

2 MATERIAL und METHODEN

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Zellkultur

HEK293-Zellen, die stabil die $\alpha 1C$ -b-Untereinheit des glattmuskulären L-Typ- Ca^{2+} -Kanals exprimierten (Biel 1990), wurden freundlicherweise von Prof. F. Hofmann und Dr. N. Klugbauer, Technische Universität München, zur Verfügung gestellt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Dulbecco's Modifiziertem Eagle Medium (Gibco BRL, Eggenstein), das mit fetalem Kälberserum (Endkonzentration 10%), 50 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin sowie 50 U/ml Penicillin ergänzt wurde. Für die Aufrechterhaltung der Expression der $\alpha 1C$ -b-Untereinheit des glattmuskulären L-Typ- Ca^{2+} -Kanals wurde zusätzlich G-418 (Neomycin) zu einer Endkonzentration von 600 $\mu\text{g/ml}$ in das Medium gegeben. HEK293-Zellen sind semi-adhärenente humane embryonale Nierenzellen (Graham 1977). Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C im CO_2 -Inkubator (5%). Passagiert wurden sie alle 3 Tage mit 2,0 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco BRL, Eggenstein). Die Reaktion wurde mit Zellkulturmedium gestoppt, die Zellsuspension sedimentiert (5 Minuten, 900 rpm) und ein Fünftel der Zellen nach wiederholtem Waschen mit Medium neu in Petrischalen eingesät.

2.1.2 Transiente Transfektion der HEK293-Zellen mit der $\beta 2a$ -Untereinheit

Für die Transfektion der Zellen wurde der SuperFect Transfections Reagent Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Das Prinzip der Methode beruht auf der Komplexierung von DNA mit den polykationischen SuperFect-Partikeln. Die für die Transfektion verwendete DNA wurde mit dem QiaFilter-Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) präpariert. Es wurden Kotransfektionen mit dem Ziel einer transienten Expression der rekombinanten Proteine $\beta 2a$ (akzessorische Untereinheit des kardialen L-Typ- Ca^{2+} -Kanals) und CD8 (Kontollgen) durchgeführt. Die verwendeten HEK293-Zellen exprimierten stabil die $\alpha 1C$ -b Untereinheit des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals (Biel 1990). Transfiziert wurden die auf Glasplättchen in einer etwa 3 cm^2 großen

Petrischale (Nunc) kultivierten Zellen, wenn diese eine Konfluenz von 60-80% erreicht hatten. Die Transfektion erfolgte in serumfreiem und antibiotikafreiem Medium (DMEM) mit je 2 µg Plasmid-DNA und 10 µl SuperFect-Reagenz (3 Stunden). Das Medium wurde danach gegen antibiotika- und serumhaltiges Medium ausgetauscht. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion für die Patch-Clamp-Untersuchungen benutzt.

2.2 Elektrophysiologische Methoden

2.2.1 Grundlagen der Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik (Hamill 1981, Neher & Sakmann 1992) ermöglicht es, Membranströme der gesamten Zellmembran wie auch den Strom einzelner Ionenkanäle zu messen. Dazu wird eine Mikropipette, die mit einer Elektrolytlösung gefüllt ist und in eine Elektrode eintaucht, direkt an die Zellmembran angepreßt. Im Bereich des Kontaktes schiebt sich beim Anlegen eines Unterdrucks ein Membranbereich (Patch) in die Pipettenmündung. Es entsteht eine sehr dichte Verbindung mit einem hohen Widerstand von Gigaohm-Stärke (10 bis 100 GΩ, Gigaseal). Durch die Bildung dieses Gigaseals wird der Membranbereich (Patch) unter der Pipettenspitze elektrisch von seiner Umgebung isoliert. In das Zellbad taucht eine zweite Elektrode ein, die sogenannte Badelektrode. Mit diesen beiden Elektroden können Ströme über das Membranstück gemessen werden. Durch Veränderungen des Membranpotentials lassen sich die Eigenschaften der isolierten Ionenkanäle untersuchen.

Die Ableitung von Einzelkanalströmen kann sowohl an der intakten Zelle im Cell-Attached-Modus als auch am isolierten Membranstück in der Inside-Out-Konfiguration (Abb. 5) erfolgen. Das Prinzip beider Meßanordnungen zeigt Abbildung 5.

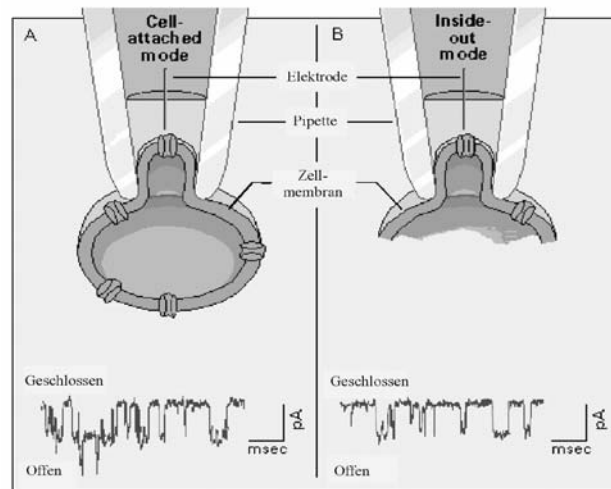


Abb. 5: Prinzip von Cell-Attached- und Inside-Out-Konfiguration (nach Ackermann & Clapham 1997).

