gefundenen Klone an dem 68 kDa- bzw. 74 kDa-Protein

Aufgrund dieser Resultate bewegt sich das reale Expressionsverhältnis an Tag sieben (P7) zwischen den Ergebnissen der zufallsgeprimten cDNS-Bibliothek und der GSP-cDNS-Bibliotheken.

5.1.4.2 Vergleich des aus den cDNS-Bibliotheken erhaltenen Expressionsverhältnisses der CaV β 2-Spleißvarianten mit der Publikation von Haase et al. (61)

Die Arbeitsgruppe von *Haase et al.* (61) präsentierte in ihrer Veröffentlichung aus dem Jahr 2000 Western Blot-Ergebnisse zur CaV β 2-Expression während verschiedener Entwicklungsstufen von Ratte (Abbildung 57, rechts). Insgesamt vier Proteine wurden von dem Antikörper, den diese Arbeitsgruppe benutzte, erkannt, wovon drei möglicherweise CaV β 2-Untereinheiten repräsentieren. *Haase et al.* fokussieren auf zwei Proteine von 90 und 85 kDa, die mit den 74 und 68 kDa Proteinen dieser Arbeit korrespondieren könnten. Hierzu setzten sie die Signalintensität des Western Blots zur aufgetragenen Gesamtproteinmenge in Beziehung, definierten die größte Signalstärke der jeweiligen Bande zu einem bestimmten Zeitpunkt densitometrisch als optische Dichte 1 und setzten sie zu den weiteren Signalstärken ins Verhältnis. Daraus ergaben sich die in Tabelle 46 und Abbildung 58 dargestellten Werte (aus *Haase et al.* (61)).

| | 85 kDa Bande | 90 kDa Bande |
|-----------------------------|--------------|--------------|
| Optische Dichte P1-3 | 1 (100%) | 1 (100%) |
| Optische Dichte P28 | ~ 0,9 (90%) | ~ 0,35 (35%) |
| Optische Dichte P72 | ~ 0,9 (90%) | ~ 0,25 (25%) |

Tabelle 46: Relative Signaldichte der 90 und 85 kDa Proteine im Western Blot nach *Haase et al.* (61)

Haase et al. (61) verglichen nicht die Signalintensität des 90 und 85 kDa Proteins im Western Blot, sondern stellten nur eine Verlaufsbeobachtung der jeweiligen Signalstärke der beiden Banden dar.

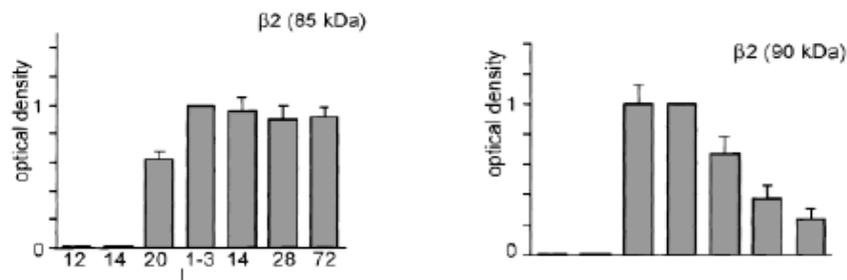


Abbildung 58: graphische Darstellung des Verlaufs der Signalstärken der beiden Banden in der Western Blot-Analyse

Es wurde jeweils eine maximale optische Dichte von 1 für beide Banden an P1 bis P3 bestimmt, was bedeutet, dass beide Varianten zu diesem Zeitpunkt maximal exprimiert sind. Im Verlauf verringert sich die Signalstärke für die untere Bande mit zunehmendem Alter der Ratten kaum, während die optische Dichte für die obere Bande auf einen Wert von 0,2 abnimmt. Man erkennt, dass die untere Bande an Tag E20 erst 60% ihrer maximalen optischen Dichte besitzt im Gegensatz zur oberen Bande, die schon an E20 ihre maximale optische Dichte erreicht. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen cDNS-Klonen gibt es Übereinstimmung hinsichtlich der in der zufallsgeprägten Bibliothek häufiger gefundenen CaVβ2a-N1 Variante (74 kDa). Orientiert man sich am Vergleich der beiden GSP-cDNS-Bibliotheken, lässt sich diese Abnahme der CaVβ2-N1-Expression bzw. des Signals der oberen Bande nicht nachvollziehen. Betrachtet man das Ergebnis der GSP-Adult-cDNS-Bibliothek isoliert, passt das Ergebnis von *Haase et al.* gut zu den Resultaten der cDNS-Bibliothek, da die untere Bande weiterhin eine hohe optische Dichte zeigt, während die obere stark an Signalstärke abnimmt, was der dominierenden Expression von Spleißvarianten, die die untere Bande bilden zur im Vergleich zu einer geringen CaVβ2-N1-Expression entspricht. So scheinen im Vergleich hier erhaltener Ergebnisse mit der Arbeit von *Haase et al.* (61) die Resultate der zufallsgeprägten P7-cDNS-Bibliothek und die GSP-cDNS-Bibliothek adult am ehesten das Expressionsverhältnis der CaVβ2-Spleißvarianten widerzuspiegeln.

Zu bedenken gilt, dass die Untersuchungen bei *Haase et al.* (61) mit Rattenherzgewebe und nicht mit Mauserzgewebe durchgeführt wurden und speziesspezifische Veränderungen des Expressionsmusters nicht ausgeschlossen werden können, obwohl Maus und Ratte phylogenetisch nahe Verwandte sind. Zudem sind die von *Haase et al.* verwendeten Antikörper nicht in gleicher Weise an Proteinfractionen von CaVβ2-defizienten Tieren validiert. Insofern ist auch keineswegs klar, inwieweit die Molekulargewichte 90 kDa versus 74 kDa bzw. 68 kDa versus

85 kDa auf unterschiedlichen Gelsystemen oder auf nicht identischen bzw. nicht orthologen Proteinen beruhen.

5.1.4.3 Vergleich des aus den cDNS-Bibliotheken erhaltenen Expressionsverhältnisses der CaV β 2-Spleißvarianten mit der Publikation von Herzig et al. (67)

Herzig et al. (67) untersuchten das Expressionsverhältnis der CaV β 2-Spleißvarianten in adultem menschlichen Ventrikelmyokard. Mittels Real-time-PCR mit Aminoterminus-spezifischen Primern erhielten sie Amplifikate aller fünf bekannten N-terminalen Spleißvarianten.

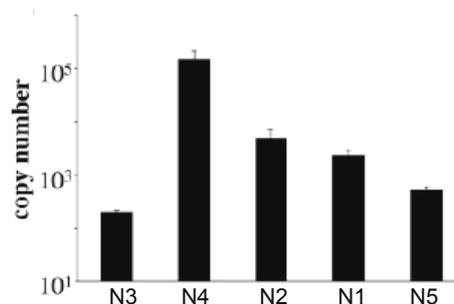


Abbildung 59: graphische Darstellung des Expressionsverhältnisses der CaV β 2-Spleißvarianten in adultem menschlichen Ventrikelmyokard nach *Herzig et al.* (67)

Die quantitative Analyse brachte folgendes Ergebnis:

- CaV β 2-N4 ~150000 Kopien (95%, bezogen auf die Gesamtzahl analysierter Kopien)
- CaV β 2-N2 ~5000 Kopien (3%)
- CaV β 2-N1 ~2400 Kopien (1,5%)
- CaV β 2-N5 ~500 Kopien (0,3%)
- CaV β 2-N3...~200 Kopien (0,2%).

Im Vergleich hierzu die Ergebnisse der cDNS-Bibliothek dieser Arbeit (Mauserz, adult):

- CaV β 2-N4 8 von 13 Klonen (62%)
- CaV β 2-N2....kein Klon isoliert
- CaV β 2-N1 2 von 13 Klonen (15%)
- CaV β 2-N5....2 von 13 Klonen (15%)
- CaV β 2-N3....1 von 13 Klonen (8%).

Man sieht, dass sowohl bei *Herzig et al.* (67) als auch bei unseren Ergebnissen die CaV β 2-N4 in Herzgewebe die am häufigsten exprimierte Spleißvariante, gefolgt von CaV β 2-N1 und CaV β 2-N5 ist, wenn auch die Prozentsätze für die jeweilige Spleißvariante voneinander abweichen. *Herzig et al.* konnten zudem die CaV β 2-N2 als zweithäufigste Variante in menschlichem Myokard identifizieren, während in den cDNS-Bibliotheken dieser Arbeit kein entsprechender Klon isoliert werden konnte. In beiden Forschungsarbeiten wurde die CaV β 2-N3 nur in einem niedrigen Prozentsatz gefunden (siehe 5.1.3.2 bzw. 5.2.1). Somit bestätigt die Publikation von *Herzig et al.* (67) in vielen Punkten die Resultate der cDNS-Bibliotheken dieser Arbeit. Unterschiede im Expressionsverhältnis der CaV β 2-Spleißvarianten können durch die verschiedenen Bestimmungsmethoden verursacht sein, wobei wie in 5.1.2.5 erläutert, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Methode sehr zuverlässige Ergebnisse erbringen sollte. Die in Bezug auf den N2-Terminus differierenden Ergebnisse wurden in 5.1.3.1 bereits diskutiert.

5.1.5 Rekonstituierung des Bandenmusters in der Western Blot-Analyse mit den durch die cDNS-Bibliotheken identifizierten CaV β 2-Spleißvarianten

Man erkennt aus Abbildung 31, dass mit den drei in den cDNS-Bibliotheken am häufigsten gefundenen Spleißvarianten der CaV β 2-Untereinheit (CaV β 2a-N1, -N4 und -N5) das Bandenmuster der in Abbildung 7 gezeigten Western Blot-Analyse rekonstituiert werden kann. Dazu werden zumindest zwei der drei Spleißvarianten benötigt, wobei CaV β 2-N1 allein für die obere Bande steht und CaV β 2-N4 und/oder CaV β 2-N5 für die untere. Geht man vom Ergebnis der P7-Random-cDNS-Bibliothek aus, in der nur die Spleißvarianten CaV β 2-N1 und CaV β 2-N4 gefunden wurden, würde CaV β 2-N1 das Signal für die sogenannte fetale Bande stellen, während CaV β 2-N4 allein die untere Bande bilden würde. Im Gegensatz dazu bestünde die untere Bande ausgehend von den Ergebnissen der P7-GSP-cDNS-Bibliothek aus CaV β 2-N4 und CaV β 2-N5 und laut der GSP-Adult-cDNS-Bibliothek-adult sogar aus CaV β 2-N3, CaV β 2-N4 und CaV β 2-N5.

Denkbar ist, dass sich die Expression der Spleißvarianten, die die untere Bande bilden, im Verlauf der Mausentwicklung ändert. Da momentan keine für den jeweiligen N-Terminus der CaV β 2-Spleißvarianten spezifischen Antikörper zur Verfügung stehen, kann die Zusammensetzung des nativen Gewebes auf Proteinebene leider nicht näher in Bezug auf diese Fragestellung untersucht werden. Wie in Abbildung 31 sichtbar, können die 68 kDa Banden von CaV β 2a-N4- und -N5-Proteinen nicht unterschieden werden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die in den cDNS- Banken gefundenen CaV β 2-Splei β varianten CaV β 2a-N1, -N4 und -N5 das in Proteinfractionen von nativen Herzen gefundene CaV β 2-Proteinmuster rekonstituieren.

5.2 Polymerase-Kettenreaktion mit isolierten Kardiomyozyten

5.2.1 One-Step RT-PCR mit isolierten Kardiomyozyten

Die PCR mit isolierten Kardiomyozyten diene vornehmlich der Frage, ob alle aus den cDNS-Bibliotheken isolierten Isoformen tats \ddot{a} chlich auch in isolierten Herzmuskelzellen vorhanden sind, oder ob sie aus mRNS anderer Zellen und Gewebe des Herzens isoliert worden waren. Dabei galt der CaV β 2-N3 besonderes Augenmerk, da in der Literatur widerspr \ddot{u} chliche Ergebnisse zu ihrer Expresssion vorliegen (siehe 5.1.3.2).

Wie im Ergebnisteil dokumentiert (4.1.2.1) konnten aus isolierten Kardiomyozyten unterschiedlicher Altersstufen bzw. Herkunft die CaV β 2-Splei β varianten CaV β 2-N1, CaV β 2-N4 und CaV β 2-N5 mittels One-Step-RT-PCR amplifiziert werden. Die Ergebnisse zeigen zum einen, dass CaV β 2-N3 nicht bzw. nur in h \ddot{o} chst geringem Ma \ddot{u} e unterhalb der zur PCR-Amplifikation ben \ddot{o} tigten Menge in Kardiomyozyten exprimiert wird. F \ddot{u} r die These, dass der einzige in der GSP-Adult-cDNS-Bibliothek gefundene CaV β 2-N3-Klon aus einem anderen Gewebetyp stammt, spricht, dass die PCR eine der sensitivsten Methoden ist, um geringste Transkriptmengen in einer Zelle nachzuweisen. W \ddot{a} re die CaV β 2-N3 in der Herzmuskelzelle so selten, dass sie mit PCR nicht nachweisbar ist, ist es ebenfalls unwahrscheinlich, einen CaV β 2-N3-Klon in den cDNS-Bibliotheken zu erhalten. Zum zweiten l \ddot{a} sst das Ergebnis Raum f \ddot{u} r verschiedene Interpretationen in Bezug auf Lokalisation und Funktion der einzelnen CaV β 2-Splei β varianten. Es ergibt sich beispielsweise die M \ddot{o} glichkeit einer unterschiedlichen lokalen Verteilung der CaV β 2-Varianten, epikardial vs. endokardial; atriale vs. ventrikul \ddot{a} re Kardiomyozyten, oder des Vorkommens mehrerer Splei β varianten nebeneinander in einer Zelle. Um zu untersuchen, ob letzteres zutrifft, wurde die in 4.1.2.2 beschriebene One-Step RT-PCR mit einzelnen isolierten adulten Mauskardiomyozyten und zwei verschiedenen N-Terminus-spezifischen Primern pro Ansatz durchgef \ddot{u} hrt.

5.2.2 One-Step RT-PCR mit einzelnen isolierten adulten Mauskardiomyozyten

Die Ergebnisse dieser Experimente mit einzelnen adulten Mauskardiomyozyten zeigen die Koexpression mehrerer CaV β 2-Spleißvarianten in einer Herzmuskelzelle. Dies wurde bisher in keiner Publikation zu diesem Thema dargestellt. Im PCR-Ansatz mit Forward-Primern für CaV β 2-N1 und CaV β 2-N4 ergab sich für jeden der zehn Reaktionsansätze ein Amplifikat der CaV β 2-N4, während nur bei einem Reaktionsansatz im Gel nachweisbare Banden der CaV β 2-N4 und CaV β 2-N1 erhalten wurden. Im Ansatz mit CaV β 2-N1- und CaV β 2-N5-spezifischen Primer konnten entsprechende DNS-Fragmente der Größe des CaV β 2-N5-Fragments amplifiziert werden, für CaV β 2-N1 ergab sich in dieser Kombination kein korrelierendes DNS-Fragment im Gel.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse scheint es, dass die CaV β 2a-N4 in einem Großteil, wenn nicht in allen Kardiomyozyten exprimiert wird, da in 13 PCR-Ansätzen stets ein spezifisches DNS-Fragment amplifiziert wurde. Für CaV β 2a-N5 ergaben sich aus zehn PCR-Ansätzen vier mit den korrekten Amplifikaten, für CaV β 2a-N1 ergab nur einer von 23 Ansätzen ein Amplifikat, in welchem zusätzlich cDNS-Fragmente für CaV β 2-N4 nachgewiesen werden konnten. In Bezug auf CaV β 2a-N5 kann man annehmen, dass diese Spleißvariante nicht in jeder Herzzelle vorhanden ist, was die negativen PCR-Ergebnisse mancher Ansätze erklären könnte. CaV β 2a-N1 scheint sehr selten in den adulten Kardiomyozyten exprimiert zu sein, da nur in einer von 23 PCR-Reaktionen die Amplifikation eines entsprechenden Fragments erfolgte. Ob tatsächlich in einigen Kardiomyozyten nur eine einzelne CaV β 2-Spleißvariante exprimiert wird, lässt sich mittels dieser PCR-Methode nicht nachweisen, da man hierzu spezifische Primer aller fünf CaV β 2-Spleißvarianten in einem PCR-Ansatz vereinen müsste oder die als Matrize verwendete RNS einer einzelnen Zelle auf fünf Reaktionen verteilen müsste. Beides ist zur Zeit nicht praktikabel, da bei der in einer einzelnen Zelle vorhandenen geringen Transkriptmenge der Spleißvarianten eine ausreichende Amplifikation zum Nachweis entsprechender Fragmente im Gel deshalb kaum zu erwarten wäre. Außerdem unterscheiden sich vier der fünf potentiellen Fragmente kaum in ihrer Nukleotidlänge, so dass sie im Agarosegel nicht ausreichend aufgetrennt werden könnten. Man müsste somit die Fragmente aus dem Gel isolieren, in Vektoren klonieren und nachfolgend auf Inserts entsprechend der Fragmente für die fünf CaV β 2-Spleißvarianten hin analysieren. Somit lässt sich nur im Umkehrschluss zeigen, dass mehr als eine CaV β 2-Spleißvariante pro Zelle vorkommen kann. Geht man nun davon aus, dass mehrere CaV β 2-Spleißvarianten nebeneinander in einer einzelnen Zelle vorkommen, stellt sich die Frage, ob sie jeweils eine spezifische Lokalisation und/oder Funktion besitzen.

Mehrere Schlüsse sind möglich. Zum einen könnte eine Spleißvariante für den Membrantransport und eine andere für die Modulation der Ca^{2+} -Kanal-Eigenschaften zuständig sein. Eine andere Möglichkeit ist, dass jede Spleißvariante die ihr benachbarten Kanäle spezifisch moduliert und dass durch die Kombination der Spleißvarianten die Ca^{2+} -Kanal-Eigenschaften gesteuert werden.

