

**Molekulare Charakterisierung und Expressionsanalyse
spannungsabhängiger und kalziumsensitiver Kaliumkanäle aus
dem ZNS der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)**

Dissertation

zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades

**des Fachbereichs Biologie/Chemie
der Universität Osnabrück**

vorgelegt von

Frank Panofen

aus Halle.

Osnabrück 2001

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Tierphysiologie der Fakultät für Biologie/Chemie an der Universität Osnabrück unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. G. Jeserich durchgeführt. Bei Ihm bedanke ich mich herzlich für die Überlassung des Themas, die finanzielle Unterstützung und die ständige Diskussionsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat. Durch seine Unterstützung gab er mir die Möglichkeit, meine Ergebnisse bei internationalen Kongressen zu präsentieren.

Dem Graduiertenkolleg „Molekulare Zellbiologie mit Schwerpunkt Membranbiologie“ und insbesondere der Sprecherin Prof. Dr. H. Schrempf danke ich für die finanzielle Unterstützung und die in diesem Rahmen durchgeführten interdisziplinären Veranstaltungen.

Prof. Dr. H. Wieczorek bin ich sehr dankbar für seine Diskussionsbereitschaft und finanzielle Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt meinen Kollegen Dr. Carsten Lanwert, Stefan Reinecke und Wolfgang Moll für Ihre ständige Hilfsbereitschaft im Laboralltag und weit darüber hinaus. Die freundschaftliche Atmosphäre war immer ein besonderer Antrieb für mich.

Dr. Holger Rabe und Jutta Henne danke ich insbesondere für ihren freundschaftlichen Umgang und die Unterstützung in den elektrophysiologischen Fragestellungen.

Bettina Flenker danke ich für ihre ausgezeichnete technische Unterstützung, ihre Hilfsbereitschaft und vor allem freundliche Mitarbeit, die mir sehr geholfen haben diese Arbeit zu erstellen.

Tanja Piwowarski, Jörg Wibekke, Wolfgang Moll und Carsten Schütte danke ich für die Unterstützung meiner Arbeit während ihrer Diplomarbeiten/Blockpraktika.

Bei Dr. Hans Merzendorfer, PD Dr. Thomas Krüppel, und Markus Huß, sowie allen Mitarbeiter(innen) der Abteilung Tierphysiologie bedanke ich mich für ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Schließlich bedanke ich mich ganz besonders herzlich bei meiner Familie für ihre jahrelange Unterstützung und Hilfe. Ohne ihre große Geduld und Verständnis wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

I Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Kaliumkanäle	1
1.1.1 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle	1
1.1.2 Kalziumaktivierte Kaliumkanäle	3
1.1.2.1 SK-Kanäle	4
1.1.2.2 BK-Kanäle	4
1.2 Retina	5
1.3 Aufgabenstellung	6
2 Material und Methoden	7
2.1 Material	7
2.1.1 Chemikalien	7
2.1.2 Enzyme/Proteine	7
2.1.3 Plasmide	7
2.1.4 Bakterienstämme	8
2.1.5 Zellkulturen	9
2.1.6 Regenbogenforellen (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	9
2.1.7 Puffer, Medien und Lösungen	9
2.1.8 Materialien/Systeme	12
2.1.9 Primer	12
2.2 Methoden	13
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	13
2.2.1.1 Plasmidpräparation	13
2.2.1.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren	13
2.2.1.3 Restriktionsspaltung von DNA	13
2.2.1.4 Agarosegelelektrophorese	13
2.2.1.5 Gelextraktion	14
2.2.1.6 Dephosphorylierung von DNA	14
2.2.1.7 Ligation	14
2.2.1.8 Herstellung glatter DNA-Enden	14
2.2.1.9 Isolierung von DNA	14
2.2.1.10 Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	15
2.2.1.11 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	15
2.2.1.12 Inverse PCR	16
2.2.1.13 Transformanden-Screening mit PCR	16
2.2.1.14 RACE-PCR (<i>Rapid amplification of cDNA ends</i>)	16
2.2.1.15 Herstellung von Digoxigenin (DIG)-markierten Sonden	16
2.2.1.16 mRNA-Isolierung aus Gewebe	17
2.2.1.17 Reverse Transkription	17
2.2.1.18 DNA-Sequenzierung	17
2.2.1.19 Computergestützte Sequenzanalyse	17
2.2.1.20 Kolonie-Screening	17
2.2.1.21 DNA-Isolierung mit paramagnetische Beads	18
2.2.2 Zellbiologische Methoden	18
2.2.2.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen	19
2.2.2.2 Kultivierung von Zellen	19
2.2.2.3 Transiente Transfektion von Zellkulturen	19
2.2.2.4 Baculovirus-Techniken	19
2.2.2.5 Isolierung von retinalen Neuronen	20

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	21
2.2.3.1 Proteinbestimmung (Bradford et al., 1979)	21
2.2.3.2 Proteinbestimmung mit Amidoschwarz	21
2.2.3.3 Proteinfällung mit Aceton	21
2.2.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	21
2.2.3.5 Coomassie-Färbung von Proteingelen	22
2.2.3.6 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran (Western Blot)	22
2.2.3.7 Anreicherung von Membranproteinen	22
2.2.3.8 Affinitätsreinigung von Polyhistidin-Fusionsproteinen	22
2.2.3.9 Affinitätsreinigung von MBP-Tag-Fusionsproteinen	23
2.2.3.10 Kopplung von Polypeptiden an tosylaktivierte Dynabeads	23
2.2.4 Immunologische Methoden	24
2.2.4.1 Herstellung polyklonaler Antikörper	24
2.2.4.2 Affinitätsaufreinigung polyklonaler Antikörper	24
2.2.4.3 Immunblot	24
2.2.4.4 "Stripping" von Immunblots	24
2.2.4.5 Immunzytochemie	24
2.2.4.6 Immunhistochemie	25
3 Ergebnisse	26
3.1 Klonierung von Kaliumkanal-Primärsequenzen	26
3.1.1 Traw1	26
3.1.1.1 Traw1-Sequenzanalyse	27
3.1.2 Tsha3	29
3.1.2.1 Tsha3-Sequenzanalyse	30
3.1.3 SK-Kaliumkanäle	33
3.1.3.1 TSK2	33
3.1.3.2 TSK3	34
3.1.3.3 Sequenzanalyse von TSK2 und TSK3	35
3.1.4 TBK	38
3.1.4.1 Primärsequenzanalyse von TBK	40
3.2 Heterologe Expression rekombinanter Kaliumkanalfragmente in <i>E. coli</i>	44
3.2.1 His ₁₀ -Fusionsproteine	44
3.2.1.1 Traw1	44
3.2.1.2 TSK2	45
3.2.1.3 Tsha1/Tsha2/Tsha3	45
3.2.2 MBP-Fusionsproteine	47
3.3 Heterologe Expression von Kaliumkanälen in Eukaryontenzelllinien	48
3.3.1 Heterologe Expression von Kaliumkanälen in Insektenzellen	48
3.3.1.1 Westernblot-Analysen heterolog exprimierender Insektenzellen	50
3.3.2 Heterologe Expression von Kaliumkanälen in CHO-Zellen	54
3.4 Expressionsanalyse	56
3.4.1 Expression von Kaliumkanaltranskripten während der Larvalentwicklung	56
3.4.2 Analyse der gewebespezifischen Expression von Kaliumkanälen	57
3.4.2.1 Expressionsanalyse der Kaliumkanaltranskripte in unterschiedlichen Geweben	57
3.4.2.2 Expressionsanalyse der Kaliumkanalproteine durch Westernblot	59
3.4.2.3 Expressionsanalyse der Kaliumkanalproteine durch Immunhistochemie	61
3.4.2.4 Expressionsanalyse der Kaliumkanalproteine in retinalen Neuronen	65
3.5 Elektrophysiologie	67
3.5.1 Traw1	67
3.5.2 Tsha2	69
3.5.3 Tsha3	69

3.5.4 TSK2	71
4 Zusammenfassung	72
5 Diskussion	73
6 Literaturverzeichnis	83
7 Anhang	89
7.1 Sequenzen	89
7.1.1 Primer	89
7.1.1.1 Traw1	89
7.1.1.2 Tsha3	89
7.1.1.3 Tsha1/2	90
7.1.1.4 TSK	90
7.1.1.5 TBK	91
7.1.1.6 Aktin	92
7.1.2 Traw1	93
7.1.3 Tsha3	95
7.1.4 TSK2	97
7.1.5 TSK3	99
7.1.6 TBK1	101
7.1.7 TBK2	104
7.2 Klonierungen	107
7.2.1 Heterologe Expression in eukaryontischen Zellen	107
7.2.1.1 pBK-CMV-GFP	107
7.2.1.2 pBK-CMV-Traw1GFP	107
7.2.1.3 pBK-CMV-TSK2GFP	108
7.2.1.4 pBK-CMV-Tsha2GFP	108
7.2.1.5 pTraw1-IRES2-EGFP	109
7.2.1.6 pTSK2-IRES2-EGFP	109
7.2.1.7 pTsha2-IRES2-EGFP	109
7.2.1.8 pTsha3-IRES2-EGFP	110
7.2.1.9 pDS-Tsha3RED	110
7.2.1.10 pFastbac-Traw1GFP	110
7.2.1.11 pFastbac-TSK2GFP	111
7.2.1.12 pFastbac-Tsha1GFP	111
7.2.1.13 pFastbac-Tsha2GFP	111
7.2.1.14 pFastbac-Tsha3RED	111
7.2.1.15 pFastbac-dual-GFP	112
7.2.1.16 pFastbac-Traw1-dual-GFP	112
7.2.1.17 pFastbac-TSK2-dual-GFP	112
7.2.1.18 pFastbac-Tsha1-dual-GFP	112
7.2.1.19 pFastbac-Tsha2-dual-GFP	113
7.2.1.20 pFastbac-Tsha3-dual-GFP	113
7.2.1.21 pFastbac	113
7.2.2 Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	113
7.2.2.1 pET-16b His ₁₀ Traw1c	113
7.2.2.2 pET-16b-His ₁₀ -TSK2n	114
7.2.2.3 pET-16b-His ₁₀ -TshaxS1/2c	114
7.2.2.4 pMal-TshaxS1/2c	114
7.3 Abkürzungsverzeichnis	116
7.4 Publikationen	117

1 Einleitung

1.1 Kaliumkanäle

Kaliumionen passieren die hydrophobe Lipid-Doppelschicht der Zellmembran mit Hilfe spezieller Kaliumkanäle. Sie operieren in ihren Funktionen als Antagonisten von Natrium- und Kalziumkanälen, um die Erregbarkeit von Zellen zu kontrollieren (Kurachi et al., 1999). Überdies haben elektrophysiologische Studien an unterschiedlichen Geweben gezeigt, daß Kaliumkanäle essentiell für verschiedene Zellfunktionen, wie die vagale Herzfrequenzminderung, Glukose-induzierte Insulinsekretion, transepithelialer Transport von Elektrolyten und Suppression der neuronalen Erregung sind (Wang et al., 1992, Hille, 1992). Der Fortschritt in der molekularen Charakterisierung von Kaliumkanälen in den letzten Jahren zeigt deutlich die fundamentale Bedeutung diese Ionenkanalsuperfamilie in der Physiologie, Pharmakologie und bei der Erforschung von Krankheiten. Einen wichtigen Beitrag zum Verständnis grundlegender Fragestellungen liefern die Untersuchungen auf diesen Gebieten an niederen Organismen (Salkoff et al., 1999).

Die Diversität der Kaliumkanalfunktionen spiegelt sich in ihrer strukturellen Vielfalt wieder. Kaliumkanäle assemblieren aus den porenbildenden α -Untereinheiten, die mit akzessorischen β -Untereinheiten assoziiert sein können (Röper & Pongs, 1996). Die α -Untereinheiten der Kaliumkanäle lassen sich in drei strukturelle Klassen unterteilen. Die Familie der Einwärtsgleichrichter (*inward rectifier*) ist gekennzeichnet durch zwei membrandurchspannende hydrophobe Segmente M1 und M2, welche die hydrophobe P(oren)-domäne flankieren. Die Einwärtsgleichrichter werden aufgrund dieser strukturellen Eigenschaften auch 2TM-Familie genannt. Eine Verdopplung des 2TM Strukturmotives führt zu den Mitgliedern der sogenannten 4TM-Familie. In der 6TM-Kaliumkanalfamilie findet man alle Kanäle, die als zentralen Bestandteil ihrer Struktur 6 transmembrane Helices S1-S6 besitzen, mit der zwischen S5 und S6 lokalisierten P-Domäne H5. Der überwiegende Teil der augenblicklich 73 bekannten Kaliumkanalgene (Vandenberg & Lummis 2000) lässt sich in diese Strukturklasse einordnen. Die gesamten Familien spannungsgesteuerter Kaliumkanäle, KQT-, Eag-, CNG-Kanäle, sowie der kalziumaktivierten Kaliumkanäle gehören dieser Klasse an (KQT: KvLQT1-verwandte Kaliumkanäle; Eag: *ether-a-gogo*; CNG: *cyclic nucleotide gated cation channels*) (Salkoff et al., 1999).

1.1.1 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle

Die Familie der spannungsgesteuerten (Kv-) Kaliumkanäle wird in weitere Subfamilien unterteilt, den *Shaker*- (Kv1-), *Shab*- (Kv2-), *Shaw*- (Kv3-) und *Shal*- (Kv4-) Familien, die wiederum durch verschiedene Subtypen repräsentiert werden. Wie schon berichtet, ist allen Vertretern dieser Familie das 6TM-Strukturmotiv gemein, mit zytoplasmatischen N- und C-Termini (Abb.1). Die zytoplasmatischen Bereiche von Kaliumkanälen determinieren unterschiedliche Effektorfunktionen. Die Bildung funktioneller Kaliumkanäle verlangt eine Oligomerisierung von 4 α -Untereinheiten zu einem Tetramer. Bei dieser Assemblierung spielt die N-terminale Tetramerisierungsdomäne T1 eine entscheidende Rolle: Sie vermittelt die Subfamilienspezifität dieses Prozesses und ermöglicht die Formierung heterotetramerer Kaliumkanäle (Li et al., 1992, Shen & Pfaffinger 1995, Minor et al., 2000). Am N-Terminus

findet man ein weiteres Strukturmotiv in einigen Kv-Kanälen mit inaktivierenden Stromcharakteristika, wie z. B. Kv1.4, Kv3.3 und Kv3.4, den sogenannten Inaktivierungsball. Die Häufung von positiven Ladungen innerhalb der ersten 20 Aminosäuren dieser Kanäle führt zu einem Verstopfen der Pore von der zytoplasmatischen Seite, was die spannungsunabhängige Inaktivierung des Kanals bewirkt. Dieser Mechanismus wird auch als *ball and chain* - Mechanismus bezeichnet. Die Aufgabe des intrinsischen Inaktivierungsballs kann in Kanälen ohne positive Ladungen am N-Terminus extrinsisch von akzessorischen β -Untereinheiten übernommen werden (Jan & Jan, 1992, Rettig et al., 1994).

Ein charakteristisches Merkmal spannungsgesteuerter Kaliumkanäle ist die Präsenz intrinsischer Spannungssensoren, welche die Veränderungen des Membranpotentials detektieren und das Öffnen der Kanäle kontrollieren. Die Transmembrandomäne S4 in jeder α -Untereinheit enthält ein hochkonserviertes, repetitives Motiv mit einer positiv geladenen Aminosäure (Arginin oder Lysin), gefolgt von zwei weiteren Resten mit meist hydrophoben Charakter. Die Anzahl dieser Motivwiederholungen innerhalb der S4-Region sind typisch für jede Subfamilie: Sieben in Kv1-Kanälen, fünf in Kv2-Kanälen, sechs in (Säuger)-Kv3-Kanälen und fünf in Kv4-Kanälen (Vega-Saenz de Miera et al., 1994). Mutationsanalysen der geladenen Reste in S4 von *Shaker*-Kanälen zeigen deren enormen Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit der Kanalöffnung und auf den sogenannten Torstrom, der durch intramolekulare Ladungsverschiebung über die Membran entsteht. Erste Modelle und auch neuere fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen (Glauner et al., 1999, Horn, 2000) führen die Entstehung des Torstromes auf die Bewegung des S4 Segmentes im elektrischen Feld zurück. Das S4 Segment ist also Teil des intrinsischen Spannungssensors der Kv-Kanäle. Allerdings führen auch Mutationen von konservierten, geladenen Resten in den Transmembrandomänen S2 und S3 zu signifikanten Veränderungen des spannungsabhängigen Verhaltens dieser Kanäle. Der Spannungssensor lässt sich also nicht auf die S4-Region reduzieren, sondern muß als intrinsische Eigenschaft der Kernregion gewertet werden (Papazian 1999).

Kaliumkanäle besitzen eine hohe Selektivität bezüglich ihrer Substrate, den Kaliumionen. Die Permeabilität von Kalium ist mehr als 100mal größer als die von Natrium. Trotz dieser großen Selektivität werden Kaliumionen in Raten $>10^6$ pro Sekunde transportiert (Ishii, 1999). Die H5 Domäne aller spannungsaktivierten Kaliumkanäle enthält die hochkonservierte Signatursequenz TTXGYGD (X = L, V, I). Diese Sequenz spielt eine Schlüsselrolle bei der Ionenselektivität. Die Carbonylsauerstoffatome der beiden Glycinreste und des Tyrosinrestes bilden Ringe, die als Kationenbindungsstellen fungieren, wie die Röntgenstrukturanalyse des KcsA-Kanals aus *Streptomyces lividans* von MacKinnon und seinen Mitarbeitern im Jahre 1998 zeigt. Die Strukturdaten bestätigen auch die postulierte Multi-Ionen-Natur von Kaliumkanälen, welche die hohen Flussraten determinieren, indem drei Kaliumionen im Bereich der Porenregion detektiert werden konnten. Der KcsA-Kanal ist zwar von der Transmembrantopologie eher in die Klasse der Einwärtsgerichteter einzusortieren, die Porensequenz des Kanals zeigt jedoch eine höhere Ähnlichkeit zu den Kv-Kanälen. Deshalb können die Ergebnisse dieser Arbeit auch auf die Porenregion dieser Kaliumkanäle übertragen werden (Schrempf et al., 1995, Doyle et al., 1998, Dougherty et al., 1998).

Die Porenregion ist aufgrund ihrer Architektur auch der Ort der Bindung pharmakologischer Blockersubstanzen von Kaliumkanälen. Einzelne Aminosäuren determinieren hier die Sensitivität der Kanäle bezüglich dieser Toxine (Pongs, 1992, Hurst et al., 1991).

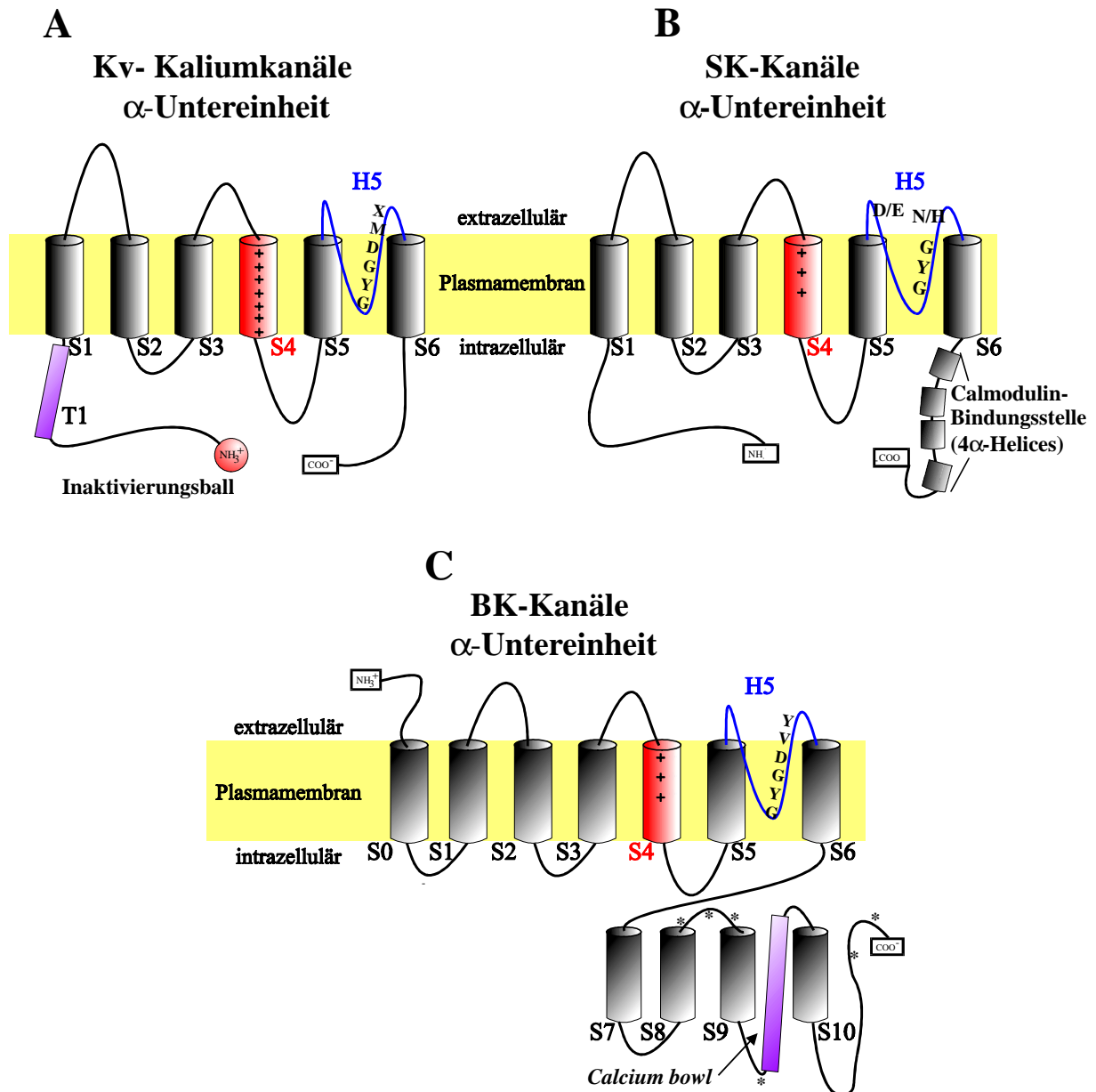


Abb. 1: Strukturmodelle spannungsabhängiger und kalziumsensitiver Kaliumkanäle. (A) Spannungsabhängige Kaliumkanäle: 6 Transmembrandurchgänge S1-S6, Tetramerisierungsdomäne T1, N-terminaler Inaktivierungsball, Kaliumkanalsignatursequenz in der Porenregion H5. X: pharmakologisch bedeutender Aminosäurerest (TEA-Sensitivität). (B) *Small conductance calcium-activated potassium channel* (SK-Kanäle): 6 Transmembrandurchgänge S1 – S6, Kaliumkanalsignatursequenz in der Porenregion H5, pharmakologisch interessante Aminosäurereste in der Porenregion (D/E, N/H: Apamin- und Tubocurarin-Sensitivität), C-terminale Calmodulin-Bindestelle. (C) *Big conductance calcium-activated potassium channel* (BK-Kanäle): Transmembrandurchgänge S0 – S6, hydrophobe zyttoplasmatische Segmente S7 – S10, Kalziumbindemotiv *Calcium bowl* zwischen S9 und S10, Kaliumkanalsignatursequenz in der Porenregion H5, (*) in Vertebraten genutzte Spleiß-Varianten. (+) Positiv geladene Aminosäurereste (K/R) in den S4-Transmembranregionen.

1.1.2 Kalziumaktivierte Kaliumkanäle

Das Membranpotential und die intrazelluläre Kalziumkonzentration sind fundamentale physiologische Regulatoren. Die zytosolische Kalziumkonzentration ist direkt mit dem Membranpotential über spannungsgesteuerte Kalziumkanäle und kalziumsensitive Kaliumkanäle verknüpft. Die letzteren lassen sich aufgrund ihrer Einzelkanalleitfähigkeit in

drei Klassen unterteilen: *Big-conductance* (BK-), *intermediate conductance* (IK-) und *small conductance* (SK-) Kaliumkanäle. Die Ähnlichkeit der IK- und SK-Kanäle in der Primärstruktur und der Organisation des Genes lassen es zu, diese in eine gemeinsame Familie zu gruppieren (Wallner et al., 1999).

1.1.2.1 SK-Kanäle

Drei eng verwandte cDNA-Sequenzen von SK-Kanälen (SK1, SK2, SK3) wurden 1996 erstmalig von Köhler et al. isoliert. Die Hydropathieanalysen dieser Kanäle legen die Transmembrantopologie der 6TM-Kaliumkanal-Strukturklasse mit zytoplasmatischen N- und C-Termini nahe (Abb.1). Man findet außerdem eine Kaliumkanalsignatursequenz zwischen der fünften und sechsten putativen Transmembrandomäne. SK-Kaliumkanäle sind im Gegensatz zu Kv-Kanälen spannungsunabhängig, obwohl im S4 Segment drei konservierte Arginine zu finden sind. Die hohe Kalziumsensitivität ($IC_{50} = \sim 0,6 \mu M$) der SK-Kanäle wird durch äußerst fest gebundenes Calmodulin vermittelt. Calmodulin bindet an die α -Helices im C-terminalen, zytoplasmatischen Bereich, der in allen SK-Kanälen hoch konserviert ist. Ein Calmodulinmolekül überspannt zwei C-Termini der SK-Kanäle und verliert dabei zwei Kalziumbindungsstellen in den sogenannten *EF-Hands* 3 und 4. Folglich kann es nur noch 2 Kalziummoleküle an den *EF-Hands* 1 und 2 binden (Xia et al., 1998, Keen et al., 1999, Vandenberg & Lummis, 2000).

Die SK-Kanalsubtypen unterscheiden sich, exprimiert man sie heterolog in Säugerzellen, pharmakologisch in ihrer Sensitivität gegenüber dem Bienengift Apamin und D-Tubocurarin. Entscheidend sind hierfür zwei Aminosäuren in der äußeren Porenregion, ein Aspartat und ein Asparagin in SK2. SK1 dagegen hat diese Aminosäuren durch Glutamat bzw. Histidin substituiert und zeigt ein um zwei Größenordnungen schwächere Hemmbarkeit durch Apamin und D-Tubocurarin. Bei SK3-Kanälen ist nur das Asparagin durch Histidin ersetzt, woraus sich eine intermediäre Sensitivität ergibt, die auch durch Heterotetramerisierung der SK-Subtypen erreicht werden kann. Die Blockierung der SK-Kanäle durch Apamin ist abhängig vom Zellsystem, wie z.B. *Xenopus laevis* Eizellen oder HEK293-Zellen, in dem sie gemessen wird. (Ishii et al., 1997, Shah & Haylett, 2000).

Die Einzelkanalleitwerte von ~ 10 pS und die Apamin-Sensitivität deuten darauf hin, daß SK-Kanäle für die Phänomene der langsamen Nachhyperpolarisation und der Spikefrequenzadaptation in Neuronen verantwortlich sind. Während die Spikefrequenzadaptation die Zeitstruktur eines Aktionspotentials beeinflusst, determiniert die Nachhyperpolarisation die Ruhephasen der Neuronen zwischen einzelnen Aktionspotentialen (Sah & McLachlan, 1991 und 1992).

1.1.2.2 BK-Kanäle

Kalziumaktivierte Kaliumkanäle mit großer Leitfähigkeit besitzen eine Kaliumkanalsignatursequenz innerhalb einer Kernregion mit typischer 6TM-Transmembrantopologie. Hydropathieanalysen bringen 5 weitere hydrophobe Domänen hervor, von denen die N-terminale S0-Domäne tatsächlich die Membran durchspannt, während die C-terminalen hydrophoben Domänen S7 - S10 intrazellulär lokalisiert sind (Abb. 1) (Wallner et al. 1996, Meera et al., 1997). Geladene Aminosäurenreste innerhalb der Domänen S2, S3, S4, welche in Kv-Kanälen hochkonserviert sind, deuten auf einen intrinsischen Spannungssensor in BK-Kanälen hin. Tatsächlich öffnen die Kanäle, selbst in der Abwesenheit von Kalziumionen, unter depolarisierenden Bedingungen und auch Torströme, charakteristische Merkmale

spannungsabhängiger Kanäle, können gemessen werden (Wallner et al., 1999). BK-Kanäle besitzen eine im Vergleich zu SK-Kanälen um zwei Größenordnungen niedrigere Kalziumsensitivität. Diese Kalziumsensitivität wird durch Domänen im Bereich der hydrophoben Segmente am C-Terminus vermittelt. Salkoff konnte mit seinen Mitarbeitern 1997 zeigen, daß ein völlig neuartiges Ca^{2+} -Bindungsmotiv, charakterisiert durch 10 hochkonservierte Glutamat- bzw. Aspartatreste, die sogenannte *Calcium-bowl*, in BK-Kanälen diese Aufgabe übernimmt. Um jedoch die komplette Kalziumbindekapazität zu erhalten, muß auch die im Protein folgende S10-Domäne zur Verfügung stehen (Schreiber & Salkoff, 1999).

BK-Kanäle sind durch eine hohe funktionelle Diversität gekennzeichnet. In Vertebraten sind innerhalb des BK-Proteins mindestens 6 Positionen bekannt, die über alternatives Spleißen die Funktionalität modulieren (Adelman et al., 1992, Jones et al., 1998). Eine weitere Möglichkeit BK-Kanaleigenschaften zu verändern ist die Coexpression akzessorischer β -Untereinheiten, die gewebespezifisch die Pharmakologie, Kinetik und Kalziumsensitivität abstimmen (Brenner et al., 2000, Uebele et al., 2000, Weiger et al., 2000, Behrens et al., 2000).

1.2 Retina

Im visuellen System der Vertebraten werden Lichtreize in geordneter Weise auf eine flächige Anordnung von neuronalen Elementen, der Retina, abgebildet. Die Retina ist Bestandteil des zentralen Nervensystems (ZNS) und besteht aus einer mehrschichtigen Anordnung unterschiedlicher Neurone (Abb.2), die aufgrund ihrer Lokalisation in den einzelnen Schichten und ihrer Morphologie gut charakterisiert sind. Photorezeptorzellen wandeln die absorbierte Lichtenergie in elektrische Potentiale um. Dieses elektrische Signal wird über ein komplexes Netzwerk von Interneuronen, Bipolarzellen, Horizontalzellen und amakrinen Zellen verarbeitet und letztendlich von den Retinaganglienzellen über den Sehnerv an das visuelle Zentrum des Gehirns weitergeleitet (Dudel et al., 1996).

Die wohldefinierte Anordnung der Neurone in ihrer Schichtstruktur, die Kenntnis über viele neuronale Verschaltungen dieses sensorischen Organs und die einfache Zugänglichkeit machen die Retina zu einem Modellsystem für neuronale Netzwerke. Ionenkanäle spielen bei der elektrischen Erregbarkeit der Neurone und folglich bei deren Funktionen im Netzwerk eine wesentliche Rolle. Das Ionenkanalprofil einzelner Zellen determiniert dabei die intrinsischen Feueigenschaften. Über die zelluläre und subzelluläre Verteilung der Ionenkanäle in der Retina der Vertebraten ist nur sehr spärliche Information verfügbar (Bindokas & Ishida, 1996). Im Bereich der phylogenetisch älteren Vertebraten, wie den Fischen, ist sogar nahezu nichts bekannt (Yazulla & Studholme, 1998), obwohl diese Information essentiell für das Verständnis der Signalverarbeitung in diesem Gewebe ist. Erst kürzlich gelang es in unserer Arbeitsgruppe, in einer kombinierten elektrophysiologischen und molekularbiologischen Studie, einen Teil der intrinsischen elektrophysiologischen Eigenschaften von Retinaganglienzellen der Forelle mit ihrem Kaliumkanalrepertoire zu korrelieren (Henne et al., 2000).

Allerdings ist es zwingend erforderlich, detailliertere Information über die charakteristischen Merkmale der Kaliumkanäle der Forelle zu sammeln, um ihre Rolle im Kontext der Funktionalität der Retina zu verstehen.

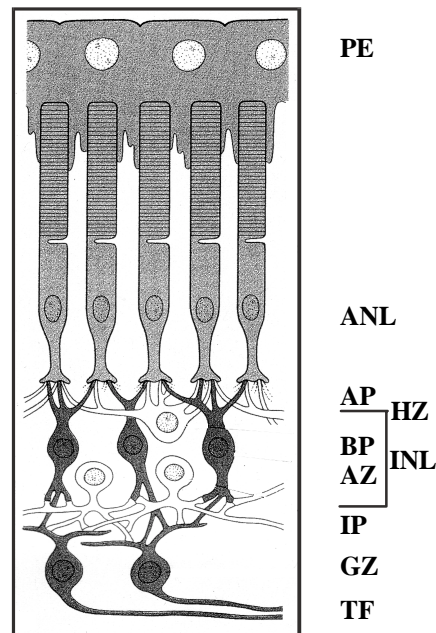


Abb. 2: Schematische Darstellung der Vertebraten-Retina. **PE** Pigmentepithel; **ANL** äußere Körnerschicht; **AP** äußere plexiforme Schicht; **HZ** Horizontalzellen; **BP** bipolare Zellen; **AZ** amakrine Zellen; **INL** innere Körnerschicht; **IP** innere plexiforme Schicht; **GZ** Ganglienzellen; **TF** Tractusfasern. Modifiziert nach Dudel et al., 1996.

1.3 Aufgabenstellung

Zu Beginn dieser Arbeit waren die Gen-Sequenzen der beiden *Shaker*-Kaliumkanäle Tsha1 und Tsha2 der Forelle bekannt, inklusive der grundlegenden elektrophysiologischen Charakterisierung von Tsha1 (Nguyen et al., 2000). Bei der fortschreitenden Beschreibung der fundamentalen Stromcharakteristika der Retinaganglienzellen zeigte sich, daß dieser Nervenzelltyp ein enorm komplexes Ionenkanalrepertoire nutzt. Deshalb mußten zum detaillierten Verständnis dieser Neurone mehr Information über die intrinsischen Eigenschaften verschiedener Kaliumkanalsubtypen im ZNS der Forelle gesammelt werden, um sie anschließend auf die Retinaganglienzellen zu projizieren.

Ein besonderes Augenmerk lag in dieser Arbeit auf der Identifizierung neuer α -Untereinheiten spannungsgesteuerter und kalziumsensitiver Kaliumkanäle. Durch heterologe Expression in Säugerzellen mit anschließender elektrophysiologischer und pharmakologischer Charakterisierung dieser Kanäle sollten, zusammen mit sekundärstrukturellen Vorhersagen, wichtige Eckdaten zur Identifizierung im nativen System gesammelt werden. Der Vergleich der Eigenschaften dieser Forellkanäle mit den Homologen anderer Spezies bietet die Möglichkeit, grundlegende Erkenntnisse über die Funktionsweise dieser Kanaltypen zu gewinnen.

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Studie der regionalen, gewebetypischen Expression der Kanäle im ZNS der Forelle. Dabei wurde auf das visuelle System dieser Tiere ein besonderes Augenmerk gerichtet. Durch diese Arbeit sollte ein besseres Verständnis der Kommunikation der Neurone im komplexen Netzwerk der Retina erlangt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Serva, Sigma, Merck, Life Technologies, Nordwald oder Calbiochem im Reinheitsgrad „zur Analyse“ bezogen. Transfectam von der Fa. Promega, Cellfectin von der Fa. Life Technologies und Superfect von der Fa. Qiagen wurden zur Transfektion eingesetzt.

2.1.2 Enzyme/Proteine

Alle Enzyme zur Modifikation bzw. Amplifikation von Nukleinsäuren wurden bei Life Technologies, New England Biolabs und MBI Fermentas gekauft.

Antikörper und Antikörperkonjugate wurden von den Firmen Dianova, Invitrogen und Sigma erworben.

2.1.3 Plasmide

Plasmidname	Verwendung/Eigenschaften	Hersteller/Referenz
pBK-CMV	Heterologe Expression in eukaryontischen (CMV-Promotor, SV40-Polyadenylierung) und prokaryotischen (lac-Promotor) Zellen, Kanamycin/Neomycin-Resistenz, lacZ- α -Komplementation.	Fa. Stratagene
pBluescript SK (-)	Klonierungsvektor, Ampicillin-Resistenz, T7 und T3 RNA-Polymerase-Promotoren, lacZ- α -Komplementation.	Fa. Stratagene
pDSRED1 N1	Heterologe Expression eines Zielproteins als DSRED-Fusionsprotein in eukaryontischen Zellen, CMV-Promotor, SV40-Polyadenylierungsstelle, Kanamycin/Neomycin-Resistenz.	Fa. Clontech
pET 16b	Heterologe Expression von Proteinen in <i>E. coli</i> , T7-Promotor, N-terminaler His ₁₀ -Tag mit Faktor Xa-Spaltstelle, Ampicillin-Resistenz.	Fa. Novagen

Plasmidname	Verwendung/Eigenschaften	Hersteller/Referenz
pFastbac	Klonierung von rekombinanten Baculoviren zur heterologen Expression von Proteinen in Insektenzellen, <i>PolH</i> -Promotor, Tn7l und Tn7r-Stellen zur gerichteten Transposition, Ampicillin- und Gentamycin-Resistenz.	Fa. Life Technologies
pFastbac dual	Klonierung von rekombinanten Baculoviren zur heterologen Coexpression von Proteinen in Insektenzellen, <i>PolH</i> und <i>P10</i> -Promotor, Tn7l und Tn7r-Stellen zur gerichteten Transposition, Ampicillin- und Gentamycin-Resistenz.	Fa. Life Technologies
pFastbac HTa-c	s. pFastbac, N-terminaler His ₆ -Tag in allen drei Leserahmen.	Fa. Life Technologies
pGEMTeasy	Klonierung von PCR-Fragmenten über 3'T-Überhänge, Ampicillin-Resistenz, T7 und SP6 RNA-Polymerase-Promotoren, lacZ- α -Komplementation.	Fa. Promega
pGreenLantern	Heterologe Expression von GFP in eukaryontischen Zellen, CMV-Promotor, SV-40 Polyadenylierungsstelle, Ampicillin-Resistenz.	Fa. Life Technologies
pIRES(2)-EGFP	Heterologe, bicistronische Coexpression eines Zielproteins mit EGFP in eukaryontischen Zellen, CMV-Promotor, SV40-Polyadenylierungsstelle, Kanamycin/Neomycin-Resistenz.	Fa. Clontech
pMal C2	Heterologe Expression von Proteinen in <i>E. coli</i> , P _{tac} -Promotor, N-terminaler MBP-Tag mit Faktor Xa-Spaltstelle, Ampicillin-Resistenz.	Fa. NEB

2.1.4 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , Φ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, endA1, recA1, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), deoR, thi-1, supE44, λ -gyrA96, relA1.
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pLysS	<i>E. coli</i> B, F ⁻ , dcm, ompT, hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻), gal λ (DE3) [pLysS Cam ^r].

Bakterienstamm	Genotyp
<i>E. coli</i> DH10Bac	F ⁻ , mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80dlacZDM15, ΔlacX74, endA1, recA1, deoR, Δ(ara, leu)7697, araD139, galU, galK, nupG, rpsL, λ-bMaon14272/pMon7124.

2.1.5 Zellkulturen

Zellkultur	Kulturbedingungen	Referenz
OLN-93	DMEM (Fa. Life Technologies), 2 mM Glutamin, 10 % FCS, 7,5 % NaHCO ₃ , 100 µg/ml Gentamycin, 37 °C, 5 % CO ₂ .	Richter-Landsberg et al., 1996
CHO-K1	DMEM/Ham's F12 (Fa. Life Technologies), 2 mM Glutamin, 10 % FCS, 7,5 % NaHCO ₃ , 100 µg/ml Gentamycin, 37 °C, 5 % CO ₂ .	Fa. Imperial, England
Sf21	InsectXpress (Fa. BioWhittaker), 2 % FCS, 100 µg/ml Gentamycin, 27 °C.	Fa. Invitrogen
HighFive	InsectXpress, 2 % FCS, 100 µg/ml Gentamycin, 27 °C.	Fa. Invitrogen
Frisch dissoziierte Fischretinazellen	DMEM (Fa. ICN), 2 mM Glutamin, 10 % FCS, 100 µg/ml Gentamycin, 16 °C.	Stegmann, 1998.

2.1.6 Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*)

Larvenstadien und Jungfische der Regenbogenforelle wurden von den Forellenzuchtbetrieben Lindthorst-Emme, Schloß Holte-Stuckenbrock, Errboe, Silkeborg (DK) und Holm, (DK) bezogen. Die Fische wurden in hauseigenen, gut belüfteten Aquarien bei 10 °C herangezogen und die Larvalstadien nach Vernier, 1969, bestimmt.

2.1.7 Puffer, Medien und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
2x SDS-Probenpuffer	8 % SDS, 40 % (v/v) Glycerin, 20 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,004 % (w/v) Bromphenolblau, 250 mM Tris-HCl (pH 6,8).
5x Probenpuffer (DNA)	TAE, 50 % (v/v) Glycerin, 1 ‰ (w/v) Bromphenolblau, 1 ‰ (w/v) Xylencyanol.

Puffer	Zusammensetzung
Acrylamid-Lösung	30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid.
Amidoschwarz-Färbelösung	0,5 % (w/v) Amidoschwarz in Methanol/Essigsäure (9:1).
AP-Reaktionspuffer (NBT/BCIP)	50 mM MgCl ₂ , 0,1 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl (pH 9,5).
BCIP-Stammlösung	50 mg/ml in DMF.
Bindepuffer (MBP)	500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20mM Tris-HCL (pH7,4).
Blockierungspuffer (Koloniescreening)	0,15 M NaCl, 1 % (w/v) Blockierungsreagenz (Fa. Roche), 0,1 M Maleinsäure (pH 7,5).
Bradford-Farbreagenz	10 ml 0,5 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250 in EtOH, 15 % (v/v) ortho-Phosphorsäure, dH ₂ O ad 100 %.
Concanavalin A-Lösung	0,1 % (w/v) Concanavalin A in dH ₂ O.
Coomassie-Färbelösung	0,1 % (w/v) Coomassie brilliant blue 250R, 50 % (v/v) Methanol, 7,5 % (v/v) Essigsäure.
Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH.
DNase-Lösung	0,05 ‰ (w/v) DNase I in DMEM.
Elutionspuffer (Antikörper)	0,15 M NaCl, 0,2 M Glycin (pH 2,7).
Elutionspuffer (MBP)	Bindepuffer (MBP), 20 mM Maltose.
Elutionspuffer (RNA)	10 mM Tris-HCL (pH 7,5).
Entfärber	7,5 % (v/v) Essigsäure, 7,5 % (v/v) Methanol, 5 % (v/v) Glycerin.
Geltrocknungslösung	22 % (v/v) Ethanol, 1 % (v/v) Methanol, 1 % (v/v) Isopropanol, 1,5 % (v/v) Glycerin.
His-Binde-Puffer	5 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,9).
His-Binde-Puffer (den.)	6 M Harnstoff, 5 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,9).
His-Elution-Puffer	1 M Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,9).
His-Elution-Puffer (den.)	6 M Harnstoff, 1 M Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,9).
His-Ladungs-Puffer	50 mM NiSO ₄ .
His-Strip-Puffer	100 mM EDTA, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,9).
His-Strip-Puffer (den.)	6 M Harnstoff, 100 mM EDTA, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,9).
His-Wasch-Puffer	60 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,9).

Puffer	Zusammensetzung
His-Wasch-Puffer (den.)	6 M Harnstoff, 20 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,9).
Hyaluronidase	0,1 % (w/v) in PBS.
Hybridisierungspuffer (Koloniescreening)	50 % (v/v) Formamid, 5x SSC, 0,1 % (w/v) N-Laurylsarcosin, 0,02 % (w/v) SDS, 2 % (w/v) Blockierungsreagenz (Fa. Roche), 0,36 M NaCl, 0,024 M Maleinsäure (pH 7,5).
LB-Agarplatten	LB-Medium, 1,4 % (w/v) Bacto-Agar.
LB-Medium	1 % (w/v) Baktotrypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % NaCl.
Lyse/Binde-Puffer (RNA)	500 mM LiCl, 10 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS, 5mM DTT, 100mM Tris-HCl (pH 8,8).
Methylenblau-Färbelösung	0,5 M Na-Acetat, 0,04 % (w/v) Methylenblau, (pH 5,2).
NBT-Stammlösung	50 mg/ml in DMF.
Neutralisationspuffer	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0).
Neutralisationspuffer (Antikörper)	0,4 M Na ₂ HPO ₄ , 0,8 % (w/v) NaN ₃ , 0,4 % (w/v) BSA.
Papain	10 % Papain, 2 mM Glutamin, in DMEM. mit 1/5 Vol. 0,8 % (w/v) Cystein in DMEM, 2 mM Glutamin, (pH 7,4) aktivieren kurz vor Gebrauch.
PBS	0,8 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,114 % Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O, 0,02 % KH ₂ PO ₄ , alle Angaben (w/v).
PBS/10MP	PBS, 10 % (w/v) Magermilchpulver.
PBS/5MP	PBS, 5 % (w/v) Magermilchpulver.
PBS/NP40	PBS, 0,2 % NP40.
PBS/PFA	PBS, 4 % (w/v) Paraformaldehyd, bei 60 °C gelöst.
PBSN	PBS, 0,02 % (w/v) NaN ₃ .
PBST	PBS, 0,05 % (v/v) Tween 20.
PCR-Puffer	50 mM KCl, 20mM Tris-HCl (pH 8,4).
Ponceau S-Lösung	0,1 % (w/v) Ponceau S, 5 % (v/v) Essigsäure.
Psi-Medium	2 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) MgSO ₄ , (pH 7,6 mit KOH).
RM-Medium	1 % (w/v) Baktotrypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, 0,2 % (w/v) Glukose.
SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS.
SET-Puffer	0,32 M Sucrose, 1 mM EGTA, 3 mM MgCl ₂ , 20 mM Tris-HCl (pH 7,4).
SSC	0,15 M NaCl, 15 mM Na ₃ -Citrat, (pH 7,0 mit HCl).

Puffer	Zusammensetzung
Stringenzpuffer A	2x SSC, 0,1 % (w/v) SDS.
Stringenzpuffer B	0,1x SSC, 0,1 % (w/v) SDS.
Strip-Puffer (Antikörper)	100 mM 2-Mercaptoethanol, 2 % (w/v) SDS, 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8).
TAE	40 mM Tris, 10 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0 mit Essigsäure.
TBS	0,8 % (w/v) NaCl, 0,02 % (w/v) KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4).
TBST	TBS, 0,05 % (v/v) Tween 20.
TFB-1	30 mM K-Acetat, 50 mM MnCl ₂ , 100 mM RbCl, 10 mM CaCl ₂ , 15 % (v/v) Glycerin, (pH 5,8 mit verd. Essigsäure).
TFB-2	10 mM Na-MOPS, 75 mM CaCl ₂ , 10 mM RbCl, 15 % (v/v) Glycerin, (pH 6,5 mit NaOH).
Transferpuffer	25 mM Tris, 20 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol.
Trypsininhibitorlösung	0,025 % (w/v) Trypsininhibitor, 0,004 % (w/v) DNase I in dem entsprechenden Kulturmedium der Zellen, sterilfiltriert.
Trypsinlösung	0,25 % (w/v) Trypsin in dem entsprechenden Kulturmedium der Zellen, ohne FCS, sterilfiltriert.
Waschpuffer (Koloniescreening)	0,15 M NaCl, 0,3 % (v/v) Tween 20, 0,1 M Maleinsäure (pH 7,5).
Waschpuffer (RNA)	0,15 M LiCl, 1 mM EDTA, 0,1-0,3 % (w/v) SDS, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5).

2.1.8 Materialien/Systeme

5'3' Race Kit	Fa. Roche
Bac-to-Bac-System	Fa. Life Technologies
Blotpapier	Fa. Roth
DNAfree	Fa. Ambion
Dynabeads M-280	Fa. Dynal
ECL-Detektionssystem	Fa. Pharmacia Biotech
Jet Star Plasmid Mini Kit	Fa. Genomed
MBP-Tag-System	Fa. NEB
Nitrozellulosemembran (0,2 µm)	Fa. Schleicher und Schüll
pET-System	Fa. Novagen
Plastikartikel zur Zell- und Bakterienkultur	Fa. Greiner und Fa. Nunc
QiaPrep Spin Mini Kit	Fa. Qiagen
Qiaquick Gel Extraction Kit	Fa. Qiagen
Qiaquick PCR Purification Kit	Fa. Qiagen
RLM-Race Kit	Fa. Ambion

2.1.9 Primer

Alle für die PCR (2.2.1.11) eingesetzten Primer wurden im Kundenauftrag bei den Firmen Genaxis und MWG Biotech synthetisiert. Die DNA-Sequenzen und die Positionierung der Primer innerhalb der klonierten Gene können dem Anhang (7.1.1) entnommen werden.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Plasmidpräparation

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA wurde mittels Säulenchromatographie durchgeführt. Zur schnellen DNA-Isolierung wurde das QIAprep Spin Plasmid Kit auf der Basis einer Silica-Matrix eingesetzt, während zur Isolation von hochreiner, endotoxinfreier DNA das Jet Star-System unter Verwendung eines Anionenaustauscherharzes benutzt wurde. Beide Verfahren wurden nach Angaben der Hersteller angewendet.

2.2.1.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit einem Metylenblau-Spot-Test bestimmt. 1 μ l der Nukleinsäurelösung wurden auf eine positiv geladene Nylonmembran (Fa. Roche) aufgespottet und bei 120 mJ/cm^2 im UV-Crosslinker (Fa. Stratagene) kovalent gebunden. Die Membran wurde anschließend in 5 % Essigsäure angesäuert und 15 min in Metylenblau-Färbelösung equilibriert. Nach Entfärbung durch leichtes Schütteln in dH_2O wurde die blaue Färbung des Spots mit einer zuvor erstellten Eichreihe definierter Nukleinsäurekonzentrationen verglichen.

Alternativ wurde die DNA-Probe bei 260 nm in einem Spektralphotometer vermessen. Eine OD_{260} von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei DNA und 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei RNA. Zur exakten Messung der Konzentration sollten die Nukleinsäuren so verdünnt werden, daß die Extinktion zwischen 0,1 und 1 liegt.

2.2.1.3 Restriktionsspaltung von DNA

Zur Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde ca. 1 μg DNA pro 10 μl Reaktionsansatz mit 2-3 U des entsprechenden Enzyms versetzt und nach Angaben des Herstellers (Puffer, Temperatur) gespalten.

2.2.1.4 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese wurden DNA-Fragmente im elektrischen Feld aufgetrennt und hinsichtlich ihres relativen Molekulargewichts analysiert. Zur Herstellung des Agarosegels wurden 0,7-2,0 % Agarose in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und auf einen Gelträger gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/5-1/10 Volumen Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Als Größenstandard diente SmartLadder (Fa.

Eurogentec). Die Elektrophorese wurde bei 5 V/cm Elektrodenabstand in einer Horizontalgelelektrophoresekammer durchgeführt und beendet, wenn die zwei Blaufronten das Gel in Drittel unterteilt hatten. Nach 10 minütiger Färbung in einem Ethidiumbromid-Bad (2 µg/ml) und anschließender Entfärbung in dH₂O für 10 min wurden die Banden bei 302-360 nm mit einem UV-Transilluminator angeregt und mit einer Geldokumentationsanlage analysiert.

2.2.1.5 Gelextraktion

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegelblock wurden mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.1.6 Dephosphorylierung von DNA

Vektoren, die zur späteren Ligation mit nur einem Restriktionsenzym gespalten wurden und kompatible Enden vorweisen, müssen, um einen hohen Anteil von religiertem Vektor im Hintergrund einer späteren Ligation zu vermeiden am 5'-Ende dephosphoryliert werden. Der geschnittene Vektor wurde in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer mit alkalischer Phosphatase aus Rinderdarm für 30-60 min bei 37 °C behandelt.

2.2.1.7 Ligation

Für die Ligation kohäsiver, komplementärer DNA-Enden wurden 10-50 ng Vektor-DNA und Insert-DNA im 3-6fachen molaren Überschuß zusammengegeben. Die Ligation erfolgte durch Zugabe des vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffers und 1 Weiss-Einheit T4-DNA Ligase bei 4 °C. Der Reaktionsansatz wurde anschließend für 1-4 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Ligation stumpfer Enden wurde hingegen mit einem bis zu 10fachen molaren Überschuß an Insert-DNA durchgeführt. Die anschließende Ligationsreaktion wurde bei 4-16 °C für 6-16 h inkubiert.

2.2.1.8 Herstellung glatter DNA-Enden

Überhänge am 5' oder 3' Ende eines DNA Fragmentes wurden mit T4 DNA-Polymerase aufgefüllt oder abgedaut. 0,3-2 µg der DNA wurden in einem 20 µl-Ansatz mit 10 U T4-DNA-Polymerase, 1 µl 0,1 M DTT und 4 µl des 5 x Reaktionspuffers bei 4 °C gemischt. Zum Auffüllen der Überhänge wurde dem Reaktionsansatz noch 2 µl 10 mM dNTP-Mix zugesetzt. Die Reaktion wurde 15 min bei 12 °C inkubiert und anschließend durch Hitzeinaktivierung der Polymerase für 10 min bei 70 °C beendet.

2.2.1.9 Isolierung von DNA

Die Isolierung von DNA nach enzymatischen Reaktionen wurde mit dem Qiaquick PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.1.10 Transformation kompetenter *E. coli*

Chemisch kompetente *E. coli* wurden nach der modifizierten TFB-Methode (Hanahan et al., 1983) gewonnen. Von einer Einzelkolonie des Bakterienstammes wurde eine 5 ml Flüssigkultur in Psi-Medium angeimpft und 16 h bei 37 °C in einem Schüttelinkubator inkubiert. 2,5 ml dieser Kultur in der stationären Wachstumsphase wurden in 250 ml Psi-Medium überimpft und die Zellen bis zu einer OD₅₅₀ von 0,45-0,5 bei 220 rpm und 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden 10 min bei 0 °C gekühlt und anschließend bei 3500 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml TFB-1 resuspendiert und weitere 15 min bei 0 °C gekühlt. Nach erneutem Pelletieren wurden die Zellen in 10 ml TFB-2 resuspendiert, und nochmals 15 min bei 0 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in 200 µl-Portionen aliquotiert und entweder sofort eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C zur späteren Verwendung gelagert. Die auf diesem Wege erhaltenen kompetenten *E. coli* sind ca. 6 Monate bei -70 °C unter geringem Verlust ihrer Kompetenz haltbar.

Pro Transformationsansatz wurden 100 µl chemisch kompetente Zellen auf Eiswasser aufgetaut und vorsichtig mit 10-50 ng Plasmid-DNA gemischt. Der Ansatz wurde 10 min bei 0 °C inkubiert und anschließend für 75 s einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt. Die Zellen wurden daraufhin wieder auf 0 °C abgekühlt, 1 ml LB-Medium zugesetzt und bei 37 °C und 350 rpm in einem Schüttelinkubator für 40-60 min inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 3000 g 1 min pelletiert, der Überstand verworfen, die Zellen in 100 µl LB-Medium resuspendiert und anschließend auf einer Selektionsplatte ausgestrichen.

Im Falle einer Blau/Weiß-Selektion wurden die Selektionsplatten zuvor mit je 100 µl 100 mM IPTG und 2 % (w/v) X-Gal (in DMF) eingespatelt.

2.2.1.11 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR zur Amplifikation von DNA (Saiki 1988) wurde in einem Reaktionsansatz von 50 µl durchgeführt. Die Templatmenge differierte zwischen 0,01 und 30 ng. In jeder Reaktion wurden je 50 pMol PCR-Primer eingesetzt. Die dNTP-Konzentration betrug 200 µM, während die MgCl₂-Konzentrationen zwischen 10 mM (Standard) und 17,5 mM (DNA-Fragmente größer als 4 kb) variierten. Es kamen unterschiedliche Polymerasen zu Einsatz: Taq-Polymerase (Fa. Gibco) für Standard-Anwendungen und High-fidelity-Polymerase (Fa. Roche) zur Amplifikation von Fragmenten, die erwartungsgemäß größer als 2 kb waren. Der Reaktionsansatz wurde mit Mineralöl überschichtet.

Das Temperaturprofil der PCR begann mit einem initialen Denaturierungsschritt bei 94 °C für 1-6 min. Anschließend wurde die Polymerase bei einer Temperatur von 68-72 °C zum Reaktionsmix pipettiert (Hot-Start). Innerhalb der Zyklen wurden die DNA-Doppelstränge für 20-60 s bei 94 °C denaturiert, während das Anlagern der Primer (Annealing) bei einer der Schmelztemperatur des Primers angepassten Temperatur für 30-60 s stattfand. Die Extension der angelagerten Primer wurde bei 68-72 °C für 30 s bis zu 8 min erreicht, abhängig von der Größe der erwarteten Fragmente. Der Zyklus wurde 25-40mal wiederholt, um eine ausreichende Vermehrung der DNA zu gewährleisten. Die Reaktion wurde in einem programmierbaren Thermocycler (Fa. MWG Biotech) durchgeführt.

2.2.1.12 Inverse PCR

Mit Hilfe der inversen PCR (Ochman et al., 1988) können unbekannte Bereiche stromaufwärts oder stromabwärts einer bekannten DNA-Sequenz aus gDNA kloniert werden. Nach erfolgtem Southern-Blot kann der Größenbereich der einem Signal entspricht von einem Parallelansatz aus dem Agarosegel eluiert werden. Aus einem anschließenden zirkularisierenden Ligationsansatz kann durch gezielte PCR das Fragment kloniert und sequenziert werden.

In dieser Arbeit wurde eine Variante dieses Verfahrens zur Ermittlung von unbekanntem 5'-Bereich bereits bekannter Gene verwendet. 10 µg gDNA wurden mit einem Restriktionsenzym verdaut, das bekanntermaßen innerhalb des gesuchten Gens, möglichst weit im 5'-Bereich schneidet. Anschließend wurden die Fragmente in einem 0,7 %igen Agarosegel bei 2 V/cm Elektrodenabstand aufgetrennt und die verdauten gDNA nach Größen fraktioniert aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert (2.2.1.5). Die Eluate wurden für 1 h bei Raumtemperatur mit Ligase behandelt (2.2.1.7), um eine Zirkularisierung der Fragmente zu erreichen. Die zirkularisierten gDNA-Fragmente wurden in zwei geschachtelten PCR-Runden unter den Bedingungen für erwartete große PCR-Amplifikate (lange initiale Denaturierung, kurze Denaturierung (20 s) und lange Extension (>6 min) innerhalb der Zyklen) ausgesetzt. Die Primer für diese PCR wurden so aus dem bekannten Genabschnitt gewählt, daß die Amplifikation über die Zirkularisierungsstelle (=Restriktionsstelle) hinweg den unbekanntem 5'-Bereich des Gens lieferte. Durch Analyse und Vergleich der PCR-Fragmentgrößen mit den Größen der eluierten gDNA-Fragmente (Templates) konnte festgestellt werden, ob die Amplifikate den erwarteten Fragmentgrößen entsprechen. Diese wurden aus dem Agarosegel eluiert, kloniert und sequenziert.

2.2.1.13 Transformanden-Screening mit PCR

Zellmaterial von Bakterienkolonien wurde mittels einer sterilen Spitze/Zahnstocher in ein Reaktionsgefäß mit 40 µl dH₂O überführt und auf einer neuen Selektionsplatte ausgestrichen. Diese Duplikatsplatte wurde bei 37 °C >4 h inkubiert. Das suspensierte Zellmaterial wurde bei 94 °C für 3-5 min hitzelysiert und als Template für eine PCR mit spezifischen Primern für das gesuchte Gen eingesetzt. Positive Klone wurden von der Duplikatsplatte zur Übernachtskultur/Plasmidpräparation (2.2.1.1) angeimpft.

2.2.1.14 RACE-PCR (Rapid amplification of cDNA ends)

Die RACE-PCR wurde zur Amplifikation unbekannter 3'- oder 5'-Enden einer bekannten cDNA-Sequenz angewendet. Das 5'/3'RACE Kit (Fa. Roche) und das RLM-RACE Kit (Fa. Ambion) wurden nach Angaben der Hersteller genutzt.

2.2.1.15 Herstellung von Digoxigenin (DIG)-markierten Sonden

Für das Kolonie-Screening (2.2.1.20) wurden DNA-Sonden benötigt, um positive Transformanden zu ermitteln. Die Sonden wurden mit spezifischen Primern und DIG-dNTP-labelling-Mix (Fa. Roche) anstelle des dNTP-Mixes an bereits klonierten und sequenzierten Teilstücken der gesuchten Sequenz durch PCR (2.2.1.12) hergestellt.

2.2.1.16 mRNA-Isolierung aus Gewebe

Alle Materialien und Lösungen wurden vor dem Kontakt mit RNA durch Sterilisation bei 200 °C, bzw. DEPC-Behandlung (Sambrook et al., 1989) von RNasen befreit oder RNasefrei vom Hersteller bezogen.

In einem Glashomogenisator wurden 0,1 g Gewebe in 1 ml Lyse/Binde-Puffer 1-2 min homogenisiert. Das Lysat wurde 5-10mal durch eine Kanüle gezogen, um die Viskosität zu erniedrigen und 30 s bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 300 µl Oligo-(dT)₂₅-Dynabeads vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die paramagnetischen Dynabeads wurden in einem Magnethalter gestellt und so vom Lysat separiert. Der Überstand wurde entfernt und verworfen. Nach 3-6maligem Waschen der Beads in Waschpuffer wurden die Beads in 10 µl Elutionspuffer resuspendiert, 2 min bei 65-70 °C inkubiert, im Magnethalter separiert und das Eluat in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Der Elutionsvorgang wurde anschließend noch einmal wiederholt und beide Eluate vereinigt.