Durch Anlegen eines Unterdrucks über die Patchpipette an die Zelle wird ein Gigaseal erzeugt. Damit befindet sich das Präparat in der Cell-Attached-Konfiguration (Abb. 5A). Es können die unter der Patchpipette befindlichen Kanäle analysiert werden. Durch Wegziehen der Pipette aus der Cell-Attached-Konfiguration heraus wird der Membranbereich (Patch) unter der Pipette von der restlichen Zelle abgetrennt (Abb. 5B). Der Vorteil dieser Anordnung besteht darin, daß man Zugang zu den intrazellulär lokalisierten Kanaldomänen erhält. Dadurch ist es möglich, Substanzen auf die zytosolische Seite der Zellmembran zu applizieren und deren Wirkung auf die Kanalmodulation zu untersuchen.

In der Cell-Attached- und Inside-Out-Konfiguration mißt man den Strom durch einige wenige Kanäle innerhalb des $1\text{-}5\ \mu\text{m}^2$ großen Patches. Durch Applikation verschiedener Spannungen über die Patchpipette können die Kanäle aktiviert werden. Der resultierende Strom setzt sich aus 3 Komponenten zusammen (Numberger und Draguhn 1996).

- a) Den L-Typ- Ca^{2+} -Strömen der einzelnen Kanäle.
- b) Dem kapazitiven Strom: Die Glaspipette bildet einen zylinderförmigen Kondensator. Weiterhin liefert der Membranpartikel einen kleinen Betrag zum kapazitiven Strom.
- c) Dem Leckstrom durch den Gigaseal: Leckströme sind Ströme, die von der Pipette direkt in das Bad und nicht über das kleine Membranstück abfließen. Diese Stromkomponente kann in der gleichen Größenordnung wie der Einzelkanalstrom liegen.

Das Potential im Zellinneren ist in der Cell-Attached-Konfiguration unbekannt. Deshalb wird eine isotonische Badlösung verwendet, um alle Zellen auf ein vergleichbares Zellpotential zu setzen (Depolarisation auf 0 mV).

2.2.2 Aufbau des Patch-Clamp-Meßplatzes

Die Pipettenelektrode war mit einem Patch-Clamp-Verstärker (LIST EPC 7, List-Darmstadt, Germany) verbunden. In Kombination mit einem programmierbaren Interface (TL-125 Axon Instruments, Foster City, CA, USA) konnten der Zelle definierte Potentiale aufgeprägt werden. Die aktivierten Membranströme wurden verstärkt, digitalisiert (4-5kHz), gefiltert (1kHz) und auf der Festplatte des Computers gesichert. Der Aufbau meines Patch-Clamp-Meßplatzes ist in Abbildung 6 dargestellt.

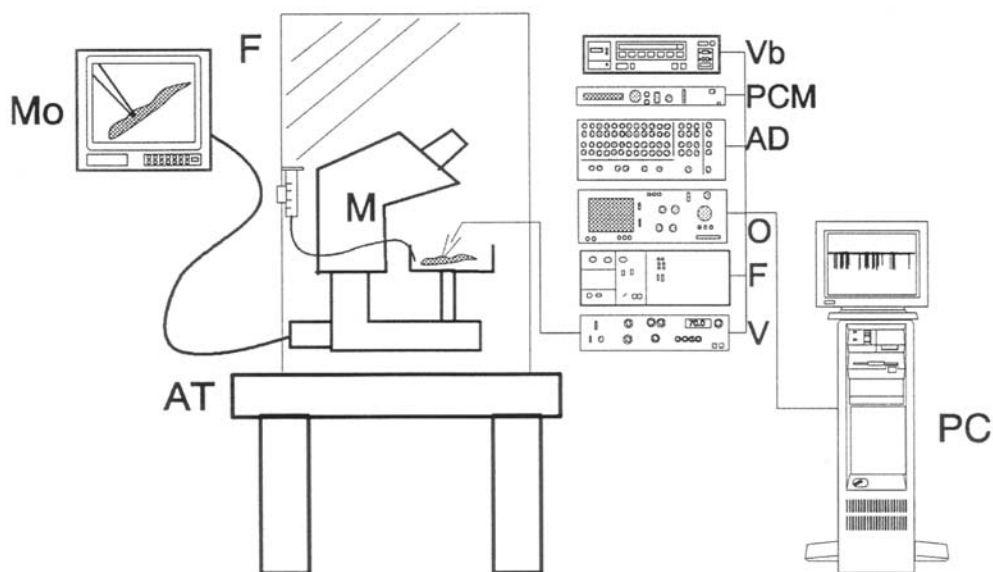


Abb. 6: Aufbau des Patch-Clamp-Meßplatzes nach K. Schuhmann (1995). Die gesamte Meßapparatur befand sich auf einem schwingungsgedämpften Tisch (AT), da geringste Erschütterungen die Patch-Clamp-Messungen stören. Der Meßstand wurde mit einem Faraday'schen Käfig (F) von elektromagnetischen Störeinflüssen abgeschirmt. Auf dem Kreuztisch des Inversmikroskops (M) befand sich die Meßkammer mit den HEK-Zellen. Der Zustand der Zellen wurde mittels Videokamera auf dem Monitor (Mo) kontrolliert. Die

Verstärkung der Ströme erfolgte mit einem Patch-Clamp-Verstärker (V). Die Daten wurden analog gefiltert (F) und über ein Interface (AD-Wandler, AD) in den Computer (PC) eingespeist. Am Oszilloskop (O) konnte während der Experimente der Verlauf der Ionenströme mitverfolgt werden.

