

Aus dem Institut für Integrative Neuroanatomie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Herstellung, Aufreinigung und Charakterisierung von
polyklonalen Antikörpern gegen die β_1 - und β_2 -Untereinheit von
BK Kaliumkanälen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Mikhail Salzmann

aus Leningrad

Gutachter: 1. Prof. Dr. R. W. Veh
 2. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Gollasch
 3. Priv.-Doz. Dr. D. Wicher

Datum der Promotion: 04.02.2011

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	7
1.1 Ionenkanäle	7
1.2 Kaliumkanäle	7
1.3 Struktur von BK Kaliumkanälen: die porenbildende Untereinheit.....	8
1.4 Das Slowpoke Gen	10
1.5 Vielfalt und Regulation von BK Kaliumkanälen	10
1.6 Die Untereinheiten BKβ_1 und BKβ_2	11
1.7 BK Kaliumkanäle außerhalb des ZNS	13
1.8 BK Kaliumkanäle im ZNS	13
1.9 Biologische Aufgaben und pharmakotherapeutische Ansätze.....	13
1.10 Zielsetzung dieser Arbeit	15
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Allgemein verwendete Materialien	16
2.1.1 Chemikalien	16
2.1.2 Proteine, Nukleotide und Antikörper	18
2.1.3 Primer	19
2.1.4 Geräte und weitere Hilfsmittel	19
2.1.5 Vorbemerkungen	21
2.2 Molekularbiologie.....	21
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	21
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	22
2.2.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosestücken	22
2.2.4 Klonieren von DNA-Fragmenten in pGEM-T.....	22
2.2.5 Transformation.....	23
2.2.6 Präparation von Plasmid-DNA	23
2.2.7 Restriktionsanalyse	24
2.3 Proteinbiochemie.....	24
2.3.1 Retransformation und Proteinexpression	24

2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	25
2.3.3 Denaturierende Thio redoxin Fusionsproteinaufreinigung über Ni-NTA Agarose..	26
2.3.4 Präparative Aufreinigung der GST-Fusionsproteine und Elektroelution.....	26
2.3.5 Bicinchoninsäure-Reaktion (BCA)	27
2.3.6 Immunisierung von Kaninchen.....	28
2.4 Antikörperaufreinigung.....	28
2.4.1 Dekomplementierung der Antiseren und Entfernung unspezifischer Komponenten	28
2.4.2 IgM-Entfernung mittels Gelfiltration über Superdex 200	28
2.4.3 Herstellung von Bakteriensedimenten zur Präabsorption	29
2.4.4 Präabsorption der Seren zur Entfernung der Kreuzreaktivität gegen das Trägerprotein und paraloge BK β -Untereinheiten	29
2.4.5 Affinitätsreinigung der Antikörper über Nitrocellulose-Membranen	29
2.4.6 Einengung von Antikörpern mit einer SP-Sepharose Säule	30
2.5 Antikörpercharakterisierung.....	30
2.5.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	30
2.5.2 Herstellung von Membranfraktionen.....	31
2.5.3 Western-Blot und Immundetektion	31
2.6 Immunzytochemie	32
2.6.1 Perfusions-Fixierung von Gewebe	32
2.6.2 Schneiden	33
2.6.3 Beschichtung von Objektträgern	33
2.6.4 Kontrollfärbung nach Klüver und Barrera	33
2.6.5 Färbung mit P-Streptavidin DAB/Ni.....	34
2.6.6 Blockadeversuch.....	35
2.6.7 Eindecken der Schnitte auf Objektträgern.....	35
3. ERGEBNISSE	36
3.1 Herstellung der Fusionsproteine.....	36
3.1.1 Auswahl der Sequenzen	36
3.1.2 Klonieren in Vektoren	37

3.1.3 Fusionsproteine.....	37
3.1.4 Testabnahmen.....	39
3.2 Aufreinigung der Antikörper.....	41
3.2.1 Entfernung unspezifischer Serum-Komponenten und der IgM Immunglobuline...	41
3.2.2 Detektion und Entfernung der Kreuzreaktivität.....	42
3.2.3 Bilanz nach der Aufreinigung.....	45
3.3 Charakterisierung der polyklonalen, monospezifischen BKβ Antiseren.....	45
3.3.1 Kreuzreaktivität gegen paraloge Proteine.....	45
3.3.2 Expression von BK β_1 und BK β_2 im Großhirn der Ratte.....	46
3.3.3 Blockade im ELISA.....	47
3.4 Immunzytochemische und lichtmikroskopische Untersuchungen.....	49
3.4.1 Blockade im Gefrierschnitt.....	49
3.4.2 Verteilung von BK β_1 und BK β_2 im Gehirn der Ratte.....	50
3.4.3 Expression von BK β_1 und BK β_2 im Hypothalamus.....	50
3.4.4 Expression von BK β_1 und BK β_2 im Hippocampus.....	56
4. DISKUSSION.....	61
4.1 Spezifität der Antikörper.....	61
4.2 BK β_1 und BK β_2 im Gehirn der Ratte.....	62
4.3 Kollokalisierung von α - und β -Untereinheit.....	62
4.4 β -Untereinheiten verändern die pharmakologischen Eigenschaften von BK Kaliumkanälen.....	63
4.5 BK β_1 wird in neuroendokrin aktiven Kerngebieten des Hypothalamus exprimiert ..	64
4.6 BK β_1 als Modulator bei der Ausschüttung von Neurohormonen im Hypothalamus ..	65
4.7 BK β_1 und BK β_2 werden im Hippocampus exprimiert.....	66
4.8 Die Rolle von BK β_1 und BK β_2 im Hippocampus.....	66
4.9 Abschließende Überlegungen.....	68
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	69
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	71

ANHANG:

Abkürzungsverzeichnis.....	84
Erklärung.....	85
Lebenslauf.....	86
Publikationsliste	87
Danksagung.....	88

1. Einleitung

1.1 Ionenkanäle

Ionenkanäle kommen in allen Säugerzellen vor und bilden eine Pore in der Zellmembran. Als dynamische Proteine, die ihre Konformation schnell ändern können (Öffnen / Schließen), halten sie Ionengradienten aufrecht, und erlauben den selektiven Durchtritt (Weiger et al. 2002). Zu ihren wichtigsten Funktionen gehört die Ausbildung des Aktionspotentials und des Ruhemembranpotentials. Dadurch werden unter anderem Abläufe wie die Muskelkontraktion, die Erregungsausbreitung in Nervenzellen, sowie die neuronale Transmitterausschüttung ermöglicht. Im Laufe der Evolution entstanden mehrere Unterfamilien von Kanalproteinen, die für Ionen wie Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , oder Cl^- spezifisch sind. Innerhalb jeder dieser Unterfamilien gibt es strukturelle und funktionelle Unterschiede (Salkoff et al. 2006). Zudem führen Mutationen in vielen Ionenkanalgenen zu schwerwiegenden Krankheitsbildern. Die Erforschung ihrer Funktion und Verteilung in den verschiedenen Geweben des Organismus liefert neue Erkenntnisse, und hilft so neue Behandlungskonzepte zu entwickeln.

1.2 Kaliumkanäle

Kaliumkanäle kommen sowohl in Eukaryoten, als auch in Prokaryoten vor. Da die meisten Zellen von Eukaryoten in Ruhe fast ausschließlich für K^+ durchlässig sind, bestimmt dessen Gleichgewichtspotential maßgeblich das Ruhemembranpotential der Zellen. Darüber hinaus spielen Kaliumkanäle in Neuronen und erregbaren Geweben eine wichtige Rolle bei der Erregbarkeit und Entladungsfrequenz von Zellen, sowie der Dauer des Aktionspotentials (Salkoff et al. 2006). Obwohl sie phylogenetisch von einer gemeinsamen Urform abstammen (Derst et al. 1998), repräsentieren Kaliumkanäle heute die größte und vielfältigste Gruppe aller bekannten Ionenkanäle (Latorre et al. 1989). Trotz ihrer Vielfalt weisen sie jedoch einige strukturelle Gemeinsamkeiten auf. So besitzen alle Kaliumkanäle eine so genannte „P-Schleife“ mit stark konservierter Aminosäuresequenz (GYG-Motiv, Heginbotham et al. 1992, 1994), welcher den Selektivitätsfilter für Kaliumionen bildet. Die P-Schleife wird von zwei Transmembransegmenten flankiert, wodurch die porenbildende Region eines Kaliumkanals (TM-P-TM) entsteht. Diese porenbildende Domäne ist allen Kaliumkanälen gemeinsam, wobei immer vier porenbildende Domänen eine funktionsfähige Ionenkanalpore bilden. Tatsächlich weisen einige Kaliumkanäle (zum Beispiel K_{ir} -Kanäle) lediglich diese Grundstruktur aus zwei Transmembransegmenten auf.

Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_v -Kanäle, v steht für *engl.* voltage) besitzen hingegen vier weitere Transmembrandomänen S1-S4, an die sich die porenbildende Region (Domänen S5, P und S6) anschließt. Die Domäne S4 fungiert als Spannungssensor. K_v -Kanäle öffnen in Abhängigkeit vom Membranpotential. Wird die Zellmembran depolarisiert, so öffnet der Kanal, bei Repolarisation schließt er wieder. Darüber hinaus sind K_v -Kanäle ebenfalls tetramere Proteine - jeweils vier aus sechs Transmembrandomänen bestehende Proteine (so genannte α -Untereinheiten) sind miteinander assoziiert, um einen funktionsfähigen Kanal zu bilden. Zusätzlich können α -Untereinheiten von K_v -Kanälen mit akzessorischen, die Funktionsweise des Kanals mitbestimmenden Hilfsproteinen (so genannten β -Untereinheiten) coassoziert sein. Neben K_{ir} - und K_v -Kanälen bilden die sog. K_{2p} -Kanäle die dritte große Kaliumkanalfamilie. K_{2p} -Kaliumkanäle sind dimere Proteine. Jede K_{2p} -Untereinheit enthält dabei jedoch zwei porenbildende Regionen, wodurch wiederum vier porenbildende Regionen zu einer funktionsfähigen Kanalpore zusammengefügt werden (Wang et al. 1999).