Bis heute konnte nicht vollständig geklärt werden, ob ein voll funktionsfähiger L-Typ Ca^{2+} -Kanal aus einer $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit besteht, die mit einer einzigen oder mehreren $\text{CaV}\beta$ -Untereinheit(en) assoziiert ist. Dies lässt offen, ob eine oder mehrere, identische oder unterschiedliche $\text{CaV}\beta 2$ -Untereinheiten für eine physiologische Kanalfunktion vonnöten sind. In einer Veröffentlichung von *Dalton et al.* (35) wird berichtet, dass ein einziges $\text{CaV}\beta 2$ -Molekül sowohl für den Membrantransport der $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit als auch für die Modulation der Leitungseigenschaften des Kanals ausreicht. Um dies zu untersuchen, fusionierten *Dalton et al.* (35) $\text{CaV}\beta 2$ -N4 mit dem C-Terminus der $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit. Expression dieses Fusionsproteins hatte annähernd identische Auswirkungen auf die gemessenen Parameter wie die Koexpression von $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit und $\text{CaV}\beta 2$ -N4. Eine zusätzliche Expression von $\text{CaV}\beta 2$ -N3 brachte keine Veränderung des Stroms mit sich, was gegen einen modulatorischen Zusatzeffekt der $\text{CaV}\beta 2$ -N3-Untereinheit oder die Notwendigkeit einer parallelen Wirkung von mehr als einer $\text{CaV}\beta 2$ -Spleißvariante am Kanal spricht. Dieses Ergebnis ist allerdings mit Vorbehalt zu betrachten, da die Fusion der $\text{CaV}\beta 2$ -N4 mit der $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit eine konstante Nähe dieser Spleißvariante zum Kanal bedingt, was einen verdrängenden Effekt auf die freie koexprimierte $\text{CaV}\beta 2$ -N3 haben könnte, so dass diese nicht nahe genug an den Kanal herantreten kann und folglich keine mit den physiologischen übereinstimmenden Bedingungen vorhanden sind.

Zwischen $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit und $\text{CaV}\beta 2$ -Untereinheit besteht keine kovalente Bindung. Bei *Dalton et al.* (35) wurde durch die Fusion der beiden Untereinheiten eine ständige Interaktion immer derselben $\text{CaV}\beta 2$ -Untereinheit bzw. -Spleißvariante mit ihrer zugehörigen $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit erzwungen. Es ist durchaus denkbar, dass freie $\text{CaV}\beta 2$ -Untereinheiten nicht spezifisch allein für eine $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit zuständig sind. So setzt das „single- $\text{CaV}\beta$ -binding“-Modell (11) voraus, dass nach Transport des $\text{CaV}\alpha_11.2$ - $\text{CaV}\beta 2$ -Komplexes zur Plasmamembran die $\text{CaV}\beta 2$ -Untereinheit von diesem Komplex abdissoziiert und reversibel an vorhandene Ca^{2+} -Kanäle bindet, die bereits in der Membran sind. Die Steuerung der Stimulation von Kanälen durch die $\text{CaV}\beta 2$ -Untereinheit hängt von der $\text{CaV}\beta 2$ -Konzentration im Zytoplasma ab. Zur weiteren Feinabstimmung dieser Steuerung könnten die $\text{CaV}\beta 2$ -Spleißvarianten dadurch beitragen, indem ihre Expressionsverhältnisse speziell an die aktuellen Bedürfnisse

der Zelle angepasst wären. Weitere Untersuchungen zu diesem Thema müssen zeigen, ob eine Notwendigkeit der parallelen Expression verschiedener CaV β 2-Untereinheiten in einer Herzmuskelzelle besteht und worin deren spezifische Funktionen liegen. Hier durchgeführter Forschungsarbeiten zeigen, dass eine Koexpression mehrerer CaV β 2-Spleißvarianten in einer Herzmuskelzelle existiert.

5.3 Untersuchung der CaV β 2-Untereinheit auf Proteinebene

5.3.1 Interaktion der CaV β 2-Isoformen

Wie in 2.4.2.1 beschrieben, bestehen Strukturhomologien zwischen CaV β 2-Untereinheiten und der Familie der membranassoziierten Guanylatkinasen (MAGUK). Wie MAGUK besitzen CaV β -Proteine eine SH3- (C1-Region) sowie eine Nukleotidkinase-(C2-Region) Domäne. Hierbei stellt die NK-Domäne in MAGUKs eine Proteinbindungsdomäne dar (138), die zusätzlich zur Bindung anderer Proteine auch die SH3-Domäne bindet. Diese Bindung kann in einer intermolekularen Form stattfinden, wobei MAGUK-Oligomere gebildet werden. Es dominiert jedoch die intramolekulare SH3-NK-Bindung (111). Bei CaV β 2-Untereinheiten beeinflussen diese Domänen unter anderem die Inaktivierungseigenschaften des Ca²⁺-Kanals (101). *McGee et al.* (101) beschreiben, dass die SH3- und die NK-Domänen von CaV β 2-Untereinheiten miteinander interagieren. CaV β 2-Untereinheiten, die Mutationen in entweder der einen oder der anderen Domäne enthalten, zeigen Interaktionen mit anderen CaV β 2-Molekülen, bei welchen die entsprechende Domäne intakt ist. Durch diese intermolekulare Interaktion können die mutierten CaV β 2-Untereinheiten die Modulationseigenschaften der intakten CaV β 2-Proteine in Bezug auf den Ca²⁺-Strom wiedererlangen, was sich in entsprechenden Veränderungen bei elektrophysiologischen Messungen zeigt. Ebenso wie bei den MAGUKs scheint bei intakten CaV β 2-Untereinheiten die intramolekulare SH3-NK-Bindung eine intermolekulare Interaktion mit anderen CaV β 2-Untereinheiten weitgehend zu verhindern (101).

In dieser Arbeit konnten wir sowohl durch die Co-Immunopräzipitation als auch durch das Crosslinking-Experiment zeigen, dass auch native CaV β 2-Untereinheiten miteinander interagieren. Ob dieser Interaktion eine SH3-NK-Bindung zugrunde liegt oder andere Regionen der CaV β 2-Proteine eine Rolle spielten, wurde in Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Da die intramolekulare Zusammenlagerung der SH3- und NK-Domänen der CaV β 2-Proteine jedoch einen essentiellen Beitrag zur dreidimensionalen Struktur dieser Untereinheit leisten (100),

sind wahrscheinlich andere Domänen Grundlage der Interaktion der CaV β 2-Proteine. Deren Identifikation ist somit Gegenstand künftiger Forschungsarbeiten.

5.4 Funktionelle Charakterisierung der verschiedenen CaV β 2a-Varianten mittels elektrophysiologischer Untersuchungen

Es existieren einige aktuelle Publikationen, in denen die Charakterisierung von CaV β 2a-Spleißvarianten im Hinblick auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von Ca²⁺-Strömen ein zentrales Thema darstellt. Die drei wichtigsten davon werden im Weiteren beschrieben, ihre Ergebnisse ausgeführt und mit den in dieser Arbeit erhaltenen verglichen und diskutiert. Keine der Publikationen befasste sich jedoch mit den CaV β 2-Untereinheiten des Ca²⁺-Kanals von Maus. Für die Untereinheiten von Maus erfolgte eine umfassende Charakterisierung ihrer Modulation der L-Typ Ca²⁺-Ströme erstmalig und systematisch in dieser Arbeit. Aufgrund der Sequenzähnlichkeit der Untereinheiten verschiedener Spezies (siehe 4.1.1.5.3) ist ein speziesübergreifender Vergleich, wie hier erfolgt, aber zu rechtfertigen.

5.4.1 Herzig et al. (67)

Herzig et al. (67) zeigen in ihrer Publikation von 2007, dass die Länge des N-Terminus weitgehend unabhängig von seiner Aminosäurezusammensetzung die Einzelkanalaktivität des L-Typ-Ca²⁺-Kanals bestimmt. Zur Messung der Einzelkanalströme wurden HEK293-Zellen stabil mit der CaV α _{1.2}-Untereinheit von Mensch transfiziert. Zusätzlich erfolgte die transiente Kotransfektion einer CaV β 2a-Untereinheit von Mensch, der CaV α _{2 δ} -Untereinheit (kloniert aus Kaninchenskelettmuskel) sowie eines grün fluoreszierenden Proteins. Die Messungen von Herzig et al. ergaben die in Tabelle 47 zusammengefassten Resultate.

Alle CaV β 2a -Spleißvarianten erhöhten die Kanalaktivität, jedoch in deutlich unterschiedlichem Ausmaß. Aufgrund ihrer Ergebnisse (Tabelle 47) gehen *Herzig et al.* (67) davon aus, dass die stärksten Modulatoren des L-Typ Ca²⁺-Kanals die CaV β 2a-Untereinheiten mit dem kürzesten N-Terminus, also CaV β 2a-N3 (16 AS) bzw. CaV β 2a-N4 (17 AS) darstellen, gefolgt von CaV β 2a-N5 (23 AS) sowie CaV β 2a-N2 (43 AS). CaV β 2a-N1, als CaV β 2a-Untereinheit mit dem längsten N-Terminus (71 AS), bezeichnen sie als den schwächsten Modulator. So scheinen Kanäle, die mit einer schwach modulatorischen Untereinheit assoziiert sind, wahrscheinlicher in nicht aktivierbaren (deep-closed) und inaktivierten Stadien, als in aktivierten

bzw. aktivierbaren (open bzw. nearly-open) Stadien zu verweilen. Ein starker Modulator bewirkt also eine Erhöhung des Ca^{2+} -Einstroms in die Zelle, während ein schwacher Modulator mit niedrigen Ca^{2+} -Strömen assoziiert ist.

| | |
|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Peak ensemble average current</i> | $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}3 \approx \text{CaV}\beta 2\text{a-N}4 > \text{CaV}\beta 2\text{a-N}5 \approx \text{CaV}\beta 2\text{a-N}2 > \text{CaV}\beta 2\text{a-N}1$ |
| <i>Availability</i> | $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}3 \approx \text{CaV}\beta 2\text{a-N}4 > \text{CaV}\beta 2\text{a-N}5 \approx \text{CaV}\beta 2\text{a-N}2 \approx \text{CaV}\beta 2\text{a-N}1$ |
| <i>Open probability:</i> | $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}3 > \text{CaV}\beta 2\text{a-N}4 \approx \text{CaV}\beta 2\text{a-N}5 \approx \text{CaV}\beta 2\text{a-N}2 > \text{CaV}\beta 2\text{a-N}1$ |
| <i>Time-dependent inactivation</i> | $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}3 < \text{CaV}\beta 2\text{a-N}4 \approx \text{CaV}\beta 2\text{a-N}5 < \text{CaV}\beta 2\text{a-N}2 \approx \text{CaV}\beta 2\text{a-N}1$ |
| <i>First latency</i> | $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}3 \approx \text{CaV}\beta 2\text{a-N}4 < \text{CaV}\beta 2\text{a-N}5 \approx \text{CaV}\beta 2\text{a-N}2 < \text{CaV}\beta 2\text{a-N}1$ |
| <i>Closed-time constant τ_{slow}</i> | $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}3 \approx \text{CaV}\beta 2\text{a-N}4 \approx \text{CaV}\beta 2\text{a-N}5 \approx \text{CaV}\beta 2\text{a-N}2 < \text{CaV}\beta 2\text{a-N}1$ |

Tabelle 47: Zusammenfassung der Ergebnisse von *Herzig et al.* (67)

Die Modulation der Einzelkanalaktivität zeigt sich in dieser Arbeit unabhängig von Strukturmotiven der V1-Region, Palmitoylierung oder Arginin- bzw. Lysin-Clustern und scheint allein abhängig von der Länge des jeweiligen N-Terminus.

5.4.2 Takahashi et al. (146)

In dieser Veröffentlichung wurden HEK293-Zellen mit der $\text{CaV}\alpha_1 1.2$ -Untereinheit von Kaninchen, $\text{CaV}\alpha_2\delta$ -Untereinheit von Ratte und jeweils einer $\text{CaV}\beta 2\text{a}$ -Spleißvariante (Mensch) transfiziert. Es wurden Ganzzellmessungen durchgeführt und die Ba^{2+} -Ströme gemessen. Es wurden Bariumionen anstelle von Calciumionen verwendet, um die Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung zu vermeiden. Untersucht wurden Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften der Ca^{2+} -Kanäle, die mit Calciumionen als Ladungsträger auftreten mit folgenden in den Tabellen 48 und 49 dargestellten Ergebnissen.

| | |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Steady-State Aktivierung</i> | Verschiedene Spleißvarianten führten zu Fraktionen von Kanälen, die eine niedrige Aktivierungsschwelle zeigten. Besonders unter Einfluss von $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}4$ nahm die Fraktion an Kanälen, die bei niedrigeren Schwellenpotenzialen aktiviert wurde, ab, während für $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}5$ diese Fraktion einen Anstieg zeigte (bezogen auf $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}3$ als Referenz). Die G-V-Kurven von Strömen in Gegenwart von $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}2$ bzw. -N1 waren weitgehend unverändert und differierten nur geringfügig von Strömen in Gegenwart der $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}3$. |
| <i>Aktivierungskinetiken</i> | Die Zeitkonstanten differierten nicht signifikant in Gegenwart der $\text{CaV}\beta 2\text{a}$ -Spleißvarianten. |

| | |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Prepulse facilitation</i> | Vergleich der L-Typ Kanal Prepulse facilitation zeigte, dass nur in Gegenwart von CaVβ2-N4 ein signifikant höherer Grad an Prepulse facilitation im Vergleich zu Strömen in Gegenwart von CaVβ2-N3 erzielt wurde. Es zeigte sich keine Aufteilung zwischen membranassoziierten und zytosolischen Spleißvarianten hinsichtlich der Modulation der Prepulse facilitation. |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Tabelle 48: Einfluss der CaVβ2a-Spleißvarianten auf die Aktivierungseigenschaften des L-Typ Ca²⁺-Kanals nach *Takahashi et al.* (146)

| | |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Inactivation kinetics</i> | <p>CaVβ2a-N3 ≈ CaVβ2a-N5 < CaVβ2a-N4 ≈ CaVβ2a-N2 ≈ CaVβ2a-N1</p> <p>Hierbei zeigte sich, dass die laut <i>Takahashi et al.</i> membranassoziierten Spleißvarianten CaVβ2a-N3 bzw. -N5 zu deutlich langsameren Inaktivierungskinetiken führen, als die im Zytosol lokalisierten CaVβ2a-N4, -N2, -N1</p> |
| <i>Inactivation rate r300</i> | <p>CaVβ2a-N3 ≈ CaVβ2a-N5 > CaVβ2a-N4 ≈ CaVβ2a-N2 ≈ CaVβ2a-N1</p> <p>Für CaVβ2a-N3 bzw. -N5 änderten sich die r300-Werte im Bereich von -20 bis +20 mV nur geringfügig. Im Gegensatz dazu fielen die r300-Werte der CaVβ2a-N4, -N2 und -N1 zusehends mit steigender Testspannung, was für eine stärkere Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung dieser Kanäle im Vergleich zu CaVβ2a-N3 bzw. -N5 spricht. Zudem lagen die r300-Werte der zytosolischen Spleißvarianten über einen weiten Spannungsbereich unter denen der membranassoziierten, was mit einem stärkeren Abfall mit zytosolischen Varianten beobachteter makroskopischer Ströme einhergeht.</p> |
| <i>Recovery from inactivation</i> | L-Typ-Kanal „recovery from inactivation“ zeigt identische Zeitkonstanten (τ_{fast} bzw. τ_{slow}), jedoch unterschiedliche Amplituden für die verschiedenen CaVβ2a-Spleißvarianten. Hierbei findet sich für CaVβ2a-N3 und -N5 im Vergleich mit den zytosolischen Spleißvarianten eine geringere Anzahl an Kanälen, die schnelle Erholungskinetiken nach Inaktivierung besitzen. |
| <i>Steady-State Inaktivierung</i> | In Bezug auf die Steady-State Inaktivierung zeigten sich nur geringe Unterschiede zwischen den CaVβ2a-Spleißvarianten. Ein signifikanter Unterschied zwischen membranassoziierten und zytosolischen Spleißvarianten wurde nicht beobachtet. |

Tabelle 49: Einfluss der CaVβ2a-Spleißvarianten auf die Inaktivierungseigenschaften des L-Typ Ca²⁺-Kanals nach *Takahashi et al.* (146)

5.4.3 Foell et al. (50)

Foell et al. (50) transfizierten HEK293-Zellen mit den CaVα₁1.2- und CaVα₂δ-Untereinheiten von Kaninchen, einer CaVβ2a-Spleißvariante von Mensch sowie GFP. Es wurden Ganzzellmessungen durchgeführt und die Ba²⁺-Ströme gemessen. Hier wurden CaVβ2c-Spleiß-

varianten, die verschiedene N-Termini besaßen (N1, N2, N4) mit CaV β 2a-N4 verglichen, um herauszufinden, ob die V2-Region der CaV β 2-Untereinheit zusätzlich zur V1-Region Einfluss auf die Modulation der Ca²⁺-Kanal-Eigenschaften nimmt (Tabelle 50).

| | |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Peak currents</i> | In Bezug auf die Peak currents zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den CaV β 2-Spleißvarianten. |
| <i>Spannungs-abhängige Kanalaktivierung</i> | Alle CaV β 2-Spleißvarianten bewirkten eine Verschiebung der Kanalaktivierung hin zu negativeren Potenzialen. CaV β 2a-N4, CaV β 2c-N2 sowie CaV β 2c-N4 ergaben einen vergleichbaren Wert in der Verschiebung des Schwellenpotenzials zur Kanalaktivierung. CaV β 2c-N1 dagegen zeigte eine geringere Verschiebung der Schwelle, die bei signifikant positiveren Potenzialen lag. Dieses Ergebnis zeigt, dass alternatives Spleißen des N-Terminus Auswirkungen auf die spannungsabhängige Kanalaktivierung hat, während in Bezug auf die V2-Region kein Unterschied zwischen CaV β 2a und CaV β 2c zu erkennen ist. |
| <i>Kanal-inaktivierung (r400)</i> | Alle vier untersuchten CaV β 2-Spleißvarianten ergaben eine signifikante Beschleunigung des Stromabfalls im Vergleich mit Strömen, die allein durch Expression von CaV α _{1.2} - und CaV α ₂ δ -Untereinheiten hervorgerufen waren. Eine statistisch signifikante Differenz des Einflusses der CaV β 2-Spleißvarianten war nicht vorhanden. |

Tabelle 50: Zusammenfassung der Ergebnisse bei Foell *et al.* (50)

5.4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der zitierten Publikationen 50, 146 und 67 und Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit

Die einzelnen Kanaluntereinheiten verschiedener Spezies haben zwar ähnliche Aminosäuresequenzen, sind jedoch nicht völlig identisch. Diesen Gegebenheiten trägt die vorliegende Arbeit Rechnung, indem - im Gegensatz zu den zitierten Arbeiten 50, 146 und 67 - alle Untereinheiten aus einer Spezies, der Maus, und einem Gewebe, dem Herzen, stammen. Ergebnisse mit Kombinationen von Proteinen von Mensch und Kaninchen (67, 50) oder Kaninchen, Ratte und Mensch (146) sind unter dem Vorbehalt zu interpretieren, dass artifizielle Kombinationen von Untereinheiten verwendet wurden bzw. dass einfach vorausgesetzt wurde, dass ähnliche Proteine verschiedener Spezies identische Funktionen aufweisen. Es gibt zahlreiche Beispiele, die zeigen, dass dies nicht der Fall ist, beispielsweise die Digitalisempfindlichkeit der Na⁺/K⁺-ATPase bei Nagern und Mensch (13). Im Übrigen sollte nicht unberücksichtigt bleiben, dass auch die normale Herzschlagfrequenz zwischen den gesamten Spezies höchst unterschiedlich ist, mit von 70 Schlägen/min (Mensch) bis ~ 450 Schlägen/min (Maus) und auf Unterschiede in der Expression und den funktionellen Eigenschaften der relevanten Ionenkanäle einschließ-

lich des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals zurückzuführen sein muss. Unabhängig von dieser Einschränkung ist der Einfluss des N-Terminus von $\text{CaV}\beta 2$ -Untereinheiten auf die Inaktivierungseigenschaften der Ca^{2+} -Ströme. *Cens et al.* (23) postulierten 1999 erstmalig, dass die N-terminale Region der $\text{CaV}\beta 2$ -Untereinheit das Hauptelement zur Verlangsamung der Kanalinaktivierung (insbesondere τ_{slow}) darstellt. Es zeigten sich in den Resultaten der oben aufgeführten Publikationen sowie der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen signifikante Unterschiede der Inaktivierung des Ca^{2+} -Kanals sowie anderer gemessener Parameter in Gegenwart einzelner $\text{CaV}\beta 2$ -Spleißvarianten. Die wichtigsten Punkte sind in Tabelle 51 zusammengefasst.

| | |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Herzig et al.</i> (67) | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Einzelkanalmessungen ▪ $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}3/-\text{N}4$ stärkste Modulatoren des Ca^{2+}-Kanals (vermitteln einen hohen Ca^{2+}-Einstrom) ▪ $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}1$ schwächster Modulator des Ca^{2+}-Kanals (vermittelt einen geringeren Ca^{2+}-Einstrom) |
| <i>Takahashi et al.</i> (146) | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ganzzellmessungen ▪ $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}3/-\text{N}5$ zeigen langsamere Inaktivierungskinetiken im Vergleich zu $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}1/-\text{N}4$ ▪ $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}5$ führt zu einer Verschiebung der Kanalaktivierung hin zu hyperpolarisierenden Potenzialen ▪ $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}4$ führt zu einer Verschiebung der Kanalaktivierung hin zu depolarisierenden Potenzialen ▪ Kein signifikanter Unterschied in der Steady-State Inaktivierung |
| <i>Foell et al.</i> (50) | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ganzzellmessungen ▪ $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}1$ führt zu einer Verschiebung der Kanalaktivierung hin zu depolarisierenden Potenzialen ▪ Kein Unterschied zwischen $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}4$ und $\text{CaV}\beta 2\text{c-N}4$ |
| Ergebnisse dieser Arbeit | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ganzzellmessungen ▪ $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}3/-\text{N}5$ zeigen langsamere Inaktivierungskinetiken im Vergleich zu $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}1/-\text{N}4$ ▪ $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}1/\text{N}4$ führen zu einer Verschiebung der Kanalaktivierung hin zu depolarisierenden Potenzialen ▪ Kein signifikanter Unterschied des peak current zwischen den Spleißvarianten |

Tabelle 51: Vergleich der wichtigsten Parameter der zitierten Studien 50, 146, 67 und dieser Arbeit

Fasst man die Ergebnisse aus Tabelle 51 zusammen, wird deutlich, dass sich hinsichtlich der Beeinflussung von Ca^{2+} -Strömen - ungeachtet der verwendeten Technik und der exprimierten Proteine - zwei Gruppen bilden lassen, eine Gruppe mit $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}3$ und $-\text{N}5$ (Gruppe 1) und eine Gruppe mit $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}1$ und $-\text{N}4$ (Gruppe 2). Einzig die Veröffentlichung von *Herzig et al.* (67) passt nicht komplett in dieses Schema; hier wird die $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}4$ (N-Terminus umfasst 207 bp) als starker Modulator des Ca^{2+} -Kanals bezeichnet, der der $\text{CaV}\beta 2\text{a-N}3$ vergleichbare

Eigenschaften aufweist. *Herzig et al.* (67) sehen die modulatorischen Eigenschaften der CaV β 2a-Spleißvarianten allein abhängig von der Länge des Aminoterminus. Diese Annahme bestätigt sich hinsichtlich der CaV β 2a-N3 (N-Terminus umfasst 48 bp) und in gewissem Maße der CaV β 2a-N5 (N-Terminus umfasst 51 bp). Für die beiden Spleißvarianten zeigen sich übereinstimmend in den zusammengefassten Publikationen eine langsame Inaktivierung und eine schnelle Aktivierung, was einen hohen Ca $^{2+}$ -Einstrom in die Zellen zur Folge hat. Auch die von *Herzig et al.* (67) als starke Modulatoren (im Sinne einer Erhöhung der Wahrscheinlichkeit der Kanalöffnung) bezeichneten Spleißvarianten bedingen einen hohen Ca $^{2+}$ -Einstrom. CaV β 2a-N1 wird als schwächster Modulator bezeichnet und bewirkt nur einen geringen Ca $^{2+}$ -Einstrom. Anhand der in Tabelle 51 aufgeführten Ergebnisse zeigt sich, dass diese Spleißvariante eine schnelle Inaktivierung und langsame Aktivierung des Ca $^{2+}$ -Kanals bewirkt, was sich auf die Höhe des Ca $^{2+}$ -Einstroms negativ auswirkt. Dies korreliert mit den Ergebnissen von *Herzig et al.* (67). Hinsichtlich der CaV β 2a-N4 differieren die Resultate von *Herzig et al.* von den übrigen Veröffentlichungen. CaV β 2a-N4 wird als starker Modulator des Ca $^{2+}$ -Kanals beschrieben, wohingegen die anderen Forschungsarbeiten übereinstimmend CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4 solche Eigenschaften zuordnen. Während CaV β 2a-N4 laut *Herzig et al.* einen hohen Ca $^{2+}$ -Einstrom bedingt, weisen die Ergebnisse der anderen Studien auf einen im Vergleich zu anderen CaV β 2-Spleißvarianten geringen Ca $^{2+}$ -Einstrom hin.

Es stellt sich die Frage, ob die Beeinflussung der Kanaleigenschaften von der Länge des Aminoterminus (*Herzig et al.* (67)) oder von der subzellulären Lokalisation der CaV β 2a-Spleißvarianten abhängt (*Takahashi et al.* (146)). Drei von vier der hier besprochenen Forschungsarbeiten zeigen eine Gruppierung der CaV β 2a-Spleißvarianten hinsichtlich ihrer modulatorischen Eigenschaften auf, die konkordant mit der jeweiligen subzellulären Lokalisation ist. Die Ergebnisse von *Herzig et al.* wurden dagegen bislang in keiner Publikation reproduziert. Die Resultate der hier dargestellten Forschungsarbeit sprechen ebenfalls stark für die von *Takahashi et al.* postulierte Abhängigkeit der modulatorischen Eigenschaften von der subzellulären Lokalisation der CaV β 2a-Spleißvarianten. *Takahashi et al.* (146) sehen für die Steady-State Inaktivierung keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen CaV β 2a-Spleißvarianten. In 4.1.4.2.1 gezeigte Resultate zeigen jedoch für CaV β 2a-N4 eine signifikant frühere Inaktivierung (bei negativeren Potenzialen) im Unterschied zu CaV β 2a-N1 bzw. -N3. Somit wirken sich verschiedene N-Termini auch auf die Steady-State Inaktivierung aus.

Bisher wurde CaV β -Untereinheiten keine signifikante Modulation der Inaktivierungskurve des L-Typ-Ca $^{2+}$ -Kanals zugeschrieben. Insbesondere für die Steady-State-Inaktivierung neuronaler Ca $^{2+}$ -Kanäle scheint die jeweilige Identität der CaV β -Untereinheit jedoch ein bestimmender

Faktor zu sein (74). Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit, die signifikante Unterschiede der Steady-State Inaktivierung zwischen CaV β 2a-Spleißvarianten zeigen, stellt sich die Frage, ob dieser Unterschied in der Regulation der Steady-State-Inaktivierungsprofile zwischen kardialen L-Typ und neuronalen Ca $^{2+}$ -Kanälen wirklich so signifikant ist, wie von *Jones et al.* (74) beschrieben.

Ein weiterer Effekt von CaV β -Untereinheiten stellt die Verschiebung des Schwellenpotenzials zu hyperpolarisierenden Potenzialen dar. Es wurde lange angenommen, dass im Gegensatz zu ihrem Einfluss auf die Inaktivierungseigenschaften des Ca $^{2+}$ -Kanals die Effekte der CaV β -Untereinheiten auf die Kanalaktivierung weitgehend homogen sind. *Helton et al.* (66) zeigten jedoch in ihrer Publikation von 2002, dass verschiedene N-terminale Spleißvarianten der CaV β 4-Untereinheit die spannungsabhängige Aktivierung von N- und P/Q-Typ Kanälen unterschiedlich modulieren. *Takahashi et al.* (146) fanden für CaV β 2-Untereinheiten einen signifikanten Unterschied in der Steady-State Aktivierung zwischen CaV β 2a-N5 und CaV β 2a-N4, wobei CaV β 2a-N5, bezogen auf CaV β 2a-N3 als Referenz, eine Aktivierung bei hyperpolarisierenden Potenzialen und CaV β 2a-N4 bei depolarisierenden Potenzialen zeigte. Messungen mit CaV β 2a-N1 zeigten mit denen der CaV β 2a-N3 korrespondierende Werte. In dieser Arbeit hingegen ergab sich eine signifikant zu depolarisierenden Potenzialen verschobene Aktivierung für die CaV β 2a-N1 im Vergleich mit CaV β 2a-N3, -N4 und -N5. Trotz der differierenden Ergebnisse der beiden Forschungsarbeiten sind diese bei näherer Betrachtung kaum widersprüchlich, da man einen klaren Trend erkennen kann. Die Gruppe 1 mit CaV β 2a- N3 und -N5 scheint eine frühere Aktivierung bei negativeren Potenzialen zu bewirken, als dies für Gruppe 2 der Fall ist. *Takahashi et al.* (146) zeigten die Aktivierung bei im Vergleich positiveren Potenzialen für CaV β 2a-N4 und diese Arbeit für CaV β 2a-N1, die gemeinsam die Gruppe 2 bilden. Für diese These sprechen auch die in dieser Arbeit für $V_{1/2,ss-act}$ erhaltenen Werte: -23.07 bzw. -23.84 mV für Ströme in Gegenwart von CaV β 2a-N3 bzw. CaV β 2a-N5 sowie -18.96 bzw. -21.96 mV für Ströme in Gegenwart von CaV β 2a-N1 bzw. CaV β 2a-N4, die sich zwar nicht immer signifikant unterscheiden, aber trotzdem die Unterteilung in oben beschriebene Gruppen demonstrieren. Die differierenden Ergebnisse bei *Takahashi et al.* und dieser Arbeit könnten durch die verwendeten Untereinheiten - Kaninchen, Ratte und Mensch bei *Takahashi et al.* (146), Maus in hier vorgelegter Arbeit - und unterschiedliche Versuchsbedingungen zu erklären sein (siehe 5.4.2).

Insgesamt zeigt sich in Bezug auf die Kinetik des Ca $^{2+}$ -Kanals eine schnellere Aktivierung und langsamere Inaktivierung durch Einfluss von CaV β 2a-Spleißvarianten der Gruppe 1, für Gruppe 2 gilt der umgekehrte Fall. Somit bilden die Mitglieder dieser zwei Gruppen durch

ihre unterschiedlichen N-Termini Möglichkeiten zur Feinregulierung des Kanals. Die V2-Region der CaV β 2a-Spleißvarianten hingegen scheint keinen Einfluss auf die Modulation der Kanaleigenschaften zu besitzen (50).

5.4.4.1 Vergleich der aus den cDNS-Bibliotheken erhaltenen Expressionsverhältnisse mit den elektrophysiologischen Charakteristika der Ca²⁺-Ströme in Gegenwart der CaV β 2a-Spleißvarianten

Im Folgenden werden die elektrophysiologischen Charakteristika der Ca²⁺-Ströme in Gegenwart der CaV β 2a-Spleißvarianten mit dem aus den cDNS-Bibliotheken erhaltenen Expressionsmuster verglichen. Ziel ist es, auf Veränderungen der Ca²⁺-Kanal-Eigenschaften durch CaV β 2a-Spleißvarianten im Lauf der Mausentwicklung schließen zu können und näheren Aufschluss über speziell benötigte Funktionen jeder der CaV β 2a-Spleißvarianten zu gewinnen. Anhand von Abschnitt 5.4.4 wird deutlich, dass sich die in Herzmuskelzellen exprimierten CaV β 2a-Spleißvarianten CaV β 2a-N1, -N4 und -N5 in zwei Gruppen aufteilen lassen: CaV β 2a-N1 und -N4 vermitteln eine langsamere Aktivierung und schnellere Inaktivierung des Ca²⁺-Kanals als CaV β 2a-N5. Die Ergebnisse aus 4.1.1.5 zeigen für jede der drei erstellten cDNS-Bibliotheken eine dominierende Expression von CaV β 2a-N4, sowie in der P7-Random-cDNS-Bibliothek auch von CaV β 2a-N1. Diese beiden Spleißvarianten gehören einer Gruppe an und führen im Vergleich mit CaV β 2a-N5 zu einer langsameren Aktivierung und schnellerer Inaktivierung des Ca²⁺-Kanals. Gleichzeitig ist die maximale Stromamplitude in Gegenwart dieser beiden CaV β 2-Varianten kleiner als in Gegenwart von CaV β 2a-N5.

In adultem Mauserz dient der Ca²⁺-Influx zur Initiierung der Ca²⁺-Ausschüttung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (siehe Kapitel 2.3), wohingegen der Ca²⁺-Speicher in embryonalen Herzmuskelzellen noch nicht vollständig ausgebildet ist. Deshalb benötigen diese zusätzlich zur Initiierung der Ca²⁺-Ausschüttung extrazelluläre Calciumionen, die die elektromechanische Kopplung bewerkstelligen (16, 123). Somit sind die embryonalen Herzmuskelzellen zunächst fast allein auf einen Ca²⁺-Einstrom im Vergleich zu adulten Herzmuskelzellen angewiesen. Dies könnte erfordern, dass die Kinetik der Ca²⁺-Ströme den Bedürfnissen der elektromechanischen Kopplung direkt angeglichen ist und deshalb eher langsamer aktivierende und schneller inaktivierende Ströme vonnöten sind. Andererseits könnte es notwendig sein, dass die Stromamplitude in dieser Entschlussphase erhöht ist. Dies wird insbesondere durch CaV β 2a-N5 bewirkt, die allerdings in der frühen Embryonalphase eher gering exprimiert wird. *Nguemo et al.* (110) berichten in ihrer aktuellen Publikation, dass die Erhöhung von I_{Ca} wäh-

rend der Embryonalentwicklung auf eine Erhöhung der Anzahl an Kanälen in der Membran und nicht aufgrund einer Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit der vorhandenen Kanäle erfolgt. Dass beispielsweise die CaV β 2a-N1 - die in der P7-Random-cDNS-Bibliothek die Hälfte aller isolierten Klone darstellt - während ihre Expression in der cDNS-Bibliothek aus adultem Herzgewebe deutlich reduziert war - zu einer Steigerung der Transportrate der CaV- α _{1.2}-Untereinheit führt, wäre denkbar, allerdings zeigen unsere elektrophysiologischen Untersuchungen keinen Hinweis auf eine solche Funktion, da der gemessene I_{Ca} (Peak current) unter Einfluss der CaV β 2a-N1 nicht signifikant von den Werten in Gegenwart von CaV β 2a-N3 und -N4 differiert (Abbildung 34).

Somit lässt sich im Vergleich des in den cDNS-Bibliotheken erhaltenen Expressionsverhältnisses und der elektrophysiologischen Charakteristika der Ströme in Gegenwart der CaV β 2a-Spleißvarianten kein direkter Hinweis auf eine spezifische Funktion einer der CaV β 2a-Spleißvarianten während der Fetal- bzw. Neonatalperiode ableiten.

5.4.5 Repräsentation physiologischer Vorgänge in nativen Kardiomyozyten durch heterologe Expressionssysteme

Sowohl im Rahmen der hier beschriebenen Versuche als auch in den vorgestellten Veröffentlichungen wurden die Untersuchungen des Einflusses verschiedener CaV β 2a-Spleißvarianten auf die L-Typ Ca²⁺-Kanaleigenschaften mittels heterologer Expression durchgeführt. Hierzu wurden eine CaV α ₁-, eine CaV β 2- und meist noch die CaV α ₂ δ -Untereinheit in geeigneten Zellen, z.B. HEK293-Zellen, die keine bzw. nur eine sehr geringe intrinsische Expression dieser Untereinheiten zeigen, exprimiert. Solche Systeme können jedoch im Vergleich zu den Gegebenheiten in Kardiomyozyten, hinsichtlich der möglichen Existenz bekannter und unbekannter Regulationsfaktoren, Ankerproteine und posttranslationaler Modifikationen, deutlich differieren.

Wei et al. (161) befassten sich mit der Frage, ob die in heterologen Expressionssystemen aufgezeigten Modulationseigenschaften verschiedener CaV β -Untereinheiten in nativen Kardiomyozyten ebenfalls vorhanden sind. Dazu entwickelten sie eine Adenovirus-basierte Transfektionsmethode zur Einschleusung von CaV β -Untereinheiten in isolierte adulte Rattenkardiomyozyten. Sie konnten zeigen, dass im Gegensatz zum heterologen Expressionssystem die Anzahl von CaV β 2-Untereinheiten in einer Herzmuskelzelle Einfluss auf die Stromdichte des L-Typ Ca²⁺-Kanals besitzt, wobei die Expression rekombinanter CaV β 2-Untereinheiten in Kardiomyozyten zu einer drei- bis vierfachen Erhöhung der Stromdichte führte. Ähnlich wie in heterologen Expressionssystemen veränderten verschiedene CaV β 2-

Untereinheiten die Inaktivierungseigenschaften des L-Typ Ca^{2+} -Kanals. Dabei zeigten die einzelnen $\text{CaV}\beta 2$ -Untereinheiten die gleichen spezifischen Eigenschaften in Kardiomyozyten wie in heterologen Systemen. Zusätzlich fiel auf, dass für die $\text{CaV}\beta 2\text{-N3}$ eine sehr langsame Inaktivierungsrate verglichen mit der nativer Ca^{2+} -Kanäle in Kardiomyozyten auftrat, weshalb *Wei et al.* folgerten, dass eine andere $\text{CaV}\beta 2$ -Spleißvariante in Kardiomyozyten dominiert, was sich gut mit den Ergebnissen hier vorgelegter Arbeit aus 4.1.1 und 4.1.2.1 deckt.