Patchpipetten

Ausgangsmaterial für die Patchpipetten waren Borosilikat-Glaskapillaren (GC150F-7.5; Clark Elektromedical Instruments, Pangbourne, UK) mit Innenfilament. Die Reinigung der Glaskapillaren erfolgte durch eine zwölfstündige Ethanolbehandlung und anschließendem wiederholten Waschen mit bidestilliertem Wasser. Im Trockenschrank bei 160°C unter weitgehend staubfreien Bedingungen wurden die Glaskapillaren getrocknet. Das Ziehen der Mikropipetten erfolgte mit einem horizontalen Pipettenziehgerät (Modell P-2000, Sutter Instruments, Novato, USA). Je nach Temperatur und Zugkraft wurden Pipettendurchmesser zwischen 0,2 und 2 µm erzeugt. Danach wurden die Patchpipetten feuerpoliert.

2.2.3 Ableitung von Einzelkanalströmen in der Cell-Attached- und Inside-Out-Konfiguration

Die Cell-Attached-Konfiguration

Für die elektrophysiologischen Ableitungen wurden die auf Glasplättchen (4x5mm) kultivierten HEK293-Zellen in die auf dem Mikroskop-Kreuztisch eingebrachte Meßkammer transferiert. Als Meßkammer diente eine modifizierte Petrischale mit einem Volumen von 200 µl. Während der Perfusion der Zellen mit Badlösung wurde die Patchpipette vorbereitet, d.h. mit Elektrolytlösung gefüllt und auf die Meßelektrode am Vorverstärker gesteckt. Die Referenzelektrode befand sich in der Meßkammer, um den Erdleiter mit der Badlösung zu verbinden. Als Elektroden wurden Silber/Silberchloridelektroden verwendet. Mit Hilfe des Verstärkers konnte ein bestimmtes Potential zwischen den Elektroden eingestellt und der fließende Strom detektiert werden. Abhängig vom jeweiligen Spitzendurchmesser der Pipette lag deren elektrischer Widerstand im Bereich von 5 bis 10 MΩ. Die Annäherung der Patchpipette an die Zelle erfolgte mit einem hydraulischen Manipulator (Narishige WR-89; Narishige Co., Ltd. Tokyo 157, Japan). Sobald die Pipettenspitze die Zelloberfläche berührte,

stieg der elektrische Widerstand auf das 2-3 fache an. Durch Anlegen eines Unterdrucks in der Pipette wurde der Kontakt zwischen Zelle und Pipette bis in den Gigaohmbereich verdichtet. Die Ausbildung des Gigaseals und damit der Cell-Attached-Konfiguration konnte über eine veränderte Stromantwort auf einen Testpuls verfolgt und durch Anlegen einer Spannung von -70 mV unterstützt werden. Die Korrektur der schnellen Kapazitätskomponente erfolgte im Anschluß. Für die Ca^{2+} -Kanal-Aktivierung wurden die Kanäle aus dem künstlich fixierten Ruhepotential von -70 mV auf 0 mV (Pulsdauer 500ms) alle 5 Sekunden depolarisiert. Die Ansteuerung des Verstärkers und die Aufnahme der Stromantwort erfolgte mit dem Programm „pClamp 5.5.“ (Axon Instruments, Foster City, Ca, USA).

Die Inside-Out-Konfiguration

Ausgehend von der Cell-Attached-Anordnung konnte man einen Inside-Out-Patch durch schnelles Wegziehen der Patchpipette von der Zelle erhalten. Infolgedessen wurde der Membranbereich in der Pipette aus der Zelle „herausgerissen“. Im Inside-Out-Patch verschwindet die Ca^{2+} -Kanalaktivität innerhalb weniger Minuten, wenn der von der Zelle abgelöste Membranbereich einer künstlichen Salzlösung ausgesetzt wird. Deshalb wurden die Experimente in Anwesenheit von Calpastatin und ATP durchgeführt (Romanin 1991). Dadurch war es möglich, L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle funktionell zu stabilisieren. Das AID-Peptid (10 μM) wurde unmittelbar vor dessen Applikation über die Badperfusion in die Calpastatin-haltige Badlösung aufgenommen. Die Aktivierung der Ca^{2+} -Kanäle in der Inside-Out-Konfiguration erfolgte wie in der Cell-Attached-Konfiguration durch Depolarisationssprünge von -70 mV auf 0 mV.

Auswertung

Die Stromaufnahmen und ein Teil der Auswertung erfolgten mit dem Programm pClamp 5.5 (Axon Instruments, Foster City, Ca, USA). Vor der Datenanalyse wurde der initial auftretende kapazitive Strom und der Leckstrom jeder Kanalspur durch Subtraktion mehrerer ereignisloser Stromspuren abgeglichen. Die nötige Software (Filecut, Subtract) wurde von Herrn A. Russ am Institut für Biophysik der Universität Graz erstellt. Weitere Analysen erfolgten mit einer speziell konfigurierten Software (Matlab), die von V. Pastushenko und W. Baumgartner am Institut für Biophysik (Universität Linz) entwickelt worden war. Die

Kanalaktivitäten wurden als mittlere Zahl der während der Depolarisationen geöffneten Kanäle errechnet. Die relative Verfügbarkeit der Kanäle wurde durch das Verhältnis der ereignislosen Depolarisationen zu den gesamten Depolarisationen bestimmt. Eine Depolarisation galt als ereignislos, wenn die Offenamplitude weniger als 50% der Stromamplitude des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals ausmachte. Von den Experimenten, bei denen sich nur ein Kanal im Membranfleck befand, wurden die Offenzeiten ermittelt (pClamp: fetchan, pstat). Die Darstellung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism.