Kaliumkanäle, die anders als K_v -Kanäle, sowohl spannungs- als auch von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[Ca^{2+}]_i$ abhängig sind, konnten erstmals durch voltage clamp Versuche (Spannungsklemme) an Schneckenneuronen (Heyer et al. 1976), und chromaffinen Zellen vom Rind (Marty 1981) untersucht werden. Die gemessene Leitfähigkeit des Einzelkanals beträgt bis zu 250 pS. Dieser Wert übersteigt die Leitfähigkeit klassischer spannungsabhängiger Kaliumkanäle um ein Vielfaches (Palotta et al. 1981). Aus diesem Grund wurden die entsprechenden Kanäle auch BK Kanäle („Big conductance K^+ channel“) genannt. Im Gegensatz zu den rein spannungsabhängigen K_v -Kanälen, öffnen BK Kaliumkanäle in Abhängigkeit von der $[Ca^{2+}]_i$, entweder rein spannungsabhängig, rein Ca^{2+} -abhängig oder aber durch eine synergistische Wirkung beider Stimuli (Garcia-Calvo et al. 1994, Magleby 2003). Die Synergie wird darin vermutet, dass der Einfluss eines der beiden aktivierenden Stimuli, die für eine Öffnung des Kanals durch den jeweils anderen Stimulus benötigte intrinsische Energie herabsetzt (Cox et al. 2000), was den BK Kanal maßgeblich von K_v -Kanälen unterscheidet.

1.3 Struktur von BK Kaliumkanälen: die porenbildende Untereinheit

BK Kaliumkanäle können durch Charybdotoxin (ChTX), spezifisch blockiert werden (Knaus et al. 1994a). Mit diesem Toxin als Marker konnten BK Kanäle in Rindern identifiziert (Garcia-Calvo et al. 1991), und aus der glatten Muskulatur von Trachea und Aorta isoliert werden (Garcia-Calvo et al. 1994). Nach Reinigung des Kanalproteins wurde elektrophoretisch gezeigt, dass der Kanal aus zwei verschiedenen Untereinheiten, α (62 kDa) und β (31 kDa, Kap. 1.6)

besteht, die in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 nichtkovalent miteinander verbunden sind (Garcia-Calvo et al. 1994, Knaus et al. 1994c). Dieses Verhältnis ist jedoch nicht zwingend, so dass eine Assoziation eines BK Kanals mit weniger als vier akzessorischen β -Untereinheiten möglich erscheint (Wang et al. 2002). Abb. 1.1 stellt schematisch den Aufbau jeweils einer α - und einer β -Untereinheit dar.

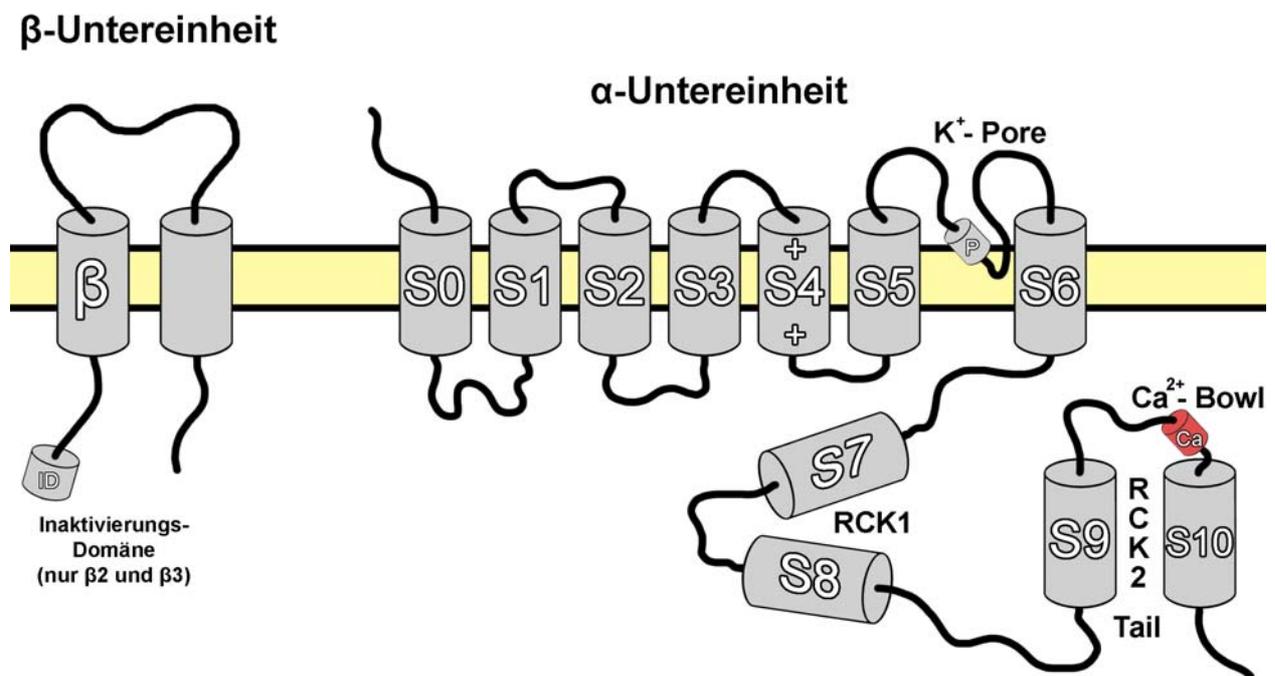


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines BK Monomers mit β -Untereinheit. Die β -Untereinheit ist nichtkovalent mit der S0 Domäne der α -Untereinheit verbunden. Die α -Untereinheit hat sieben Transmembrandomänen S0 bis S6, und vier weitere intrazelluläre, hydrophobe Domänen. Der Spannungssensor des Kanals befindet sich bei S4, die Kanalpore zwischen S5 und S6 und die Ca²⁺-Sensoren bei RCK1, sowie zwischen S9 und S10 („Ca²⁺-Bowl“). Die Untereinheiten BK β_2 und BK β_3 verfügen über eine zusätzliche Inaktivierungsdomäne am N-Terminus.

Ähnlich spannungsabhängigen Kaliumkanälen ist der BK Kanal ein tetrameres Protein, das von α -Untereinheiten des BK Kanals gebildet wird (häufig auch Slo oder Slo1 genannt, Shen et al 1994). Im Gegensatz zu spannungsabhängigen Kaliumkanälen, besitzen die α -Untereinheiten jedoch nicht sechs, sondern sieben Transmembrandomänen. Die zusätzliche siebte Transmembrandomäne S0 befindet sich am N-Terminus des Proteins, wodurch der Amino-(N)-Terminus nach extrazellulär verlagert wird (Meera et al. 1997). Hierbei befindet sich, wie bei K_v-Kanälen, der Spannungssensor bei Domäne S4 und die porenbildende Region bei S5-P-S6, was den Kanal zu einem Mitglied der Superfamilie spannungsabhängiger Ionenkanäle macht

(Diaz et al. 1998). Der C-terminale zytosolische Anteil der α -Untereinheit besitzt zwei so genannte RCK Domänen (regulators of conductance of K^+ , Magleby et al. 2003), welche aus vier weiteren hydrophoben, jedoch nicht transmembranen Regionen (früher S7-S10 genannt) und mehreren Ca^{2+} -Sensoren (zum Beispiel der "Ca²⁺ Bowl", Schreiber et al. 1997, Bao et al. 2004) bestehen. Ca^{2+} -Bindung an die Ca^{2+} -Sensoren führt über eine Konformationsänderung zur Öffnung der Kanalpore (Niu et al. 2004).

In den vergangenen Jahren sind insgesamt drei weitere stark homologe Kanaluntereinheiten identifiziert worden (Slo2.1, Slo2.2 und Slo3). Trotz der strukturellen Ähnlichkeiten, handelt es sich bei Slo2.1 und Slo2.2 funktionell jedoch um Na^+ -abhängige Kaliumkanäle und bei Slo3 um einen pH-abhängigen Kaliumkanal (Salkoff et al. 2006).

1.4 Das Slowpoke Gen

Bei einem von mehreren Tausend *Drosophila melanogaster* Stämmen führte eine Defekt-Mutation eines Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanals zu verlängerten Aktionspotentialen im muskulären Flugapparat (Elkins et al. 1986). Die DNA dieser Mutanten konnte isoliert und sequenziert werden (Atkinson et al. 1991). Das entsprechende Gen wurde aufgrund der Auswirkungen der Mutation Slowpoke (*engl. Trödler*), kurz Slo genannt. Nach der Erstbeschreibung des Slo Gens konnte eine cDNA des Gens aus *Drosophila melanogaster* isoliert und mittels Hybridisierung in Neuronen und Skelettmuskulatur ein homologes Gen bei Mäusen beschrieben werden (Butler et al. 1993). Schließlich gelang auch die Isolierung des Slo Gens aus Hippocampus und Muskulatur des Menschen. Es ist auf dem Chromosom 10q22.3 lokalisiert (Pallanck et al. 1994). Eine Mutation dieses Gens verursacht beim Menschen unter anderem das GEPD-Syndrom, welches sich durch generalisierte Epilepsie mit paroxysmalen Dyskinesien äußert (Du et al. 2005). Heute wird das für humane BK Kaliumkanäle kodierende Gen als *KCNMA1* bezeichnet.