Insgesamt weist die Publikation von *Wei et al.* darauf hin, dass heterologe Expressionssysteme zur Untersuchung des L-Typ Ca^{2+} -Kanals und seiner die Kanalfunktion modulierenden $\text{CaV}\beta$ -Untereinheiten für hier dargestellte Forschungsarbeit durchaus geeignet sind, da sie die Unterschiede in den modulatorischen Eigenschaften der $\text{CaV}\beta 2$ -Spleißvarianten in sehr ähnlicher Weise wie native Kardiomyozyten wiedergeben können.

5.4.6 Vergleich der Eigenschaften der Ca^{2+} -Ströme in nativen Kardiomyozyten mit denen der Ca^{2+} -Ströme im heterologen Expressionssystem HEK293

Yamada et al. (167) beschreiben als Ziel der Forschungsarbeiten ihrer Publikation von 2001, den Ca^{2+} -Strom nativer Kardiomyozyten von Ratte in einem heterologen Expressionssystem zu rekonstituieren. Hierzu wurden Ganzzellmessungen mit Bariumionen als Ladungsträger an baby hamster kidney (BHK-) Zellen durchgeführt, die mit einer $\text{CaV}\alpha_1 1.2$ -Untereinheit, einer $\text{CaV}\alpha_2\delta$ -Untereinheit und $\text{CaV}\beta 2\text{-N1}$ bzw. -N3 transfiziert wurden. Eine parallele Expression in HEK293- bzw. COS-Zellen sowie die Kotranfektion einer $\text{CaV}\alpha_2\delta$ -Untereinheit ergab keinen Unterschied der gemessenen Inaktivierungseigenschaften. Es stellte sich heraus, dass die $\text{CaV}\beta 2\text{-N3}$ signifikant differierende Inaktivierungseigenschaften der Ba^{2+} -Ströme im Vergleich mit denen nativen Kardiomyozyten hervorbrachte, während für $\text{CaV}\beta 2\text{-N1}$ eine zu nativen Kardiomyozyten ähnliche Inaktivierung des Ba^{2+} -Stroms beobachtet wurde. Allerdings konnten nicht alle Parameter übereinstimmend mit den Messergebnissen an nativen Kardiomyozyten rekonstituiert werden. Während im Vergleich der Werte für τ_{slow} von Strömen in Gegenwart von $\text{CaV}\beta 2\text{-N1}$ und $\text{CaV}\alpha_1 1.2$ im heterologen System und Strömen im nativen System kein signifikanter Unterschied bestand, ergab der Vergleich der Inaktivierungsrate r_{400} zwischen dem heterologen System ($\text{CaV}\beta 2\text{-N1}$ und $\text{CaV}\alpha_1 1.2$) und nativen Kardiomyozyten signifikante Unterschiede. Der Wert der Messungen an nativen Kardiomyozyten lag zwischen den Werten für Ströme in Gegenwart von $\text{CaV}\beta 2\text{-N1}$ und $\text{CaV}\beta 2\text{-N3}$. Auch für die Spannungsabhängigkeit der I-V-Beziehung waren signifikant unterschiedliche Werte messbar. Beim selben Versuch mit Ca^{2+} (1,8mM) anstatt Ba^{2+} als Ladungsträger zeigten

sich vergleichbare Inaktivierungsraten für Ströme in Gegenwart von CaV β 2a-N1 im Vergleich zu Strömen nativer Kanäle, während sich für durch die CaV β 2a-N3 modulierten Ströme weiterhin eine signifikant langsamere Inaktivierung ergab. Auch in Bezug auf τ_{fast} waren die Werte für CaV β 2a-N1-modulierte Ströme im heterologen System und nativer Kanäle vergleichbar und differierten signifikant zu denen für CaV β 2a-N3. Der Parameter τ_{slow} nativer Kanäle hingegen zeigte signifikant niedrigere Werte als der entsprechende Parameter für Ströme in Gegenwart von CaV β 2a-N1 und eine noch größere Differenz zu CaV β 2a-N3-modulierten Strömen. Zudem ergaben sich signifikante Unterschiede in der Spannungsabhängigkeit der I-V-Beziehung zwischen den drei Gruppen.

Somit gelang es *Yamada et al.* (167) nicht, Ca²⁺-Ströme identisch denen in nativen Kardiomyozyten mittels eines heterologen Expressionssystems zu rekonstituieren. Diese Differenzen müssen nicht allein durch eine unphysiologische Zusammensetzung der Untereinheiten des Ca²⁺-Kanals bedingt sein, sondern können das Fehlen zusätzlicher Modulatoren ausdrücken. Es stehen drei weitere CaV β 2a-Spleißvarianten zur Verfügung (CaV β 2a-N2, -N4, -N5), die im Rahmen der Studie von *Yamada et al.* nicht mit den Messungen an nativen Kardiomyozyten verglichen wurden und potentiell native Ca²⁺-Ströme in heterologen Expressionssystemen rekonstituieren könnten. Zudem ist nicht ausgeschlossen, dass die Kanaleigenschaften durch mehrere CaV β 2-Spleißvarianten parallel gesteuert werden (siehe 5.2.2). Dies müssen künftige Arbeiten zeigen.

5.4.7 Einfluss des CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins auf die Eigenschaften des L-Typ Ca²⁺-Stroms

Nach 5.4.6 scheint die Koexpression einer CaV α 1.2- mit einer CaV β 2-Untereinheit zur Rekonstituierung aller Eigenschaften nativer Ca²⁺-Ströme nicht auszureichen, was die Frage nach fehlenden akzessorischen Untereinheiten oder Modulatoren aufwirft.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Einzelzell-PCR-Experimenten ergaben sich Hinweise auf die Koexistenz mehrerer CaV β 2-Spleißvarianten in einer Herzmuskelzelle. Um zu überprüfen, ob mehr als eine Spleißvariante zur Rekonstitution nativer Ca²⁺-Ströme notwendig ist, bedienten wir uns eines CaV β 2a-N1-CaV β 2a-N4-Fusionsproteins. Mittels dieses Fusionsproteins wurde sichergestellt, dass beide CaV β 2a-Spleißvarianten gleichzeitig in unmittelbarer Kanalnähe vorhanden waren. Die Entscheidung fiel auf ein Fusionsprotein mit CaV β 2a-N1- und CaV β 2a-N4, da diese entsprechend unseren cDNS-Bibliotheken die zwei am häufigsten in Herz exprimierten Spleißvarianten sind. Parallel dazu wurden dieselben Messungen nach Kotransfektion der CaV α 1.2-Untereinheit mit CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4 als Referenz vor-

genommen und die von *Yamada et al.* (167) beschriebenen differierenden Werte bei Messungen in heterologen Expressionssystemen und nativen Kardiomyozyten für das Fusionsprotein sowie die Kotransfektion analysiert und mit den für die CaV β 2a-N1-modulierten Ströme erhaltenen sowie an nativen Kanälen gemessenen Werten verglichen.

In Bezug auf die Spannungsabhängigkeit der I-V-Beziehung ergab sich sowohl für das Fusionsprotein als auch für die Kotransfektion eine Verschiebung der halbmaximalen Aktivierung hin zu positiveren Potenzialen im Vergleich zu CaV β 2a-N1. Hinsichtlich der r400 zeigten sich bei -10 mV und +20 mV Ströme, die durch das Fusionsprotein reguliert wurden, kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Werte von CaV β 2a-N1. Auch bei Kotransfektion von CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N4 ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Inaktivierungsrate der entsprechenden Ströme (siehe Tabellen 23, 34 und 35).

Aufgrund der oben aufgeführten Ergebnisse scheint unwahrscheinlich, dass die beiden CaV β 2-Spleißvarianten CaV β 2a-N1 bzw. CaV β 2a-N4 die von *Yamada et al.* als differierend bezeichneten Parameter Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung und Inaktivierungsrate r400 in nativen Kardiomyozyten kooperierend modulieren. Somit muss die Suche nach den fehlenden Faktoren zum Erhalt nativer Ca²⁺-Ströme im heterologen Expressionssystem weitergeführt werden. Auffallend ist jedoch, dass auch die Kotransfektion von zwei CaV β 2a-Untereinheiten im Vergleich mit der Transfektion nur einer entsprechenden CaV β 2a-Untereinheit - entweder CaV β 2a-N1 oder CaV β 2a-N4 - differierende Ströme hervorbringt. Hier liegen die gemessenen Werte, wie man erwarten könnte, nicht zwischen denen der einzeln exprimierten CaV β 2a-Spleißvarianten; diese Ergebnisse schließen aus, dass die im Verhältnis 1:1 transfizierten Spleißvarianten zu je 50% an den in der Membran vorhandenen Ca²⁺-Kanälen wirken. Ursache dieser Messunterschiede könnte zum einen die erhöhte Zahl an CaV β 2a-Transkripten in der Zelle sein. Ebenfalls möglich ist, dass beide Untereinheiten in Kombination spezifische Auswirkungen auf die Kanalfunktion bedingen, die sie als einzeln mit einer CaV α _{1.2}-Untereinheit exprimierte CaV β 2a-Untereinheiten nicht zeigen.

5.5 Klonierung der CaV α_1 1.2-Untereinheit

5.5.1 Vergleich der Spleißmuster der CaV α_1 1.2-Untereinheit in glatter Muskulatur mit Herzmuskulatur

Lange wurde angenommen, dass alternative Spleißvorgänge in Bezug auf die CaV α_1 1.2-Untereinheit in glatter Muskulatur bzw. Herzmuskulatur ein festgelegtes Schema besitzen. Als „klassische“ Verteilung galt die folgende Kopplung einzelner Exonabschnitte:

Glatten Muskulatur: Exon 1b / 8B / + 9* / 32

Herzmuskulatur: Exon 1a / 8A / - 9* / 31.

So vermittelt beispielsweise Exon 8B die für glatte Muskulatur typische wesentlich höhere Dihydropyridin-Sensitivität (164). Es zeigte sich in Versuchen mit nativen Herzzellen und vaskulären glatten Muskelzellen, dass der Quotient $IC_{50}^{\text{Herz}} / IC_{50}^{\text{Gefäße}}$ (IC_{50} , mittlere inhibitorische Konzentration) im Vergleich zu Ergebnissen aus in vitro durchgeführten Studien bei vergleichbaren Membranpotenzialen sogar noch wesentlich höher lag (55, 173, 145). Somit scheint die Dihydropyridin-Sensitivität nicht allein durch alternatives Spleißen dieses Exon reguliert zu werden. Die Tatsache, dass DHPs eher an den inaktivierten Kanal binden und - aufgrund des weniger negativen Membranpotenzials - in glatter Muskulatur im Vergleich zu Kardiomyozyten ein größerer Anteil von Kanälen in diesem Zustand vorliegt, weist auf einen CaV1.2 Subtyp-unspezifischen Mechanismus. Allerdings schließt dies nicht aus, dass weit komplexere Spleißvorgänge innerhalb der CaV α_1 1.2-Untereinheit zusätzlich eine Rolle spielen.

Eine aktuelle Studie von *Tang et al.* (148) zeigt, dass keine Muskeltyp-spezifische CaV α_1 1.2-Spleißform existiert, sondern dass allein für Herzgewebe von Mensch mindestens 30 verschiedene Kombinationen und in glatter Muskulatur von Mensch nicht weniger als 20 Spleißvarianten vorhanden sind. *Tang et al.* untersuchten dabei Gewebeproben aus der Aorta. Insgesamt zeigt sich eine große Inhomogenität in Bezug auf die Häufigkeit des Auftretens einzelner Exons oder von Exonkombinationen zwischen den verschiedenen Studien zu diesem Thema. Ein Erklärungsansatz für diese teils widersprüchlichen Ergebnisse ist, dass die Vielzahl an Spleißformen der CaV α_1 1.2-Untereinheit der Zelle eine exakte Feineinstellung auf aktuelle Bedürfnisse ermöglichen könnte und gefundene Spleißmusterkonfigurationen jeweils ein Abbild von Zellpopulationen, die unterschiedlichen Versuchs- und Umgebungsbedingungen ausgesetzt waren, darstellen.

Unter den in dieser Arbeit aus Mauserherz amplifzierten Klonen enthält nur einer, Klon 15, die klassische Exonverteilung der kardialen $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit. Weiterhin wurde ein Klon, Klon 29, der die postulierte Exonfolge von $\text{CaV}\alpha_11.2$ in glatter Muskulatur besitzt, identifiziert. Die übrigen vier sequenzierten Klone enthalten Kombinationen dieser beiden Spleißmuster. Als einzige Kombinationen scheinen die Exons 1A und 8A sowie Exon 1B und 8B konstant gekoppelt zu sein (siehe Tabelle 25).

5.5.1.1 Vergleich des Spleißmusters des N-Terminus von $\text{CaV}\alpha_11.2$

Traditionell wird die $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Spleißvariante mit der kurzen Form des N-Terminus, $\text{CaV}\alpha_11.2b$, als „neuronal“, und die den langen N-Terminus enthaltende $\text{CaV}\alpha_11.2a$ als „kardiale“ Form bezeichnet. *Saada et al.* (132) konnten mittels eines RNase-protection assay eindeutig nachweisen, dass $\text{CaV}\alpha_11.2a$ die dominierende Form in menschlichem Herzgewebe darstellt. Zum gleichen Ergebnis kamen *Biel et al.* (9) für die $\text{CaV}1.2a$ -Expression in Herz von Kaninchen. Allerdings wird auch $\text{CaV}\alpha_11.2b$ in geringem Maße in Herzgewebe exprimiert, wie auch $\text{CaV}\alpha_11.2a$ in einigen Geweben, die Anteile glatter Muskulatur oder Neurone enthalten, beispielsweise Aorta oder Harnblase, zu finden ist. Korrespondierend hierzu finden auch *Tang et al.* (148) die $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Spleißvariante in Rattenmyokard präferentiell exprimiert.

5.5.1.2 Vergleich des Spleißmusters des Exon 8

Exon 8 (IS6-Segment) spielt eine wichtige Rolle in Bezug auf die spannungsabhängige Inaktivierung sowie die Interaktion des Kanals mit Dihydropyridinen (DHPs) (76, 172, 116). Hierbei bewirkt Exon 8B, dass DHPs außer an inaktivierte Kanäle auch an ruhende Kanäle binden, was eine spannungsunabhängige Komponente der Blockierung des Ca^{2+} -Kanals bedingt. Daraus ergibt sich eine höhere DHP-Sensitivität weniger bei depolarisierenden Membranpotenzialen als mehr bei in Richtung Hyperpolarisation gehender Potenziale im Vergleich zu Exon 8A (164). Exon 8A hingegen ist Grundlage der von der Aktionspotenzialfrequenz abhängigen Zunahme der DHP-Blockade; so verschiebt eine Frequenzzunahme das Gleichgewicht zwischen verschiedenen Kanalstadien hin zum inaktivierten Stadium, in dem DHPs mit höherer Affinität binden (164). Während in glattem Muskel das inaktivierte Stadium des Kanals aufgrund des weniger hyperpolarisierten Potentials vorliegt, kann im Herzmuskel ein größerer Anteil von Kanälen in inaktivierten Stadien durch eine Frequenzzunahme erreicht werden.

Somit bestätigt die Funktionsanalyse von $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Varianten hinsichtlich des Exon 8 das Ergebnis, dass die $\text{CaV}\alpha_11.2a$ -Spleißvariante, in der Exon 1A und Exon 8A - wie beispiels-

weise in dieser Arbeit gezeigt - gekoppelt sind, im Herzmuskel vorherrscht, was diesem Gewebe die oben beschriebenen pharmakologischen Eigenschaften verleiht. Jüngst zeigten allerdings *Tang et al.* (148), dass in Rattenmyokard auch Exon 1B häufiger zusammen mit Exon 8A als 8B auftritt, während in Gewebeproben aus Aorta Exon 1B fast ausschließlich mit Exon 8B kombiniert exprimiert wurde, Exon 1A dagegen schien fest mit Exon 8A gekoppelt zu sein.

5.5.1.3 Vergleich des Spleißmusters des Exon 9A

Exon 9A folgt unmittelbar der alpha interaction domain (AID) in der L1-Schleife der $\text{CaV}\alpha_1.2$ -Untereinheit. Laut unseren Ergebnissen scheint es in $\text{CaV}\alpha_1.2b$ -Klonen häufiger aufzutreten, kommt aber auch in $\text{CaV}\alpha_1.2a$ -Klonen vor. Dies korreliert mit den Ergebnissen von *Liao et al.* (89), die eine starke Expression des Exons 9A in der glatten Muskelschicht von Arterien aufzeigen konnten, in denen $\text{CaV}\alpha_1.2b$ dominiert, während sich nur eine geringe Expression dieses Exons in Herzmuskelgewebe fand. *Liao et al.* verwendeten menschliches Gewebe. Auch *Tang et al.* (148) amplifizierten nur sehr wenige cDNS-Klone aus Rattenmyokard, die Exon 9A in Kombination mit Exon 1A enthielten. Exon 1B hingegen wurde sowohl in Myokard als auch aortalem Gewebe in 20-30% gemeinsam mit Exon 9A exprimiert.

In elektrophysiologischen Messungen verursachte Exon 9A eine Verschiebung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanal-Aktivierung in hyperpolarisierender Richtung, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Steady-State Inaktivierung oder DHP-Wirkung.

Zudem stellt Exon 9A eine mutmaßliche Substratdomäne der Proteinkinase A dar (10). Allerdings ist der hierfür benötigte Threoninrest nur im $\text{CaV}\alpha_1.2$ -Gen von Mensch und Kaninchen nachgewiesen, im entsprechenden Gen von Ratte und Maus ist er durch einen Alaninrest ersetzt. Bislang wurde keine Arbeit publiziert, in der eine *in vivo*-Phosphorylierung dieses Threoninrests nachgewiesen ist.