Lösungen

Für die Einzelkanalmessungen in der Cell-Attached- sowie in der Inside-Out-Konfiguration wurden folgende Lösungen verwendet:

Pipettenlösung:

10 mM BaCl_2
 100 mM NaCl
 30 mM TEACl_2
 15 mM Hepes, pH = 7,4

Badlösung:

110 mM K-Aspartat
 20 mM KCl
 2 mM MgCl_2
 20 mM Hepes
 2 mM EGTA, pH = 7,3

Der Pipettenlösung wurde S(-)-Bay K 8644 (1 μM) zugesetzt, um die niedrige Kanalaktivität anzuheben. Alle Lösungen wurden vor ihrem Gebrauch mit einer Kalziumelektrode (Orion, 710A, pH/ISE Meter) und einem Osmometer (Wescor 5500, Dampfdruck-Osmometer) auf ihren Ca^{2+} -Gehalt und ihre Osmolarität überprüft. In den Inside-Out Versuchen enthielt die Badlösung 2 mM Na_2ATP und 1Unit/Calpastatin.

Calpastatinlösung

Calpastatin wurde in der Badlösung dialysiert. Die Dialyse erfolgte in Dialyseschläuchen (Serva, Visking dialysis tubing No. 44110) mit einer Cut-Off-Rate zwischen 12.000 und 14.000. Vor Gebrauch wurden die Dialyseschläuche in 2% iger NaHCO_3 + 1mM EDTA-Lösung für 10 Minuten gekocht und 16 Stunden in bidestilliertem Wasser gelagert. Danach mußten die Dialyseschläuche erneut 10 Minuten in einer 1 mM EDTA-Lösung gekocht werden. Vor Gebrauch wurden sie 3 mal gründlich mit bidestilliertem Wasser gespült. Die Dialyse des gelösten Calpastatins (1 Unit/ml) erfolgte in 2 Schritten (4 Stunden in 400 ml Volumen, 48 Stunden in 1200 ml Volumen) bei 4°C unter leichtem Rühren.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Präparation von Ca²⁺-Kanälen

Gefrorenes adultes Rattenherzgewebe (0,5g) wurde in flüssigem Stickstoff zerrieben, mit 5 ml Puffer A (5 mM Histidin/HCl, pH 7,4, 120 mM KCl, 50 mM Na₄P₂O₇, 25 mM NaF, 10 mM EDTA, 0,2 mM Dithiothreitol, 0,1 mM PMSF, 1 µM Pepstatin A, 17 µg/ml Calpain I und 7 µg Calpain II) versetzt und mit dem *Polytron* (Kinematica AG) homogenisiert. Zur Solubilisierung der Membran wurde CHAPS-Puffer im Verhältnis 5:1 zugegeben (1 % CHAPS, 50 mM Tris, 1 mM NaCl, 1 µM PMSF, 1 µM Benzamidin, 1 µM Pepstatin, 0,25 mM Jodacetamid, 17 µg/ml Calpain I, 7 µg/ml Calpain II). Der Ansatz wurde 45 Minuten auf Eis mit dem Magnetrührer gerührt und 35 Minuten bei 35000 rpm (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die solubilisierten Proteine nach Lowry (1951) bestimmt. WGA-gereinigte Skelettmuskel-Ca²⁺-Kanäle wurden freundlicherweise von Frau Dr. Haase, MDC-Berlin, zur Verfügung gestellt und präpariert, wie in Haase und Mitarbeiter (1991) beschrieben.

2.3.2 Herstellung der AID-Beads

Das AID-Peptid (Sequenz der α1C-b-Untereinheit, AS 477-494 QQLEEDLKG YLDWIT-QAE) wurde mit einem N-terminalen Monochloracetyl-glycyl-Rest synthetisiert (Biosynthan, Berlin-Buch), um es an aktivierte ω-Amino-hexylagarose-Beads binden zu können. Deren Vorbehandlung erfolgte mit 2-Iminothiolan (10 facher molarer Überschuß) für 20 Minuten. Anschließend wurden die Beads mit PBS (pH 7,5) gewaschen. Für die Bindung des Peptids (6 mg/ml) an die aktivierten Agarosebeads wurden beide Partner drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (Rotationsrad), gefolgt von einer einstündigen Behandlung mit 5 ml 40 mM Jodacetamid. Die Reinigung dieser AID-Beads erfolgte durch mehrmaliges Waschen mit PBS (pH 7,5). Danach wurden die AID-Beads mit 1 % Rinderserumalbumin und gegebenenfalls für die Aufbewahrung bei 4°C mit 0,02 % Na-Azid versetzt.

2.3.3 Bindung der β -Untereinheit an die AID-Beads

Solubilisiertes Rattenherzhomogenat (0,5mg) wurde mit 10 μ l der AID-Beads in Puffer A (2.3.1) mit 0,1 % Digitonin für 2 Stunden bei 4°C inkubiert (Rotationsrad). Das Waschen der Beads erfolgte mit dem selben Puffer. Die gebundenen Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer eluiert und auf einem 7 %igen Polyacrylamidgel separiert.