Im Anschluß an die Elution von den Dynabeads wurde die mRNA mit dem DNFree-Kit (Fa. Ambion) nach Angaben des Herstellers von kontaminierender gDNA befreit.

2.2.1.17 Reverse Transkription

Die reverse Transkription dient der cDNA-Erststrangsynthese. Es wurden zu 0,1-1 µg frisch isolierter mRNA 50 pMol Oligo-(dT)₁₈₋₂₅ oder Random Hexamer-Primer gegeben und 10 min auf 70 °C erhitzt. Anschließend wurde das Gemisch auf 0 °C abgekühlt und 4 µl 5x Erststrangpuffer, 2 µl 10 mM dNTP-Mix, 2 µl 0,1 M DTT, RNasefreies H₂O bis zu einem Volumen von 19 µl und 1 µl (200 U) Superscript RT II zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde zunächst 10 min bei Raumtemperatur und danach weitere 50 min bei 42 °C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 95 °C für 5 min beendet und bei -20 °C gelagert oder sofort als PCR-Templat eingesetzt.

2.2.1.18 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden mit der Didesoxy-Methode nach Sanger et al., 1977, im Kundenauftrag von der Fa. SeqLab auf einem ABI 377 (Fa. Perkin Elmer) durchgeführt.

2.2.1.19 Computergestützte Sequenzanalyse

Die Sequenzanalysen wurden computergestützt mit den Softwarepaketen DNASIS (Fa. Hitachi), GCG (Fa. Genetics Computer Group) und Vector NTI Suite (Fa. Informax) analysiert. Außerdem wurden die Internetdienste auf den Bioinformatik-Servern von NCBI, EMBL und EXPASY für Datenbankvergleiche mit den Datenbanken Genbank und Swissprot genutzt.

2.2.1.20 Kolonie-Screening

Das Kolonie-Screening wurde zur Detektion positiver Transformanden in Zufallsklonierungsansätzen gewählt.

PCR-Ansätze, die keine eindeutigen Banden in der Agarosegelelektrophorese lieferten, wurden größenfraktioniert aus dem Gel eluiert (2.2.1.5), über das Zufallsprinzip in den pGEMTeasy-Vektor ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert (2.2.1.10). Die Selektionsplatten wurden 16 h bei 37 °C ohne Blau/Weiß-Selektion inkubiert. Von den gewachsenen Kolonien wurden mit Nitrozellulose Abdrücke gefertigt, die bezüglich ihrer Orientierung zur Platte markiert wurden, und die Selektionsplatte anschließend so lange bei 37 °C inkubiert, bis die Kolonien nachgewachsen waren.

Die Nitrozellulosefilter wurden anschließend mit der Rückseite auf mit Puffern getränkte Blotpapiere gelegt: 3 min Denaturierungspuffer, 2 min Neutralisierungspuffer, 15 min 2x SSC. Nach einstündigem Backen der Filter bei 80 °C wurden diese für mindestens 30 min bei 42 °C in Hybridisierungspuffer prähybridisiert. Die DIG-markierte DNA-Sonde wurde anschließend frisch denaturiert (10 min 68 °C, 5 min 0 °C) in einer Konzentration von 50-80 ng/ml in Hybridisierungspuffer zugegeben und mindestens 2 h bei 42 °C hybridisiert.

Die Filter wurden je zweimal mit Stringenzpuffer A 5 min bei Raumtemperatur und mit Stringenzpuffer B 15 min bei 60-68 °C gewaschen. Nach mehrmaligem Waschen mit Waschpuffer wurden die Membranen 30 min in Blockierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde ein Antikörper gegen Digoxigenin (Fa. Roche), der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt war, 1:10000 verdünnt in Blockierungspuffer mindestens 30 min auf die Filter gegeben. Die Membranen wurden mehrfach mit Waschpuffer und zweimal mit AP-Reaktionspuffer gewaschen. Die Detektion wurde durch Verdünnung der Substrate NBT (330 μ g/ml) und BCIP (170 μ g/ml) in AP-Reaktionspuffer auf den Filtern gestartet und nach einer blauen Farbmarkierung der Kolonien auf dem Filter durch Spülen mit dH₂O beendet.

Kolonien, die ein blaues Signal im Koloniescreening hervorgebracht haben, wurden auf den Selektionsplatten identifiziert und zur Plasmidpräparation (2.2.1.1) verwendet.

2.2.1.21 DNA-Isolierung mit paramagnetische Beads

Aus komplexen DNA-Lösungen, wie PCR-Reaktionsansätzen, wurde mit Hilfe paramagnetischer Dynabeads gezielt DNA isoliert. Die DNA wurde in einem PCR-Gefäß in 50 μ l PCR-Puffer aufgenommen und 50 pMol biotinylierter Primer zugegeben. Die DNA wurde 3 min bei 94 °C denaturiert, gefolgt von einer Hybridisierung von 5 min bei 50-55 °C. Die Dynabeads wurden nun durch magnetische Separation sechsmal mit PCR-Puffer bei Raumtemperatur gewaschen. Zur Elution wurden die Beads zweimal in 10 μ l Elutionspuffer (RNA) resuspendiert, 2 min bei 80 °C inkubiert und das Eluat durch magnetische Separation abgenommen. Da das geringe Eluatvolumen sich schnell wieder abkühlt, wurde auch der Magnethalter auf 80 °C vorgewärmt. 1-2 μ l des Eluates wurden sofort für eine PCR-Reaktion eingesetzt.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen und endotoxinfreien Bedingungen an einem Sterilarbeitsplatz durchgeführt.

2.2.2.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zum Auftauen von kryokonservierten Zellen wurde die entsprechende Einfrierprobe im Wasserbad zügig bei 37 °C (Säugerzellen), bzw. 27 °C (Insektenzellen) aufgetaut und sofort in 5-10 ml des entsprechenden vorgewärmten Kulturmediums in Kulturschalen/-flaschen aufgenommen. Nach 2-4 h (Insektenzellen) oder am nächsten Tag (Säugerzellen) wurde nach Anhaftung der Zellen das Kulturmedium gewechselt.

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese in einer Dichte von 5×10^6 - 10^7 /ml in Kulturmedium mit 10 % (v/v) DMSO suspendiert und in ein Einfrierröhrchen überführt. In einer geschlossenen Styroporbox wurden die Zellen bei -70 °C über Nacht eingefroren und dann in flüssigen Stickstoff gelagert.

2.2.2.2 Kultivierung von Zellen

Zellkulturen müssen spätestens bei einer Konfluenz von 90 % passagiert werden.

Bei adhärent wachsende Zellen (CHO, OLN-93) wurde das Kulturmedium entfernt und durch Trypsinlösung ersetzt. Die Ablösung der Zellen wurde mikroskopisch verfolgt. Waren alle Zellen abgelöst, wurde das gleiche Volumen Trypsininhibitorlösung zugegeben, die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen mit dem 10fachen Volumen Kulturmedium überführt und bei 900 g pelletiert. Das Zellpellet wurde in dem 10fachen Ausgangsvolumen resuspendiert und die Zellen wieder ausplattiert. OLN-93 Zellen mußten zur Resuspension durch eine Kanüle (18G) gezogen werden um Zellaggregate zu lösen.

Insektenzellen (HighFive, Sf21) konnten ohne Trypsinisierung, durch Abspülen oder Abschlagen der Zellen vom Boden der Kulturschalen/flaschen abgelöst werden. Nach dem Pelletieren bei 900 g wurden die Zellen in dem 3-10fachen Ausgangsvolumen resuspendiert und erneut ausplattiert.

2.2.2.3 Transiente Transfektion von Zellkulturen

Die Zellen (CHO, OLN-93) wurden am Tag vor der Transfektion passagiert und in einer Konfluenz von 20-40 % auf 35 mm Kulturschalen ausplattiert.

Am Tage der Transfektion wurden die Zellen mit je 1 ml Optimem-Medium (Fa. Life technologies) dreimal gewaschen und mit 660 µl bedeckt. In 170 µl Optimem wurden 1 µg der hochreinen DNA (Jet Star-Präparation (2.2.1.1)) und je 4 µl Transfectam gelöst, zur Präzipitatbildung miteinander vermischt und 15-20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA/Transfectam-Präzipitate wurden auf die Zellen gegeben und 2-6 h im CO₂-Begasungsbrutschrank bei 5 % CO₂ inkubiert. Die Transfektion wurde durch Ersetzen des Transfektionsmediums mit Kulturmedium beendet. Das Expressionsniveau der Zielproteine erreichte nach 12-36 h den optimalen Zeitpunkt für weitere Untersuchungen.

2.2.2.4 Baculovirus-Techniken

Rekombinante Varianten des *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV, Baculovirus) wurden mit Hilfe des Bac-to-Bac-Systems generiert, um Zielproteine heterolog in Insektenzellen exprimieren zu lassen. Die rekombinante Bacmid-DNA (pMON14272) wurde, wie vom Hersteller beschrieben, durch Klonierung des Zielgens in Fastbac-Vektoren und anschließende gerichtete Transposition in *E. coli* DH10bac-Zellen erstellt. Die Isolierung

erfolgte mit Hilfe der Jetstar-Präparationsmethode (2.2.1.1) nach Angaben des Herstellers. Die Elution der Bacmid-DNA von den Anionentauschersäulen wurde jedoch, in Änderung des Protokolls, mit dem vorher auf 65 °C erwärmten Elutionspuffer durchgeführt, um die hochmolekulare Bacmid-DNA von der Matrix ablösen zu können. Die isolierte DNA enthielt sowohl Bacmid-DNA, als auch Plasmid-DNA des Helferplasmides und der Fastbac-Vektoren. Die rekombinante Bacmid-DNA wurde direkt zur initialen Transfektion von Insektenzellen (HighFive oder Sf21) verwendet. 50 % konfluente 35 mm Kulturschalen mit Insektenzellen wurden serumfrei gewaschen und mit 800 µl serumfreien Medium (InsectXpress) bedeckt. Je 1 µg DNA und 6 µl Cellfectin wurden in 100 µl InsectXpress gelöst, vermischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das DNA/Cellfectin-Präzipitat wurde anschließend auf die Zellen gegeben und die Zellen 4 h bei 27 °C inkubiert. Die Transfektion wurde beendet, indem das Transfektionsmedium durch Kulturmedium ersetzt wurde.

Bei Viren, die ein Reportergen (GFP, DSRED) trugen, konnten bereits nach 24 h einzelne infizierte Zellen fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden, deren Nachbarzellen durch schwächere Fluoreszenz gekennzeichnet waren. Diese Infektionsherde kennzeichnen eine erfolgreiche Transfektion und Virus-Bildung der Zellen. Nach 2-3 Tagen wurde der virenhaltige Überstand der Zellen abgenommen, sterilfiltriert und 100 µl dieses Überstandes auf eine 30-50 %ig konfluente 75 cm² Kulturflasche mit Zellen gegeben und weitere 3 Tage inkubiert, um einen hochtitrigen Virusstock zu erhalten. Der Virusstock wurde in Einfrierröhrchen aliquotiert und zur kurzfristigen Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Dauerlagerung fand bei -70 °C statt.

Der Virustiter der rekombinanten AcPNV wurde nicht bestimmt, da für die heterologe Expression der Kaliumkanalproteine zur elektrophysiologischen Charakterisierung für jeden Virus eine eigenes Virus/Zell-Verhältnis und eine eigene Infektionszeit empirisch ermittelt werden mußten. Aus diesem Grund waren die Virentiter nicht von Interesse.

2.2.2.5 Isolierung von retinalen Neuronen

Sämtliche Präparationsschritte wurden bei 16 °C durchgeführt, um die Vitalität der Zelle zu erhalten.

Vor Beginn der Präparation wurden 35 mm Gewebekulturschalen mit 125 µl Concanavalin A-Lösung beschichtet und gründlich mit DMEM gespült. Der Fisch wurde dekapitiert, 10 min in 70 % (v/v) EtOH getaucht und anschließend die Augen herauspräpariert. Die Augen wurden im Bereich der *Ora serata* mit einem Schnitt geöffnet, welcher entlang der *Ora serata* vergrößert wurde, um den Augenbecher zu öffnen. Nach Entfernung der Linse löste sich die Retina vom Augenbecher, bis auf eine geringe Bindung im Bereich des blinden Flecks, welche im folgenden ebenfalls durchtrennt wurde. Der Glaskörper wurde 15-20 min mit Hyaluronsäure angedaut, bis er sich leicht aus dem Augenbecher entfernen lässt. Das freiliegende Gewebe wurde mit Papain gelockert (70 min bei Retinaprints, 85 min bei Retinadissoziaten).

Sollten Retinadissoziat generiert werden, wurde die Papain-Lösung durch 1 ml DMEM ersetzt und die Retina durch 2-3maliges pipettieren mit einer 1000 µl Pipette dissoziiert. Je 500 µl der Zellsuspension wurden zum Anhaften in eine Concanavalin-beschichtete Kulturschale gegeben und nach 30 min 500 µl Fischkulturmedium (2.1.5) zugesetzt.

Retinaprints wurden aus dem papainverdauten Gewebe generiert, indem die Retinen nun vorsichtig in 1 ml DNase-Lösung inkubiert wurden. Ein Stück Nitrozellulose wurde unter der Photorezeptorseite des Präparates gelegt und langsam aus der Kulturschale gezogen, so daß die Retina mit der Ganglienzellenseite nach oben auf der Nitrozellulose zum Liegen kommt. Die Nitrozellulose wurde vorsichtig mit einem Stempel und dem Präparat nach unten auf eine

beschichtete Kulturschale gedrückt. Daraufhin wurden 500 µl DMEM zugegeben und die Membran wieder entfernt. Auf dem Boden der Kulturschale befanden sich ein Abdruck der Retinaganglienzellschicht und je nach ausgeübten Druck auch einige andere Retinazelltypen, teilweise sogar ganze Retinastücke. Nach einer halben Stunde Anheftung wurde den Zellen Fischkulturmedium zugesetzt. Immunzytochemie (2.2.4.5) wurde mit diesen Präparaten nach einer Erholungsphase von 1-2 h durchgeführt.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Proteinbestimmung (Bradford et al., 1976)

Das Protein wurde in 500 µl dH₂O verdünnt und mit dem gleichen Volumen Bradford-Farbreakanz gründlich vermischt. Nach 15minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die OD₅₉₅ der Proben in einem Spektralphotometer bestimmt und mit einer Referenzkurve definierter BSA-Konzentrationen verglichen.

2.2.3.2 Proteinbestimmung mit Amidoschwarz

1 µl der zu bestimmenden Proteinlösung wurde auf einen Nitroacetatpapierstreifen gespottet und 3 min in Amidoschwarz-Färbelösung gefärbt. Der Papierstreifen wurde anschließend in Methanol/Essigsäure (9:1) entfärbt und die erhaltene Färbung des Spots mit einer BSA-Eichreihe definierter Proteinkonzentrationen verglichen.

2.2.3.3 Proteinfällung mit Aceton

Die wässrige Proteinlösung mit dem Zielprotein wurde mit dem vierfachen Volumen kaltem (-20 °C) Aceton versetzt, gründlich gemischt und 30 min bei -20 °C inkubiert. Das Protein konnte durch Zentrifugation bei 4 °C mit 16.000 g für 20 min als Pellet gewonnen werden. Das Proteinpellet wurde nach Entfernen des Überstandes an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in dem gewünschten Puffersystem wieder gelöst bzw. resuspendiert.

2.2.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen wurden SDS-Polyacrylamidgele mit diskontinuierlichem Puffersystem nach Laemmli, 1970, verwendet. Die Trenngele wurden mit einer Endkonzentration (T) von 10-15 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8; C=2,66 %), 0,375 M Tris-HCL (pH 8,8), 1 ‰ (w/v) SDS, 1 ‰ (v/v) TEMED und 1 ‰ (w/v) AMPS zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen und mit etwas n-Butanol überschichtet. Nach beendeter Polymerisation des Trenngels wurde das n-Butanol abgegossen und gründlich mit dH₂O gespült. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel mit 5 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8), 0,125 M Tris-HCl (pH 6,8), 1 ‰ (w/v) SDS, 1 ‰ (v/v) TEMED und 1 ‰ (w/v) AMPS gegossen. Die Probestaschen wurden mit Hilfe eines Teflonkammes einpolymerisiert.

Die Proteinproben wurden vor dem Lauf in SDS-Probenpuffer 3 min aufgekocht. Die Elektrophorese erfolgte bei 15-18 mA/Gel im Sammelgel und 25-30 mA/Gel im Trenngel unter Verwendung von SDS-PAGE-Laufpuffer.

2.2.3.5 Coomassie-Färbung von Proteingelen

SDS-Gele wurden in Entfärber für mindestens 30 min durch leichtes Schütteln bei Raumtemperatur equilibriert. Anschließend wurde die Gele mindestens 2 h bei Raumtemperatur in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend durch Aufkochen in 500 ml dH₂O/Gel entfärbt. Der restliche Hintergrund der Gele wurde durch weiteres Entfärben in Entfärber-Lösung entfernt.

Zur Lagerung und Dokumentation wurden die Gele anschließend 15 min in Gel Trocknungslösung geschwenkt. Die Gele wurden in einem Rahmen zwischen zwei mit Gel Trocknungslösung gesättigte Zellophanfolien gespannt und 16-24 h bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.3.6 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran (Westernblot)

Drei Lagen Blotpapier in der Größe des zu blottenden Gels wurden in Transferpuffer ohne Luftblasen getränkt und auf die Anode einer Semi-Dry-Blotapparatur gelegt. Darauf wurde ein mit Transferpuffer benetztes Stück Nitrozellulose gleicher Größe, gefolgt von dem SDS-Gel, welches kurz in Transferpuffer geschwenkt worden war, luftblasenfrei aufgelegt. Das SDS-Gel wurde mit weiteren 3 Lagen des mit Transferpuffer gesättigten Blotpapiers bedeckt und die Kathode auf den Sandwich aufgelegt. Der Transfer erfolgte elektrisch bei 150 mA für 1-1,5 h. Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose wurde durch Inkubation für 5 min in Ponceau-S-Lösung und nachfolgendes Waschen mit dH₂O kontrolliert. Der angefärbte Molekulargewichtsstandard wurde von der Nitrozellulose abgetrennt und die Blotmembran anschließend mit PBS entfärbt.

2.2.3.7 Anreicherung von Membranproteinen

Das Gewebe (0,1-0,5 g) bzw. 1–5 x 10⁶ Zellen wurden in 1 ml SET-Puffer (Gewebe: Glashomogenisator, Zellen: Ultraschall) homogenisiert. Die Homogenisate wurden bei 4 °C mit 700 g zentrifugiert, gefolgt von einer erneuten Zentrifugation des Überstandes bei 13.000 g und 4 °C. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde bei 100.000 g und 4 °C 80 min pelletiert. Das Pellet bestand aus Membranlipiden und deren assoziierten Proteinen und wurde in 100 µl SDS-Probenpuffer 3 min bei 94 °C aufgekocht.

2.2.3.8 Affinitätsreinigung von Polyhistidin-Fusionsproteinen

Eine das Expressionsplasmid tragende *E. coli* Kultur (0,5-2 L), welche sich in der logarithmischen Wachstumsphase befand, wurden in dem entsprechendem Selektionsmedium bei einer OD₆₀₀ von 0,8-1,0 mit IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert und bis zu einer maximalen Produktanreicherung, die vorher in einem kleinerem Maßstab optimiert wurde, kultiviert (2-4 h). Die Bakteriensuspension wird bei 4000 g und 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 5 ml kalten His-Binde-Puffer je Gramm Feuchtwicht resuspendiert. Die

Zellsuspension wurde bei 0 °C sonifiziert und zwischendurch mehrfach durch eine Kanüle gezogen bis sie am Meniskus klar durchschien. Das Zell-Lysat wurde bei 9000 g und 4 °C 20 min pelletiert. Überstand und Pellet dieser Zentrifugation wurden mit SDS-PAGE analysiert, in welcher der beiden Fraktionen das Zielprotein enthalten war. Ist der größte Teil des Zielproteins im Überstand enthalten, wird dieser nativ aufgereinigt, während eine denaturierende Aufarbeitung nötig war, wenn das Zielprotein überwiegend im Zellpellet zu finden war.

Bei der nativen Aufarbeitung des Zielproteins wird der Überstand der Zentrifugation des Zell-Lysates durch eine 0,45 µm Membran filtriert und direkt für die Säulenchromatographie eingesetzt.

Im Falle der denaturierenden Aufreinigung wurde das Pellet der Zentrifugation des Zell-Lysates in His-Binde-Puffer (den.) resuspendiert, ca. 1 h unter Schütteln homogenisiert und bei 16000 g und 4 °C 20 min zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde durch eine 0,45 µm Membran filtriert und direkt zur Säulenchromatographie eingesetzt.

Die Affinitätschromatographie mit His-Bind-Resin (Fa. Novagen) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur denaturierenden Aufarbeitung wurden die entsprechenden Puffer genutzt, welche mit (den.) gekennzeichnet sind.

Die Säule wurde mit einer Flussrate von 10 Säulenvolumen pro Stunde mit den Zellextrakten beladen und mit 10 Säulenvolumen His-Binde-Puffer, gefolgt von 6 Säulenvolumen His-Wasch-Puffer gewaschen. Das Protein wurde mit 4 Säulenvolumen His-Elution-Puffer fraktionsweise eluiert. Die Säule wurde anschließend noch mit His-Strip-Puffer (4 Säulenvolumen) gespült. Die Durchläufe der verschiedenen Waschschriffe, die Elutionsfraktionen und das Strip-Eluat wurden anschließend einer Proteinbestimmung (2.2.3.1) unterzogen und durch SDS-PAGE (2.2.3.4) analysiert.

2.2.3.9 Affinitätsreinigung von MBP-Tag-Fusionsproteinen

Die Heterologe Expression der MBP-Tag-Fusionsproteine in *E. coli* wurden wie unter 2.2.3.8 und im Protokoll des Herstellers beschrieben durchgeführt. Die Induktion der Expression erfolgte mit 0,3 mM IPTG Endkonzentration in RM-Medium.

Nach der Zellyse durch Ultrabeschallung in Bindepuffer und anschließender Zentrifugation bei 9000 g wurde der Überstand durch eine 0,45 µm Membran filtriert und direkt auf eine Amylose-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit dem 10fachen Säulenvolumen Bindepuffer gewaschen und das Zielprotein mit dem dreifachen Säulenvolumen Elutionspuffer in Fraktionen eluiert. Die verschiedenen Säulendurchläufe und die Elutionsfraktionen wurden einer Proteinbestimmung (2.2.3.1) unterzogen und durch SDS-PAGE (2.2.3.4) analysiert.

2.2.3.10 Kopplung von Polypeptiden an tosylaktivierte Dynabeads

$6,7 \times 10^8$ tosylaktivierte Dynabeads wurden mit 500 µl PBS dreimal im Magnetseparator gewaschen. Das Peptid wird in einer Endkonzentration von 400 µg in 2 ml PBS zu den Beads gegeben und 16 h bei 37 °C oder 24 h bei Raumtemperatur im Rollinkubator bei niedriger Umdrehungszahl inkubiert. Die Beads wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und die freien Tosylgruppen mit 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5) 4 h inaktiviert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Beads in PBSN bei 4 °C gelagert.

2.2.4 Immunologische Methoden

2.2.4.1 Herstellung polyklonaler Antikörper

Polyklonale Antikörper gegen heterolog exprimierte und aufgereinigte Polypeptide (2.2.3.8-9) wurden im Kundenauftrag bei der Fa. Bioscience in Kaninchen oder Meerschweinchen produziert. Die Tierseren wurden portioniert und zur dauerhaften Lagerung bei -70 °C eingefroren oder mit 0,1 ‰ (w/v) NaN_3 versetzt und bei 4 °C gelagert.

2.2.4.2 Affinitätsaufreinigung polyklonaler Antikörper

Zur Affinitätsaufreinigung polyklonaler Antikörperseren wurden mit dem entsprechenden Polypeptid gekoppelte Dynabeads einmalig mit Elutionspuffer und dreimal mit sterilem PBS im Magnethalter gewaschen. Die Beads wurden anschließend mit 1 ml PBS/0,5 ml Antiserum bei Raumtemperatur 30 min im Rollinkubator bei niedriger Umdrehungszahl inkubiert. Der Überstand wurde magnetisch separiert und die Beads vier- bis sechsmal mit 0,5-1 ml sterilem PBS gewaschen. Zur Elution wurden die Beads gründlich 2 min mit 300 μl Elutionspuffer gemischt, magnetisch separiert und der Überstand sofort mit 100 μl Neutralisationspuffer gemischt. Die Beads wurden mit sterilem PBS dreimal gewaschen und in PBSN bei 4 °C gelagert. Die affinitätsgereinigten Antikörper wurden ebenfalls bei 4 °C gelagert.

2.2.4.3 Immunblot

Die proteintragende Nitrozellulosemembran wurde mindestens 30 min in PBS/5MP bei Raumtemperatur oder alternativ 16 h bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper gegen das Zielprotein in der vom Hersteller angegebenen Verdünnung, bzw. bei affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörpern (2.2.4.2) 1:1000 in PBS/5MP 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen des Blots mit PBST wurde der sekundäre mit Peroxidase gekoppelte Antikörper 1:3000 (anti Kaninchen) oder 1:10000 (anti Meerschweinchen) in PBS/5MP verdünnt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde sechsmal je 5 min mit PBST gewaschen und die gebundene Peroxidase mit dem ECL-System nach Angaben des Herstellers detektiert.

2.2.4.4 "Stripping" von Immunblots

Zur Entfernung von auf Westernblots gebundenen Antikörpern wurde der Blot 30 min mit Strip-Puffer bei 50 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach intensivem Waschen mit PBST kann der Blot mit PBS/5MP blockiert und einer erneuten Immunblotdetektion unterworfen werden.

2.2.4.5 Immunzytochemie

Die immunzytochemisch zu untersuchenden Zellen wurden in 35 mm Kulturschalen ausplattiert und mit PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte entweder mit kaltem Methanol bei -20 °C für 20 min oder mit PBS/PFA 10 min bei Raumtemperatur. Es folgte

eine 10minütige Inkubation mit PBS/NP40 und der Blockierungsschritt mit PBS/10MP für mindestens 30 min. Die affinitätsgereinigten Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:800 in PBS/10MP für 1 h auf die fixierten Zellen gegeben. Die Präparate wurden mit PBST viermal gewaschen und durch den sekundären, mit Cy3 gekoppelte Antikörper (anti-Kaninchen, bzw. anti-Meerschweinchen) 1:800 in PBS/10MP ersetzt. Die Zellen wurden mit PBST sechsmal gewaschen.

Spezifische Bindungen der sekundären Antikörper konnten fluoreszenzmikroskopisch bei einer Anregungswellenlänge von 550 nm und einer Emissionswellenlänge von 570 nm detektiert werden.

2.2.4.6 Immunhistochemie

Junge, adulte Forellen wurden dekapitiert und die Köpfe in iso-Pentan bei -130 °C bis -150 °C schockgefroren. Die Köpfe wurden auf den Schneidetisch eines Gefriermikrotoms mit Wasser festgefroren und in 10 µm dicken Schnitten auf Objektträger übertragen. Die Schnitte wurden 30 min auf einer Heizplatte bei 37 °C getrocknet. Die Fixierung der Schnitte erfolgte entweder mit kaltem Methanol bei -20 °C für 20 min oder mit PBS/PFA 10 min bei Raumtemperatur. Es folgte eine 10minütige Inkubation mit PBS/NP40 und der Blockierungsschritt mit PBS/10MP für mindestens 30 min. Die affinitätsgereinigten Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:50 - 1:200 in PBS/10MP für 1 h auf die fixierten Schnitte gegeben. Die Präparate wurden mit PBST viermal gewaschen und durch den sekundären, mit Cy3 gekoppelte Antikörper (anti-Kaninchen bzw. anti-Meerschweinchen) 1:800 in PBS/10MP ersetzt. Die Schnitte wurden mit PBST sechsmal gewaschen.

Spezifische Bindungen der sekundären Antikörper konnten fluoreszenzmikroskopisch bei einer Anregungswellenlänge von 550 nm und einer Emissionswellenlänge von 570 nm detektiert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung von Kaliumkanal-Primärsequenzen

3.1.1 Traw1

Die Klonierung eines Mitglieds der *Shaw*-Subfamilie (Kv3) erfolgte über PCR. Zwei cDNA-Fragmente aus der phylogenetisch konservierten Kernregion eines Kaliumkanals waren bereits aus dem Hirnstamm, bzw. dem Kleinhirn der Forelle kloniert worden und konnten eindeutig durch Homologievergleiche dieser Subfamilie zugeordnet werden (Turkan, 1998). Die beiden korrespondierenden Kaliumkanäle wurden Traw1 und Traw2 genannt.

Zur Komplettierung der Traw1-cDNA-Sequenz wurde ein modifiziertes Protokoll der RACE-Technik angewendet. Im Falle der 5'-Region wurde cDNA aus Forellenhirn-mRNA mit dem kaliumkanalselektiven Primer Chan und AMV-RT synthetisiert. Das 5'-Ende von Traw1 wurde amplifiziert mit dem sequenzspezifischen Primer Kv3rr, in Kombination mit dem Oligo-dT-Ankerprimer. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, der Größenbereich von 0,9 bis 2,0 kb aus dem Gel eluiert und über das Zufallsprinzip in den pGEMTeasy-Vektor ligiert, um eine cDNA-Minibibliothek herzustellen. Diese Minibibliothek wurde in *E. coli* DH5 α transformiert. Fünf positive rekombinante Bakterienklone wurden mit einem PCR-Transformandenscreening (Primer; Kv3rr/Kv3rv) ermittelt und anschließend die Plasmid-DNA zur Sequenzierung isoliert.

Um die Traw1-Sequenz am 3'-Ende zu vervollständigen wurde mit Oligo-dT-Ankerprimern und AMV-RT hergestellte Forellenhirn-cDNA als Templat für die erste PCR-Runde mit dem genspezifischen Primer Kv3rv und dem Oligo-d(T)-Ankerprimer eingesetzt. Aus dem Reaktionsgemisch wurden mit dem kaliumkanalselektiven, biotinylierten Primer Chan und kovalent an Dynabeads gebundenem Streptavidin die für Kaliumkanäle kodierenden cDNA-Sequenzen angereichert. Diese wurden in einer zweiten, halb-verschachtelten PCR-Runde eingesetzt (Primer: Kv3r2v/Oligo-d(T)-Anker). Aus den PCR-Produkten, die eine Größe von 1,3 kb überschritten, wurde eine Minibibliothek durch Ligation in den Vektor pGEMTeasy hergestellt. Die Transformanden wurden mit einer sequenzspezifischen Sonde (Kv3r2r/Kv3r2v) einem Kolonie-Screening unterzogen. Zehn im Kolonie-Screening positive Klone wurden mittels Restriktionsspaltung getestet und sequenziert.

Die erhaltenen Sequenzen der 5'-und 3'-Regionen von Traw1 konnten mit dem initialen PCR-Fragment zur Überlappung gebracht und zu einer vollständigen cDNA-Sequenz von 2552 bp (7.1.1) zusammengefügt werden. Diese vollständige cDNA umschließt einen offenen Leserahmen von 1761 bp, was einer Proteinsequenz von 587 Aminosäuren (AS) entspricht. Zur Verifikation dieser Sequenz wurde eine RT-PCR an cDNA aus dem Gesamthirn

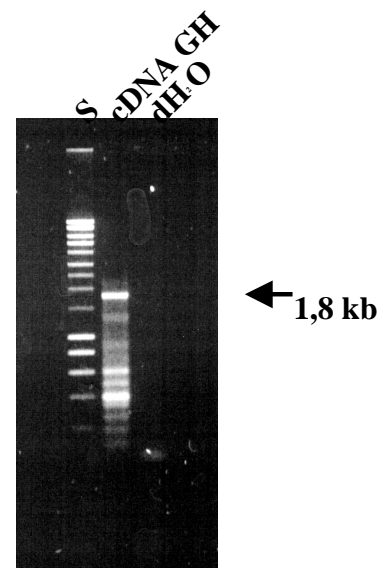


Abb. 3: Nachweis des Traw1-Transkriptes in Gesamthirn (GH)-cDNA der Forelle mit PCR. Die Kontrollreaktion wurde in dH₂O durchgeführt. S: SmartLadder-Standard. Primer: Kv3rgv/Kv3rg9r. Annealingtemperatur: 60 °C.

der Forelle mit sequenzspezifischen Primern, Kv3rgv und Kv3rg9r, welche den offenen Leserahmen von Traw1 umschließen, durchgeführt. Diese PCR lieferte unter anderem ein Amplifikat mit einem Molekulargewicht von ca. 1,8 kb (Abb. 3). Die korrespondierende Bande wurde aus dem Agarosegel eluiert, in pGEMTeasy kloniert und sequenziert. Die Sequenzierung ergab eine 100%ige Übereinstimmung mit der Sequenz der cDNA-Fragmente. Die in Abbildung 3 gezeigten niedermolekularen Nebenbanden wurden nicht untersucht. Die cDNA-Sequenz, sowie die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz können inklusive der Primerpositionierung dem Anhang (7.1.1) entnommen werden.

3.1.1.1 Traw1-Sequenzanalyse

Der Vergleich der vorhergesagte AS-Sequenz von Traw1 mit anderen Mitgliedern der *Shaw*-Subfamilie in Säugern zeigt die höchste Ähnlichkeit (82 %) mit dem Kv3.1b der Ratte (RKv3.1b), während das Traw2-Fragment keinem Subtyp zugeordnet werden kann (Abb. 3). Die Traw1-Aminosäuresequenz zeigt einige strukturelle Eigenschaften, die charakteristisch für Kaliumkanäle der *Shaw*-Subfamilie sind:

- 1.) Das S4-Segment enthält sechs periodische Motive mit einem positiv geladenen Aminosäurerest an jeder dritten Position.
- 2.) In der Region zwischen dem S5-Segment und der Porenregion H5 findet man einen 9 Aminosäuren langen Einschub, der, verglichen mit dem RKv3.1b, nur einen einzigen Austausch eines AS-Restes (Arg für Ser) aufweist.
- 3.) Die extrazelluläre Schleife zwischen den S1- und S2-Segmenten enthält zwei konservierte putative N-Glykosylierungsstellen.

Eine auffallende Sequenzübereinstimmung mit anderen *Shaw*-Kanälen lässt sich am Aminoterminus feststellen, der die Tetramerisierungsdomäne T1 beinhaltet. Das Sequenzmotiv HX₅CX₂₀CC, welches die subfamilienspezifische Oligomerisierung über Zn²⁺-Brücken vermittelt (Bixby et al., 1999), ist an gleicher Stelle bei Traw1 zu finden.

Die größten Unterschiede auf AS-Ebene zwischen Traw1 und RKv3.1b sind im Carboxy-Terminus und in den die putativen S1/S2- und S3/S4-Transmembrandomänen verbindenden extrazellulären Schleifen lokalisiert. Bei einem Vergleich mit den *Shaw*-Subtypen RKv3.3 und RKv3.4, welche beide in ihren Stromcharakteristika einen inaktivierenden I_A-Strom zeigen, fällt auf, daß Traw1 einen deutlich kürzeren Aminoterminus als diese beiden Kanäle besitzt. Als eine Besonderheit von Traw1 muß eine fünffach wiederkehrende Konsensussequenz am Carboxyterminus für die Proteinkinase C (PKC)-Phosphorylierung genannt werden, während am N-Terminus vier innerhalb der *Shaw*-Familie konservierte PKC-Phosphorylierungsstellen vorhanden sind.

Traw1 besitzt in der äußeren Porenregion an der Position 394 ein Tyrosinrest, welcher an dieser Stelle die Sensitivität von Traw1 gegenüber TEA vorhersagen läßt (Pongs, 1992).


```

# #
Traw1 : MGQGDENDRIVINVGGIRHQTYRSTLRRLPGTRLAWLAEPDAHSHF----- : 46
RKv3.1 : MGQGDSESERIVINVGGIRHQTYRSTLRRLPGTRLAWLAEPDAHSHF----- : 46
RKv3.2 : MGKIENNERVILNVGGIRHET YRSTLKTLPGTRLALLASSEPOGDCLTAAGDKLQPLP : 58
Traw2 : ----- : -

Traw1 : -----DYDPKIEEFFFD RHPGVFAHILN : 69
RKv3.1 : -----DYDPRADEEFFFD RHPGVFAHILN : 69
RKv3.2 : PPLSPPPRPPPLSPVPSGCFEGGAGNCSSHGGNGSDHPGGGREEFFFD RHPGVFAHILN : 116
Traw2 : ----- : -

#
Traw1 : YYRTGKHLHCPADVCGPLYEEELAFWGI DETDVEPCCWMTYRQHRDAEEALDSF----- : 122
RKv3.1 : YYRTGKHLHCPADVCGPLYEEELAFWGI DETDVEPCCWMTYRQHRDAEEALDSF----- : 122
RKv3.2 : YYRTGKHLHCPADVCGPLFEEELAFWGI DETDVEPCCWMTYRQHRDAEEALDIFETPDL : 174
Traw2 : -----PCCWMTYRQHRDAEEALDVF----- : 20

Traw1 : -GGGPPENSEEDGD-----EETLGMINRLAL-D-----GDDAKSGGHWRRWOR : 163
RKv3.1 : -GGAPLDNSADDADADGPGDSGDGEDELEMTKRLALSD-----SPDGRPGGFWRRWQP : 174
RKv3.2 : IGGDP-----GDDEDLGG-----KRLGIEDAAGLGGPDGKSGR-WRKLQP : 213
Traw2 : ---DINVDNGDD-D-----EET-G--KRLGIEDWL--ILISAAG--KKCDL : 55

# S1 * *
Traw1 : LLWALFEDPYSSKYARWIAFASLFFILVSI TTFCL ETHEAFNP--IINRTEIDPLDNS : 219
RKv3.1 : RIWALFEDPYSSRYARYVAFASLFFILVSI TTFCL ETHEAFNP--IYNKTEIENVRNG : 230
RKv3.2 : RMWALFEDPYSSRAARFIAFASLFFILVSI TTFCL ETHEAFNI--VKNKTE--PVING : 267
Traw2 : WIWNLFEDPYSSRAARFVAFASLFFILVSI TTFCL KTHEAFNITITINKSE--AVING : 111

S2 S3
Traw1 : IR-V---YQETETVVFILTYIEGVCVLWFTFEFIMRVTF CSPSKLEFERNITLNIIDFIA : 272
RKv3.1 : IQ-VRY---YREAETEAFILTYIEGVCVWFTFEFLMRVVF CSPNKVEFIKNSLNIIDFVA : 285
RKv3.2 : ISAVLQ---Y-EIETDPALTYIEGVCVWFTFEFLVRIVF SPNKLEFIKNLLNIIDFVA : 322
Traw2 : SLPDLGPDY-IIEETDPALTYIEGVCVLWFTLEFMRVVF SPDKLEFVKSLLNIIDFVA : 168

S4 #
Traw1 : ILPFYLEVGLSGLS SKAAKDV LGF LRVRFVRI LRIFKLTRHFVGLR VLGHTLRASN : 330
RKv3.1 : ILPFYLEVGLSGLS SKAAKDV LGF LRVRFVRI LRIFKLTRHFVGLR VLGHTLRASN : 343
RKv3.2 : ILPFYLEVGLSGLS SKAAKDV LGF LRVRFVRI LRIFKLTRHFVGLR VLGHTLRASN : 380
Traw2 : ILPFYLEVGLSGLS SKAAKDV LGF LRVRFVRI LRIFKLTRHFVGLR VLGHTLKASN : 226

S5 H5
Traw1 : EFLLLLIIFLALGVLIFATMIYYAERIGAKPNDBRASEHTHFKNIP IGFWWAVVTMTTL : 388
RKv3.1 : EFLLLLIIFLALGVLIFATMIYYAERIGAOPNDBSASEHTHFKNIP IGFWWAVVTMTTL : 401
RKv3.2 : EFLLLLIIFLALGVLIFATMIYYAERVGAOPNDBSASEHTHFKNIP IGFWWAVVTMTTL : 438
Traw2 : EFLLLLIIFLALGVLIFATMIYYAERIGANPNDBTAGEHTHFKNIP IGFWWAVV----- : 279

```

```

                                     S6
Traw1 : GYGDMYPQTWSGMLV GALCALAGVLTIAMPVPVIVNNFGMYYSLAMAKQKLPKKKKNKH : 446
RKv3.1 : GYGDMYPQTWSGMLV GALCALAGVLTIAMPVPVIVNNFGMYYSLAMAKQKLPKKKKNKH : 459
RKv3.2 : GYGDMYPQTWSGMLV GALCALAGVLTIAMPVPVIVNNFGMYYSLAMAKQKLPKRKKNKH : 496
Traw2 : ----- : -

Traw1 : IPRAPLLGSPNYCKSEVTSPHHSTQDDTWPLAPQEPPEEITLEVNRAAPQAVFQDPKVN : 504
RKv3.1 : IPRPPQLGSPNYCKSVVNSPHHSTQSDTCPLAQ-----EETLEINRA-----DSKLN : 506
RKv3.2 : IPPAPLASSPTFCCKTELNMACNSTQSDTC-LGK---ENRLLIEHNR-----SVILS : 541
Traw2 : ----- : -

# # # # #
Traw1 : GETPKESAKRAAKESAKESAKESAKEAEKAALANEDCPHIDQIMSPDDGQILSPIDRS : 562
RKv3.1 : GEVAK-----AALANEDCPHIDQALTPDEGLPFTRSGTR : 540
RKv3.2 : GD-----DSTGSEPPPLSPPERLP IRRSSTR : 566
Traw2 : ----- : -

Traw1 : EQQ---PCFLLAMGGRPGHTAARVRKGTSR----- : 589
RKv3.1 : ERYG---PCFLLSTGEYACPPGGGMRKDL----- : 566
RKv3.2 : DKNRRGETCFLLTTGDTCASDGGIRKDNCKDVVITGYTQAEARSLT----- : 613
Traw2 : ----- : -

```

Abb. 4: Sequenzvergleich der vorhergesagten AS-Sequenzen von Traw1 und Traw2 mit Kv3.1 und Kv3.2 der Ratte. Die putativen Transmembrandomänen S1-S6 und die Porenregion H5 sind durch rote Kästen hervorgehoben. Potentielle N-Glykosylierungsstellen sind mit (*) und PKC-Phosphorylierungsstellen mit (#) gekennzeichnet. GenBank Zugangsnummern: RKv3.1 M68880, RKv3.2 22803, Traw1 AF223409, Traw2 AF223410.

3.1.2 Tsha3

Die Klonierung der kompletten kodierenden DNA-Sequenz des *Shaker*-Subtyp-Kaliumkanals Tsha3 erfolgte über eine modifizierte PCR-RACE-Strategie in Kombination mit einer inversen PCR. Ausgehend von der Sequenz eines PCR-Fragmentes, welches einen Teil der phylogenetisch konservierten Kernregion, von der T1-Domäne bis zur Porenregion, beinhaltete (Ritz, 1997), wurde eine erste 3'-RACE-PCR mit dem Primer Tsha3v2 und dem Oligo-dT-Ankerprimer an cDNA aus dem Forellenhirn durchgeführt. Aus dem Reaktionsgemisch wurden die DNA-Fragmente welche für Kaliumkanäle kodieren, mit Hilfe des biotinylierten, kaliumkanalselektiven Primers Chan, über magnetische Separation an Streptavidin-gekoppelte magnetische Kügelchen, angereichert. Das Eluat aus dieser Reaktion wurde in einer zweiten Runde der 3'-RACE-PCR (Primer: Tsha3v3/ Oligo-dT-Ankerprimer) eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, der Größenbereich von 1,3-6 kb aus dem Gel eluiert und in den Vektor pGEMTeasy ligiert. Die daraus resultierende cDNA-Minibibliothek wurde in *E. coli* DH5 α transformiert und die Transformanten einem Kolonie-Screening mit einer DIG-markierten DNA-Sonde (Primer Tsha3v3/TshaS3r) unterzogen. Es konnten 30 positive Klone detektiert werden. Aus sechs Klonen wurde die Plasmid-DNA präpariert, mit Restriktionsspaltung analysiert und sequenziert. Es zeigte sich, daß alle sechs Klone identisch waren.

Die Sequenz von Tsha3 konnte mit Datenbankvergleichen eindeutig der *Shaker*-Subfamilie zugeordnet werden (Ritz, 1997). Alle bisher bekannten Shaker-Kaliumkanäle der Forelle, wie auch die der Säugern, liegen im Genom intronlos vor (Nguyen et al., 2000, Chandy et al., 1990). Deshalb war ein genomischer Ansatz sehr vielversprechend, um die fehlende Sequenzinformation über den 5'-Bereich dieses Kanals zu finden.

Genomische DNA aus der Leber der Forelle wurde mit *PstI* gespalten und elektrophoretisch in einem 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt. Die DNA von 2-10 kb wurde in 1 kb-Abständen größenfraktioniert aus dem Gel eluiert. Die gDNA-Fragmente wurden durch intramolekulare Ligation zirkularisiert und in einer ersten PCR-Runde mit den Primern Tsha3v4/Tsha3r eingesetzt. An den PCR-Produkten wurde gleich im Anschluß eine zweite PCR durchgeführt (Primer: Tsha3r2/Tsha3v5). Die Analyse der PCR-Produkte auf einem Agarosegel ergab, daß die rezirkularisierte gDNA der Größenbereiche 2,5-3 kb und 3-4 kb nach zwei PCR-Runden eine scharfe, sehr deutliche Bande bei 2,2 kb lieferte. Diese Bande wurde aus dem Gel eluiert, mit PCR überprüft und in pGEMTeasy kloniert. Alle getesteten Klone trugen das gleiche Insert, welches in der Sequenzanalyse in den überlappenden Bereichen mit dem bereits bekannten Fragment von Tsha3 identisch war.

Die cDNA-Sequenzen aus den 5'- und 3'-Regionen von Tsha3 konnten mit dem initialen Fragment von Tsha3 zur Überlappung gebracht und zu einer 2714 bp umfassenden Sequenz vervollständigt werden. Der größte offene Leserahmen betrug innerhalb dieser Sequenz 1696 bp, der für 566 davon abgeleiteten Aminosäuren kodiert. Zur Verifikation dieser Sequenz wurde eine RT-PCR an Forellenhirn-mRNA mit den sequenzspezifischen Primern T3gneuv2 und Tsha3gr durchgeführt, um den gesamten kodierenden Bereich des Tsha3-Proteins zu amplifizieren. Die resultierende 1,7 kb-Bande (Abb. 5) wurde kloniert und sequenziert. Die Sequenzierung der Bande zeigte die Identität mit der zuvor aus den Fragmenten vorhergesagten Sequenz. Die niedermolekularen Banden (Abb. 5) wurden nicht untersucht.

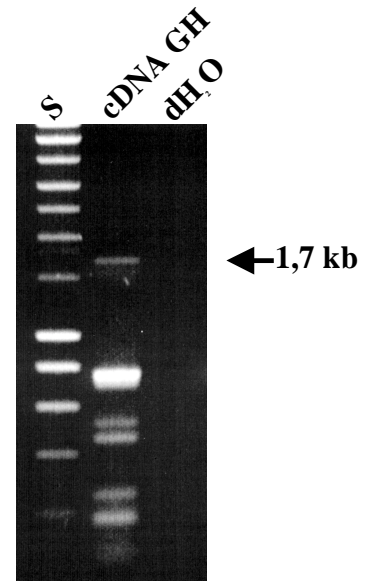


Abb. 5: Nachweis des Tsha3-Transkriptes in Gesamthirn (GH)-cDNA der Forelle mit PCR. Die Kontrollreaktion wurde in dH₂O durchgeführt. S: Smart-Ladder-Standard. Primer: T3gneuv2/Tsha3gr. Annealingtemperatur: 60 °C.

3.1.2.1 Tsha3-Sequenzanalyse

Die von der cDNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz besitzt viele primärstrukturelle Eigenschaften, die eine Zuordnung dieses Kanals in die *Shaker*-Subfamilie der spannungsaktivierten Kaliumkanäle zulassen (Abb. 6). Die durch Sekundärstrukturvorhersage postulierte Transmembrantopologie mit 6 Transmembranhelices S1-S6 und einer hydrophoben Porenregion zeigt die Zuordnung von Tsha3 in die 6TM-Kanalsuperfamilie. Tsha3 weist in dieser Kernregion eine sehr hohe Ähnlichkeit mit den beiden bereits bekannten Mitgliedern der *Shaker*-Subfamilie der Forelle, Tsha1 (70 %) und Tsha2 (67 %), auf. Betrachtet man den N-Terminus von Tsha3 fällt die große Identität der Aminosäuren 127-232 (74 % Tsha1, 68 % Tsha2) mit einem Strukturmotiv auf, welches als Tetramerisierungsdomäne T1 bezeichnet wird. Im Vergleich zu Tsha1 und Tsha2 ist der N-terminale Bereich deutlich länger, enthält jedoch keine Anhäufung positiv geladener Aminosäurereste, die auf das Strukturmotiv eines Inaktivierungsballes hindeuten. Der C-Terminus ist relativ kurz im Verhältnis zu den C-terminalen Bereichen von Tsha1 und Tsha2. Im Gegensatz zu diesen

beiden Kanälen findet man außerdem kein PDZ-Bindungsmotiv (LTDV) innerhalb der letzten 4 Aminosäuren, welches die Bindung zu Proteinen mit sogenannten PDZ-Domänen vermitteln kann (Nguyen et al., 2000). Ein Datenbankvergleich der gesamten AS-Sequenz von Tsha 3 liefert die höchste Anzahl von Aminosäure-Identitäten ausschließlich mit Kaliumkanälen der *Shaker*-Familie, während hier besonders die Homologie zu dem erst kürzlich beschriebenen Kanal KCNA10 hervorsteicht. Dieser Kaliumkanal ist interessanterweise sowohl spannungsabhängig, als auch pharmakologisch mit den *CNG*-Kanälen vergleichbar (Yao et al., 1995; Lang et al., 2000). Die Aminosäure-Identität von Tsha3 zum KCNA10 des Menschen (HKCNA10) liegt mit 59 % deutlich über dem Vergleichswert zu Tsha1 (50 %) und Tsha2 (48 %). Bei allen Primärsequenzvergleichen fällt außerdem auf, daß keine dem C-Terminus von Tsha3 verwandten Proteinsequenzen in der Datenbank zu finden sind, d.h. auch nicht die in HKCNA10 dort postulierte cGMP-Bindestelle.

Das Transmembransegment S4 enthält die für Kv1-Kanäle typische siebenfache Wiederholung des AS-Sequenzmotives R/K-X-X (X entspricht einem hydrophoben Aminosäurerest). In den ersten 4 Motiven findet man in *Shaker*-Kanälen immer ein Arginin, gefolgt von zwei Lysin und einem weiteren Arginin. Die Transmembransegmente S2, S3 und S5 enthalten mit den Aminosäuren E322, E332, D355, E369 und E446 weitere geladene Reste an konservierten Positionen. Die genannten geladenen Aminosäuren liefern in *Shaker*-Kanälen wichtige Beiträge zur spannungsabhängigen Aktivierung (Papazian, 1999).

Im Gegensatz zu bereits bekannten *Shaker*-Kanälen sind innerhalb der Tetramerisierungsdomäne T1 von Tsha3 Aminosäuren an Positionen ausgetauscht, die eigentlich spezifisch konserviert sind (M107, E171, K175) (Jan & Jan, 1992), da sie bei der Oligomerisierung spezifische Kontaktstellen zwischen den T1-Domänen ausbilden.

In der variablen äußeren Porenregion ist die Position 477, welcher eine entscheidende Rolle bezüglich der TEA-Sensitivität zukommt, mit einem Cystein besetzt. Diese Tatsache gibt Anlaß zu der Vermutung, daß Tsha3 durch TEA blockierbar ist. Pharmakologisch interessant sind außerdem die Positionen P448 und Q449, da an diesen Stellen die Sensitivität von Tsha3 gegenüber α -Dendrotoxin determiniert ist (Hurst et al., 1991). Tsha3 sollte deshalb nicht von α -Dendrotoxin blockiert werden.

```

Tsha3      : -----MEVPLVNFENMDDIGINMGDPSESGYPTSPTEAVPDQNLVTRVTS : 47
HKCNA10    : MDVCGWKEMEVALVNFNDSDEIQE-----EPGYATDFDSTSP----- : 37
HKv1.2     : MTV----- : 3
Tsha1      : MTV----- : 3
Tsha2      : MTV----- : 3
HKv1.1     : MTV----- : 3

```

```

Tsha3      : QNSAQHRGHQIRHEGFSPYTPHTLTAKGQSRCNSLLSNFKLLMNSGSPIDSI FN : 102
HKCNA10    : -----KGRPGGSSF-SNGKILI-SESTNHETA F S : 64
HKv1.2     : -----ATGDPAD EAAALP : 16
Tsha1      : -----ATGDP SDEAAHP : 16
Tsha2      : -----VSC EIQDETVVVS : 16
HKv1.1     : -----MSGENVDEASAP : 16

```

T1

```

Tsha3 : QLVQECRDNEEDLFGETLEVKDGNGKVVINISGMMFETQLKTLQFPDITLLGDDEA : 157
HKCNA10 : KLEGDYADPPGP---EPVVLNEGQRVIINIAGLRFETQLRRTLQFPETLLGDRE : 116
HKv1.2 : GHPQDITYDPEA----D----HECCERVVINISGLRFETQLKTLAQPETLLGDPEK : 63
Tsha1 : GNPAAE-YDPDA----D----HECCERVVINISGLRFETQLKTLQFPDITLLGDPEK : 62
Tsha2 : PLYQDDCDEERG---D----QECSERVVINISGLRFETQLRRTLQFPETLLGDPEK : 64
HKv1.1 : GHPQDGSYPRQADHDD---HECCERVVINISGLRFETQLKTLAQPNTLLGNPK : 67
    
```

V

```

Tsha3 : KRMRYFDPMKNEYFFDRNRPSFDGILYFYQSGGKIRRPVNVPLEIFAKEIVFYKLE : 212
HKCNA10 : KRMQFFDSMRNEYFFDRNRPSFDGILYFYQSGGKIRRPANVPIDIFADEISFYEL : 171
HKv1.2 : KRMRYFDPLRNEYFFDRNRPSFDAILYFYQSGGRLRRPVNVPLDIFSEEIRFYEL : 118
Tsha1 : KRMRYFDPLRNEYFFDRNRPSFDAILYFYQSGGRLRRPANVTLDIFSEEIRFYEL : 117
Tsha2 : KRMRFDPPLRNEYFFDRNRPSFDAILYFYQSGGKLRRPVNVPLDIFMEEMTFYEL : 119
HKv1.1 : KRMRYFDPLRNEYFFDRNRPSFDAILYFYQSGGRLRRPVNVPLDMFSEEIKFYEL : 122
    
```

⊕ S1

```

Tsha3 : GKEAMEQFREIEGFITTEPEELLPITNEVHKQFVLLFEYPESSSAARSVALVSVGVI : 267
HKCNA10 : GSEAMDQFREDEGFIKDPETLLPITNDIHRQFVLLFEYPESSSAARAVAVVSVLVV : 226
HKv1.2 : GSEAMEMFREDEGYIKBEERPLPENEFQROVWLLFEYPESSGPARIIAIVSVMVI : 173
Tsha1 : GDEAIELFREDEGFVKEBERPLPDNEFQROVWLLFEYPESSGPARIIAIVSVMVI : 172
Tsha2 : EBEAIDMFKEDEGMTIEVERAMPDNEFQROVWLLFEYPESSGPARIIAVVSVVI : 174
HKv1.1 : GSEAMEKFREDEGFIKBEERPLPEKEYQROVWLLFEYPESSGPARVIAIVSVMVI : 177
    
```

* S2

```

Tsha3 : VISITIFFCLETLPEFRDDVDFITTFSLGLNGTQEGPASVQNNLFAYFTDPEFFIVE : 322
HKCNA10 : VISITIFFCLETLPEFREDELKVVDPNLNMSKTVLSQTM-----FTDPEFFMVE : 275
HKv1.2 : LISIVSFCLETLPIFRDENEDMHGSGVTFHTYSNSTIGYQOS--TSFTDPEFFIVE : 226
Tsha1 : LISIVSFCLETLPIFRNDDDEPHS---VFDTNTNTI-YFTS--TYFTDPEFFILE : 221
Tsha2 : VISIVIFFCLETLPOFREDTSANLP--LSNHHTTNGTTLHKKP--NLFTDPEFFMVE : 225
HKv1.1 : LISIVIFFCLETLPELKDDKDFTG---TVHRIDNTIVIY-NS--NIFTDPEFFIVE : 225
    
```

⊕ S3

```

Tsha3 : TFCIVWFCFELGVRFVVCPSKSDFFHNMNIIDIVSIIIPYFVTMVTTELWITPDTD : 377
HKCNA10 : STCIVWFTFELVLRVFCPSKIDFFRNIMNIIDIIISIIIPYFATLITEL--VQETE : 328
HKv1.2 : TFCIIWFSFELVRLFFA CPSKAGFFTNIMNIIDIVAIIPYFITLGLTELAEKPEDA : 281
Tsha1 : TFCIIWFSFELVRLFFA CPSKSGFFGNVMNIIDVVAIIPYFITLATELAEKPEDG : 276
Tsha2 : TFCIVWFSFELVRLFLS CPSKPAFFKNAMNSIDILAIAPYFITLGLTELAEQQEAG : 280
HKv1.1 : TFCIIWFSFELVVRFFA CPSKIDFFKNIMNEFIDIVAIIPYFITLGLTEIAEQ-EGN : 279
    
```

⊕ # # S5

```

Tsha3 : INSSQNMSTAILRIIRLVRFVFRIFKLSRHSGLQILGQTLKASMRELGLLIFFFLE : 432
HKCNA10 : PSAQNMSTAILRIIRLVRFVFRIFKLSRHSGLQILGQTLKASMRELGLLIFFFLE : 383
HKv1.2 : QQGQAMSTAILRVIRLVRFVFRIFKLSRHSGLQILGQTLKASMRELGLLIFFFLE : 336
Tsha1 : QAGQAMSTAILRVIRLVRFVFRIFKLSRHSGLQILGQTLKASMRELGLLIFFFLE : 331
Tsha2 : S--EQAMSTAILRVIRLVRFVFRIFKLSRHSGLQILGQTLHASISELGLLIFFFLE : 333
HKv1.1 : QKCEQATSTAILRVIRLVRFVFRIFKLSRHSGLQILGQTLKASMRELGLLIFFFLE : 334
    
```

H5 S6

```

Tsha3 : IGVILFSSAVYFAEVDEPOTQFVSI PDGFWWAVVTMTTVGYGDMCPITLGGKIVG : 487
HKCNA10 : IGVILFSSAVYFAEVDEBESHFSSIPDGFWWAVVTMTTVGYGDMCPITPGGKIVG : 438
HKv1.2 : IGVILFSSAVYFAEADERESQFSPDADFWWAVVSMTTVGYGDMVPTITGGKIVG : 391
Tsha1 : IGVILFSSAVYFAEADDEBSQFSSIPDAFWWAVVSMTTVGYGDMVPTITGGKIVG : 386
Tsha2 : IGVILFSSAVYFAEADDEBSQFSSIPDAFWWAVVSMTTVGYGDMCPVITGGKIVG : 388
HKv1.1 : IGVILFSSAVYFAEAEAESESHFSSIPDAFWWAVVSMTTVGYGDMVPTITGGKIVG : 389
    
```

```

Tsha3      : TLCAIAGVLT IALPVPVIVSNFN*YFYHRETEQAEKQV IDDATEAAQKVSDANRYE : 542
HKCNA10   : TLCAIAGVLT IALPVPVIVSNFN*YFYHRETEENEKQNI*PGEIERI-----LNSVG : 488
HKv1.2    : SLCAIAGVLT IALPVPVIVSNFN*YFYHRETEGEEQ*QYLOVTS*CPKIPSS*PDLKK : 446
Tsha1     : SLCAIAGVLT IALPVPVIVSNFN*YFYHRETEGEEQ*QCLGPVT--KEDSNEELKK : 439
Tsha2     : SMCAIAGVLT IALPVPVIVSNFN*YFYHRE*RNDEETAVYTHVTCGQONASFG*EFK- : 442
HKv1.1    : SLCAIAGVLT IALPVPVIVSNFN*YFYHRETEGEEQ*QQLLVSS-PNLASDS*DL*SR : 443

Tsha3     : YGSATSP*SMKINGRV*ODDRNDM----- : 565
HKCNA10   : SRMGSTDSL*NKTN*GGCSTEKSRK----- : 511
HKv1.2    : SRSASTISKSDYMEIQEGV*NSNEDFRE*NLKT-ANCT-LANTNYVNITKMLTDV : 499
Tsha1     : SRSGSTISKSDYMEIQEGV*NTIEDIPEENLKTQANCTTLANTNYVNITKMLTDV : 494
Tsha2     : ---STSDSRQSLTKSE*DTEEDSCETIRLTHFNPF*EHYI-----GK-LTDV : 483
HKv1.1    : -RSSSTMSKYEYMEIEEDMNSLAHYRQVNI*RT-ANCTT-ANQNCV*NKSKLLTDV : 495

```

Abb. 6: Sequenzvergleich der vorhergesagten AS-Sequenzen von Tsha3 mit Tsha1, Tsha2, humanem Kv1.1 und Kv1.2. Die putativen Transmembrandomänen S1-S6, die Porenregion H5 und die Tetramerisierungsdomäne T1 sind durch rote Kästen hervorgehoben. Potentielle N-Glykosylierungsstellen sind mit (*), PKC-Phosphorylierungsstellen mit (#), CK2-Phosphorylierungsstellen mit (⊕) und Tyrosinphosphorylierungsstellen mit (✓) gekennzeichnet. GenBank Zugangsnummern: Tsha1 AF252301, Tsha2 AF252302, HKv1.1 NM000217, HKv1.2 NM004974, HKCNA10 NM005549.