1.5 Vielfalt und Regulation von BK Kaliumkanälen

Anders als bei K_v -Kanälen kodiert lediglich ein Gen für die α -Untereinheit von BK Kaliumkanälen. Dennoch sind in verschiedenen Geweben zahlreiche BK Kanäle mit unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften beschrieben worden (Lu et al. 2006). Diese Vielfalt wird unter anderem dadurch erreicht, dass aus dem Gen für die α -Untereinheit durch alternatives Spleißen der mRNA mehrere Kaliumkanalvarianten entstehen können. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten, dass die einzelnen Spleißvarianten eine

unterschiedliche Ca^{2+} -Sensitivität (Tseng-Crank et al. 1994) und Leitfähigkeit des Einzelkanals aufweisen (Lagrutta et al. 1994). Jedes α -Monomer kann darüber hinaus mit einer der vier regulierenden β -Untereinheiten, assoziiert sein, welche unter anderem eine große Verschiebung der Spannungsabhängigkeit bei bestimmten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verursachen (Wang et al. 2002), und sowohl die Kinetik, als auch die pharmakologischen Eigenschaften des Kanals maßgeblich mitbestimmen (McManus et al. 1995). Sowohl $\text{BK}\beta_1$, als auch $\text{BK}\beta_2$, können außerdem die Oberflächenexpression von BK Kanalproteinen regulieren (Toro et al. 2006, Zarei et al. 2007). Zusätzlich werden BK Kanäle auch über Phosphorylierung gesteuert, da sie Substrat verschiedener Kinasen wie Proteinkinase A, G und C sein können, was ihre Eingliederung in diverse Signalkaskaden ermöglicht (Schubert et al. 2001).

1.6 Die Untereinheiten $\text{BK}\beta_1$ und $\text{BK}\beta_2$

Die β -Untereinheiten von BK Kaliumkanälen sind phylogenetisch neuartige Proteine und kommen erst in Vertebraten vor (Knaus et al. 1996). Heute weiß man, dass es insgesamt vier (β_1 - β_4) Untereinheiten in Vertebraten gibt (Salkoff et al. 2006).

$\text{BK}\beta_1$ ist ein stark glykosyliertes, 31 kDa großes und 191 Aminosäuren langes Protein. Es besteht strukturell, wie alle $\text{BK}\beta$ -Untereinheiten, aus zwei Transmembrandomänen, relativ kurzen zytosolischen N- und C-terminalen Enden und einer großen extrazellulären Schleife mit einem konservierten Grundgerüst aus Cysteinresten, welche intramolekulare Disulfidbrücken bilden (Abb. 1.1, Knaus et al. 1994b). $\text{BK}\beta_1$ wird hauptsächlich in glatter Muskulatur (Orio et al. 2002) exprimiert, wurde jedoch mittels PCR in Haarzellen der Cochlea (Langer et al. 2003), und mit *in situ* Hybridisierung in einigen Neuronengruppen, vor allem in Hypothalamus, Thalamus und cerebellären Purkinjezellen nachgewiesen (Chang et al. 1997). Die Interaktion mit der zugehörigen α -Untereinheit erfolgt über die Domänen S0 (Meera et al. 1997), oder S1-S3 (Morrow et al. 2006, Liu et al. 2008). $\text{BK}\beta_1$ setzt die zum Öffnen des Kanals benötigte intrinsische Energie herab und moduliert so seine Offenwahrscheinlichkeit (Cox et al. 2000), erhöht gleichzeitig aber auch die Ca^{2+} -Sensitivität des Kanals (Bao et al. 2005). Dies wird dadurch erreicht, dass $\text{BK}\beta_1$ den Spannungssensor des Kanals so beeinflusst, dass der Kanal bei negativeren Membranpotentialen öffnet. Da Spannungsabhängigkeit und Ca^{2+} -Aktivierbarkeit, wie zuvor beschrieben, synergistisch wirken, kann somit die Ca^{2+} -abhängige Öffnung des Kanals bei geringerer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erreicht werden (Bao et al. 2005, Wang et al. 2006). Unabhängig von diesem Mechanismus erhöht $\text{BK}\beta_1$ außerdem die Dissoziationskonstante von Ca^{2+} , was die Ca^{2+} -Sensitivität zusätzlich erhöht (Bao et al. 2005).

Die cDNA von BK β_1 wurde aus glatter Muskulatur isoliert (Knaus et al. 1994b). Später konnte auch das kodierende Gen *KCNMB1*, welches aus vier Exons besteht, charakterisiert (Jiang et al. 1999) und auf Chromosom 5q34 des Menschen lokalisiert werden (Tseng-Crank et al. 1996). Eine niedrige Expression dieses Gens könnte ursächlich an der Entstehung von Schizophrenie beteiligt sein (Wong et al. 2005). Eine Bindungsstelle für Estradiol liefert eine weitere Möglichkeit, die Kanalfunktion zu beeinflussen (Valverde et al. 1999). Dies erfolgt sowohl über die direkte Öffnung des Kanals, als auch über Regulation der Kanalexpression (Korovkina et al. 2004) (Nagar et al. 2005). Da eine Beteiligung von BK β_1 an protektiven Mechanismen gegen arterielle Hypertension gezeigt wurde (Nelson et al. 2004) liegt hier ein möglicher Ansatz zur Erklärung der geringeren Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen des weiblichen Geschlechts vor der Menopause. Zusätzlich konnte BK β_1 eine modulierende Wirkung bei oxidativem Stress zugeordnet werden (Santarelli et al. 2004).

BK β_2 ist strukturell mit BK β_1 zu 44% identisch (Uebele et al. 2000). Zwar bewirkt BK β_2 ebenfalls eine Erhöhung der Ca²⁺-Sensitivität und somit der Offenwahrscheinlichkeit, jedoch bleibt die Sensitivität des Spannungssensors unverändert (Orio et al. 2005), obwohl in Anwesenheit von BK β_2 die aktivierte Konformation des Spannungssensors offenbar begünstigt wird (Savalli et al. 2007). Anders als BK β_1 verursacht BK β_2 jedoch zusätzlich eine schnelle Inaktivierung des BK Kanals (Wallner et al. 1999). Diese wird durch eine Inaktivierungsdomäne am N-Terminus (Abb. 1.1) des 235 Aminosäure langen Proteins ermöglicht, die, nachdem der Kanal aktiviert wurde, die Kanalpore ähnlich einem „Ball“ verstopft, und so den K⁺-Strom unterbricht (Bentrop et al. 2001). Daher wurde diese Untereinheit mit schnellen Inaktivierungsvorgängen in Pyramidenzellen des Hippocampus in Zusammenhang gebracht, welche zu einer schnelleren Widererregbarkeit von Neuronen führen (Hicks et al. 1998, Shao et al. 1999). Das kodierende Gen *KCNMB2* konnte auf dem humanen Chromosom 3q26.2 identifiziert werden, wodurch es mit einigen genetischen Erkrankungen, wie dem Myelodysplastischen Syndrom in Verbindung gebracht werden kann (Uebele et al. 2000).

BK β_3 und BK β_4 werden von den zugehörigen Genen *KCNMB3* (Chromosom 3q26.3 des Menschen) und *KCNMB4* (Chromosom 12q des Menschen) kodiert. BK β_3 wurde hauptsächlich in Hoden, Pankreas und Milz nachgewiesen und hat vor allem Strukturähnlichkeit mit BK β_2 . Im Gegensatz dazu weist BK β_4 eine geringere Homologie mit anderen BK β -Untereinheiten auf und scheint vorrangig im Gehirn vorzukommen (Orio et al. 2002). BK β_3 und BK β_4 wurden im

Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, weshalb im weiteren Verlauf nicht näher auf sie eingegangen wird.

1.7 BK Kaliumkanäle außerhalb des ZNS

Die Expression und Funktion von BK Kaliumkanälen ist außerhalb des ZNS durchaus vielfältig, jedoch ist ihre Funktion nur teilweise verstanden (Salkoff et al. 2006). So kommen sie beispielsweise in Haarzellen vor, wo sie an der Frequenzwahrnehmung beteiligt sind (Langer et al. 2003, Pyott et al. 2007). In glatter Muskulatur sind BK Kaliumkanäle in die Regulation des Gefäßtonus und somit des Blutdrucks involviert (Plüger et al. 2000), und in peripheren Neuronen modulieren sie unter anderem die Feuerfrequenz (Salkoff et al. 2006). Darüber hinaus konnte BK β_1 RNA in mehreren peripheren Organen wie Magen, Darm, Herz, Lunge, Milz, Niere und Hoden gezeigt werden (Chang et al. 1997). In Northern Blot Analysen konnten zwei unterschiedlich große RNA-Transkripte (1,5 und 2,5 kb) von BK β_2 in Magen, Darm, Herz, Lunge, und Uterus nachgewiesen werden (Wallner et al. 1999). Quantitative PCR Versuche zeigten außerdem ein BK β_2 -Signal in Niere, Pankreas und Hinterwurzelneuronen von Ratten (Li et al. 2007, Uebele et al. 2000).

1.8 BK Kaliumkanäle im ZNS

BK Kaliumkanäle sind im ZNS weit verbreitet (Salkoff et al. 2006). Immunzytochemische Versuche mit gegen die α -Untereinheit gerichteten Antikörpern, sowie *in situ* Hybridisierung zum Nachweis von BK α mRNA zeigten ein Signal in Neocortex, Hippocampus, Thalamus, Hypothalamus, Striatum, Pallidum, Substantia nigra, medialer Habenula, Ncl. interpeduncularis, cerebellären Purkinjezellen, sowie dem olfaktorischen System (Knaus et al. 1996, Chang et al. 1997, Sausbier et al. 2006). *In situ* Hybridisierung zeigte BK α mRNA außerdem im Ncl. suprachiasmaticus des Hypothalamus, wobei die Expression einer circadianen Rhythmik unterliegt (Pitts et al. 2006). Darüber hinaus ist bekannt, dass eine Dysfunktion von BK Kaliumkanälen im Cerebellum im Maus-Modell zu cerebellärer Ataxie führt (Sausbier et al. 2004).

1.9 Biologische Aufgaben und pharmakotherapeutische Ansätze

BK Kaliumkanäle werden vor allem als negativer Rückkopplungsmechanismus bei Membrandepolarisation und Ca²⁺-Einstrom in die Zelle gesehen (Salkoff et al. 2006). Sie können aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften sehr schnell auf Änderungen des Membranpotentials und der [Ca²⁺]_i reagieren und tragen so zur Re- und Hyperpolarisation der Zellmembran bei.