2.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Transfer

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE; Lämmli, 1970). Das Trenngel bestand aus 7-10 % Acrylamid, 50 % Trenngelpuffer (0,375 M Tris, pH 8,8 und 0,1 % SDS), 0,7 % Temed und 1,4 % Ammoniumpersulfat. Das Sammelgel enthielt 4 % Acrylamid, 50 % Sammelgelpuffer (0,125 M Tris, pH 6,8 und 0,1% SDS), 1% Temed und 2% Ammoniumpersulfat. Es wurden Proben mit 5-20 μ g Proteingehalt aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einem Puffer, bestehend aus 0,025 M Tris, 0,192 M Glycin und 0,1 % SDS bei 120 mV. Die Proteine wurden entweder mit Coomassie-Blue direkt im Gel angefärbt (10 Minuten) oder auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond C, Amersham) transferiert. Dazu wurde eine Naßblotapparatur (BioRad) verwendet. Das Blotting der Proteine auf die Membran erfolgte 2 Stunden bei 210 mA. Der verwendete Puffer bestand aus 0,04 M Tris, 0,306 M Glycerin, 0,1 % SDS und 20 % Methanol. Die Proteine wurden anschließend in einer Ponceau-S-Lösung angefärbt.

Verwendete Molekulargewichtsmarker:

Prestained SDS	Bio Rad, München
LWM	Amersham, Freiburg

2.3.5 Immunofärbung der Proteine nach dem Western-Transfer

Der Nachweis der auf die Nitrocellulosemembran geblotteten Proteine erfolgte durch Immunodetektion mit spezifischen, gegen die Ca^{2+} -Kanaluntereinheiten gerichteten Antikörpern (siehe unten). Die geblotteten Proteine wurden mit dem entsprechenden Antikörper 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Mit dem zweiten Antikörper, einem Anti-Kaninchenantikörper (Anti-Rabbit IgG, Verdünnung 1:10000) wurde die Membran anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Antikörper war mit einer Meerrettich-Peroxidase konjugiert, die einer Chemolumineszenz-Reaktion nach den Angaben des Herstellers unterzogen wurde (ECL, Amersham). Auf die gewaschene Membran wurde ein Röntgenfilm (X-Omat, Kodak) aufgelegt. Die Belichtungszeiten lagen zwischen 0,5 und 5 Minuten.

Antikörper

Es wurden polyklonale, isoform-spezifische Antikörper aus dem Kaninchen verwendet. Spezifische Peptidsequenzen verschiedener Untereinheiten wurden von der Firma Biosynthan, Berlin-Buch, synthetisiert und für die Immunisierung von weißen Neuseeland-Kaninchen verwendet.

<i>verwendete Epitope</i>	<i>Ca^{2+}-Kanaluntereinheit</i>
EEEEKERKKLARTASPEKK	α 1C (Mikami 1989)
EWNRDVYIRQ	β 2 (Hullin 1992)
QRNRPWPKDSY	β 3 (Castellano 1993)

Ein nicht isoformspezifischer β -Antikörper (β common, DSYTSRPSDSDVSLE) war gegen ein konserviertes Epitop aller vier bisher beschriebenen β -Isoformen gerichtet (Castellano und Perez-Reyes 1994). Der monoklonale α 1S-Antikörper wurde von Prof. F. Hofmann zur Verfügung gestellt. Als Sekundärantikörper kam ein Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (BioGenes, Germany) zum Einsatz.

2.3.6 Phosphorylierung der β 2a-Fusionsproteine

β 2a-Fusionsproteine (200 μ g) wurden an die GST-Beads (50 μ l gequollenes Gel; Amersham) gebunden und danach mit 40 mM HEPES/Tris-Puffer, pH 7,4 (10 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 10 μ M [γ ^{32}P]ATP und 0,5 μ M PKA) für 5 Minuten bei 30°C inkubiert. Die phosphorylierten Proteine wurden mit 20 mM Glutathionlösung (0,1 % CHAPS in Bicarbonatpuffer, pH 9,2) eluiert, die Proteinkonzentration bestimmt und für die Overlay-Bindungsversuche eingesetzt. Die kalkulierten Molekulargewichte (laut ExPASy, Molecular-Biology-Server) für die Fusionsproteine betragen für die β 2a-Untereinheit 95 kDa, für das N-terminale Fragment, β 2a-N, 48 kDa und für das C-terminale Fragment, β 2a-C, 74 kDa. Die spezifische Radioaktivität pro Mol [^{32}P]ATP wurde über die Bestimmung der DPM (Messung nach Cerenkow) der Eluate realisiert. Mit diesen Werten wurden die Mole der ^{32}P -Inkorporation und das molare Verhältnis von ^{32}P zur β 2a und den trunkierten Formen ermittelt.

2.3.7 Overlay-Bindungsversuche

Die GST-Ahnak-Fusionsproteine (120 pMole) wurden durch SDS-PAGE, (10 % Acrylamid) getrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Blots wurden für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt (5 % BSA, 0,5 % Trockenmilch in PBS, pH 7,5) und anschließend mit eqimolaren Konzentrationen der phosphorylierten β 2a-Untereinheit sowie der trunkierten Proteine (30 nM) in dieser Lösung für 3 Stunden inkubiert. Das Waschen der Membran erfolgte mit einer 5 %igen BSA-Lösung in PBS (pH 7,5). Die Blots wurden luftgetrocknet und ein Kodak X-Omat AR-Film wurde für 14 Stunden aufgelegt.