3.1.3 SK-Kaliumkanäle

3.1.3.1 TSK2

Zu Beginn dieser Arbeit war keine cDNA-Sequenz eines kalziumaktivierten Kaliumkanals der Forelle bekannt. Zur ersten Klonierung der cDNA eines SK-Kanals wurde ein RT-PCR-Ansatz mit degenerierten Primern an poly(A) -RNA gewählt. Die PCR mit den Primern SK2v/SK6r lieferte in der Agarosegelelektrophorese eine Bande in der erwarteten Größe von ca. 850 bp. Das PCR-Produkt wurde durch Klonierung in pGEMTeasy, Restriktionsspaltung und Sequenzierung analysiert. Ein Vergleich der ermittelten Sequenz des 837 bp-Fragmentes mit Sequenzen der GenBank zeigte die höchste Ähnlichkeit mit dem SK2-Kaliumkanal der Ratte. Aus diesem Grunde wurde der diesem Fragment entsprechende Kaliumkanal TSK2 genannt. Ausgehend von der Kernsequenz wurde eine modifizierte RACE-Technik angewendet, um die fehlenden Sequenzen im 5'- und 3'- Bereich zu klonieren.

Das fehlende 3'-Ende von TSK2 konnte mit einer einzigen RT-PCR an mRNA aus Forellenhirn mit dem Primer SK11v1 und dem Oligo-d(T)-Ankerprimer als 3,1 kb großes Fragment amplifiziert und anschließend kloniert und sequenziert werden.

Um Sequenzinformation über den 5'-Bereich der cDNA von TSK2 zu erhalten, wurde zunächst cDNA aus Forellenhirn-mRNA mit dem Primer SK2r hergestellt und in einer PCR mit dem Oligo-d(T)-Ankerprimer und SK6r eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in einem 1%igen-Agarosegel aufgetrennt und der Größenbereich von 0,5-10 kb aus dem Gel eluiert, um diese anschließend in pGEMTeasy zu ligieren. Diese Mini-cDNA-Bibliothek wurde in *E. coli* DH5α transformiert, gefolgt von einem Kolonie-Screening mit einer DIG-markierten DNA-Sonde (SK11v1/SK6r). Von 10 im Kolonie-Screening positiven Klonen wurde Plasmid-DNA isoliert und mit einer Restriktionsspaltung analysiert. Drei Klone lieferten ein Fragment von 1,3 kb Größe, welches sequenziert wurde.

Die durch das RACE erhaltenen PCR-Fragmente überlappten und konnten zu einer cDNA mit einer Gesamtlänge von 4978 bp zusammengebracht werden. Der größte offene Leserahmen innerhalb dieser cDNA betrug 1635 bp, korrespondierend mit einer abgeleiteten Proteinsequenz von 545 Aminosäuren. Der vorhergesagte kodierende Bereich von TSK2 wurde mit den Primern SKgv3m und SKgr in einer RT-PCR verifiziert. Die Sequenz der resultierenden 1,6 kb-Bande (Abb. 7) war nach Klonierung und Sequenzierung identisch mit der aus den RACE-PCR vorhergesagten Sequenz.

3.1.3.2 TSK3

Um einen weiteren Vertreter der Familie der kalziumaktivierten Kaliumkanäle zu klonieren, wurde ein kombinierter Ansatz aus RT-PCR und RACE-Techniken gewählt. Die initiale RT-PCR an mRNA aus Forellenhirn mit den degenerierten Primern TSK1v und TSK3r lieferte ein DNA-Fragment, der erwarteten Größe von ca. 800 bp. Die Sequenzierung dieses Fragments zeigte im Vergleich mit den Sequenzen der GenBank die größte Ähnlichkeit mit dem SK3-Kaliumkanal der Ratte. Der dem 788 bp-Fragment entsprechende Kaliumkanal der Forelle wurde deshalb TSK3 genannt. Das fehlende 5'-Ende der cDNA von TSK3 wurde mit zwei Runden RACE-PCR ermittelt. In der ersten RACE-PCR-Runde an Forellenhirn-cDNA, hergestellt durch reverse Transkription von mRNA aus Forellenhirn mit dem Primer TSK6r, wurde der Oligo-d(T)-Ankerprimer mit dem Primer TSK8r kombiniert. Der Primer TSK6r wurde in der zweiten Runde durch den Primer TSK7r ersetzt. In der Agarosegelelektrophorese konnte ein 1,2 kb großes Fragment detektiert werden, welches anschließend in pGEMTeasy kloniert und sequenziert wurde.

Um die TSK3-Sequenz am 3'-Ende zu komplettieren, wurde die RACE-Technik mit dem Koloniescreening kombiniert. Die initiale RACE-PCR an cDNA aus dem Forellenhirn wurde mit dem Primer TSK7v und dem Oligo-d(T)-Ankerprimer durchgeführt. Die DNA im Größenbereich von 0,6-6 kb aus diesem PCR-Ansatz wurde aus dem Agarosegel eluiert, in pGEMTeasy ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Das anschließende Koloniescreening mit einer DIG-markierten DNA-Sonde (Primer: TSK7v/6r) lieferte ca. 50 positive Klone. Von 12 Klonen wurde DNA isoliert und per Restriktionsverdau analysiert. Es konnten drei unterschiedliche Inserts der Größe 2,2, 2,1 und 1,1 kb identifiziert werden. Durch Sequenzierung je eines dieser Klone stellte sich heraus, daß diese mit hoher Wahrscheinlichkeit PCR-Artefakte darstellten. Es konnte jedoch im 3'-untranslatierten Bereich (3'-UTR) jedes dieser drei Klone ein ca. 300 bp großer identischer Bereich identifiziert werden. Die PCR mit einem vorwärts gerichteten Primer aus der Kernregion von TSK3 (TSK35v) und einem reversen Primer (TSK38r) aus diesem 3'-Konsensusbereich an cDNA aus Forellenhirn ergab eine 1,8 kb-Bande. Die Klonierung dieser Bande in pGEMTeasy und die anschließende Sequenzierung lieferte den 800 bp langen fehlenden Teil der kodierenden Sequenz von TSK3, sowie den 1 kb langen 3'-UTR.

Die PCR-Fragmente wurden zu einem 3200 bp-cDNA-Fragment zur Überlappung gebracht, das einen offenen Leserahmen von 2256 bp (entsprechend 752 Aminosäuren) beinhaltet. Bis zur Beendigung dieser Arbeit war es noch nicht gelungen den endgültigen Beweis für das

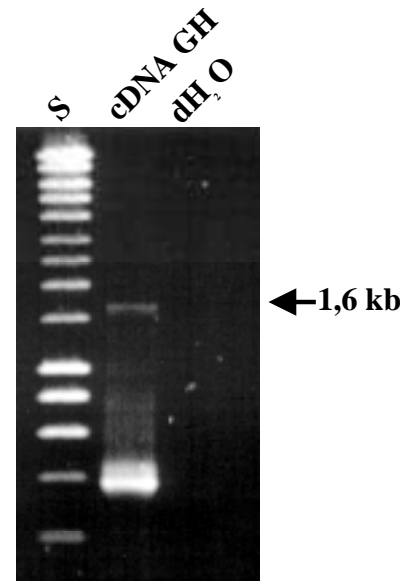


Abb. 7: Nachweis des TSK2-Transkriptes in Gesamthirn (GH)-cDNA der Forelle mit PCR. Die Kontrollreaktion wurde in dH₂O durchgeführt.

S: SmartLadder-Standard.

Primer: SKgv3m/Skgr

Annealingtemperatur: 62 °C.

korrekte Zusammenfügen der überlappenden cDNA-Fragmente in Form eines sequenzierten Vollängenklons zu erbringen. Durch mehrere miteinander überlappende PCR-Runden gelang es jedoch die Kernsequenz zu verifizieren.

3.1.3.3 Sequenzanalyse von TSK2 und TSK3

Die Hydropathieanalyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von TSK2 und TSK3 zeigt ein für Kaliumkanäle der 6-TM-Familie typisches Bild von 7 hydrophoben Bereichen die den vorhergesagten Transmembrandomänen S1-S6 und der zwischen S5 und S6 lokalisierten Porenregion H5 entsprechen. Vergleicht man die TSK-Aminosäuresequenzen mit Datenbanksequenzen, stellt man sehr hohe Ähnlichkeiten dieser beiden Proteine mit den Vertretern der SK-Kaliumkanalsubfamilie fest (Abb. 8).

Die hohen Anzahl identischer Aminosäuren dieser Kanäle im Bereich der Kernregion (Transmembransegmente S1-S6 und die putative Calmodulin-Bindestelle mit den vorhergesagten α -Helices A-B) von 84-93 % sind auffallend und unterstreichen die Einordnung von TSK2 und TSK3 in diese Kaliumkanalfamilie. Die in dieser Kernregion nicht berücksichtigten zytoplasmatischen N- und C-Termini sind durch eine hohe Variabilität gekennzeichnet.

In beiden TSK-Kanälen sind innerhalb der Transmembranhelix S4 drei in allen bekannten Säugerhomologen konservierte Argininreste lokalisiert. Im Gegensatz zu den positiv geladenen Aminosäuren in der S4-Domäne der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle findet man hier allerdings kein regelmäßig wiederkehrendes Motiv.

Der zytoplasmatische C-terminale Teil der TSK-Kanäle enthält den schon erwähnten, konservierten Bereich der Calmodulin-Bindungsstelle, welcher für Kaliumkanäle der SK-Familie charakteristisch ist. Innerhalb dieser Domäne sind die beiden Aminosäuren R433 und K436 (Nummerierung TSK2), welche für die kalziumunabhängige Interaktion mit Calmodulin verantwortlich gemacht werden, in allen Spezies hochkonserviert.

Zwei Aminosäurenreste, ein Aspartat und ein Asparagin, welche sich auf der jeweils gegenüberliegenden Seite der Pore befinden, sind essentiell für die Apamin- und D-Tubocurarin-Sensitivität der SK-Kanäle (Ishii et al., 1997).

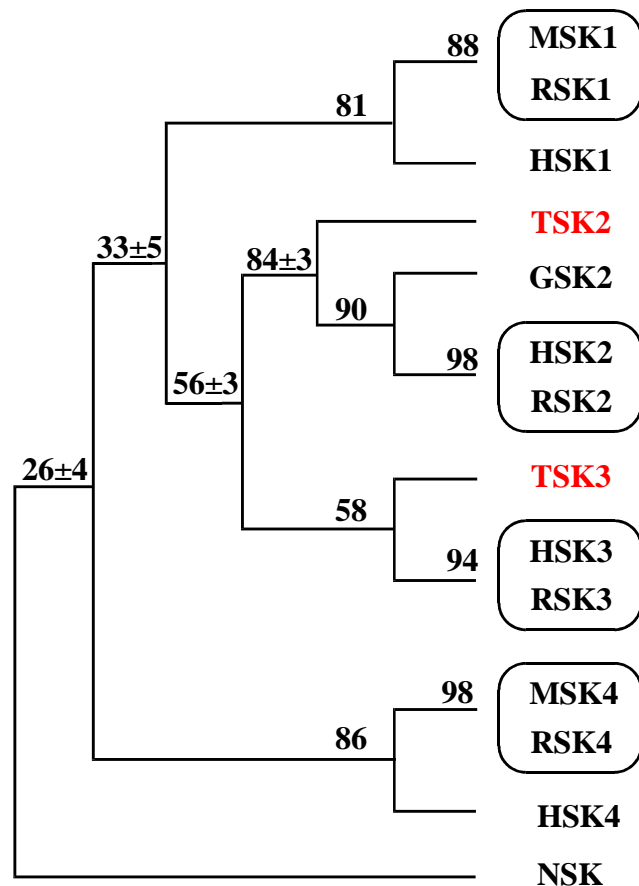


Abb.8: Dendrogramm zur Dokumentation der Verwandtschaftsverhältnisse von TSK2 und TSK3 zu allen bisher bekannten SK-Kanälen unterschiedlicher Spezies. H Mensch, M Maus, R Ratte, G Huhn, N Nematode *C. elegans*. An den Verzweigungspunkten sind in Prozenten die durchschnittlichen paarweisen Aminosäure-Identitäten der jeweiligen Gruppierungen dargestellt. GenBank Zugangsnummern: HSK1 NM002248, RSK1 NM019319, GSK2 AF079372, HSK2 NM021614, RSK2 NM019314, HSK3 002249, RSK3 NM019315, HSK4 NM002250, RSK4 AJ133438, NSK AA80439.

Während in TSK2 das Aspartat und das Asparagin an den Positionen 307, bzw. 334 zu finden ist, wird in TSK3 das Asparagin durch ein Histidin ersetzt. Diese Unterschiede lassen auf eine unterschiedliche Sensitivität der beiden TSK-Kanäle bezüglich Apamin/D-Tubocurarin schließen. Durch die Kombination der Aminosäuren an diesen beiden Stellen im SK-Protein lassen sich die Forellenkanäle exakt dem SK2- bzw. dem SK3-Subtyp zuordnen.

TSK3 hat als einziger bisher bekannter SK-Kanal eine putative N-Glykosylierungsstelle in der extrazellulären Schleife zwischen S1 und S2 am Asparagin 305, welche häufig in spannungsgesteuerten Kaliumkanälen genutzt wird. Des weiteren findet man eine große Anzahl putativer Phosphorylierungsstellen verschiedenster Kinasen (PKC, PKA, CamKII, cAMP/cGMP-PK, CK2), von denen S102, S252, T367, S/T448 und S/T482 in allen Subtypen konserviert sind (Abb. 8).

```

RSK1 : ----- : -
TSK2 : ----- : -
RSK2 : ----- : -
TSK3 : MPKAS-----LPKLEPL----SSVGGQ-----PLPPLPNALHPTSTP----- : 32
RSK3 : MDTSGHFHESGVDLDEDEPKPCPSSGDEQQQQQPPPPSAPPAPVQPPGPLLQP : 56

```

```

RSK1 : ----- : -
TSK2 : ----- : -
RSK2 : ----- : -
TSK3 : -----LSSCLGSQHSLSG-----D : 46
RSK3 : QPPQLQQQQQQQQQQQQQQQQQQQAPLHPLPQLAQLQSQVHPGLLHSSPTAFRAP : 112

```

```

RSK1 : ----- : -
TSK2 : ----- : -
RSK2 : ----- : -
TSK3 : NSPVYNALF-YSSHSPSMERERDRDRERDRDRER-----GCKHRQASPLVHRRDS : 95
RSK3 : NSANSTAILHPSRQGSQNLNLDHLVGHSPSSSTATSGPGGSRHRQASPVVHRRDS : 168

```

```

RSK1 : ----- : 36
TSK2 : ----- : 36
RSK2 : ----- : 36
TSK3 : NPFTEIAMSSCKYTGGVMKPLSRLSASDATLSNQTAAATPKRAGQHLLPAQLPLEG : 151
RSK3 : NPFTEIAMSSCKYSGGVMKPLNRLSASRRNLIIEAEPEGQPLQL : 211

```

```

RSK1 : -----TQGPGLQMA : 46
TSK2 : -----ISTADASDTLASKPE-NNST : 55
RSK2 : -----PASVVGGGGASSPSAAAASSSAPEIVVSKPEHNNSN : 74
TSK3 : GTGTERLHPLPILAILQSTNPESRSDSPSSKEDSPYARGYDITDSSSNQMSIYHQ : 207
RSK3 : -----FSPSNPPEIIISRED----- : 227

```

```

RSK1 : KGQPAGLSPSGPRGHSQAQEEE-----EEEEDEDRPGSGKPPVSH : 87
TSK2 : TLMPYASGDGG-----GGCNSGSKSGKKKNQNICQ : 86
RSK2 : NLALYGTGGGGSTGGGGGGG-----GGGSGHGSSSGTKSSKKKNQNICY : 120
TSK3 : NHALVGSREGLSSAGGTGGGVGGSRQGGVGVGAVGPRGSCSKASSKRKNQNICY : 263
RSK3 : NHAHQTLHHPNATHN-----HQHAGTTA-----GSTTFPKANKRKNQNICY : 269

```

⌘
S1 * S2

RSK1 : RLGHRRALFEKRRKRLSDYALIFGMFGIVVMVIEETE LSWG VYKESLCSFALKCLIS : 143
 TSK2 : RLGHRRALFEKRRKRLSDYALIFGMFEIVVMVIEETE LSWGAYGKESLYSLALKCLIS : 142
 RSK2 : RLGHRRALFEKRRKRLSDYALIFGMFGIVVMVIEETE LSWGAYDKASLYSLALKCLIS : 176
 TSK3 : RLGHRRALFEKRRKRLSDYALIFGMFGIVVMVIEETE LSWG VYNKSMYSLALKCLIS : 319
 RSK3 : RLGHRRALFEKRRKRLSDYALIFGMFGIVVMVIEETE LSWG LYSKDSMFSLALKCLIS : 325

S3

RSK1 : LSTVILLGLVILYHAREIQLELV DNGADDWRIAMTWERVSLISLELAVCAIHPVPG : 199
 TSK2 : LSTIILLGLVILYHAREIQLELV DNGADDWRIAMTYERIFFICLEILVCAIHPVPG : 198
 RSK2 : LSTIILLGLVILYHAREIQLELV DNGADDWRIAMTYERIFFICLEILVCAIHPVPG : 232
 TSK3 : LSTVILLGLI IAYHAREVOLFVIDNGADDWRIAMTLNRVLLISLELLVSAVHPVPG : 375
 RSK3 : LSTIILLGLI IAYHTREVOLFVIDNGADDWRIAMTYERILYISLEMLVCAIHPVPG : 381

* S4 #

RSK1 : HYRFTWTARLAFSLVPSAAEADVDVLLSIPMFLRLYL IARVMLLHSCRIFTDASSRS : 255
 TSK2 : NYTFTWTARLAFSYTPSKTDADVDIILSIPMFLRLYL IARVMLLHSKLFTDASSRS : 254
 RSK2 : NYTFTWTARLAFSYAPSIITADVDIILSIPMFLRLYL IARVMLLHSKLFTDASSRS : 288
 TSK3 : DFKFQWRARLAFSYAPSOAEADLDMLSVPMFLRLYL IARVMLLHSKLFTDASSRS : 431
 RSK3 : EYKFFWTARLAFSYTPSRABADVDIILSIPMFLRLYL IARVMLLHSKLFTDASSRS : 437

S5

RSK1 : IGALNRVTFNTRFVTKTIMTICPGTVLLVFSISSWIVAAWTVRVCERYHDKQEVTS : 311
 TSK2 : IGALNKINFNTRFVMKTI MTICPGTVLLVFTISLWIIAAWTVRACERYHDNMDIITS : 310
 RSK2 : IGALNKINFNTRFVMKTI MTICPGTVLLVFSISLWIIAAWTVRACERYHDQODVTS : 344
 TSK3 : IGALNKVHFNTRFVMKTI MTICPGTVLLVFSISLWIIAAWTVRVCERYHDAQDVTS : 487
 RSK3 : IGALNKINFNTRFVMKTI MTICPGTVLLVFSISLWIIAAWTVRVCERYHDQODVTS : 493

H5 S6

RSK1 : NFI GAMWLISITFLSIGYGDMPHTYCGKGVCLLTGIMGAGCTALVVAVVARKLEL : 367
 TSK2 : NFI GAMWLISITFLSIGYGDMPNTYCGKGVCLLTGIMGAGCTALVVAVVARKLEL : 366
 RSK2 : NFI GAMWLISITFLSIGYGDMPNTYCGKGVCLLTGIMGAGCTALVVAVVARKLEL : 400
 TSK3 : NFI GAMWLISITFLSIGYGDMPHTYCGKGVCLLTGIMGAGCTALVVAVVARKLEL : 543
 RSK3 : NFI GAMWLISITFLSIGYGDMPHTYCGKGVCLLTGIMGAGCTALVVAVVARKLEL : 549

⊕

RSK1 : TKAEKHVHNFMMDTQLTKRVKNAAANVLRETWLIYKHTRLVKKPDQSRVRKHQRKF : 423
 TSK2 : TKAEKHVHNFMMDAQLTKRVKNAAANVLRETWLIYKNTKLVKMDHARVRKHQRKF : 422
 RSK2 : TKAEKHVHNFMMDTQLTKRVKNAAANVLRETWLIYKNTKLVKKTIDHAKVRKHQRKF : 456
 TSK3 : TKAEKHVHNFMMDTQLTKRJKNAAANVLRETWLIYKHTKLQKKIDHSRVRKHQRKF : 599
 RSK3 : TKAEKHVHNFMMDTQLTKRJKNAAANVLRETWLIYKHTKLLKKTIDHAKVRKHQRKF : 605

⌘ ⊕

RSK1 : LQATHQAKLRITVKIEQGVNDQANTLADLAKAQS IAYEVVSELQAQQEELEARLA : 479
 TSK2 : LQATHQARKLRSVKMEQRKLNQANS LVDLAKTONIMYDLISDLNERGEDMEKRIA : 478
 RSK2 : LQATHQ --- LRSVKMEQRKLNQANTLVDLAKTONIMYDMISDLNERSEDFEKRIV : 509
 TSK3 : LQATHQ --- LRSVKMEQRKLSQANTLVDLSKMQSVMYELMSELNDRSEDLERQML : 652
 RSK3 : LQATHQ --- LRGVKMEQRKLSQANTLVDLSKMQNVMYDLITELNDRSEDLKQIG : 658

```

                                     #
                                     ⌘
RSK1 : ALESRLDVLGASLQALPSLTAQAICPLPPPW-----PGPSHLTTAAQSPQSHWLP : 529
TSK2 : MLETKLETLLGNLQALPGLISQVISQHRDFLEVQLQPYDKH---SPERSQSVSRR : 531
RSK2 : TLETKLETLLIGSIHALPGLISQIRQORDFIETOMENYDKHVTYNAERSRSSRR : 565
TSK3 : SLETRVEQLTAGFSALPAHLSATLSAHTTLLHLLRERDYRGGGWGGELHVEEGQP : 708
RSK3 : SLESKLEHLLTASFNSLPLLTADTLRQOQQLLT-----AFVEARG : 698

                                     #⌘
                                     ⌘
RSK1 : TTASDCG----- : 536
TSK2 : R-----SSSTAPPTSSESS----- : 545
RSK2 : RR-----SSSTAPPTSSESS----- : 580
TSK3 : WSLLLSLAPAHALTPSPNLAPPEPQQPPEGTIEGSTSENTSTSSC----- : 752
RSK3 : ISVAVG-----TSHAPPSDSEIGISSTSFPTEYTSSSSC----- : 732

```

Abb. 9: Sequenzvergleich der vorhergesagten AS-Sequenzen von TSK2 und TSK3 mit SK1, SK2 und SK3 der Ratte. Die putativen Transmembrandomänen S1-S6 und die Porenregion H5 sind durch rote Kästen hervorgehoben. Potentielle N-Glykosylierungsstellen (*), PKA-Phosphorylierungsstellen (‡), PKC-Phosphorylierungsstellen (#), CK2-Phosphorylierungsstellen (⊕) und CamKII-Phosphorylierungsstellen (⌘) sind oberhalb der Sequenz markiert. Alle Stellen, die sich auf TSK2 beziehen sind blau, TSK3 orange und Stellen, die beide TSK-Kanäle betreffen, schwarz markiert. GenBank Zugangsnummern: RSK1 NM019313, RSK2 NM019314, RSK3 NM019315.

3.1.4 TBK

Kalziumaktivierte Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit (BK-Kanäle) spielen eine wesentliche Rolle bei der Repolarisation von Aktionspotentialen (Jin et al., 2000) und sind deshalb von großem Interesse. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war kein Kaliumkanal dieser Subfamilie von Fischen bekannt.

Um Sequenzinformationen über mindestens einen Vertreter dieser Familie zu erhalten, wurde die RT-PCR eingesetzt. Die initiale PCR mit degenerierten Primern gegen konservierte Regionen von BK-Kanälen anderer Spezies (Maxi1v/Maxi4r) lieferte in der Agarosegelelektrophorese eine 2,2 kb große Bande. Nach der Klonierung in pGEMTeasy und Sequenzierung konnte im Vergleich mit Sequenzen der GenBank eine hohe Ähnlichkeit mit BK-Kanälen anderer Spezies identifiziert werden. Der dem PCR-Fragment entsprechende Kaliumkanal wurde aus diesem Grunde TBK1 genannt.

Das fehlende 5'-Ende von TBK1 wurde mit Hilfe der RACE-Technik kloniert. An das 5'-Ende der vollständigen mRNA aus dem Hirn der Forelle wurde ein RNA-Adapterprimer ligiert und anschließend durch reverse Transkription mit *Random-Decameren* aus dieser RNA cDNA synthetisiert. In einer ersten PCR Runde wurden der Ankerprimer zusammen mit dem genspezifischen Primer Maxi12r eingesetzt, der in der zweiten Runde durch den Primer Maxi21r ersetzt wurde. Es konnte in der Agarosegelelektrophorese eine 380 bp große Bande detektiert werden, welche in pGEMTeasy kloniert und sequenziert wurde. In den überlappenden Bereichen zeigte die Sequenz eine 100%ige Übereinstimmung mit der bereits vorhandenen Sequenz.

Das 3'-RACE lieferte für dem TBK1-Kanal keine befriedigenden Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde der fehlende Teil der kodierenden Sequenz mit einem genspezifischen Primer und einem degenerierten Primer, der das Ende der kodierenden Sequenz der meisten BK-Kanäle beinhaltet, in einer PCR-Reaktion an cDNA aus dem Forellenhirn amplifiziert. Das resultierende 1,5 kb große Amplifikat konnte in pGEMTeasy kloniert und sequenziert werden.

Die drei verschiedenen cDNA Fragmente konnten zu einer 3840 bp langen Gesamtsequenz zusammengefügt werden, die eine offenen Leserahmen von 3657 bp, entsprechend 1219 davon abgeleiteten Aminosäuren, beinhaltet. Zur Verifikation der Sequenz von TBK1 wurde eine RT-PCR an mRNA aus dem Forellenhirn mit Primern, die den kodierenden Bereich umschließen (Maxigv3/gr2), durchgeführt. Diese PCR lieferte nach großen Schwierigkeiten ein 3,5 kb großes Fragment, welches kloniert und sequenziert wurde (Abb. 10). Überraschenderweise zeigte die resultierende Sequenz jedoch nur 91 % Sequenzähnlichkeit mit der vorhergesagten TBK1-Sequenz und wurde daraufhin TBK2 genannt. Die entscheidenden Unterschiede zwischen TBK1 und TBK2 waren allerdings Sequenzeinschübe bei TBK1 an Positionen, die in anderen Spezies zum alternativen Spleißen genutzt werden. Der TBK2-Kanal zeigte zusätzlich noch einzelne Aminosäuresubstitutionen. In anderen Spezies wird der BK-Kanal nur von einem Gen kodiert (Wallner et al., 1999). Deshalb ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, daß auch in der Forelle die Varianten durch alternatives Spleißen gebildet werden. Folglich konnte mit diesem Experiment die Authentizität der TBK1-Sequenz nicht widerlegt werden, da nur die entsprechende TBK-Spleißvariante möglicherweise nicht kloniert werden konnte.

Nach diesem Hinweis auf ein mögliches alternatives Spleißen im TBK1-Gen wurde gezielt mit einem RT-PCR-Ansatz nach weiteren Isoformen an einer Stelle in TBK1 gesucht, in der dieser Kanal einen 58 AS-Einschub gegenüber TBK2 besitzt (Primer Maxi23v/24r). Auf diese Weise gelang es, zwei weitere Varianten von TBK zu klonieren (Abb. 11).

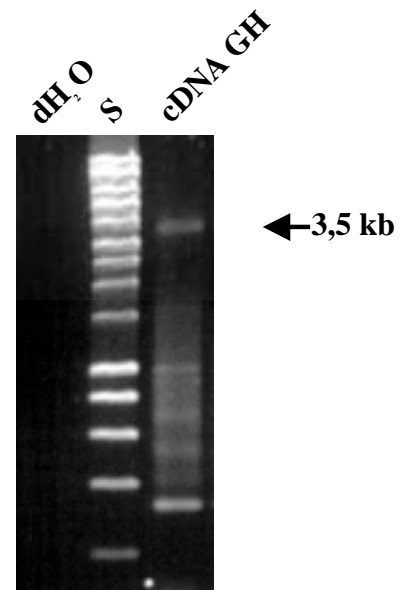


Abb. 10: Nachweis des TBK2-Transkriptes in Gesamthirn (GH)-cDNA der Forelle mit PCR. Die Kontrollreaktion wurde in dH₂O durchgeführt.

S: SmartLadder-Standard.

Primer: SKgv3m/Skgr

Annealingtemperatur: 64 °C.

SP2

TBK1	:	KKCGCKRLIY SKMSAYQMKLACCFDCGRSERDCSCMSGSVHSN	:	44
TBK1-2	:	KKCGCKRLIY SEGAT-TPGK-T-----G-SQK--E--TG-V---	:	28
TBK2	:	KKCGCKRLIY -----	:	10
TBK1-8	:	KKCGCKRL -----	:	8
TBK1	:	MDTLQRAYPLSSVSVHDCATTLRAF FEDEHPSTLSPKKKQ RNGGM	:	88
TBK1-2	:	-----R-F--KA----DCN--L-V- FEDEHPSTLSPKKKQ RNGGM	:	56
TBK2	:	----- FEDEHPSTLSPKKKQ RNGGM	:	30
TBK1-8	:	----- FEDEHPSTLSPKKKQ RNGGM	:	27

Abb. 11: Sequenzvergleich verschiedener möglicher Spleißvarianten von TBK1. TBK1-2 und -8 wurden per RT-PCR nachträglich kloniert. Die Nummerierung der AS beginnt bei 628 (TBK-1), bzw. 632 (TBK-2).

3.1.4.1 Primärsequenzanalyse von TBK

Die Primärsequenz der in dieser Arbeit klonierten Mitglieder der BK-Familie aus dem Forellenhirn zeigt die für die α -Untereinheiten dieser Kaliumkanäle charakteristischen Merkmale. Die Sekundärstrukturvorhersage zeigt die für Kaliumkanäle der 6TM-Superfamilie vorhergesagte Transmembrantopologie mit 6 membrandurchspannenden Helices S1-S6 und der zwischen S5 und S6 lokalisierten Porenregion H5, mit ihrer typischen Porensignatur. Hydropathievorhersagen der BK-Kanäle legen die Vermutung nahe, daß 5 weitere hydrophobe Segmente die Membran durchspannen könnten, eines am N-Terminus (S0) und vier am C-Terminus (S7-S10). Bei den Orthologen des Menschen und von *Drosophila* gezeigt werden, daß S0 eine zusätzliche Transmembranregion darstellt, während S7-S10 mit hoher Wahrscheinlichkeit zytoplasmatisch lokalisiert sind (Wallner et al. 1996, Meera et al., 1997). Die Ca^{2+} -Sensitivität wird in einem hoch konservierten Bereich des C-Terminus determiniert: In der sogenannten *Calcium-bowl*, in TBK-1 durch die AS 944-968 repräsentiert, ist nur die Position 950 (TBK1) in allen bisher bekannten BK-Kanälen variabel (Schreiber & Salkoff, 1997). Zusammen mit der direkt folgenden konservierten S10-Domäne bildet die *Calcium-bowl* den Ort der Ca^{2+} -Sensitivität (Schreiber et al., 1999).

TBK1 und TBK2 weisen in den Transmembransegmenten S3, S4 und S5 geladene Aminosäurereste (D188, R209, R212, R215, E259) auf, die sowohl in der Familie der spannungsgesteuerte Kaliumkanäle als auch in der BK-Familie hochkonserviert sind. Dieser Sachverhalt legt die Vermutung nahe, daß die Kaliumkanäle der BK-Familie einen intrinsischen Spannungssensor tragen (Wallner et al., 1999, Papazian, 1999).

In den TBK-Proteinen ist die Position 296 mit einem Tyrosinrest besetzt, der für die in bisher allen elektrophysiologisch charakterisierten BK-Kanälen gefundene TEA-Sensitivität essentiell ist. Aus dieser Tatsache heraus läßt sich ableiten, daß die Porenarchitektur der BK-Kanäle denen der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle sehr ähnlich ist, da in den Kv-Kanälen eine äquivalente Position die TEA-Sensitivität determiniert.

BK-Kanäle besitzen eine Vielzahl putativer Phosphorylierungsstellen für unterschiedlichste Kinasen. Ein in vielen Proteinen dieser Familie konserviertes Serin an der Aminosäureposition 933 (TBK1) ist Bestandteil einer Erkennungssequenz der Proteinkinase A (PKA). Durch Mutationsanalyse konnte bewiesen werden, daß die Phosphorylierung dieser Aminosäure zu einer Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit in den homologen Proteinen von *Drosophila* und Mensch führt (Nara et al., 1998, Esguerra et al., 1994).

BK-Kanäle besitzen eine enorme Palette funktioneller Diversität. Diese wird im Gegensatz zu anderen Kaliumkanalsubfamilien im überwiegenden Maße durch eine Vielzahl von Spleißvarianten getragen bzw. durch akzessorische Untereinheiten vermittelt (Wallner et al., 1999). In den Vertebraten sind bisher 6 verschiedenen Stellen im Protein bekannt, an denen durch alternatives Spleißen diese funktionelle Vielfalt hervorgerufen wird. TBK1 repräsentiert möglicherweise einen Vertreter der BK-Familie, der an der Spleißposition 2 (SP2) eine 58 AS lange, cysteinreiche Insertion trägt. Im Menschen und im Kaninchen führt ein homologer 59 AS-Einschub zu einer Erhöhung der Kalziumsensitivität (Tseng-Crank et al., 1994, Hanaoka et al., 1999). Eine Insertion von 4 Aminosäuren, von denen 3 positiv geladen sind, an der Spleißposition 1 (SP1), wie sie TBK2 trägt, resultiert bei humanen BK-Familienmitgliedern in einer leicht reduzierten Ca^{2+} -Sensitivität (Tseng-Crank et al., 1994).

S0

```

TBK1 : -----MD-VIIPFSPDVPCDNNQORMWVAFLAS : 27
TBK2 : -----MD-VIIPFSPDVPCDNNQORMWVAFLAS : 27
TSslo : -----MDALIIIPVTMEVPCDSRGORMWVAFLAS : 28
Hslo : -----MDALIIIPVTMEVPCDSRGORMWVAFLAS : 28
Dslo : MASGLIDTNFSSTLANGMSGCDQSTVESLADDPDTPSPFDAD-DCLKVRKYWCFLLS : 55

```

#

```

TBK1 : SMVTFFGGLFIILLWRTIKYLWTVCCHCNKRKEAOKVNNPANSQAADGTAKGPDE : 83
TBK2 : SMVTFFGGLFIILLWRTIKYLWTVCCHCNKKKEAOKVNNPANSQAADGTPKGPDE : 83
TSslo : SMVTFFGGLFIILLWRTIKYLWTVCCHCGVKNKEAOKINAGGGNQA-DGTCCKPTDE : 83
Hslo : SMVTFFGGLFIILLWRTIKYLWTVCCHC GGKTKEAOKINN-GS-SQADGTLKPVDE : 82
Dslo : SIFTFLAGLLVLLWRAFAF---VCC-----RKEPDLGPNDPKQKEQKASRN : 99

```

⊕

#S1

```

TBK1 : KDEVVPASEVGMWTSVKDWAGVMISAQTLTGRVLVVLVVFALSIGALGIYFID-SSD : 138
TBK2 : KDEVVPASEVGMWTSVKDWAGVMISAQTLTGRVLVVLVVFALSIGALGIYFID-SSD : 138
TSslo : KEETV-AAEVCWMTSVKDWAGVMISAQTLTGRVLVVLVVFALSIGALVIYFID-SSN : 137
Hslo : KEEAV-AAEVCWMTSVKDWAGVMISAQTLTGRVLVVLVVFALSIGALVIYFID-SSN : 136
Dslo : KOEF----EGTFMTEAKDWAGELISGQTTTGRILVVLVVFILSIASLIIYFVDSSE : 151

```

S2 S3

```

TBK1 : PIESQNFYKDFTLQIDMFFNVFFLLYFGLRFIAANDKLWFWLEVNSVVDFFTVP : 194
TBK2 : PIESQNFYKDFTLQIAMFFNVFFLLYFGLRFIAANDKLWFWLEVNSVVDFFTVP : 194
TSslo : PIESQNFYKDFTLQINMAFNVFFLLYFGLRFIAANDKLWFWLEVNSVVDFFTVP : 193
Hslo : PIESQNFYKDFTLQIDMAFNVFFLLYFGLRFIAANDKLWFWLEVNSVVDFFTVP : 192
Dslo : EVERCOKWSNNITLQIDLAFNIFFMVYFFIRFIAASDKLWFMLEMYSEFVDYETTP : 207

```

* S4 # S5

```

TBK1 : VFVSVYLNRSWGLRFLRALRLIQFSEILQFLNILKTSNSIKLVNLCISIFITGWT : 250
TBK2 : VFVSVYLNRSWQGLRFLRALRLIQFSEILQFLNILKTSNSIKLVNLCISIFMGTWT : 250
TSslo : VFVSVYLNRSWGLRFLRALRLIQFSEILQFLNILKTSNSIKLVNLCISIFISTWT : 249
Hslo : VFVSVYLNRSWGLRFLRALRLIQFSEILQFLNILKTSNSIKLVNLLSIFISTWT : 248
Dslo : SFVSIYLDRTWIGLRFRLALRLMTVPDILQYLVNVLKTSSTRIAQLVSIIFISVWLT : 263

```

H5 S6

```

TBK1 : AAGFIHLVENSQDPWENFONSQSLSYWECVYLLMVTMSTVGYGDVYAKTTLGRIFM : 306
TBK2 : AAGFIHLVENSQDPWENFONSQSLSYWECVYLLMVTMSTVGYGDVYAKTTLGRIFM : 306
TSslo : AAGFIHLVENSQDPWENFONNQPITYWECVYLLMVTMSTVGYGDVYAKTTLGRIFM : 305
Hslo : AAGFIHLVENSQDPWENFONNQAITYWECVYLLMVTMSTVGYGDVYAKTTLGRIFM : 304
Dslo : AAGFIHLVENSQDPLD-FDNAHRLSYWTCVYELIVTMSTVGYGDVYCETVLRIFM : 318

```

```

TBK1 : VFFILGGLAMFASYVPEIIEELIGNRKKYGGSSYAVNGRKHIVVCGHITLESVSNFL : 362
TBK2 : VFFILGGLAMFASYVPEIIEELIGNRKKYGGSSYAVNGRKHIVVCGHITLESVSNFL : 362
TSslo : VFFILGGLAMFASYVPEIIEELIGNRKKYGGSSYAVSGRKHIVVCGHITLESVSNFL : 361
Hslo : VFFILGGLAMFASYVPEIIEELIGNRKKYGGSSYAVSGRKHIVVCGHITLESVSNFL : 360
Dslo : VFFLLVGLAMFASSIPEIIEELVSGNKYGGELKREHGKRKHIVVCGHITLESVSHFL : 374

```

⊕

```

TBK1 : KDFLHKDRDDVNVEIVFLHNISPDLLELEALFKRHFTQVEFYQGSVLNPHDLARVKI : 418
TBK2 : KDFLHKDRDDVNVEIVFLHDISPDLLELEALFKRHFTQVEFYQGSVLNPHDLARVKI : 418
TSslo : KDFLHKDRDDVNVEIVFLHNISPDLLELEALFKRHFTQVEFYQGSVLNPHDLARVKI : 417
Hslo : KDFLHKDRDDVNVEIVFLHNISPDLLELEALFKRHFTQVEFYQGSVLNPHDLARVKI : 416
Dslo : KDFLHEDREDVDVEVFLHRKPPDLELEGLFKRHFTTVEFFQGTIMNPIDLORVKV : 430

```

```

# #
TBK1 : ESADACLILANKYCPDPDAEDASNIMRVISIKNYSPKIRIITOMLOYHNKAHLLNI : 474
TBK2 : ESADACLILANKYCPDPDAEDASNIMRVISIKNYSCKIRIITOMLOYHNKAHLLNI : 474
TSslo : ESADACLILANKYCADPDAEDASNIMRVISIKNYSHPKIRIITOMLOYHNKAHLLNI : 473
Hslo : ESADACLILANKYCADPDAEDASNIMRVISIKNYSHPKIRIITOMLOYHNKAHLLNI : 472
Dslo : HEADACLVLANKYCODPDAEDAANIMRVISIKNYSDDIRVITLOLMQYHNKAYLLNI : 486

```

```

S7 # ⊕
TBK1 : PSWNNWKEGDDAICLAEIKAGFIAQSCLAQGLSTMLANLFSMRSF-TELEEDTWQKY : 529
TBK2 : PSWNNWKEGDDAICLAEIKAGFIAQSCLAQGLSTMLANLFSMRSF-TELEEDTWQKY : 529
TSslo : PSWNNWKEGDDAICLAEIKLGFIAQSCLAPGLSTMLANLFSMRSF-TEKMEEDTWQKY : 528
Hslo : PSWNNWKEGDDAICLAEIKLGFIAQSCLAQGLSTMLANLFSMRSF-TEKLEEDTWQKY : 527
Dslo : PSWDWKQGGDVICLAEIKLGFIAQSCLAPGFSTMMANLFAFMRSEKTSPTMQSWTND : 542

```

```

S8 SP1
TBK1 : YLEGVANEMYTEYLSSAFVGLSFPVAVCELCYVKLKLILLIAIENKSELGESS----I : 581
TBK2 : YLEGVANEMYTECLSSAFVGLSFPVAVCELCYVKLKLILLIAIENKSELGESSRSRKRI : 585
TSslo : YLEGVSNEMYTEYLSSAFVGLSFPVAVCELVFAKLKLLMIAIEYKSEKRESRSRKRI : 584
Hslo : YLEGVSNEMYTEYLSSAFVGLSFPVAVCELCYVKLKLILLIAIENKSEANRESR----I : 579
Dslo : YLRGTGMEEMYTEILSPTFICIPFAQATELCFSKLLKLLILLIAIEIKGAEEGADSK--I : 596

```

```

SP2
TBK1 : LINPGNHVKMQEGTLGFFIASDAKEVKRAFFY-CKACHDDIIDPKRIKKCGCKRLI : 636
TBK2 : LIYPGNHVKMQEGTLGFFIASDAKEVKRAFFY-CKACHDDIIDPKRIKKCGCKRLI : 640
TSslo : LINPGNHVKMQEGTLGFFIASDAKEVKRAFFY-CKACHDDIIDPKRIKKCGCKRLI : 639
Hslo : LINPGNHVKMQEGTLGFFIASDAKEVKRAFFY-CKACHDDIIDPKRIKKCGCKR-- : 632
Dslo : SINPRG-AKIQANTQGGFIAQSADEVKRAFFY-CKACHEDIKDETLLIKKCKCKNLT : 650

```

```

# # ⊕ #
TBK1 : YSKMSAYKQMKLACCFDCGRSERDCSCMSGSVHNSMMDTLQRAYPLSSVSVHDCATT : 692
TBK2 : Y----- : 641
TSslo : YSKMSIYKRMKLACCFDCGRSERDCSCMSGSVHNSMMDTLERAFPLSSVSVNDCSTS : 695
Hslo : ----- : -
Dslo : VQPRSKFDDLGDITRDREDTNLLNRNVRRPNGTGNGTGGMHMMNNTAAAAAAAAA : 706

```

```

# # SP3
TBK1 : LRAFEDEHPST-----LSPKKKQRNGGMRNSPNNSPKMSRHDPPLIIPGNE : 738
TBK2 : ---FEDEHPST-----LSPKKKQRNGGMRNPPNNSPKMSRHDPPLIIPGNE : 684
TSslo : LRAFEDEHPST-----LSPKKKQRNGGMRNSPNSSPKLM-RHDPPLIIPGNE : 740
Hslo : ---LEDEQPST-----LSPKKKQRNGGMRNSPNTSPKLM-RHDPPLIIPGND : 674
Dslo : GKQVNVKQPTVNVSRQVEGQVISPSPQYNRPTSRSSGTGTQNGGGVSLPAGIADDQ : 762

```

```

⊕ S9
TBK1 : QME-NMDMNVKQYDSTGMFHWCPskeIEKVILTRSEASMTVLSGHVVVCLFGDVTS : 793
TBK2 : QMG-NMDMNVKQYDSTGMFHWCPskeIEKVILTRSEASMTVLSGHVVVCMFGDVTS : 739
TSslo : QID-NMDASVKKYDSTGMFHWCPGKDIKVLTRSEAAAMTVLSGHVVVCLFGDAKS : 795
Hslo : QID-NMDSNVKKYDSTGMFHWCPskeIEKVILTRSEAAAMTVLSGHVVVCLFGDVSS : 729
Dslo : SKDFDFEKTEMKYDSTGMFHWSPAKSLEDCLLDRNQAAMTVLNGHVVCIFADPDS : 818

```

```

⊕
TBK1 : ALVGLRNLVMPLRASNFHYHELKPIVFGSLEYLRREWETLHNFPKVSIILPGTPLS : 849
TBK2 : ALVGLRNLVMPLRASNFHYHELKPIVFGSLEYLRREWETLHNFPKVSIILPGTPLS : 795
TSslo : ALIGVRLNLVMPLRASNFHYHELKPIVFGSLEYLRREWETLHNFPKVSIILPGTPLS : 851
Hslo : ALIGLRNLVMPLRASNFHYHELKPIVFGSLEYLRREWETLHNFPKVSIILPGTPLS : 785
Dslo : PLIGLRNLVMPLRASNFHYHELKPIVFGSVDYLRREWKMLQNLDPKISVNLGSPLS : 874

```

⊕

TBK1 : RADLRAVNINLCDMCVILSANQNNIDDASPQDKECVLASLNIKSMQFDDSIGLLQA : 905
TBK2 : RADLRAVNINLCDMCVILSANQNNIDDASLQDKECILASLNIKMQFDDSIGLLQA : 850
TSslo : RADLRAVNINLCDMCVILSANQNNIDDASLQDKECILASLNIKMQFDDSIGVLQA : 907
Hslo : RADLRAVNINLCDMCVILSANQNNIDDASLQDKECILASLNIKMQFDDSIGVLQA : 841
Dslo : RADLRAVNWNLCDMCCILSAKVPSNDDPTLADKEAILASLNIKMTFDDTIGVLSQ : 930

⊕ † SP4
CB

TBK1 : NSQGFTPPGMDRSSPDSSPVHGLVROASVTTGANIPIITELVNDSNVQFLDQDDDD : 961
TBK2 : NSQGFAPPGVDRSSSDSSPVHGLVROASVTTGANIPIITELVNDSNVQFLDQDDDD : 906
TSslo : NSQGFTPPGMDRSSPDNSPVHGLROPSITTGANIPIITELVNDSNVQFLDQDDDD : 963
Hslo : NSQGFTPPGMDRSSPDNSPVHGMLROPSITTGVNIPIITELVNDTNVQFLDQDDDD : 897
Dslo : RGPEFD---NLSATAGSPI-VLQRRGSVY-GANVPMITELVNDGNVQFLDQDDDD : 980

S10 ⊕

TBK1 : DPDTELYLTQPFACGTAFAVSVLDSLMGATYFNDNILTLIRTLVTGGATPELEALL : 1017
TBK2 : DPDTELYLTQPFACGTAFAVSVLDSLMGATYFNDNILTLIRTLETGGATPELEALL : 962
TSslo : DPDTELYLTQPFACGTAFAVSVLDSLMSATYFNDNILTLIRTLVTGRATPELEALI : 1019
Hslo : DPDTELYLTQPFACGTAFAVSVLDSLMSATYFNDNILTLIRTLVTGGATPELEALI : 953
Dslo : DPDTELYLTQPFACGTAFAVSVLDSLMSTYFNQALTLIRSLITGGATPELELIL : 1036

TBK1 : AEENALRGGYSTPQTLANRDRCRVAQLALYDGPFADLGDGGCYGDLFCKALKTYNM : 1073
TBK2 : AEENALRGGYSTPQTRANRDRCRVAQLALYDGPFADLGDGGCYGDLFCKALKTYNM : 1018
TSslo : AEENALRRSYSTPQTLANRDRCRVAQLALYDGPFADLGDGGCYGDLFCKALKTYNM : 1075
Hslo : AEENALRGGYSTPQTLANRDRCRVAQLALYDGPFADLGDGGCYGDLFCKALKTYNM : 1009
Dslo : AEGAGLRGGYSTVESLNNRDRCRVGQISLYDGPLAQFGECGKYGDLFVAALKSYGM : 1092

TBK1 : LCFGIYRLRDAHLATPSQCTKRYVITNPPYEFELVPTDLIFCLMQFDHNAGQSRTS : 1128
TBK2 : LCFGIYRLRDAHLATPSQCTKRYVITNPPYEFELVPTDLIFCLMQFDHNAGQSRAS : 1074
TSslo : LCFGIYRLRDAHLSTPSQCTKRYVITNPPYEFELVPTDLIFCLMQFDHNAGQSRAS : 1131
Hslo : LCFGIYRLRDAHLSTPSQCTKRYVITNPPYEFELVPTDLIFCLMQFDHNAGQSRAS : 1065
Dslo : LCIGLYRFRDTSSCDAS-SKRYVITNPPDDFSLLPTDQVFVLMQFDPGL-EYKPP : 1146

SP5 † SP6

TBK1 : LSHSSHSSSSKKSSSVHSIPTT-NRONRSSKAREAGHK-----QKKEWF : 1173
TBK2 : LSHSSHSSSSKKSSSVHSIPTT-NRONRSSKAREAGHKQNATRMNGMSQERKWF : 1129
TSslo : LSHSSHSSSSKKSSSAHSIPSTANRODRT-KTRDSRGKQNATRMNRMGQEKEWF : 1186
Hslo : LSHSSHSQSSKKSSSVHSIPSTANRQNRP-KSRESRDKQKYVQEERL----- : 1113
Dslo : AVRAPAGGRGTNTQGSGVGGGGSNKDDNS----- : 1175

TBK1 : TDEPENAYPRNIQIKPMSTHMANQINQYKSTSSLIPPIREVEDEC----- : 1218
TBK2 : TDEPQAYPRNIQIKPMSTHMANQINQYKSTSSLIPPIREVEDEC----- : 1174
TSslo : TDETDNAYPRNIQIKPMSTHMANQINQYKSTSSLIPPIREVEDEC----- : 1231
Hslo : ----- : -
Dslo : ----- : -

Abb. 12 (vorhergehende Seiten): Vergleich der vorhergesagten AS-Sequenzen von TBK1 und TBK2 mit den BK-Kanälen der Schildkröte (TSslo), des Menschen (Hslo) und von *Drosophila* (Dslo). Die hydrophoben Domänen S0 - S10, die *Calcium-bowl* und die Porenregion H5 sind durch rote Kästen hervorgehoben. Positionen an denen in anderen Vertebraten alternatives Spleißen nachgewiesen wurde, sind mit Sp1-Sp6 bezeichnet. Potentielle N-Glykosylierungsstellen (*), PKA-Phosphorylierungsstellen (‡), PKC-Phosphorylierungsstellen (#), CK2-Phosphorylierungsstellen (⊕) und CamKII-Phosphorylierungsstellen (⌘) sind oberhalb der Sequenz markiert. Alle Stellen, die sich ausschließlich auf TBK beziehen sind blau, beide TBK-Kanäle betreffend schwarz gekennzeichnet. GenBank Zugangsnummern: TSslo AF036627, Hslo U111058, Dslo M96840.

3.2 Heterologe Expression rekombinanter Kaliumkanalfragmente in *E. coli*

3.2.1 His₁₀-Fusionsproteine

Zur Herstellung von Antisera wurden Fragmente bekannter Kaliumkanäle der Forelle als His₁₀-Fusionsproteine exprimiert. Das Expressionsplasmid war in allen Konstrukten pET16b und der Expressionswirtstamm *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Die Klonierungsschema sind in Kapitel 7 dargestellt.

3.2.1.1 Trawl

Die Mitglieder der *Shaw*-Kaliumkanalfamilie besitzen im Bereich der Kernregion (S1-S6) und am N-Terminus (T1-Domäne) ihre höchsten Sequenzähnlichkeiten (Abb. 4). Um Antikörper gegen den Trawl-Kanal generieren zu können, wurden deshalb die C-terminalen Aminosäuren 478-587 mit einem N-terminalen Deca-Histidin fusioniert. Nach Induktion der *E. coli*-Zellen konnte nach dreistündiger Expressionsphase im Zell-Lysat per SDS-PAGE eine prominente Bande bei ca. 18 kDa detektiert werden (Abb. 13). Das vorhergesagte Molekulargewicht von His₁₀Trawl1c betrug 14,6 kDa. Die Diskrepanz zwischen dem vorhergesagten und dem experimentell detektierten Laufverhalten in der SDS-PAGE liegt an einer bekannten Veränderung der Laufeigenschaften von His₁₀-Fusionsproteinen von 4-6 kDa. Die Bakterienzellen wurden durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Das Zielprotein befand sich nach der Lyse der Zellen in der löslichen Fraktion und konnte aus dieser mittels Ni²⁺-Chelatchromatographie aufgereinigt werden. Bis auf wenige niedermolekulare Verunreinigungen war His₁₀Trawl1c aufgereinigt. Die Ausbeute bei diesem Verfahren betrug ca. 4 mg His₁₀Trawl1c pro Liter Bakteriensuspension. Das Protein wurde anschließend zur Immunisierung gegen TBS dialysiert und lyophilisiert zur Immunisierung eines Kaninchens eingeschickt. Die

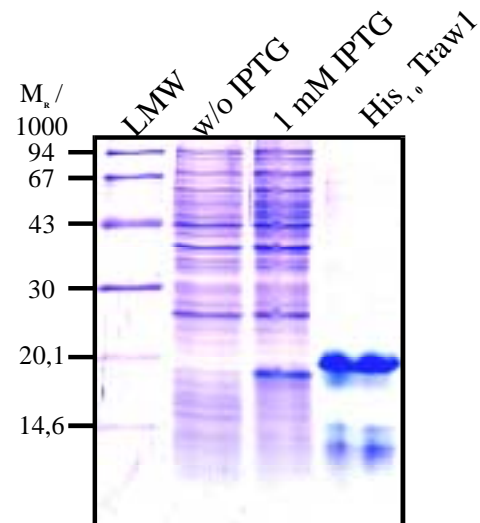


Abb. 13: SDS-PAGE (15 % Acrylamid) der heterologen Expression von His₁₀Trawl1c in *E. coli* (Coomassie-Färbung). LMW: Molekulargewichtstandard in kDa; w/o IPTG: Bakterienzell-Lysate vor der Induktion; 1 mM IPTG: Bakterienzell-Lysate nach 3 h Expression; His₁₀Trawl1: Zielprotein nach Affinitätschromatographie an Ni²⁺-Chelatsäule.

Immunisierung wurde mit vier intradermalen Injektionen des rekonstituierten Proteins (einmalig 500 µg Protein, anschließend je drei Immunisierungen mit 250 µg Protein) durchgeführt. Die Antikörper wurden als aufgearbeitetes Serum des immunisierten Tieres erhalten.

3.2.1.2 TSK2

Die Proteine der SK-Familie besitzen untereinander hohe Ähnlichkeiten, vor allen Dingen in der Kernregion (S1-S6) und innerhalb der 4 α -Helices am C-Terminus, die die Calmodulin-Bindestelle enthalten. Die höchste Variabilität der SK-Kanäle ist jedoch am N-Terminus (Abb. 9) zu finden. Um Antikörper gegen das TSK2-Protein zu erhalten, wurden deshalb die N-terminalen Aminosäuren 1-81, welche keine erkennbaren Sequenzübereinstimmungen mit anderen SK-Kanälen außer dem RSK2 aufwiesen, mit dem Deca-Histidin-Tag im Expressionsvektor pET16b fusioniert ($\text{His}_{10}\text{TSK2n}$). Nach dreistündiger Induktion der plasmidtragenden *E. coli*-Zellen konnte in der SDS-PAGE eine prominente Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 16 kDa detektiert werden. Die Diskrepanz zu dem vorhergesagten Molekulargewicht des Zielproteins von 12 kDa beruhte auf dem veränderten Laufverhalten durch die His_{10} -Tag-Fusion. Das $\text{His}_{10}\text{TSK2n}$ -Protein konnte nach Lyse der Bakterien mit Ultraschall in der löslichen Fraktion des Zell-Lysates detektiert und anschließend mit Ni^{2+} -Chelatchromatographie aufgereinigt werden. Je Liter Bakteriensuspension konnten 4-5 mg Zielprotein aufgereinigt werden. $\text{His}_{10}\text{TSK2n}$ wurde mit Aceton gefällt, um es wieder in TBS aufzunehmen. Das lyophilisierte Protein wurde zur Immunisierung eines Kaninchens eingeschickt. Zu diesem Zweck wurden dem Tier zunächst 500 µg und im Abstand von 2 Wochen dreimal 250 µg rekonstituiertes Protein intradermal injiziert. Die Antikörper konnten als aufgearbeitetes Serum des ausgebluteten Tieres erhalten werden.

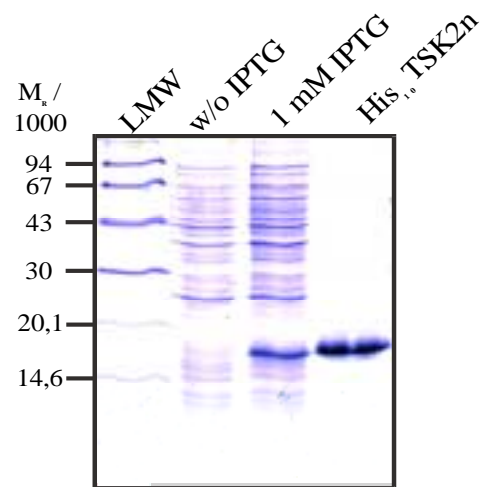


Abb. 14: SDS-PAGE (15 % Acrylamid) der heterologen Expression von $\text{His}_{10}\text{TSK2n}$ in *E. coli* (Coomassie-Färbung). LMW: Molekulargewichtstandard in kDa; w/o IPTG: Bakterienzell-Lysate vor der Induktion; 1 mM IPTG: Bakterienzell-Lysate nach 3 h Expression; $\text{His}_{10}\text{Traw1}$: Zielprotein nach Affinitätschromatographie an Ni^{2+} -Chelatsäule.

3.2.1.3 Tsha1/Tsha2/Tsha3

Kaliumkanäle der *Shaker*-Familie besitzen ausgedehnte Bereiche hoher Sequenzähnlichkeit in der Kernregion (S1-S6) und am N-Terminus (T1) (Abb. 5). Ausschließlich im C-Terminus dieser Kanäle findet man längere Sequenzabschnitte niedrigerer Ähnlichkeit innerhalb dieser Familie. Deshalb sind diese Bereiche prädestiniert für die Herstellung von Antikörpern mit hoher Spezifität. Die C-Termini von Tsha1, Tsha2 und Tsha3 sind jedoch mit 79, 67 und 49 Aminosäuren sehr kurz. Bei der heterologen Expression von Polypeptiden in *E. coli* kommt es häufig vor, daß kurze Polypeptide hydrolytisch verdaut werden, da sie nicht durch die Tertiärstruktur des gesamten Proteins geschützt werden. Das hat häufig sehr geringe Ausbeuten zur Folge. Um diesem Problem gleich von Anfang an aus dem Weg zu gehen,

wurde eine andere Strategie beschrrieben. Zunächst wurden die C-Termini der drei *Shaker*-Kanäle mit dem Deca-Histidin-Tag fusioniert und anschließend an diese Proteine C-terminal die jeweiligen extrazellulären, zwischen den Transmembrandomänen S1 und S2 lokalisierten, variablen Schleifen angehängt (7.2).

Die C-Termini waren bei Tsha1 die AS 414 – 494, bei Tsha2 die AS 416 - 483 und bei Tsha3 die AS 515 - 565. Die S1/S2-Schleifen lagen im Bereich der AS 181 – 220 (Tsha1), 183 – 220 (Tsha2) und 281 - 317 (Tsha3). Die resultierenden Fusionsproteine wurden His₁₀T1S1/2c, His₁₀T2S1/2c und His₁₀T3S1/2c genannt.

Die Fusionsproteine konnten nach dreistündiger Induktionsdauer in den Zell-Lysaten der *E. coli*-Zellen als prominente Bande in der SDS-PAGE nachgewiesen werden. Alle Banden waren in ihrem Laufverhalten 4-4,5 kDa größer als das vorhergesagte Molekulargewicht (Tsha1 17,4 kDa, Tsha2 16,4 kDa, Tsha3 14,1 kDa). Die Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen und die lösliche von der unlöslichen Zellfraktion durch Zentrifugation bei 9.000 g für 20 min getrennt. Die Fusionsproteine His₁₀T1S1/2c und His₁₀T2S1/2c konnten in der anschließenden SDS-PAGE in der unlöslichen Zellfraktion detektiert werden, während His₁₀T3S1/2c gelöst zu finden war (Abb. 15). His₁₀T1S1/2c und His₁₀T2S1/2c wurden daraufhin unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt, während His₁₀T3S1/2c einer Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen unterzogen wurde.

Die Ausbeuten der gereinigten Proteine lagen bei 3,5 mg (Tsha1), 4 mg (Tsha2) und 2 mg (Tsha3) Protein pro Liter Bakteriensuspension.