Daher könnten sie auch eine Art „Notbremse“ bei starker Depolarisation und nachfolgender Ca^{2+} -Akkumulation, wie sie bei cerebralen Ischämien oder epileptiformen Aktivitäten vorkommen, darstellen (Hu et al. 2001, Shanley et al. 2002). Außerdem ist bekannt, dass es bei chronischen Epilepsien am Rattenmodell mit der Zeit nachweislich zu einer Reduktion von BK Kaliumkanälen in der CA3 Region des Hippocampus kommt (Pacheco Otalora et al. 2008), wodurch der schützende Effekt verloren geht. Funktionell wird angenommen, dass BK Kaliumkanäle an der schnellen Phase der Nachhyperpolarisation in Pyramidenzellen der CA1 Region des Hippocampus beteiligt sind (Lancaster et al. 1987, Shao et al. 1999) und in präsynaptischen Membranen sowohl des Stratum radiatum der CA1 Region, als auch in Pyramidenzellen der CA3 Region vorkommen (Hu et al. 2001), wo sie unter anderem die Glutamat-Ausschüttung modulieren (Raffaelli et al. 2004). Nach Lernprozessen bei konditionierten Tieren ist die schnelle Nachhyperpolarisation verkürzt, und die Dauer der Aktionspotentiale verlängert. BK Kanäle regulieren dort also die Frequenz und Dauer von Aktionspotentialen, sowie Ca^{2+} -abhängige Veränderungen und so letztendlich die an Lernvorgängen beteiligte, gesteigerte Erregbarkeit von hippocampalen Neuronen (Matthews et al. 2008). Darüber hinaus konnten BK Kaliumkanäle mit Regulationsmechanismen bei Depolarisationsvorgängen in Somata von Pyramidenzellen der basolateralen Amygdala in Zusammenhang gebracht (Meis et al. 1997), und elektrophysiologisch (Dopico et al. 1999), sowie immunzytochemisch (Greffrath et al. 2004) im Ncl. supraopticus charakterisiert werden, wo sie an der Nachhyperpolarisation von Neuronen beteiligt sind (Greffrath et al. 2004). Der Immunzytochemische Nachweis von $\text{BK}\alpha$ und $\text{BK}\beta_1$ im Ncl. accumbens führte zu der Theorie, dass BK Kaliumkanäle an der Entstehung von Suchtverhalten beteiligt sein könnten (Martin et al. 2004).

BK Kaliumkanäle wurden in Myozyten von cerebralen Arterien immunzytochemisch charakterisiert und mit den Veränderungen des Gefäßtonus bei Ischämie, Apoplex und Migräne in Verbindung gebracht (Wulf et al. 2008). Obwohl es hierbei in koronaren Myozyten zu einer altersabhängigen Herabsetzung der Expression von BK Kaliumkanälen kommt (Nishimaru et al. 2004a), scheint in Myozyten cerebraler Arterien sowohl die Expression, als auch die Assoziation mit β_1 -Untereinheiten von BK Kaliumkanälen keiner altersabhängigen Herabsetzung der Expression zu unterliegen, wodurch ihre protektive Wirkung lebenslang erhalten bleibt (Nishimaru et al. 2004b). Des Weiteren ist bekannt, dass BK Kanäle in Clustern in der Nähe von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen (Robitaille et al. 1993), Ryanodin-Rezeptoren (Tanaka et al. 2004) und β_2 -adrenergen Rezeptoren verteilt sind, und mit diesen interagieren können, wodurch

sie an der Regulation des physiologischen arteriellen Muskeltonus beteiligt sind (Liu et al. 2004). Pharmakologisch könnte dies in Zukunft genutzt werden, um alternative Antihypertensiva zu den derzeit genutzten L-Typ Ca^{2+} -Kanalblockern oder β -Adrenozeptorantagonisten zu entwickeln (Tanaka et al. 2004). Da reaktive Sauerstoffspezies darüber hinaus Inhibitoren von BK Kaliumkanälen sind, was im Rahmen vaskulärer Erkrankungen wie der arteriellen Hypertonie oder Apoplex von Bedeutung ist, liegt in potenten Agonisten von BK Kaliumkanälen ein weiterer pharmakologischer Ansatz (Tang et al. 2004). Bei Diabetes mellitus kommt es zum Beispiel schon früh zu einer quantitativen Reduktion von $\text{BK}\beta_1$ mRNA in Myozyten von Arteriolen, was eine zusätzliche Möglichkeit wäre den Pathomechanismus von diabetischen Angiopathien zu erklären (McGahon et al. 2007).

1.10 Zielsetzung dieser Arbeit

BK Kaliumkanäle können mit dem Pathomechanismus vieler Erkrankungen wie Epilepsie, Apoplex und arterieller Hypertonie in Verbindung gebracht werden. Morphologisch ist die immunzytochemische Charakterisierung der α -Untereinheit im Gehirn von Säugern mehrfach durchgeführt worden (Knaus et al. 1996, Chang et al. 1997, Sausbier et al. 2006). Seit der Klonierung der $\text{BK}\beta$ -Untereinheiten, wurde der immunzytochemische Nachweis von $\text{BK}\beta_1$ und $\text{BK}\beta_2$ aber lediglich in einzelnen peripheren Organen, wie Niere (Pluznick et al. 2005, Grimm et al. 2007) und Dünndarm (Du et al. 2006), und im ZNS nur im Ncl. accumbens (Martin et al. 2004) durchgeführt. Im Gegensatz zur α -Untereinheit sind die β -Untereinheiten noch weit weniger untersucht, und ihre biologische Funktion nur teilweise verstanden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Herstellung und Charakterisierung selektiver polyklonaler Antikörper gegen die Untereinheiten $\text{BK}\beta_1$ und $\text{BK}\beta_2$, und die Untersuchung ihrer Verteilung im Gehirn der Ratte mit Hilfe immunzytochemischer Methoden soll daher zu einem besseren Verständnis der biologischen Funktion von $\text{BK}\beta_1$ und $\text{BK}\beta_2$ beitragen. Darüber hinaus stellen $\text{BK}\beta$ -Untereinheiten eines der wenigen Unterscheidungsmerkmale für die Vielfalt von BK Kaliumkanälen dar. Die Kenntnis der unterschiedlichen Verteilung der einzelnen $\text{BK}\beta$ -Untereinheiten im Gehirn ist daher die Voraussetzung zur Entwicklung selektiver pharmakologischer Präparate. Aufgrund der zentralen Rolle des Hypothalamus (Dopico et al. 1999, Greffrath et al. 2004, Pitts et al. 2006, Wynne et al. 2009) und Hippocampus (Shao et al. 1999, Hu et al. 2001, Shanley et al. 2002, Raffaelli et al. 2004) in elektrophysiologischen Untersuchungen von BK Kaliumkanälen, wurden die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunzytochemischen Untersuchungen hauptsächlich auf diese beiden Areale fokussiert.

2. Material und Methoden

2.1 Allgemein verwendete Materialien

(Auflistung jeweils in alphabetischer Reihenfolge)

2.1.1 Chemikalien

2,2'-Azino-bis-[3-ethylbenthiazolin-6-Sulfonsäure] di-Ammoniumsalz (ABTS)	Roth (Karlsruhe)
3,3'-diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-Galactopyranosid (X-Gal)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat p-Toluidinsalz (BCIP)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
6 x Loading Dye	Fermentas (St. Leon-Rot)
Acrylamid 30%	Roth (Karlsruhe)
Agarose GTQ	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumnickelsulfat 3%	Fluka (Schweiz)
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Bisacrylamid 2%	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)
Complete Protease Inhibitor Cocktail, Tabletten	Roche (Mannheim)
Gel Code Blue Stain Reagent	Pierce Biotechnology (USA)
Dimethylfomamid (DMFA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dinatriummonohydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth (Karlsruhe)
Entellan	Merck (Darmstadt)
Essigsäure 100% / Eisessig	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromidlösung 1%	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiaminessigsäure (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Ethylenglycol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Formaldehyd 37%	Merck (Darmstadt)
Gelatinepulver	Merck (Darmstadt)
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glycerol	Merck (Darmstadt)
Glycin	Merck (Darmstadt)
Harnstoff	Merck Darmstadt

Imidazol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isopropanol	Braun (Melsungen)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Chrom(III)Kaliumsulfat-Dodecahydrat	Merck (Darmstadt)
Ketamin	Delta Select (Dreieich)
Kresylviolett-Acetat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Kupfersulfat (CuSO ₄)	Merck (Darmstadt)
Lauria-Bertani (LB)-Pulver	MP Biomedicals (Eschwege)
Lithiumcarbonat (Li ₂ CO ₃)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Magermilchpulver	Saliter (Obergünzburg)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Methanol (CH ₃ OH)	Roth (Karlsruhe)
Natriumacetat (CH ₃ COONa)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumborhydrid (NaBH ₄)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Boehringer (Mannheim)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt)
Natrium-Tartrat-Dihydrat	Merck (Darmstadt)
Nickel-Nitrilotriessigsäure Agarosematrix (Ni-NTA)	QIAGEN (Hilden)
NitroBlue Tetrazolium (NBT)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Normal-Goat-Serum (NGS)	PAN-Systems (Aidenbach)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Phenylhydrazin	Merck (Darmstadt)
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Roth (Karlsruhe)
Pikrinsäure	Merck (Darmstadt)
Ponceau-S	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Rattenleberextrakt	MP Biomedicals (Eschwege)
RNase freies Wasser (H ₂ O)	Roth (Karlsruhe)

Rompun [®] Injektionslösung 2%	Bayer (Leverkusen)
Salzsäure (HCl)	Merck (Darmstadt)
Saccharose	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Solvent Blue 38	Sigma-Aldrich (Steinheim)
SP-Sepharose 66% Suspension, fast flow	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Stickstoff, flüssig	Linde Gas (Berlin)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
Thimerosal	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tissue Tec	Jung (Nussloch)
Triethanolamin (TEA)	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Serva (Heidelberg)
Trishydroxymehtylaminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tween [®] 20	Roth (Karlsruhe)
Vorspüllösung Deltadex [®] 60	DeltaSelect (Dreieich)
Wasser bidest. (H ₂ O)	Milli-Q académic (s. Geräte)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Xylol	J.T. Baker (Niederlande)