5.5.1.4 Vergleich des Spleißmusters von Exon 17

In Bezug auf Exon 17 dominierte in den Ergebnissen dieser Arbeit das „normale“ Exon 17 vor Exon 17*. *Tang et al.* (147) beschreiben die hier gefundene Insertion von neun Nukleotiden (Exon 17*) wie auch alternativ eine Insertion von zwölf Nukleotiden, die in dieser Arbeit in keinem der sequenzierten Klone identifiziert werden konnte. Letzgenannte Insertion führt zu einem Stopkodon im Leserahmen und könnte einen „halben“ Zwei-Domänen-Kanal bilden. Solche Hemikanäle sind für $\text{CaV}\alpha_1.2.2$ vorhergesagt, wobei im Fall von $\text{CaV}\alpha_1.2.2$ die Hemikanäle durch Zusammenlagerung mit dem Volllängen- $\text{CaV}\alpha_1.2.2$ -Protein die Translation von

Vollängen-Kanälen im endoplasmatischen Retikulum weitgehend verhindern und somit einen physiologischen Mechanismus zur entwicklungsabhängigen oder gewebespezifischen Kanal-expression darstellen könnten (122).

Exon 17 liegt in der L2-Schleife der $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit. In neuronalen $\text{CaV}\alpha_12.2$ -Kanälen spielt diese Region eine wichtige Rolle in Bezug auf die spannungsabhängige Inaktivierung, pharmakologische Eigenschaften und Bindung von Syntaxin (77). Welche Funktion die 9 bp-Insertion für den L-Typ Kanal besitzt und ob eine gewebespezifische Verteilung existiert, wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben und kann auch anhand der Ergebnisse dieser Arbeit nicht gefolgert werden. Dies bleibt somit Aufgabe künftiger Forschungsarbeiten.

5.5.1.5 Vergleich des Spleißmusters der Exons 21 und 22

Sowohl bei der $\text{CaV}\alpha_11.2a$ -Variante als auch der $\text{CaV}\alpha_11.2b$ -Spleißvariante ist Exon 21 vor Exon 22 vorherrschend. *Soldatov et al.* (141) konnten zeigen, dass die Wirkung der Dihydropyridine signifikant durch alternatives Spleißen dieser Exons beeinflusst wird. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass das in den hier sequenzierten $\text{CaV}\alpha_11.2a$ - sowie $\text{CaV}\alpha_11.2b$ -Klonen häufiger vorhandene Exon 21 dem Kanal eine geringere DHP-Sensitivität als Exon 22 verleiht. Dies ist in Übereinstimmung mit der oben diskutierten Prävalenz von $\text{CaV}\alpha_11.2a$ bzw. Exon 8A in kardialem Gewebe, die ebenfalls eine geringere DHP-Sensitivität im Vergleich zu glatter Muskulatur bedingt. Somit könnten die Exons 21 und 22 zum oben diskutierten Quotient $\text{IC}_{50}\text{Herz} / \text{IC}_{50}\text{Gefäße}$ beitragen.

In der Arbeit von *Tang et al.* (148) scheint Exon 1B mit einer höheren Frequenz des Auftretens des Exon 21 vergesellschaftet zu sein, während Exon 1A zu einem Überwiegen des Exon 22 führt. Die Ergebnisse von *Soldatov et al.* sprechen allerdings mehr für das in dieser Arbeit gefundene preferentielle Auftreten von Exon 21 in Herzmuskelgewebe, d.h. Kopplung von Exon 1A und Exon 21.

5.5.1.6 Vergleich des Spleißmusters der Exons 31 und 32

Entsprechend den Ergebnissen der Untersuchungen dieser Arbeit überwiegt Exon 31 vor Exon 32 sowohl bei der $\text{CaV}\alpha_11.2a$ - als auch bei der $\text{CaV}\alpha_11.2b$ -Spleißvariante. Eine Publikation von *Yang et al.* (170) berichtet über eine deutlich höhere Expression von Exon 31 im Vergleich zu Exon 32 in gesundem menschlichen Myokard. Bei auftretender Herzinsuffizienz kehrt sich nach dieser Studie (170) das Verhältnis zugunsten von Exon 32 um.

Im Gegensatz dazu sprechen *Tang et al.* (147, 148) sowie *Feron et al.* (48) von einer dominierenden Expression des Exon 32 in menschlichem bzw. Rattenmyokard.

In Bezug auf die funktionellen Eigenschaften dieser Exons postulierten *Zuhlke et al.* (174), dass Exon 31 dem Ca^{2+} -Kanal eine größere DHP-Sensitivität verleiht als dies für Exon 32 der Fall ist, während von *Tang et al.* (147) keine Veränderungen der biophysikalischen Eigenschaften des Kanals durch das eine oder andere Exon gezeigt werden konnten.

5.5.1.7 Vergleich des Spleißmusters des Exon 33

Es zeigt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit, dass Exon 33 in allen $\text{CaV}\alpha_11.2\text{a}$ -Klonen vorhanden ist, während $\text{CaV}\alpha_11.2\text{b}$ -Klone entweder kein Exon 33 besitzen oder ein verlängertes Exon 33* enthalten. *Tang et al.* (148) finden in adultem Herz (Mensch) ein Auftreten des Exon 33 zusammen mit Exon 1A in über 95% der Klone, während Exon 1B und Exon 33 in 80-90% gekoppelt auftreten. In $\text{CaV}\alpha_11.2\text{b}$ -Klonen aus aortalem Gewebe wurde von *Tang et al.* das Exon 33 nur in etwa 60% exprimiert. Über das Exon 33* wurde von ihnen nicht berichtet. Aufgrund dieser Beobachtungen lässt sich schließen, dass eine Expression des Exons 33 insbesondere in Kombination mit Exon 1A auftritt und somit in Herzmuskelgewebe präferenziell exprimiert wird.

Tang et al. (147) beobachteten einen Einfluss des Exons 33 auf die spannungsabhängige Aktivierung des Kanals: Eine zunehmende Länge des Verbindungsstücks IVS3-IVS4 ging in ihrer Arbeit mit einer Rechtsverschiebung der Aktivierungskurve hin zu depolarisierenden Potenzialen einher. *Soldatov et al.* (141) sahen diesen Unterschied hingegen nicht.

Das Exon 33* wurde in hier vorgelegter Arbeit erstmalig beschrieben. Dass Exon 33* auch beim Screening der cDNS-Bibliotheken auf $\text{CaV}\alpha_11.2$ -cDNS-Klone gefunden wurde, beweist, dass es sich um ein transkribiertes gespleißtes Exon handelt und nicht um ein PCR-Artefakt. Es findet sich sowohl in Proben isolierter mRNA sowohl aus adultem wie aus neonatalem Herzgewebe.

5.5.2 Vergleich der Spleißmuster der $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit in fetalem bzw. adultem Herzgewebe

In Bezug auf entwicklungspezifische Spleißvorgänge der $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit lässt sich anhand der in dieser Arbeiten erhobenen Daten aus der Auswertung der cDNS-Sequenzen (4.1.1.5) keine definitive Aussage über das dominierende Vorkommen einer bestimmten Spleißvariante in Herzgewebe unterschiedlicher Altersstufen treffen. Zum einen wurde keine

ausreichende Anzahl an Klonen, die spleißrelevante Exons enthalten, isoliert und zum anderen beim Durchmustern der cDNS-Bibliothek keine Vollängenklone identifiziert, so dass eine Beurteilung von spezifischen Spleißmustern in Bezug auf die gesamte Sequenz nicht möglich ist. Allerdings fällt auf, dass beispielsweise bei $\text{CaV}\alpha_11.2$ -cDNS, die aus Poly(A)⁺RNS von Herzgewebe adulter Mäuse kloniert wurde, Exon 21 dominiert. Von den elf sequenzierten, aus der P7-Random-cDNS-Bibliothek erhaltenen $\text{CaV}1.2$ -cDNS-Fragmenten enthielten zwei, Klon 57-1 und Klon 50-1, den entsprechenden Sequenzabschnitt, der für Exon 21 bzw. Exon 22 kodiert. Beide, Klon 57-1 und Klon 50-1, kodieren Exon 22; Exon 21 konnte hier nicht identifiziert werden (siehe Tabelle 31). Dadurch stellt sich die Frage, ob diese Veränderungen des Spleißmusters im Zusammenhang mit der Herzentwicklung stehen.

Außer gewebespezifischen Spleißmustern ist auch eine entwicklungsabhängige Veränderung alternativer Spleißvorgänge der $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheit in der Literatur beschrieben. So veröffentlichten *Diebold et al.* (41) eine Arbeit, in der Exon 31 in fetalem und Exon 32 in adultem Rattenherz jeweils das dominierende Exon darstellt. *Tang et al.* (147) dagegen zeigten, dass sowohl in fetalem als auch adultem menschlichen Herzgewebe die Expression von Exon 32 dominiert. Zudem scheint Exon 33 in fetalem Herzgewebe von Mensch wesentlich häufiger vorzukommen. Die Ergebnisse von *Tang et al.* korrelieren gut mit den Resultaten der aus der P7-Random-cDNS-Bibliothek isolierten $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Klonen, da in den Klonen, die die entsprechenden Exonsequenzen (Exon 31 / 32 / 33) enthielten, stets die Expression von Exon 32 als auch Exon 33 nachgewiesen werden konnte. Es wurde kein Klon, der Exon 31, nicht aber Exon 33 enthielt, isoliert. Ein Klon enthielt das bisher nicht beschriebene Exon 33* (siehe Tabelle 31).

Über die anderen Spleißorte sind in der Literatur keine Informationen in Bezug auf potentielle Entwicklungsabhängigkeit vorhanden.

5.5.2.1 Vergleich des Exon 16* mit der Literatur

Der aus der P7-Random-cDNS-Bibliothek isolierte Klon 57-1 besitzt das Exon 16*, was zu einem trunkierten Protein durch eine Verschiebung des Leserahmens mit konsekutivem Stopkodon in Exon 16 führt, wobei die alpha interaction domain (AID) erhalten ist. Dieses Exon ist in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Fan et al. (46) identifizierten drei Spleißvarianten von $\text{CaV}\alpha_11.2$ -Untereinheiten in Rattenkardiomyozyten. Die Expression von Exon 21 und 22, ein Insert nach Exon 32 und ein Insert vor Exon 47 führen zu trunkierten Proteinen: In keinem unserer Klone wurde diese Kombination gefunden. *Yang et al.* (170) beschreiben eine Spleißvariante in menschlichem Myokard mit

Exon 31 und einem Exon 32, dem die letzten sechs Basenpaare des Exons 32 fehlen, was ebenfalls zu einem trunkierten Protein führt. Bei allen in der Literaturrecherche gefundenen beschriebenen trunkierten CaV α_1 1.2-Proteinen (46, 170, 38), so auch bei dem von Klon 57-1 kodierten Protein, ist die AID erhalten.

Der Befund, dass nur ein Klon unter allen sequenzierten Klonen gefunden wurde, der für ein trunkiertes Protein kodiert, korreliert mit einer Arbeit von *Liu et al.* (91), die für alle Entwicklungsstadien des Rattenherzens eine Dominanz der Expression von Vollängen-CaV α_1 1.2-Untereinheiten aufzeigen konnten.

5.6 Fluoreszenzexperimente

Im Folgenden werden die regelrechte Expression und Fluoreszenz der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Fusionsproteine diskutiert, die in dieser Form bisher nicht in anderen Publikationen beschrieben sind. Dies gilt insbesondere für die CaV α_1 1.2-Untereinheit, da bisher nur der erfolgreiche Einbau eines wenige Aminosäuren umfassenden Antikörperepitops in die IIS5-IIS6 Extrazellulärschleife beschrieben ist (113). Der Einbau eines weiteren Proteins wie von GFP in diese Schleife, könnte einen weitaus schwerwiegenderen Eingriff in die Integrität des CaV α_1 1.2-Proteins darstellen.

Die weiteren Abschnitte zeigen und diskutieren die *in vivo*-Untersuchungen der koexprimierten mit einem Fluoreszenzprotein fusionierten CaV β 2a- und CaV α_1 1.2-Untereinheiten im Vergleich mit anderen Publikationen.

5.6.1 Expression eines CaV β 2a- mRFP-Fusionsproteins in HEK293-Zellen

In Bezug auf die CaV β 2a-Untereinheiten zeigten *Takahashi et al.* (146), dass CaV β 2a-N3 und CaV β 2a-N5 eine Assoziation mit der Plasmamembran aufweisen, während CaV β 2a-N1 und CaV β 2a-N5 im Zytosol lokalisiert sind. Diese Unterschiede der subzellulären Lokalisation beruhen ausschließlich auf den unterschiedlichen N-Termini, da die CaV β 2a-Proteine in ihrer restlichen Aminosäuresequenz identisch sind. CaV β 2a-N3 unterliegt einer posttranslationalen Lipidmodifikation, der Palmitoylierung, wodurch über einen Anker eine Membranassoziation ermöglicht ist (105, 124), bei CaV β 2a-N5 ist der Mechanismus der Assoziation mit der Plasmamembran noch Gegenstand der Forschung. Das CaV β 2a-Protein selbst besitzt nach Hydrophathieanalyse durch *Perez-Reyes et al.* (119) bzw. *Castellano et al.* (21) keine Transmembran-

domänen, weswegen für dieses Protein prinzipiell eine zytoplasmatische Lokalisation zu erwarten ist.

Abbildung 60 zeigt konfokalmikroskopische Bilder der mit GFP C-terminal fusionierten CaV β 2a-Untereinheiten (obere Reihe) aus der Veröffentlichung von *Takahashi et al.* (146) im Vergleich mit lichtmikroskopischen Bildern aus dieser Arbeit. Vergleicht man nun CaV β 2d, die nach der Nomenklatur dieser Arbeit CaV β 2a-N1 entspricht, mit der Expression des CaV β 2a-N1-mRFP-Fusionsproteins dieser Arbeit, sieht man, dass in beiden Forschungsarbeiten für diese Spleißvariante eine Verteilung der Fluoreszenz über die ganze Zelle, vor allem im Zytosol, mit Aussparung des Zellkerns vorhanden ist. Somit bestätigt sich auch in dieser Arbeit, dass die mit mRFP fusionierte CaV β 2a-N1-Spleißvariante überwiegend im Zytosol lokalisiert ist.

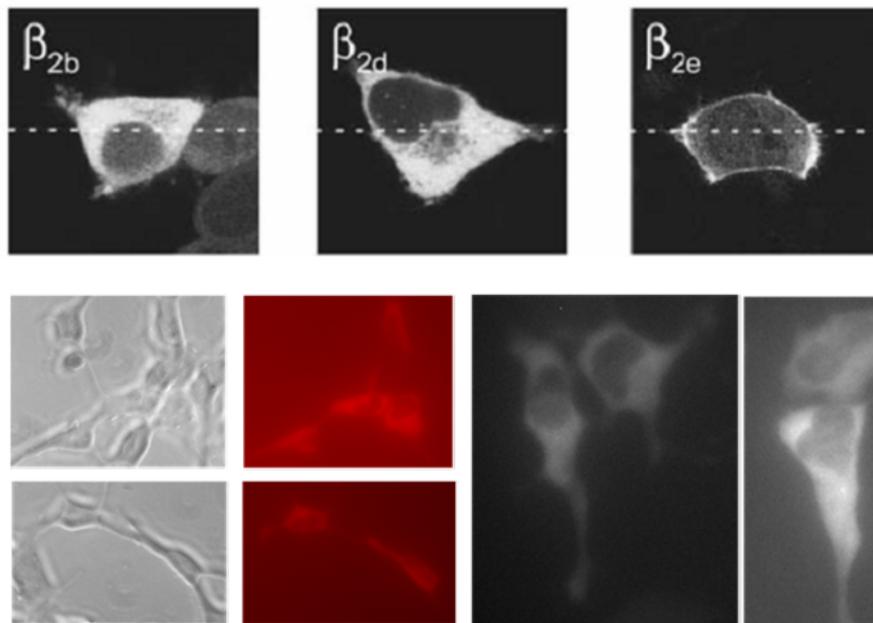


Abbildung 60: Vergleich von C-terminal mit einem Fluoreszenzprotein fusionierten CaV β 2a-Untereinheiten; oben CaV β 2b entsprechend CaV β 2-N4, CaV β 2d entsprechend CaV β 2-N1 und CaV β 2e entsprechend CaV β 2-N5 der Nomenklatur dieser Arbeit; aus *Takahashi et al.* (146); unten, CaV β 2a-N1-mRFP-Fusionsprotein, diese Arbeit

Es zeigt sich weiterhin, dass das mRFP keinen Nachteil gegenüber dem üblichen grün fluoreszierenden Protein GFP in Bezug auf Expressions- und Signalstärke des Proteins mit sich bringt und sich somit gut für fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen eignet.

5.6.2 Expression des CaV α_1 1.2-s-pHluorin-Fusionsproteins in HEK-Zellen

Beim Vergleich der in Abbildung 61 dargestellten Aufnahmen von *Harry et al.* (links) und aus dieser Arbeit (rechts) zeigt sich in beiden Fällen eine intensive Fluoreszenz verteilt über die gesamte Zelle mit Intensitätsmaximum im zentralen Bereich der Zellen. *Harry et al.* verwendeten im Gegensatz zu dieser Arbeit ein gelb fluoreszierendes Protein, welches mit dem N-Terminus der CaV α_1 1.2-Untereinheit fusioniert wurde. Dieses Konstrukt wurde in COS-Zellen exprimiert. Eine vermehrte Anreicherung der CaV α_1 1.2-Untereinheit in der Plasmamembran ist in keiner der Aufnahmen erkennbar, ist aber auch ohne Koexpression einer CaV β -Untereinheit, welche den Membrantransport der CaV α_1 1.2-Untereinheit bewerkstelligt, nicht zu erwarten.

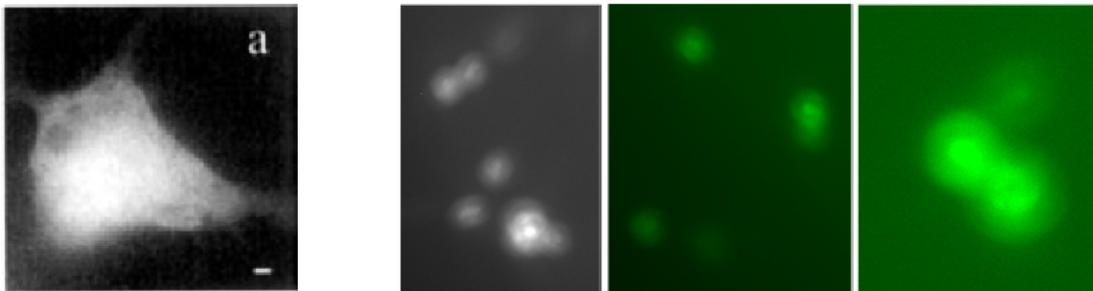


Abbildung 61: Vergleich der Expression der mit einem Fluoreszenzprotein fusionierten CaV α_1 1.2-Untereinheiten links aus *Harry et al.*, N-terminale Fusion, COS-Zellen (63); rechts diese Arbeit, Fusion des s-pHluorins in der Extrazellulärschleife; HEK293-Zellen.