His₁₀T1S1/2c wurde mit Aceton gefällt, um es in PBS aufzunehmen, während die beiden anderen Proteine gegen PBS dialysiert wurden. Die lyophilisierten Fusionsproteine wurden zur Immunisierung verschickt. Mit dem Tsha1-Protein wurden ein Kaninchen und ein Meerschweinchen, mit His₁₀T2S1/2c ein Kaninchen und mit His₁₀T3S1/2c zwei Meerschweinchen immunisiert. Die Antikörper wurden in Form des aufgereinigten Serums der ausgebluteten Tiere erhalten. In Abbildung 15 wurde exemplarisch die Aufreinigung von His₁₀T1S1/2c dargestellt, da die His₁₀T2S1/2c- bzw. His₁₀T3S1/2c-Aufreinigungen ein bis auf die unterschiedlichen Molekulargewichte der Fusionsproteine identisches Bild ergaben,

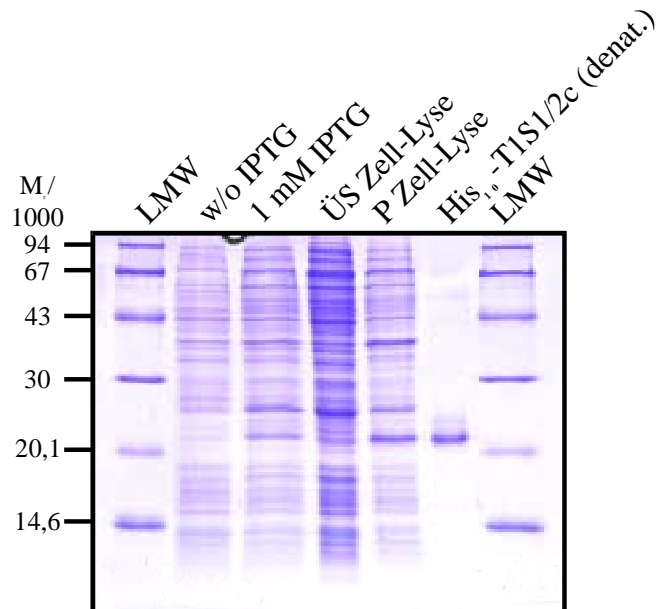


Abb. 15: SDS-PAGE (15 % Acrylamid) der heterologen Expression von His₁₀T1S1/2c in *E. coli* (Coomassie-Färbung). LMW: Molekulargewichtsstandard in kDa; w/o IPTG: Bakterienzell-Lysate vor der Induktion; 1 mM IPTG: Bakterienzell-Lysate nach 3 h Expression; ÜS Zell-Lyse: Überstand der Zell-Lyse nach der Zentrifugation; P Zell-Lyse: Pellet der Zell-Lyse nach der Zentrifugation; His₁₀T1S1/2c (denat.): Zielprotein nach der Affinitätschromatographie an Ni²⁺-Chelatsäule unter denaturierenden Bedingungen.

3.2.2 MBP-Fusionsproteine

Die polyklonalen Antikörper, die mit den Fusionsproteinen aus Kapitel 3.2.1 hergestellt wurden, mußten insbesondere für die Immunhistochemie affinitätsgereinigt werden. Die Affinitätsaufreinigung erfolgte mittels an tosylaktivierten Dynabeads gekoppelten Polypeptiden/Proteinen. Um aus den Seren nur die kanalsequenzspezifischen Antikörper aufzureinigen und Antikörper gegen den His₁₀-Tag zu vermeiden, wurden MBP-Fusionsproteine der gleichen Kanalsequenzen in dem Vektor pMal C2 durch Umklonierung (7.2) hergestellt (MBP-Traw1c, MBP-TSK2n, MBP-T1S1/2c, MBP-T2S1/2c, MBP-T3S1/2c). Die MBP-Fusionsproteine wurden nur in geringer Menge produziert, da für die Kopplungsreaktion an die Beads lediglich 400 µg der Proteine benötigt wird. Alle 5 Fusionsproteine konnten mit ihren vorhergesagten Molekulargewichten nach dreistündiger Induktion als prominente Bande in den Zell-Lysaten mittels SDS-PAGE detektiert werden. Das MBP-System bietet keine Möglichkeit der denaturierenden Aufarbeitung, deshalb war es von großer Wichtigkeit, daß alle Proteine nach der Zell-Lyse in der löslichen Zellfraktion zu finden waren. Die Tsha-Proteine ließen sich alle gut aus dem Zell-Lysat durch Affinitätschromatographie an einer Amylosesäule aufreinigen, während MBP-Traw1c und MBP-TSK2n eine geringe Affinität zu der Matrix aufwiesen. Deshalb mußten die Zell-Lysate mehrfach auf die Säule aufgetragen werden, um ausreichende Mengen Zielprotein aufzureinigen. Die Ausbeuten lagen in folgenden Größenordnungen (Angaben pro Liter Bakteriensuspension): MBP-T1S1/2c 7 mg, MBP-T2S1/2c 3mg, MBP-T3S1/2c 2 mg, MBP-Traw1c 4 mg (aus drei Säulendurchläufen), MBP-TSK2n 7 mg (aus zwei Säulendurchläufen). Die Aufreinigung der MBP-Fusionsproteine ist exemplarisch an MBP-Traw1c in Abbildung 16 dargestellt. Das vorhergesagte Molekulargewicht der MBP-Fusionsproteine betrug 55 kDa (Tsha1), 53 kDa (Tsha2), 51 kDa (Tsha3), 51 kDa (Traw1) und 49 kDa (TSK2). Das Maltose-Bindeprotein MBP selbst besitzt ein Molekulargewicht von 43 kDa.

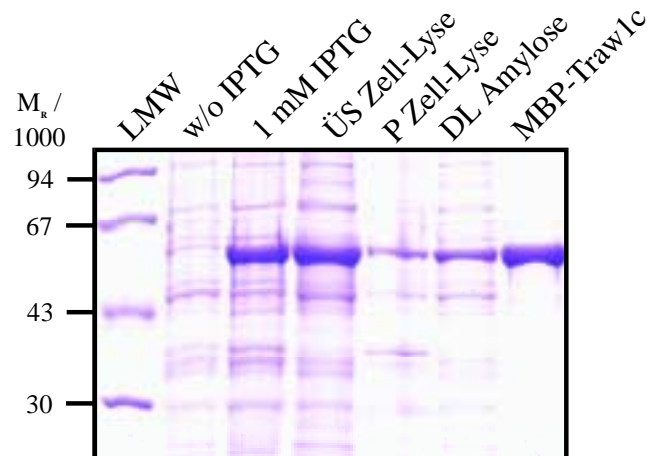


Abb. 16: SDS-PAGE (10 % Acrylamid) der heterologen Expression von MBP-Traw1c in *E. coli* (Coomassie-Färbung). LMW: Molekulargewichtstandard in kDa; w/o IPTG: Bakterienzell-Lysate vor der Induktion; 1 mM IPTG: Bakterienzell-Lysate nach 3 h Expression; ÜS Zell-Lyse: Überstand der Zell-Lyse nach Zentrifugation; P Zell-Lyse: Pellet der Zell-Lys nach der Zentrifugation; DL Amylose: Durchlauf der 1. säulenchromatographischen Aufreinigung an der Amylosesäule; MBP-Traw1c: Zielprotein nach der Affinitätschromatographie an der Amylosesäule.

3.3 Heterologe Expression von Kaliumkanälen in Eukaryontenzelllinien

3.3.1 Heterologe Expression von Kaliumkanälen in Insektenzellen

Die erfolgreiche Klonierung von α -Untereinheiten verschiedener Kaliumkanalfamilien bietet die Möglichkeit, diese heterolog in Zelllinien zu exprimieren, verbunden mit der Chance der vergleichenden, funktionellen Charakterisierung.

Das Baculovirus-Expressionssystem bietet viele Vorteile, welche die herkömmlichen Systeme in anderen eukaryontischen Zellen nicht bieten: Das virale System zeichnet sich durch ein hohes Expressionsniveau aus. Die Infektion der Zellen erreicht, je nach Virustiter, zeitlich abhängig jede Zelle in der Kultur. Dagegen erreichen transiente Transfektionen nur eine Effizienz von 0-25 % und diese erst häufig nach mühseliger Optimierung. Durch gezielte Herabsetzung des Virustiters und durch Optimierung der Infektionsdauer können unterschiedlich hohe Expressionsniveaus erhalten werden. Bei optimaler Nutzung des viralen Systems in Insektenzellen können die Zielproteine in größeren Mengen präparativ gewonnen werden.

Die α -Untereinheiten der Kaliumkanäle Tsha1, Tsha2, Tsha3, Traw1 und TSK2 wurden in unterschiedliche Vektoren kloniert, um rekombinante AcNPV-Viren mit Hilfe des Bac-to-Bac-Systems herzustellen (7.2). Es gelang von Tsha1, Tsha2, Traw1 und TSK2 rekombinante Viren mit C-terminalen GFP-Fusionsproteinen zu generieren, während Tsha3 mit dem rotfluoreszierenden RED-Protein fusioniert und in das Virusgenom eingebracht werden konnte.

Das Tsha1GFP-Protein zeigte in den Insektenzellen eine membranöse Fluoreszenz, welche, wie in CHO-Zellen der Bildung von *Clustern* unterliegt (Nguyen et al., 2000, Abb. 17 D). Das Tsha2GFP-Protein ließ in Insektenzellen ähnliche Charakteristika erkennen (Abb. 17 E/G). Verfolgte man die Fluoreszenz von Tsha3RED (Abb. 17 F/H), konnte man erkennen, daß überwiegend die Zellkernmembran, in stark leuchtenden Zellen auch die Plasmamembran, markiert ist. Das Traw1GFP-Fusionsprotein unterlag in Insektenzellen einem membranösen Verteilungsmuster. Allerdings ist bei einer 600fachen Vergrößerung keine genauere subzelluläre Lokalisierung möglich (Abb. 17 A). Die Fluoreszenz des TSK2GFP-Proteins war überwiegend membranös lokalisiert. Dabei fiel eine starke Akzentuierung der Fluoreszenz auf der Zelloberfläche auf, welche entweder auf einer Bildung von *Clustern* der Proteine, oder auf einer verstärkten Anfärbung exozytotischer Vesikel beruhte, wie sie bei der Freisetzung der Viren aus den Insektenzellen vorkommt (Abb. 17 B). Alle Kaliumkanalproteine führten überexprimiert in den Insektenzellen innerhalb von 16-48 h zu einem raschen Tod der Zelle. Deshalb konnten infizierte Zellen nur wenig neue Viren freisetzen und die Infektion benachbarter Zellen nicht so rasant verlaufen, wie z. B. bei der alleinigen Expression von GFP in der Zelle.

Die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung der an die Fluorophore gekoppelten Kaliumkanäle, ließ den Schluß zu, daß alle Kanäle, wenn auch zu einem geringen Prozentsatz, in die Plasmamembran eingebaut wurden. Da zur funktionellen Charakterisierung jedoch bevorzugt unfusionierte Proteine verwendet werden, um eventuellen Artefakten durch die Fusion vorzubeugen, wurden die Kanäle zusätzlich in Vektoren kloniert, die eine Coexpression des Zielproteins und des Reportergens GFP erlaubten. Die aus diesen Vektoren durch gerichtete Transposition gewonnenen rekombinanten Baculoviren charakterisierte eine starke zytoplasmatische Fluoreszenz (Abb. 17 C). Ihre Lebensdauer war vergleichbar mit den Zellen, welche die korrespondierenden Fusionsproteine exprimierten.

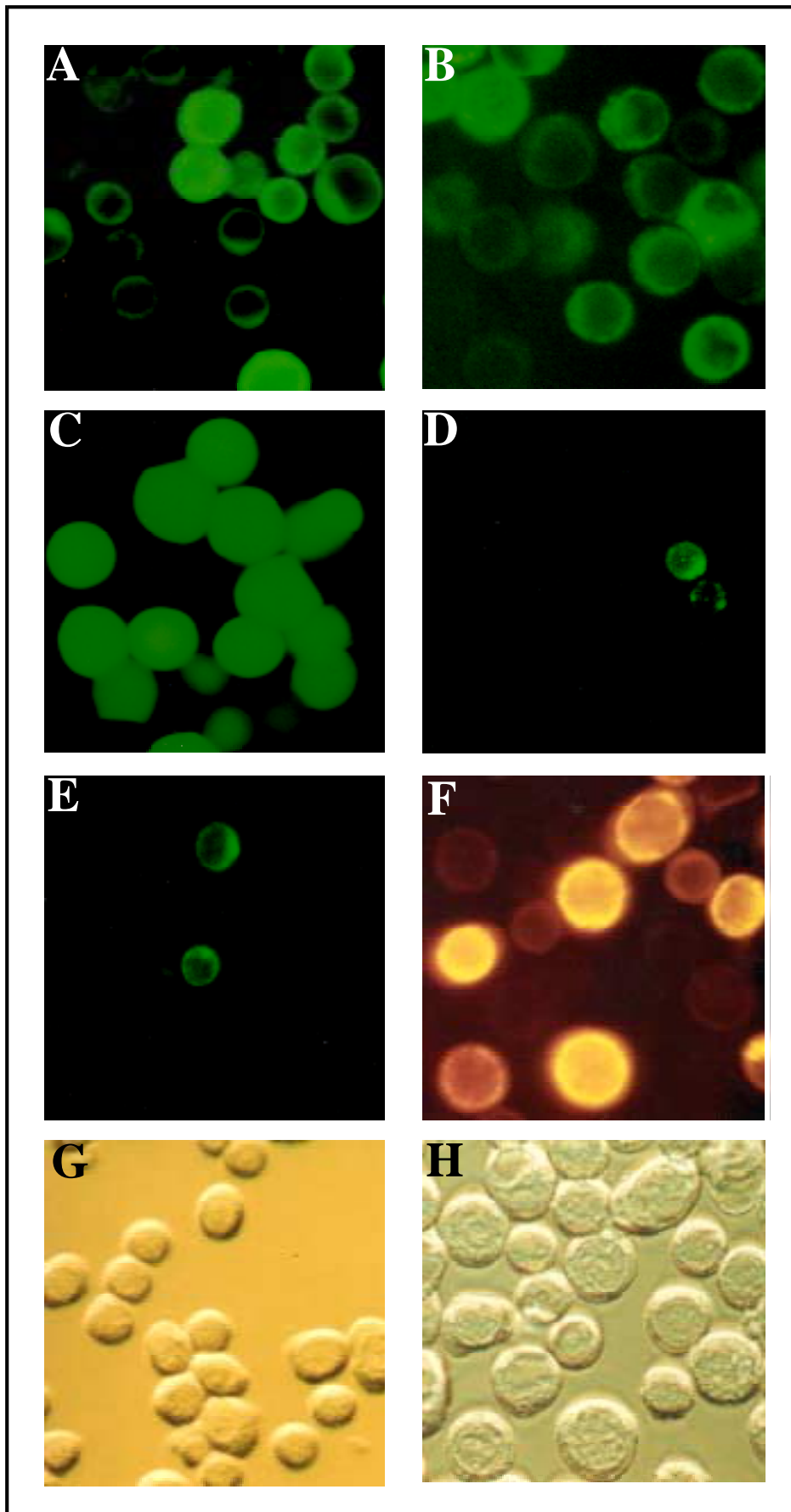


Abb. 17: Fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der heterologen Expression von Kaliumkanalproteinen in Insektenzellen. (A) Traw1GFP zeigt eine membranöse Verteilung innerhalb der Sf21-Zellen; (B) TSK2GFP zeigt eine akzentuierte Fluoreszenzfärbung der Insektenzellen; (C) Co-expression von Kanalproteinen (hier Traw1) und GFP führt zu einer zytoplasmatischen Verteilung der Fluoreszenz; (D) Tsha1GFP bildet auch in Insektenzellen Cluster; (E) Tsha2GFP liegt membranös verteilt vor. (F) Tsha3RED färbt stark die Kernmembran, aber auch die Plasmamembran; (G/H) Die Phasenkontrastbilder von (E/F) zeigen exemplarisch die inkomplette Infektion der Zellen im Bildausschnitt.

3.3.1.1 Westernblot-Analysen heterolog exprimierender Insektenzellen

Bei der Herstellung rekombinanter Baculoviren zur Coexpression des Reportergens GFP mit einem Zielprotein in Insektenzellen mußten die das Zielprotein tragenden Viren identifiziert werden. Das GFP-Protein konnte zwar per Fluoreszenzmikroskopie einwandfrei nachgewiesen werden, jedoch zeigten einige GFP-tragende Viren keine Kanalproteinexpression, obwohl die eingesetzten Vektoren eindeutig die Sequenz des rekombinanten Kanalprotein getragen hatten. Deshalb wurden die Antikörper, die aus den rekombinant in *E. coli* produzierten Kanalfragmenten hergestellt worden waren, (3.2) zur Selektion der Vireklone genutzt.

Insektenzellen wurden zu diesem Zweck mit dem jeweiligen Virus inkubiert, und die Infektion fluoreszenzmikroskopisch verfolgt. Wenn alle Zellen in der GFP-Fluoreszenz positiv waren, wurden diese entweder lysiert (Traw1, TSK2), oder ihre Membranen isoliert und solubilisiert (Tsha1, Tsha2, Tsha3), um die Proben einer Westernblot-Analyse zu unterziehen. Die Detektion des Westernblots wurde mit den entsprechenden affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörpern aus dem Kaninchen bzw. dem Meerschweinchen (1:1000) mittels Chemilumineszenz-Verstärkung durchgeführt.

Der Antikörper gegen Tsha1 (aus Meerschweinchen) detektierte in den Membranfraktionen aus Tsha1/GFP-coexprimierenden Zellen eine Doppelbande bei einem apparenten Molekulargewicht von 64 kDa (Abb. 18). In der das Tsha1GFP-Fusionsprotein beinhaltenden Spur, konnte eine Doppelbande mit einem relativen Molekulargewicht von 94 kDa detektiert werden. Die Differenz zwischen den Molekulargewichten dieser beiden Proteine entspricht exakt dem Molekulargewicht des fusionierten GFP-Proteins und der Linkersequenz (30 kDa). Das von der Primärsequenz abgeleitete Molekulargewicht von Tsha1 beträgt hingegen nur 56 kDa. Diese Differenz zu dem experimentell ermittelten Wert ließ auf posttranslationale Modifikationen von Tsha1 in den Insektenzellen schließen, die das Laufverhalten im SDS-PAGE entsprechend verändern. Tsha1 weist in der AS-Sequenz eine Konsensussequenz für N-Glykosylierung und mehrere putative Phosphorylierungsstellen auf. Die Doppelbande könnte durch alternative Modifikationen zustande kommen. Mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen das GFP-Protein konnte auf der gleichen Membran in derselben Spur die Doppelbande mit dem apparenten Molekulargewicht von 94 kDa detektiert werden. Diese Tatsache untermauert das Ergebnis der ersten Detektion, daß in Insektenzellen das Tsha1GFP-Fusionsprotein in der SDS-PAGE ein apparentes Molekulargewicht von 94 kDa und daraus abgeleitet das nicht fusionierte Tsha1 von 64 kDa besitzt.

Insektenzellen, welche mit rekombinanten Tsha2-Baculoviren infiziert worden waren, wurden ebenfalls im Westernblot analysiert (Abb. 19): In der Spur, welche das unfusionierte Tsha2-Protein enthalten sollte, konnte mit dem Kaninchenantikörper gegen Tsha2 keine Bande angefärbt werden (Abb.19 A). In den Spuren 1 und 4 der Abbildung 19 B jedoch konnten mit dem GFP-Antikörper die unfusionierten GFP-Proteine nachgewiesen werden. Allerdings entsprach das einzeln exprimierte GFP einer anderen Isoform als das mit Tsha2 coexprimierte

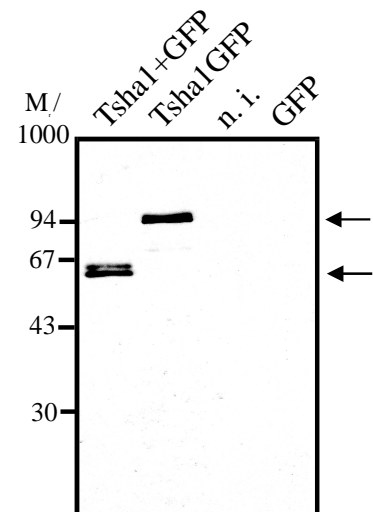


Abb. 18: Immunblot der Membranfraktionen (100000 g-Pellet) heterolog exprimierender Insektenzellen mit Meerschweinchen anti-Tsha1;. Tsha1+GFP: Coexpression der beiden Proteine; Tsha1GFP: Fusionsprotein; GFP: GFP-Protein alleine; n.i.: Kontrolle mit nicht infizierten Zellen; Aufgetragen sind pro Spur Membranproteine von ~5000 Sf21-Zellen.

GFP. Die Banden der beiden Fluorophore differieren im Laufverhalten im SDS-PAGE um 3 kDa (29 kDa/32 kDa). Diese Daten zeigen, daß die Zellen, welche GFP und Tsha2 coexprimieren sollten, nur GFP produzieren, jedoch nicht Tsha2. Anders stellte sich die Situation der Tsha2GFP-Fusionsprotein produzierenden Zellen dar. In dieser Spur konnte mit dem Tsha2-Antikörper eine Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von 93 kDa detektiert werden. Die erneute Untersuchung derselben Membran mit dem GFP-Antikörper zeigte die gleiche Spezifität. Leitet man das Molekulargewicht von Tsha2 von seiner vorhergesagten Aminosäuresequenz ab, erhält man einen Wert von 55 kDa. Das GFP-Fusionsprotein sollte demnach ein Molekulargewicht von ca. 85 kDa haben, was sich deutlich von dem in diesem Experiment ermittelten Wert unterscheidet. Allerdings sind in der AS-Sequenz von Tsha2, neben einer N-Glykosylierungsstelle, an der analogen Position wie im Tsha1-Protein, noch mehrere putative Phosphorylierungsstellen zu finden. Dementsprechend kann angenommen werden, daß auch hier posttranslationale Modifikationen des Proteins in Insektenzellen bei der Veränderung des Laufverhaltens in der SDS-PAGE eine Rolle spielen.

Die rekombinanten Tsha3-Baculoviren führten in den Insektenzellen zur Produktion von Proteinen, die von den Tsha3-Meerschweinchenantikörpern in der Westernblotanalyse erkannt wurden (Abb.

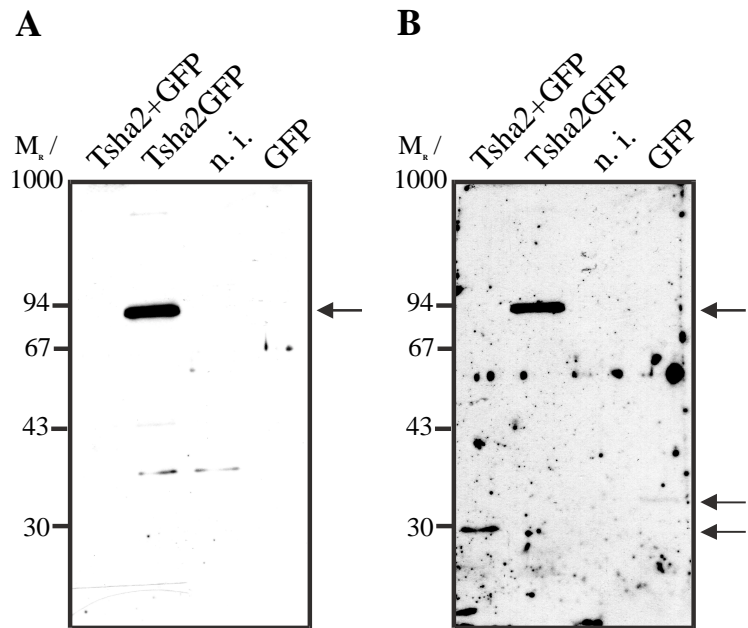


Abb. 19: Immunblot der Membranfraktionen (100000 g Pellet) heterolog exprimierender Insektenzellen. (A) Anti-Tsha2; (B) Anti GFP. Tsha2+GFP: Coexpression der beiden Proteine; Tsha2GFP: Fusionsprotein; GFP: GFP-Protein alleine; n.i.: Kontrolle mit nicht infizierten Zellen; Aufgetragen sind pro Spur Membranproteine von ~5000 Sf21-Zellen.

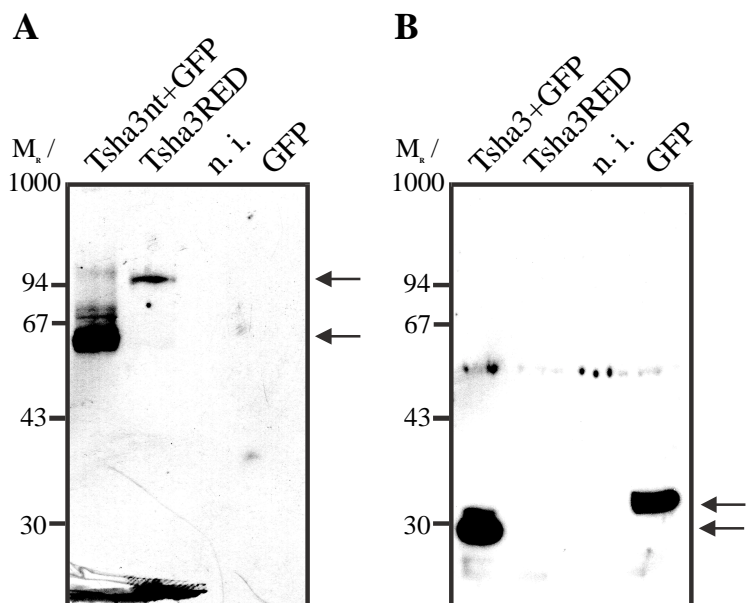


Abb. 20: Immunblot der Membranfraktionen (100000 g Pellet) heterolog exprimierender Insektenzellen. (A) Meerschweinchen Anti-Tsha3; (B) Anti GFP. Tsha3nt+GFP: Coexpression der beiden Proteine; Tsha3RED: Fusionsprotein; GFP: GFP-Protein alleine; n.i.: Kontrolle mit nicht infizierten Zellen; Aufgetragen sind pro Spur Membranproteine von ~5000 Sf21-Zellen.

20, A/B). Tsha3nt stellte in diesem Fall das N-terminal um 89 Aminosäuren trunkeerte Tsha3-Protein dar, welches mit GFP coexprimiert wurde. Dieses Protein mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 54 kDa konnte bei 62 kDa detektiert werden, während das komplette Tsha3-Protein als Fusion mit dem RED-Protein bei 102 kDa erkannt wurde. Das kalkulierte Molekulargewicht von 94 kDa war wiederum 8 kDa geringer als experimentell ermittelt.

Die Analyse der AS-Sequenz des Tsha3-Proteins weist, wie schon bei seinen Verwandten Tsha1 und Tsha2, eine putative N-Glykosylierungsstelle und mehrere Phosphorylierungsstellen auf. Die Diskrepanz zwischen kalkulierte und experimentell bestimmten Molekulargewicht deutete erneut auf posttranslationale Modifikationen des Proteins in Insektenzellen hin. Ein *Reprobing* derselben Blotmembran mit einem GFP-Antikörper zeigte die GFP-Banden bei 29 bzw. 32 kDa. Das rotfluoreszierende Protein wird von diesem Antikörper nicht erkannt.

Die Antikörper gegen *Shaker*-Kaliumkanäle der Forelle wurden zusätzlich auf ihre Subtypspezifität getestet, indem die Membranfraktionen der Tsha1, Tsha2 und Tsha3 heterolog exprimierenden Insektenzellen kreuzweise mit allen Antikörpern im Westernblot analysiert wurden. Es konnte keine Kreuzreaktivität der Antikörper zu den jeweilig anderen Kaliumkanalsubtypen detektiert werden.

Traw1 wurde in Insektenzellen sowohl als GFP-Fusionsprotein exprimiert, als auch mit GFP coexprimiert. Die Westernblotanalyse dieser Zellen wurde in diesem Falle direkt an den Zell-Lysaten durchgeführt. Der Traw1-Kaninchenantikörper lieferte dominante Banden bei Molekulargewichten von 125 kDa bzw. 94 kDa (Abb. 21 A/B). Die Differenz in den beiden Molekulargewichten entsprach exakt dem Molekulargewicht des fusionierten Proteinanteils des Fluorophors in Traw1GFP. Die 125 kDa-Bande wurde ebenfalls in einem Westernblot mit einem polyklonalen GFP-Antikörper detektiert, wie auch die beiden Banden (29/32 kDa), die den freien GFP-Proteinen entsprechen. Der Traw1-Antikörper erkennt ausschließlich Proteinbanden in den Spuren

welche Traw1-Proteine enthalten und nicht in den Kontrollspuren. Dieses spricht für seine Spezifität. Allerdings wurden zusätzlich zu den 94 und 125 kDa-Banden noch höher- und niedermolekulare Proteine detektiert. Die hochmolekularen Banden könnten von oligomerisiertem Traw1-Protein herrühren. Die niedermolekularen Banden sind besonders in der Spur des Traw1GFP-Fusionproteins zu erkennen. Hier besteht die Möglichkeit, daß dieses proteolytische Fragmente des C-Terminus von Traw1 sind. Diese Fragmente wären ohne das fusionierte GFP nicht groß genug, um in diesem Westernblot nachgewiesen zu werden.

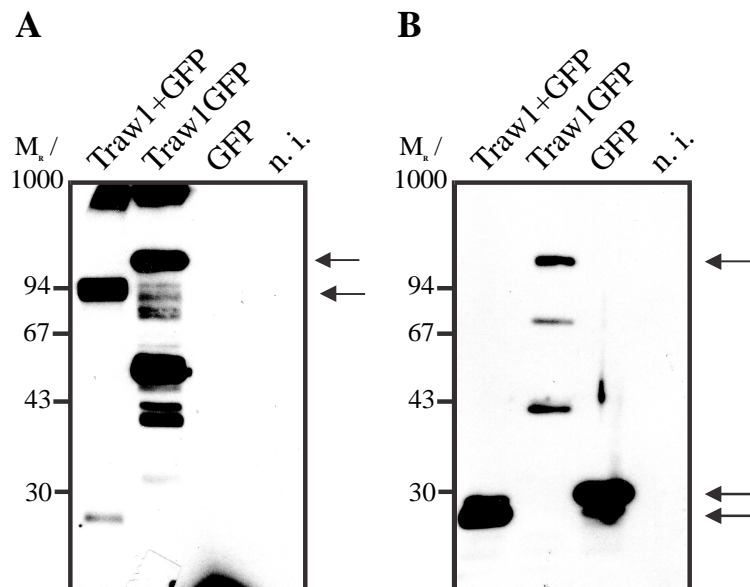


Abb. 21: Immunblot der Zell-Lysate heterolog exprimierender Insektenzellen. (A) Anti-Traw1; (B) Anti GFP. Traw1+GFP: Coexpression der beiden Proteine; Traw1GFP: Fusionsprotein; GFP: GFP-Protein alleine; n.i.: Kontrolle mit nicht infizierten Zellen; Aufgetragen sind pro Spur Proteine von ~5000 Sf21-Zellen.

Die kalkulierten Molekulargewichte von Traw1 und Traw1GFP betragen 67 bzw. 97 kDa. Die aus diesen Daten resultierende Diskrepanz des experimentell bestimmten Traw1-Molekulargewichtes betrug demnach 27 kDa. Betrachtet man allerdings die Traw1-Primärsequenz, stellt man zwei putative Glykosylierungsstellen und mehrere Phosphorylierungsstellen fest. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, daß Traw1, wie auch die drei *Shaker*-Kanäle, in Insektenzellen posttranslational modifiziert wird.

Die Westernblotanalyse der Insektenzellen, die mit TSK2-Baculoviren infiziert waren, wurde wiederum direkt an den Zell-Lysaten durchgeführt. Der Kaninchenantikörper gegen TSK2 bindet hier an ein Protein, dessen apparentes Molekulargewicht bei 64 kDa liegt (Abb. 22). In der korrespondierenden Spur, die das TSK2GFP-Fusionsprotein beinhalten sollte, konnte eine dominante 94 kDa-Bande detektiert werden. Diese Molekulargewichte liegen sehr nahe an den vorhergesagten Werten von 62 kDa bzw. 92 kDa. Die geringe Differenz zwischen kalkuliertem und experimentell ermitteltem Molekulargewicht lässt sich mit der Tatsache erklären, daß in der Primärstrukturanalyse mehrere Phosphorylierungsstellen zu finden sind, die möglicherweise das Laufverhalten in der SDS-PAGE beeinflussen. Hochmolekulare posttranslationale Modifikationen spielen in diesem Protein in Insektenzellen möglicherweise keine Rolle, da auch die Sequenzanalyse keine putative N-Glykosylierungsstelle in diesem Protein lieferte. In der Spur, die das nicht fusionierte TSK2-Protein enthält wiesen hochmolekulare Banden auf eine mögliche Oligomerisierung des TSK2-Proteins hin, da diese Banden in den Kontrollspuren nicht vorhanden sind. Der Immunblot mit den GFP-Antikörpern zeigte im Lysat der TSK2GFP-Zellen keine positive Reaktion, während die beiden GFP-Banden in ihren Lysaten deutlich markiert wurden. Schon in der Traw1GFP-Detektion hatte der GFP-Antikörper schwächer an das Fusionsprotein gebunden, als an GFP. Möglicherweise sind ein geringeres Expressionsniveau und die verminderte Bindung des GFP-Antikörpers für die fehlende Detektion verantwortlich.

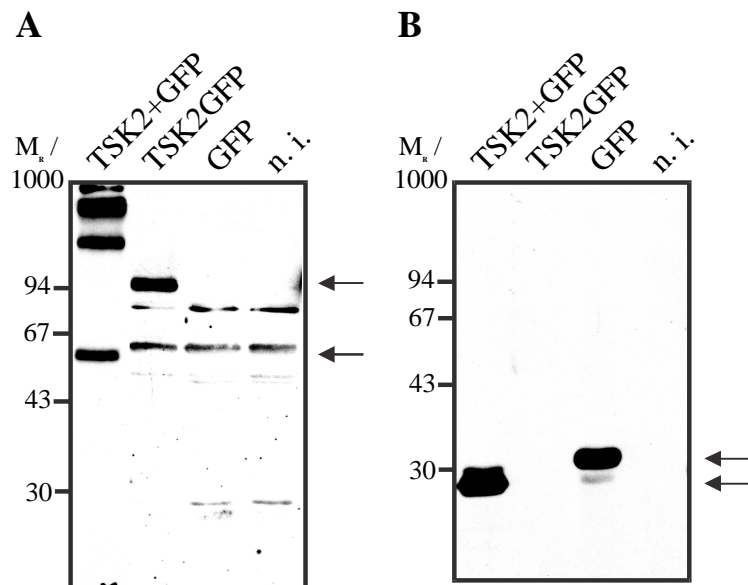


Abb. 22: Immunblot der Zell-Lysate heterolog exprimierender Insektenzellen. **(A)** Anti-TSK2; **(B)** Anti GFP. TSK2+GFP: Coexpression der beiden Proteine; TSK2GFP: Fusionsprotein; GFP: GFP-Protein alleine; n.i.: Kontrolle mit nicht infizierten Zellen; Aufgetragen sind pro Spur Proteine von ~5000 Sf21-Zellen.

3.3.2 Heterologe Expression von Kaliumkanälen in CHO-Zellen

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war die elektrophysiologische Charakterisierung der heterolog exprimierten Kanalproteine. Die Ergebnisse der funktionellen Expression von Proteinen in Zelllinien erfordern die Kontrolle in einem weiteren Zellsystem, damit sichergestellt ist, keine zelltypspezifischen Daten zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden die α -Untereinheiten der klonierten Kaliumkanäle transient in chinesische Hamster Ovarzellen (CHO-Zellen) mittels Transfektion eingeschleust. Die Transfektionseffizienz liegt bei den gängigen Verfahren idealerweise im Bereich von bis zu 20 % der Zellen, 2-4 % Effizienz sind jedoch die Regel. Deshalb ist es für die elektrophysiologischen Charakterisierung von Kaliumkanälen zwingend erforderlich, ein leicht zu detektierendes Reportergen mit dem Zielprotein in die Zelle einzubringen, um zeitaufwendige Messungen untransfizierter Zellen zu vermeiden. In dieser Arbeit wurde das grünfluoreszierende Protein (GFP) als Reportergen verwendet. Um die Wahrscheinlichkeit artifizieller Messungen zu minimieren, wurden Vektoren mit einer internen Ribosomeneintrittsstelle (IRES) eingesetzt, welche eine Coexpression des Zielproteins mit GFP ermöglichten. Allein bei Tsha1 wurden die bereits etablierten Tsha1GFP-Fusionskonstrukte genutzt (Nguyen et al., 2000). Die Expression der Zielproteine wurde durch immunzytochemische Analyse der transfizierten Zellen mit den jeweiligen affinitätsgereinigten Antikörpern kontrolliert (Abb. 23).

den lebenden, nicht fixierten Zellen konnten die transfizierten Zellen nach 16-24 h durch eine starke grüne Fluoreszenz identifiziert werden (Abb. 23 F). Nach 36 h Expressionszeit wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch die heterolog exprimierten Zielproteine detektiert. Auffallend war bei allen α -Untereinheiten von Kaliumkanälen (Tsha1, Tsha2, Tsha3, Traw1, TSK2) eine heterogene Verteilung der Proteine innerhalb der Zellen. Die Kanäle lagen über die gesamte Zelle in *Clustern* verteilt vor. Die maximal 600fache Vergrößerung und die durch die Fixierung teilweise zerstörte Morphologie der Zellen ließen dabei keine genauere subzelluläre Lokalisation zu, jedoch deuten die Ergebnisse auf eine membranständige Expression aller Kanäle hin. Während auch nach 2-4 Tagen der Expression von Tsha1 und Traw1 noch vitale Zellen zu erkennen waren, führte die Expression von Tsha2-, Tsha3- und TSK2-Kanälen zum raschen Tod der Zellen innerhalb von 36 h.

Die heterolog exprimierenden CHO- und Insektenzellen wurden zur elektrophysiologischen Charakterisierung der Kanäle eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Kapitel 3.5 dargestellt.

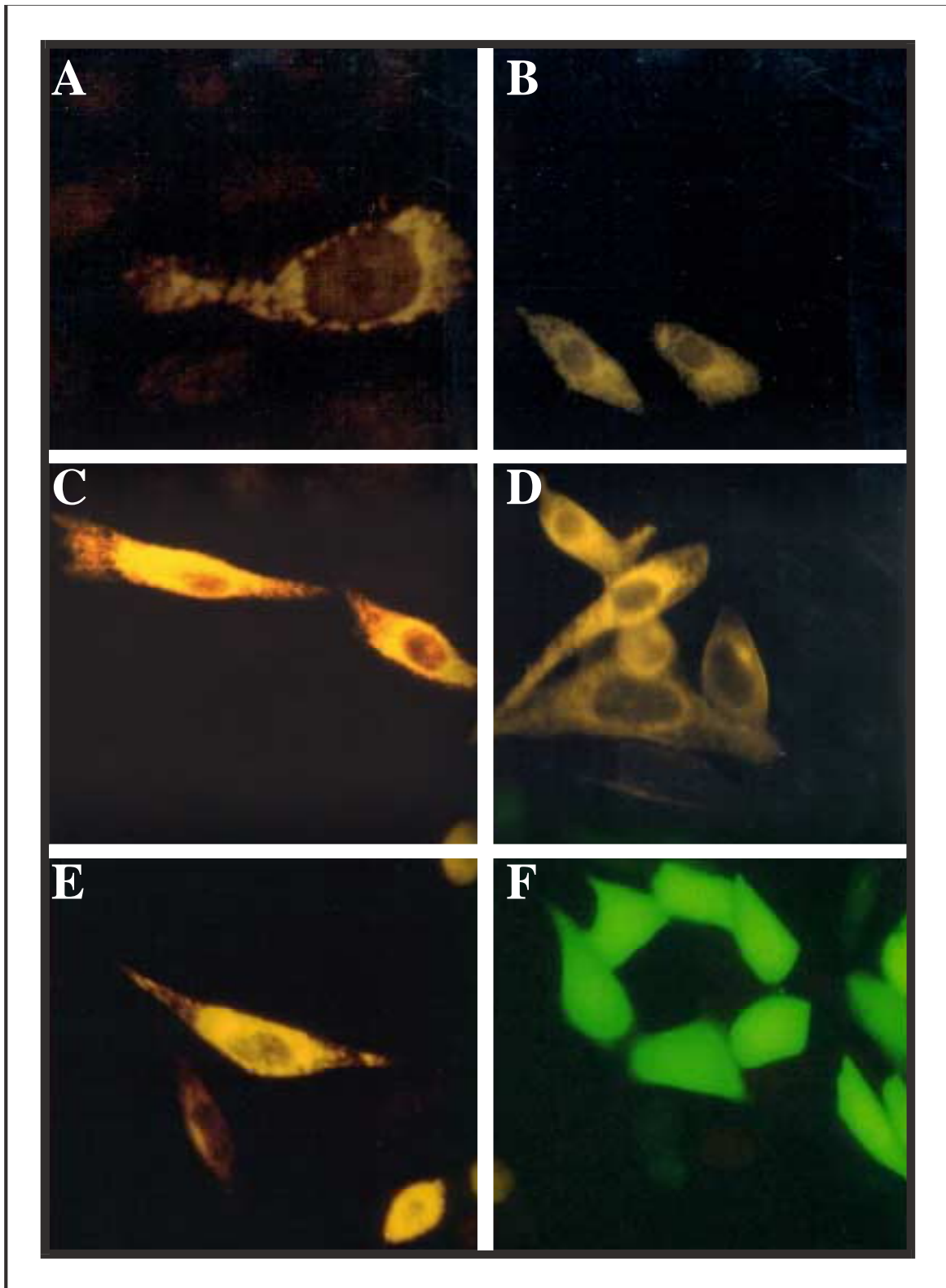


Abb. 23: Heterologe Expression von Kaliumkanälen in CHO-Zellen. Immunzytochemische Detektion mit den korrespondierenden affinitätsgereinigten Antikörpern. **(A)** Tsha1GFP, **(B)** Tsha2, **(C)** Tsha3, **(D)** Traw1, **(E)** TSK2, **(F)** Coexpression von TSK2 und GFP, Zellen vor der Fixierung. Der Bildausschnitt umfaßt immer mehr als nur die immunpositiven Zellen (im Phasenkontrast zu erkennen). Die Durchlichtaufnahmen wurden nicht dokumentiert, da die Morphologie der Zellen durch die Fixierung im Phasenkontrast nur schwer abzubilden war. Die Immunreaktivität ließ sich mit den korrespondierenden Peptiden, welche zur Immunisierung verwendet worden waren, inhibieren.

3.4 Expressionsanalyse

3.4.1 Expression von Kaliumkanaltranskripten während der Larvalentwicklung

Die entwicklungspezifische Expression der Kaliumkanaltranskripte der *Shaker*-Subfamilie im Gehirn der Regenbogenforelle wurden kürzlich mittels RT-PCR detailliert beschrieben (Nguyen et al., 2000). Aufgrund dieser Daten konnte geschlossen werden, daß auch die Transkripte der kalziumsensitiven und der übrigen spannungsgesteuerten Kaliumkanäle entwicklungspezifisch exprimiert werden. Um einen Überblick zu erhalten, wurde zu diesem Zweck cDNAs verschiedener Entwicklungsstadien der Regenbogenforelle hergestellt. Im Folgenden wurden die cDNAs mit verschachtelten PCR-Reaktionen auf die Gegenwart entsprechenden Kaliumkanaltranskripte untersucht (Abb. 24). Für die beiden Mitglieder der *Shaw*-Familie, Traw1 und Traw2, wurde zunächst eine Voramplifikation mit den subfamilienselektiven Primern Raw und Chan durchgeführt, um in den folgenden PCR-Reaktionen mit den spezifischen Primer Kv3rv/Kv3rr (Traw1) und Kv3cv/Kv3cr (Traw2) die Transkripte nachzuweisen. Im Entwicklungsstadium 26 (12 Tage vor dem Schlupf) konnten keine Traw-Transkripte im Forellenhirn detektiert werden. Eine Woche vor dem Schlupf, im Entwicklungsstadium 28, konnte zuerst eine schwache Bande bei der erwarteten Größe von Traw2 nachgewiesen werden, während Traw1 erst 3-5 Tage nach dem Schlupf (Stadium 31) detektierbar war.

Die Transkripte der beiden SK-Kanäle konnten mittels einer initialen PCR-Runde der Primerkombination TSK1v/TSK2r angereichert werden. Die spezifischen Primer SK11v1/SK6r (TSK2) und TSK7v/TSK6r (TSK3) amplifizierten in der zweiten PCR-Runde die korrespondierenden, spezifischen cDNA-Fragmente. Beide Kaliumkanäle konnten erstmalig 3-5 Tage vor dem Schlupf im Entwicklungsstadium 30 im Forellenhirn nachgewiesen werden.

TBK-Kanaltranskripte wurden nach einer Voramplifikation der Transkripte durch die Primer Maxi1v/4r mit den Primern Maxi9v/3r erstmalig im Entwicklungsstadium 31 mittels PCR detektiert. Die Primerkombinationen umschließen den Bereich im N-Terminus, der keine der alternativen Spleißpositionen SP1 - SP6 beinhaltet. Es sollten folglich alle TBK-Isoformen gleichzeitig detektiert werden können.

Bei diesen Betrachtungen fällt insbesondere auf, daß alle Kaliumkanaltranskripte erstmalig frühestens im Schlupfstadium detektiert werden konnten. Traw1 und TBK waren sogar erst kurz nach dem Schlupf zu finden. Die funktionelle Bedeutung dieser Daten muß in weiteren Untersuchungen am nativen System noch geklärt werden.

Zur Normalisierung des cDNA-Gehaltes der Proben wurde in allen Entwicklungsstadien das β -Aktin der Forelle detektiert. Es konnten Banden mit nahezu gleichförmiger Intensität erhalten werden, was auf einen zur Detektion der Kanaltranskripte ausreichenden cDNA-Gehalt der Proben hindeutet

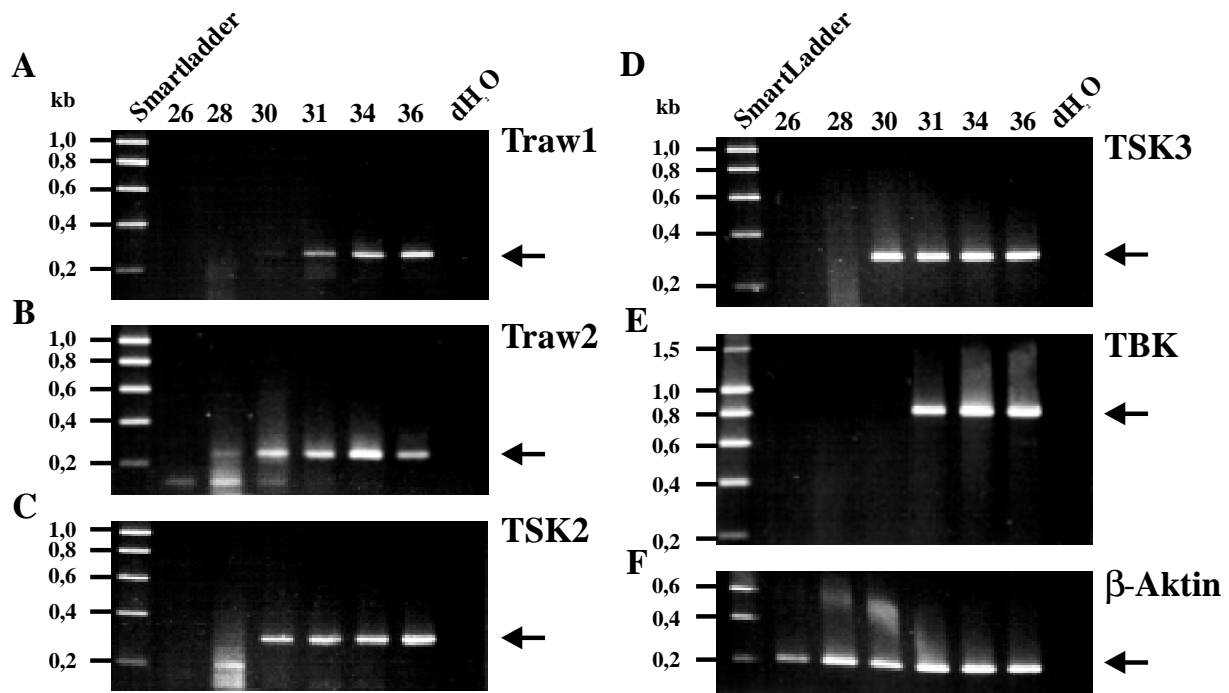


Abb. 24: Expression von Kaliumkanaltranskripten während der Larvalentwicklung der Regenbogenforelle (Stadien 26, 28, 30, 31, 34, 36). (A) Traw1 277 bp; (B) Traw2 249 bp; (C) TSK2 306 bp; (D) TSK3 303 bp; (E) TBK 809 bp; (F) Kontroll-PCR mit β -Aktin-Primern, zur Normierung des cDNA-Gehaltes der Proben. Die Fragmentgrößen wurden aufgrund des DNA-SmartLadder-Standards bestimmt. Kontrollreaktionen wurden in dH_2O durchgeführt. In allen PCR-Reaktionen wurden 500 ng cDNA eingesetzt. Annealingtemperaturen: 58 °C (TSK, Traw) bzw. 54 °C (TBK).

3.4.2 Analyse der gewebespezifischen Expression von Kaliumkanälen

3.4.2.1 Expressionsanalyse der Kaliumkanaltranskripte in unterschiedlichen Geweben.

Die Expression der Transkripte von Tsha1, Tsha2, Tsha3, Traw1, Traw2, Tsk2, Tsk3 und aller bekannter Isoformen von TBK wurde mit RT-PCR in verschiedenen Geweben getestet. Zu diesem Zweck wurde cDNA aus Leber, Muskel, *Tectum Opticum*, *Cerebellum*, Vorderhirn und Stammhirn hergestellt. In den vier Hirnregionen konnten alle untersuchten Kanäle mit ihren Transkripten nachgewiesen werden. Unterschiede bezüglich der gewebespezifischen Expression konnten nur in der Leber und dem Muskel gefunden werden: TSK2, TSK3, Tsha2 und alle TBK-Isoformen waren mit ihren Transkripten in diesen beiden Geweben vertreten. Allerdings konnte Traw1-, Traw2- und Tsha3-mRNA zwar im Muskel, jedoch nicht in der Leber nachgewiesen werden, während Tsha1 als einziger Kaliumkanal in diesen Experimenten weder in der Leber noch im Muskel detektiert wurde.

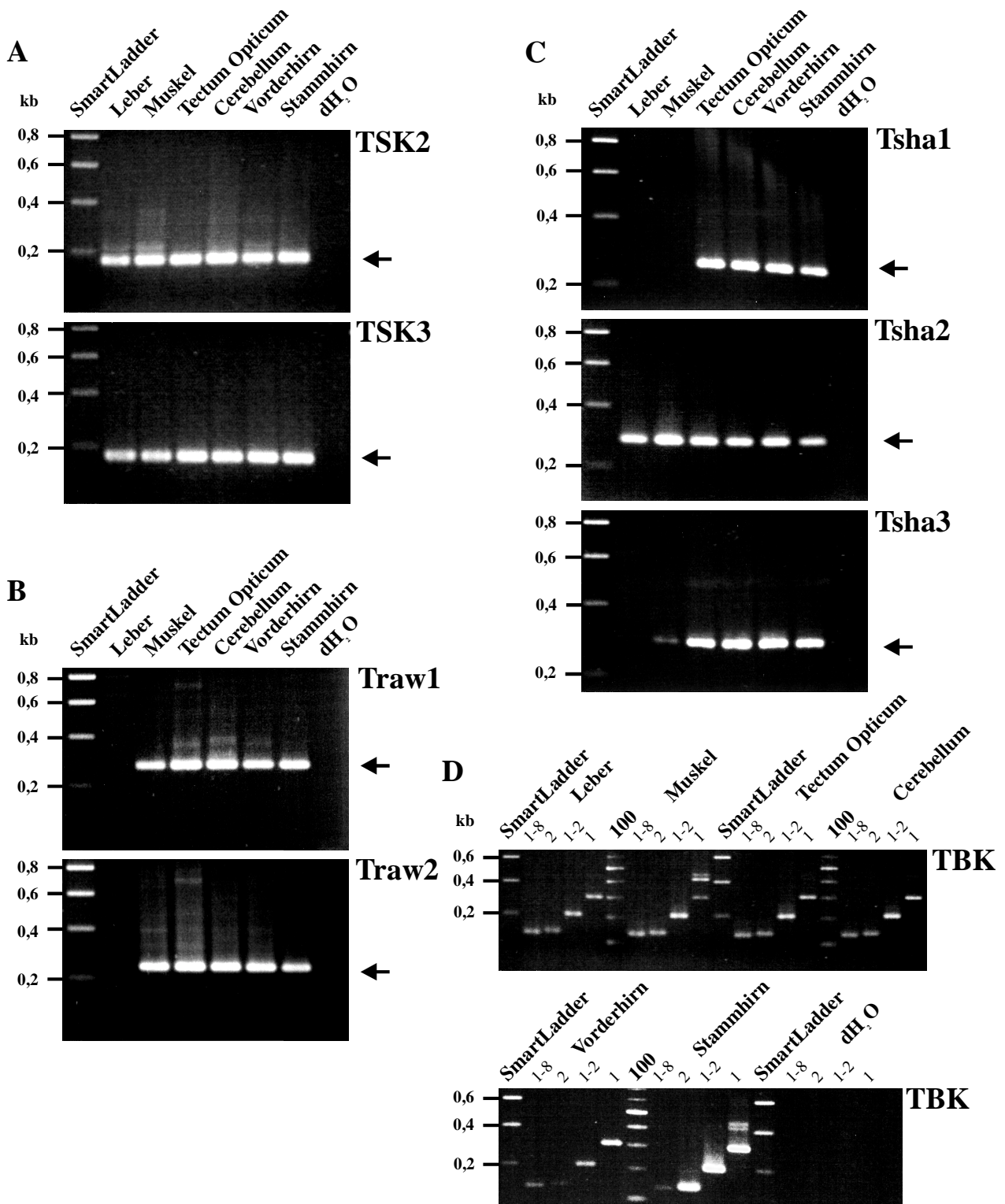


Abb. 25: Expression von Kaliumkanaltranskripten in unterschiedlichen Geweben der adulten Regenbogenforelle. (A) TSK-Kanäle (TSK2 306 bp; TSK3 303 bp); (B) Shaw-Kanäle (Traw1, 277 bp; Traw2, 249 bp); (C) Shaker-Kanäle (Tsha1, 264 bp; Tsha2, 286 bp; Tsha3, 281 bp); (D) TBK-Isoformen (TBK1-8, 121 bp; TBK2, 129 bp; TBK1-2, 211bp; TBK1, 307 bp). Die Fragmentgrößen wurden durch Vergleich mit dem DNA-SmartLadder- bzw. 100bp-Standards bestimmt. Kontrollreaktionen wurden in dH₂O durchgeführt. Es wurden 500 ng cDNA pro Reaktion eingesetzt. Annealingtemperaturen: 58 °C.

3.4.2.2 Expressionsanalyse der Kaliumkanalproteine durch Westernblot

Durch RT-PCR können zwar Transkripte der entsprechenden Kaliumkanalgene nachgewiesen werden, jedoch ist noch kein Nachweis der Translationsprodukte erbracht. Diese Lücke kann durch den Nachweis der Kanalproteine in den Membranfraktionen der jeweiligen Gewebe mittels Westernblotanalyse geschlossen werden. Die Transkripte aller untersuchten Kaliumkanalgene konnten in allen vier großen Hirnregionen nachgewiesen werden. Deswegen wurde in diesen Experimenten die Unterteilung des Hirns in seine Regionen nicht weiter verfolgt, sondern die Analyse auf das gesamte Hirn der Forelle erweitert.

Die Detektion der Proteine im Westernblot konnte mit den affinitätsgereinigten, polyklonalen Antikörpern gegen Tsha1/2/3, Traw1 und TSK2 durchgeführt werden (3.2.1). Das Tsha1-Protein wurde in der Membranfraktion des Forellenhirns, in hervorragender Übereinstimmung mit den Versuchen an Membranfraktionen der Insektenzellen (3.3.1.1), mit einem apparenten Molekulargewicht von 64 kDa detektiert (Abb. 26 A). Der Westernblot bestätigt die Befunde aus der RT-PCR-Analyse (3.4.2.1), in der Tsha1 im Lebergewebe und im Muskel nicht identifiziert werden konnte. Das experimentell ermittelte Molekulargewicht weist erneut eine Differenz von 8 kDa zum kalkulierten Molekulargewicht von 56 kDa auf, was die Hypothese einer posttranslationalen Modifikation (3.4.2.1) von Tsha1 noch einmal unterstreicht.

Der Tsha2-Antikörper erkennt im Westernblot eine schwache Bande von ca. 62 kDa Größe im Muskel und im Hirn der Forelle, während in der Leber keine Bande der gleichen Größe auftaucht (Abb. 26 B). Die Westernblotanalysen an heterolog exprimierenden Insektenzellen ließen eine Bande dieser Größenordnung erwarten, weil in diesem Zellsystem das Tsha2-Protein, vermutlich aufgrund einer Glykosylierung, ein verändertes Laufverhalten mit einer Differenz von 7-8 kDa aufwies (3.3.1.1). In den Spuren der Membranfraktionen von Muskel und Hirngewebe erkennt man außerdem zwei stark immunpositive Banden in der Größenordnung von 35 kDa. Diese Banden könnten ein Hinweis auf den proteolytischen Verdau von Tsha2 während der Membranpräparation sein, da diese Banden zudem in den Spuren der Muskel- bzw. Hirnmembranfraktionen zu finden sind. Der Nachweis des Tsha2-Transkriptes in der Leber durch RT-PCR steht nicht im Gegensatz zu dem Befund dieses Westernblots, sondern spiegelt möglicherweise die unterschiedliche Sensitivität der Detektionsmethoden wieder.

Tsha3 wurde im Westernblot als dominante Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 64 kDa in den Membranfraktionen des Muskels und des Hirnes, jedoch nicht der Leber detektiert (Abb. 26, C). Diese Daten stehen in guter Übereinstimmung mit den Befunden der RT-PCR-Analyse (3.4.2.1). Das experimentell an Forellengewebe ermittelte Molekulargewicht entspricht exakt dem kalkulierten Molekulargewicht, zeigt jedoch auch, daß das veränderte Laufverhalten in der SDS-PAGE von Tsha3 aus den Experimenten mit heterolog exprimierenden Insektenzellen (3.3.1.1) keine Rolle im natürlichen System spielen. In der Abbildung 26 C sind zusätzlich zu den 64 kDa-Banden noch weitere niedermolekulare Banden zu erkennen, die auf einen möglichen proteolytischen Verdau des Zielproteins, oder auf eine Kreuzreaktivität des Antikörpers mit Proteinen dieser Größenordnungen hindeuten.

Der Traw1-Antikörper färbt im Immunblot zwei Banden mit apparenten Molekulargewichten von 94 und 63 kDa in den Muskel- und Hirnmembranfraktionen an (Abb. 26 D). Die RT-PCR ließ bereits erwarten (3.4.2.1), daß in der Leber kein Traw1-Protein detektierbar ist. Das aus der Primärsequenz hergeleitete Molekulargewicht beträgt 67 kDa. Die 63 kDa-Bande ist folglich zu klein, um das gesuchte Protein darzustellen, es könnte sich jedoch um eine durch alternatives Spleißen entstandene Isoform des Proteins handeln. In der Westernblotanalyse der heterolog exprimierenden Insektenzellen konnte Traw1 bereits mit einem Molekulargewicht von 94 kDa identifiziert werden (3.3.1.1). Die im Forellengewebe

nachgewiesene 94 kDa-Bande unterstützt also den Befund der vorherigen Experimente, daß Traw1 vermutlich hochglykosyliert vorliegt.

In der Membranfraktion des Forellenhirns wurde mit dem TSK2-Antikörper immunologisch eine ca. 63 kDa große Bande detektiert, während im Muskelgewebe eine dominante Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 70 kDa angefärbt wurde (Abb. 26 E). Das kalkulierte und in heterolog exprimierenden Insektenzellen experimentell determinierte Molekulargewicht von TSK2 liegt in guter Übereinstimmung mit dem experimentell an Forellenhirngewebe bestimmten Molekulargewicht bei 62-64 kDa. Die Differenz zu der in Muskelgewebe angefärbten Bande kann durch eine mögliche differentielle Expression einer weiteren, bisher unbekanntes Isoform des TSK2-Proteins erklärt werden. Der fehlende immunologische Nachweis des TSK2-Proteins im Lebergewebe, wie eigentlich durch die RT-PCR erwartet, spiegelt die unterschiedliche Sensitivität der beiden Detektionsmethoden wieder: Mit der PCR können selbst geringste Spuren mRNA nachgewiesen werden. Möglicherweise liegt aber auch eine translationale Hemmung des Proteins vor.