2.1.2 Proteine, Nukleotide und Antikörper

Advantage Taq 2 Polymerase	Clontech (Hamburg)
Alkaline Phosphatase Anti-Rabbit IgG, made in goat (AP-GaR)	Vector Laboratories (USA)
Biotinylated Goat-anti-Rabbit IgG (B-GaR)	Vector Laboratories (USA)
Bovine Serum Albumine (BSA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Desoxynukleotidtriphosphate	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNA-Marker λ -Eco47I	Fermentas (St. Leon-Rot)
Dual Color Protein Standard	BIO-RAD (München)
Hämoglobin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Horseradish Peroxidase Streptavidin (P-SA)	Perkin Elmer (Überlingen)
Low Molecular Weight Marker (LMW 14,4 – 97,0 kDa)	Amersham Biosciences (Freiburg)
Peroxidase-Goat-anti-Rabbit (pGaR)	Vector Laboratories (USA)
Rabbit IgG	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Restriktionsendonuklease <i>XhoI</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)

T4 DNA Ligase	Promega (Mannheim)
T4 DNA Ligase	NEB (Frankfurt am Main)
Vektor pGEM-T	Promega (Mannheim)
Vektor pGEX-4T-1	Amersham Biosciences (Freiburg)
Vektor pET32b(+)	Novagen (Darmstadt)

2.1.3 Primer

(Die markierten Sequenzen stellen eine *XhoI* Restriktionsstelle dar.)

rBKbeta1ECL_F (5'-GT <u>CTCGAG</u> ACCCAGGAATCCACCTGTCA-3')	QIAGEN (Hilden)
rBKbeta1ECL_B (5'-CA <u>CTCGAG</u> GGGAGAAGAGGAGGATTTGGG-3')	QIAGEN (Hilden)
rBKbeta2ECL_F (5'-GT <u>CTCGAG</u> ACAGAAGAAGCCCAGCGTGC-3')	QIAGEN (Hilden)
rBKbeta2ECL_B (5'-CA <u>CTCGAG</u> AGAATGGAACAGCACATTGG-3')	QIAGEN (Hilden)

2.1.4 Geräte und weitere Hilfsmittel

Autoklav	Holzner (Nussloch)
Bakterien-Schüttler Certomat [®]	Braun (Melsungen)
Bakterien-Inkubator	Heraeus (Hanau)
Dialyseschlauch	Roth (Karlsruhe)
Dialyseschlauchklemmen	Roth (Karlsruhe)
Elektroelutions-System Biotrap	Schleicher & Schuell (Dassel)
Feinwaage MC 1	Sartorius (Göttingen)
Fraktionssammler FC 203B	Abimed (Langenfeld)
Homogenisator UW70	Bandelin electronic (Berlin)
Horizontalschüttler KS 250 basic	Ika Labortechnik (Staufen)
HT II ELISA Reader	Anthos (Österreich)
Inkubator Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Kryostat Frigocut 2800	Reichert-Jung (Nussloch)
Laufkammersystem Mini Protean [®] 3 Cell	BIO-RAD (München)
Laufkammersystem Protean [®] II xi Cell	BIO-RAD (München)

Magnetrührer	Ika Labortechnik (Staufen)
Mikrotiterplatten	FALCON (USA)
Milli-Q académic (Wasseraufbereitungsanlagen)	Millipore (Schwalbach)
Minishaker KMS1	Ika Labortechnik (Staufen)
Nährbodenplatten	Roth (Karlsruhe)
Nitrocellulose-Transfermembranen	BIO-RAD (München)
Objekträger und Deckgläser	Menzel-Gläser (Braunschweig)
PCR Mastercycler	Eppendorf (Hamburg)
pH-Meter 761 Calimatic	Knick/Elcolab (Niederlande)
Photometer Gilson [®] 112 UV/VIS Detector	Abimed (Langenfeld)
Pipetten und Spitzen	Eppendorf (Hamburg)
Power Pac 200 und 300	BIO-RAD (München)
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN (Hilden)
Reaktionsgefäße, FALCON [®]	Eppendorf (Hamburg), BD Biosciences (Heidelberg)
Rotationspumpe Gilson [®] Minipuls 3	Abimed (Langenfeld)
Schreiber	Geitmann Messtechnik (Menden)
Superdex 200 Säule und Matrix	GE Healthcare (München)
Trans-Blot SD Semi - Dry Transfer Cell	BIO-RAD (München)
Ultrazentrifuge J2-HS	Beckman (Krefeld)
UV-Transilluminator (312 nm)	INTAS (Göttingen)
Videodokumentationssystem P91 D	Mitsubishi (Ratingen)
Waage BP 4100	Sartorius (Göttingen)
Wärmeschrank Kelvitron [®]	Heraeus (Hanau)
Wasserbad DC10	HAAKE (Karlsruhe)
Whatman [®] Perfusionfilter	Schleicher & Schuell (Dassel)
Whatman [®] Protran [®] Blotpapier	Schleicher & Schuell (Dassel)
Whatman [®] Protran [®] Nitrocellulosemembranen	Schleicher & Schuell (Dassel)
Zentrifuge 5417 C	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Labofuge 400 R	Heraeus (Hanau)

2.1.5 Vorbemerkungen

Die verwendete cDNA wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Christian Derst, Bakteriensedimente und Fusionsproteine mit BK β ₃ und BK β ₄ Fusionsanteilen von Frau Katharina N. Seidel zur Verfügung gestellt. BK β ₃ war humanen Ursprungs, BK β ₄ aus *Rattus norvegicus*. Bei allen durchgeführten Experimenten wurden die Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis beachtet. Die verwendeten Versuchstiere wurden mit dem Ziel der Tiertötung zur Organentnahme bei der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM-Nummer: T0127/02) bestellt.

2.2 Molekularbiologie

(Bei allen verwendeten Enzymen und Kits lagen die zugehörigen Reaktionspuffer des Herstellers bei, deren Zusammensetzung vom Hersteller in der Regel nicht angegeben wurde.)

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur *in vitro* Amplifikation ausgewählter rat brain cDNA-Fragmente wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Die Primer wurden so gewählt, dass ausschließlich die für den extrazellulären Anteil der rBK β ₁- und rBK β ₂-Untereinheiten codierenden DNA-Fragmente amplifiziert wurden. Dazu ist folgender Ansatz von 50 μ l verwendet worden:

10 x Puffer	5 μ l
Desoxynukleotidtriphosphate (2,5 mM each)	10 μ l
Primer forward (100 pmol/ μ l)	1 μ l
Primer backward (100 pmol/ μ l)	1 μ l
cDNA (rat brain)	5 μ l
Advantage Taq 2 Polymerase	1 μ l
bidest. H ₂ O	27 μ l

Der PCR Mastercycler startete mit einem vorbereitenden Zyklus von 1 min bei 94 °C, wodurch die DNA Doppelstränge denaturiert und somit in Einzelstränge zerlegt wurden. Danach folgte ein dreiteiliger Zyklus, welcher 35-mal wiederholt wurde:

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Kommentar
1.	94	30	Denaturierung
2.	65	30	Anlagerung der Primer
3.	68	180	Elongation

Anschließend folgte ein letzter Zyklus von 3 min bei 68 °C zur vollständigen Elongation der PCR Produkte.

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Um die Nukleinsäurestränge ihrer Größe nach im elektrischen Feld aufzutrennen, kam die Agarose-Gelelektrophorese zum Einsatz. Es wurden 1% Agarosegele in 1 x TAE (40 mM Tris, 20 mM Acetat, 1 mM Na₂ EDTA) verwendet. Vor Gießen des Gels wurde 1 µl 1% Ethidiumbromidlösung hinzugegeben. Die Elektrophorese lief 40 min bei 80 V. Zur besseren Zuordnung der Molekülgrößen wurde der DNA-Marker *λ-Eco47I* mit aufgetragen, und die Proben vorher mit jeweils 2 µl 6 x Loading Dye (10 mM Tris-HCl, 0,03% Bromophenolblau, 0,03% Xylencyanol FF, 60% Glycerol, 60 mM EDTA) versehen.

2.2.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosestücken

Durch Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.2.2) wurden mit Restriktionsenzymen verdaute DNA-Fragmente oder PCR-Produkte aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten, und die DNA anschließend mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aus dem Gel extrahiert. Dazu wurde das jeweilige Gelfragment gewogen und vollständig in 3 µl QG Puffer/mg Gel bei 50 °C gelöst. Danach wurde 1 µl Isopropanol/mg Gel hinzugegeben und die Lösung anschließend in einer Gelextraktionssäule 1 min bei 17.900 x g zentrifugiert, wobei der Durchlauf verworfen wurde. Nach Zugabe von 500 µl Puffer QG und einem weiteren Zentrifugationsschritt, wurde 750 µl Puffer PE in jede Gelextraktionssäule gegeben und zweimalig unter Verwerfen des Durchlaufs zentrifugiert. Nun wurde die Säule in einem sauberen Auffanggefäß platziert und die DNA durch Zugabe von 50 µl RNase freiem H₂O und 1 min Zentrifugieren eluiert. Zum Schluss wurde die extrahierte DNA mit Hilfe einer Vakuumkonzentrationseinheit aufkonzentriert.

2.2.4 Klonieren von DNA-Fragmenten in pGEM-T

Um die amplifizierte DNA in den Vektor pGEM-T zu klonieren wurde folgende Ligationreaktion angesetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert:

2 x Rapid Ligation Buffer	5 µl
pGEM-T Vektor (50mg)	1 µl
gereinigtes PCR-Produkt	3 µl
T4 DNA Ligase (Promega, 3 Weiss units/µl)	1 µl

2.2.5 Transformation

Für die Transformation wurde der Ligationsansatz zu 100 µl kompetenten *E. coli* XL-1 Blue Bakterienzellen gegeben, 1 h auf Eis inkubiert, danach auf LB-Ampicillin Nährbodenplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Bei der Transformation des pGEM-T-Vektors wurden zusätzlich 20 µl 2% X-Gal gelöst in DMFA und 20 µl 100 mM IPTG hinzupipettiert. Dadurch wurde die Expression des Enzyms β-Galactosidase aus dem Gen lacZ induziert. Das Enzym kann über eine Farbreaktion mit X-Gal nachgewiesen werden, wodurch eine Abgrenzung von Klonen mit Insert (keine Farbreaktion) gegenüber Klonen ohne Insert (blaue Farbreaktion) möglich wurde. Bei den Vektoren pGEX-4T-1 und pET32b(+) ist diese farbliche Nachweismethode nicht möglich.