Allerdings erschienen die grün fluoreszierenden Zellen dieser Arbeit klein und abgerundet, im Vergleich zu den von *Harry et al.* (63) gezeigten Zellen, die eine physiologische länglich-ovale Form besitzen. Die Transfektionseffizienz der in dieser Arbeit verwendeten HEK-Zellen war niedrig. Somit besteht die Möglichkeit, dass das exprimierte Fusionsprotein die Integrität der Zellen stört.

5.6.3 Koexpression des CaV α_1 1.2-s-pHluorin- mit dem CaV β 2a-N4-mRFP-Fusionsprotein in HEK293-Zellen

Der obere Teil von Abbildung 62 zeigt die mit einem Fluoreszenzprotein fusionierte CaV β 2a-Untereinheit koexprimiert mit einer nicht fluoreszenzmarkierten CaV α_1 1.2-Untereinheit aus *Harry et al.* (63), oben links, im Vergleich mit dieser Arbeit, oben rechts. Man erkennt in bei-

den Fotografien eine basale Fluoreszenz der gesamten Zelle mit verstärkter Anfärbung der Plasmamembran und bestimmter Bereiche innerhalb der Zellen.

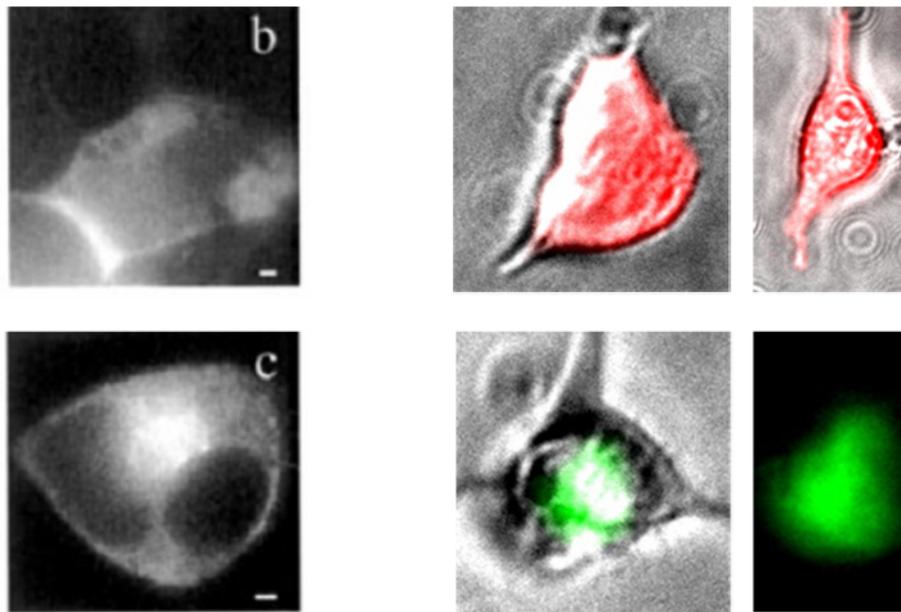


Abbildung 62: Koexpression der $\text{CaV}\alpha_{1.2}$ -s-pHluorin- mit dem $\text{CaV}\beta_{2a}$ -mRFP-Fusionsprotein in HEK293-Zellen. Links oben (EYFP)N- $\text{CaV}\beta_{2(r)}$ + $\text{CaV}\alpha_{1.2}$ + $\text{CaV}\alpha_{2\delta}$, aus Harry et al. (63); links unten (EYFP)N- $\text{CaV}\alpha_{1.2}$ + $\text{CaV}\beta_{2(r)}$ + $\text{CaV}\alpha_{2\delta}$, aus Harry et al. (63); rechts oben das $\text{CaV}\beta_{2a}$ -N4-mRFP-Fusionsprotein + $\text{CaV}\alpha_{1.2}$, diese Arbeit; rechts unten das $\text{CaV}\alpha_{1.2}$ -s-pHluorin-Fusionsprotein + $\text{CaV}\beta_{2a}$ -N4, diese Arbeit; (r) bezeichnet die Verwendung einer $\text{CaV}\beta_{2}$ -Untereinheit aus Herz von Kaninchen (rabbit); die von Harry et al. verwendeten $\text{CaV}\alpha_{1.2}$ - und $\text{CaV}\alpha_{2\delta}$ -Untereinheiten stammen aus Gewebe von Mensch, die in der vorgelegten Arbeit verwendeten $\text{CaV}\alpha_{1.2}$ - und $\text{CaV}\beta_{2}$ -Untereinheiten aus Herzgewebe von Maus.

Es fällt auf, dass sich diese Bilder deutlich von denen der allein transfizierten $\text{CaV}\beta_{2a}$ -Untereinheit (Abbildung 60) unterscheiden, wo eine gleichmäßige Grün- bzw. Rotfärbung mit Aussparung des Kerns zu erkennen war. Die Abbildung zeigt eine schwerpunktmäßige Umverteilung der Fluoreszenz von gleichmäßiger Verteilung im Zytoplasma hin zu Akkumulation im Bereich der Plasmamembran und bestimmten Strukturen im Zytosol. Dies korreliert mit dem durch die $\text{CaV}\beta_{2a}$ -Untereinheit vermittelten Einbau der $\text{CaV}\alpha_{1.2}$ -Untereinheit in die Plasmamembran, wo $\text{CaV}\beta_{2a}$ - und $\text{CaV}\alpha_{1.2}$ -Untereinheit in unmittelbarer Nachbarschaft miteinander interagieren sowie der Lokalisation der beiden Untereinheiten in Strukturen des endoplasmatischen Retikulums, in denen die $\text{CaV}\beta_{2a}$ -Untereinheit wahrscheinlich eine für den Membrantransport der $\text{CaV}\alpha_{1.2}$ -Untereinheit wichtige Chaperonfunktion (siehe 2.4.1) besitzt. Somit stellt sich in den Ergebnissen dieser Arbeit auch im Vergleich mit den Ergebnissen von Harry et al. die Interaktion von $\text{CaV}\alpha_{1.2}$ - und $\text{CaV}\beta_{2a}$ -Untereinheiten in vivo sehr

schön dar und scheint durch die Fusion der CaV β 2a-Untereinheit mit dem mRFP nicht beeinträchtigt zu sein.

Im unteren Teil der Abbildung 62 - links aus der Studie von *Harry et al.* (63), rechts die Ergebnisse dieser Arbeit - wurde die mit einem Fluoreszenzprotein fusionierte CaV α _{1.2}-Untereinheit mit einer nicht fluoreszenzmarkierten CaV β 2a-Untereinheit koexprimiert. Beide Fotografien zeigen eine starke Fluoreszenz in einem rundlichen zentralen Bereich der Zellen, während sich die Peripherie nur schwach anfärbt. Im Bild von *Harry et al.* (63) erkennt man zusätzlich eine Anfärbung der Plasmamembran, die in dieser Form in hier dargelegter Arbeit nicht zu sehen ist.

Da es sich bei der CaV α _{1.2}-Untereinheit um ein sehr großes Protein mit zahlreichen Transmembrandomänen handelt, ist es durchaus möglich, dass der Plasmamembran-Einbau in unseren Experimenten trotzdem stattgefunden hat, die schwachen Fluoreszenzsignale aber mittels Lichtmikroskopie, die wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde, nicht oder nur schwach detektierbar sind. Es zeigt sich, dass im Vergleich zu den Aufnahmen von *Harry et al.* eine vermehrte Akkumulation der CaV α _{1.2}-Untereinheit im ER stattfindet, während der Membrantransport in geringerem Maße erfolgt. Der unzureichende Membrantransport, der in der Publikation von *Harry et al.* (63) möglicherweise nicht besteht, könnte auf die Fusion des Fluoreszenzproteins in die IIS5-IIS6 Extrazellulärschleife von CaV α _{1.2} zurückzuführen sein. Es ist nämlich nicht ausgeschlossen, dass diese Modifikation des Proteins seine Tertiärstruktur und somit seinen Transport und den Einbau in die Plasmamembran beeinflusst. Eine sehr sensitive Methode, um den korrekten Einbau von nur wenigen CaV α _{1.2}-Untereinheiten in die Membran nachzuweisen, sind elektrophysiologische Messungen. Hierfür sind anders als für die Lichtmikroskopie nur wenige Moleküle notwendig. Dies bedeutet, dass die für elektrophysiologische Messungen ausreichende Anzahl an Kanälen nicht zwangsläufig sichtbare Signale in der Fluoreszenzmikroskopie ergibt. Solche elektrophysiologischen Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe begonnen (Anhang 2, Tabelle 41); allerdings ist man für die in vivo-Identifizierung des Transportwegs von CaV α _{1.2} in die Plasmamembran auf mikroskopische Techniken angewiesen.

5.6.4 Konfokalmikroskopie der CaV α _{1.2}-Untereinheit

Abbildung 63 zeigt den Vergleich der konfokalmikroskopischen Aufnahmen von *Cheng et al.* und dieser Arbeit. Die Studie von *Cheng et al.* (27) zeigt, dass die Expression der CaV α _{1.2}-Untereinheit in HEK293-Zellen eine bevorzugte intrazelluläre Lokalisation in tubulären, vernetzten Strukturen, teils perinukleär, bewirkt; dies könnte einer Lokalisation der CaV α _{1.2}-

Untereinheit im endoplasmatischen Retikulum entsprechen (Abbildung 63, links). Zusätzlich sind kleine rundliche Bereiche stärkerer Signalintensität zu erkennen. Das Fluoreszenzsignal erstreckt sich über die gesamte Zelle mit Aussparung des Zellkerns. Die Expression des CaV- α_1 1.2-s-pHluorin-Fusionsproteins in unseren Untersuchungen (Abbildung 63, rechts) führt, ähnlich dem linken Teil der Abbildung 63, zu einer diskreten Fluoreszenz der gesamten Zelle mit Aussparung des Kerns. Im linken Teil der Abbildung 63 sind kleine rundliche Bereiche stärkerer Signalintensität zu erkennen, die hinsichtlich ihrer Identität aufgrund zu geringer Auflösung nicht näher analysiert werden können.

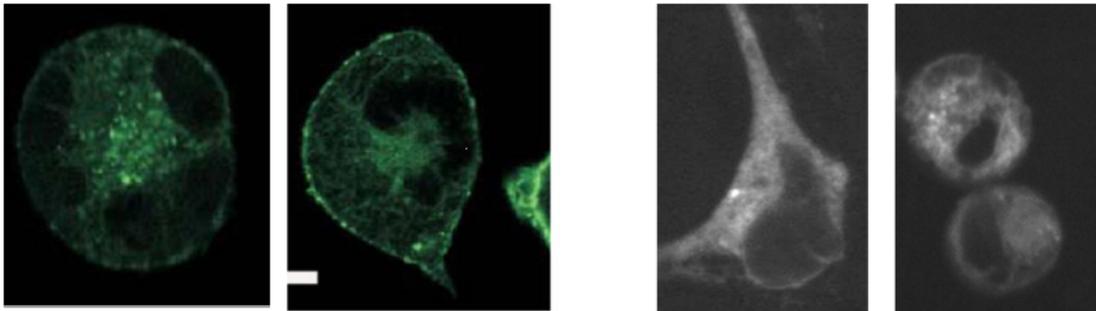


Abbildung 63: Vergleich konfokalmikroskopischer Bilder der in HEK293-Zellen transfizierten fluoreszenzmarkierten CaV α_1 1.2-Untereinheit. Links HEK293-Zellen transfiziert mit der CaV α_1 1.2-Untereinheit aus Rattengewebe - C-terminal fusioniert mit EGFP - und der CaV $\alpha_2\delta$ -Untereinheit, aus Cheng *et al.* (27); rechts HEK293-Zellen transfiziert mit CaV α_1 1.2-Untereinheit aus Herzgewebe von Maus mit im Extrazellulärloop fusioniertem s-pHluorin, diese Arbeit)

Die Konfokalmikroskopie konnte in dieser Arbeit leider nicht mit einer höheren Auflösung durchgeführt werden, da das Fluoreszenzsignal der CaV α_1 1.2-Untereinheit relativ schwach und die Transfektionsrate zu gering war, um einzelne Zellen, wie beispielsweise in der Arbeit von Cheng *et al.* (27) gezeigt, näher fokussieren zu können. Deshalb muss über den Rahmen dieser Arbeit hinaus zunächst primär eine Steigerung der Transfektionseffizienz erreicht werden, um weitere Untersuchungen durchführen und kritisch analysieren zu können. Für zukünftige Arbeiten stehen deshalb Untersuchungen im Vordergrund, bei denen die Transfektionseffizienz erhöht wird, z.B. durch Verwendung von viralen Expressionssystemen; gleichzeitig soll in diesen Zellen die Kanalaktivität registriert werden. Ziel ist es, diese Untersuchungen dann auf Kardiomyozyten zu übertragen, bei denen die normalerweise vorhandene CaV β 2-Untereinheit aufgrund des Targeting ihres Gens ausgeschaltet ist. Solche CaV β 2-defizienten Mauslinien existieren in der Arbeitsgruppe (162).

6 Literaturverzeichnis

1. Allen TJ and Mikala G (1998) Effects of temperature on human L-type cardiac Ca²⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Pflügers Arch* 436: 238-247.
2. Alwine JC, Kemp DJ and Stark GR (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5350-5354.
3. Ashby MC, Ibaraki K and Henley JM (2004) It's green outside: tracking cell surface proteins with pH-sensitive GFP. *Trends in Neurosciences* 27: 257-261.
4. Aviv H and Leder P (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69: 1408-1412.
5. Bean BP (1991) Pharmacology of Calcium Channels in Cardiac-Muscle, Vascular Muscle, and Neurons. *American Journal of Hypertension* 4: S406-S411.
6. Berjukow S, Marksteiner R, Gapp F, Sinnegger MJ and Hering S (2000) Molecular mechanism of calcium channel block by isradipine - Role of a drug-induced inactivated channel conformation. *Journal of Biological Chemistry* 275: 22114-22120.
7. Bichet D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, Mori Y and De Waard M (2000) The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* 25: 177-190.
8. Biel M, Ruth P, Bosse E, Hullin R, Stuhmer W, Flockerzi V and Hofmann F (1990) Primary Structure and Functional Expression of A High-Voltage Activated Calcium-Channel from Rabbit Lung. *Febs Letters* 269: 409-412.
9. Biel M, Hullin R, Freundner S, Singer D, Dascal N, Flockerzi V and Hofmann F (1991) Tissue-Specific Expression of High-Voltage-Activated Dihydropyridine-Sensitive L-Type Calcium Channels. *European Journal of Biochemistry* 200: 81-88.
10. Bielefeldt K (1999) Molecular diversity of voltage-sensitive calcium channels in smooth muscle cells. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 133: 469-477.

11. Birnbaumer L, Qin N, Olcese R, Tareilus E, Platano D, Costantin J and Stefani E (1998) Structures and functions of calcium channel beta subunits. *J Bioenerg Biomembr* 30: 357-375.
12. Birnboim HC and Doly J (1979) Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid Dna. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1523.
13. Blanco G and Mercer RW (1998) Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 44: F633-F650.
14. Blumenstein Y, Kanevsky N, Sahar G, Barzilai R, Ivanina T and Dascal N (2002) A novel long N-terminal isoform of human L-type Ca²⁺ channel is up-regulated by protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 277: 3419-3423.
15. Bodi I, Mikala G, Koch SE, Akhter SA and Schwartz A (2005) The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *Journal of Clinical Investigation* 115: 3306-3317.
16. Brotto MAD and Creazzo TL (1996) Ca²⁺ transients in embryonic chick heart: Contributions from Ca²⁺ channels and the sarcoplasmic reticulum. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 39: H518-H525.
17. Bunemann M, Gerhardstein BL, Gao TY and Hosey MM (1999) Functional regulation of L-type calcium channels via protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta2 subunit. *Journal of Biological Chemistry* 274: 33851-33854.
18. Butcher AJ, Leroy J, Richards MW, Pratt WS and Dolphin AC (2006) The importance of occupancy rather than affinity of Ca-V beta subunits for the calcium channel I-II linker in relation to calcium channel function. *Journal of Physiology-London* 574: 387-398.
19. Campbell KP, Leung AT and Sharp AH (1988) The Biochemistry and Molecular-Biology of the Dihydropyridine-Sensitive Calcium-Channel. *Trends in Neurosciences* 11: 425-430.
20. Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, Zacharias DA and Tsien RY (2002) A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 7877-7882.

21. Castellano A, Wei XY, Birnbaumer L and Perezreyes E (1993) Cloning and Expression of A Neuronal Calcium-Channel Beta-Subunit. *Journal of Biological Chemistry* 268: 12359-12366.
22. Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 521-555.
23. Cens T, Restituito S and Charvet P (1999) Regulation of Ca-sensitive inactivation of a 1-type Ca²⁺ channel by specific domains of beta subunits. *Febs Letters* 450: 17-22.
24. Chen RS, Deng TC, Garcia T, Sellers ZM and Best PM (2007) Calcium channel gamma subunits: a functionally diverse protein family. *Cell Biochem Biophys* 47: 178-186.
25. Chen X, Zhang X, Kubo H, Harris DM, Mills GD, Moyer J, Berretta R, Potts ST, Marsh JD and Houser SR (2005) Ca²⁺ influx-induced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ overload causes mitochondrial-dependent apoptosis in ventricular myocytes. *Circ Res* 97: 1009-1017.
26. Chen YH, Li MH, Zhang Y, He LL, Yamada Y, Fitzmaurice A, Shen Y, Zhang HL, Tong L and Yang J (2004) Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Nature* 429: 675-680.
27. Cheng X, Liu J, Asuncion-Chin M, Blaskova E, Bannister JP, Dopico AM and Jaggar JH (2007) A novel CaV1.2 N terminus expressed in smooth muscle cells of resistance size arteries modifies channel regulation by auxiliary subunits. *J Biol Chem* 282: 29211-29221.
28. Chirgwin JM, Przybyla AE, Macdonald RJ and Rutter WJ (1979) Isolation of Biologically-Active Ribonucleic-Acid from Sources Enriched in Ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-5299.
29. Chung CT and Miller RH (1988) A Rapid and Convenient Method for the Preparation and Storage of Competent Bacterial-Cells. *Nucleic Acids Research* 16: 3580.
30. Chung CT, Niemela SL and Miller RH (1989) One-Step Preparation of Competent Escherichia-Coli - Transformation and Storage of Bacterial-Cells in the Same Solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 2172-2175.
31. Clewell DB (1972) Nature of Col E1 Plasmid Replication in Escherichia-Coli in Presence of Chloramphenicol. *Journal of Bacteriology* 110: 667-&.