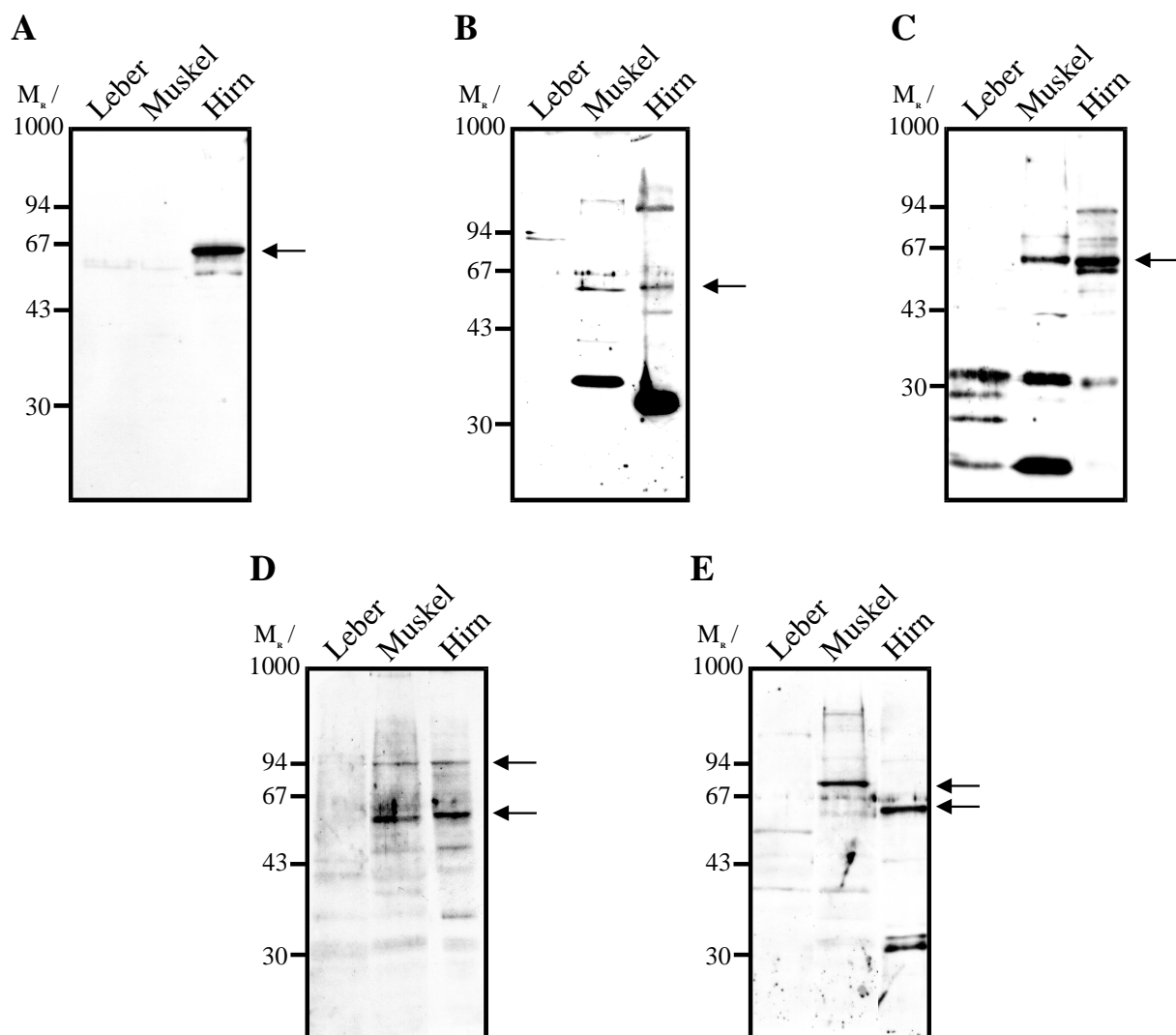


Abb. 26: Immunblotanalysen von Membranfraktionen (100000 g Pellet) unterschiedlicher Gewebe der Forelle. Die Detektion erfolgte mit den entsprechenden Antikörpern: (A) Tsha1 (Kaninchen); (B) Tsha2; (C) Tsha3; (D) Traw1; (E) TSK2. Das Molekulargewicht der Proteine wurde mit Hilfe eines Molekulargewichtstandards in einer Kontrollspur bestimmt. Jede Spur wurde mit 12,5 mg Gesamtprotein der Membranfraktion beladen. Die Immunreaktionen konnten mit den Peptiden, die zur Immunisierung genutzt worden waren, inhibiert werden.

3.4.2.3 Expressionsanalyse der Kaliumkanalproteine durch Immunhistochemie

Die differentielle Expression der Kaliumkanalproteine wurde mit den affinitätsgereinigten Antikörpern an Gefrierschnitten untersucht. Die Untersuchungen wurden an Geweben aus dem ZNS der Forelle und dem Muskel durchgeführt, um Informationen über die zelltypspezifische Expression der Kaliumkanäle zu erhalten.

Im Muskelgewebe wurde eine starke Anfärbung der Zellmembranen mit den Tsha2- und Tsha3-Antikörpern beobachtet (Abb. 27 B/C), während der Tsha1-Antikörper keine Anfärbung des Muskelgewebes verursachte. Traw1 und TSK2 waren immunhistochemisch nur schwach zu detektieren. Diese Daten zeigen eine exakte Übereinstimmung mit den Ergebnissen der RT-PCR- und der Westernblotanalysen.

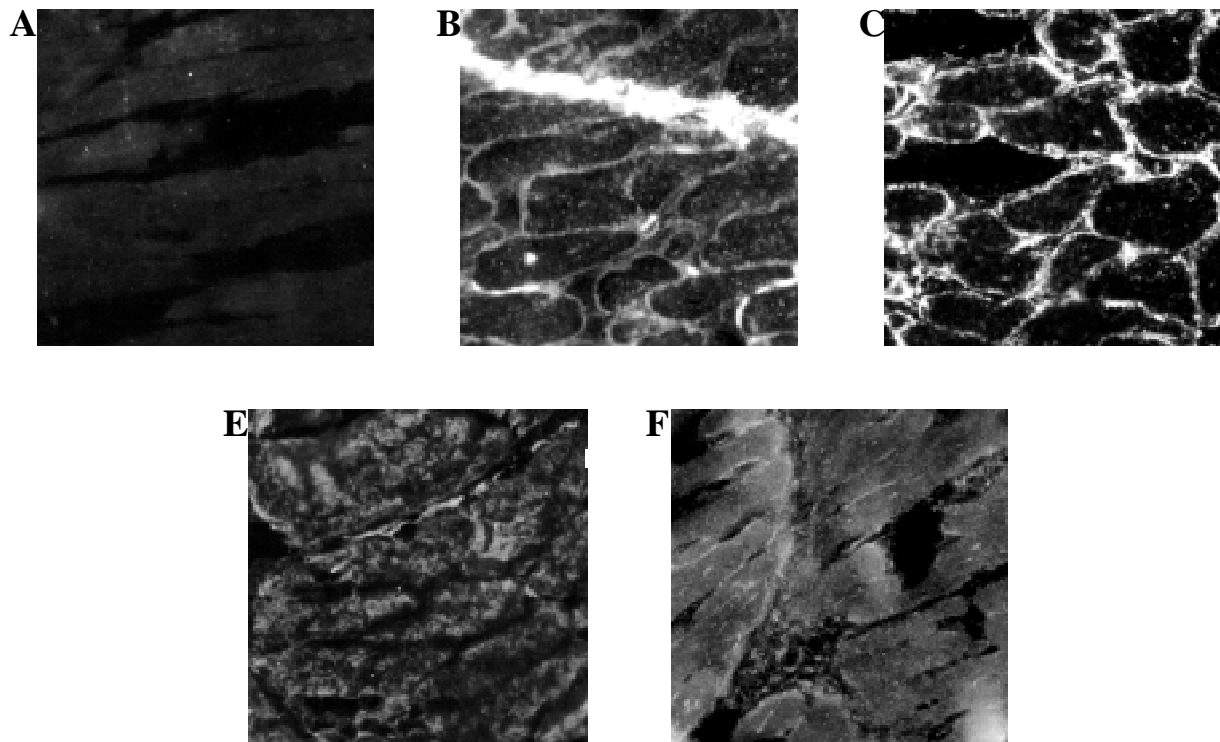


Abb. 27: Immunhistochemische Analyse des Forellenmuskelgewebes. Gefrierschnitte von 10 µm wurden mit den entsprechenden Antikörpern gegen Kaliumkanäle der Forelle detektiert. (A) Tsha1 (Kaninchen); (B) Tsha2; (C) Tsha3; (D) Traw1; (E) TSK2. Der Sekundärantikörper war mit CY3 konjugiert. Kontrollreaktionen wurden mit den Peptiden aus der Immunisierung und Kaninchenimmunglobulinen durchgeführt und zeigten Immunreaktivitäten wie in (A).

Die immunhistochemische Analyse des *Cerebellum* der Forelle lieferte eine differentielle Expression der untersuchten Kaliumkanäle innerhalb dieses Gehirnbereiches. Tsha1-Antikörper färbten die Purkinje-Zellen im *Stratum ganglionare*, inklusive ihrer Dendritenbäume im *Stratum moleculare*, selektiv an. Tsha2 hingegen wurde überwiegend in den Körnerzellen des *Stratum granulosum* gefunden wurde. Tsha3 konnte immunhistochemisch nur in den Endfüßen der radialen Gliazellen des *Stratum moleculare* nachgewiesen werden. Der Traw1-Antikörper zeigte eine starke, selektive Färbung der Zellkörper der Purkinje-Zellen, die auch positiv auf TSK-2 getestet wurden, allerdings mit schwächerer Intensität (Abb. 28).

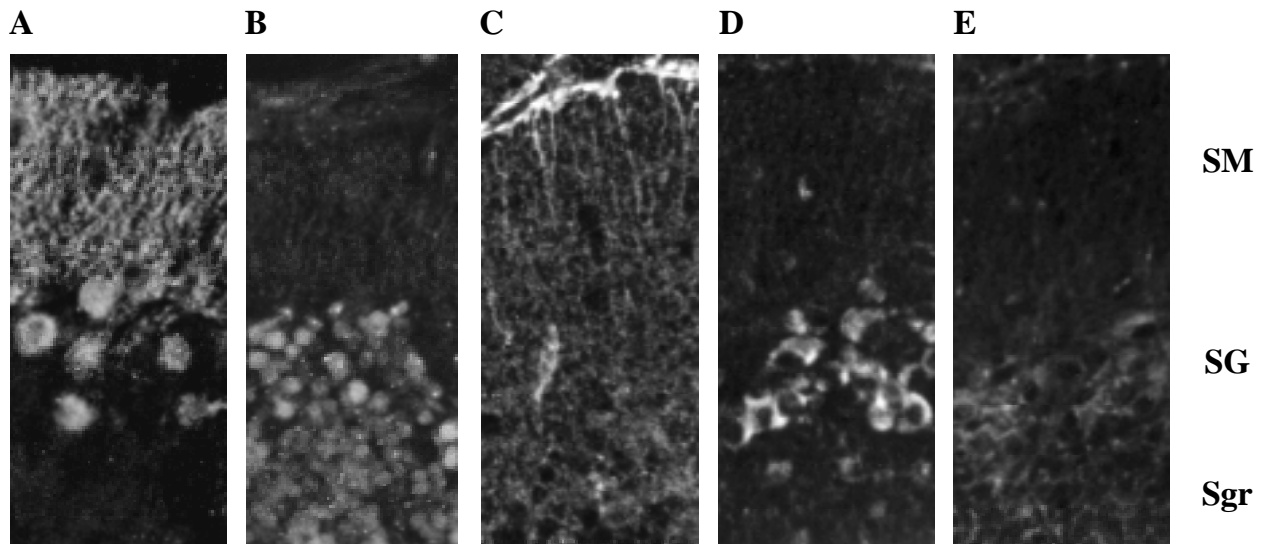


Abb. 28: Immunhistochemische Analyse des Cerebellum der Forelle. Sagittale Gefrierschnitte wurden mit den entsprechenden Antikörpern gegen Kaliumkanäle der Forelle detektiert. (A) Tsha1; (B) Tsha2; (C) Tsha3; (D) Traw1; (E) TSK2. Der Sekundärantikörper war mit CY3 konjugiert. Kontrollreaktionen wurden mit den Peptiden, gegen welche die Antikörper gemacht wurden, und Kaninchenimmunglobulinen durchgeführt und zeigten keine Immunreaktivität. **SM** *Stratum moleculare*; **SG** *Stratum ganglionare*; **Sgr** *Stratum granulosum*.

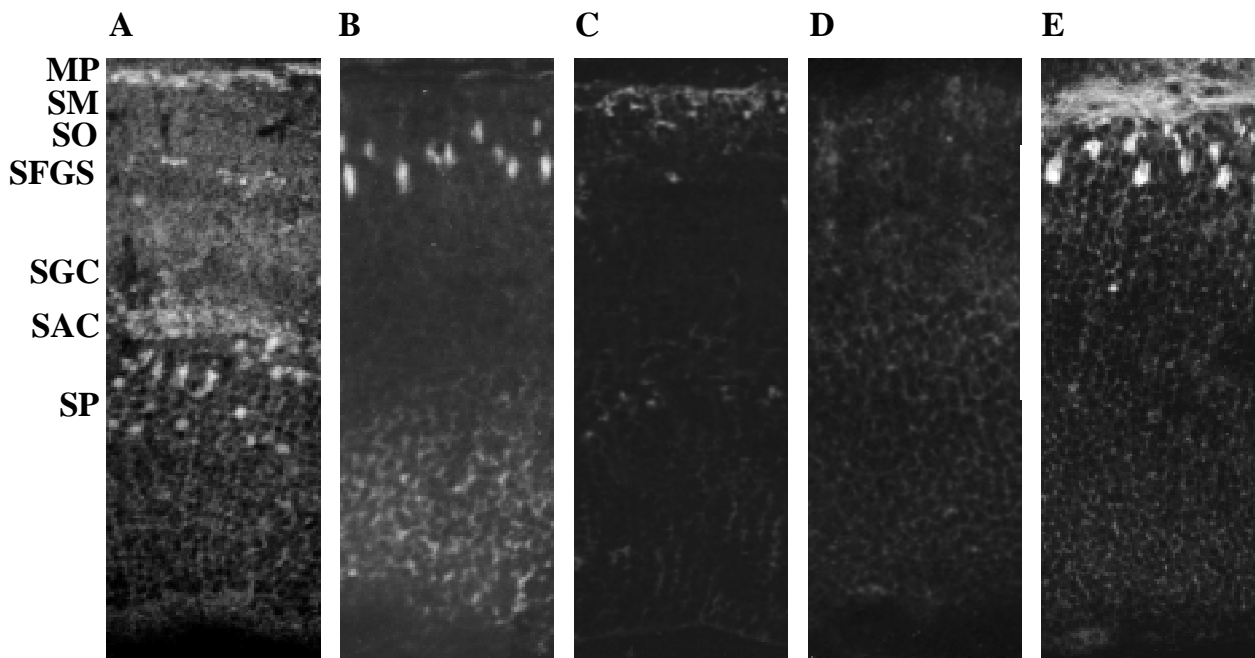


Abb. 29: Immunhistochemische Analyse des Tectum opticum der Forelle. Sagittale Gefrierschnitte wurden mit den entsprechenden Antikörpern gegen Kaliumkanäle der Forelle detektiert. (A) Tsha1; (B) Tsha2; (C) Tsha3; (D) Traw1; (E) TSK2. Der Sekundärantikörper war mit CY3 konjugiert. Kontrollreaktionen wurden mit den Peptiden, gegen welche die Antikörper gemacht wurden, und Kaninchenimmunglobulinen durchgeführt und zeigten keine Immunreaktivität. **MP** *Meninx primitiva*; **SM** *Stratum marginale*; **SO** *Stratum opticum*; **SFGS** *Stratum fibrosum et griseum superficiale*; **SGC** *Stratum griseum centrale*; **SAC** *Stratum album centrale*; **SP** *Stratum periventriculare*.

Im *Tectum opticum* der Regenbogenforelle konnten Traw1 und Tsha3 mittels Immunfluoreszenz nicht detektiert werden, Tsha2 und TSK2 hingegen wurden in den Pyramidalzellen des *Stratum fibrosum et griseum superficiale* (SFGS) nachgewiesen.

Während mit dem TSK2-Antikörper auch die Dendriten der Pyramidalzellen im *Stratum marginale* angefärbt wurden, war Tsha2 nur im Soma der Pyramidalzellen zu finden. Auch Periventricularneurone (PV) zeigten eine leichte Immunreaktivität gegenüber dem Tsha2-Antikörper. Eine Subpopulation der Zellen im *Stratum periventriculare* (SPV) exprimiert selektiv Tsha1. Dieser Kaliumkanal wurde immunhistochemisch außerdem noch in Zellen des *Stratum album centrale* (SAC) und im *Stratum marginale* (SM) gefunden (Abb. 29).

Der *Saccus Vasculosus* (Abb. 30 D) ist ein in seiner Funktion noch vollkommen unverstandener Teil des Gehirnes von Knochenfischen. Die Struktur dieses Gewebes wird dominiert von drei Subtypen von Kronenzellen, welche von Gliazellen separiert werden. Tsha3 wurde im Soma der Kronenzellen, in ihren papillären Ausstülpungen und verstärkt in den Gliazellen immunhistochemisch detektiert. Tsha2 konnte im Gegensatz dazu ausschließlich in den papillären Ausstülpungen gefunden werden, in denen auch TSK2 vorzufinden ist. Der TSK2-Antikörper zeigte jedoch zusätzlich eine starke Anfärbung der Gliazellen (Abb. 30 A-C).

Tsha1 wurde in besonders hohem Maße im Riechepithel der Regenbogenforelle nachgewiesen. Eine ähnlich starke Immunreaktivität lag im Tegmentum bezüglich des Traw1-Antikörpers vor, der dort einen ganzen Satz sehr großer Neurone färbte (Abb. 30 E/F).

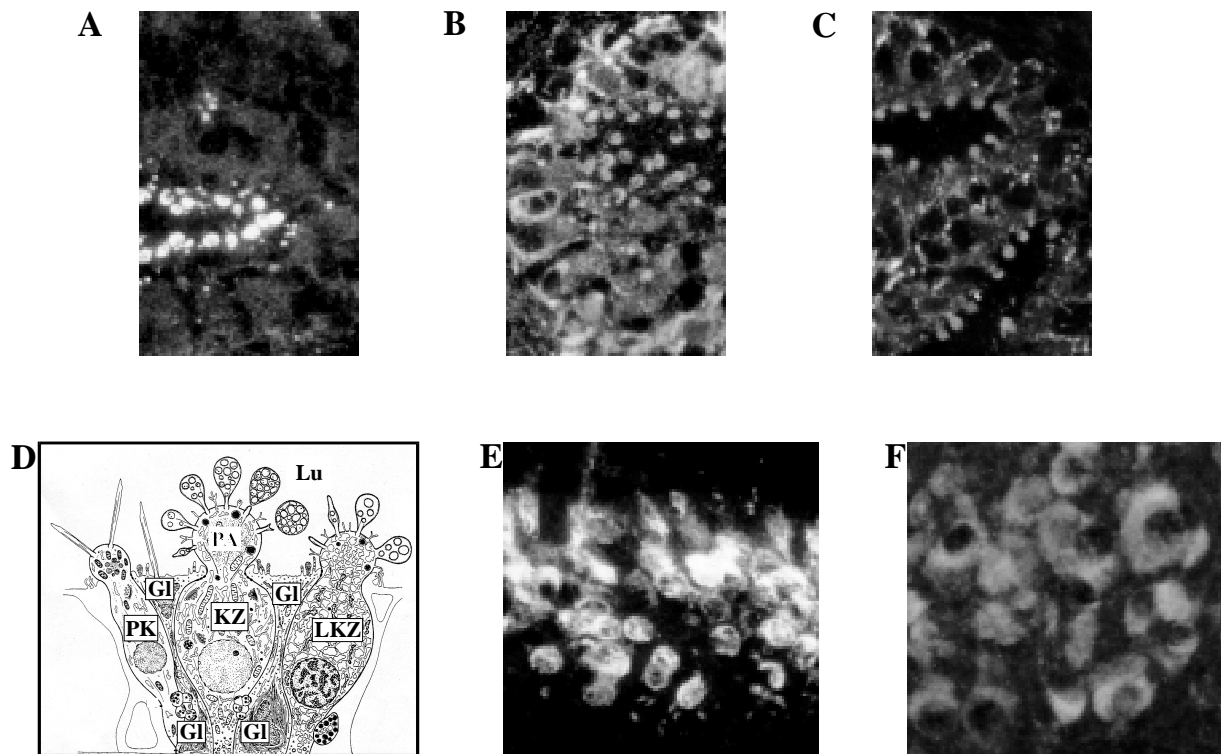


Abb. 30: (A)-(C) Immunhistochemische Analyse des Saccus vasculosus der Forelle. 10 µm dicke sagitale Gefrierschnitte wurden mit den Antikörpern gegen Tsha2 (A), Tsha3 (B) und TSK2 (C) inkubiert. (D) Schematische Zeichnung der Morphologie des Saccus vasculosus. Lu Lumen; GI Gliazellen; KZ Kronenzellen; LKZ leichte Kronenzellen; PK Pseudokronenzellen; PA papilläre Ausstülpungen (modifiziert nach Jansen, 1975). (E) hohe Immunreaktivität des Riechepithels gegenüber dem Tsha1-Antikörper. (F) Zellen im Tegmentum der Forelle mit hoher Immunreaktivität gegenüber dem Traw1-Antikörper. Der Sekundäntikörper war mit CY3 gekoppelt. Kontrollreaktionen mit den Kontrollpeptiden und Präimmunsereen zeigten keine Anfärbung des Gewebes.

Die Retina der Forelle zeigte die höchste Diversität der zellspezifischen Kaliumkanalexpression: Der Tsha1-Antikörper färbte mit enormer Intensität und Selektivität die äußere plexiforme Schicht (AP), in der die Photorezeptorsynapsen und die Horizontalzellen lokalisiert sind. Nur geringe Immunreaktivität konnte bezüglich der amakrinen (AZ) und der Ganglienzellen (GZ) festgestellt werden.

Tsha2 wurde in Ganglienzellen, amakrinen Zellen, und in den Fasern und Synapsen der Photorezeptorzellen (PZ) detektiert. Die äußere plexiforme Schicht besaß auch hier die stärkste Immunreaktivität. Analysiert man die Signalverteilung der Immunhistochemie für Tsha3 in der Retina, waren besonders die starke Anfärbung der Endfüße der radialen Gliazellen der Retina, der Müllerzellen auffallend, wodurch die schwächere Fluoreszenz der Ganglienzellen nur schwer wahrgenommen werden konnte. Die Photorezeptorzellen zeigten eine nahezu einheitliche Fluoreszenz der gesamten Membranen. In der äußeren plexiformen Schicht konnten sogar die schwer zugänglichen, quer angeschnittenen Horizontalzellen mit dem Tsha3-Antikörper detektiert werden. Traw1 ließ sich in den Zellkörpern der Photorezeptorzellen, der amakrinen Zellen und der Ganglienzellen nachweisen. Der TSK2-Antikörper zeigte eine starke Immunreaktivität mit den Tractusfasern (TF) der Ganglienzellen. Auch die Zellkörper dieser Zellen wurden angefärbt, ähnlich wie die Zellkörper der amakrinen Zellen. Die äußere plexiforme Schicht zeigte ebenfalls eine ausgeprägte Immunfluoreszenz, wie auch die Zellkörper der Photorezeptorzellen (Abb. 31).

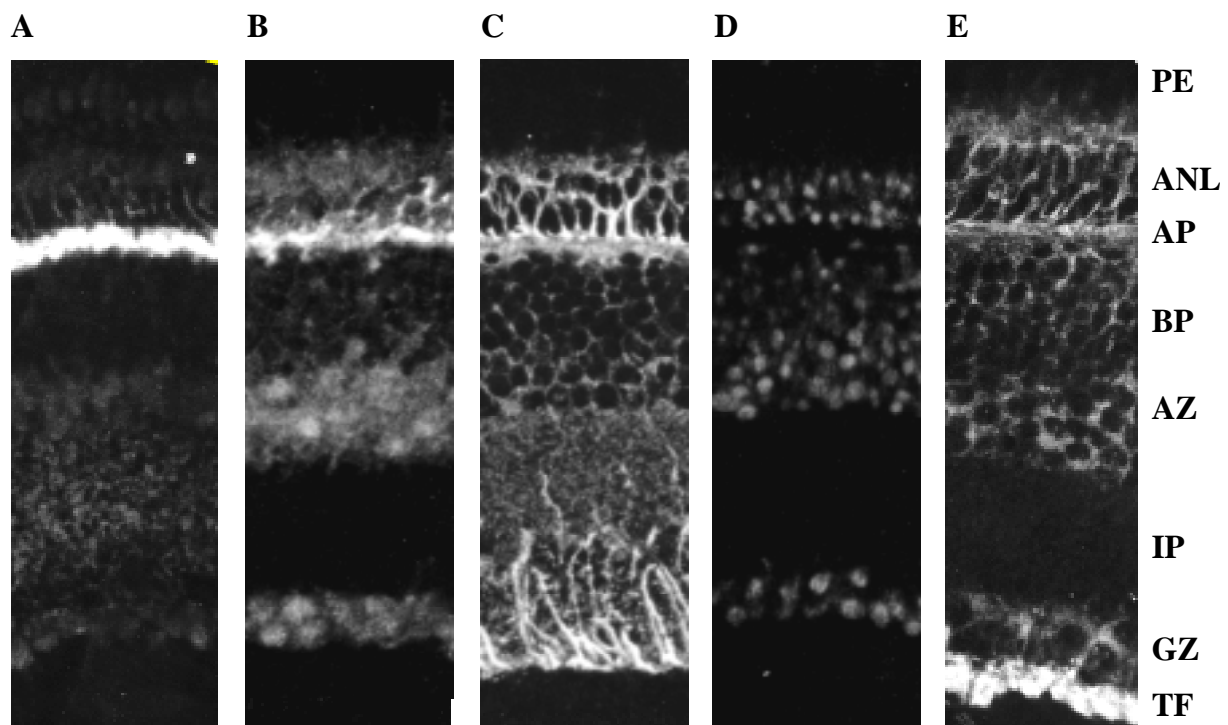


Abb. 31: Immunhistochemische Analyse der Retina der Forelle. 10 μ m dicke Gefrierschnitte wurden mit den entsprechenden Antikörpern gegen Kaliumkanäle der Forelle gefärbt. (A) Tsha1 (Kaninchen); (B) Tsha2; (C) Tsha3; (D) Traw1; (E) TSK2. Der Sekundärantikörper war mit CY3 konjugiert. Kontrollreaktionen wurden mit den Peptiden, gegen welche die Antikörper gemacht wurden, und Kaninchenimmunglobulinen durchgeführt und zeigten keine Immunreaktivität. PE Pigmentepithel; ANL äußere Körnerschicht; AP äußere plexiforme Schicht; BP bipolare Zellen; AZ amakrine Zellen; INL innere Körnerschicht; IP innere plexiforme Schicht; GZ Ganglienzellen; TF Tractusfasern.

3.4.2.4 Expressionsanalyse der Kaliumkanalproteine in retinalen Neuronen

Die Neurone der Retina erfüllen unterschiedliche Aufgaben in einem komplizierten Netzwerk. Um die elektrischen Eigenschaften dieser Neurone mit dem Expressionsmuster verschiedener Kaliumkanalproteine korrelieren zu können, wurden die Kaliumkanalproteine immunzytochemisch in frisch präparierten retinalen Neuronen nachgewiesen.

Morphologisch ließen sich im Phasenkontrastmikroskop sehr einfach die Photorezeptorzellen und die Ganglienzellen innerhalb der fixierten Retinadissoziat/Retinaprints von den übrigen Zellen unterscheiden. Die Photorezeptoren zeichneten sich durch ihre langgezogene Form aus, an deren Ende an einem Faserstück die Rezeptorsynapse als kleiner Kegel zu erkennen war. Nach dem enzymatischen Verdau der Retina konnte allerdings keine Differenzierung dieser Zellen in Zapfen oder Stäbchen vorgenommen werden. Ganglienzellen waren vor allen Dingen durch ihre Größe und das zum Teil noch mehrere Mikrometer lange Axon zu identifizieren. Es wurden deshalb ausschließlich Ganglienzellen, die ein entsprechendes Axon besaßen in der immunzytochemischen Auswertung berücksichtigt. Alle übrigen Zellen waren nach der Isolation im Phasenkontrast nicht mehr zu unterscheiden, da sie keine morphologisch identifizierbaren Merkmale besaßen. Allerdings konnten nach der

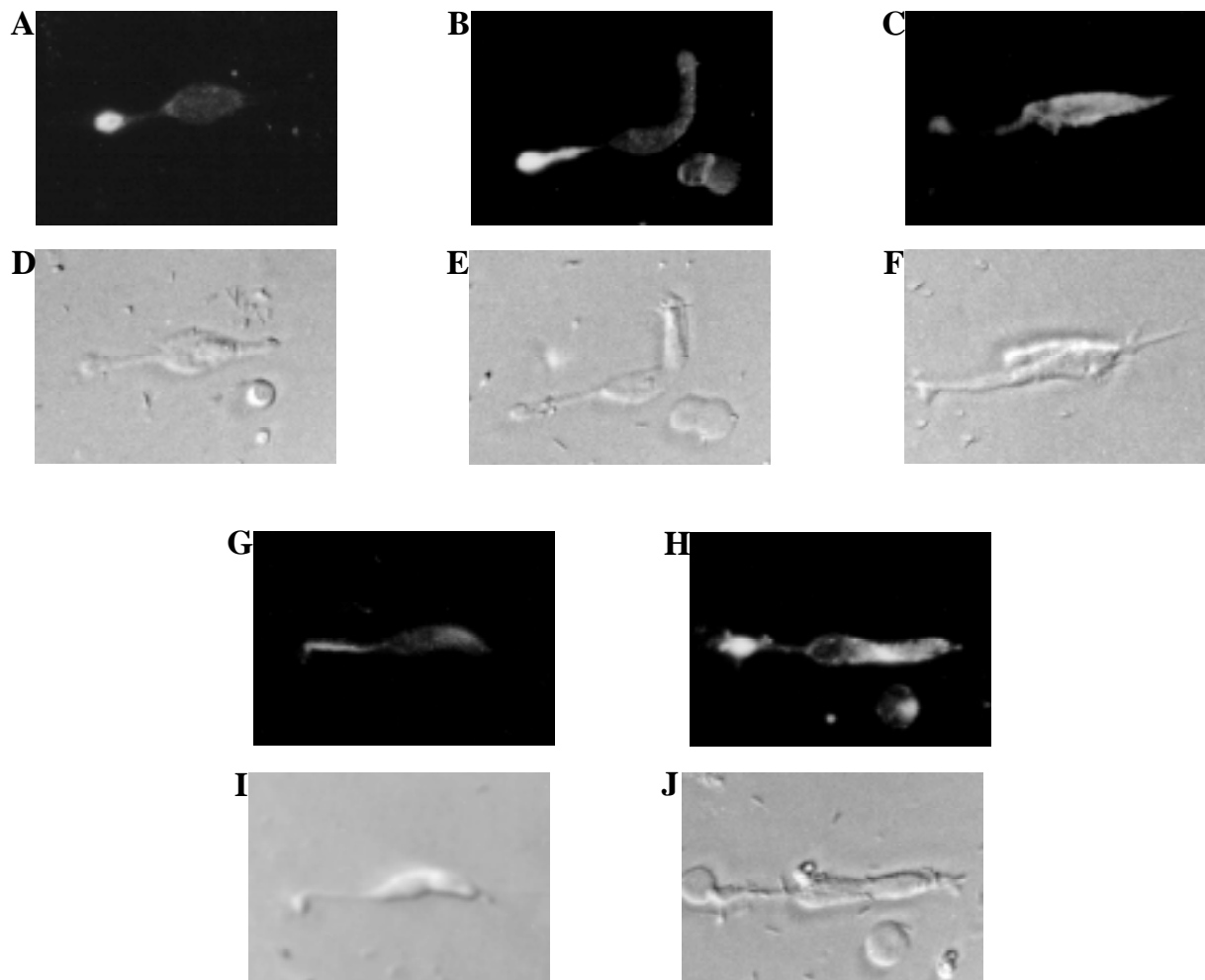


Abb. 32: Immunzytochemische Analyse der Photorezeptorzellen der Forelle mit den korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen. (A/D) Anti-Tsha1, (B/E) Anti-Tsha2, (C/F) Anti-Tsha3, (G/I) Anti-Traw1, (H/J) Anti-TSK2. Der Sekundärantikörper war mit CY3 gekoppelt. Kontrollreaktionen mit den Kontrollpeptiden und Präimmunseren zeigten keine Immunreaktivität.

Immunzytochemie die Horizontalzellen morphologisch identifiziert werden: Diese Zellen waren sehr flach und aus diesem Grund im Phasenkontrast kaum zu finden. Erst die immunzytochemische Anfärbung dieser Zellen machte sie detektierbar. Das äußerst flache und flächig verzweigte Aussehen ist charakteristisch für diesen Zelltyp. Deshalb konnten Horizontalzellen die gar nicht, oder nur schwach immunologisch positiv waren in den übrigen Präparaten nicht erkannt werden.

Die Photorezeptorzellen zeigen eine spezifische subzelluläre Verteilung der Kaliumkanäle. Tsha1 war nahezu ausschließlich in der Rezeptorsynapse zu detektieren, während Tsha2 sowohl in der Synapse als auch in der zugehörigen Rezeptorfaser gefunden wurde. Der Tsha3-Antikörper färbte sowohl die Rezeptorsynapse, als auch das innere und äußere Segment dieser Zellen an. Traw1 wurde ausschließlich in der Rezeptorfaser und dem äußeren Segment mit nur geringer Immunreaktivität nachgewiesen, während TSK2 in der gesamten Photorezeptorzelle zu detektieren war (Abb. 32).

Die Ganglienzellen der Retina zeigten kein vergleichbar starkes differentielles Expressionsmuster auf subzellulärem Niveau. Alle untersuchten Kaliumkanäle (Tsha1, Tsha2, Tsha3, Traw1, TSK2) konnten in diesem Zelltyp nachgewiesen werden. Die Tsha1- und Traw1-Antikörper zeigten nur eine sehr geringe Anfärbung der Zellen, in denen auch nur die Somata fluoreszierten. Von diesen beiden Kaliumkanälen zeigt Tsha1 die geringste Immunreaktivität, welche, berücksichtigt man die enorme Anfärbung der Photorezeptorsynapsen, auf ein nur äußerst geringes Tsha1-Expressionsniveau in diesen Zellen schließen läßt. Tsha2, Tsha3 und TSK2 konnten allerdings sowohl im Soma als auch im Axon der Ganglienzellen mit einem deutlich stärkeren Signal detektiert werden (Abb. 33).

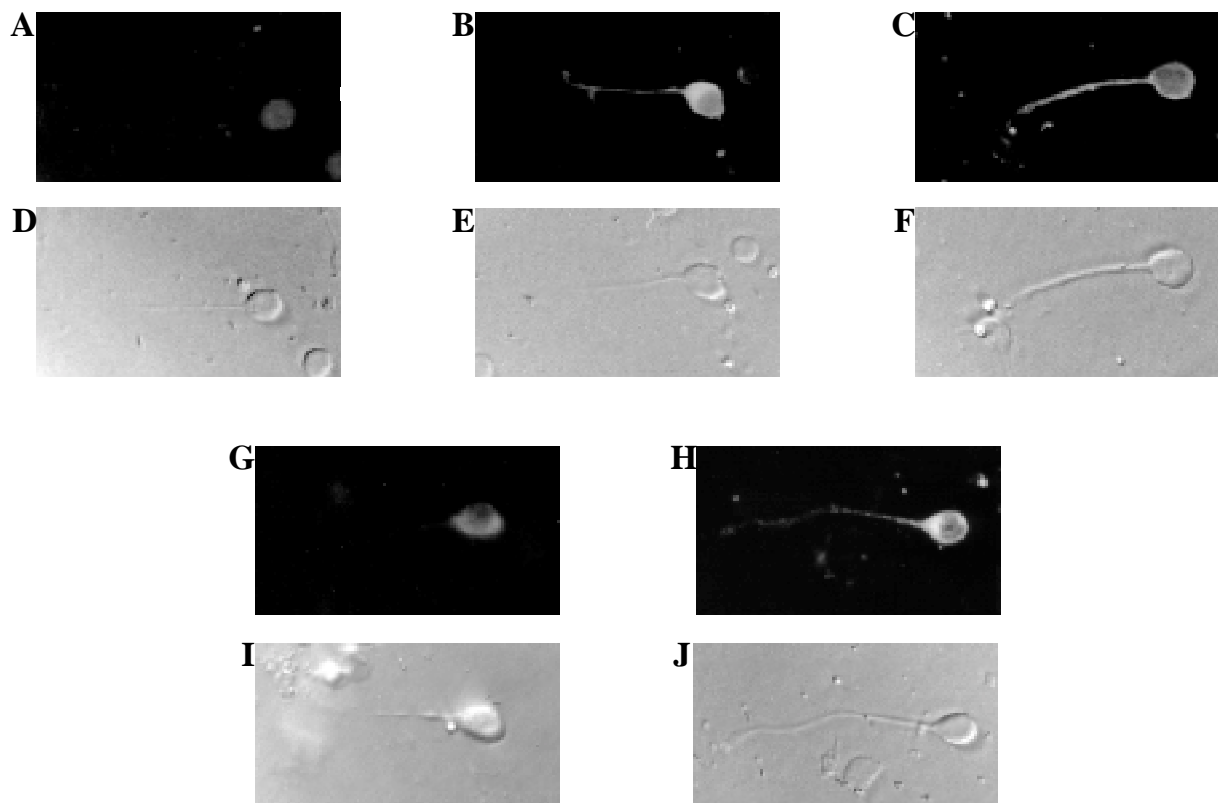


Abb. 33: Immunzytochemische Analyse der Retinaganglienzellen der Forelle mit den korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen. (A/D) Anti-Tsha1; (B/E) Anti-Tsha2; (C/F) Anti-Tsha3; (G/I) Anti-Traw1; (H/J) Anti-TSK2. Der Sekundärantikörper war mit CY3 gekoppelt. Kontrollreaktionen mit den Kontrollpeptiden und Präimmunseren zeigten keine Immunreaktivität.

Horizontalzellen konnten erst in den Präparaten erkannt werden, wenn sie immunologisch deutlich positiv waren. Nur die drei *Shaker*-Kanäle Tsha1, Tsha2, und Tsha3 wurden auf diesem Wege in den Horizontalzellen nachgewiesen. Während Tsha1 und Tsha2 überwiegend in der somatischen Plasmamembran gefunden wurden, war Tsha3 vor allen Dingen in den Dendriten dieser Zellen lokalisiert (Abb. 34).

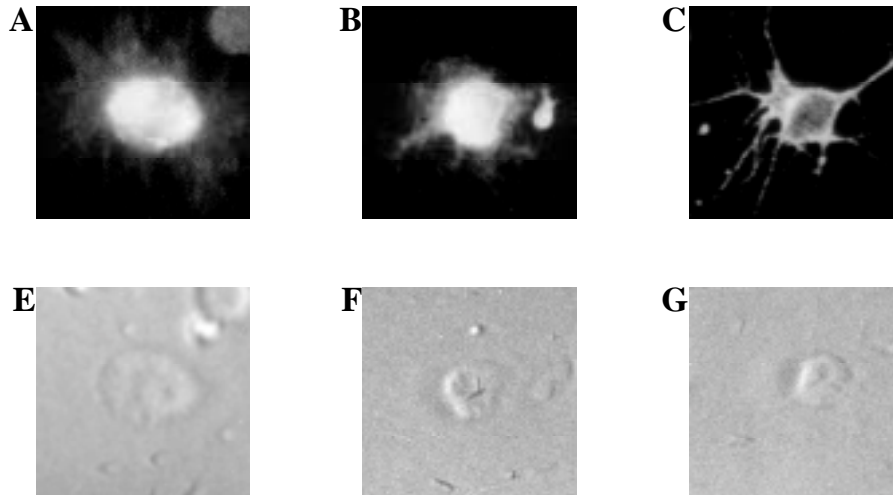


Abb. 34: Immunzytochemische Analyse der Horizontalzellen der Forelle mit den korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen. (A/E) Anti-Tsha1; (B/F) Anti-Tsha2; (C/G) Anti-Tsha3. Der Sekundärantikörper war mit CY3 gekoppelt. Kontrollreaktionen mit den Kontrollpeptiden und Präimmunsereen zeigten keine Immunreaktivität.

3.5 Elektrophysiologie

Zur elektrophysiologischen Charakterisierung der im Verlauf dieser Arbeit klonierten Kaliumkanäle wurden die heterolog in Sf21-, OLN-93 oder CHO-Zellen exprimierte, rekombinante Proteine vermessen. Die hier präsentierten Daten wurden alle im Ganzzellmodus der Patch-Clamp-Technik von Dr. Holger Rabe, Jutta Henne und Tanja Piwowarski ermittelt. Um elektrischen Kontakt zu vermeiden, wurden ausschließlich isolierte Zellen genutzt. Infizierte bzw. transfizierte Zellen wurden durch ihre mittels Coexpression gewonnene GFP-Fluoreszenz detektiert. Nur die elektrophysiologischen Eckdaten dieser Messungen werden im Folgenden dargestellt. In allen Messungen zeigten die nicht infizierten Sf21-Zellen ein Membranpotential von 0 mV und nahezu keine spannungsgesteuerten Ströme.

3.5.1 Traw1

Die spannungsgesteuerten Ganzzellströme der Traw1-exprimierenden Sf21-Zellen wurden analysiert, indem die Zellen auf ein Haltepotential von -60 mV geklemmt wurden, gefolgt von depolarisierenden Spannungsstufen bis auf 100 mV in 10 mV-Schritten (Abb. 35). Die Aktivierungsschwelle von Traw1 lag bei -10 bis -20 mV. Die Ströme gingen nicht in eine Sättigung über, sondern erhöhten sich innerhalb der Spannungsschritte von bis zu +100 mV. Die Aktivierungskinetik war schnell und ließ sich mit einem einzigen Exponenten

beschreiben. Oberhalb von Spannungen von +40 mV zeigten die Traw1-Ströme eine partielle Inaktivierung bis auf einen Gleichgewichtswert, der über eine Testpulsdauer von 500 ms gehalten wurde. Dieses Muster veränderte sich auch nicht durch zehnfache Erhöhung der intrazellulären Kaliumionenkonzentration oder einen Austausch von Natriumionen durch Tris im extrazellulären Medium. Das Umkehrpotential der Ströme wurde bestimmt, indem die Zellen von einem Haltepotential von -60 mV für 50 ms auf 60 mV depolarisiert und anschließend auf Testspannungen von -20 bis -120 mV in 10 mV-Inkrementen geklemmt wurden. In Badlösungen mit 35 mM Kaliumionen lag das Umkehrpotential bei -34,8 mV, sehr nahe am Nernst'schen Kaliumgleichgewichtspotential von -33,6 mV. Allerdings führte die Verringerung der extrazellulären Kaliumionenkonzentration auf ein Zehntel der Ausgangskonzentration zu einer Veränderung des Umkehrpotentials von nur 30 mV, was signifikant geringer ist als durch die Nernst-Gleichung vorhergesagt.

Die pharmakologischen Eigenschaften des Auswärtsstromes von Traw1 wurden mit den externen Kaliumkanalblockern Tetraethylammonium (TEA), 4-Aminopyridin (4-AP), α -Dendrotoxin (DTX), Apamin und Chinin untersucht. Apamin (bis zu 7,5 μ M) und DTX (bis zu 2 μ M) zeigten keine Beeinflussung der Stromeigenschaften, während eine hohe Sensitivität des Traw1-vermittelten Stromes bezüglich der extrazellulär applizierten Toxine TEA, 4-AP und Chinin zu messen war. Dosis-Wirkungs-Experimente ergaben einen IC_{50} der halb-

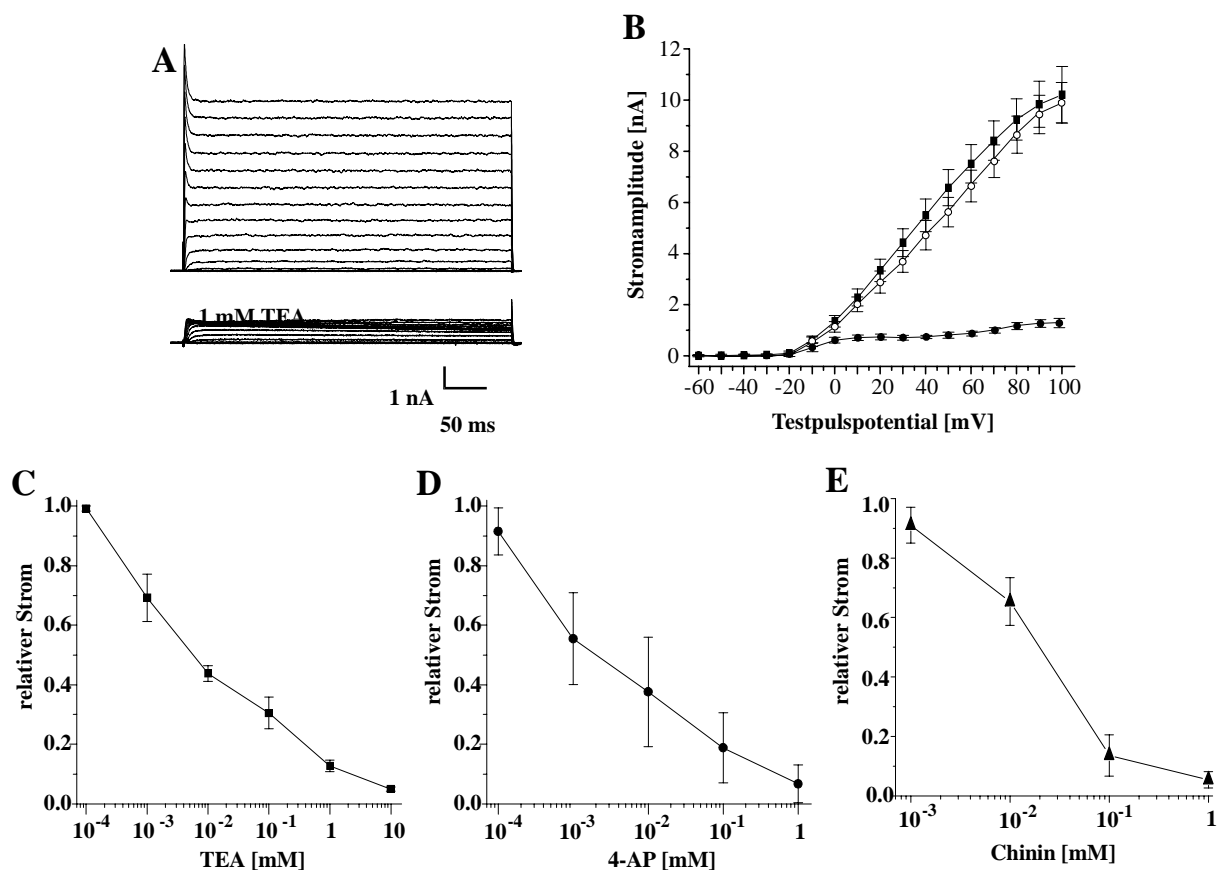


Abb. 35: Elektrophysiologische und pharmakologische Charakterisierung von Traw1 in Sf21-Zellen. **(A)** Originalregistrierungen des Traw1-induzierten Stromes unter Standard-Bedingungen (oben) und in Präsenz von 1 mM TEA. Die Zellen wurden auf ein Haltepotential von -60 mV geklemmt und Testpulse von -60 bis -100 mV appliziert in 10 mV Inkrementen. **(B)** Korrespondierendes Strom/Spannungsdiagramm unter Standardbedingungen (gefüllte Quadrate), mit 1 mM TEA (offene Kreise) oder 2 μ M DTX (gefüllte Kreise). **(C-E)** Dosis-Wirkungskurven des Traw1-vermittelten Stromes für TEA; 4-AP und Chinin.

maximal blockierenden Konzentrationen von 30 (TEA) und 10 μM (4-AP). Applikation von 1 mM 4-AP oder 0,1 mM Chinin führten zu einem vollständigen Verschwinden des Traw1-vermittelten Stromes. Vergleichsexperimente mit L929-Zellen, die den Kv3.1b-Kanal der Maus stabil exprimieren, bestätigten die bereits publizierte zehnfach niedrigere TEA-Sensitivität von Traw1 (Grissmer et al., 1994; Kanemasa et al., 1995).

Traw1 enthält in seiner Primärsequenz mehrere Konsensussequenzen zur Phosphorylierung durch Proteinkinase C. Deshalb lag es nahe, den Einfluss des Phorbolesters TPA auf Traw1-Ströme zu untersuchen. Die Applikation von 50 nM TPA in die Badlösung führte zu einer signifikanten, zeitabhängigen Reduktion der Stromamplitude von maximal 48 %. Durch vorherige Inkubation der Zellen mit dem Proteinkinaseinhibitor H7 konnte dieser Effekt komplett unterdrückt werden. Die Verminderung des Stromes war also auf eine enzymatische Modifikation und nicht auf einen messtechnisch verursachten Effekt zurückzuführen.

3.5.2 Tsha2

Tsha2 zeigte in seinen Stromcharakteristika große Ähnlichkeiten zu dem bereits elektrophysiologisch detailliert beschriebenen Kanal Tsha1 (Abb. 36) (Nguyen et al., 2000). Die Zellen wurden auf ein Haltepotential von -80 mV geklemmt und depolarisierenden Spannungspulsen bis auf 100 mV in 10 mV Schritten ausgesetzt. Testpotentiale von größer als -30 mV führten zu einem lang anhaltenden Auswärtsstrom von bis zu 4 nA. Es konnte keine Inaktivierung der Ströme in Vorpulspotentialexperimenten im Bereich von -20 bis -120 mV detektiert werden. Das Umkehrpotential bei 5,4 mM Kaliumionen in der Badlösung betrug -72,8 mV, was in sehr guter Übereinstimmung mit dem durch die Nernstgleichung kalkulierten Wert steht. Die Tsha2-vermittelten Ströme zeigten im Gegensatz zu Tsha1 eine TEA-Sensitivität. Es wurden zwar keine Dosis-Wirkungskurven ermittelt, jedoch führten 10 mM TEA zu einer Reduktion des Stromes auf unter 5 % des Ausgangswertes.

3.5.3 Tsha3

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit waren die Untersuchungen an Tsha3 noch nicht abgeschlossen, so daß in diesem Rahmen nur einige vorläufige Daten präsentiert werden können (Abb. 37). Tsha3 heterolog exprimierende CHO-Zellen wurden auf ein Haltepotential von -60 mV eingestellt und Spannungspulsen von -120 mV bis +40 mV in 10 mV Stufen ausgesetzt. Alle Testpulse führten zu Membranströmen, welche bei negativeren Potentialen (-70 bis -120 mV) einwärtsgerichtet und bei positiveren Potentialen (-50 bis +40 mV) auswärtsgerichtet waren. Die Ströme zeigten potentialunabhängig eine partielle Inaktivierung bis auf ein Gleichgewichtsniveau, daß über die restliche Testpulsdauer gehalten wurde. Ein Umkehrpotential konnte nicht bestimmt werden, d.h. der Strom des homotetrameren Tsha3-Kanals wird möglicherweise durch unterschiedliche Ionen getragen.

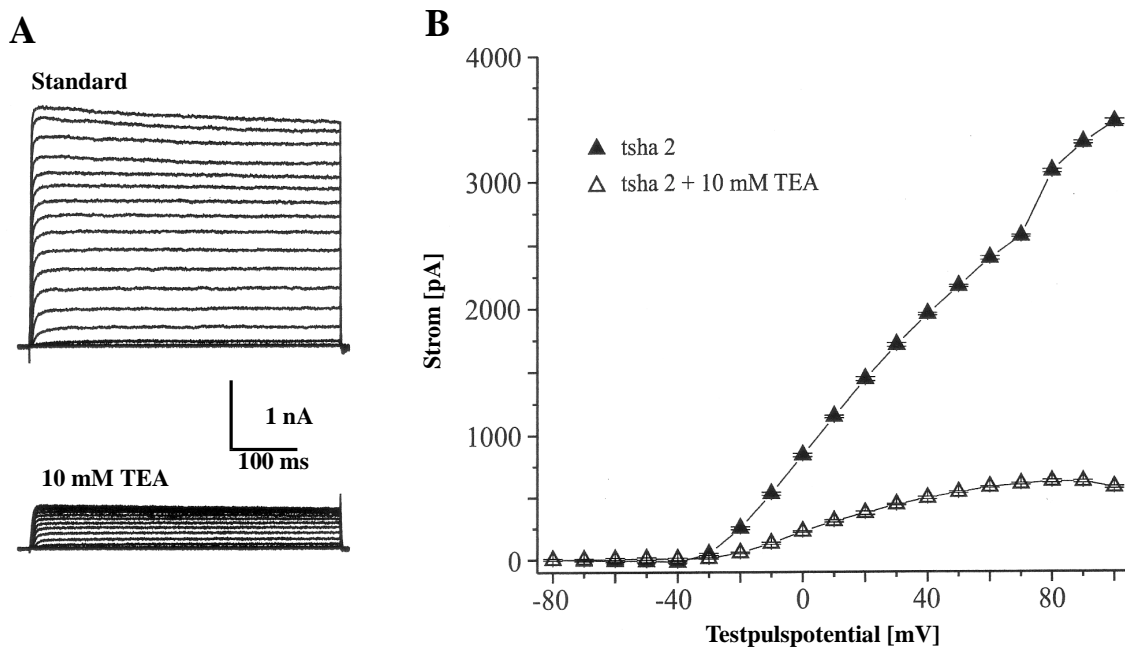


Abb. 36: Elektrophysiologische und pharmakologische Charakterisierung von transient in OLN93-Zellen transfiziertem Tsha2. **(A)** Originalregistrierungen des Tsha2-induzierten Stromes unter Standard-Bedingungen (oben) und in Präsenz von 10 mM TEA. Die Zellen wurden auf ein Haltepotential von -60 mV geklemmt und Testpulse in 10 mV Inkrementen von -60 bis +100 mV appliziert. **(B)** Korrespondierendes Strom/Spannungsdiagramm unter Standardbedingungen (gefüllte Dreiecke), mit 10 mM TEA (offene Dreiecke).

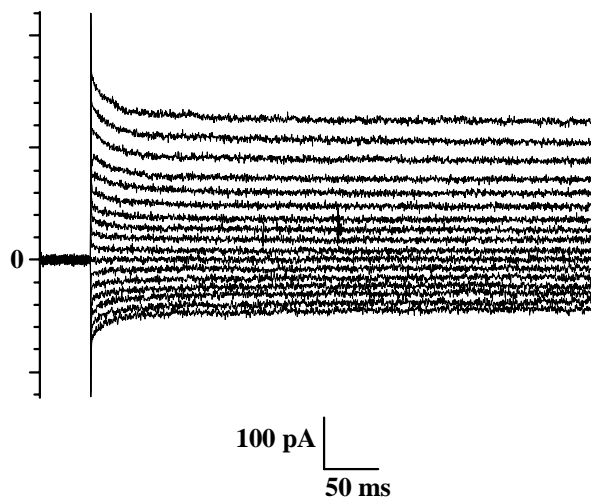


Abb. 37: Elektrophysiologische und pharmakologische Charakterisierung von transient in CHO-Zellen transfiziertem Tsha3. Originalregistrierungen des Tsha3-induzierten Stromes unter Standard-Bedingungen. Die Zellen wurden auf ein Haltepotential von -60 mV geklemmt und Testpulse in 10 mV Inkrementen von -120 bis +40 mV appliziert.

3.5.4 TSK2

Die elektrophysiologische Charakterisierung kalziumsensitiver Kanäle stellt hohe Anforderungen an die Messmethodik. Die Perfusion der heterolog exprimierenden Zellen mit Pipettenlösungen, die hohe Kalziumionenkonzentrationen enthalten, bergen die Risiken der hohen Leckströme, des schnellen Zelltodes und des sogenannten *Resealings*, einem erneuten Verschließen der Pipette durch die Membran. Außerdem ist die Pharmakologie dieser Kanäle mit dem Bienengift Apamin verknüpft, welches große Schwierigkeiten in der Applikation bereitet, da es höchst effizient an Kunststoffoberflächen adheriert. Die genannten Gründe führen dazu, daß auch die elektrophysiologischen Daten von TSK2 momentan noch unvollständig sind.

Die TSK2 heterolog exprimierenden Sf21-Zellen wurden mit einer Pipettenlösung perfundiert, die 1 μM Kalziumionen enthielt und auf ein Haltepotential von -60 mV eingestellt. Die Applikation von Spannungspulsen bis zu 100 mV in 10 mV-Schritten führte zu einem Auswärtsstrom von bis zu 2 nA. Dieser Strom folgte dem Ohmschen Gesetz und ist demzufolge nicht spannungsgesteuert. Er ließ sich durch 50 pM Apamin um 40 % reduzieren (Abb. 38).

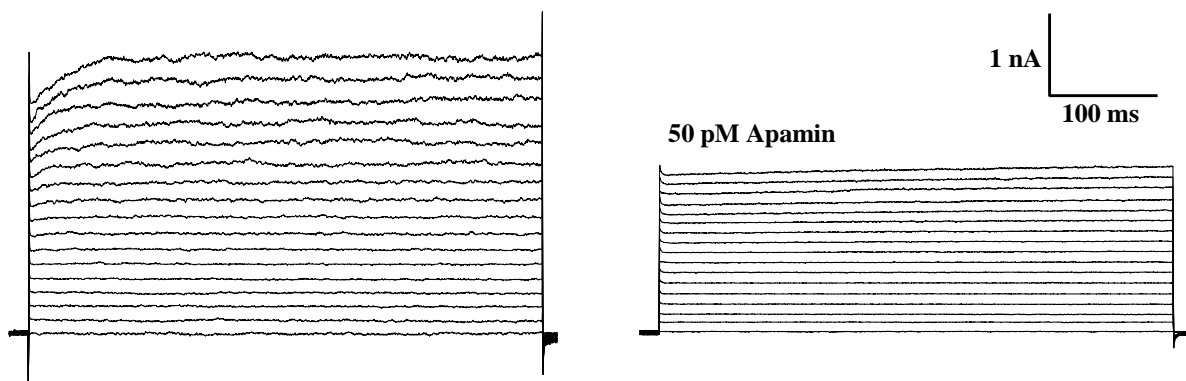


Abb. 38: Elektrophysiologische und pharmakologische Charakterisierung von TSK2 in Sf21-Zellen. Originalregistrierungen des TSK2-induzierten Stromes unter Standard-Bedingungen (links) und in Präsenz von 50 pM Apamin (rechts). Die Zellen wurden auf ein Haltepotential von -60 mV geklemmt und Testpulse von -60 bis -100 mV appliziert in 10 mV Inkrementen.

4 Zusammenfassung

In Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Kaliumkanäle der Regenbogenforelle charakterisiert. Erstmals gelang es, eine α -Untereinheit eines Kaliumkanals der Regenbogenforelle aus der *Shaw*-Subfamilie Traw1, mit seiner vollständigen kodierenden Sequenz zu klonieren. Im Bereich der *Shaker*-Kanäle wurde der Kanal Tsha3 vervollständigt. Die bisher bei Fischen noch unbekanntenen α -Untereinheiten kalziumaktivierter Kaliumkanäle wurden ebenfalls in dieser Spezies auf molekularer Ebene charakterisiert. Es gelang zwei Kanäle der SK-Subtypen, TSK2 und TSK3, und zwei Isoformen eines BK-Subtypus, TBK1 und TBK2, zu klonieren. Desweiteren konnten erste Hinweise auf die Existenz weiterer TBK-Isoformen, vermutlich generiert durch alternatives Spleißen, über die Klonierung entsprechender Sequenzinformation gewonnen werden.

Die Sequenzinformationen wurden genutzt, um spezifische Aminosäuresequenzen der Kanäle heterolog in *E. coli* zu exprimieren und mit diesen Polypeptiden polyklonale Antikörper herzustellen. Die affinitätsgereinigten Antikörper dienten anschließend der Charakterisierung und dem Nachweis der Kanalproteine in verschiedenen Zelltypen und Geweben. Die heterolog exprimierten Proteine konnten immunzytochemisch in der Plasmamembran von Säuger- und Insektenzellen nachgewiesen werden. In Westernblotanalysen an heterolog exprimierenden Zellen unterschieden sich Tsha1, Tsha2, Tsha3 und Traw1 in ihren experimentell ermittelten und kalkulierten Molekulargewichten. Diese Befunde konnten durch Analyse der Kanalproteine in den Membranfraktionen unterschiedlicher Gewebe der Regenbogenforelle im Westernblot bestätigt werden.

Die Expressionsanalyse aller bekannter Kaliumkanäle der Regenbogenforelle war ein weiteres zentrales Thema dieser Dissertation. Es konnte gezeigt werden, daß die Kanäle entwicklungspezifisch zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Larvalentwicklung der Forelle erstmalig exprimiert werden. Während Traw2, TSK2 und TSK3 bereits 3-5 Tage vor dem Schlupf, im Entwicklungsstadium 30 detektiert wurden, konnten TBK und Traw1 erstmalig ca. 8 Tage später gefunden werden.

Die regionale Verteilung der Kaliumkanäle in den Geweben der Regenbogenforelle zeigte, daß alle Kanaltranskripte in allen untersuchten Hirnregionen nachgewiesen werden konnten. Unterschiede fanden sich bei der Detektion dieser Transkripte im Muskel- und im Lebergewebe. TSK2-, TSK3-, TBK- und Tsha2-Transkripte waren in beiden Geweben vorhanden, im Gegensatz zu den *Shaw*-Kanälen und Tsha3, die nur im Muskel nachgewiesen wurden. Tsha1 war der einzige Kaliumkanal dessen Transkripte weder in der Leber noch im Muskel gefunden wurden. Diese Untersuchungen wurden gestützt von den Westernblotanalysen der Membranfraktionen von Leber, Muskel und Gesamthirn.

Zur Erstellung eines Expressionsprofils der Kaliumkanäle im zentralen Nervensystem der Forelle, wurden immunhistochemische Untersuchungen an Gefrierschnitten durchgeführt. Die zelltypspezifische Expression der Kanalproteine im *Cerebellum*, *Tectum opticum* und der Retina wies deutliche Unterschiede bezüglich der regionalen Verteilung in diesen Geweben auf. Die Analyse der regionalen, zelltypspezifischen Kanalexpression wurde am System der Retina detaillierter betrachtet, indem Retinadissoziate und -prints immunzytochemisch untersucht wurden. Die Ergebnisse dieser beiden Untersuchungen waren nicht nur deckungsgleich, es gelang darüber hinaus die subzelluläre Lokalisation der Kanäle in retinalen Neuronen zu verfolgen.