2.3.8 Ca²⁺-Kanal-Pull-Down-Assay

Das gereinigte Ahnak-C2 Fusionsprotein und ein GST-Kontrollprotein (jeweils 860 µg) wurden kovalent an BrCN-aktivierte Sepharose 4B nach den Angaben des Herstellers (Amersham, Freiburg) gebunden. Das solubilisierte Herzhomogenat (1ml) wurde mit 9 ml Puffer A (2.3.1) verdünnt und mit den Ahnak-C2-Beads (100 µl gequollenes Gel) oder den GST-Kontroll-Beads für 15 Stunden bei 4°C auf dem Rotationsrad inkubiert. WGA-gereinigter Skelettmuskel-Ca²⁺-Kanal (500 µl) wurde ebenfalls mit den Ahnak-C2-Beads und den Kontroll-Beads unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Nach der Bindung wurden die Beads 3x mit Puffer A gewaschen und die gebundenen Proteine in 70 µl 2fach konzentriertem SDS-Probenpuffer resuspendiert und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert und die im Überstand enthaltenen Proteine auf einem 8 %igen SDS-PAGE separiert, auf Nitrocellulose geblottet und durch Immunreaktion nachgewiesen.

2.4 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

2.4.1 Präparation von DNA für die Klonierung in den pGEX-Vektor

Zur Herstellung rekombinanter Plasmidmoleküle benötigt man linearisierte DNA-Fragmente und ebenfalls linearisierte Vektor-DNA. Die DNA-Fragmente wurden mit geeigneten Restriktionsnukleasen aus der Vektor-DNA (5-10 µg) ausgeschnitten und über ein Agarosegel (0,9-1,5 %) aufgetrennt. Die entsprechende DNA-Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mittels QIAEX Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt (2.4.2).

Desweiteren erfolgte über PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion nach Mullis 1985) die Amplifikation zweier β2a-cDNA-Abschnitte. Als Template wurde das pcDNA3.1-Konstrukt (freundlicherweise von Prof. F. Hofmann, TU-München zur Verfügung gestellt) benutzt. Es enthielt die kodierende Sequenz der β2a-Untereinheit (X64297). Für die Amplifikation des N- und C-terminalen β2a-Fragments mittels PCR wurden folgende Primerpaare von der Firma BioTez, Berlin-Buch synthetisiert:

β2a-N (AS 1-200)	5'-acgtgaattcgggtcgaccacgcgctccgcc- 3'	Forward Primer
	5'-gatgcggccgcgacgttacactgtttgcact- 3'	Reverse Primer
β2a-C (AS 195-606)	5'-acgtgaattcagtgcaaacagtgtaacgtc- 3'	Forward Primer
	5'-gatgcggccgctggcggatgtaaaccacct- 3'	Reverse Primer

Als kursiv gedruckte Nukleotide sind die in die Primer eingebauten Restriktionsstellen EcoRI und NotI gekennzeichnet. Die Durchführung der PCR erfolgte im Perkin-Elmer-Zykler (GeneAmp[®] PCRSystem 9700). Folgender Reaktionsansatz wurde zusammenpipettiert:

Steriles H ₂ O	X µl
10x <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase-Puffer	10 µl
dNTPs (10 mM je dNTP)	2 µl
DNA-Template	100 ng/µl
Forward-Primer	100 ng/µl
Reverse-Primer	100 ng/µl
<i>Pfu</i> -Turbo-DNA-Polymerase (2.5 U/µl) (Stratagene)	1 µl
Reaktionsvolumen	100 µl

Folgendes PCR-Programm wurde für die Amplifikation durchlaufen:

Segment	Zyklenanzahl	Temperatur	Dauer
1	5	95 °C 67 °C 72 °C	1,0 min 1,0 min 1,0 min
2	20-24	95 °C 72 °C	0,30 min 1,0 min
3	1	72 °C	10,0 min

2.4.2 Isolierung von cDNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung von cDNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der QIAEX Gel Extraction Kit der Firma Qiagen verwendet. Das Gelstück wurde dazu mit 3 Volumina QX1-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml Rnase H) und 25 µl Trägermatrix (Silikagel-Partikel) versetzt, 10 min bei 50°C unter mehrmaligem Mischen inkubiert und

anschließend für 30 Sekunden bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 500 µl QX1-Puffer suspendiert und wieder für 30 Sekunden bei 12000 rpm zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes erfolgte die Reinigung des Pellets mit 500 µl PE-Puffer (keine Angaben vom Hersteller). Das Pellet wurde dazu resuspendiert und der Überstand nach der Zentrifugation verworfen. Dieser Waschschrift erfolgte 2 Mal. Das Pellet wurde anschließend für 20-30 min Luft-getrocknet, mit 25-30 µl sterilem H₂O versetzt, resuspendiert und 10 Minuten bei 50°C inkubiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand, die gereinigte Plasmid-DNA abgenommen und bei -20°C gelagert.

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm entspricht eine OD₂₆₀ 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Die Reinheit der DNA kann aus dem Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ abgeschätzt werden. Dieser Quotient sollte zwischen 1,7 und 1,9 liegen.