32. Colecraft HM, Alseikhan B, Takahashi SX, Chaudhuri D, Mittman S, Yegnasubramanian V, Alvania RS, Johns DC, Marban E and Yue DT (2002) Novel functional properties of Ca^{2+} channel beta subunits revealed by their expression in adult rat heart cells. *Journal of Physiology-London* 541: 435-452.
33. Cornet V, Bichet D, Sandoz G, Marty I, Brocard J, Bourinet E, Mori Y, Villaz M and De Waard M (2002) Multiple determinants in voltage-dependent P/Q calcium channels control their retention in the endoplasmic reticulum. *Eur J Neurosci* 16: 883-895.
34. Curtis BM and Catterall WA (1984) Purification of the Calcium-Antagonist Receptor of the Voltage-Sensitive Calcium-Channel from Skeletal-Muscle Transverse Tubules. *Biochemistry* 23: 2113-2118.
35. Dalton S, Takahashi SX, Miriyala J and Colecraft HM (2005) A single Cav beta can reconstitute both trafficking and macroscopic conductance of voltage-dependent calcium channels. *Journal of Physiology-London* 567: 757-769.
36. Davies MP, Doevendans P, An RH, Kubalak S, Chien KR and Kass RS (1996) Developmental changes in ionic channel activity in the embryonic murine heart. *Circulation Research* 78: 15-25.
37. Davis LG, Dibner MD, Battey JF (1986) Probing Nucleic Acids with Labelled Synthetic Probes. In: *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier, New York, pp 67-78
38. De Jongh KS, Warner C, Colvin AA and Catterall WA (1991) Characterization of the two size forms of the alpha 1 subunit of skeletal muscle L-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10778-10782.
39. De Waard M, Witcher DR, Pragnell M, Liu H and Campbell KP (1995) Properties of the alpha 1-beta anchoring site in voltage-dependent Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* 270: 12056-12064.
40. Dewaard M, Pragnell M and Campbell KP (1994) Ca^{2+} Channel Regulation by A Conserved Beta-Subunit Domain. *Neuron* 13: 495-503.
41. Diebold RJ, Koch WJ, Ellinor PT, Wang JJ, Muthuchamy M, Wiczeorek DF and Schwartz A (1992) Mutually Exclusive Exon Splicing of the Cardiac Calcium-Channel Alpha-1 Subunit Gene Generates Developmentally Regulated Isoforms in the Rat-Heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 1497-1501.

42. Dimitratos SD, Woods DF, Stathakis DG and Bryant PJ (1999) Signaling pathways are focused at specialized regions of the plasma membrane by scaffolding proteins of the MAGUK family. *Bioessays* 21: 912-921.
43. Dolphin AC (2003) Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 35: 599-620.
44. Ebashi S, Endo M, Ohtsuki I (1999) Calcium in Muscle Contraction. In: Carafoli E, Klee C (eds) *Calcium as a Cellular Regulator*. Oxford University Press, Oxford New York, pp 579-595
45. Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW and Catterall WA (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25: 533-535.
46. Fan QI, Vanderpool KM, Chung HS and Marsh JD (2005) The L-type calcium channel alpha 1C subunit gene undergoes extensive, uncoordinated alternative splicing. *Mol Cell Biochem* 269: 153-163.
47. Feinberg AP and Vogelstein B (1983) A Technique for Radiolabeling Dna Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity. *Analytical Biochemistry* 132: 6-13.
48. Feron O, Octave JN, Christen MO and Godfraind T (1994) Quantification of 2 Splicing Events in the L-Type Calcium-Channel Alpha-1 Subunit of Intestinal Smooth-Muscle and Other Tissues. *European Journal of Biochemistry* 222: 195-202.
49. Flockerzi V, Oeken HJ, Hofmann F, Pelzer D, Cavalie A and Trautwein W (1986) Purified Dihydropyridine-Binding Site from Skeletal-Muscle T-Tubules Is A Functional Calcium-Channel. *Nature* 323: 66-68.
50. Foell JD, Balijepalli RC, Delisle BP, Yunker AM, Robia SL, Walker JW, McEnery MW, January CT and Kamp TJ (2004) Molecular heterogeneity of calcium channel beta-subunits in canine and human heart: evidence for differential subcellular localization. *Physiol Genomics* 17: 183-200.
51. Freise D, Held B, Wissenbach U, Pfeifer A, Trost C, Himmerkus N, Schweig U, Freichel M, Biel M, Hofmann F, Hoth M and Flockerzi V (2000) Absence of the gamma subunit of the skeletal muscle dihydropyridine receptor increases L-type Ca²⁺ currents and alters channel inactivation properties. *Journal of Biological Chemistry* 275: 14476-14481.

52. Ganesan AN, Maack C, Johns DC, Sidor A and O'Rourke B (2006) beta-adrenergic stimulation of L-type Ca^{2+} channels in cardiac myocytes requires the distal carboxyl terminus of alpha1C but not serine 1928. *Circulation Research* 98: E11-E18.
53. Gerster U, Neuhuber B, Groschner K, Striessnig J and Flucher BE (1999) Current modulation and membrane targeting of the calcium channel alpha1c Subunit are independent functions of the beta subunit. *Journal of Physiology-London* 517: 353-368.
54. Gidh-Jain M, Huang B, Jain P, Battula V and el Sherif N (1995) Reemergence of the fetal pattern of L-type calcium channel gene expression in non infarcted myocardium during left ventricular remodeling. *Biochem Biophys Res Commun* 216: 892-897.
55. Godfraind T, Salomone S, Dessy C, Verhelst B, Dion R and Schoevaerts JC (1992) Selectivity Scale of Calcium-Antagonists in the Human Cardiovascular-System Based on Invitro Studies. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 20: S34-S41.
56. Grabe M and Oster G (2001) Regulation of organelle acidity. *Journal of General Physiology* 117: 329-343.
57. Grueter CE, Abiria SA, Dzhura I, Wu Y, Ham AJL, Mohler PJ, Anderson ME and Colbran RJ (2006) L-type Ca^{2+} channel facilitation mediated by phosphorylation of the beta subunit by CaMKII. *Molecular Cell* 23: 641-650.
58. Grunstein M and Hogness DS (1975) Colony Hybridization - Method for Isolation of Cloned Dnas That Contain A Specific Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72: 3961-3965.
59. Gubler U (1988) A One Tube Reaction for the Synthesis of Blunt-Ended Double-Stranded Cdna. *Nucleic Acids Research* 16: 2726.
60. Haase H, Bartel S, Karczewski P, Morano I and Krause EG (1996) In-vivo phosphorylation of the cardiac L-type calcium channel beta-subunit in response to catecholamines. *Mol Cell Biochem* 163-164: 99-106.
61. Haase H, Pfitzmaier B, McEnery MW and Morano I (2000) Expression of Ca^{2+} channel subunits during cardiac ontogeny in mice and rats: Identification of fetal alpha1c and beta subunit isoforms. *Journal of Cellular Biochemistry* 76: 695-703.
62. Hanahan D and Meselson M (1980) Plasmid Screening at High Colony Density. *Gene* 10: 63-67.

63. Harry JB, Kobrinsky E, Abernethy DR and Soldatov NM (2004) New short splice variants of the human cardiac Cavbeta2 subunit: redefining the major functional motifs implemented in modulation of the Cav1.2 channel. *J Biol Chem* 279: 46367-46372.
64. He H, Giordano FJ, Hilal-Dandan R, Choi DJ, Rockman HA, McDonough PM, Bluhm WF, Meyer M, Sayen MR, Swanson E and Dillmann WH (1997) Overexpression of the rat sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation. *J Clin Invest* 100: 380-389.
65. Heilbrunn LV and Wiercinski FJ (1947) The Action of Various Cations on Muscle Protoplasm. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 29: 15-32.
66. Helton TD and Horne WA (2002) Alternative splicing of the beta4 subunit has alpha1 subunit subtype-specific effects on Ca²⁺ channel gating. *Journal of Neuroscience* 22: 1573-1582.
67. Herzig S, Khan IFY, Grundemann D, Matthes J, Ludwig A, Michels G, Hoppe UC, Chaudhuri D, Schwartz A, Yue DT and Hullin R (2007) Mechanism of CaV1.2 channel modulation by the amino terminus of cardiac beta2-subunits. *Faseb Journal* 21: 1527-1538.
68. Hidalgo P and Neely A (2007) Multiplicity of protein interactions and functions of the voltage-gated calcium channel beta-subunit. *Cell Calcium* 42: 389-396.
69. Hofmann F, Biel M and Flockerzi V (1994) Molecular-Basis for Ca²⁺ Channel Diversity. *Annual Review of Neuroscience* 17: 399-418.
70. Hogan K, Greg RG and Powers PA (1999) Structure and alternative splicing of the gene encoding the human beta1 subunit of voltage dependent calcium channels. *Neurosci Lett* 277: 111-114.
71. Hosey MM, Chien AJ and Puri TS (1996) Structure and regulation of L-type calcium channels - A current assessment of the properties and roles of channel subunits. *Trends in Cardiovascular Medicine* 6: 265-273.
72. Hullin R, Singerlahat D, Freichel M, Biel M, Dascal N, Hofmann F and Flockerzi V (1992) Calcium-Channel Beta-Subunit Heterogeneity - Functional Expression of Cloned Cdna from Heart, Aorta and Brain. *Embo Journal* 11: 885-890.

73. Hullin R, Matthes J, von Vietinghoff S, Bodi I, Rubio M, D'Souza K, Friedrich K, I, Rottlander D, Hoppe UC, Mohacsi P, Schmitteckert E, Gilsbach R, Bunemann M, Hein L, Schwartz A and Herzig S (2007) Increased expression of the auxiliary beta2-subunit of ventricular L-type Ca^{2+} channels leads to single-channel activity characteristic of heart failure. *PLoS ONE* 2: e292.
74. Jones LP, Wei SK and Yue DT (1998) Mechanism of auxiliary subunit modulation of neuronal alpha1E calcium channels. *Journal of General Physiology* 112: 125-143.
75. Jurkat-Rott K and Lehmann-Horn F (2004) The impact of splice isoforms on voltage-gated calcium channel alpha1 subunits. *J Physiol* 554: 609-619.
76. Kalasz H, Watanabe T, Yabana H, Itagaki K, Naito K, Nakayama H, Schwartz A and Vaghy PL (1993) Identification of 1,4-Dihydropyridine Binding Domains Within the Primary Structure of the Alpha-1 Subunit of the Skeletal-Muscle L-Type Calcium-Channel. *Febs Letters* 331: 177-181.
77. Kaneko S, Cooper CB, Nishioka N, Yamasaki H, Suzuki A, Jarvis SE, Akaike A, Satoh M and Zamponi GW (2002) Identification and characterization of novel human $\text{CaV}2.2$ (alpha1B) calcium channel variants lacking the synaptic protein interaction site. *Journal of Neuroscience* 22: 82-92.
78. Kanevsky N and Dascal N (2006) Regulation of maximal open probability is a separable function of Ca-v beta subunit in L-type Ca^{2+} channel, dependent on NH2 terminus of alpha1C ($\text{CaV}1.2$ alpha). *Journal of General Physiology* 128: 15-36.
79. Kang MG and Campbell KP (2003) Gamma subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem* 278: 21315-21318.
80. Klockner U, Mikala G, Schwartz A and Varadi G (1996) Molecular studies of the asymmetric pore structure of the human cardiac voltage-dependent Ca^{2+} channel - Conserved residue, GLU-1086, regulates proton-dependent ion permeation. *Journal of Biological Chemistry* 271: 22293-22296.
81. Koch SE, Bodi I, Schwartz A and Varadi G (2000) Architecture of Ca^{2+} channel pore-lining segments revealed by covalent modification of substituted cysteines. *Journal of Biological Chemistry* 275: 34493-34500.

82. Kolossov E, Lu ZJ, Drobinskaya I, Gassanov N, Duan YQ, Sauer H, Manzke O, Bloch W, Bohlen H, Hescheler J and Fleischmann BK (2005) Identification and characterization of embryonic stem cell-derived pacemaker and atrial cardiomyocytes. *Faseb Journal* 19: 577-+.
83. Kolossov E, Bostani T, Roell W, Breitbach M, Pillekamp F, Nygren JM, Sasse P, Rubenchik O, Fries JWU, Wenzel D, Geisen C, Xia Y, Lu ZJ, Duan YQ, Kettenhofen R, Jovinge S, Bloch W, Bohlen H, Welz A, Hescheler J, Jacobsen SE and Fleischmann BK (2006) Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *Journal of Experimental Medicine* 203: 2315-2327.
84. Lacinova L, Ludwig A, Bosse E, Flockerzi V and Hofman F (1995) The Block of the Expressed L-Type Calcium-Channel Is Modulated by the Beta3 Subunit. *Febs Letters* 373: 103-107.
85. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD and Gelfand DH (1993) High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl* 2: 275-287.
86. Leroy J, Richards MS, Butcher AJ, Nieto-Rostro M, Pratt WS, Davies A and Dolphin AC (2005) Interaction via a key tryptophan in the I-II linker of N-type calcium channels is required for beta 1 but not for palmitoylated beta 2, implicating an additional binding site in the regulation of channel voltage-dependent properties. *Journal of Neuroscience* 25: 6984-6996.
87. Letts VA, Felix R, Biddlecome GH, Arikath J, Mahaffey CL, Valenzuela A, Bartlett FS, Mori Y, Campbell KP and Frankel WN (1998) The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca²⁺-channel gamma subunit. *Nat Genet* 19: 340-347.
88. Letts VA, Felix R, Biddlecome GH, Arikath J, Mahaffey CL, Valenzuela A, Bartlett FS, Mori Y, Campbell KP and Frankel WN (1998) The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca²⁺-channel gamma subunit. *Nature Genetics* 19: 340-347.
89. Liao P, Yu DJ, Lu SQ, Tang ZZ, Liang MC, Zeng SH, Lin WM and Soong TW (2004) Smooth muscle-selective alternatively spliced exon generates functional variation in CaV1.2 calcium channels. *Journal of Biological Chemistry* 279: 50329-50335.

90. Liao P, Yong TF, Liang MC, Yue DT and Soong TW (2005) Splicing for alternative structures of CaV1.2 Ca²⁺ channels in cardiac and smooth muscles. *Cardiovascular Research* 68: 197-203.
91. Liu L, O'Hara DS, Cala SE, Poornima I, Hines RN and Marsh JD (2000) Developmental regulation of the L-type calcium channel alpha1C subunit expression in heart. *Mol Cell Biochem* 205: 101-109.
92. Ludwig A, Flockerzi V and Hofmann F (1997) Regional expression and cellular localization of the alpha1 and beta subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain. *Journal of Neuroscience* 17: 1339-1349.
93. Ma WJ, Holz RW and Uhler MD (1992) Expression of A Cdna for A Neuronal Calcium-Channel Alpha-1 Subunit Enhances Secretion from Adrenal Chromaffin Cells. *Journal of Biological Chemistry* 267: 22728-22732.
94. Maltez JM, Nunziato DA, Kim J and Pitt GS (2005) Essential Ca-V beta modulatory properties are AID-independent. *Nature Structural & Molecular Biology* 12: 372-377.
95. Mangoni ME, Couette B, Bourinet E, Platzer J, Reimer D, Striessnig J and Nargeot J (2003) Functional role of L-type CaV1.3 Ca²⁺ channels in cardiac pacemaker activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 5543-5548.
96. Massa E, Kelly KM, Yule DI, Macdonald RL and Uhler MD (1995) Comparison of Fura-2 Imaging and Electrophysiological Analysis of Murine Calcium-Channel Alpha-1 Subunits Coexpressed with Novel Beta-2 Subunit Isoforms. *Molecular Pharmacology* 47: 707-716.
97. Maxam AM and Gilbert W (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol* 65: 499-560.
98. Mayer BJ (2001) SH3 domains: complexity in moderation. *Journal of Cell Science* 114: 1253-1263.
99. Mcgee AW and Brecht DS (1999) Identification of an intramolecular interaction between the SH3 and guanylate kinase domains of PSD-95. *Journal of Biological Chemistry* 274: 17431-17436.

100. Mcgee AW, Dakoji SR, Olsen O, Bredt DS, Lim WA and Prehoda KE (2001) Structure of the SH3-guanylate kinase module from PSD-95 suggests a mechanism for regulated assembly of MAGUK scaffolding proteins. *Mol Cell* 8: 1291-1301.
101. Mcgee AW, Nunziato DA, Maltez JM, Prehoda KE, Pitt GS and Bredt DS (2004) Calcium channel function regulated by the SH3-GK module in beta subunits. *Neuron* 42: 89-99.
102. Miesenbock G, De Angelis DA and Rothman JE (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394: 192-195.
103. Mikala G, Bahinski A, Yatani A, Tang SQ and Schwartz A (1993) Differential Contribution by Conserved Glutamate Residues to An Ion-Selectivity Site in the L-Type Ca^{2+} Channel Pore. *Febs Letters* 335: 265-269.
104. Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S and Numa S (1989) Primary Structure and Functional Expression of the Cardiac Dihydropyridine-Sensitive Calcium-Channel. *Nature* 340: 230-233.
105. Milligan G, Parenti M and Magee AI (1995) The Dynamic Role of Palmitoylation in Signal-Transduction. *Trends in Biochemical Sciences* 20: 256.
106. Mori MX, Erickson MG and Yue DT (2004) Functional stoichiometry and local enrichment of calmodulin interacting with Ca^{2+} channels. *Science* 304: 432-435.
107. Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Watanabe H, Miyoshi I, Nakayama S, Ono K, Ito H and Iijima T (2006) Identification of a cardiac isoform of the murine calcium channel alpha 1C (CaV1.2-a) subunit and its preferential binding with the beta 2 subunit. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 41: 115-125.
108. Murray V (1989) Improved Double-Stranded Dna Sequencing Using the Linear Polymerase Chain-Reaction. *Nucleic Acids Research* 17: 8889.
109. Neher E and Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802.
110. Nguemo F, Fleischmann BK, Schunkert H, Hescheler J and Reppel M (2007) Functional expression and inactivation of L-type Ca^{2+} currents during murine heart development implications for cardiac Ca^{2+} homeostasis. *Cellular Physiology and Biochemistry* 20: 809-824.