Die heterologe Expression der Kaliumkanäle Traw1, Tsha2, Tsha3 und TSK2 in Säuger- und Insektenzellen ermöglichte die grundlegende elektrophysiologische und pharmakologische Charakterisierung dieser Kanäle. Nach Abschluß dieser Arbeiten existiert nun das Werkzeug, um die biophysikalischen Daten auf native Forellenneurone zu projizieren.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden α -Untereinheiten verschiedener Kaliumkanalsubtypen der Regenbogenforelle auf molekularer Ebene, hinsichtlich ihrer Expression sowie ihrer biophysikalischen Eigenschaften charakterisiert.

Traw1, ein Mitglied aus der *Shaw*-Subfamilie wurde aus dem ZNS durch RT-PCR-Strategien kloniert und heterolog exprimiert. Die erfolgreiche heterologe Expression der C-terminalen, zytoplasmatischen Aminosäuren als His₁₀-Fusionsprotein wurde zur Produktion polyklonaler Antikörper im Kaninchen genutzt. Die Analyse der vorhergesagten Aminosäuresequenz brachte alle wichtigen strukturellen Elemente der Kv3-Familie zum Vorschein, wie die 6TM-Transmembrantopologie und die Kaliumkanalsignatursequenz zwischen den S5- und S6-Domänen. Weiterhin wurden zwei putative N-Glykosylierungsstellen an konservierten Positionen zwischen S1 und S2 gefunden. Die N-terminale Region von Traw1 beinhaltet die hochkonservierte Tetramerisierungsdomäne T1, inklusive des Zink-Bindungsmotives HX₅CX₂₀CC, welches für die subtypspezifische Oligomerisierung in *Shaw*-Kanälen verantwortlich ist (Bixby et al., 1999). In der S4-Domäne wurden die für Kv3-Kanäle von Säugern typischen von hydrophoben Resten flankierten 6 positiv geladenen Aminosäurereste festgestellt (Wei et al., 1990, Baro et al., 1996). Die computergestützte Primärstrukturanalyse und der Vergleich mit einzelnen Mitgliedern der *Shaw*-Genfamilie ließ die Aussage zu, daß Traw1 wahrscheinlich ein Fischhomolog zum Kv3.1b der Säuger ist. Traw2 hingegen, dessen Sequenz nur als Kernfragment bekannt ist (Turkan, 1998), konnte nicht eindeutig innerhalb der Kv3-Familie klassifiziert werden. Im Bereich der zytoplasmatischen N- bzw. C-Termini wurden die größten Sequenzunterschiede von Traw1 zu anderen *Shaw*-Kanälen gefunden. Bezieht man die hohe Ähnlichkeit auf elektrophysiologischer Ebene in die Überlegungen mit ein, werden diese Bereiche des Traw1-Kanals mit hoher Wahrscheinlichkeit keinen Beitrag zu den grundlegenden Kanaleigenschaften leisten, sondern eher eine Rolle bei der spezifischen Interaktion mit anderen Proteinen oder der Verarbeitung von Sekundärinformationen spielen. Den vier am N-Terminus lokalisierten, konservierten PKC-Erkennungssequenzen, welche zusätzlich auffällig gehäuft am C-Terminus von Traw1 vorliegen, könnte bei diesen Fragestellungen eine zentrale Bedeutung zukommen. Tatsächlich verursachte die Applikation des PKC-Aktivators TPA in elektrophysiologischen Messungen eine substantielle Reduktion der Stromamplitude, die wahrscheinlich, wie bei den Säugerhomologen, verursacht wird durch eine geringere Öffnungswahrscheinlichkeit (Kanemasa et al., 1995).

Traw1 wurde heterolog in Säuger (CHO)- und Insektenzellen exprimiert. Das Traw1-Protein konnte mit einer deutlich membranösen Verteilung innerhalb der Zellen immunzytochemisch bzw. durch GFP-Fusion lokalisiert werden. Traw1 bildete unter diesen Bedingungen homomultimere, funktionelle Kanäle, die nicht inaktivierende verzögerte Gleichrichterströme bei den biophysikalischen Patch-Clamp-Untersuchungen zeigten. Die schnelle Aktivierungskinetik und der hohe Schwellenwert der Aktivierung von -10 mV betonen die Ähnlichkeit von Traw1 zu dem Kv3.1 der Säuger (Kanemasa et al., 1995). Das Umkehrpotential von Traw1 liegt allerdings deutlich über dem kalkulierten Nernst-Potential, eine Eigenschaft, die Kv3.1b nicht aufweist. Die Umkehrpotentiale der beiden einzigen elektrophysiologisch charakterisierten Kaliumkanäle der Forelle, Tsha1 und Tsha2, zeigen diese Besonderheit nicht (Nguyen et al., 2000). Auch in der Pharmakologie findet man Differenzen zwischen Traw1 und Kv3.1b: Beide Kanäle besitzen zwar eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber TEA und 4-AP, jedoch liegt die Sensitivität von Traw1 eine Größenordnung über der von Kv3.1b. Die hohe TEA-Sensitivität korreliert ausgezeichnet mit der Präsenz eines konservierten Tyrosinrestes in der äußeren Porenregion, wie Mutationsanalysen an *Shaker*-Kanälen bewiesen haben (MacKinnon et al., 1990, Pongs,

1992). Traw1 und RKv3.1 unterscheiden sich im Bereich von S5 – S6 nur um eine einzige Aminosäure, was bezüglich der zehnfach höheren TEA-Sensitivität überrascht. Die TEA-Bindung muß demzufolge aus anderen Bereichen des Traw1-Kanals kooperativ beeinflusst werden und die Effektivität der Kanal-Blockierung verändern.

Traw1- und Traw2-Transkripte werden während der Larvalentwicklung zeitlich differenziert im Hirn exprimiert. Während Traw2 schon vor dem Schlupf detektiert werden konnte, war Traw 1 erst 3-5 Tage nach dem Schlupf mit RT-PCR nachzuweisen. Der Traw1 homologe Kanal Kv3.1 wird im Gehirn der Ratte erstmalig am embryonalen Tag 17 exprimiert, dort aber erst nach der Geburt auf einen Maximalwert hochreguliert (Perney et al., 1992). Kv3.1 stellt im adulten Hirn der Säuger zusammen mit dem Kv3.3 den am stärksten vertretenen Kanal der Shaw-Familie dar, während im Muskelgewebe nur niedrige Transkriptmengen von Kv3.1 nachgewiesen werden können (Weiser et al., 1994). Diese Beobachtungen konnten durch RT-PCR und Westernblotanalysen an Membranfraktionen von Forellengewebe bestätigt werden. Das experimentell im Immunblot ermittelte Molekulargewicht von Traw1 beträgt 94 kDa. Dieser Wert konnte sowohl an heterolog exprimierenden Insektenzellen, als auch an Hirnmembranen der Forelle gezeigt werden. An Rattenhirnmembranfraktionen erkennt ein Antikörper gegen Kv3.1b selektiv ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwas mehr als 90 kDa (Weiser et al., 1995, Härtig et al., 1999). Legt man ein kalkuliertes Molekulargewicht von ~66 kDa zugrunde, liegt die Vermutung nahe, daß beide Proteine posttranslational modifiziert sind. Höchstwahrscheinlich werden beide Proteine an den konservierten N-Glykosylierungsstellen zwischen S1 und S2 glykosyliert.

Die zelltypspezifische, regionale Verteilung von Kaliumkanälen im Gewebe niederer Vertebraten, wie den Fischen, wurde in dieser Arbeit erstmalig immunhistochemisch am Beispiel der Forelle untersucht. Traw1 konnte im *Cerebellum* mit dieser Methode in den Purkinje-Neuronen im *Stratum ganglionare* und in den Periventricularneuronen, allerdings mit nur sehr geringer Signalintensität nachgewiesen werden. Das gleiche Verteilungsmuster findet man im *Cerebellum* der Maus durch *in situ*-Hybridisierungen mit Kv3.1-spezifischen Sonden (Wang et al., 1998). Das Soma der Retinaganglienzellen wurde ebenfalls von dem Traw1-Antikörper angefärbt. Diese Tatsache steht in hervorragender Übereinstimmung mit den elektrophysiologischen Daten an diesem Zelltyp (Henne et al., 2000). Pharmakologisch konnte hier ein Strom isoliert werden, der in seinen Eigenschaften mit den Eckdaten des heterolog exprimierten Traw1 in Insektenzellen übereinstimmt. Desweiteren konnte Traw1 im Gewebeschnitt noch in amakrinen Zellen und Photorezeptorzellen der Forellenretina gefunden werden. Die Photorezeptorzellen weisen in diesem Fall eine besonders interessante subzelluläre Verteilung von Traw1 auf: Der Kanal ist ausschließlich in der Rezeptorfaser und schwach im äußeren Segment der Zelle nachzuweisen, was für eine spezifische Aufgabenverteilung der Ionenkanäle innerhalb der Kompartimente dieses Zelltyps spricht.

Im Nervensystem der Säuger werden Kv3.1-Kanäle häufig in Zellen gefunden, die sich durch ihre hochfrequente Feuerrate auszeichnen, wie z. B. im auditorischen System der Maus. Durch die schnelle Aktivierungskinetik dieser Kanäle sind die Zellen in der Lage einem hochfrequenten Stimulus zu folgen (Wang et al., 1998). Die funktionelle Aufgabe des Traw1-Proteins in den untersuchten Geweben der Forelle bleibt durch die Untersuchungen in dieser Arbeit ungeklärt. Zu diesem Zweck müssen in Zukunft Zellen mit hoher Traw1-Immunreaktivität elektrophysiologisch charakterisiert werden, wie beispielsweise die Purkinje-Zellen im *Cerebellum* oder die großen tegmentalen Neurone der Forelle.

Mit Tsha3 wurde ein Kanal entdeckt, von dem es gelang die gesamte kodierende cDNA-Sequenz zu klonieren und heterolog zu exprimieren. Die Primärstrukturanalyse läßt Tsha3 zusammen mit seinen Verwandten Tsha1 und Tsha2 (Nguyen et al., 2000) in die Familie der *Shaker*-Kanäle der Regenbogenforelle klassifizieren. Während am C-terminalen Ende keine Übereinstimmungen mit bereits klonierten Kaliumkanälen anderer Spezies gefunden wurde,

fällt die hohe Sequenzähnlichkeit in der Kernregion S1 - S6 und der Tetramerisierungsdomäne T1 mit anderen Vertretern der *Shaker*-Familie auf. Vor allen Dingen die siebenfache Wiederholung des Strukturmotives R/K-X-X in der S4-Transmembrandomäne ist ein typisches Merkmal dieser Kaliumkanäle (Pongs, 1992). Zwischen S1 und S2 findet man eine in Kv1-Kanälen weit verbreitete N-Glykosylierungsstelle. *In vivo* fehlt bisher der direkte Beweis für eine tatsächliche Glykosylierung der Kanäle und deren funktionelle Bedeutung. *In vitro* konnte diese jedoch nachgewiesen werden. Westernblotanalysen zeigen eine entsprechende Differenz der kalkulierten und experimentell bestimmten Molekulargewichte von Shaker-Kanälen (Deal et al., 1994; Rosenberg & East, 1992; Shen et al., 1993; Shi et al., 1996; Bekele-Arcuri et al., 1996). Die zytoplasmatischen Bereiche von Tsha3 enthalten mehrere Konsensussequenzen zur Phosphorylierung durch PKC, CK2 und Tyrosinkinasen, was auf eine Modulation der Proteinfunktionen durch Phosphorylierung schließen lässt. Es konnte schon mehrfach gezeigt werden, daß die Phosphorylierung von Kv1-Kanälen eine Reduktion der Stromamplituden zur Folge hat (Holmes et al., 1996, Lev et al., 1995, Moreno et al., 1995). Überraschenderweise ist Tsha3 enger verwandt mit dem humanen HKCNA10-Kanal als mit seinen Forellenhomologen Tsha1 und Tsha2. Der HKCNA10 wurde erst kürzlich beschrieben und weist einige interessante Eigenschaften auf (Lang et al., 2000). Der Kanal wird zwar in die Kv1-Familie klassifiziert, jedoch durch Antagonisten von Kanälen der CNG-Familie gehemmt. Trotz der Präsenz einer putativen Bindestelle für zyklische Nukleotide modulieren diese Effektoren die Kanaleigenschaften nicht. Die Phosphorylierung durch PKC reduziert die Stromamplitude dieses Kanals hingegen um 42%. Das zu HKCNA10 homologe Kaninchenprotein Kcn1 verhält sich elektrophysiologisch vollkommen gegensätzlich: Heterolog exprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten findet man einen spannungsunabhängigen, cGMP-aktivierten Kaliumstrom (Yao et al., 1995).

Tsha3 zeigt, heterolog in CHO-Zellen exprimiert, keine Spannungsabhängigkeit seiner Ströme: Sobald das Membranpotential sich vom Ruhepotential entfernt, werden je nach Orientierung des Testpulses Einwärtsströme bzw. Auswärtströme gemessen. Tsha3 ist also kein Gleichrichter, wie z. B. Tsha1 und Tsha2 (Nguyen et al., 2000). Ein weiteres Problem zeigt sich bei der Bestimmung der Ionenselektivität: Aus dem von Tsha3 getragenen Strom kann kein Umkehrpotential bestimmt werden. Diese Daten lassen auf keine Kationenselektivität schließen. Das könnte ein Hinweis auf die Tatsache sein, daß der Tsha3-Kanal nicht korrekt von den Zellen zu einem homomultimeren Kanal assembliert wird. In der T1-Domäne von Tsha3 sind an *Shaker*-spezifisch konservierten Positionen, welche die intramolekularen Kontaktstellen bei der Tetramerisierung determinieren (Jan & Jan, 1992), einige Austausche festzustellen. Während der konservative Austausch D171E wohl nicht ins Gewicht fällt, wiegen die Austausche R107M und E175K vermutlich besonders schwer. Die Veränderung der Ladungseigenschaften an den Kontaktstellen könnten großen Einfluß auf die korrekte Assemblierung des Kanals haben. Eine weitere Interpretationsmöglichkeit der elektrophysiologischen Daten wäre, daß Tsha3 niemals als Homomultimer im Forellengewebe vorkommt, sondern als Bestandteil von anderen Kv1-Kanäle deren Eigenschaften moduliert. Solche subfamilienspezifischen Heteromultimerisierungen von Kaliumkanälen ist schon lange bekannt und eine interessante Art der Modulation von Kanaleigenschaften (Sheng et al., 1993, Wang et al., 1993).

Die Kaliumkanäle der *Shaker*-Familie werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Larvalentwicklung der Forelle exprimiert. Zusammen mit Tsha4, einem bisher als cDNA-Fragment in seiner Sequenz bekannten Kv1-Kanal der Forelle, konnten Transkripte bereits vor dem Schlupf detektiert werden, im Gegensatz zu Tsha1 und Tsha2, die im Stadium 36 bzw. im Stadium 34 (3 bzw. 2 Wochen nach dem Schlupf) erstmalig mit ihren Transkripten auftreten (Nguyen et al., 2000). Tsha1, Tsha2 und Tsha3 konnten mit der RT-PCR-Technik in allen Hirnregionen der Forelle nachgewiesen werden, nur in der Leber und dem Muskel

wurden sie differentiell detektiert. Tsha2 wurde in beiden Geweben, Tsha3 nur im Muskel und Tsha1 in keinem der beiden Geweben gefunden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen spiegeln die Resultate der Westernblotanalysen an Membranfraktionen von Leber, Muskel und Hirn wieder. Widersprüchlich erscheint hier allein die fehlende Detektion von Tsha2 in der Leber. Geht man jedoch davon aus, daß in diesem Gewebe nur sehr wenige Kopien dieses Kanals exprimiert werden, wie es in einem nicht erregbaren Gewebe zu erwarten ist, schlägt in diesem Fall die unterschiedliche Sensitivität der beiden Nachweismethoden, RT-PCR und Westernblot, zu Buche. Andererseits ist auch eine Hemmung auf translationaler Ebene denkbar. Die experimentell ermittelten Molekulargewichte von Tsha1 und Tsha2 von 64 bzw. 63 kDa sind identisch mit den Molekulargewichten, die aus den Zellysaten der heterolog exprimierenden Insektenzellen bestimmt wurden, liegen aber jeweils um ca. 8 kDa höher als von der Primärsequenz abgeleitet. Mit hoher Wahrscheinlichkeit werden die N-Glykosylierungsstellen in beiden Geweben zur posttranslationalen Modifikation der Kanäle genutzt. Tsha3 zeigt bezüglich des Molekulargewichtes jedoch ein gegensätzliches Verhalten: Konnte aus den Ergebnissen der Analyse der Insektenzellysaten noch erwartet werden, daß Tsha3 ebenfalls posttranslational modifiziert wird, stimmte das experimentell an Hirn- und Muskelmembranfraktionen der Forelle ermittelte Molekulargewicht exakt mit der Vorhersage von 64 kDa überein. Eine mögliche Interpretation dieser experimentellen Befunde ist eine Glykosylierung von Tsha3 in Insektenzellen, jedoch aber nicht im Forellengewebe. Über die gewebespezifische Expression des KCNA10-Kanals ist nur sehr wenig bekannt. Man findet ihn, wie sein Kaninchenhomolog, im Hirn, der Niere und im Gefäßgewebe, aber nicht im Muskel (Orias et al., 1997, Yao et al., 1995). Möglicherweise ist die in diesen Northernblot-Analysen angewendete Methodik jedoch nicht sensitiv genug, um eine schwache Expression nachzuweisen. Das Tsha3-Transkript konnte im Muskel nur sehr schwach in einer äußerst empfindlichen verschachtelten RT-PCR-Reaktion nachgewiesen werden. Eine niedrige Transkriptzahl lässt aber trotzdem eine ausreichende Translation des Protein zu, um dieses im Westernblot detektieren zu können. Die gewebespezifische Expression von Tsha2 läßt keinen Vergleich mit Kanälen anderer Spezies zu, weil Tsha2 nicht eindeutig innerhalb der *Shaker*-Familie einem Subtyp zuzuordnen ist. Tsha1 wurde, genau wie sein Säugerhomolog Kv1.2 in der Maus, nicht im adulten Muskelgewebe nachgewiesen (Lesage et al., 1992).

Die zelltypspezifische Expression der Kv1-Kanäle der Forelle im *Cerebellum* zeigt ein sehr unterschiedliches, immunhistochemisches Profil von Tsha1, Tsha2 und Tsha3. Tsha1 wird in den Purkinje-Neuronen und deren Dendriten stark exprimiert. Untersuchungen am Kleinhirn der Ratte führten zu ähnlichen Ergebnissen (Sheng et al., 1994). Während Tsha2 ausschließlich in den Körnerzellen detektiert wurde, färbte der Tsha3-Antikörper hingegen die Endfüße der radialen Gliazellen des *Stratum moleculare*. Bei der vergleichenden Betrachtung der Expressionsmuster dieser drei Kanäle im *Cerebellum* fällt auf, daß sie nie immunhistochemisch in den gleichen Zelltypen nachgewiesen werden konnten. Auch im *Tectum opticum* setzt sich dieser Trend weiter fort: Tsha2 konnte in den Pyramidalzellen dieses Gewebes nachgewiesen werden, nicht jedoch Tsha3. Tsha1 besitzt im *Tectum* eine weitere Verbreitung: Vor allem eine Subpopulation der Periventricularneuronen zeigte eine hohe Immunreaktivität.

Im Gehirn der Fische liegt *posterior* zur Hypophyse eine hochvaskuläre, dünnwandige Hirnstruktur, welche in anderen Vertebraten in dieser Form nicht zu finden ist, der *Saccus vasculosus*. Die Funktion des *Saccus vasculosus* im Gehirn der Knochenfische ist bisher noch gänzlich ungeklärt: Sowohl über eine sensorische Funktion als Tiefenorgan, als auch sekretorische Funktionen wurde bislang spekuliert. Gesichert ist zur Zeit nur seine Rolle bei der Homöostase der cerebrospinalen Flüssigkeit (Jansen et al., 1982). Die Struktur des *Saccus vasculosus* wird von den Kronenzellen, wie auch den leichten Kronenzellen, deren papillären Ausstülpungen in das Lumen des *Saccus vasculosus* ragen, dominiert. Ein zweiter

Zelltyp, die Pseudo-Kronenzellen unterscheiden sich morphologisch hauptsächlich in ihrer Größe von den Kronenzellen. Gliazellen füllen den engen Raum zwischen den Kronenzellen und separieren diese voneinander (Jansen et al., 1975). Die Morphologie lässt auf eine gezielte Aufgabenteilung dieser unterschiedlichen Zelltypen schließen. In diesem Organ war Tsha1 immunhistochemisch mit keinem hohen Expressionsniveau nachweisbar. Tsha2 zeigte eine besondere Selektivität in der zelltypspezifischen Expression: Der Kanal wurde ausschließlich in den papillären Ausstülpungen der Kronenzellen in das Lumen detektiert. Tsha3 hingegen war in den gesamten Kronenzellen und verstärkt in den Gliazellen des *Saccus vasculosus* zu finden. In diesem Zusammenhang ist die hohe Expression von TSK2 in den Kronen- und Gliazellen von Bedeutung, da SK-Kanäle eine besondere Funktion bei der zeitlichen Strukturierung von Aktionspotentialen besitzen. Folglich besteht die Möglichkeit, daß die postulierten sekretorischen und homöostatischen Funktionen durch elektrische Reize gesteuert werden und deshalb eng mit dem Membranpotential der entsprechenden Zellen in diesem Organ verknüpft sind. Zur Untersuchung dieser Funktionen ist die Kenntnis der Ionenkanalzusammensetzung dieser Zellen essentiell. Dieser Ansatz bietet die Gelegenheit durch Kenntnis der elektrischen Eigenschaften der beteiligten Zellen mehr Informationen über die Funktionen des *Saccus vasculosus* der Knochenfische zu erhalten.

Über die Lokalisation spannungssensitiver Kaliumkanäle in der Retina der Vertebraten und im besonderen der Fische ist bisher nur sehr wenig bekannt. Immunhistochemisch, sowie mittels *in-situ*-Hybridisierungen und RT-PCR, wurde die Verteilung von Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv2.1 und Kv4.2 in der Mausretina bestimmt (Pinto et al., 1998). In der Retina des Goldfisches wurden die Immunreaktivität von Antikörpern gegen die Säugerproteine Kv1.1, Kv1.2 und Kv2.1 ohne Kenntnis der Kanalprimärsequenzen untersucht (Yazulla & Studholme, 1998). Ohne die Kenntnis der Aminosäuresequenz der Kanäle fällt es jedoch schwer, einen Bezug zwischen der Immunreaktivität eines Antikörpers und der vorhergesagten Subtypspezifität herzustellen, obwohl die hohe Sequenzähnlichkeit von Kv1.2 und Tsha1 im Bereich des C-Terminus für eine Kreuzreaktivität dieser Antikörper spricht.

Die retinalen Neurone konnten an Gefrierschnitten der Retina aufgrund ihrer Lage in dieser hochorganisierten Schichtstruktur relativ einfach ihren Zelltypen zugeordnet werden, während in der frisch dissoziierten Retina durch das Auflösen dieser Struktur die Identifizierung der unterschiedlichen Neurone nur aufgrund intrinsischer morphologischer Eigenschaften möglich war. Die bipolaren und amakrinen Zellen waren nur schwierig zu identifizieren, da keine zelltypspezifischen Marker dieser Zellen zur Verfügung standen. Ganglien-, Photorezeptor- und Horizontalzellen waren hingegen durch ihre morphologischen Eigenschaften und ihre Lage innerhalb der Retina eindeutig charakterisiert. Tsha1, das Forellenhomologe zu Kv1.2, wurde in der Retina der Regenbogenforelle in den Retinaganglienzellen und in der inneren Körnerschicht immunologisch nachgewiesen. Diese Ergebnisse konnten die Einzelzell-RT-PCR-Daten unserer Arbeitsgruppe (Henne et al., 2000) unterstützen, in denen dieser Kanal zusammen mit Tsha2 und Tsha3 sehr häufig in den Retinaganglienzellen auftrat. Tsha2 und Tsha3 waren immunologisch ebenfalls in diesem Zelltyp nachzuweisen. Die Ergebnisse der Untersuchungen an der Maus-Retina (Pinto et al., 1998) zeigen eine Immunreaktivität der Retinaganglienzellen bezüglich der Kv1.2-Antikörper und auch beim Goldfisches (Yazulla et al., 1995) findet man mit den gleichen Antikörpern eine starke Immunreaktivität in den Retinaganglienzellen. Die gezeigte Expression von Tsha1 in diesem Zelltyp der Forellenretina korreliert folglich mit diesen Daten. Die Retinaganglienzellen der Goldfischretina werden jedoch von dem Kv1.2-Antikörper stärker angefärbt als es in der Forellenretina mit dem Tsha1-Antikörper der Fall ist, während die äußere plexiforme Schicht beim Goldfisch kaum gefärbt ist. Im Gegensatz dazu ist bei der Forelle hier eine enorme Immunreaktivität zu beobachten. Folglich stellt sich die Frage, ob die Subtypspezifität des Kv1.2-Antikörpers auch für die Goldfischproteine gilt.

Alle drei *Shaker*-Kanäle der Forelle konnten in Retinadissoziaten eindeutig in den Horizontalzellen nachgewiesen werden, was sich bei den immunhistochemischen Untersuchungen in einer Anfärbung der äußeren plexiformen Schicht manifestierte. Die Photorezeptorzellen wurden von den Antikörpern gegen Tsha1, Tsha2 und Tsha3 sehr differenziert angefärbt. Tsha1 wurde ausschließlich in der Photorezeptorsynapse nachgewiesen, was im Gefrierschnitt zu einer enorm starken Anfärbung der äußeren plexiformen Schicht führte. In der Photorezeptorsynapse wurde außer Tsha1 noch Tsha2 detektiert, der allerdings auch in einem großen Teil der Rezeptorfaser gefunden wurde. Die Anfärbung der Faser spiegelte sich auch in den immunhistochemischen Befunden wieder. Tsha3 war in nahezu der gesamten Photorezeptorzelle zu finden, charakterisiert durch die immunologische Anfärbung der äußeren nukleären Schicht in den Gefrierschnitten. Die Ergebnisse der immunhistochemischen und immunzytochemischen Untersuchungen stimmen sehr gut untereinander und mit allen bisherigen Befunden überein. Zur detaillierteren Betrachtung wären weitere Einzelzelluntersuchungen an den verschiedenen Zelltypen in der Retina wünschenswert. Die gut etablierte Methode der Retinadissoziation bietet eine nahezu optimale Voraussetzung, um solche Studien durchzuführen.

Kalziumaktivierte Kaliumkanäle spielen eine wesentliche Rolle bei der Formgebung und der zeitliche Struktur der Aktionspotentiale. Die Isolation der Primärsequenz eines BK-Kanals im Rahmen dieser Arbeit ist deshalb ein großer Schritt zur Korrelation der Kaliumströme mit dem Kanalrepertoire des nativen Zellsystems der Forelle. TBK1 und TBK2 aus dem ZNS der Forelle sind vermutlich Isoformen des gleichen Kanals, die durch alternatives Spleißen generiert wurden. Der TBK-Kanal zeigt einige interessante Eigenschaften: Das N-terminale Ende ist vermutlich im extrazellulären Raum lokalisiert, hervorgerufen durch eine gegenüber den übrigen Mitgliedern der 6TM-Familie zusätzliche Transmembrandomäne S0. Die Existenz von S0 als membrandurchspannendes Segment wurde 1996 von Wallner et al. am humanen BK-Kanal bewiesen. Die S0-Domäne gewährleistet die Interaktion mit den β -Untereinheiten, Transmembranproteinen, welche die Pharmakologie, Kinetik und Kalziumsensitivität von BK-Kanälen modulieren (Wallner et al., 1999). Mittlerweile sind 4 verschiedene β -Untereinheiten bekannt, die gewebespezifisch exprimiert werden und die BK-Kanaleigenschaften auf die unterschiedlichen Anforderungen in den Geweben abstimmen (Brenner et al., 2000, Uebele et al., 2000, Weiger et al., 2000, Behrens et al., 2000). Die Kernregion des TBK-Kanals beinhaltet eine Kaliumkanalsignatursequenz in der Porenregion H5. Das Y296 innerhalb dieser Region deutet daraufhin, daß der TBK, wie auch alle anderen bisher klonierten BK-Kanäle (Wallner et al., 1999), hochempfindlich gegenüber der extrazellulären Applikation von TEA ist. Die äquivalente Position determiniert auch in Kv-Kanälen die TEA-Sensitivität, was den Schluß zulässt, daß der BK-Kanal eine ähnliche Porenarchitektur wie Kv-Kanäle aufweist. Der von der S6-Domäne ausgehende C-terminale Bereich des TBK beinhaltet 4 weitere hydrophobe Bereiche S7 - S10, die schon in anderen Spezies als weitere mögliche Transmembrandurchgänge postuliert wurden. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß dieser Bereich mit hoher Wahrscheinlichkeit zytoplasmatisch lokalisiert ist (Meera et al., 1997). Diese Vorstellung ist konsistent mit der Beobachtung, daß diese Region als Kalziumsensor fungiert. Zwischen den hydrophoben Segmenten S9 und S10 liegt beim TBK die sogenannte *Calcium-bowl*, eine Konsensussequenz, welche 10 hochkonservierte negativ geladene Aspartat- bzw. Glutamatreste beinhaltet. Ein großer Teil der Kalziumsensitivität wird durch diesen Teil des Proteins vermittelt. Um vollständige Kalziumbindekapazität zu erlangen, muß jedoch auch die nachfolgende S10 Domäne vollständig erhalten sein (Salkoff et al., 1997, Schreiber et al., 1999). Erst kürzlich wurde ein neuer BK-Subtyp aus Spermatozyten der Maus, genannt Slo3, beschrieben, dem die Kalziumsensitivität komplett abhanden gekommen ist (Schreiber et al., 1998). Im Slo3-Protein ist die eigentlich hochkonservierte *Calcium-bowl* derart mutiert, daß 8 der 10 negativ

geladenen Aminosäurereste durch neutrale Aminosäurereste ersetzt sind. Durch Transplantation der *Calcium-bowl* und des proximalen Teiles von S10 von Slo1 auf Slo3 konnte die Kalziumsensitivität vollkommen wieder hergestellt werden (Schreiber et al., 1999).

TBK besitzt innerhalb der transmembranen Segmente S3, S4 und S5 mehrere in spannungsgesteuerten Kaliumkanälen hochkonservierte geladene Aminosäurereste. Diese Tatsache lässt vermuten, daß TBK einen intrinsischen Spannungssensor trägt. In der Tat sind alle Kanäle der BK-Familie nicht nur kalziumsensitiv, sondern reagieren auch auf depolarisierende Spannungspulse (Wallner et al., 1999, Papazian et al., 1999). Die Feinabstimmung der BK-Kanäle wird nicht nur durch die Existenz der β -Untereinheit oder die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration gesteuert. Es findet zusätzlich noch eine Kopplung der Kanalaktivität an den Signalstatus der Zelle über eine mögliche Phosphorylierung durch Kinasen statt. Ein gut untersuchtes Beispiel dieser Modulation ist die Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit durch Phosphorylierung eines konservierten Serinrestes in den BK-Kanälen von Mensch und Fruchtfliege (Esguerra et al., 1994, Nara et al., 1998). Diese konservierte Aminosäure wird im TBK-Protein an Position 933 gefunden.

Bis zur Klonierung des Slo3-Kanals war der BK nur durch ein Gen in seiner Familie repräsentiert. Die funktionelle Vielfalt wurde jedoch innerhalb dieses Genes determiniert. In Vertebraten sind allein 6 verschiedene Positionen bekannt, an denen alternatives Spleißen betrieben wird. Vergleichende Analysen der Sequenzen von TBK1 und TBK2 lassen erkennen, daß TBK1 durch einen 58 Aminosäuren langen, cysteinreichen Einschub an der SP2 charakterisiert ist. Untersuchungen an den Menschen- und Kaninchenhomologen haben gezeigt, daß genau dieser Einschub die Kalziumsensitivität der Kanäle drastisch erhöht (Tseng-Crank et al., 1994, Hanaoka et al., 1999). TBK2 allerdings zeigt an der SP1 einen 4 Aminosäuren umfassenden Einschub, von denen 3 positiv geladen sind. Die gleiche Insertion ruft im menschlichen BK eine reduzierte Kalziumsensitivität hervor, möglicherweise ausgelöst durch die sterischen Veränderungen aufgrund der Erhöhung der positiven Ladungsdichte (Tseng-Crank et al., 1994). Durch RT-PCR-Klonierung gelang es in dieser Arbeit noch weitere Sequenzvariationen an der SP2 zu entdecken. Interessanterweise gelang es, mit TBK1-2 eine Isoform, die durch eine 29 AS-Insertion charakterisiert ist, zu finden, die bisher in noch keiner anderen Spezies beschrieben wurde. Die Analyse dieser Spleißvariante hinsichtlich der Kalziumsensitivität könnte wichtige Hinweise auf weitere Möglichkeiten der Feinabstimmung innerhalb der BK-Familie liefern. In der Cochlea der Schildkröte z. B. werden verschiedene Spleißvarianten innerhalb der Haarzellpopulation tonotopisch variabel exprimiert. Dies ist ein Beispiel dafür, wie die Feinabstimmung dieser Kanäle wichtige physiologische Funktionen erfüllen kann (Jones et al., 1998, Ricci et al., 2000).

BK-Kanäle sind in praktisch allen untersuchten menschlichen Geweben nachgewiesen worden (Wallner et al., 1999), nur im Herzmuskel konnte kein Kanal dieser Familie gefunden werden. Erwartungsgemäß wurden alle in dieser Arbeit klonierten Isoformen des TBK in allen untersuchten Geweben (Leber, Muskel, alle Hirnregionen) mit RT-PCR detektiert. Weitere Expressionsanalysen, z. B. mit isoformspezifischen Antikörpern, könnten in Zukunft weiteren Aufschluß über die zelltypspezifische Verteilung in den Geweben liefern. Nachgewiesen wurde der BK-Kanal in unserer Arbeitsgruppe bisher in einem einzigen Zelltyp. Durch pharmakologische Dissektion konnte aus den Kaliumströmen der Retinaganglienzellen mit dem für BK-Kanäle selektiven Skorpiongift Iberitoxin ein Strom isoliert werden, der durchschnittlich 28% des gesamten Kaliumstromes ausmacht (Henne et al., 2000). Diese Untersuchungen stimmen hervorragend mit den Ergebnissen von Wang et al., 1998 überein, die den BK-Kanal in den Ganglienzellen der Retina des Frettchens elektrophysiologisch und pharmakologisch identifizieren konnten. Die Klonierung der Sequenz des BK-Kanals der Forelle liefert nun das Werkzeug, um diesen Kanal biophysikalisch und hinsichtlich seines Expressionsmusters zu untersuchen. Eine detailliertere

Studie des BK-Kanals in Zukunft verlangt aber die Kenntnis über entsprechende β -Untereinheiten in den untersuchten Geweben, da diese den Kanal in seinen grundlegenden Eigenschaften stark modulieren.

Ein wesentlicher Schritt zur Charakterisierung des Kaliumkanalrepertoires der Forelle wurde durch die Klonierung der beiden SK-Kanäle TSK2 und TSK3 getan. SK-Kanäle erfüllen eine wichtige Funktion im Nervensystem mit der Spike-Frequenzadaptation und der langsamen Nachhyperpolarisation, welche die Zeitstruktur von Aktionspotentialen grundlegend beeinflussen (Sah & McLachlan., 1991 und 1992). Beide TSK-Kanäle zeigen in der Primärstrukturanalyse eine typische 6TM-Kanalstruktur. Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit der GenBank ergab die größte Ähnlichkeit mit den korrespondierenden SK-Kanälen der Ratte. Vor allen im Bereich der Domänen S1 - S6 und den C-terminal anschließenden 4 α -Helices waren die Sequenzähnlichkeiten mit 84-93 % auffallend hoch. Eine hohe Variabilität ist jedoch in den zytoplasmatischen Bereichen der N- und C-Termini zu erkennen. Die S4-Transmembranhelix enthält drei konservierte Argininreste, die allerdings keinen gleichmäßigen Abstand von zwei Aminosäuren voneinander besitzen, wie es bei den Mitgliedern der Kv-Familie der Fall ist (Pongs, 1992). Der S6-Domäne nachfolgend, beginnt der zytoplasmatische, C-terminale Schwanz der Kanäle. Er enthält eine Abfolge von 4 putativen α -Helices, welche zur Calmodulin-Bindung herangezogen werden (Keen et al., 1999). Calmodulin bindet äußerst fest an SK-Kanäle, sowohl kalziumabhängig als auch kalziumunabhängig. Die kalziumunabhängige Interaktion von Calmodulin wird wesentlich von den Aminosäuren R433 und K436 beeinflusst. Diese hochkonservierten Aminosäuren konnten auch in TSK2 und TSK3 identifiziert werden. Calmodulin ist für die gegenüber BK-Kanälen deutlich höhere Kalziumsensitivität ($K_{0,5} \sim 0,6 \mu\text{M}$) der SK-Kanäle verantwortlich. Das Calmodulin-Protein umspannt bei seiner Interaktion zwei C-Termini und vermittelt über diesen Mechanismus möglicherweise auch die Tetramerisierung dieser Kanäle. Dabei verlieren zwei der vier Kalziumbindungsstellen ihre ursprüngliche Konformation und Kalziumbindefähigkeit. Da zwei Calmodulinmoleküle je Tetramer an die SK-Kanäle binden, stimmt diese Beobachtung hervorragend mit der Vorhersage überein, daß mindestens vier Kalziumionen bei der Öffnung der Kanäle benötigt werden (Köhler et al., 1996, Vandenberg & Lummis, 2000). TSK3 hat als einziger bisher bekannter SK-Kanal eine putative N-Glykosylierungsstelle in der extrazellulären Schleife zwischen S1 und S2, der Position, an der vermutlich auch die Kv-Kanäle glykosyliert werden. TSK2 und TSK3 zeigen eine große Anzahl putativer Phosphorylierungsstellen, die darauf hinweisen, daß auch diese Kaliumkanalfamilie durch Phosphorylierung im Rahmen von verschiedenen Signalkaskaden moduliert werden. Über diese Art der Modulation der SK-Aktivität existieren nur wenige Hinweise. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß die Öffnungswahrscheinlichkeit von SK-Kanälen in Myozyten der Maus durch die aktive, thiophosphorylierte Form der Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Kinase II (CamK II) erhöht wird (Kong et al., 2000). Vor diesem Hintergrund gewinnen die putativen Phosphorylierungsstellen der CamK II in den TSK2- und TSK3-Proteinen an Bedeutung.

SK-Kanäle wurden, bis zu ihrer Klonierung, über ihre Fähigkeit das Bienengift Apamin zu binden charakterisiert. Apamin blockiert die SK-Subtypen mit unterschiedlichen Affinitäten. Dieser Block ist teilweise abhängig vom Zellsystem, an dem die Pharmakologie gemessen wird. In Eizellen von *Xenopus laevis* heterolog exprimiert wird RSK1 von 100 nM Apamin nicht beeinflusst, während dieser Kanal in HEK293 exprimiert einen IC_{50} von 3,3 nM besitzt. Die Apamin-Sensitivität von RSK2 ist in beiden Zelltypen mit 83 bzw. 63 pM um zwei Größenordnungen höher als bei RSK1. RSK3 liegt in seiner Hemmbarkeit bezüglich Apamin zwischen diesen beiden Grenzfällen (Köhler et al., 1996; Strobaek et al., 2000). Die molekularen Grundlagen der Apamin-Bindung wurden von Ishii et al., 1997, aufgeklärt. In der Porenregion von SK2 sind zwei flankierende Aminosäuren, D307 und N334, für die hohe

Sensitivität des Kanals verantwortlich. Im SK3-Kanal ist das N334 durch ein Histidin und im SK1-Protein D307 zusätzlich durch ein Glutamat ersetzt, was für die reduzierte Sensitivität verantwortlich gemacht wird. Die gleichen Aminosäuren determinieren auch die Empfindlichkeit gegenüber D-Tubocurarin. In den TSK-Kanälen werden genau diese Aminosäuren entsprechend ihrer Subtypenklassifizierung an den entsprechenden Positionen detektiert.

In dieser Arbeit gelang es TSK2 erfolgreich in Insektenzellen und CHO-Zellen heterolog zu exprimieren. Es konnten erste elektrophysiologische Daten gesammelt werden, welche die Klassifizierung als SK2 rechtfertigen. Messungen im Ganzzellmodus zeigen wie erwartet einen spannungsunabhängigen, nicht inaktivierenden und kalziumsensitiven Strom, der vom TSK2-Protein getragen wird. Der Strom kann durch 50 pM Apamin zu 40 % inhibiert werden. Erste Einzelkanalmessungen an diesem Protein zeigen einen Leitwert von ~15 pS bei -80 mV in symmetrischer Kaliumlösung (Tanja Piwowarski, persönliche Mitteilung). TSK2 zeigt in den ersten Untersuchungen alle Charakteristika eines SK2-Kanals. Allein der Leitwert liegt in den ersten Messungen gegenüber dem Rattenhomologen RSK2 ca. 4 pS höher (Köhler et al., 1996). Zur exakten Bestimmung des Leitwertes liegen jedoch noch nicht ausreichend Daten vor. Die Reduktion des TSK2-Stromes durch 50 pM Apamin lässt auf einen IC_{50} von 50-100 pM Apamin schließen. Dieser Wert stimmt gut mit der Sensitivität des RSK2 von 63 bzw. 83 pM (IC_{50}) überein (Köhler et al., 1996, Strobaek et al., 2000) und unterstützt die diesbezügliche Vorhersage aufgrund der Aminosäuresequenz.

Aus dem Aminosäuresequenzvergleich von TSK2 mit anderen SK-Kanälen wurde der N-Terminus als variabelste Region des Proteins detektiert. Deshalb wurden die ersten 81 Aminosäuren heterolog in *E. coli* als His₁₀-Fusionsprotein exprimiert und das Polypeptid zur Immunisierung eines Kaninchens eingesetzt. Die polyklonalen Antikörper wurden mit Hilfe des MBP-TSK2n-Proteins affinitätsgereinigt. Der TSK2-Antikörper detektiert im Westernblot in heterolog exprimierenden Sf21-Zellen und in Membranfraktionen des Forellenhirnes ein Protein von ca. 63 kDa. Dieses experimentell ermittelte Molekulargewicht liegt im Bereich des vorhergesagten Molekulargewichtes von 62 kDa. Im Muskelgewebe allerdings ist das vom TSK2-Antikörper detektierte Protein um 8 kDa größer als vorhergesagt. Möglicherweise handelt es sich in diesem Fall um eine bisher unbekannte Isoform des TSK2-Proteins. SK-Kanalisoformen werden wie auch andere Kaliumkanäle durch alternatives Spleißen generiert (M. Ladzdunski, persönliche Mitteilung). Auch die RT-PCR-Analyse weist die Transkripte der TSK-Proteine im Muskelgewebe nach. Folglich ist es denkbar, daß die 70 kDa-Bande im Westernblot der Muskelmembranen einer TSK2-Isoform entspricht. Allerdings konnte in der Ratte im Northernblot kein RSK2-Transkript im Muskel- und Lebergewebe nachgewiesen werden (Köhler et al., 1996). Folglich spiegelt der Nachweis von TSK2 und TSK3 in der Leber mit RT-PCR die hohe Sensitivität dieser Methode wieder, da TSK2 immunologisch im Westernblot nicht detektiert werden konnte. Im Forellenhirn wurden mit RT-PCR in allen untersuchten Hirnregionen TSK2 und TSK3 gefunden, wie auch schon im Westernblot.

TSK2 konnte in verschiedenen Geweben zelltypspezifisch immunhistochemisch nachgewiesen werden. Im Cerebellum wurde eine schwache Anfärbung der Purkinje-Neuronen und des *Stratum granulosum* beobachtet. Ein deckungsgleiches Expressionsmuster wird im Kleinhirn der Ratte mit *in situ*-Hybridisierungen beschrieben (Stocker & Pedarzani, 2000). Das visuelle System der Forelle zeigt einen hohen Grad der differentiellen TSK2-Expression: Die Pyramidalzellen des *Tectum opticum* exprimieren TSK2 im hohen Maße in ihren Somata und den Dendritenbäumen. Die Retina wiederum zeigt eine hohe Immunreaktivität gegenüber dem TSK2-Antikörper in den Tractus-Fasern der Retinaganglienzellen, deren Somata ebenfalls SK2-Expression aufwiesen. Relativ hohe Expressionslevel wurden auch in den Photorezeptorzellen und dem Teil der inneren Körnerschicht, die überwiegend von den amakrinen Zellen repräsentiert wird, gefunden. Die Immunreaktivität an den Gefrierschnitten

der Retina spiegelt sich in der immunzytochemischen Untersuchungen der Retinadissoziat wieder: Die Retinaganglienzellen zeigen auch in diesem System eine hohe TSK2-Expression. Die Axone dieser Zellen, die den *Tractus opticus* bilden, sind deutlich immunpositiv. Die Photorezeptorzellen in den Dissoziaten werden, wie in den Schnitten, stark vom TSK2-Antikörper angefärbt, mit einer Schwerpunktfärbung der Rezeptorsynapse und des inneren Segments. Die differentielle Expression von TSK2 im zentralen Nervensystem der Forelle zeigt, daß dieser Ionenkanal eine wichtige Aufgabe bei der Kommunikation der Neurone in diesem komplexen Netzwerk erfüllt. Die erfolgreiche Klonierung des SK3-Subtypen aus dem Forellenhirn ermöglicht in Zukunft vergleichende Untersuchungen dieser beiden Kanäle, sobald es gelungen ist, das TSK3-Transkript in seiner vollen Länge nachzuweisen. Retinadissoziat bilden hier ein ausgesprochen komfortables System zur immunologischen und biophysikalischen, möglicherweise sogar biochemischen Charakterisierung der Kanäle. Ein besonderer Vorteil bietet sich durch die in dieser Arbeit bereits vorgenommene Erstellung des Kaliumkanalprofils verschiedener Zelltypen. Ergänzend zur biophysikalischen Charakterisierung sind Einzelzell-RT-PCR-Analysen der bereits abgeleiteten Zellen sehr aufschlußreich zur Korrelation der Stromcharakteristika mit dem Kaliumkanalrepertoire einzelner Zelltypen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studien bieten die Chance das komplexe Zusammenspiel der Ionenkanäle eines spezifischen Zelltyp, wie z. B. Retinaganglienzellen, Photorezeptorzellen oder auch den Kronenzellen des *Saccus vasculosus*, zu verstehen. Die elektrophysiologischen Daten der Zellen können dabei mit Daten aus den heterologen Expressionssystemen verglichen werden, zu deren Charakterisierung der Grundstock mit der Etablierung des Baculovirussystems zur Ionenkanalexpression gelegt wurde. Eine besonders interessante Fragestellung ist hierbei sicherlich die Aufklärung möglicher Interaktionspartner von Tsha3, um die ungewöhnlichen Stromcharakteristika dieses Kanales als Homomultimer zu verstehen. Die bereits elektrophysiologisch charakterisierten *Shaker*-Kanäle Tsha1 und Tsha2 sind aufgrund der Klassifizierung in eine gemeinsame Subfamilie sicherlich die ersten Kandidaten für solche Interaktionen. Aber auch der noch nicht komplettierte *Shaker*-Kanal Tsha4 (Turkan, 1998) ist bezüglich dieser Fragestellung von hohem Interesse.

Die Klonierung des TBK und der Hinweis auf mindestens 4 Isoformen ermöglicht in Zukunft eine detaillierte Betrachtung der Retinaganglienzellen, in denen ca. 28 % der gesamten Stromamplitude von diesem Kanal getragen wird. Die Kenntnis der kalziumaktivierten Kaliumkanäle ist essentiell für die Betrachtung der nativen Feueigenschaften dieser Zellen. Die subzelluläre Verteilung der Kaliumkanäle kann Hinweise auf die speziellen Funktionen dieser Kompartimente liefern.

Mit Traw1 konnte ein Kaliumkanal der *Shaw*-Subfamilie grundlegend charakterisiert werden. Bei diesen Untersuchungen ergaben sich gleich mehrere Fragestellungen, die es sich zu untersuchen lohnt: Mutageneseexperimente, bzw. die Konstruktion von chimären Kanälen sollten Aufschluß geben über die im Vergleich zu seinen Säugerhomologen hervorstechende höhere TEA-Sensitivität. Diese intrinsische Eigenschaft kann wertvolle Hinweise auf mögliche pharmakologisch wichtige Interaktionen innerhalb der Kanalproteine liefern. Die Kombination von Primärstrukturanalyse und Mutageneseexperimenten ermöglichen die Analyse des Phosphorylierungsstatus von Traw1 und dessen Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften des Proteins. Durch Immunpräzipitation von Traw1 mit den hergestellten Antikörpern kann eine Anbindung des Kanals an distinkte Signalkaskaden analysiert werden.

Mit den in dieser Arbeit präsentierten Daten konnte die Grundlage für eine differentielle Betrachtung der funktionellen Bedeutung und des Expressionsmusters der entsprechenden Kaliumkanäle im nativen Kontext gelegt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Adelman, J., Shen, K.Z., Kavanaugh, M.P., Warren, R.A., Wu, Y.N., Lagrutta, A., Bond, C.T., North, R.A. (1992): Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron*; 9: 209-216.
- Baro, D.J., Cole, C.L., Harris-Warrick, (1996): The lobster Shaw gene: cloning sequence analysis and comparison to fly Shaw. *Gene*; 170: 267-270.
- Barres, B.A., Silverstein, B.E., Corey, D.P., Chun, L.L. (1988): Immunological, morphological, and electrophysiological variations among retinal ganglion cells purified by panning. *Neuron*; 1: 791-803.
- Behrens, R., Nolting, A., Reimann, F., Schwarz, M., Waldschütz, R., Pongs, O. (2000): hKCNMB3 and hKCNMB4, cloning and characterization of two members of the large-conductance calcium-activated potassium channel β -subunit family. *FEBS Lett.*; 474: 99-106.
- Bekele-Arcuri, Z., Matos, M.F., Manganas, L., Strassle, B.W., Monaghan, M.M., Rhodes, K.J., Trimmer, J.S. (1996): Generation and characterization of subtype-specific monoclonal antibodies to K^+ channel α - and β -subunit polypeptides. *Neuropharmacol.*; 35 (7): 851-865.
- Bindokas, V.P., Ishida, A.T. (1996): Conotoxin-sensitive and conotoxin-resistant Ca^{2+} currents in fish retinal ganglion cells. *J. Neurobiol.*; 29: 429-444.
- Bixby, K.A., Nanao, M.H., Shawn, V., Kreusch, A., Bellamy, H., Pfaffinger, P.J., Choe, S. (1999): Zn^{2+} -binding and molecular determinants of tetramerization in voltage-gated K^+ channels. *Nat. Struct. Biol.*; 6: 38-43.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*; 72: 248-254.
- Brenner, R., Jegla, T.J., Wickenden, A., Liu, Y., Aldrich, R.W. (2000): Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel β -subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *J. Biol. Chem.*; 275 (9): 6453-6461.
- Chandy, K.G., Williams, C.B., Spencer, R.H., Aguila, B.A., Ghanshani, S., Tempel, B.L., Gutman, G.A. (1990): A family of three mouse potassium channel genes with intronless coding regions. *Science*; 247: 973-975.
- Deal, K.K., Lovinger, D.M., Tamkun, M.M. (1994): The brain Kv1.1 potassium channel: in vitro and in vivo studies on subunit assembly and posttranscriptional processing. *J. Neurosci.*; 14 (3): 1666-1676.
- Dougherty, D.A., Lester, H.A. (1998): Die Kristallstruktur des Kaliumkanals: Eine Ära in der Chemie der biologischen Signalübertragung. *Angew. Chem.*; 110 (17): 2463-2466.
- Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., MacKinnon, R. (1998): The structure of the potassium channel: Molecular basis of K^+ conduction and selectivity; *Nature*; 280: 69-76.
- Dudel, J., Menzel, R., Schmidt, R.F. (1996): *Neurowissenschaft*, Springer Verlag, Heidelberg.
- Esguerra, M., Wang, J., Foster C.D., Adelman, J.P., North, R.A., Levitan, I.B. (1994): Cloned Ca^{2+} -dependent K^+ channel modulated by a functionally associated protein kinase. *Nature*; 369, 563-565.
- Glauner, K.S., Mannuzzu, L.M., Gandhi, C.S., Isacoff, E.Y. (1999): Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel. *Nature*; 402: 813-816.
- Grissmer, S., Nguyen, A.N., Aiyar, J., Hanson, D.C., Mather, R.J., Gutman, G.A., Karmilowicz, M.J., Auperin, D.D., Chandy, K.G. (1994): Pharmacological

- characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol. Pharmacol.*; 45: 1227-1234.
- Hanahan, D. (1983): Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*; 166: 557-580.
- Hanaoka, K., Wright, J.M., Cheglakov, I.B., Morita, T., Guggino, W.B. (1999): A 59 Amino acid insertion increases Ca²⁺ sensitivity of rbslo1, a Ca²⁺-activated K⁺ channel in renal epithelia. *J. Membrane Biol.*, 172, 193-201.
- Härtig, W., Derouiche, A. Welt, K., Brauer, K., Grosche, J., Mäder, M., Reichenbach, A., Brückner, G. (1999): Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. *Brain Res.*; 842: 15-29.
- Henne, J., Pöttering, S., Jeserich, G. (2000): Voltage-gated potassium channels in retinal ganglion cells of trout: a combined biophysical, pharmacological, and single-cell RT-PCR approach; *J. Neurosci res*; 62: 629-637.
- Hille, B. (1993): Ionic channels in excitable membranes. Sinauer, Sunderland, MA. 2nd Edition.
- Holmes, T.C., Fadool, D.A., Levitan, I.B. (1996): Tyrosine phosphorylation of the Kv1.3 potassium channel. *J. Neurosci.*; 16: 1581-1590.
- Horn, R. (2000): A new twist in the saga of charge movement in voltage-dependent ion channels. *Neuron*; 25: 511-514.
- Hurst, R.S., Busch, A.E., Kavanaugh, M.P., Osborne, P.B., North, R.A., Adelman, J.P. (1991): Identification of amino acid residues involved in Dendrotoxin Block of rat voltage-dependent potassium channels. *Mol. Pharmacol.*; 40: 572-576.
- Ishii, K. (1999): Permeation of voltage-dependent potassium channels. *Potassium Ion Channels, Current Topics in Membranes*, 40, Academic Press, San Diego: 47-66.
- Ishii, T.M., Maylie, J. Adelman, J. (1997): Determinants of apamin and d-tubocurarine block in SK potassium channels. *J. Biol. Chem.*; 272: 23195-23200.
- Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1992): Structural elements involved in specific K⁺ channel functions. *A. Rev. Physiol.*; 54: 537-555.
- Jansen, W.F. (1975): The *saccus vasculosus* of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Neth. J. Zool.*; 25 (3): 309-331.
- Jansen, W.F., Burger, E.H., Zandbergen, M.A. (1982): Subcellular localization of calcium in the coronet cells and tanocytes of the *saccus vasculosus* of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Cell Tissue Res.*, 224: 169-180.
- Jin, W., Sugya, A., Tsuda, T., Ohguchi, H., Sugaya, E. (2000): Relationship between large conductance calcium-activated potassium channel and bursting activity. *Brain Res.*; 860: 21-28.
- Jones, E.M.C., Laus, C., Fettiplace, R. (1998): Identification of Ca²⁺-activated K⁺ channel splice variants and their distribution in the turtle cochlea. *Proc. R. Soc. Lond.*; 265: 685-692.
- Kanemasa, T., Gan, L., Perney, T.M., Wang, L.Y., Kaczmarek, L.K. (1995): Electrophysiological and pharmacological characterization of a mammalian *Shaw* channel expressed in NIH 3T3 fibroblasts. *J. Neurophys.*; 74: 207-217.
- Keen J.E., Khawaled, R., Farrens, D.L., Neelands, T., Rivard, A., Bond, C.T., Janowsky, A., Fakler, B., Adelman, J.P., Maylie, J. (1999): Domains responsible for constitutive and Ca²⁺-dependent interactions between Calmodulin and small-conductance Ca²⁺-activated potassium channels. *J. Neurosci.*, 19 (20): 8830-8838.
- Köhler, M., Hirschberg, B., Bond, C.T., Kinzie, J.M., Marrion, N.V., Maylie, J., Adelman, J.P. (1996) Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science*; 273, 1709-1714.

- Kong, I.D., Koh, S.D., Bayguinov, O., Sanders, K.M. (2000): Small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels are regulated by Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II in murine colonic myocytes. *J. Physiol.*; 524 (2): 331-337.
- Kurachi, Y., Jan, L.Y., Lazdunski, M. (1999): Potassium ion channels, molecular structure, function, and diseases; *Current Topics in Membranes*, 40, Academic Press, San Diego. XXI.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227: 680-685.
- Lang., R., Lee, G., Liu, W., Tian, S., Rafi, H., Orias, M., Segal, A.S., Desir, G.V. (2000): KCNA10: A novel ion channel functionally related to both voltage-gated potassium and CNG cation channels. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*; 278: F1013-F1021.
- Lesage, F., Attali, B., Lazdunski, M., Barhanin, J. (1992): Developmental expression of voltage-sensitive K^+ channels in mouse skeletal muscle and C_2C_{12} cells. *FEBS Lett.*; 310 (2): 162-166.
- Lev, S., Moreno, H., Martinez, R., Canoli, P., Peles, E., Musacchio, J.M., Plowman, G.D., Rudy, B., Schlessinger, J. (1995): Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca^{2+} -induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature*; 376: 737-745.
- Li, M., Jan, Y.N., Jan, L.Y. (1992): Specification of subunit-assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the *Shaker* potassium channel. *Science*; 257: 1225-1229.
- MacKinnon, R., Yellen, G. (1990): Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K^+ channels. *Science*; 250: 276-279.
- Meera, P., Wallner, M., Song, M., Toro, L. (1997): MaxiK channel, a distinct member of voltage dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N-Terminus and an intracellular (S9-S10) C-Terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 94: 14066-14071.
- Minor, D.L., Lin, Y.F., Mobley, B.C., Avelar, A., Jan, Y.N., Jan, L.Y., Berger, J.M. (2000): The polar interface is linked to conformational changes that open the voltage-gated potassium channel. *Cell*; 102: 657-670.
- Moreno, H., Kentros, C., Blueno, E., Weiser, M., Hernandez, A., Vega-Saenz de Miera, E., Ponce, A., Thornhill, W., Rudy, B. (1995): Thalamocortical projections have a K^+ channel that is phosphorylated and modulated by cAMP-dependent protein kinase. *J. Neurosci.*; 15: 5486-5501.
- Nara, M., Dhulipala, P.D.K., Wang, Y.X., Kotlikoff, M.I. (1998): Reconstitution of β -adrenergic modulation of large conductance, calcium-activated potassium (MaxiK) channels in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.*; 273 (12), 14920-14924.
- Nguyen, T.D., Rabe, H., Terlau, H., Jeserich, G. (2000): Isolation and heterologous expression of two genomic clones encoding *Shaker*-related potassium channels of trout CNS. *J. Neurosci. Res.*; 60: 174-183.
- Ochmann, H., Gerber, A.S., Hartl, D.L. (1988): Genetic application of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*; 120: 621-623.
- Orias, M., Bray.Ward, P., Curran, M.E., Keating, M.T., Desir, G.V (1997): Genomic localization of the human gene for KCNA10, a cGMP-activated K channel. *Genomics*; 42: 33-37.
- Papazian, D.M. (1999): Activation of voltage-dependent potassium channels. *Potassium Ion Channels, Current Topics in Membranes*, 40, Academic Press, San Diego: 29-46.
- Perney, T.M., Marshall, J., Martin, K.A., Hockfield, S., Kaczmarek, L.K. (1992): Expression of the mRNAs for the Kv3.1 potassium channel gene in the adult and developing rat brain. *J. Neurophys.*; 68: 756-766.
- Pinto L.H., Klumpp D.J. (1998): Localization of potassium channels in the retina. *Prog. Retin. Eye Res.*; 17 (2):207-30.