2.2.6 Präparation von Plasmid-DNA

Die auf den Platten über Nacht bei 37 °C gewachsenen Kolonien wurden am nächsten Tag steril gepickt, in jeweils 1,5 ml LBA Flüssigmedium (25 g/l LB Pulver in bidest. H₂O, autoklaviert, 100 µg/ml Ampicillin) überführt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Schließlich wurden die Proben 5 min bei 5000 x g pelletiert und der Überstand verworfen. Die Plasmid-DNA wurde aus den Bakterienpellets mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit isoliert. Hierzu wurden die Pellets in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und anschließend zur alkalischen Lyse 250 µl NaOH und SDS-haltiger Puffer P2 hinzugefügt. Zur Lyse wurden die Suspensionen vorsichtig vier- bis sechsmal invertiert. Anschließend wurden 350 µl Puffer N3 hinzugegeben, weitere vier- bis sechsmal invertiert und 10 min bei 17.900 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden in eine Plasmid-Miniprep Säule gegeben, weitere 60 s zentrifugiert und der Durchlauf schließlich verworfen. Jetzt wurden 500 µl Puffer PB in die Säulen gegeben und ein weiteres mal 1 min lang zentrifugiert, wobei der Durchlauf erneut verworfen wurde, und wonach die Säulen durch Zugabe von 750 µl Puffer PE und zweimaligem Zentrifugieren à 1 min gewaschen wurden. Letztendlich wurde die DNA durch Zugabe von 75 µl RNase freiem H₂O und anschließendem Zentrifugieren eluiert und in einem sauberen Gefäß aufgefangen.

2.2.7 Restriktionsanalyse

Durch Verdau mit der Restriktionsendonuklease *XhoI* (schneidet die palindrome Sequenz CTCGAG) und anschließende Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.2.2) wurde die Klonierung überprüft. Proben, welche ein Insert aufwiesen wurden zum Sequenzieren weggeschickt (JenaGen, Jena). Hierbei musste beachtet werden, dass die Ligation nach Verdau mit nur einer Restriktionsendonuklease (in diesem Fall *XhoI*) zur Folge hat, dass das Insert in beiden Orientierungen in den Vektor kloniert werden kann.

2.2.8 Umklonierung in die Expressionsvektoren pGEX-4T-1 und pET32b(+)

Zum Umklonieren der DNA in die Expressionsvektoren pGEX-4T-1 und pET32b(+) wurden beide Vektoren, sowie rBK β_1 -pGEM-T und rBK β_2 -pGEM-T jeweils 90 min bei Raumtemperatur mit *XhoI* inkubiert. So wurde die Insert-DNA aus ihrem Vektor herausgeschnitten, und eine geeignete Klonierungsstelle im jeweiligen Expressionsvektor geschaffen. Damit sich diese *XhoI*-Stelle bei der anschließenden Ligation nicht wieder schloss, wurde zu beiden Vektoren 1 μ l CIAP (1 u/ μ l) zur Dephosphorylierung dazugegeben, und weitere 15 min inkubiert. Danach erfolgte erneut eine Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.2.2) mit anschließender Gelextraktion (Kap. 2.2.3). Schließlich wurde folgende Ligation über Nacht bei Raumtemperatur angesetzt:

10 x Ligase Puffer	1 μ l
Vektor DNA pGEX4T-1 / pET32b(+)	2 μ l
Insert DNA rBK β_1 / rBK β_2	6 μ l
T4 DNA Ligase (NEB, 400 u/ μ l)	1 μ l

Abschließend erfolgte wieder eine Transformation (Kap. 2.2.5) mit darauf folgender DNA-Präparation (Kap. 2.2.6) und Restriktionsanalyse (Kap. 2.2.7), sowie erneutes Sequenzieren (JenaGen, Jena) zur Überprüfung der Orientierung des Inserts.

2.3 Proteinbiochemie

2.3.1 Retransformation und Proteinexpression

Zunächst wurde der entsprechende Expressionsvektor in BL21DE3 *E. coli* Bakterien retransformiert (Kap. 2.2.5), die die extrazelluläre Schleife von rBK β_1 bzw. rBK β_2 als Fusionsprotein mit GST (Glutathion-S-Transferase aus pGEX4T-1) oder TR6H (Thioredoxin mit HisTag-Anteil aus pET32b(+)) exprimieren. Die Kulturen wurden steril gepickt und in 50 ml

LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin gegeben, über Nacht bei 37 °C geschüttelt und dann in 500 ml LBA-Medium überführt. Die Medien wurden ca. 1 h (bis zu einer Optischen Dichte von 0,4-0,6 bei 600 nm) geschüttelt und anschließend 250 µl (in die pGEX4T-1-Kulturen), bzw. 1 ml (in die pET32b(+)-Kulturen) 500 mM IPTG zur Induktion der mRNA Transkription und Proteinexpression hinzupipettiert, wonach die Kulturen weitere 3h schüttelten. Schließlich wurden die Kulturen in Eiswasser abgekühlt, 5 min bei 10.000 x g pelletiert und der Überstand dekantiert. Die Pellets wurden nun in 1 x Phosphate Buffered Saline (PBS, Stamm 10 x PBS: 1,4 M NaCl, 0,03 M KCl, 0,1 M NaH₂PO₄ x bidest. H₂O, 0,09 M NaOH, pH 6,8) resuspendiert und nochmals 5 min bei 10.000 x g zentrifugiert, wobei der Überstand erneut dekantiert wurde. Die Pellets wurden bis zur Proteinaufreinigung bei -20 °C eingefroren. Die Proteinexpression wurde mittels SDS-PAGE (Kap. 2.3.2) überprüft.

2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld kam die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970) zum Einsatz. Es wurden 6 x 9 cm große und 1 mm dicke 12% Acrylamid / 0,3% Bisacrylamid Trenngele, und 3,75% Sammelgele in folgender Zusammensetzung für jeweils ein Gel verwendet:

	Trenngel	Sammelgel
bidest. H ₂ O	1,0 ml	1150 µl
1,5 M Tris-HCl pH 8,8 + 0,4% SDS	1,25 ml	-----
0,5 M Tris-HCl pH 6,8 + 0,4% SDS	-----	500 µl
Acrylamid 30%	2,0 ml	250 µl
Bisacrylamid 2%	0,75 ml	100 µl
10% APS	50 µl	20 µl
TEMED	6,25 µl	2,6 µl

Nach resuspendieren der Proben in Laemmli-Puffer (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS, 5% Mercaptoethanol, 10% Glycerol, 0,005% Bromphenolblau, pH 6,8) und 3 min Denaturieren bei 96 °C, kühlten die Proben ab und wurden in das mit Taschen versetzte, auspolymerisierte Sammelgel pipettiert, welches über dem polymerisierten Trenngel gegossen wurde.

Die SDS-PAGE lief nach Beladen der Sammelgele die ersten 30 min bei 100 V, und danach mindestens 60 min bei 150 V (Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1% SDS) in dem Laufkammersystem Mini Protean[®] 3. Anschließend wurden die Gele entnommen und 3 x 10 min in bidest. H₂O gewaschen um das SDS herauszulösen und danach in Gel Code Blue Stain Reagent (basierend auf Coomassie-Brillant-Blau) zum Färben gegeben. Das Gel ist ausreichend angefärbt, wenn alle Banden eines Proteinmarkers eindeutig zu sehen sind. Schließlich wurde der Vorgang durch Waschen des Gels in bidest. H₂O abgebrochen. Zur richtigen Zuordnung der Proteingrößen wurde stets ein Low Molecular Weight (LMW 14,4 – 97,0 kDa) Proteinmarker mit aufgetragen.

2.3.3 Denaturierende Thioredoxin Fusionsproteinaufreinigung über Ni-NTA Agarose

Das Prinzip der Aufreinigung basiert auf der Bindung des am Thioredoxin befindlichen HisTag-Anteils des Fusionsproteins an eine Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) Agarosematrix, aus der es nach der Bindung pH-abhängig oder mit Imidazol eluiert werden kann. Jedes der *E. coli* TR6H-Pellets wurde in 20 ml Lysispuffer (8 M Harnstoff, pH 8,0; 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris-Cl) resuspendiert und danach pro ml Suspension 10 µl 100 mM PMSF-Stammlösung hinzugefügt. Anschließend wurde die Suspension 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt und dann 5 min bei 10.000 x g zentrifugiert, wonach der Überstand vorsichtig abpipettiert und aufgehoben wurde. Das entstandene Pellet wurde in 5 ml Waschpuffer (8 M Harnstoff, pH 6,3; 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris-HCl) gelöst. Der abgenommene Überstand wurde dann in die Ni-NTA-Säule gegeben und der Durchlauf aufgefangen. Schließlich wurde die Säule mit 40 ml Waschpuffer gewaschen und danach mit Elutionspuffer (8 M Harnstoff, pH 4,5; 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris-HCl) eluiert, wobei 2 ml Fraktionen aufgefangen wurden. Proben von Zwischenschritten der Aufreinigung wurden entnommen, um diese anschließend mit Hilfe der SDS-PAGE (Kap. 2.3.2) zu überprüfen. So wurde kontrolliert, ob der Hauptanteil des Proteins nicht im Pellet verblieben ist, sondern mit dem Überstand abgenommen und in die Säule gegeben wurde. Die Überprüfung des Durchlaufs und des Waschganges sollte sicherstellen, dass auch hier vor der Elution kein Protein von der Ni-NTA Agarose gelöst wurde.