111. Nix SL, Chishti AH, Anderson JM and Walther Z (2000) hCASK and hDlg associate in epithelia, and their src homology 3 and guanylate kinase domains participate in both intramolecular and intermolecular interactions. *J Biol Chem* 275: 41192-41200.
112. Nowycky MC, Fox AP and Tsien RW (1985) 3 Types of Neuronal Calcium-Channel with Different Calcium Agonist Sensitivity. *Nature* 316: 440-443.
113. Obermair GJ, Szabo Z, Bourinet E and Flucher BE (2004) Differential targeting of the L-type Ca²⁺ channel alpha 1C (CaV1.2) to synaptic and extrasynaptic compartments in hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 19: 2109-2122.
114. Opatowsky Y, Chen CC, Campbell KP and Hirsch JA (2004) Structural analysis of the voltage-dependent calcium channel beta subunit functional core and its complex with the alpha 1 interaction domain. *Neuron* 42: 387-399.
115. Paarmann I, Spangenberg O, Lavie A and Konrad M (2002) Formation of complexes between Ca²⁺ center dot calmodulin and the synapse-associated protein SAP97 requires the SH3 domain-guanylate kinase domain-connecting HOOK region. *Journal of Biological Chemistry* 277: 40832-40838.
116. Parent L, Gopalakrishnan M, Lacerda AE, Wei X and Perezreyes E (1995) Voltage-Dependent Inactivation in A Cardiac-Skeletal Chimeric Calcium-Channel. *Febs Letters* 360: 144-150.
117. Pearson HA and Dolphin AC (1993) Inhibition of omega-conotoxin-sensitive Ca²⁺ channel currents by internal Mg²⁺ in cultured rat cerebellar granule neurones. *Pflugers Arch* 425: 518-527.
118. Pedersen SF, Owsianik G and Nilius B (2005) TRP channels: An overview. *Cell Calcium* 38: 233-252.
119. Perezreyes E, Castellano A, Kim HS, Bertrand P, Bagstrom E, Lacerda AE, Wei XY and Birnbaumer L (1992) Cloning and Expression of A Cardiac Brain Beta-Subunit of the L-Type Calcium-Channel. *Journal of Biological Chemistry* 267: 1792-1797.
120. Pichler M, Cassidy TN, Reimer D, Haase H, Krause R, Ostler D and Striessnig J (1997) beta subunit heterogeneity in neuronal L-type Ca²⁺ channels. *Journal of Biological Chemistry* 272: 13877-13882.

121. Qin N, Platano D, Olcese R, Costantin JL, Stefani E and Birnbaumer L (1998) Unique regulatory properties of the type 2a Ca²⁺ channel beta subunit caused by palmitoylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 4690-4695.
122. Raghiv A, Bertaso F, Davies A, Page KM, Meir A, Bogdanov Y and Dolphin AC (2001) Dominant-negative synthesis suppression of voltage-gated calcium channel CaV2.2 induced by truncated constructs. *Journal of Neuroscience* 21: 8495-8504.
123. Ramesh V, Kresch MJ, Katz AM and Kim DH (1995) Characterization of Ca²⁺-Release Channels in Fetal and Adult-Rat Hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 38: H778-H782.
124. Resh MD (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1451: 1-16.
125. Reuter H (1967) Dependence of Slow Inward Current in Purkinje Fibres on Extracellular Calcium-Concentration. *Journal of Physiology-London* 192: 479-&.
126. Reuter H (1983) Calcium-Channel Modulation by Neurotransmitters, Enzymes and Drugs. *Nature* 301: 569-574.
127. Richards MW, Butcher AJ and Dolphin AC (2004) Ca²⁺ channel beta-subunits: structural insights AID our understanding. *Trends Pharmacol Sci* 25: 626-632.
128. Ringer S (1883) A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J Physiol* 4: 29-42.
129. Robb FT, Maeder DL, Brown JR, DiRuggiero J, Stump MD, Yeh RK, Weiss RB and Dunn DM (2001) Genomic sequence of hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*: Implications for physiology and enzymology. *Hyperthermophilic Enzymes, Pt A* 330: 134-157.
130. Rosenfeld MR, Wong E, Dalmau J, Manley G, Posner JB, Sher E and Furneaux HM (1993) Cloning and Characterization of A Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome Antigen. *Annals of Neurology* 33: 113-120.
131. Rottbauer W, Baker K, Wo ZG, Mohideen MA, Cantiello HF and Fishman MC (2001) Growth and function of the embryonic heart depend upon the cardiac-specific L-type calcium channel alpha1 subunit. *Dev Cell* 1: 265-275.

132. Saada N, Dai B, Echetebe C, Sarna SK and Palade P (2003) Smooth muscle uses another promoter to express primarily a form of human CaV1.2 L-type calcium channel different from the principal heart form. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 302: 23-28.
133. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA (1988) Primer-Directed Enzymatic Amplification of Dna with A Thermostable Dna-Polymerase. *Science* 239: 487-491.
134. Sambrook, J, Russell D (eds) (2001) *Molecular Cloning - a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
135. Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
136. Seisenberger C, Specht V, Welling A, Platzer J, Pfeifer A, Kuhbandner S, Striessnig J, Klugbauer N, Feil R and Hofmann F (2000) Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type alpha1C (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse. *J Biol Chem* 275: 39193-39199.
137. Sharp PA, Sugden B and Sambrook J (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12: 3055-3063.
138. Sheng M and Sala C (2001) PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annual Review of Neuroscience* 24: 1-29.
139. Snutch TP, Tomlinson WJ, Leonard JP and Gilbert MM (1991) Distinct calcium channels are generated by alternative splicing and are differentially expressed in the mammalian CNS. *Neuron* 7: 45-57.
140. Soldatov NM (1994) Genomic Structure of Human L-Type Ca²⁺ Channel. *Genomics* 22: 77-87.
141. Soldatov NM, Bouron A and Reuter H (1995) Different Voltage-Dependent Inhibition by Dihydropyridines of Human Ca²⁺ Channel Splice Variants. *Journal of Biological Chemistry* 270: 10540-10543.
142. Stotz SC, Hamid J, Spaetgens RL, Jarvis SE and Zamponi GW (2000) Fast inactivation of voltage-dependent calcium channels. A hinged-lid mechanism? *J Biol Chem* 275: 24575-24582.

143. Stotz SC, Jarvis SE and Zamponi GW (2004) Functional roles of cytoplasmic loops and pore lining transmembrane helices in the voltage-dependent inactivation of HVA calcium channels. *J Physiol* 554: 263-273.
144. Striessnig J (1999) Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca^{2+} channels. *Cellular Physiology and Biochemistry* 9: 242-269.
145. Sun J and Triggle DJ (1995) Calcium channel antagonists: cardiovascular selectivity of action. *J Pharmacol Exp Ther* 274: 419-426.
146. Takahashi SX, Mittman S and Colecraft HM (2003) Distinctive modulatory effects of five human auxiliary beta2 subunit splice variants on L-type calcium channel gating. *Biophysical Journal* 84: 3007-3021.
147. Tang ZZ, Liang MC, Lu SQ, Yu DJ, Yu CY, Yue DT and Soong TW (2004) Transcript scanning reveals novel and extensive splice variations in human L-type voltage-gated calcium channel, $\text{CaV}1.2$ alpha1 subunit. *Journal of Biological Chemistry* 279: 44335-44343.
148. Tang ZZ, Hong X, Wang J and Soong TW (2007) Signature combinatorial splicing profiles of rat cardiac- and smooth-muscle $\text{CaV}1.2$ channels with distinct biophysical properties. *Cell Calcium* 41: 417-428.
149. Tavares GA, Panepucci EH and Brunger AT (2001) Structural characterization of the intramolecular interaction between the SH3 and guanylate kinase domains of PSD-95. *Mol Cell* 8: 1313-1325.
150. Taviaux S, Williams ME, Harpold MM, Nargeot J and Lory P (1997) Assignment of human genes for beta 2 and beta 4 subunits voltage-dependent Ca^{2+} channels to chromosomes 10p12 and 2q22-q23. *Human Genetics* 100: 151-154.
151. Thomas PS (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 5201-5205.
152. Tsien RY, Rink TJ and Poenie M (1985) Measurement of Cytosolic Free Ca^{2+} in Individual Small Cells Using Fluorescence Microscopy with Dual Excitation Wavelengths. *Cell Calcium* 6: 145-157.
153. Tsuruda PR, Julius D and Minor DL, Jr. (2006) Coiled coils direct assembly of a cold-activated TRP channel. *Neuron* 51: 201-212.

154. Urena J, Valle-Rodriguez A and Lopez-Barneo J (2007) Metabotropic Ca^{2+} channel-induced calcium release in vascular smooth muscle. *Cell Calcium* 42: 513-520.
155. Van Petegem F, Clark KA, Chatelain FC and Minor DL (2004) Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature* 429: 671-675.
156. Van Petegem F and Minor DL (2006) The structural biology of voltage-gated calcium channel function and regulation. *Biochemical Society Transactions* 34: 887-893.
157. Van Petegem F, Duderstadt KE, Clark KA, Wang M and Minor DL, Jr. (2008) Alanine-scanning mutagenesis defines a conserved energetic hotspot in the CaValpha1 AID-CaVbeta interaction site that is critical for channel modulation. *Structure* 16: 280-294.
158. Verheijck EE, van Ginneken AC, Wilders R and Bouman LN (1999) Contribution of L-type Ca^{2+} current to electrical activity in sinoatrial nodal myocytes of rabbits. *Am J Physiol* 276: H1064-H1077.
159. Vinograd J and Lebowitz J (1966) Physical and Topological Properties of Circular Dna. *Journal of General Physiology* 49: 103-&.
160. Walker D, Bichet D, Campbell KP and De Waard M (1998) A beta4 isoform-specific interaction site in the carboxyl-terminal region of the voltage-dependent Ca^{2+} channel alpha1A subunit. *Journal of Biological Chemistry* 273: 2361-2367.
161. Wei S, Colecraft HM, DeMaria CD, Peterson BZ, Zhang R, Kohout TA, Rogers TB and Yue DT (2000) Ca^{2+} channel modulation by recombinant auxiliary beta subunits expressed in young adult heart cells. *Circulation Research* 86: 175-184.
162. Weissgerber P, Held B, Bloch W, Kaestner L, Chien KR, Fleischmann BK, Lipp P, Flockerzi V and Freichel M (2006) Reduced cardiac L-type Ca^{2+} current in CaVbeta(-/-)2 embryos impairs cardiac development and contraction with secondary defects in vascular maturation. *Circulation Research* 99: 749-757.
163. Welling A, Lacinova L, Donatin K, Ludwig A, Bosse E, Flockerzi V and Hofmann F (1995) Expression of the L-Type Calcium-Channel with 2 Different Beta-Subunits and Its Modulation by Ro-40-5967. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 429: 400-411.

164. Welling A, Ludwig A, Zimmer S, Klugbauer N, Flockerzi V and Hofmann F (1997) Alternatively spliced IS6 segments of the alpha1C gene determine the tissue-specific dihydropyridine sensitivity of cardiac and vascular smooth muscle L-type Ca²⁺ channels. *Circulation Research* 81: 526-532.
165. Williams JG, Mason PJ (1985) Hybridization in the analysis of RNA. In: Hames BD, Higgins SJ (eds) *Nucleic Acids Hybridization - A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp 139-159
166. Xu M, Welling A, Papparisto S, Hofmann F and Klugbauer N (2003) Enhanced expression of L-type CaV1.3 calcium channels in murine embryonic hearts from CaV1.2-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry* 278: 40837-40841.
167. Yamada Y, Nagashima M, Tsutsuura M, Kobayashi T, Seki S, Makita N, Horio Y and Tohse N (2001) Cloning of a functional splice variant of L-type calcium channel beta 2 subunit from rat heart. *J Biol Chem* 276: 47163-47170.
168. Yamaguchi H, Okuda M, Mikala G, Fukasawa K and Varadi G (2000) Cloning of the beta2a subunit of the voltage-dependent calcium channel from human heart: cooperative effect of alpha2/delta and beta2a on the membrane expression of the alpha1C subunit. *Biochem Biophys Res Commun* 267: 156-163.
169. Yang L, Liu GX, Zakharov SI, Bellinger AM, Mongillo M and Marx SO (2007) Protein kinase G phosphorylates CaV1.2 alpha1c and beta2 subunits. *Circulation Research* 101: 465-474.
170. Yang Y, Chen X, Margulies K, Jeevanandam V, Pollack P, Bailey BA and Houser SR (2000) L-type Ca²⁺ channel alpha 1c subunit isoform switching in failing human ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 32: 973-984.
171. Zamponi GW, Soong TW, Bourinet E and Snutch TP (1996) beta Subunit coexpression and the alpha1 subunit domain I-II linker affect piperidine block of neuronal calcium channels. *Journal of Neuroscience* 16: 2430-2443.
172. Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW and Tsien RW (1994) Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature* 372: 97-100.

173. Zheng W, Stoltefuss J, Goldmann S and Triggle DJ (1992) Pharmacological and Radioligand Binding-Studies of 1,4-Dihydropyridines in Rat Cardiac and Vascular Preparations - Stereoselectivity and Voltage Dependence of Antagonist and Activator Interactions. *Molecular Pharmacology* 41: 535-541.
174. Zuhlke RD, Bouron A, Soldatov NM and Reuter H (1998) Ca²⁺ channel sensitivity towards the blocker isradipine is affected by alternative splicing of the human alpha1C subunit gene. *Febs Letters* 427: 220-224.

7 Publikationen / Dank

Die in meiner Doktorarbeit beschriebenen Experimente und Ergebnisse sind in einem Manuskript zusammengefasst, das Anfang 2009 zur Publikation eingereicht wird:

Sabine Link, Marcel Meissner, Brigitte Held, Veit Flockerzi:

The primary structures of L-type Ca channel subunits CaV β 2 and Cav1.2 proteins of the murine heart: Developmental expression and function

Weiterhin habe ich Teile der Ergebnisse in einem Vortrag vor der klinischen Forschergruppe 196 „Signaltransduktion bei adaptiven und maladaptiven kardialen Remodeling-Prozessen“ dargestellt:

Sabine Link „Molekulare Grundlage des spannungsabhängigen Ca-Einstroms in Mausherz“ (1. Dezember 2008, Homburg)

Zwei weitere Vorträge mit Teilen meiner Ergebnisse und mit mir als Vortragende sind angemeldet für:

50. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (Mainz, 10. bis 12. März 2009)

und

75. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kardiologie (Mannheim 16. bis 18. April 2009)

Sabine Link, Marcel Meissner, Brigitte Held, Veit Flockerzi:

“CaV β 2 diversity and developmental expression in the murine heart”

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. V. Flockerzi für die Überlassung des Themas und der Betreuung der praktischen Arbeit bedanken. Ich danke Herrn Flockerzi insbesondere für das meiner Arbeit entgegengebrachte Interesse, die ständige Diskussionsbereitschaft und für seine Geduld und Unterstützung.

In unserem Institut möchte ich besonders Frau Christine Wesely und Dr. Marcel Meissner danken, die mir geholfen haben, hier am Labor Fuß zu fassen. Ich danke Dr. Marcel Meissner im Speziellen für seine Hilfsbereitschaft hinsichtlich jeglicher Probleme, die mir während meiner einjährigen Laborarbeit begegneten, die zahlreichen anregenden Diskussionen und für die Durchführung der proteinbiochemischen Versuche.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Brigitte Held für die Durchführung und Auswertung der zahlreichen elektrophysiologischen Messungen.

Bei Herrn Martin Simon-Thomas bedanke ich mich für das unermüdliche Reparieren von diversen Geräten, insbesondere meines Computers.

Ich möchte mich bei meinen Eltern und Großeltern für die Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen nicht nur während der letzten fast acht Jahre, seitdem ich angefangen habe zu studieren, bedanken. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Zuletzt danke ich denjenigen Personen, die während der letzten zwei Jahre wichtiger Teil meines Lebens waren. Ich danke Frau Monika Müller, die mit mir die Examenszeit durchgestanden hat sowie Frau Melanie Schmitt, Frau Stefanie Stoll und Herrn Timo Kahl, die in allen Lebenslagen für mich da waren

8 Lebenslauf

Sabine Anna Maria Link

* 08.12.1981 in Ludwigshafen am Rhein

An der Farrwiese 2

66424 Homburg

Schulische Ausbildung

Grund- und Hauptschule Neuenstein, 1988 - 1992

Hohenlohe-Gymnasium, Öhringen, 1992 - 2001

Abschluss: Abitur, Juni 2001

Hochschulausbildung

Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes, Homburg (2001 - 2008)

Abschluss: Zweite ärztliche Prüfung, Juni 2008

Praktika / Berufserfahrung

- Ärztlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität des Saarlandes, Homburg; ab Oktober 2008
- Promotion am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität des Saarlandes, Homburg, ab April 2005
- Praktisches Jahr an der Universität des Saarlandes in der Klinik für Neurologie, Innere Medizin (Pneumologie, Nephrologie) und Chirurgie (Unfallchirurgie, Neurochirurgie, Allgemein Chirurgie und Herz-Thorax-Chirurgie); Februar 2007 bis Januar 2008
- vierwöchige Famulatur am Universitätsklinikum des Saarlandes in der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie; September 2006
- vierwöchige Famulatur in einer neurologischen Praxis in Lebach bei Frau Dr. Wollenberg; März 2006

- vierwöchige Famulatur im Evangelischen Krankenhaus in Saarbrücken in der Abteilung für Innere Medizin; März 2005
- vierwöchige Famulatur in einer Praxis für Innere Medizin mit Schwerpunkt auf Nephrologie, Diabetes und Osteoporose in Saarbrücken bei Herrn Dr. Hümpfner und Herrn Dr. Daschner; September 2004
- einjähriges Auslandsstudium an der Universität von La Laguna auf Teneriffa/Spanien mit dem Austauschprogramm ERASMUS; September 2003 bis Juli 2004
- einmonatiges Krankenpflegepraktikum im Städtischen Krankenhaus in Kiel in der Abteilung für Innere Medizin; August 2002
- einmonatiges Krankenpflegepraktikum an der Universität des Saarlandes in der Klinik für Neurochirurgie; März 2002