- Pongs, O. (1992): Molecular biology of voltage-dependent potassium channels. *Physiol. Rev.*; 72 (4) Suppl.: S69-S88.
- Rettig, J., Heinemann, S.H., Wunder, F., Lorra, C., Parcey, D.N., Dolly, J.O., Pongs, O. (1994): Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of beta-subunit. *Nature*; 369: 289-294.
- Ricci, A.J., Gray-Keller, M., Fettiplace, R. (2000): Tonotopic variations of calcium signalling in turtle auditory hair cells. *J. Physiol.*; 524 (2): 423-436.
- Richter-Landsberg, C., Heinrich, M. (1996): OLN-93: A new permanent oligodendroglia cell line derived from primary rat brain glial cultures. *J. Neurosci. Res.*; 45: 161-173.
- Ritz, H.J. (1997): Molekulare Grundlagen des inaktivierenden Kaliumioneneinstromes bei Gliazellen der Forelle. *Diplomarbeit*, Universität Osnabrück.
- Röper, J., Pongs, O. (1996): Presynaptic potassium channels. *Curr. Op. Neurobio.*; 6: 338-341.
- Rosenberg, R.L. East, J.E. (1992): Cell-free expression of functional *Shaker* potassium channels. *Science*; 360: 166-168.
- Sah, P., McLachlan, E. (1991): Ca²⁺-activated K⁺ currents underlying the afterhyperpolarization in guinea pig vagal neurons: A role for Ca²⁺-activated Ca²⁺ release. *Neuron*; 7: 257-264.
- Sah, P., McLachlan, E. (1992): Potassium currents contributing to action potential repolarization and the afterhyperpolarization in rat vagal motoneurons. *J. Neurophysiol.*, 68 (5): 1834-1841.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel S., Scharf, S.J. Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-Polymerase. *Science*; 239: 487-491.
- Salkoff, L., Kunkel, M.T., Wang, Z.W., Butler, A., Yuan, A., Nonet, M., Wei, A. (1999): The impact of the *Caenorhabditis elegans* genome project on potassium channel biology. *Potassium Ion Channels, Current Topics in Membranes*, 40, Academic Press, San Diego: 9-27.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulsen, A.R. (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 74: 5463-5467.
- Schreiber, M., Salkoff, L. (1997): A novel calcium sensing domain in the BK channel. *Biophys. J.*, 73: 1355-1363.
- Schreiber, M., Wei, A., Yuan, A., Gaut, J., Saito, M., Salkoff, L. (1998): Slo3, a novel pH-sensitive K⁺ channel from mammalian spermatocytes. *J. Biol. Chem.*; 273 (6): 3509-3516.
- Schreiber, M., Yuan, A., Salkoff, L. (1999): Transplantable sites confer calcium sensitivity to BK channels. *Nat. Neurosc.*; 2 (5): 416-421.
- Schrempf, H., Schmidt, O., Kummerlin, R., Hinnah, S., Muller, D., Betzler, M., Steinkamp, T., Wagner, R. (1995): A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *streptomyces lividans*. *EMBO J.*; 14: 5170-5178.
- Shah, M., Haylett, D.G. (2000): The pharmacology of hSK1 Ca²⁺-activated K⁺ channels expressed in mammalian cell lines. *Br. J. Pharmacol.*; 129: 627-630.
- Shen, N.V., Chen, X., Boyer, M.M., Pfaffinger, P.J. (1993): Deletion analysis of K⁺ channel assembly. *Neuron*; 11: 67-76.
- Shen, N.V., Pfaffinger, P.J. (1995): Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated K⁺ channel proteins. *Neuron*; 14: 625-633.

- Sheng, M., Liao, Y.J., Jan, Y.N., Jan, L.Y. (1993): Presynaptic A-current based on heteromultimeric K⁺ channels detected *in vivo*. *Nature*; 365: 72-75.
- Sheng, M., Tsaur, M.L., Jan, Y.N., Jan, L.Y. (1994): Contrasting subcellular localization of the Kv1.2 K⁺ channel subunit in different neurons of the rat brain. *J. Neurosci.*; 14(4): 2408-2417.
- Shi, G., Nakahira, K., Hammond, S. (1996): β -subunits promote K⁺ channel surface expression through effects early in biosynthesis. *Neuron*; 16: 843-852.
- Stegmann, J. (1998): Spannungsabhängige Ionenströme und Erregungsmuster von Retina-Ganglienzellen junger, adulter Regenbogenforellen. *Diplomarbeit*, Universität Osnabrück.
- Stocker, M., Pedarzani, P. (2000): Differential distribution of three Ca²⁺-activated K⁺ channel subunits, SK1, SK2, SK3, in the adult rat central nervous system. *Mol. Cell Neurosci.*; 15 (5): 476-493.
- Strobaek, D., Jorgensen, T.D., Christophersen, P., Ahring, P.K., Olesen, S.P. (2000): Pharmacological characterization of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels stably expressed in HEK 293 cells. *Br. J. Pharmacol.*; 129: 991-999.
- Tseng-Crank, J., Faster, C.D., Krase, J.D., Merz, R., Godinaot, N., DiChiara, T.J., Reinhart, P.H. (1994): Cloning, expression, and distribution of functionally distinct Ca²⁺-activated K⁺ channel isoforms from human brain. *Neuron*; 13: 1315-1330.
- Turkan, Z. (1998): Expression spannungsabhängiger Kalium-Kanäle im ZNS der Regenbogenforelle. *Diplomarbeit*, Universität Osnabrück.
- Uebele, V.N., Lagrutta, A., Wade, T., Figueroa, D.J., Liu, Y., McKanna, E., Austin, C.P., Bennett, P.B., Swanson, R. (2000): Cloning and functional expression of two families of β -subunits of the large conductance calcium-activated K⁺ channel. *J. Biol. Chem.*; 275 (30): 23211-23218.
- Vandenberg, J.I., Lummis, S.C.R (2000): Ion channels – a plethora of pharmaceutical targets. *TiPS*, 21, 409-410.
- Vega-Saenz de Mira, E., Weiser, M., Kentros, C., Lau, D., Moreno, H., Serodio, P., Rudy, B. (1994): Shaw related potassium channels; *Handbook of membrane channels*, Academic Press, New York: 41-78.
- Vernier, J.M. (1969): Table chronologique du developement embryonnaire de la truite arc-en-ciel *Salmo gairdneri*, Rich. 1836; *Ann. Embryol. Morphogenet*, 2: 495-520.
- Wallner, M., Meera, P., Toro, L. (1996): Determinant for β -subunit regulation in high conductance voltage activated and Ca²⁺-sensitive K⁺ channels: An additional transmembrane region at the N-Terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 93, 14922-14927.
- Wallner, M., Meera, P., Toro, L. (1999): Calcium-activated potassium channels in muscle and brain. *Potassium Ion Channels, Current Topics in Membranes*, 40, Academic Press, San Diego: 117- 140.
- Wang, G.Y., Olshausen B.A., Chalupa, L.M. (1999): Differential effects of Apamin- and Charybdotoxin-sensitive K⁺ conductances on spontaneous discharge patterns of developing retinal ganglioncells. *J. Neurosci.*; 19 (7): 2609-2618.
- Wang, H., Kunkel, D.D., Martin, T.M., Schwartzkroin, P.A., Tempel, B.L. (1993): Heteromultimeric K⁺ channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. *Nature*; 365: 75-79.
- Wang, L.Y., Gan, L., Forsythe, I.D., Kaczmarek, L.K. (1998): Contribution of the Kv3.1 potassium channel to high-frequency firing in mouse auditory neurones. *J. Physiol.*; 509 (1): 183-194.
- Wang, W., Sackin, H., Giebisch, G.A. (1992): Renal potassium channels and their regulation. *A. Rev. Physiol.*; 54: 81-96.

- Wei, A.M., Covarrubias, A., Butler, K., Baker, M., Pak, M., Salkoff, L. (1990): K⁺ current diversity is produced by an extend gene family conserved in *Drosophila* and mouse. *Science*; 248: 599-603.
- Weiger, T.M., Holmqvist, M.H., Levitan, I.B., Clark, F.T. Sprague, S., Huag, W.J., Ge, P., Wang, C., Lawson, D., Jurman, M.E., Glucksmann, M.A., Silos-Santiago, I., DiStefano, P.S., Curtis, R. (2000): A novel nervous system β subunit that downregulates human large conductance calcium-dependent potassium channels. *J. Neurosci.*; 20 (10): 3563-3570.
- Weiser, M., Bueno, E., Sekirnjak, C., Martone, M.E., Baker, H., Hillman, D., Chen, S., Thornhill, W., Ellisman, M., Rudy, B. (1995): The potassium channel subunit Kv3.1b is localized to somatic and axonal membranes of specific populations of CNS neurons. *J. Neurosci.*; 15: 4298-4314.
- Weiser, M., Vega-Saenz de Miera, E., Kentros, C., Moreno, H., Franzen, H., Hillman, D., Baker, H., Rudy, B. (1994): Differential expression of *shaw*-related K⁺ channels in the rat central nervous system. *J. Neurosci.*; 14: 949-972.
- Xia, X.M., Fakler, B., Rivard, A., Wayman, G., Johnson-Pais, T., Keen, J.E., Ishii, T., Hirschberg, B., Bond, C.T., Lutsenko, S., Maylie, J., Adelman, J.P. (1998): Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*; 395: 503-507.
- Yao, X., Segal, A.S., Welling, P., Zhang, X., McNicholas, C.M., Engel, D., Boulpaep, E.L., Desir, G. (1995): Primary structure and functional expression of a cGMP-gated potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 92: 11711-11715.
- Yazulla, S., Studholme, K.M. (1998): Differential distribution of *Shaker*-like and *Shab*-like K⁺ channel subunits in goldfish retina and retinal bipolar cells. *J. Comp. Neuro.l*; 396: 131-149.

7 Anhang

7.1 Sequenzen

7.1.1 Primer

7.1.1.1 *Traw1*

Primer	Sequenz 5'->3'
Chan ¹	CAC IAC IGC CCA CCA RAA
Kv3r2r	ATA AAG TCG ATG ATG TTG AG
Kv3r3v.....	CGG CAC CCG GGT GTG TTT GC
Kv3r4r	GTC GGT CTC ATC GAT ACC CC
Kv3r4v.....	ACT GGG AAG TTG CAC TGC CC
Kv3r5r	GGC ATC GGG CTC GGC GAG CC
Kv3r6r	GTT CTC GTC GCC TTG TCC CAT
Kv3rcm ²	TGT CCC GGG TTA CGT ACC CTT
Kv3rcvI-Nde ²	ACA TGG CAT ATG GCC CCA CAA G
Kv3rcvm ²	TTA GAA TTC AAC AGA GCA GCT
Kv3rg9r	TTA CGT ACC CTT CCT GAC TC
Kv3rgv.....	ATG GGA CAA GGC GAC GAG AAC
Kv3rstopXba ²	GCT CTA GAC GTA CCC TTC CTG ACT
Kv3rv.....	GAG AAT TCA GAG GAG GAT
Kv3rv2.....	ACG TTG GCA GCG GTT GCT TTG
Raw ¹	CCC ITG YTG YTG GAT GAC
RawS1r ¹	AGG ATG AAG AAC ARR GAG GC
Kv3rr	TGC TGT TGT CCA GCG GGT
Kv3cv	ACG TTG ACA ATG GAG ACG AC
Kv3cr.....	CAC ACT TGT TGA TGA TGG T

7.1.1.2 *Tsha3*

Primer	Sequenz 5'->3'
Chan ¹	CAC IAC IGC CCA CCA RAA
RCK C ¹	CAA YGA RTA YTT YTT AGA
T3crXho ²	AAC CTC GAG CAT GTC ATT CCT GTC
T3cvNde ²	TTC TAC CAT ATG GAG ACA GAG C
T3gneuv2.....	GAG AAA CGC ACAGTG ATG GAG GTG CC
T3S1/2Bam ²	AAA GGG ATC CGT GAA ATA GGC
T3S1/2cmalEcoI ²	CAT ATG GAA TTC GAG CAA GCA
T3S1/2Xho ²	ACT CTT CTC GAG TTC CGC GAT

¹ Degenerierte Primer

² Mutagenese-Primer

Tsha0v	TGG CTT CTG TTT GAR TAY CCR G
Tsha3gDNA3v.....	TAG CAG CGT TTG TGC ACA TGG
Tsha3gmv	ATG AAC AGT GAG GGT TCG
Tsha3gr	AGA TTA CAT GTC ATT CCT GTC
Tsha3gr.....	AGA TTA CAT GTC ATT CCT GTC
Tsha3grBam ²	ATC AAC AGG ATC CAT GTC ATT CCT
Tsha3r.....	CTG GAG TTG ATG TCT GTA TC
Tsha3r2.....	GAA GAA GTC ACT TTT GCT CGG
Tsha3r3.....	CCC GTC CTT CAC TTC CAG CG
Tsha3stopXba ²	GCT CTA GAC ATG TCA TTC CTG TCA T
Tsha3v	CTT TAT CAC CAC CTT TTC C
Tsha3v2	GAG GGG TTC ATA ACA GAA CCT GAG C
Tsha3v3	ACC ACC TTT TCC CTG GGT CTC AAT GG
Tsha3v4	CTT CAG ATC CTG GGC CAA ACC
Tsha3v5	ATG ACC ACT GTG GGA TAC GGG
TshapMalXbaI ²	GGC TTT GTT CTA GAC CGG ATC CGT
TshaS3r ¹	ACA ATG TCG ATG GTG TTC AT

7.1.1.3 Tsha1/2

Primer	Sequenz 5'->3'
Chan ¹	CAC IAC IGC CCA CCA RAA
RCK C ¹	CAA YGA RTA YTT YTT AGA
T1crXho ²	GGC CTC GAG CAC GTC TGT GAG CAT
T1cS1/2MalEco ²	ATG ACA GAA TTC GAG GAG CAG
T1cvNde ²	TAC CAC CAT ATG ACA GAG GGC
T1S1/2rBam ²	ATG AAG AAT GGA TCC GTG GAA
T1S1/2vXho ²	AGC TTC TGC CTC GAG ACC
T2crXho ²	TGT CTC GAG TAC ATC CGT CAG CTT
T2cS1/2MalEco ²	CAT ATG GAT ATC AAT GAC GAG
T2cvNde ²	TTT TAT CAT ATG GAG CGT AAT
T3/2S1/2rBam ²	ATR AAA AAS GGA TCC GTG AA
T3/2S1/2vXho ²	ATY TTC TGY CTC GAG ACT
Tsha1r.....	CGC CTG GCC ATC CTC TGG TTT
Tsha1v	GAC GAC GAA CCG CAC AGT GTC TT
Tsha2gv	ATG ACT GTT GTG TCC TGT GAG
Tsha2r.....	TGC TCG CTT CCC GCT CCC TGT
Tsha2stopXba ²	GCT CTA GAT ACA TCG CTC AGC TTG CC
Tsha2v	GGT TCA GGG AAG ATC ACA GCA
TshapMalxba ²	GGC TTT GTT CTA GAC CGG ATC CGT

7.1.1.4 TSK

Primer	Sequenz 5'->3'
Skgrstop.....	GAG CTG CTC TCG GAG GAG GT
SKgv3m.....	GAA ATA GCC ATG AGC AGT TGC

SKgy2.....	GGG GAG TTC CAG CAT CAC TG
SK13r	CCT CTG TCT GCA GTT CAT TC
SK12r	CTG GAT TTC ATC TCG ACC
SKgr	GGA CTC TAG CTG CTC TCG GA
SK11v1.....	ACG AGC GCA TCT TCT TCA TCT
SK2v ¹	AGC AGC TGC AGG TAC AAC GGG
Sknvmm ²	TAA CGA ATT CGC CAT GAG CAG
Sknrm ²	CTT TTG CCC GGG GTT CTA GTA
SKnvmNde ²	CAT ACA TAT GAG CAG TTG C
TSK1v ¹	GTC GAC WRY GGT ACC GAT GAY TGG
TSK2r ¹	TGB GGT ACC ATR TCB CCR TA
TSK3r ¹	TGR ATG GCC TGC AGR AAC TT
TSK4v	TGG CGC ATC GCC ATG ACG TTG
TSK5r.....	TCT GGT GTT TGC GGA CTC TGG
TSK6r = SK6r	CAG TGC CTG GAC AGA TGG TCA
TSK7v	AAT CGG GTG TTG CTG ATA TCG
TSK8r.....	CAG CAT GAC GCG GGC GAT GA
TSKS1r2.....	CCT CTT TTC GAA CAG CGC CC
TSKS12r.....	AAC ATT CCG AAA ATG AGT GC
TSKm3v	ATG AGC TCC TGT AA TAC ACA
TSKm2v	ATG GAG AGA GAG AGG GAC AGG
TSKm1v	ATG CCC AAG GCC TCC CTC CCC
TSK1/2v ¹	TGY CTG ATM AGC CTK TCT AC
TSK32r.....	TGT GTG TCC ATC ATG AAG TT
TSK33r.....	GTC CAC CAG AGT GTT GGC CTG
TSK34v	CAT AGG GGC CCT CAA TAA GGT GC
TSK35v	AGG TAT CAT GAT GCC CAG GAT GTG
TSK36v	CTG TGG ATC ATC GCT GCC TGG
TSk37v	AAC TTC CTG GGG GCG ATG TGG
TSK3g40r.....	TCA ACA ACT GGA GGT GCT AGT

7.1.1.5 TBK

Primer	Sequenz 5'->3'
Maxi10v	GAG GCA TGC GAA ACT CAC CC
Maxi12r.....	CTG TGC TGA TAT CAT GAC CC
Maxi14v	AAG CTG TAC CTG ACA CAG CC
Maxi15v	AAT AAC CCT GCT AAC AGT CAG
Maxi16v	TCC ATG GTC ACG TTT TTC CG
Maxi17r.....	GAA GAC ATT GAA GAA CAT GTC G
Maxi18r.....	CTG TTA GCA GGG TTA TTT ACC
Maxi19v	CTG GTT GTA CTA GTT TTC GC
Maxi1v ¹	ATG TGG TGG GCN TTY CTN GC
Maxi20v	CTT ATA GAT TCT TCT GAT CC
Maxi21r.....	CTG GGC CTC CTT CCT TTT GAT
Maxi22r.....	GGC TTC ACT GGC GAT GAA GAA C
Maxi22v	TTC TTC ATC GCC AGT GAA GCC
Maxi23v	TGC AAA GCT TGT CAC GAT GAC

Maxi24r GTT CCC AGG GAT TAG TAG AGG
Maxi25r CGT GGA GTC GTA CTG CTT CAC
Maxi26v ACC ATT CCT AGC TGG AAC TGG
Maxi27v GAG TAC CTG AGG AGA GAG TGG
Maxi28v CAC GAT CTG GCC AGA GTG AAG
Maxi29r GAA GAT CAA GTC TGT GG
Maxi2v¹ AAY GAY AAR CTN TGG TTY TGG
Maxi30v GCT GGT GAA CCT TTG TTC C
Maxi31v ATG TAC ACA GAG TGT CTG TCC
Maxi32v TTG CAG GCT AAC TCC CAA GG
Maxi4r¹ GCR CAC CAR TGR AAC ATN CC
Maxi9v GAG ATT GAT ACA GTT CTC TG
Maxigkv GAT TTA CTC CAA GAT GTC CG!
Maxigr TCA ACA TTC ATC TTC AAC TTC TC
Maxigr¹ TCA AGA TTC ATC TTC AAC TTC TCT GAT TGG
Maxigv ATG CTA GAT GAG GCG GAC GCC
Maxigv2 ATG ATG AGT AGA AGT AAC TAT TTT
Maxigv3 ATG GAC GTG ATC ATC CCC TTC
Maxik2v GAT TTA CTC AGA GGG CGC TAC
Maxik4v ACG ACT GAT TTA CTT TGA AG
Maxik8v GCA AAC GAC TTG AAG ACG

7.1.1.6 Aktin

Primer Sequenz 5' -> 3'

AktinBF1 TAT GGA ATC TTG CGG TAT CCA CG
AktinBR1 CCC ATC CAG ACA GAG TAT TTA CG

7.1.2 Traw1

```

-359 - GGAGGAGTGTTCATCTTTGGTTTTGTGATGTAGCCTAACCATGAACATTTTGATTTT - -300
-299 - CCATCCAAATTTCTGGGGCAGCCACAGGCTGCTTCTTGCTTTAGCCTACCTTGCAACTAT - -240
-239 - ATCAAACACCCGTTGAGGTATTGCTGTCTTTGGTATTATTAAGTTGGGATTTATCTGA - -180
-179 - AAGCTTGAGTGGAGCCTGTGCTTTTTTGAAGCTGAATAAAATAAGTCGGTAAGAAACCT - -120
-119 - GCCTTCTCTTTCTCTTTCAATCCGAGTTCATGTGTGCGCCAGACCCCACTGCGTTGCT - -60
      |
-59 - TCGCACATGTTTTGCAATATAATGACTGGAACCTGCTCGAGACATGCCTAAGCGACGCAA - 1
  1 -                                     <Kv3r6r|                                     M
      |
      |Kv3rgv>
  2 - TGGGACAAGGCGACGAGAACGATCGTATTGTGATTAACGTGGGAGGTATCAGACACCAGA - 61
  21 - G Q G D E N D R I V I N V G G I R H Q T

      |<
  62 - CCTACCGTAGCACCCTTCGTACATTACCGGGCACCCGGTTAGCTTGGCTCGCCGAGCCCG - 121
  41 - Y R S T L R T L P G T R L A W L A E P D

<Kv3r5r|
122 - ATGCCACAGTCACTTTGACTATGATCCCAAGATTGAAGAATTTTCTTTGACCCGGCACC - 181
  61 - A H S H F D Y D P K I E E F F F D R H P

      >|
182 - CGGGTGTGTTGCCACATCCTCAATTACTATAGGACTGGGAAGTTGCACTGCCCTGCAG - 241
  81 - G V F A H I L N Y Y R T G K L H C P A D

      |<
      |Kv3r4v>
242 - ATGTTTGGCGCCCTTTGTACGAGGAGGAGTTGGCGTTCTGGGGTATCGATGAGACCGACG - 301
101 - V C G P L Y E E E L A F W G I D E T D V

      |>
      |Raw>
302 - TGGAACCATGTTGTTGGATGACTTATCGGCAACATCGAGAGGCAGAGGAGGCATTGGATA - 361
121 - E P C C W M T Y R Q H R E A E E A L D S

      |>
      |Kv3rv>
362 - GTTTTGGGGTGGCCCCCGAGAATTCAGAGGAGGATGGGGATGAGGAAACGCTGGGAA - 421
141 - F G G G P P E N S E E D G D E E T L G M

      |>
      |Kv3rv2>
422 - TGATCAATAGTTGGCTCTTGATGGACCAGATGCCAAATCCGGGGGCATTGGCGACGTT - 481
161 - I N R L A L D G P D A K S G G H W R R W

      |<
      |S1
482 - GGCAGCGTTTGTCTTGGCACTTTTCGAGGATCCCTATTCTTCTAAATATGCAAGTTGGA - 541
181 - Q R L L W A L F E D P Y S S K Y A R W I

      |<
      |RawS1r|
542 - TAGCCTTCGCCTCCCTGTTCTTCATCCTGGTTTCCATCACCACCTTCTGCCTGGAGACAC - 601
201 - A F A S L F F I L V S I T T F C L E T H

      |<
      |Kv3rr|
602 - ACGAGGCCTTCAACCCATCATCAACCGGACGGAAATTCACCCGCTGGACAACAGCACGC - 661
221 - E A F N P I I N R T E I D P L D N S T R

      |<
      |S2
662 - GGGTCTACCAGGAGACTGAGACCGTGGTTTTCCTCACCTATATTGAGGGGTCTGTGTGC - 721
241 - V Y Q E T E T V V F L T Y I E G V C V L

      |<
      |S3
      |Kv3r2r|
722 - TGTGGTTTTACATTTGAGTTTATAATGCGAGTGACGTTCTGTCCGAGCAAGCTGGAGTTTT - 781
261 - W F T F E F I M R V T F C P S K L E F F

      |<
      |S4
782 - TCCGTAACACCTCAACATCATCGACTTTATTGCCATCATGCCCTTCTATCTGGAGGTTG - 841
281 - R N T L N I I D F I A I M P F Y L E V G

      |<
      |S5
842 - GGCTGAGTGGGCTCTCTTCCAAGGCAGCTAAGGATGTACTGGGTITCCTACGTGTGGTAC - 901
301 - L S G L S S K A A K D V L G F L R V V R

902 - GCTTTGTCCGGATCCTCCGGATCTTTAAGCTGACTAGGCACCTTTGTGGGACTGCCGCTCC - 961
321 - F V R I L R I F K L T R H F V G L R V L

962 - TGGGTCATACACTCCGAGCCAGCACCAATGAATTCTGCTCCTCATCATCTTCTCGCCC - 1021
341 - G H T L R A S T N E F L L L I I F L A L

1022 - TGGGTGTGCTCATCTTCGCCACTATGATCTACTATGCTGAAAGGATTGGTGCCAAGCCCA - 1081
361 - G V L I F A T M I Y Y A E R I G A K P N

```

```

1082 - ATGACCCCCGAGCCAGCGAGCACACACTTCAAGAACATTCCTATTGGATTCTGGTGGG - 1141
381 - D P R A S E H T H F K N I P I G F W W A
      <Chan|
1142 - CCGTGGTGACCATGACAACCCTTGGCTATGGAGACATGTACCCTCAGACATGGTCTGGCA - 1201
401 - V V T M T T L G Y G D M Y P Q T W S G M

      S6
1202 - TGCTGGTGGGAGCGCTGTGTGCTCTGGCTGGTGTGCTGACTATCGCCATGCCAGTGGCTG - 1261
421 - L V G A L C A L A G V L T I A M P V P V

1262 - TTATTGTCAATAACTTTGGGATGTATTACTCCCTGGCGATGGCCAAGCAGAAGTTACCAA - 1321
441 - I V N N F G M Y Y S L A M A K Q K L P K

1322 - AGAAAAAGAACAAGCATATCCCCGCGCCCCACTTCTGGGCTCCCCAATTACTGTAAGT - 1381
461 - K K N K H I P R A P L L G S P N Y C K S

      |Kv3rcvI-Nde>
1382 - CGGAGGTAACCTCACCTCACCACAGCACGACGAGACACATGGCCCCTGGCCCCACAAG - 1441
481 - E V T S P H H S T Q D D T W P L A P Q E

      |Kv3rcvm>
1442 - AACCACCAGAAGAGATCTTAGAAGTAAACAGAGCAGCTCCACAAGCTGTTTTCAAGATC - 1501
501 - P P E E I L E V N R A A P Q A V F Q D P

1502 - CCAAAGTGAACGGGAAACACCCAAGGAGTCAGCCAAGAGAGCAGCCAAGGAGTCAGCCA - 1561
521 - K V N G E T P K E S A K R A A K E S A K

1562 - AGGAGTCAGCCAAGGAGTCAGCCAAGGAGGCAGAAAAAGCAGCACTGGCCAATGAAGACT - 1621
541 - E S A K E S A K E A E K A A L A N E D C

1622 - GTCCCCACATAGACCAGATTATGTCACCTGACGATGGCCAGATCTTAAGCCCTATTGATC - 1681
561 - P H I D Q I M S P D D G Q I L S P I D R

1682 - GATCCGAGCAGCAGCCCTGCTTCCTCCTGGCCATGGGCGGGCGCCAGGCCACACGGCGG - 1741
581 - S E Q Q P C F L L A M G G R P G H T A A
      |<
      |<
      |<
1742 - CCAGAGTCAGGAAGGGTACGTAATATGACACACCTAGACACAGGCCCTACATCGGGGCAC - 1801
601 - R V R K G T * <Kv3rcm|

1802 - ACATCCCAGAGCTTAAATCTCAGAGCACAACCTTCTCAGGGAACACATTCAGGGAACAC - 1861
1862 - ATTCAGGGAACACACCTCAGGGAACACACTTAGAGTCAAGCACAACATACTTTCATGT - 1921
1922 - GTECTAGGGAGGAGAACTGCACAGCTGTACTGTAAGTCTGAAACGTGACACAAAAAGA - 1981
1982 - CACTTTAGAGACACACACATTATTTTGTGTTGCTTTCTCACAGTAGGTCTTGTCTTT - 2041
2042 - ACTATCTTTGTCTATACAGCTTCCAACACAAACAACCTTTCGGTCCCCACCCACATACTA - 2101
2102 - CTGCTGAGCGACACAACATCTGCCAGTCGCAGTTGTAATGAGAAGTTGTTCTCAACTG - 2161
2162 - GCCTACCTGGTTAAATAAAGGTGGATAAAAAAAAAAAAAAAAAA - 2193

```

7.1.3 Tsha3

```

-596 - TGCCACTGTATCTGTAAGTGAGCCAAGAGTTTCTCTCTGCATGTGCAAGGCCCTAGGTGT - -535
-536 - CAAGTAGAGACAGCGGTGCGCAATGTAAAAGCTTGTGTGTCAGGATATGTTTACCTGTCTAAA - -475
-476 - CCTAACAGAGTGGAAAGATAAAATGTTCTAACACCACTCATCCATCCCAAGTTGCTTTACTG - -415
-416 - TAATGTTTCGATTGGTATGAAAAATAACCAAGACTATGTAAATGTACCATCCAGGCATAAC - -355
-356 - TCTGACGATCAAAATATAGGTTGTGTTTTTTGAGTTGTGAGTCAATTATGACTGAAGTGCG - -295
-296 - ATGAGAGCTGATCTCCTGTTTCAGGAGACTGAGCTGAGAGATGATGATATAGAGGGATG - -235
-236 - TCTTGTTTACGGTCACACACAACAGAGCCAGAGGATGGAACTAAGCAGACTTGTATTT - -175
-176 - AATTCTTTTACGATTACAAGGAGATGGCATCTTAAATCAGACCACCCTGTTGAATACACCT - -115
-116 - GTATGAATGCTCTTCGGGAACGAGGAGACCGTGGCAGGATCATCAGGCTGGTTGTGGCGT - -55

                                     |T3gneuv2>
-56 - CGCCCCAGTCCCATCTCAAATGAGGAACAGAGGAGTCCCCCGAGAAACGCACAGTGATGG - 4
  1 -                                     M E

      >|
  5 - AGGTGCCACTGGTGAACTTTGAGAACATGGATGATATCGGCATCAACATGGGCGACCCCA - 64
  3 - V P L V N F E N M D D I G I N M G D P S

65 - GTGAGTCGGGGTACCCCACTTCACCCACCTCAGAGGCGGTGCCTGATCAAAACCTAGTCA - 124
23 - E S G Y P T S P T S E A V P D Q N L V T

125 - CCAATCGTGTGACGTCACAAAATTCGGCACAGCACCGTGGGCACCAGATCAGGCATGAGG - 184
43 - N R V T S Q N S A Q H R G H Q I R H E G

185 - GGTTTTCTCCCTATACACCACATACACTGACTGCTAAAGGACAATCTAGATGCAACAGTC - 244
63 - F S P Y T P H T L T A K G Q S R C N S L

                                     |Tsha3gmv>                                     >|
245 - TGCTGTCCAACCTTCAAACCTCCTGATGAACAGTGAGGGTTCGCCGATTGACAGCATCTTCA - 304
83 - L S N F K L L M N S E G S P I D S I F N

                                     |<
305 - ATCAGCTGGTTCAGGAGTGCCGTGACAACGAAGAAGACCTGTTTGGTGAGACCTGGAAG - 364
103 - Q L V Q E C R D N E E D L F G E T L E V

<Tsha3r3|
365 - TGAAGGACGGGAATCAGAAAGTGGTCATCAATATTTTCAGGCATGATGTTTCGAGACACAAC - 424
123 - K D G N Q K V V I N I S G M M F E T Q L

425 - TAAAAACACTATCACAGTTTCCAGACACCCTGCTAGGAGACCCCGCAAAAAGGATGTACT - 484
143 - K T L S Q F P D T L L G D P A K R M Y Y

                                     |RKC>                                     >|
485 - ACTTCGACCCCATGAAGAACGAATACTTTTTTCGACAGGAATCGTCCAAGCTTCGATGGGA - 544
163 - F D P M K N E Y F F D R N R P S F D G I

545 - TCTTGTACTTCTATCAGTCTGGGGGCAAAATTCGAAGACCGGTCAACGTCCCCTTAGAGA - 604
183 - L Y F Y Q S G G K I R R P V N V P L E I

605 - TTTTTGCAAAAGAGATTGTCTTCTACAAATTAGGAAAAGAAGCTATGGAACAGTTCCGTG - 664
203 - F A K E I V F Y K L G K E A M E Q F R E

                                     |Tsha3v2>                                     >|
665 - AAATTGAGGGGTTTATAACAGAACCTGAGCCGCTGTTGCCACCAACGAGGTCCATAAGC - 724
223 - I E G F I T E P E P L L P T N E V H K Q

                                     |Tsha0v>                                     >|
725 - AGTTTTGGCTCCTTTTTTGTGATCCAGAGAGTTCCAGTGCAGCTCGGTCAGTGGCCCTGG - 784
243 - F W L L F E Y P E S S S A A R S V A L V

                                     |T3S1/2Xho>
785 - TGCTGTGCGGGGTCATTGTCTCATCTCCATCTTCAATTTTCTGCCTGGAAACTCTTCCAGAGT - 844
263 - S V G V I V I S I F I F C L E T L P E F

      >|                                     |Tsha3v3>                                     >|
845 - TCCGCGATGACGTAGACTTTATCACCACCTTTTCCCTGGGTCTCAATGGAACTCAGGAAG - 904
283 - R D D V D F I T T F S L G L N G T Q E G

                                     |<                                     <T3S1/2Bam|
905 - GACCTGCTTCAGTACAAAACAACTTGTTCCTATTTTCAGACCCCTTTTTCATTGTGG - 964
303 - P A S V Q N N L F A Y F T D P F F I V E

                                     |<
965 - AAACATCTGCATAGTTTGGTTCTGCTTTGAGCTTGGTGTACGCTTTGTGGTCGCCCCGA - 1024
323 - T I C I V W F C F E L G V R F V V C P S

```

```

1025 - GCAAAAAGTGACTTCTTCCACAACATTTATGAACACCATTGACATTGTCTCTATAATCCCCT - 1084
343 - K S D F F H N I M N T I D I V S I I P Y
|< <TshaS3r|
|S3
1085 - ATTTTGTAAACCATGGTGACAGAGCTGTGGACCACGCCAGATACAGACATCAACTCCAGCC - 1144
363 - F V T M V T E L W T T P D T D I N S S Q
|< <Tsha3r|
1145 - AGAACATGTCACTGGCCATCTTACGCATCATCCGTCTAGTGCGAGTCTTCCGAATCTTCA - 1204
383 - N M S L A I L R I I R L V R V F R I F K
S4
1205 - AGCTCTCGCGGCACTCCAAGGGGCTTCAGATCCTGGGCCAAACCCCTGAAAGCTAGTATGA - 1264
403 - L S R H S K G L Q I L G Q T L K A S M R
|Tsha3v4> >|
1265 - GGGAGCTGGGTCTGCTGATCTTCTCTCTTTATTGGAGTCATACTCTTCTCCAGTGCCA - 1324
423 - E L G L L I F F L F I G V I L F S S A I
S5
1325 - TCTACTTTGCTGAGGTGGACGAGCCCCAAACACAGTTTGTCAAGTATCCCTGACGGGTTCT - 1384
443 - Y F A E V D E P Q T Q F V S I P D G F W
H5 |<
|< Chan| |Tsha3v5> >|
1385 - GGTGGGCTGTGGTGACAATGACCACTGTGGGATACGGGGACATGTGTCTTACTACTCTGG - 1444
463 - W A V V T M T T V G Y G D M C P T T L G
S6
1445 - GGGGCAAAATGGTGGGGACTCTTTGCGCCATTGCCGGCGTGTGACCATCGCCTTACCCG - 1504
483 - G K M V G T L C A I A G V L T I A L P V
|T3cvNde> >|
1505 - TCCCTGTTATCGTCTCCAACCTTAACTATTTCTACCACCGGGAGACAGAGCAAGCAGAGA - 1564
503 - P V I V S N F N Y F Y H R E T E Q A E K
1565 - AACAAAGTGATTGATGATGCGACAGAGGCTGCTCAGAAAGTATCTGACGCAAACAGATATG - 1624
523 - Q V I D D A T E A A Q K V S D A N R Y E
|<|<|<
1625 - AGTATGGTAGTGCAACCTCTCCTAGCATGAGCAAAATCAATGGTAGAGTGACAGGATGACA - 1684
543 - Y G S A T S P S M S K I N G R V Q D D R
<T3crXho|
<Tsha3gr|
1685 - GGAATGACATGTAATCTGTTGATCATTGAAGTTATTATAACCAAGGCATGACAACTAA - 1744
563 - N D M * <Tsha3grBam|
<Tsha3stopxba|
1745 - GAAATCAAACATATCTAAATACTAAAATGCACTGATTTAATTTTTGTTTCTGTATTTTAT - 1804
|Tsha3gDNA3v> >|
1805 - ATTCATTTCATAGCAGCGTTTGTGCACATGGTATAGTATTCATCTCTCACAATATTCAA - 1864
1865 - ATAAGAAGCTAATATTAGTTATCAGCCTGACTGATCTGCATGTGGATGTGTCAAAATGCA - 1924
1925 - ATTAAGATTATATATAAACAGTCACAGCAAAAACATTTACAGTTTGAAGTGGACAGATC - 1984
1985 - TTGAGTATATGTGGCATTATAAGCTTACAAATCCTGCAGTTGTATTTGGCGTGGCATGAT - 2044
2045 - GATACCTTAGCATCAGGCAATTGTGTTCAATTAATTTGTTTCATGAAAAATATAAAAAA - 2104
2105 - AAGAAAAAAAAAAAAA - 2118

```

7.1.4 TSK2

```

-333 - |SKgv2> >|
-333 - GGGGAGTTCCAGCATCACTGTAAGTACCAGCACTACTGCGGACCAGAGGAACGCTCCACT - -272
-273 - AAGCAGCGCAACCAATGCTGCACCTGCAAGAACTGTACCTGTGGTGCAAGAAAAAGCCTA - -212
-213 - GTTTTTCGCGGGACGTCGGCGATCACTCAAGGAACTTTAAGGACGCCATCCGTAACGTCT - -152
-153 - TCGAGACAAGGTTGTCAATTTAGCGTCTGTGAGTTTAAGCCCTCCAGTCATGGTAGTTCA - -92
-93 - CCCAGACATCACCACCATCAGCATTGCCACAATCGGCCGCGGGCAGCCCGAGCAGCAGC - -32
-33 - CACAAAAGAGAGTAACTCGTATAACGAAATAGCCATGAGCAGTTGCAGATAACAACGGCGGC - 27
1 - M S S C R Y N G G
|SKnvm> |SKgv3m> |SK2v> >|
|SKnvmNde>
28 - GTAATGCGGCCGCTGAGCAACTTGAGCTCGTCCCGCAGAAACCTACACGAGTTTGATTCA - 87
10 - V M R P L S N L S S S R R N L H E F D S
88 - GAGTCCCAGCCTTTACAACCAATTTCCACCGCAGATGCATCGGACACCCTAGCATCTAAA - 147
30 - E S Q P L Q P I S T A D A S D T L A S K
148 - CCGGAGAACAATTCGACCACCCTGATGCCTTACGCATCGGGAGACGGAGGGGTGGATGT - 207
50 - P E N N S T T L M P Y A S G D G G G G C
208 - AACAACAGTGGCAGTAAATCGGGTAAAAAGAAGAACCCAGAACATTGGGCAAAAGCTTGA - 267
70 - N N S G S K S G K K K N Q N I G Q K L G
|< <SKnrm|
268 - CATAGAAGGGCCTTGTTTGAGAAAAGGAAGCGCCTCAGCGACTATGCTTTGATCTTTGGG - 317
90 - H R R A L F E K R K R L S D Y A L I F G
328 - ATGTTTGAGATCGTTGTTATGGTTATAGAGACTGAACTCTCATGGGAGCATATGGAAAG - 387
110 - M F E I V V M V I E T E L S W G A Y G K
|TSK1/2v> >|
388 - GAATCCTTGATTTCATTAGCTCTAAAATGCGCTGATAAGCCTTTCTACAATCATTCTTCTT - 447
130 - E S L Y S L A L K C L I S L S T I I L L
448 - GGTCTAGTTATCATATACCACGCAAGGGAGATTTCAGTTATTCATGGTGGACAATGCAGCA - 507
150 - G L V I I Y H A R E I Q L F M V D N A A
|>SK11v1 s3 >|
508 - GATGACTGGAGGATAGCCATGACCTACGAGCGCATCTTCTTCATCTGCCTGGAGATCCTG - 567
170 - D D W R I A M T Y E R I F F I C L E I L
568 - GTGTGCGCCATCCACCCCATCCCAGGCAACTACACCTTCACCTGGACAGCGCGCCTGGCC - 627
190 - V C A I H P I P G N Y T F T W T A R L A
628 - TTCTCCTACACCCCGTCCAAGACGGACGACGACGTTGACATCATCCTGTCTATCCCCATG - 687
210 - F S Y T P S K T D A D V D L I L S I P M
|< <SK8r|
688 - TTCTTGGCGCTGTATCTCATCGCCCGCTCATGCTGCTCCACAGCAAGCTCTTCACAGAC - 747
230 - F L R L Y L I A R V M L L H S K L F T D
748 - GCCTCGTCCCGCAGTATCGGGGCGCTCAACAAAATCAACTTCAACACACGCTTTGTCATG - 807
250 - A S S R S I G A L N K I N F N T R F V M
s5 <
808 - AAGACCCTGATGACCATCTGCCCTGGCACCGTGTGGTCTTTACCATCTCGTTGTGG - 867
270 - K T L M T I C P G T V L L V F T I S L W
868 - ATCATCGCTGCGTGGACCGTGAGGGCCGCGAGAGATAACCATGACAACATGGACATAACC - 927
290 - I I A A W T V R A C E R Y H D N M D I T
H5
928 - AGCAACTTCTAGGAGCCATGTGGTTGATCTCAATCACTTTTCTAACCATTGGATATGGG - 987
310 - S N F L G A M W L I S I T F L T I G Y G
s6
988 - GACATGGTCCCCAACACTTACTGTGGAAAGGAGTCTGTCTCCTCACTGGTATTATGGGA - 1047
330 - D M V P N T Y C G K G V C L L T G I M G
1048 - GCCGGCTGCACAGCCTTGGTAGTGGCTGTGGTTGCAAGAAACTGGAGTTAACCAAAGCT - 1107
350 - A G C T A L V V A V V A K K L E L T K A

```

1108 - GAAAAACATGTTTCATAATTTTATGATGGACGCCAGCTGACAAAAAGAGTGAAAAACACT - 1167
370 - E K H V H N F M M D A Q L T K R V K N T

1168 - GCTGCAAATGTACTCAGGGAGACGTGGCTCATCTACAAGAACACCAAACCTGGTGAGGAAA - 1227
390 - A A N V L R E T W L I Y K N T K L V R K

1228 - ATGGACCATGCCAGAGTCAGGAAGCACCAGAGGAAATTCCTCCAAGCCATTCATCAAGCT - 1287
410 - M D H A R V R K H Q R K F L Q A I H Q A

1288 - CGAAAATTGAGAAGTGTAAATGGAGCAACGCAAGCTGAATGACCAAGCAAACCTCACTA - 1347
430 - R K L R S V K M E Q R K L N D Q A N S L

1348 - GTGGACCTTGCAAAGACTCAGAACATCATGTATGACCTGATCTCAGACCTGAACGAGAGA - 1407
450 - V D L A K T Q N I M Y D L I S D L N E R

1408 - GGGGAGGACATGGAGAAGAGGATCGCCATGCTGGAGACCAAGCTGGAGACTCTGCTGGGG - 1467
470 - G E D M E K R I A M L E T K L E T L L G

1468 - AACCTGCAGGCCCTGCCAGGACTCATCAGCCAGGTCATCAGCCAGCAGCACAGGGACTTC - 1527
490 - N L Q A L P G L I S Q V I S Q Q H R D F

1528 - CTGGAGGTGCAGCTCCAGCCATACGACAAACACAGCCCTGAGCGCTCACAGTCTGTCTCC - 1587
510 - L E V Q L Q P Y D K H S P E R S Q S V S

1588 - AGACGGAGGTCGTCCTCCACGGCACCACCCACCTCCTCCGAGAGCAGCTAGAGTCCAAGT - 1647
530 - R R R S S S T A P P T S S E S S *
|< <Skgrstop|<Skgr|<Skstopxba|

1648 - GGAACACCTACAAAGAAGACTTTTGCATCATATGGCCAGGTTGCATTTATTGTAAAGCC - 1707
1708 - TTCAATAAGTGTATCCAAATTCGATGACAGAATCCAAGGTACCGGACAATGGATTT - 1767
1768 - TAAACTGATGCTGTTGTTTGTTTTATTATCTCAAAGATGTTGTTTTCCTTGCTCTGG - 1827
1828 - TGACGGGACTGTAGAAAAATATGCTTTCCTCAGTAAAAACTATTAGGCCTATCGATGGGG - 1887
1888 - GCTGTGATCAGAACTATACTCCATCTCTATGCAGAGGTAGCCAGTTTATAGGACAGCAAG - 1947
1948 - TTACCGCCGGGTGTAAAGATATGGCAGAAAATAGTGCTTCTTCTCACAGACTTTGTGC - 2007
2008 - TTCCGCTGGCTTGATTTCAGATGCCGTGTTTCTTAAAGCAATCTGAGAAATCAACGGACCT - 2067

2068 - GTCAATCAGCAAGCTTTACAGCAATACTTTTTATTGAGGAAAAAGTATTTGATGGAGATG - 2127
|<

2128 - AATGAACTGCAGACAGAGGGCAGCACAAGAAGGCACCCACATACTGTCACTCAGAGGTAC - 2187
2188 - CATATGCAGCTTGAAATATGAGGAAAAACATATATCTTTTAGGTTAGAAAACAGCATCAA - 2247
2248 - CTATAGTGGTTTTTTGGTTGATGGTGCTGAGTGCCCTGTAGAATGACTATTTTTGGGGCC - 2307
2308 - AACTGCAAACAATTTAGTCCCTAATCAAATGAATGCATCTAAATCTGTACTTGCAC - 2367
2368 - TACTTTTAATCAATGCACCTTCAATGACTGACTGACATATTAATACATTTTGTGCTCC - 2427
2428 - TTAAAATAAGAACAATTTAGATGTTTGGGCATGGATTTATGGTCAATGCGCAATTAATAA - 2487
2488 - ATTGTGAATTAGTGAGGGTGACTCAAGTCAAAGCCCTCATGCTATGTACCACAAAGGGAC - 2547
2548 - CTCAATATCAAAGTCTAGGCTACTGAAATGAATACTTTCAATTATCACAAAACAGTTT - 2607
2608 - GTTCTTTCCTCAAATATCTCAACTCTTGTCTGGAGGCACCTTAGTATTTATACTGTTTT - 2667
2668 - TTGCCTCAGCTGAGCAATGCTAGTTGGTTGCAATGCAAACCAATAACTCACAAGAACTGT - 2727
2728 - AACTCACTTTTAAAAGAAAATCATATTTTTATATGTTTCATGAGGATAAGCACACCTCCG - 2787
2788 - CACACCTTTACAACATATGTCTTTCACACAATATTTACAAGCAAATGATGATGGAGAGA - 2847

2848 - TATGAACAGAATAAACGATGCAACATGTTGCATAGGTCGAGATGAAATCCAGCATATTCA - 2907
2908 - ACATATCTTCCAGTAAACCTCCAGGACCAGGGTTAAGAAACCATGTTGAAGAGCCTCCCA - 2967
2968 - TCATCCCTACCATGATCAGGCCTGTCTTGTCTGAAATGATAGCTTAATTCAGAAGAGG - 3027
3028 - TTCAATATATCTCTTTCAAAACCATGGAATATACATTGTTAGTTCAAGAGGAATGTAT - 3087
3088 - AGAAGATGATATAGCAACTTACTGTGTGATCACTAACCACATATCCTTAATAATGAGTGG - 3147
3148 - TGGTTATCAGATTGAGAAGTAAAATGTCAAACCTAACTGCAAAAAAGTAATCTCTGAC - 3207
3208 - ACATATAATTGTGAAAATATTGTATGTGCTCAAGATTATAGCATTATATCAACAAAGCT - 3267
3268 - TCGTAACTTTGTTTTAAACAGCAATGGCTTGGCCACTGGCCAGTCACAAAAGGGAAATAAA - 3327
3328 - GGTAACCTTCCACATTTATGCACATTTTGGCAATATGCACCTCCCTCCTGCAAGGTTT - 3387
3388 - TAAGAAGTTAAAGGAGTGTGCCACATTCATCTGATGGGCACCTTATCTAGCCACACTTTCT - 3447
3448 - GCAATGACCTTGTCCAACCAACCAAAAGCTCAATCCCATCTACAGTGTGAAATGTACTGT - 3507
3508 - GTTGGTATTAGAGCTTTAAACACTGTGTCAGTCGATCCAGAAATTTAGCAACATAGATA - 3567
3568 - CTTTTGAGATATTATGTACTGTATGCGATAGAAATATAAACAATAAAAACTACTATTTAC - 3627
3628 - CAAAAAAAAAAAAAAAAA - 3645

1193 - TGGACATG ^{S4} GTGCTGAGTGTTC^{S4}CCATGTTCTCCTCCGCCTCTACCTCATCGCCCGCGTCATGC - 1252
 399 - D M V L S V P M F L R L Y L I A R V M L

<TSK8r | | TSK34v>
 1253 - TGCTGCACAGCAA^{S4}ACTGTTCACTGATGCCTCCTCGCGGAGCATAGGGGCCCTCAATAAGG - 1312
 419 - L H S K L F T D A S S R S I G A L N K V

> | | S5 <TSK6r |
 1313 - TGCAC^{S5}TTAACACAAGGTTTGTGATGAAGACTCTGATGACCATCTGTCCAGGCACTGTTCC - 1372
 439 - H F N T R F V M K T L M T I C P G T V L

| TSK36v> > | TSK35>
 1373 - TCCTGGTCTTCAGCATCTCAGTGTGGATCATCGCTGCCTGGACCGTACGAGTGTGTGAGA - 1432
 459 - L V F S I S L W I I A A W T V R V C E R

> | | TSK37v> H5 > |
 1433 - GGTATCATGATGCCAGGATGTGACCAGTAACTTCCTGGGGCGGATGTGGCTCATCTCTA - 1492
 479 - Y H D A Q D V T S N F L G A M W L I S I

| < <TSK2r |
 1493 - TCACCTTCCTGTCTATTGGCTACGGAGACATGGTCCCTCACACGTACTGTGGCAAAGGAG - 1552
 499 - T F L S I G Y G D M V P H T Y C G K G V

^{S6}
 1553 - TCTGTTTACTAACC^{S6}GGCATCATGGGTGCGGGCTGTACAGCTCTGGTGGTTGCCGTGGTAG - 1612
 519 - C L L L T G I M G A G C T A L V V A V V A

^{oHA} | < <TSK32r |
^{oHB}
 1613 - CAAGGAAGCTGGAGTTGACCAAGCGGAGAAACACGTCACAAC^{oHA}TTCATGATGACACAC - 1672
 539 - R K L E L T K A E K H V H N F M M D T Q

1673 - AACTCACCAAGAGGATAAAAAATGCTGCGGCCAACGTTCTGAGGGAGACTTGGCTCATCT - 1732
 559 - L T K R I K N A A A N V L R E T W L I Y

| < ^{oHC} <TSK5r | | <
 1733 - ACAAACACACCAA^{oHC}ACTACAGAAGAAGATTGACCCTCCAGAGTCCGCAAACACCAGAGGA - 1792
 579 - K H T K L Q K K I D H S R V R K H Q R K

<TSK3r |
 1793 - AGTTCCTGCAGGCCACCCACCAACTGCGTAGTGTGAAGATGGAGCAGAGGAAACTGAGTG - 1852
 599 - F L Q A T H Q L R S V K M E Q R K L S D

| < <TSK33r |
^{oHD}
 1853 - ATCAGGCCAACACTCTGGTGGACCTCTCAAAGATGCAAAGTGTGATGTACGAGCTGATGT - 1912
 619 - Q A N T L V D L S K M Q S V M Y E L M S

1913 - CGGAGCTGAACGATCGCAGTGAGGACCTGGAGCGGCAGATGCTGTCTCTGAAACACGGG - 1972
 639 - E L N D R S E D L E R Q M L S L E T R V

1973 - TGGAACAGCTGACCGCCGGCTTCAGTGCCTGCCTGCCACCTGTCTGCCACGCTGTCTG - 2032
 659 - E Q L T A G F S A L P A H L S A T L S A

2033 - CCCAGCACACCACCTTGCTTCACCTGCTCCGAGAGAGGGACTACAGAGGAGGAGGATGGG - 2092
 679 - Q H T T L L H L L R E R D Y R G G G W G

2093 - GAGGGGAGTTGCATGTGGAGGAAGGACAGCCCTGGTCCCTGTTGCTCAGCTTGGCCCCTG - 2152
 699 - G E L H V E E G Q P W S L L L S L A P A

2153 - CCCATGCCCTGACCCCAAGCCCAAACCTGGCCCCAGAGCCACAGCAGCCCCCAGAAGGAA - 2212
 719 - H A L T P S P N L A P E P Q Q P P E G T

| < <TSK3g40r |
 2213 - CCATAGAGGGTAGCACTAGTCCCAATACTAGCACCTCCAGTTGTTGAAGAGAGGAGGAGG - 2272
 739 - I E G S T S P N T S T S S C *

2341 - AGAGGATGGGAAGTGGAAAGAAGAGGTGAGGGGAGAGGAGGAGATAGATGGGCCAGTAGG - 2332
 2333 - AATACGGGATGAGGAGGGAGGGGGG - 2358

7.1.6 TBK1

```

-180 - CGCGGATCCGACACTCGTTTTGCTGGCTTTGATGGGGCTGGGGACGCTGGCATAGGCTCTC - -121
-120 - CAAGGCTCCTAGATGCTAGATGAGGCGGACGCCACCGTTACCCATGGAAGCGGCAACTCT - -61
    |Maxigv> >|
-60 - ATGATGAGTAGAAGTAAC TATTTTAACAAAAATCCGGACTCCTCGATCTCTATGTCCAAG - -1
    |Maxigv2> >|
    |Maxigv3> >| |Maxilv>
  1 - ATGACGATGATCATCCCCTTCTCGCCAGACGTGCCCTGCGACAACAATGGCCAGCGCATG - 60
  1 - M D V I I P F S P D V P C D N N G Q R M
    S0 >| |Maxi 16v> >|
  61 - TGGTGGGCATTCTCGCTCCTCCATGGTCACGTTTTTCGGGGGTCTCTTCATCATTTCTC - 120
  21 - W W A F L A S S M V T F F G G L F I I L
    |<
  121 - CTGTGGAGGACCCTCAAATACCTGTGGACCGTCTGCTGCCACTGTAACATCAAAGGAAG - 180
  41 - L W R T | L K Y L W T V C C H C N I K R K
    <Maxi21r| |< |Maxi15v> >| <Maxi18r|
  181 - GAGCCCAGAAGGTAAATAACCCTGCTAACAGTCAGGCAGCAGACGGTACAGCTAAGGGT - 240
  61 - E A Q K V N N P A N S Q A A D G T A K G
  241 - CCTGATGAGAAGGACGAAGTGGTCCCTGCCAGCGAGGTGGGCTGGATGACATCCGTTAAG - 300
  81 - P D E K D E V V P A S E V G W M T S V K
    |< <Maxi12r| |Maxi22v> >| |Maxi19v>
  301 - GACTGGGCCGGGTCTATGATATCAGCACAGACTCACCGGCAGGGTCCTGGTTGTAATA - 360
  101 - D W A G V M I S A Q T L T G R V L V V L
    >| |Maxi20v> >|
  361 - GTTTTCGCTCTCAGCATTGGAGCACTTGAATAATACCTTATAGATTCTTCTGATCCATA - 420
  121 - V F A L S I G A L G I Y L I D S S D P I
    S2 |<
  421 - GAATCCTGTCAGAATTTCTACAAAGATTTCAATTACAGATCGACATGTTCTTCAATGTC - 480
  141 - E S C Q N F Y K D F T L Q I D M F F N V
    <Maxi17r| |Maxi2v> >|
  481 - TTCTTCCTCCTCTACTTTGGCTTGCGGTTATAGCAGCCAAATGATAAGCTGTGGTTCTGG - 540
  161 - F F L L Y F G L R V I A A N D K L W F W
    S3
  541 - CTGGAGTCAACTCAGTTGTGGACTTCTTACTGTTTCTCCTGTCTTTCGTATCTGTCTAC - 600
  181 - L E V N S V V D F F T V P P V F V S V Y
    S4 |Maxi9v>
  601 - CTGAACAGGAGCTGGCTGGGTTTAAGATTCTGAGAGCCTTGAGATTGATACAGTTCTCT - 660
  201 - L N R S W L G L R F L R A L R L I O F S
    >| |Maxi30v>
  661 - GAAATTTTACAGTTTTTGAATATCTTAAAAACAAGCAATTCATCAAGCTGGTGAACCTG - 720
  221 - E I L Q F L N I L K T S N S I K L V N L
    >|
  721 - TGTTCCATCTTCATAGGCACATGGCTAACAGCTGCCGGATTTCATACATTTGGTGGAAAAC - 780
  241 - C S I F I G T W L T A A G F I H L V E N
    H5
  781 - TCAGGGGATCCTTGGGAAAACCTCCAAAATCCAGTCACTTTCCTATTGGGAATGTGTC - 840
  261 - S G D P W E N F Q N S Q S L S Y W E C V
  841 - TACTTGCTCATGGTCACTATGTCAACAGTGGGCTACGGGGACGCTCATGCAAAAACCACC - 900
  281 - Y L L M V T M S T V G Y G D V Y A K T T
    S6
  901 - CTGGGACGCTGTTCATGGTCTTCTTCATCCTCGGGGGTTTGGCCATGTTTGCAGCTAC - 960
  301 - L G R L F M V F F I L G G L A M F A S Y
  961 - GTCCCTGAAATCATAGAGTTAATAGGAAACCGCAAGAAATATGGTGGTTCCTATAGTGCG - 1020
  321 - V P E I I E L I G N R K K Y G G S Y S A
  1021 - GTTAATGGGAGAAAGCACATTGTGGTTTGTGGTCATATTACACTCGAAAGTGTCCCAAC - 1080
  341 - V N G R K H I V V C G H I T L E S V P N
  1081 - TTCCTCAAAGACTTCTACACAAGGACAGGGATGATGTCAATGTAGAAATGTTTTTCTC - 1140
  361 - F L K D F L H K D R D D V N V E I V F L

```

1141 - CATAATATTTCCCTAATCTTGAGCTGGAAGCCTTGTTC AACGCCACTTTACCCAGGTA - 1200
 381 - H N I S P N L E L E A L F K R H F T Q V
 1201 - GAGTTCTACCAGGGTCTGTCTCAACCCTCACGATCTGGCCAGAGTGAAGATTGAGTCA - 1260
 401 - E F Y Q G S V L N P H D L A R V K I E S
 1261 - GCAGACGCCTGTCTGATTCTGGCTAATAAGTACTGTCCAGATCTGATGCTGAAGACGCC - 1320
 421 - A D A C L I L A N K Y C P D P D A E D A
 1321 - TCCAACATCATGAGGGTCATCTCTATCAAGA ACTATTC CCCC AAGATACGAATTATCACT - 1380
 441 - S N I M R V I S I K N Y S P K I R I I T
 1381 - CAGATGTTACAATACCATAACAAGGCTCACCTGTCTCAACATTCTAGCTGGAAGTGAAG - 1440
 461 - Q M L Q Y H N K A H L L N I P S W N W K
 1441 - GAGGGGGATGATGCTATCTGTCTAGCAGAGCTCAAGGCTGGCTTCATAGCTCAGAGCTGT - 1500
 481 - E G D D A I C L A E L K A G F I A Q S C
 1501 - CTGGCCCAGGGCCTCTCCACCATGCTGGCCAACCTCTTCTCCATGAGGTCCTTCATCGAG - 1560
 501 - L A Q G L S T M L A N L F S M R S F I E
 1561 - ATTGAAGAGGACACATGGCAGAAGTACTATTTAGAAGGGGTAGCTAATGAGATGTACACA - 1620
 521 - I E E D T W Q K Y Y L E G V A N E M Y T
 1621 - GAGTATCTGTCCAGTGCCTTTGTGGGGCTCTCCTTCCCTGCAGTCTGCGAGCTGTGCTAC - 1680
 541 - E Y L S S A F V G L S F P A V C E L C Y
 1681 - GTGAAGCTGAAGCTGTTGCTTATCGCCATCGAGAACAAGTCGGAGCTGGGTGAGAGCAGC - 1740
 561 - V K L K L L L I A I E N K S E L G E S S
 1741 - ATCCTCATCAACCCGGGAACCACGTAAGATGCAGGAAGGAACCTCTGGGGTCTTTCATC - 1800
 581 - I L I N P G N H V K M Q E G T L G F F I
 1801 - GCCAGTGAAGCCAAAGAAGTAAAGAGAGCATT TTTTCTACTGCAAAGCTTGTACAGATGAC - 1860
 601 - A S E A K E V K R A F F Y C K A C H D D
 1861 - ATCACAGACCCCAAACGGATCAAAAAGTGTGGCTGCAAACGACTGATTTACTCCAAGATG - 1920
 621 - I T D P K R I K K C G C K R L I Y S K M
 1921 - TCCGCCTACAAACAATGAACTGGCATGTTGTTTTGATTGCGCCGTTTCAGAGCGAGAC - 1980
 641 - S A Y K Q M K L A C C F D C G R S E R D
 1981 - TGCTCTTGATGTCAGGCAGTGTACATAGTAACATGGACACCCTACAGAGGGCCTACCCA - 2040
 661 - C S C M S G S V H S N M D T L Q R A Y P
 2041 - CTCTCCTCTGTCTCTGTTTCATGATTGCGCAACC ACTTTACGTGCCTTTGAAGACGAGCAC - 2100
 681 - L S S V S V H D C A T T L R A F E D E H
 2101 - CCGTCAACTCTGTGCGCCAAAAAAGCAGCGGAACGGAGGCATGCGAAACTCACCCAAC - 2160
 701 - P S T L S P K K K Q R N G G M R N S P N
 2161 - AACTCGCCAAAATGATGAGCAGGCATGACCCTCTACTAATCCCTGGGAACGAGCAGATG - 2220
 721 - N S P K M M S R H D P L L I P G N E Q M
 2221 - GAGAACATGGACATGAATGTGAAGCAGTACGACTCCACGGGAATGTTCCACTGGTGCCCA - 2280
 741 - E N M D M N V K Q Y D S T G M F H W C P
 2281 - TCTAAAGAGATTGAGAAGTTCATCTGACCCGGAGTGAGGCATCCATGACGGTGTGAGC - 2340
 761 - S K E I E K V I L T R S E A S M T V L S
 2341 - GGCCATGTAGTGGTCTGTATATTTGGAGATGTCACGTCCGCTCTAGTGGGGCTGCGAAAC - 2400
 781 - G H V V V C I F G D V T S A L V G L R N