2.3.4 Präparative Aufreinigung der GST-Fusionsproteine und Elektroelution

Da eine konventionelle Aufreinigung der GST-Fusionsproteine mittels Glutathion Sepharose 4B aufgrund der Unlöslichkeit der Fusionsproteine nicht durchgeführt werden konnte, wurden die GST-Fusionsproteine durch SDS-PAGE (Kap. 2.3.2) aufgereinigt und durch Elektroelution aus dem entsprechenden Gelfragment isoliert. Hierzu wurden 16 x 16 cm große und 3 mm dicke,

präparative SDS-Polyacrylamidgele mit 10% Acrylamid / 0,3% Bisacrylamid im Trenngel, und 4% Acrylamid / 0,1% Bisacrylamid im Sammelgel mit folgender Zusammensetzung für jeweils 2 Gele verwendet:

	Trenngele	Sammelgele
bidest. H ₂ O	45,9 ml	5,6 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8 + 0,4% SDS	43,8 ml	-----
0,5 M Tris-HCl pH 6,8 + 0,4% SDS	-----	2,5 ml
Acrylamid 30%	58,0 ml	1,35 ml
Bisacrylamid 2%	26,2 ml	0,5 ml
10% APS	875 µl	50 µl
TEMED	87,5 µl	10 µl

Die Elektrophorese lief über Nacht bei 30 mA in dem Laufkammersystem Protean[®] II xi bis die Farbfront den unteren Rand des Gels erreichte (ca. 18 h). Daraufhin wurden die Gele gefärbt (Coomassie), die aufzureinigende Proteinbande herausgeschnitten und anschließend im Mörser zu kleinen Gelstücken zerkleinert, mit denen das Elektroelutions-System Biotrap über Nacht beladen wurde. Das Protein wurde nun elektrophoretisch aus dem zerkleinerten Gel in Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin; 0,025% SDS) bei 100 V eluiert, und zwischen zwei dünnen Membranen (Eingangsmembran durchlässig, Begrenzungsmembran undurchlässig) gesammelt. Am nächsten Tag wurde das eluierte Protein entnommen und im Dialyseschlauch 6 h gegen PBS dialysiert. Schließlich wurde die Aufreinigung mittels SDS-PAGE (Kap. 2.3.2) überprüft.

2.3.5 Bicinchoninsäure-Reaktion (BCA)

Die Bicinchoninsäure-Reaktion (BCA) nach SMITH et al. (1985) wurde verwendet, um Proteinkonzentrationen photometrisch zu bestimmen. Jeweils 400 µl BCA Reagenz (10 ml Lösung A zu 200 µl Lösung B; Lösung A: 1% Bicinchoninsäure Dinatrium, 1,7% Na₂CO₃, 0,16% Natrium-Tartrat-Dihydrat, 0,4% NaOH, 0,95% NaHCO₃ in bidest. H₂O, pH 11,25; Lösung B: 4% CuSO₄ in bidest. H₂O) wurden mit 40 µl PBS, dem als Standard dienenden und in PBS verdünnten BSA (BSA-Stammlösung 1 mg/ml in PBS) in den Konzentrationen 50, 100 und 200 µg/ml und angemessenen Probenverdünnungen (zwischen 1:10 und 1:100) in einer Mikrotiterplatte versetzt und 30 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die

photometrische Messung bei 550 nm im HT II ELISA Reader, wobei stets Doppelwerte bestimmt wurden.

2.3.6 Immunisierung von Kaninchen

Nach erfolgreicher Proteinaufreinigung und Konzentrationsbestimmung wurde jeweils 1 mg der beiden GST-Fusionsproteine rBK β ₁ und rBK β ₂ zur Immunisierung von jeweils 2 Kaninchen (Tier 1 und Tier 2) weggeschickt (Durchführung: Pineda Antikörper-Service, Berlin). Tier 1 wurde jeweils mit 80 μ g, Tier 2 mit 160 μ g Antigen immunisiert, wobei jedes Tier zusätzlich mindestens zweimal mit der entsprechenden Antigenmenge geboostert wurde. Die TR6H-Fusionsproteine wurden bei -20 °C eingefroren und blieben der späteren Aufreinigung und Charakterisierung der Antikörper (Kap. 2.4 und 2.5) vorbehalten.

2.4 Antikörperaufreinigung

2.4.1 Dekomplementierung der Antiseren und Entfernung unspezifischer Komponenten

Die Endabnahmen der anti-rBK β ₁- und anti-rBK β ₂-Kaninchenserum (ca. 100 ml Rohserum pro Tier) wurden zunächst 1 h bei 56 °C im Wasserbad dekomplementiert, um das Komplementsystem der Seren auszuschalten. Der Großteil wurde dann bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden jeweils 2 ml Serum 30 min bei Raumtemperatur mit 50 mg/ml Rattenleberextrakt präabsorbiert, um unspezifische, gegen Extrazellulärmatrix und Kollagenfasern gerichtete Antikörper zu binden, und diese anschließend über mehrere Zentrifugationsschritte bei 5000 x g vom Serum zu trennen.

2.4.2 IgM-Entfernung mittels Gelfiltration über Superdex 200

Zur Trennung der IgG von den IgM wurde das jeweilige Serum sterilfiltriert und auf eine vorher mit entgastem PBS gewaschene Superdex 200 Säule aufgetragen, in dessen Matrix eine Größenauftrennung der Serumproteine erfolgte.

Die Gelfiltration lief dann 5 h bei 4 °C mit folgenden Geräteeinstellungen:

Rotationspumpe	0,4 ml/min
Fraktionen (2 ml)	5,0 min/tube
Schreiber	1,0 mm/min
Photometer	280 nm

Nach Auswertung der aufgezeichneten Absorption bei 280nm und Kontrolle des IgG-Titers mittels ELISA (Kap. 2.5.1) wurden ausgewählte IgG Fraktionen gepoolt.

2.4.3 Herstellung von Bakteriensedimenten zur Präabsorption

Über Nacht wurden in LBA-Medium Bakterienkulturen mit dem Expressionsvektor pGEX-4T-1 bei 37 °C geschüttelt. Die Expression des Proteins Gluthation-S-Transferase jeweils ohne und mit rBK β ₁ und rBK β ₂ Fusionsanteil wurde dann mit 0,2 mM IPTG induziert und die Kultur nach weiteren 3 h bei 37 °C auf dem Bakterienrüttler, bei 4000 x g 15 min lang pelletiert. Das Pellet wurde anschließend in PBS gelöst, und in zwei gleiche Anteile getrennt, von denen ein Teil 60 min bei 121 °C autoklaviert, und der zweite Teil 60 min in 0,5% Formaldehyd (270 μ l 37% Formaldehyd zu 20 ml Pellet-PBS) fixiert und bei 37 °C geschüttelt wurde. Schließlich wurden beide Anteile wieder zusammengeführt, dreimal in PBS gewaschen, pelletiert und bei -20 °C eingefroren.

2.4.4 Präabsorption der Seren zur Entfernung der Kreuzreaktivität gegen das Trägerprotein und paraloge BK β -Untereinheiten

Die Kreuzreaktivität gegen das Trägerprotein, sowie gegen paraloge BK β Proteine wurde zunächst durch ELISA (Kap. 2.5.1) detektiert. Zur Entfernung GST-spezifischer Antikörper wurde ein GST-Bakteriensediment (ohne BK β Fusionsanteil, Kap. 2.4.3) im Serum resuspendiert, 45 min bei Raumtemperatur geschüttelt, anschließend 5 min bei 10.000 x g zentrifugiert und das Pellet verworfen. Dieser Vorgang wurde nacheinander mit GST-Bakteriensedimenten, welche sämtliche paraloge BK β Fusionsanteile enthielten (Kap. 2.4.3), wiederholt. So wurde nacheinander die Kreuzreaktivität gegen die paraloge BK β Fusionsanteile, sowie gegen das Trägerprotein GST minimiert.

2.4.5 Affinitätsreinigung der Antikörper über Nitrocellulose-Membranen

Zur Affinitätsreinigung wurden 6 x 8 cm große Nitrocellulosemembranen (Whatman[®] Protran[®]) verwendet. Diese wurden über Nacht bei Raumtemperatur in PBS mit 5 μ g/ml TR6H-Fusionsprotein inkubiert, anschließend dreimal in PBS gewaschen und die freien Proteinbindungsstellen dann 1 h mit 5% NGS in PBS verdünnt geblockt. Die Membranen wurden nun 5 h mit dem in 5% NGS verdünnten, kreuzreaktivitätsfreiem Serum inkubiert und der Überstand verworfen. Danach wurden die gebundenen Antikörper 30 min mit Elutionspuffer (200 mM Glycin, 150 mM NaCl, 1 mg/ml BSA, pH 2,5) eluiert, und schließlich die eluierten

Antikörper über Nacht gegen 20 mM Phosphatpuffer (12,1 g NaH_2PO_4 , 1,745 g Na_2HPO_4 in bidest. H_2O , pH 6,0) dialysiert.

2.4.6 Einengung von Antikörpern mit einer SP-Sepharose Säule

Hierzu wurde die Spitze einer Pasteurpipette etwas gekürzt und mit einem kleinen Quarzstein abgedichtet. Dann wurde die Säule mit etwa 5 mm feinem Quarzsand gefüllt und anschließend mit SP-Sepharose (4 ml 66% Suspension, fast flow) gefüllt. Über Nacht wurde die Säule mit 20 mM Phosphatpuffer gewaschen, und am nächsten Tag mit Antikörperlösung beladen. Die Lösung lief mit Hilfe einer Pumpvorrichtung mit 7 ml/h über die Säule, wonach die Säule 1 h mit entgastem 20 mM Phosphatpuffer gewaschen und die Antikörper mit Carbonatpuffer (200 mM NaHCO_3 , pH 9,0) eluiert wurden. Die aufgefangenen Fraktionen wurden mittels ELISA (Kap. 2.5.1) getestet, aktive Fraktionen gepoolt und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