2.4.3 Klonierung von cDNA-Abschnitten in den Fusionsvektor pGEX-4T1

Die Klonierung der Ahnak cDNA- und β2a-Sequenzabschnitte in den prokaryotischen Expressionsvektor pGEX-4T1 (Amersham, Pharmacia) stellte die Voraussetzung für die Expression der entsprechenden GST-Fusionsproteine dar. Zwei Ahnak-Plasmide z37 und z7 (Shtivelman 1992) wurden freundlicherweise von Dr. E. Shtivelman (Universität San Francisco, USA) zur Verfügung gestellt. Die humane cDNA des Ahnak-Aminoterminus lag im Plasmid z37 und die des Carboxylterminus im Plasmid z7 inseriert vor. Für die Generierung von Ahnak's N-Terminus (Ahnak-N: AS 1-257) mit Hilfe des GST-Vektors wurde z37 mit EcoRI und BsaBI geschnitten und dieses Fragment in den mit EcoRI und SmaI geöffneten Vektor pGEX-4T1 subkloniert. Ahnak's C-Terminus besteht aus 1002 Aminosäuren. Dieser wurde für die Klonierung in den Fusionsvektor in 2 Fragmente geteilt. Ahnak-C1 enthielt AS 4646 bis 5288 und Ahnak-C2 AS 5262 bis 5643. Für die Herstellung von Ahnak-C1 wurde z7 mit NspV verdaut, die Enden mit Hilfe des Klenow-Enzyms von *E.coli* DNA-PolymeraseI (Boehringer Mannheim) aufgefüllt und danach mit XhoI geschnitten. Die Insertion dieses Fragments erfolgte in den mit SmaI und XhoI geöffneten

pGEX-Vektor. Das 1,3-kb NcoI-XhoI Fragment konnte schließlich entfernt, die Enden des Plasmids aufgefüllt und ligiert werden. Das C-terminale Fragment, Ahnak-C2, wurde durch Verdau von z7 mit BspMI, Auffüllen der Enden mit Hilfe des Klenow-Enzyms und anschließender Restriktion mit XhoI aus dem z7-Plasmid isoliert. Die Insertion dieses 1,4-kb Fragments erfolgte in den mit SmaI-XhoI geschnittenen pGEX-Vektor. Zwei pGEX-Konstrukte, die zentrale, repetitive Ahnak-Domänen tragen (Ahnak-R1 und -R4), wurden freundlicherweise von Dr. Bae (Ewha Womans Universität Seoul, Korea) zur Verfügung gestellt. Ahnak-R1 enthält ein Repeat und Ahnak-R4 enthält drei komplette und zwei halbe Repeats der zentralen Ahnak-Region.

Prof. F. Hofmann (Technische Universität München) stellte uns das pcDNA3.1-Konstrukt, das die kardiale β 2a-cDNA-Sequenz (Kaninchen, X64297) trägt, zur Verfügung. Das 2,1-kb Sall-NotI Fragment wurde in die Sall-NotI Schnittstelle des pGEX-Vektors subkloniert. Außerdem wurden zwei β 2a-Fragmente benötigt, die die N- und C-terminale Region des Proteins tragen. Die Amplifikation der entsprechenden cDNA-Abschnitte (β 2a-N: AS 1-200 und β 2a-C: AS 195-606) erfolgte über PCR (siehe 2.4.1). Die Primer wurden mit überhängenden Restriktionsseiten für EcoRI und NotI designt (Sequenz der Primer, siehe Punkt 2.4.1), um die cDNA-Abschnitte in den mit EcoRI und NotI geschnittenen pGEX-Vektor zu klonieren.

Mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) erfolgte die Ligation der entsprechenden cDNA-Abschnitte in den pGEX-4T1-Vektor. Der Standard-Ligationsansatz mit 20 μ l Endvolumen setzte sich wie folgt zusammen: Die DNA wurde mit sterilem Wasser auf 16 μ l aufgefüllt und mit 2 μ l 10x Ligationspuffer (50 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 10 mM ATP und 660 mM Tris/HCl, pH 7,5) versetzt. In diesen Ansatz wurde 1 μ l T4-DNA-Ligase (2 Units) pipettiert, gemischt und über Nacht bei 22°C inkubiert. Die Ligation wurde durch 10minütiges Erhitzen auf 65°C beendet.

2.4.4 Transformation von kompetenten *E.coli*-Zellen (DH5 α , Hanahan 1983)

Zur Plasmidtransformation in Bakterien wurde der Ligationsansatz mit 100 μ l kompetenten *E. coli*-Zellen des Stammes DH5 α (Gibco BRL) gemischt, 30 Minuten auf Eis inkubiert, bei 37°C für 45 Sekunden "Hitze-geschockt" und danach für 2 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen mit 900 μ l LB-Medium (Trypton 10 g/l, Hefeextrakt 5 g/l,

NaCl 5 g/l, pH 7,5) versetzt und 1 Stunde bei 37°C geschüttelt (250 rpm). Das Ausplattieren von 100 µl Bakteriensuspension erfolgte auf Ampicillin-haltige LB-Agarplatten (100µg/µl). Diese wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Vermehrung der Transformanten erfolgte in jeweils 3,0 ml LB-Ampicillin-Medium mit je einer Einzelkolonie (12-15 Stunden bei 37°C und 280 rpm). 2 ml der Ansätze wurden zur Isolierung der Plasmid-DNA mittels Spin-Präp (2.4.5) verwendet. Zum Anlegen einer Glycerolvorratskultur wurden 800 µl der restlichen Bakteriensuspension mit 200 µl Glycerol (85%[v/v]) versetzt, gemischt und bei -80°C eingefroren und aufbewahrt.