2401 - TTGGTGATG CCTTTGAGAGCCAGCAACTTCCATTATCACGAGCTGAAGCCCATAGTGTTT - 2460
 801 - L V M P L R A S N F H Y H E L K P I V F

2461 - GTGGGCTCGCTGGAGTACCTGAGGAGAGAGTGGGAAACTCTACACAACCTTCCCCAAGGTC - 2520
 821 - V G S L E Y L R R E W E T L H N F P K V

2521 - TCCATACTACCTGGTACGCCATTAAGTCGTGCAGATTTAAGGGCTGTCAACATCAACCTC - 2580
 841 - S I L P G T P L S R A D L R A V N I N L

2581 - TGCGACATGTGCGTGATACTGTCGGCCAATCAGAACAATATCGACGACGCCTCGCCGCAG - 2640
 861 - C D M C V I L S A N Q N N I D D A S P Q

2641 - GATAAGGAATGCGTTCTGGCGTCGCTCAACATCAAGTCTATGCAGTTTGACGACAGCATC - 2700
 881 - D K E C V L A S L N I K S M Q F D D S I

2701 - GGGCTCTTGCAGGCTAACTCCCAAGGTTTTCACGCCTCCTGGAATGGACCGGTCTCTCCA - 2760
 901 - G L L Q A N S Q G F T P P G M D R S S P

2761 - GACAGCAGTCCAGTACATGGTTTAGTACGCCAGGCCTCCGTACCACCGGCGCCAACATC - 2820
 921 - D S S P V H G L V R Q A S V T T G A N I

2821 - CCCATCATC ACTGAACTAGTGAACGACTCCAACGTTTCAGTTTCTGGACCAAGATGATGAT - 2880
 941 - P I I T E L V N D S N V Q F L D Q D D D

2881 - GATGACCCTGACACAGAGCTGTACTGACACAGCCCTTCGCCTGCGGAACCGCCTTCGCT - 2940
 961 - D D P D T E L Y L T Q P F A C G T A F A

2941 - GTCAGCGTGTGGACTCTCTCATGGGTGCAACATACTTCAACGATAATATCCTCACCCCTG - 3000
 981 - V S V L D S L M G A T Y F N D N I L T L

3001 - ATCCGGACGCTGGTGACTGGGGGAGCCACCCCGGAGCTAGAGGCTCTATTGGCCGAAGAG - 3060
 1001 - I R T L V T G G A T P E L E A L L A E E

3061 - AACGCCCTGCGAGGGGGCTACAGCACGCCACAGACACTGGCCAACCGAGACAGGTGTCGT - 3120
 1021 - N A L R G G Y S T P Q T L A N R D R C R

3121 - GTAGCCCAGCTAGCCCTCTATGACGGGCCCTTTGCCGACTTGGGGGATGGCGGTTGCTAT - 3180
 1041 - V A Q L A L Y D G P F A D L G D G G C Y

3181 - GGAGATTTGTTTTGTAAAGCGTTGAAGACGTACAACATGTTGTGCTTCGGAATATACAGA - 3240
 1061 - G D L F C K A L K T Y N M L C F G I Y R

3241 - TTGAGAGACGCTCACCTCGCCACGCCTAGCCAGTGTACCAAACGGTATGTGATCACCAAC - 3300
 1081 - L R D A H L A T P S Q C T K R Y V I T N

3301 - CCTCCGTATGAGTTTGGAGCTGGTCCCCACAGACCTGATCTTCTGTCTGATGCAGTTTGAC - 3360
 1101 - P P Y E F E L V P T D L I F C L M Q F D

3361 - CACAATGCGGGCCAGTCTCGGACCAGCCTTTCCCACAGCTCCCACTCCTCCCATTCTCTCC - 3420
 1121 - H N A G Q S R T S L S H S S H S S H S S

3421 - AGCAAAAAGAGCTCGTCCGTCCACTCCATCCCCACCACCAACCGGCAGAACCGCAGCAGC - 3480
 1141 - S K K S S S V H S I P T T N R Q N R S S

3481 - AAGGCCCGGGAGGCCGCCACAAACAGAAAAGGAATGGTTTACAGATGAACCAGAAAAT - 3540
 1161 - K A R E A G H K Q K K E W F T D E P E N

3541 - GCCTACCCACGGAACATTCAGATCAAGCCCATGAGCACTCACATGGCCAACCAAATCAAC - 3600
 1181 - A Y P R N I Q I K P M S T H M A N Q I N

3601 - CAATACAAATCCACTAGCAGTCTGATTCCACCAATCAGAGAAGTTGAAGATGAATGTTGA - 3660
 1201 - Q Y K S T S S L I P P I R E V E D E C *

7.1.7 TBK2

```

1 - |Maxigv3> >|
1 - ATGGACGTGATCATCCCCTTCTCGCCAGACGTGCCCTGCGACAATAATGGCCAACGCATG - 60
1 - M D V I I P F S P D V P C D N N G Q R M

61 - |s0
21 - TGGTGGGCATTCTCGCCTCCTCTATGGTGACGTTTTTCGGGGTCTCTTCATCATTCTC - 120
21 - W W A F L A S S M V T F F G G L F I I L

121 - |CTT|TGGAGGACCCTTAAATACCTGTGGACCGTGTGCTGCCACTGCAACACCAAAAAGAAG - 180
41 - |L|W R T L K Y L W T V C C H C N T K K K

181 - GAGGCCAGAAAGGTGAATAACCCTGCTAACAGTCAGGCAGCAGATGGGACACCTAAGGGT - 240
61 - E A Q K V N N P A N S Q A A D G T P K G

241 - CCTGATGAGAAGGACGAAGTGGTACCTGCCAGCGAGGTGGGGTGGATGACCTCTGTGAAG - 300
81 - P D E K D E V V P A S E V G W M T S V K

301 - GACTGGGCCGGGGTCTATGATATCAGCACAGACACTCACCGGCAGAGTCCTGGTCTGCTC - 360
121 - D W A G V M I S A Q T L T |G R V L V V L|

361 - |GTCTTCGCTCTCAGCATTGGAGCACTTGGAAAT|TACTTTATAGACTCTTCTGATCCCATA - 420
141 - |V F A L S I G A L G I|Y F I D S S D P I

421 - GAATCCTGTCAGAATTTCTACAAAGATTTACCGTTACAGATCGCCATGTTCTTCAATGTC - 480
161 - E S C Q N F Y K D F T |L Q I A M F F N V|

481 - |TTCTTCCTCCTCTACTTTGGGCTGCGGTTTCATAGCAGCC|AATGATAAGCTGTGGTTCTGG - 540
181 - |F F L L Y F G L R F I A A|N D K L W F W

541 - |CTGGAG|GTCAACTCAGTGGTGGACTTCTTCACTGTTTCTCCCGTCTTCGTATCGGTCTAC - 600
201 - L E |V N S V V D F F T V P P V F V S V Y|

601 - |TTGAATAGG|AGCTGGCAG|GGCTTAAGATTCTGAGAGCCTTGAGATTGATACAGTTCTCA - 660
221 - |L N R|S W Q |G L R F L R A L R L I Q F S|

661 - |GAAATTTTACAGTTTTT|GAAATATCTTAAAAACAAGCAATTCATCAAGCTGGTGAACCTT - 720
241 - |E I L Q F L|N I L K T S N S I K |L V N L|

>|
721 - |TGTTCATCTTCATGGGCACATGGCTAACAGCTGCCGGATTTCATACATTTGGT|GAAAAC - 780
261 - |C S I F M G T W L T A A G F I H L V|E N

781 - TCAGGGGATCCTTGGGAAAACCTCCAAAATTCCCAGTCACTTTCCTATTGGGAATGTGTC - 840
281 - S G D P W E N F Q N S Q S |L S Y W E C V|

841 - |TACTTGCTCATGGTCACTATGTCAACAGTGGGCTACGGGGATGTCTATG|CAAAAACCACC - 900
301 - |Y L L M V T M S T V G Y G D V Y A|K T T

901 - CTGGGACGCCTGTTTCATGGTCTTCTTCATCCTTGGGGGTTTTGGCCATGTTTGCCAGCTAC - 960
321 - L G R |L F M V F F I L G G L A M F A S Y|

961 - GTCCCTGAAATCATAGAGTTAATAGGAAACCGCAAGAAATATGGTGGTTCCTATAGTGCG - 1020
322 - V P E I I E L I G N R K K Y G G S Y S A

1021 - GTTAATGGGAGAAAGCACATTGTGGTCTGTGGTTCATATAACGCTCGAAAGTGTCTCCAAC - 1080
341 - V N G R K H I V V C G H I T L E S V S N

1081 - TTCCTCAAAGACTTCTACACAAGGACAGGGATGATGTCAATGTAGAAATGTTTTTCTC - 1140
361 - F L K D F L H K D R D D V N V E I V F L

1141 - CATGATATTTCCCCTGATCTTGAGCTGGAAGCCTTGTTCAAACGCCACTTTACCCAAGTG - 1200
381 - H D I S P D L E L E A L F K R H F T Q V

1201 - GAGTTCACCAGGGATCTGTTCTCAACCTCAGCATCTGGCCCGAGTGAAGATTGAGTCA - 1260
401 - E F Y Q G S V L N P H D L A R V K I E S

```

1261 - GCAGACGCCTGTCTGATTCTGGCTAATAAATACTGTCCAGATCCCGATGCTGAAGATGCC - 1320
 421 - A D A C L I L A N K Y C P D P D A E D A

1321 - TCCAACATCATGAGGGTCATCTCTATCAAGAACTATTGCCCAAGATACGAATTATCACT - 1380
 441 - S N I M R V I S I K N Y C P K I R I I T

1381 - CAAATGTTACAATACCATAACAAGGCTCACCTGCTCAACATTCCCTAGCTGGAAGTGAAG - 1440
 461 - Q M L Q Y H N K A H L L N I P S W N W K

1441 - GAGGGGATGATGCGATCTGTCTAGCAGAGCTG^{s7}AAGGCTGGCTTCATAGCTCAGAGCTGT - 1500
 481 - E G D D A I C L A E L K A G F I A Q S C

1501 - CTAGCCCAGGGCCTCTCCACCATGCTTGCCAATCCCTTCTCCATGAGGTCTTTCATCGAG - 1560
 501 - L A Q G L S T M L A N P F S M R S F I E

1561 - ATTGAAGAGGATACGTGGCAGAAGTACTATTTAGAAGGGGTAGCTAATGAGATGTACACA - 1620
 521 - I E E D T W Q K Y Y L E G V A N E M Y T

1621 - GAGTGTCTGTCCAGT^{s8}GCCTTTGTGGGGCTCTCCTTCCCAGCAGTCTGTGAGCTGTGCTAC - 1680
 541 - E C L S S A F V G L S F P A V C E L C Y

1681 - GTGAAGCTGAAGCTGTTGCTTCTCGCCATCGAGAACAAGTCGGAGCTGGGAGAGAGCAGA - 1740
 561 - V K L K L L L L A I E N K S E L G E S R

1741 - AGCCGAAAGCGCATCCTCATCTACCCGGGAACACGTAAGATGCAGGAAGGAACTCTG - 1800
 581 - S R K R I L I Y P G N H V K M Q E G T L

1801 - GGGTTCCTTCATCGCCAGCGATGCCAAAGAAGTAAAGAGAGCATTTCCTACTGCAAAGCT - 1860
 601 - G F F I A S D A K E V K R A F F Y C K A

1861 - TGTCACGACGACATCACAGACCCCAACGGATCAAAAAGTGGGCTGCAAACGACTGATT - 1920
 621 - C H D D I T D P K R I K K C G C K R L I

1921 - TATTTTGAAGATGAGCACCCGTCAACTCTGTGCGCCAAAAAAAAGCAGCGGAACGGAGGC - 1980
 641 - Y F E D E H P S T L S P K K K Q R N G G

1981 - ATGCGTAACCCACCCAACAACCTCGCCAAAATGATGAGCAGGCATGACCCTCTACTAATC - 2040
 661 - M R N P P N N S P K M M S R H D P L L I

2041 - CCTGGGAACGAGCAGATGGGGAACATGGACATGAATGTGAAGCAGTACGACTCCACGGGA - 2100
 681 - P G N E Q M G N M D M N V K Q Y D S T G

2101 - ATGTTCCACTGGTGCCCATCTAAAGAGATTGAGAAGGTCATCCTGACCCGGAGTGAG^{s9}SCA - 2160
 701 - M F H W C P S K E I E K V I L T R S E A

2161 - TCCATGACGGTGTGAGCGGCCATGTAGTGGTCTGTATGTTTGGAGATGTCACGTCGCT - 2220
 721 - S M T V L S G H V V V C M F G D V T S A

2221 - CTAGTGGGGCTGCGAAACTTGGTGATGCCCTTGGAGAGCCAGCAACTTCCATTATCACGAG - 2280
 741 - L V G L R N L V M P L R A S N F H Y H E

2281 - CTGAAGCCCATAGTGTGTTGTGGGCTCGCTGGAGTACCTGAGGAGAGAGTGGGAACTCTA - 2340
 761 - L K P I V F V G S L E Y L R R E W E T L

2341 - CACAACCTCCCAAGGGCTCCATACTACCTGGTACGCCATTAAGTCGTGCAGATTTAAGG - 2400
 781 - H N F P K G S I L P G T P L S R A D L R

2401 - GCTGTCAACATCAACCTCTGCGACATGTGCGTGATACTGTGCGCAATCAGAACAATATC - 2460
 801 - A V N I N L C D M C V I L S A N Q N N I

2461 - GACGACGCCTCGCTGCAGGATAAGGAATGCATTCTGGCGTCGCTCAACATCAAGTCTATG - 2520
 821 - D D A S L Q D K E C I L A S L N I K S M

2521 - CAGTTTGCAGACAGCATCGGGCTCTTGCAGGCTAACTCCCAAGTTTCGCGCCTCCTGGA - 2580
 841 - Q F D D S I G L L Q A N S Q G F A P P G

2581 - GTGGACCGGTCTCTTCAGACAGCAGTCCAGTACATGGTTTGTAGTACGCCAGGCCTCCGTC - 2640
 861 - V D R S S S D S S P V H G L V R Q A S V

2641 - ACCACCGGCGCAACATCCCCATCATCACTGAAGTACTGAACTAGTGAACGACTCCAACGTTTCAGTTC - 2700
 881 - T T G A N I P I I T E L V N D S N V Q F

2701 - CTGGACCAAGATGATGATGATGACCCTGACACAGAGCTGTACCTGACACAGCCCTTCGCC - 2760
 901 - L D Q D D D D D P D T E L Y L T Q P F A

2761 - TCGGGAACCGCCTTCGCTGTGCTGAGCTGCTGGACTCTCTCATGGGTGCGACATACTTCAAC - 2820
 921 - C G T A F A V S V L D S L M G A T Y F N

2821 - GATAATATCCTCACCTGATCCGACGCTGGAGACTGGGGGAGCCACCCCGGAGCTAGAG - 2880
 941 - D N I L T L I R T L E T G G A T P E L E

2881 - GCTCTATTGGCCGAAGAGAACGCCCTGCGAGGGGGCTACAGCACGCCACAGACACGGGCC - 2940
 961 - A L L A E E N A L R G G Y S T P Q T R A

2941 - AACCGAGACAGGTGTCGTGTAGCCAGCTAGCCCTCTATGACGGGCCCTTTGCCGACTTG - 3000
 981 - N R D R C R V A Q L A L Y D G P F A D L

3001 - GGGGATGGCGGTTGCTATGGAGATTTGTTTTGTAAAGCGTTGAAGACGTACAACATGTTG - 3060
 1001 - G D G G C Y G D L F C K A L K T Y N M L

3061 - TGCTTCGGAATATACAGATTGAGAGACGCTCACCTCGCCACGCCTAGTCAGTGTACAAA - 3120
 1021 - C F G I Y R L R D A H L A T P S Q C T K

3121 - CGGTATGTGATCACCAACCCTCCGTATGAGTTTGTAGCTGGTCCCCACAGACCTGATCTTC - 3180
 1041 - R Y V I T N P P Y E F E L V P T D L I F

3181 - TGCCTGATGCAGTTTGACCACAACCGGGCCAGTCCCGGGCCAGCCTCTCCACAGCTCT - 3240
 1061 - C L M Q F D H N A G Q S R A S L S H S S

3241 - CACTCCTCCCATTCTCCAGCAAAAAGAGCTCGTCCGTCCACTCCATCCCCACCACCAAC - 3300
 1081 - H S S H S S S K K S S S V H S I P T T N

3301 - CGGCAGAACCGCAGCAGCAAGGCCCGGGAGGCCGCCACAACAGAATGCAACAAGGATG - 3360
 1101 - R Q N R S S K A R E A G H K Q N A T R M

3361 - AATGGAATGAGCCAAGAAAGGAAATGGTTTACAGATGAACCACAAAATGCCTACCCACGG - 3420
 1121 - N G M S Q E R K W F T D E P Q N A Y P R

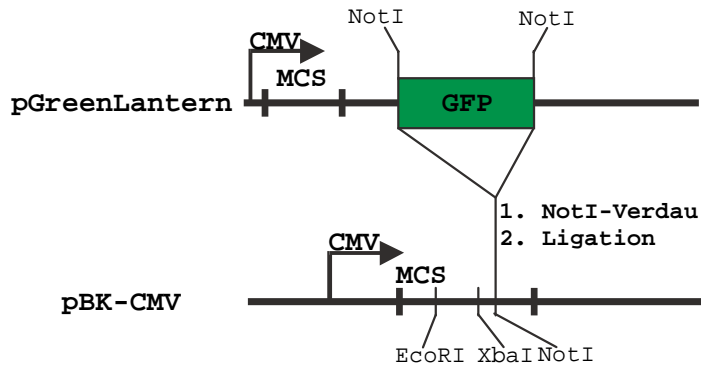
3421 - AACATTCAGATCAAGCCCATGAGCACTCACATGGCCAACCAAATCAACCAATACAAATCC - 3480
 1141 - N I Q I K P M S T H M A N Q I N Q Y K S

3481 - ACTAGCAGTCTGATTCCACCAATCAGAGAAGTTGAAGATGAATCTTGG - 3528
 1161 - T S S L I P P I R E V E D E S W

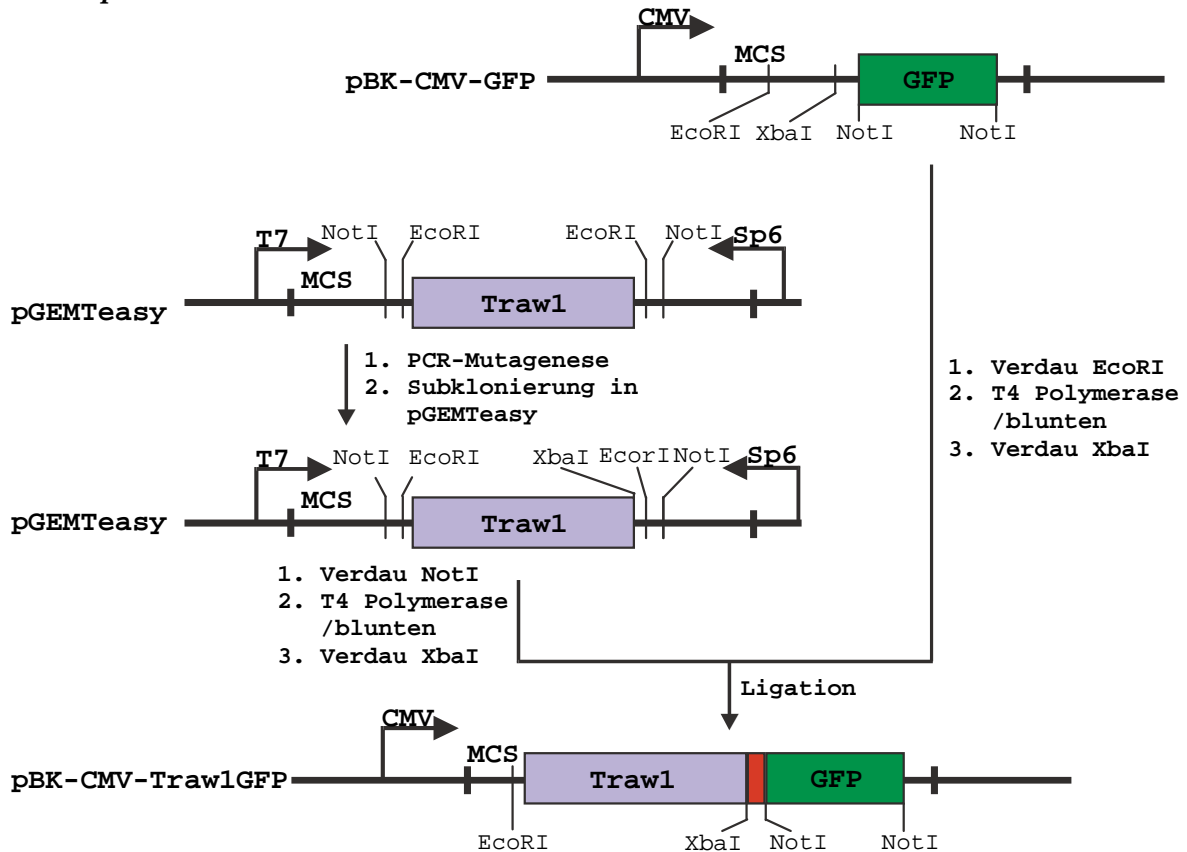
7.2 Klonierungen

7.2.1 Heterologe Expression in eukaryontischen Zellen

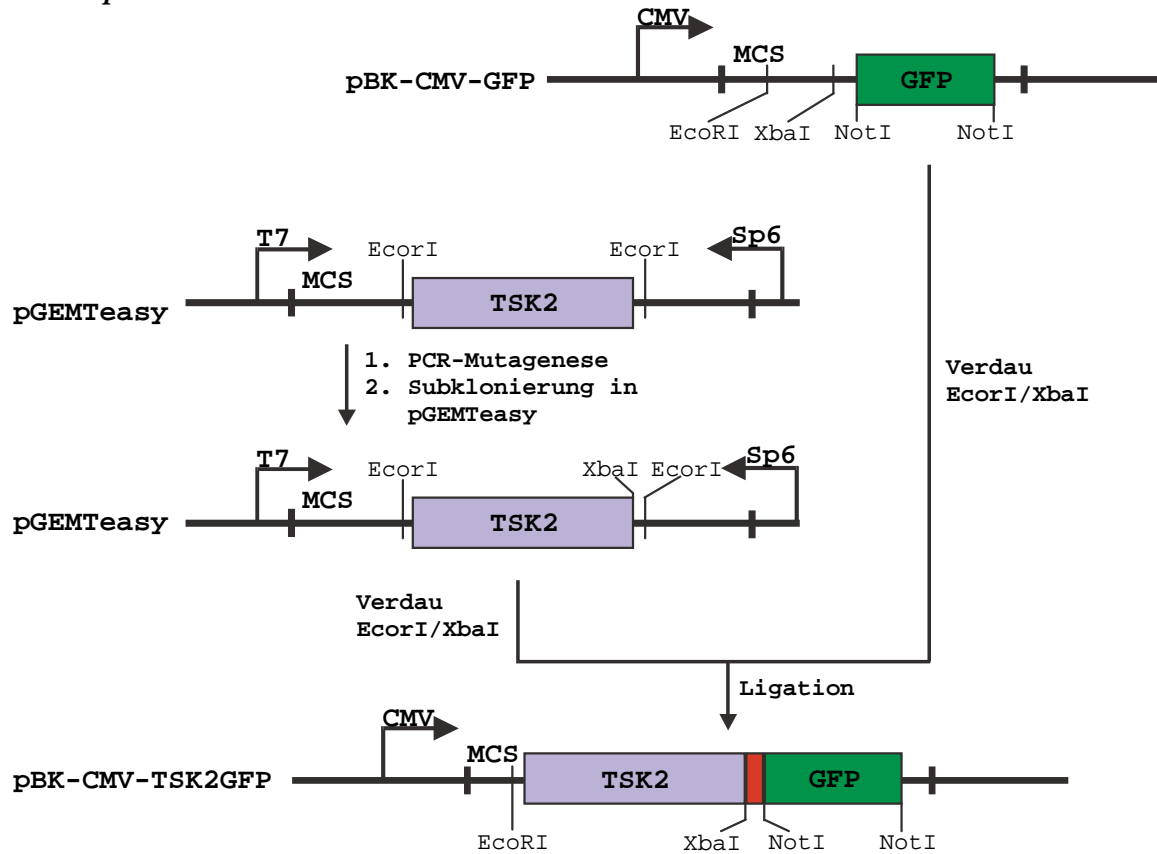
7.2.1.1 pBK-CMV-GFP



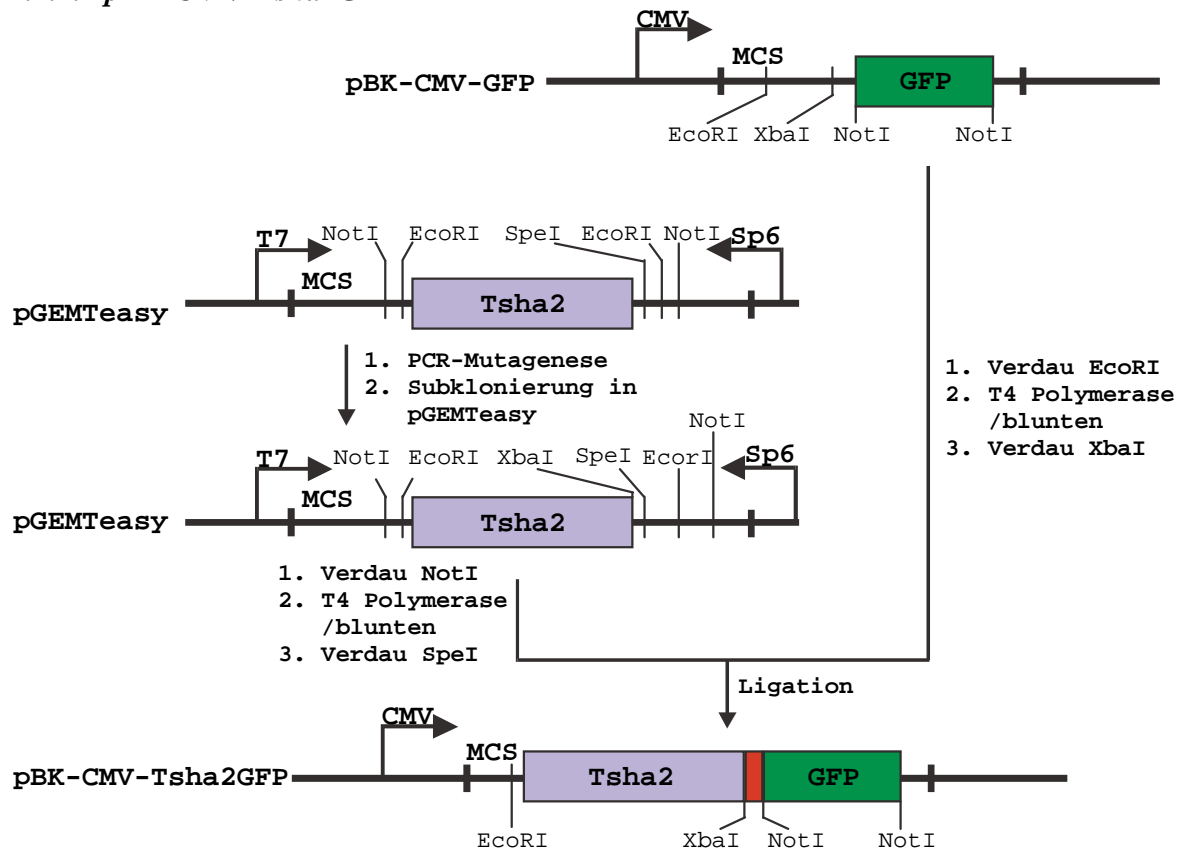
7.2.1.2 pBK-CMV-Traw1GFP

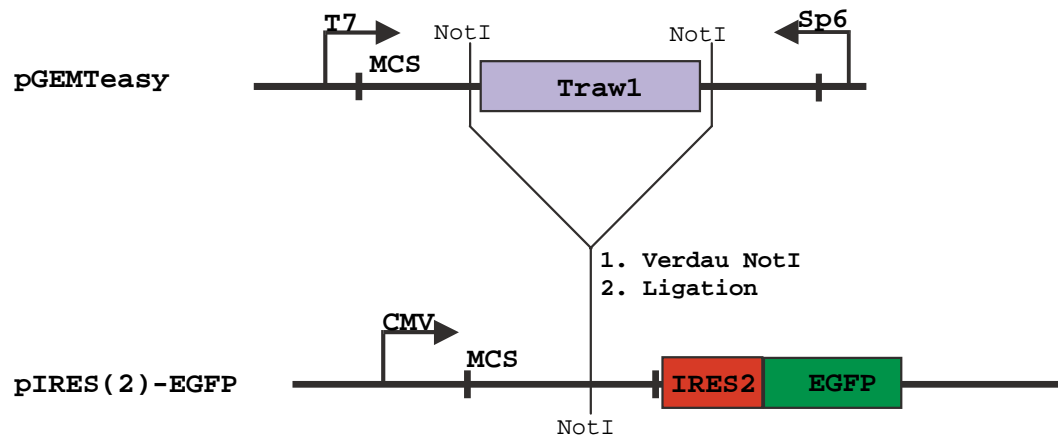
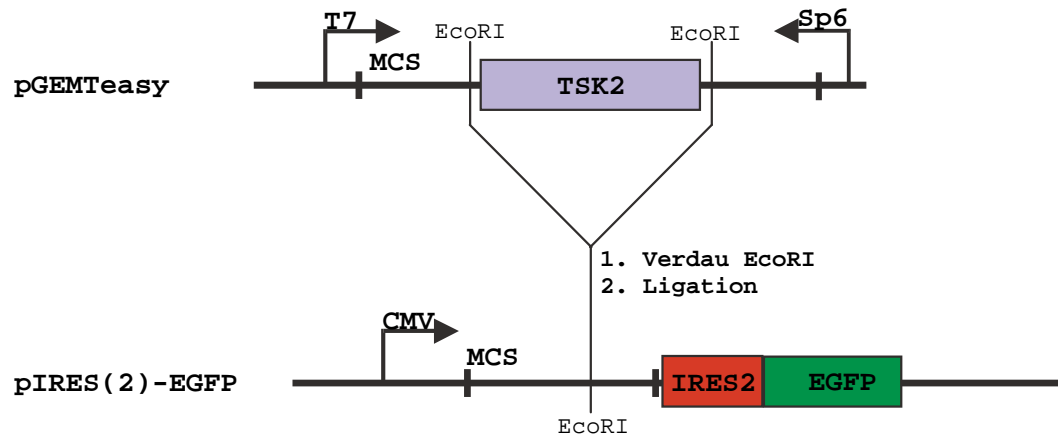
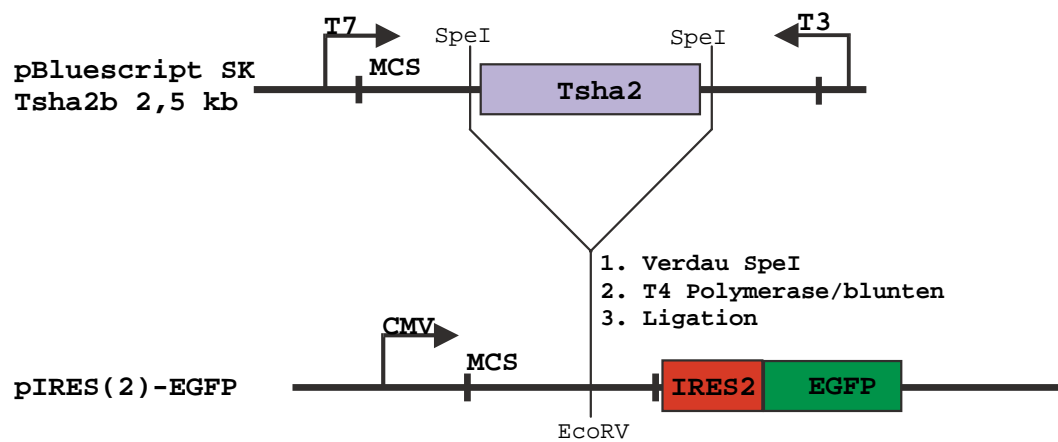


7.1.1.3 pBK-CMV-TSK2GFP

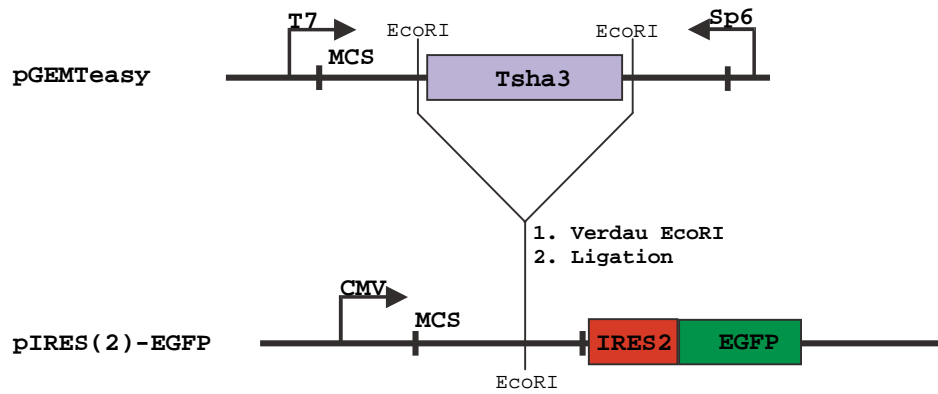


7.2.1.4 pBK-CMV-Tsha2GFP

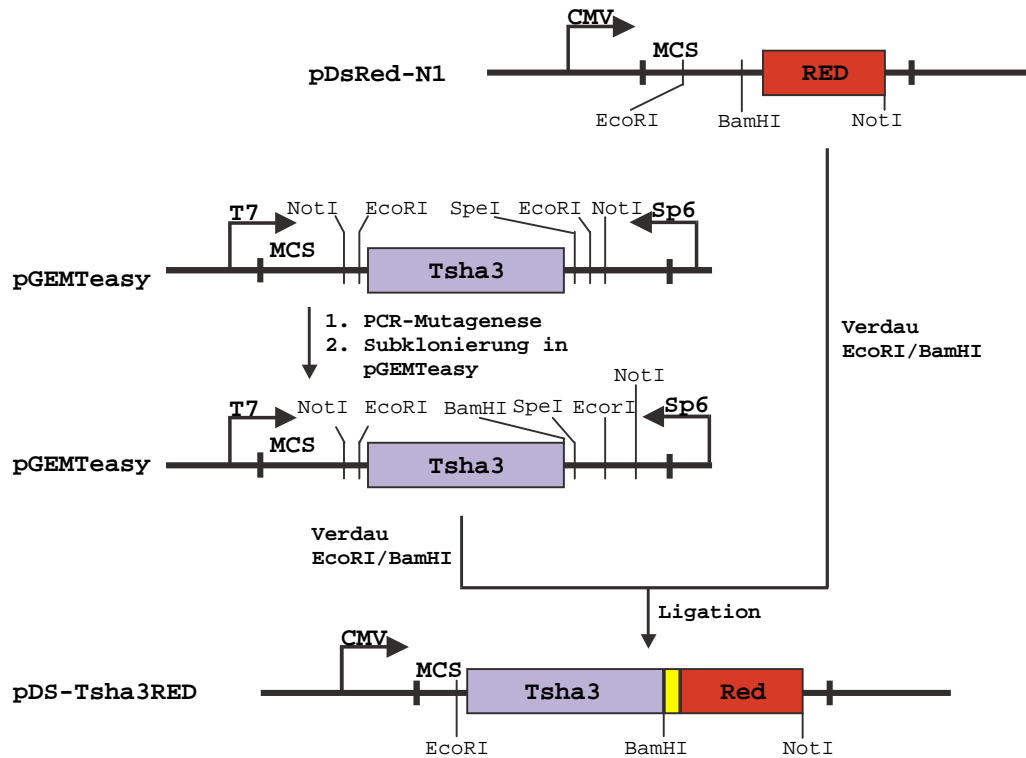


7.2.1.5 *pTraw1-IRES2-EGFP*7.2.1.6 *pTSK2-IRES2-EGFP*7.2.1.7 *pTsha2-IRES2-EGFP*

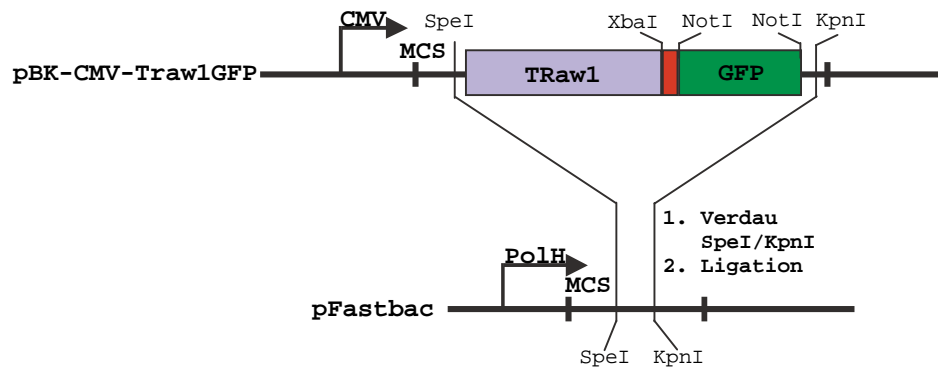
7.2.1.8 pTsha3-IRES2-EGFP

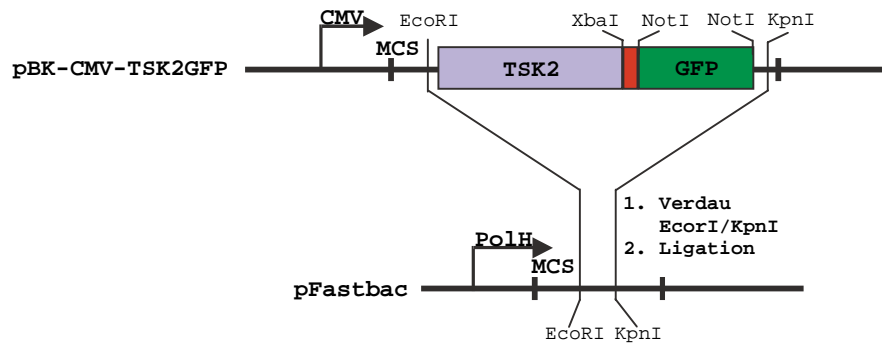
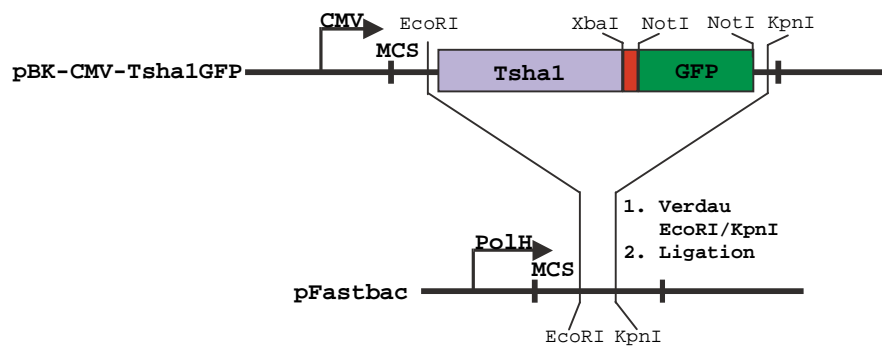
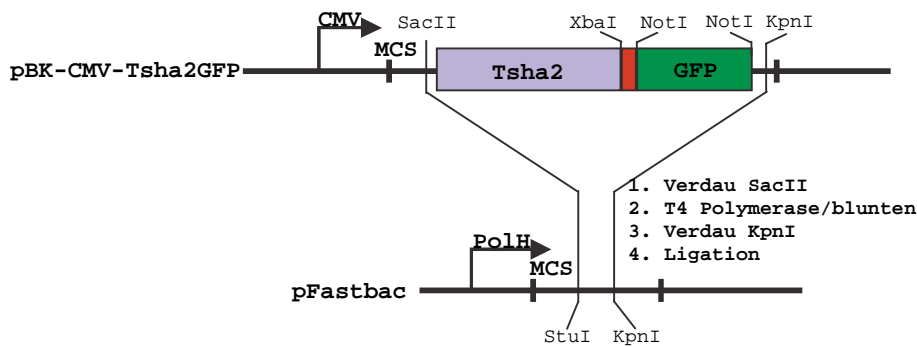
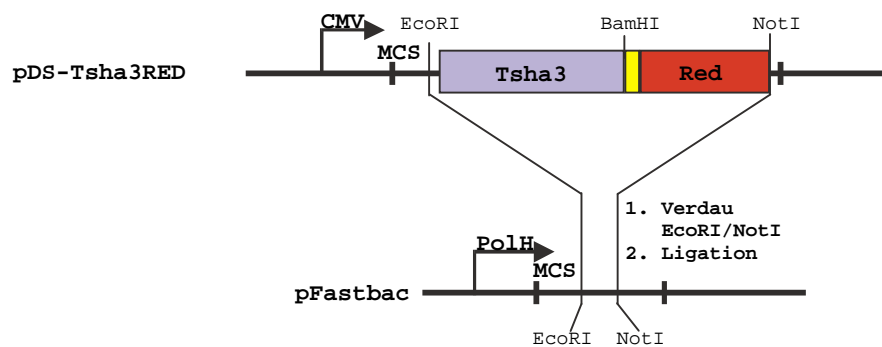


7.2.1.9 pDS-Tsha3RED

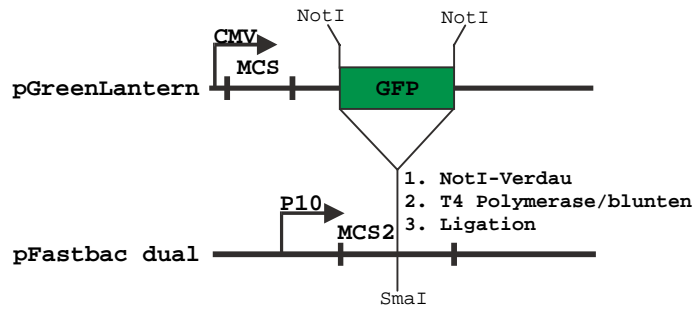


7.2.1.10 pFastbac-Traw1GFP

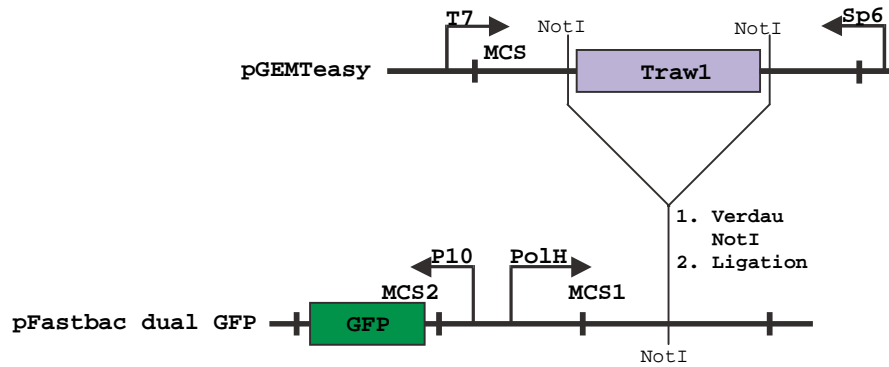


7.2.1.11 *pFastbac-TSK2GFP*7.2.1.12 *pFastbac-Tsha1GFP*7.2.1.13 *pFastbac-Tsha2GFP*7.2.1.14 *pFastbac-Tsha3RED*

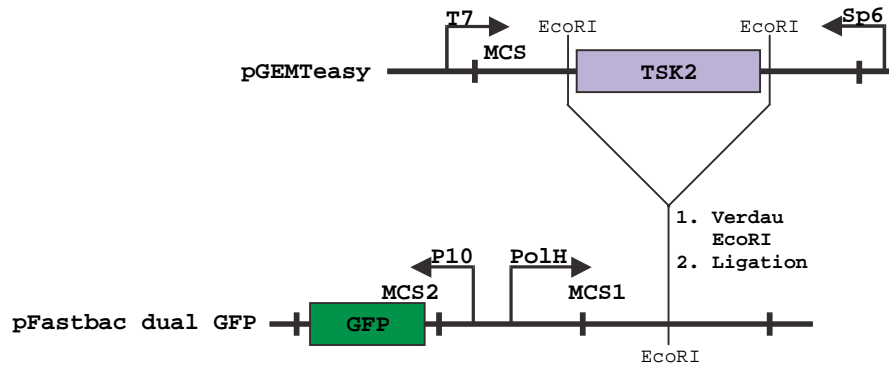
7.2.1.15 pFastbac-dual-GFP



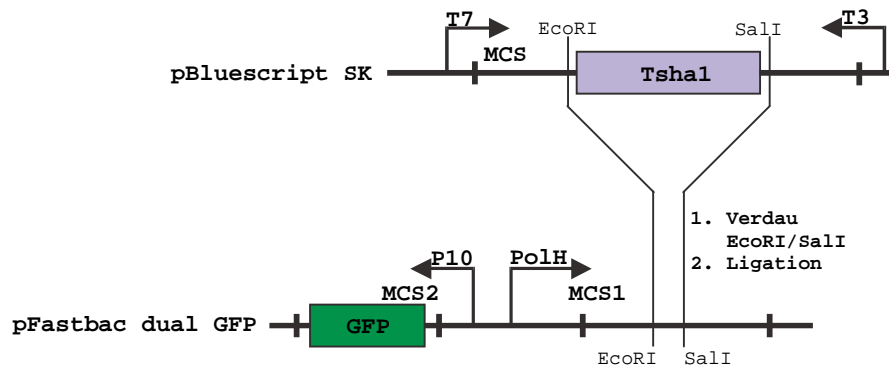
7.2.1.16 pFastbac-Traw1-dual-GFP



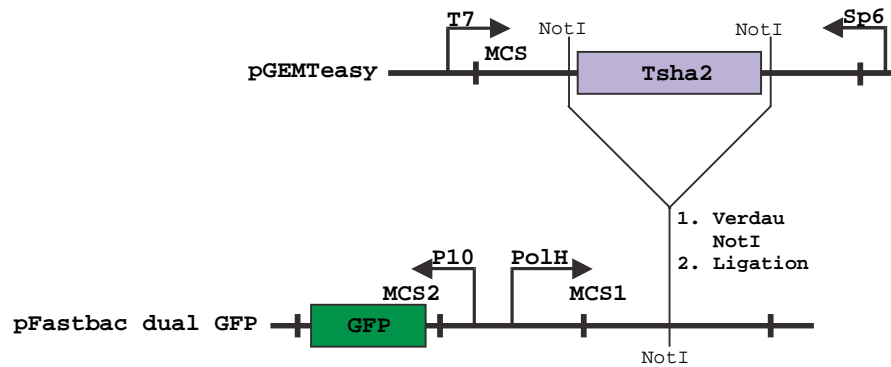
7.2.1.17 pFastbac-TSK2-dual-GFP



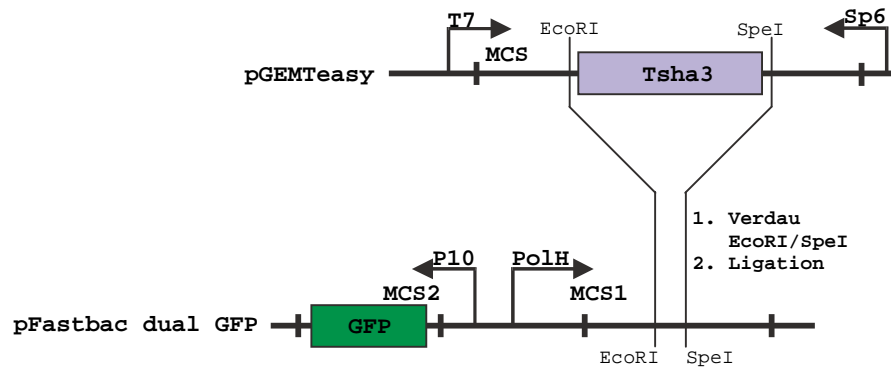
7.2.1.18 pFastbac-Tsha1-dual-GFP



7.2.1.19 pFastbac-Tsha2-dual-GFP



7.2.1.20 pFastbac-Tsha3-dual-GFP

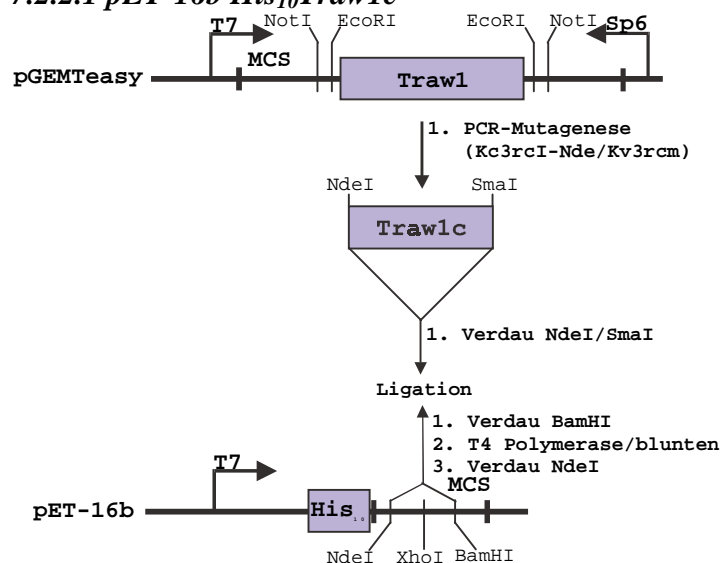


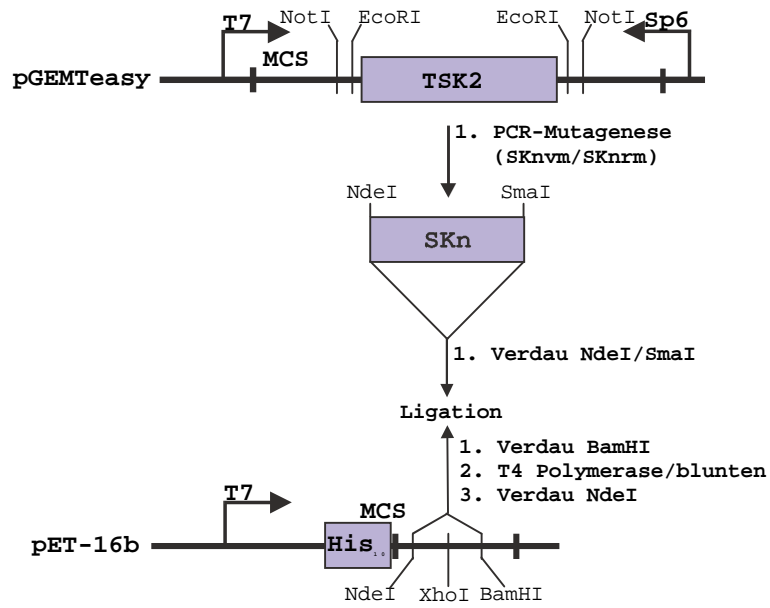
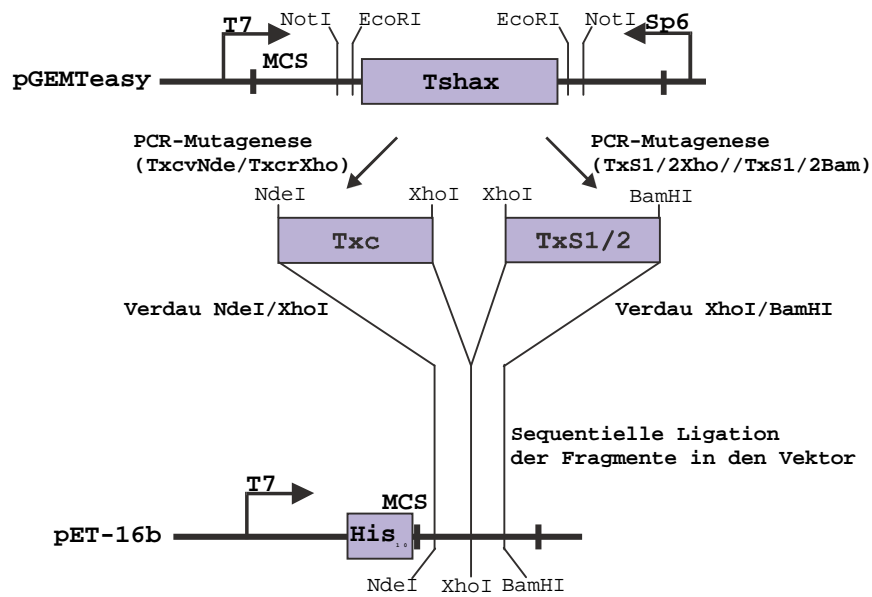
7.2.1.21 pFastbac

Alle Klonierungen in den pFastbac-Vektor wurden analog zu den Klonierungen in pFastbac-dual-GFP durchgeführt.

7.2.2 Heterologe Expression in *E. coli*

7.2.2.1 pET-16b His₁₀Traw1c

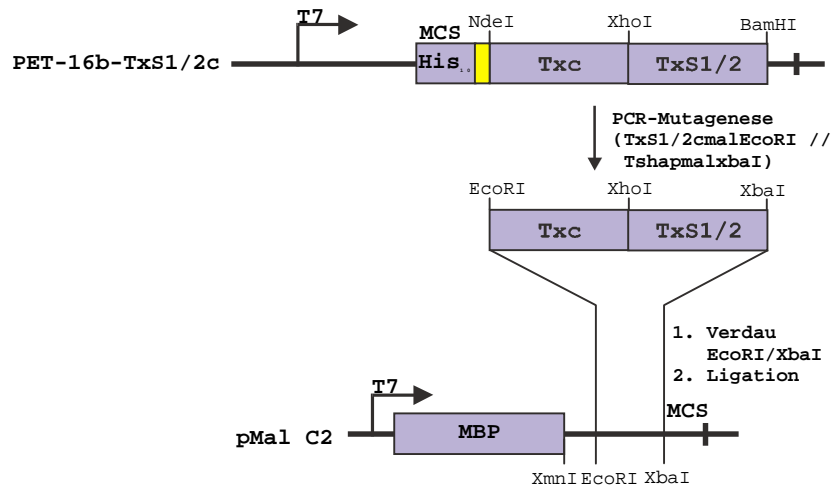


7.2.2.2 *pET-16b-His₁₀-TSK2n*7.2.2.3 *pET-16b-His₁₀-TshaxS1/2c*

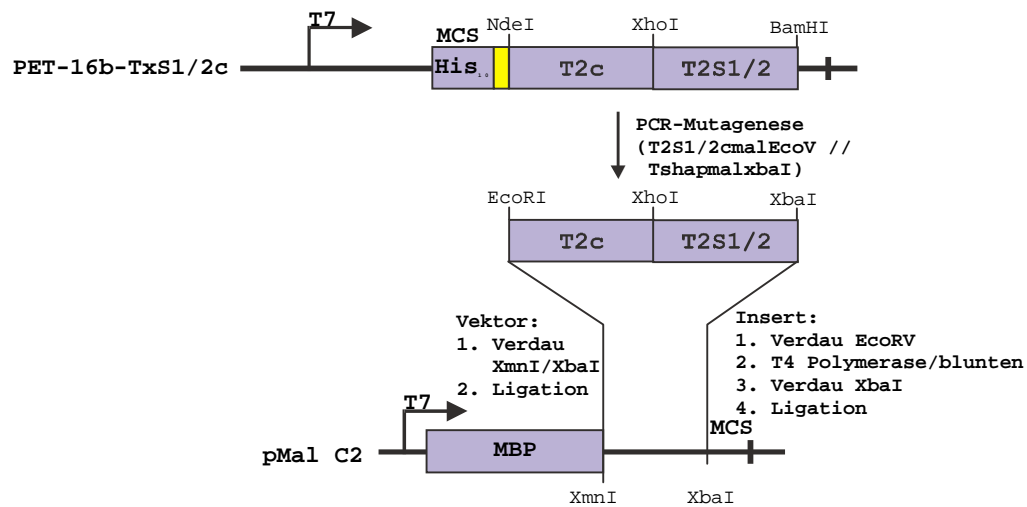
Alle drei Protein Tsha1S1/2c, Tsha2S1/2c, Tsha3S1/2c wurden gleich kloniert.

7.2.2.4 pMal-TshaxS1/2c

Die Proteine Tsha1S1/2c und Tsha3S1/2c wurden beide auf die gleiche Weise in den pMal-C2-Vektor kloniert.



7.2.2.4 pMal-Tsha2S1/2c



7.3 Abkürzungsverzeichnis

3'UTR	3' untranslatierte Region.
4-AP	4-Aminopyridin.
5'UTR	5' untranslatierte Region.
AcNPV	„ <i>Autographa californica</i> nuclear polyhedrosis virus“.
AMPS	Ammoniumperoxodisulfat.
AMV-RT	<i>Avian myoblastosis virus reverse transcriptase</i> .
AP	Aktionspotential.
AS	Aminosäure(n).
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat.
BK	<i>Big conductance Ca²⁺-activated potassium channel</i> .
bp	Basenpaar(e).
BSA	Rinderserumalbumin.
CamKII	<i>Calcium/Calmodulin dependent Kinase II</i> .
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure.
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat.
CK2	Casein Kinase 2.
CNG	<i>cyclic nucleotide gated cation channel</i> .
dH ₂ O	entionisiertes Wasser.
DIG	Digoxygenin.
DMF	N,N'-Dimethylformamid.
DMSO	Dimethylsulfoxid.
DNA	Desoxyribonukleinsäure.
dNTP	Desoxyribonukleosintriphosphat.
DSRED	Rot fluoreszierendes Protein.
DTX	α-Dendrotoxin
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
Eag	<i>ether-a-gogo</i> .
ECL	“Enhanced Chemiluminescence”.
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure.
EtOH	Ethanol.
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure.
GFP	Grün fluoreszierendes Protein.
H7	1-[5-Isochinolinsulfonyl]-2-methylpiperazin.
IK	<i>Intermediate conductance Ca²⁺-activated potassium channel</i> .
IPTG	Isopropylthiogalaktosid.
kDa	Kilodalton.
KQT	<i>KvLQT1 – like potassium channel</i> .
MBP	Maltosebindeprotein.
MetOH	Methanol.
MOPS	3-Morpholinpropansulfonsäure.
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure.
NBT	p-Nitroblautetrazolium.
OD	Optische Dichte.
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese.
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung.
PCR	Polymerasekettenreaktion.
PKA	Proteinkinase A.
PKC	Proteinkinase C.

RACE	<i>Rapid amplification of cDNA ends.</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute.
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR.
SDS	Natriumdodecylsulfat.
SK	<i>Small conductance Ca²⁺-activated potassium channel.</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung.
TEA	Tetraethylammoniumion.
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin.
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat.
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaureat.
UTR	Untranslatierte Region.
v/v	Volumen/Volumen.
w/v	Masse/Volumen.
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid.
ZNS	Zentrales Nervensystem.

7.4 Publikationen

Panofen, F., Rabe, H., Henne, J., Jeserich, G., (2000): Molecular cloning and functional characterization of Shaw-related potassium channels of trout CNS. *Brain Res. Mol. Brain Res.*; 83 (1-2): 9-19.

Poster:

Panofen, F. Rabe, H., Stegmann, J., Jeserich, G., (2000): Biophysical and Molecular Properties of a Shaw-like Potassium Channel Natively Expressed in Retinal Ganglion Cells of Trout. Keystone Symposium "Potassium Channels: Structure, Function and Therapeutic Utilities (D4)"; March 11 - March 16, 2000; Granlibakken Resort, Tahoe City, California.

Panofen, F., Jeserich, G., (2000): Molecular Structure and Expression of SK-Potassium Channels from Trout CNS. Benzon Symposium, NO. 47: "Molecular Pharmacology of ion channels"; August 13-17, 2000; Copenhagen, Denmark.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere, daß ich die vorliegende Dissertation, entsprechend § 3 Absatz 2 der Promotionsordnung des Fachbereichs Biologie/Chemie der Universität Osnabrück, selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben habe.

Ich versichere, daß ich weder an der Universität Osnabrück, noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Osnabrück, den 1. März 2001

(Frank Panofen)

Curriculum Vitae

Frank Panofen

geboren am 08.05.1969 in Münster/Westf.
verheiratet mit Elke Panofen, geb. Pichler.
Kinder: Jonas, geb. 07.02.1995
Marian, geb. 21.10.1997
Yvonne, geb. 29.08.1999

Schulbildung

- 08/1975 - 06/1979 Grundschule Steinhagen.
08/1979 - 06/1988 Kreisgymnasium Halle, Abschluß mit Abitur.

Zivildienst

- 10/1988 - 05/1990 Zivildienst im St. Franziskus-Hospital, Bielefeld.

Hochschulbildung

- 10/1990 - 12/1996 Studium Diplom Chemie an der Universität Bielfeld. Diplomarbeit mit dem Thema "Modulation der B-Zellaktivierung durch CD22" in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Frey.
18.12.1996 Erfolgreicher Abschluß des Studiums mit der Verleihung des akademischen Grades des Diplom-Chemikers.
01/1997 - 06/1997 Beginn einer Promotion in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. J. Frey.
07/1997 - 04/2001 Doktorand in der Arbeitsgruppe Tierphysiologie an der Universität Osnabrück. Anfertigung der Dissertation mit dem Thema "Molekulare Charakterisierung und Expressionsanalyse spannungsabhängiger und kalziumsensitiver Kaliumkanäle aus dem ZNS der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)" unter der Leitung von Prof. Dr. G. Jeserich.
-