2.4.5 Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Plasmid Mini Kits der Firma Qiagen. 2 ml der über Nacht-Kultur wurden für 5 Minuten bei 6000 rpm in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Das Pellet wurde in 250 µl P1-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase H) gelöst, mit ebenfalls 250 µl P2-Puffer (200 mM NaOH, 1 % SDS) gemischt und für maximal 5 Minuten bei Raumtemperatur zur Lyse der Bakterien inkubiert. Der Ansatz wurde mit 350 µl N3-Puffer (keine Angaben) neutralisiert. In diesem Schritt fallen die SDS-Anteile und die Reste der Bakterienzellen zusammen mit der noch in den Zellen befindlichen genomischen Bakterien-DNA aus. Diese Anteile können durch anschließendes Zentrifugieren von der Plasmid-DNA abgetrennt werden. Die Überstände wurden dazu auf eine QIA-prep-spin Säule aufgetragen und 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die an die Matrix gebundene DNA wurde danach mit 750 µl PB-Puffer (keine Angaben) gewaschen, d.h. der Waschpuffer durch die Säule gedrückt und die DNA anschließend mit 100 µl TE-Puffer (pH 8,0) eluiert. Es konnten circa 15 µg bis 20 µg Plasmid-DNA pro 2 ml Ausgangskultur gewonnen werden.

Für größere Mengen an Plasmid-DNA wurde die Midi-Plasmid-Aufreinigungsmethode derselben Firma verwendet. Hierbei wurden 50 ml LB-Ampicillin-Medium mit den gewünschten Bakterien beimpft und über Nacht kultiviert (37°C, 250 rpm). Diese Kultur wurde abzentrifugiert (15 Minuten bei 6000 rpm und 4°C), das Pellet in 4 ml P1-Puffer gelöst, mit 4 ml P2-Puffer versetzt und nach 5 Minuten der Lyse, bei Raumtemperatur mit 4 ml eiskaltem P3-Puffer neutralisiert. Nach 30minütiger Zentrifugation (27000 x g bei 4 °C)

wurde der Überstand auf eine QIAGEN Tip100-Säule dekantiert. Die weitere Aufreinigung erfolgte dann wie oben beschrieben.

Alle Konstrukte wurden durch Restriktionsverdau und Sequenzierung (Firma Invitex, Berlin-Buch) auf ihre Richtigkeit überprüft.

2.4.6 Expression von GST-Fusionsproteinen

Für die Herstellung der Fusionsproteine mußten die pGEX-Konstrukte in einen speziellen, für die Proteinexpression geeigneten Bakterienstamm transformiert werden. Es wurden kompetente Zellen des Stammes BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Weiner 1994) der Firma Stratagene verwendet. Die effiziente Produktion von heterologen Proteinen wird durch eine erhöhte t-RNA-Produktion in diesen Zellen garantiert. Bei konventionellen Bakterienstämmen kommt es im Verlauf der Expression aufgrund einer limitierten t-RNA-Produktion zum Stillstand der Proteinexpression. Die Transformation der pGEX-Konstrukte wurde wie folgt durchgeführt: 20 µl der Bakterien wurden mit 0,4 µl 1:10 verdünntem Mercaptoethanol versetzt, für 10 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend 1 ng Plasmid-DNA dazupipettiert und für weitere 30 Minuten auf Eis gestellt. Für die Aufnahme der DNA durch die Bakterien mußte der Ansatz auf 42°C für 20 Sekunden erhitzt werden. Danach wurde dieser für 2 Minuten auf Eis abgekühlt und in 900 µl SOC-Medium (Trypton 20 g/l, Hefeextrakt 5 g/l, NaCl 0,5 g/l, pH 7,0) überführt. Die Zellen wurden 1 Stunde bei 250 rpm bei 37°C im Schüttler inkubiert, anschließend ein geeignetes Volumen (80-100 µl) auf Ampicillin-haltige Agarplatten (100 µg/µl) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Vermehrung der positiven Klone erfolgte in 50 ml LB-Medium (Ampicillin 100 µg/ml) im Schüttler für 12 bis 14 Stunden bei 280 rpm und 37°C. Dieser Ansatz wurde zu 11 Ampicillin-haltigem LB-Medium gegeben und für weitere 3 Stunden bei 280 rpm geschüttelt. Die Proteinexpression der Bakterien wurde danach mit 0,1 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden für weitere 3 bis 4 Stunden bei 300 rpm in der Regel bei 37°C inkubiert.

2.4.7 Isolierung und Reinigung der Fusionsproteine aus den Bakterienzellen

Die Zellsuspension wurde für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert (8100 rpm, Beckman-Rotor JLA-10.500), das Bakterienpellet in 20 ml STE-Puffer (10 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA mit 0,1 mM PMSF, 1 µM Pepstatin A, 0,1 mM Benzamidine, 1 mM Jodacetamid, 1 % Triton, 2 mM Dithiothreitol) resuspendiert und anschließend mit einem Sonikator (SonoPlus HD70, Bachofer Laboratoriumsgeräte) 2 x 45 Sekunden mit Ultraschallstößen (Powerlevel 70%, Zyklus 70) behandelt. Die Zelltrümmer wurden bei 10.000 rpm für 10 Minuten (4°C) in einem Beckman JA-20 Rotor abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig auf Glutathion-S-Transferase-Beads (1 ml gequollenes Gel) dekantiert und 10 Minuten auf einem Rotationsrad bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Bindung der GST-Fusionsproteine an die GST-Beads wurden diese mit eiskaltem STE-Puffer (150 ml) gewaschen. Die Elution der Ahnak- und der β2a-GST-Fusionsproteine erfolgte mit einer 20 mM Glutathionlösung (gelöst in 0,1 % CHAPS-haltigem Bicarbonatpuffer pH 9,2). Zur Kontrolle der Expression wurden die Fusionsproteine auf einem 10 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Coomassie-Blue Färbung angefärbt.