2.5 Antikörpercharakterisierung

2.5.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Indirekter ELISA: Zur Detektion spezifischer Antikörper und Quantifizierung ihrer Affinität zum Antigen, sowie zum Nachweis eventueller Kreuzreaktivitäten kam der indirekte ELISA zum Einsatz. Eine 96-Well Mikrotiterplatte wurde mit dem jeweiligen Antigen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), gelöst in 50 mM Beschichtungspuffer (Carbonatpuffer: 2,5 ml Na_2CO_3 + 47,5 ml bidest. H_2O , 1,6 ml 1 M HCl, pH 9,6), über Nacht bei Raumtemperatur beschichtet. Als Standard wurde Kaninchen IgG in den Konzentrationen 1, 5 und 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in BSA (BSA Stammlösung 1 mg/ml) und anschließend 1:200 in Beschichtungspuffer verdünnt verwendet. Als Leerwert diente BSA 1:200 in Beschichtungspuffer verdünnt. Am nächsten Tag wurden die beschichteten Wells der Mikrotiterplatte geleert, mit 150 μl Nachbeschichtungslösung (1 mg/ml Hämoglobin in ELISA-Waschpuffer) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal mit ELISA-Waschpuffer (50 mM NaH_2PO_4 x bidest. H_2O , 150 mM NaCl, 0,05% Tween[®] 20, 3 M Natriumazid NaN_3 ad 1 l bidest. H_2O , pH 7,2 mit 10 M NaOH) gewaschen. Dann wurde jeweils 100 μl Erstantikörper anti-rBK β_1 GST, bzw. anti-rBK β_2 GST, welcher zuvor in Nachbeschichtungslösung zwischen 1:1000 und 1:100.000 verdünnt wurde hinzugegeben und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Standardreihe wurde mit jeweils 100 μl PBS aufgefüllt. Nach Ablauf der Zeit wurde dreimal mit jeweils 200 μl PBS gespült und 100 μl Zweitantikörperlösung (pGaR 1:1000 in 1 mg/ml PBS-Hb) in jedes Well pipettiert und eine weitere Stunde inkubiert. Der Zweitantikörper bindet spezifisch Antigen-Erstantikörper

Komplexe, weshalb anschließend erneut dreimalig mit 200 µl PBS pro Well gespült wurde, um nicht gebundenen Zweitantikörper zu entfernen. Es wurden dann 100 µl Inkubationslösung (9 ml Inkubationspuffer: 50 mM NaH₂PO₄ x bidest. H₂O, 100 mM CH₃COONa x 3H₂O ad 1 l bidest. H₂O, pH 4,2; 1ml ABTS-Stammlösung: 100 mg ABTS ad 10 ml Inkubationspuffer; 1 µl 30% H₂O₂) in jedes Well pipettiert. Die am Zweitantikörper gebundene Peroxidase ist in der Lage ein in der Inkubationslösung vorhandenes Substrat unter Farbumschlag enzymatisch umzusetzen, wobei die Farbintensität in Korrelation zur Antigenkonzentration steht. Nach 5 min Entwicklungszeit wurde die Farbreaktion mit Stopplösung (15 mM NaN₃ in PBS) abgebrochen und die Extinktion bei 405 nm im HT II ELISA Reader sofort photometrisch gemessen. Es wurden stets Doppelwerte bestimmt.

Kompetitiver ELISA: Beim kompetitiven ELISA wurde der verdünnte Erstantikörper vor dem eigentlichen ELISA über Nacht mit bestimmten Mengen des entsprechenden Antigens (10⁻³ – 50 µg/ml) vorinkubiert. Zeigte der Antikörper eine Affinität zu diesem Protein, so wurde er gebunden und stand für die nachfolgende spezifische Bindung nicht mehr zur Verfügung.

2.5.2 Herstellung von Membranfraktionen

Um die gesuchten Kanalproteine später immunologisch im Western Blot (Kap. 2.5.3) nachweisen zu können, wurden aus Rattenorganen Membranfraktionen hergestellt. Zunächst wurde das Tier gewogen, dann betäubt (45% Ketamin, 17,5% Rompun[®], 37,5% isotone (0,9%) NaCl-Lösung; Dosierung: 0,32 ml/100g Körpergewicht) und anschließend dekapitiert. Die benötigten Organe wurden nun herauspräpariert, in flüssigem Stickstoff gemörsert und in Homogenisierungspuffer (10 mM TEA, 250 mM Saccharose, 1 Tablette Complete Protease Inhibitor Cocktail) resuspendiert. Danach wurden die Proben im Ultraschall (50-60 Hz) homogenisiert und 10 min bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden entnommen, mit Homogenisierungspuffer austariert und 1 h bei 200.000 x g und 4 °C ultrazentrifugiert. Die Pellets wurden nun in Homogenisierungspuffer durch Ultraschallbehandlung (50-60 Hz) resuspendiert und die Proteinkonzentrationen mittels BCA-Test (Kap. 2.3.5) bestimmt.

2.5.3 Western-Blot und Immundetektion

Beim Western-Blot nach BURNETTE (1981) wurden die Proteine von einem Elektrophoresegel auf eine Nitrocellulose Trägermembran (Whatman[®] Protran[®]) übertragen. Dazu wurde zunächst eine SDS-PAGE (Kap. 2.3.2) mit den Fusionsproteinen (Kap. 2.3.3 und 2.3.4) oder

Membranfraktionen (Kap. 2.5.2) durchgeführt. Das ungefärbte SDS-PAGE-Gel wurde dann zwischen Blotpapier (Whatman[®] Protran[®]) und einer Nitrocellulosemembran in die entsprechende Apparatur (Kap. 2.1.4) eingelegt und alles mit Semidryblottpuffer (20 mM Tris, 25 mM Glycin, 10% SDS in 20% Methanol) überschichtet. Anschließend wurde der Proteinanteil des Gels bei 200 mA 30 min auf die Nitrocellulosemembran geblottet, die Nitrocellulosemembran entnommen, in Tris Buffered Saline (TBS, 20 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, pH 7,3) gewaschen und kurz in Ponceau-Rot (2,6 mM Ponceau-S, 184 mM Trichloressigsäure in bidest. H₂O) zur Visualisierung der Proteinbanden gegeben. Danach wurden die freien Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran 30 min in Blockmilch (5% Magermilchpulver in TBS) geblockt. Jetzt wurde der 1. Antikörper anti-rBKβ₁, bzw. anti-rBKβ₂ in der Verdünnung 1:1000 für Western Blot Analysen mit Rattenorganhomogenisat (Kap. 2.5.2) und 1:5000 bis 1:10.000 für Western Blot Analysen mit den Fusionsproteinen hinzupipettiert und der Blot über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Blot 3 x 10 min in TBS gewaschen und danach der 2. Antikörper AP-GaR (1:10.000 in Blockmilch verdünnt) hinzugegeben und der Blot 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde erneut 3 x 10 min in TBS und dann kurz in AP-Puffer (100 mM TrisHCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,5) gespült. Schließlich wurde der Blot in 50 µl NBT (75 mg in 700 µl DMFA + 300 µl bidest. H₂O) und 37,5 µl BCIP (50 mg 1 ml DMFA) in 10 ml AP-Puffer ca. 30 min lang, unter Sichtkontrolle, entwickelt. War der Blot ausreichend stark entwickelt, wurde die Reaktion mit bidest. H₂O abgebrochen.

Blockade: Für Blockadeversuche im Western Blot wurde der in Blockmilch verdünnte Erstantikörper über Nacht bei 4 °C mit 20 µg/ml Thioredoxin-Fusionsprotein vorinkubiert.

2.6 Immunzytochemie

2.6.1 Perfusions-Fixierung von Gewebe

Die Fixierung erfolgte über das Gefäßsystem nach SOMOGYI UND TAGAKI (1982) in modifizierter Weise nach GEISLER (2002). Das Tier wurde betäubt (Kap. 2.5.2) und über einer Wanne auf ein Korkbrett gespannt. Anschließend wurden Abdomen und Thorax eröffnet, die Herzspitze aufgeschnitten und die Perfusionskanüle über den linken Ventrikel in die Aorta ascendens vorgeschoben und festgeklemmt. Unmittelbar nach Beginn der Perfusion wurde die Vena cava inferior direkt unter dem rechten Herzen abgeschnitten. Vor ihrem Gebrauch wurden alle Lösungen filtriert. Zuerst wurde 10 sec lang bei 200 torr mit Vorspüllösung Deltadex[®] 60

perfundiert und danach bei gleichem Druck zu der Perfusionslösung (80 g Paraformaldehyd in 1,5 l bidest. H₂O bei 60 °C mit 10 M NaOH gelöst, nach Abkühlen 27,6 g NaH₂PO₄ x 1 H₂O, 4 ml 25% Glutaraldehyd, 6 g Pikrinsäure mit 0,5 ml bidest. H₂O/g, auf 2 l mit bidest. H₂O aufgefüllt, pH 7,4) gewechselt. Nach 5 min wurde der Druck auf 20 torr reduziert und weitere 20 min perfundiert, wonach der Druck erneut angehoben, und die Perfusion für weitere 10 min mit Nachfixierungslösung (69 g NaH₂PO₄ x 1 H₂O, 250 g Saccharose, gelöst in 4,8 l bidest. H₂O, pH Einstellung auf 7,4 und Auffüllen auf 5 l bidest. H₂O) fortgeführt wurde. Das Tier wurde schließlich dekapitiert und das Gehirn nach vorsichtiger Eröffnung des Schädels entnommen. Die entnommenen Gehirne wurden von Frau Heike Heilmann und Frau Ina Wolter freundlicherweise zu schnittfertigen Blöckchen aufgearbeitet.

2.6.2 Schneiden

Für die lichtmikroskopische Immunzytochemie wurden mit Hilfe eines Kryostaten Schnitte von 25 µm Dicke angefertigt. Das Gewebe war mit Tissue Tec auf dem Stativ fixiert und wurde bei einer Temperaturdifferenz von 2 °C zwischen Kammer (-24 °C) und Objekt (-22 °C) geschnitten. Die Schnitte wurden vorsichtig aus dem Kryostaten entfernt und in PBS übertragen. Die anschließende Aufarbeitung der Schnitte erfolgte meist noch am selben Tag. Alternativ wurden Schnitte in Anti Freeze Solution (40% 0,1 M Phosphatpuffer NaH₂PO₄ in bidest. H₂O, 30% Saccharose, 30% Ethylenglycol, pH 7,4) gegeben und bei -20 °C gelagert.

2.6.3 Beschichtung von Objektträgern

Gereinigte und staubfreie Objektträger wurden 3 min lang in eine Gelatinelösung (15 g Gelatinepulver, 1,76 g Chrom(III)Kaliumsulfat-Dodecahydrat ad 630 ml bidest. H₂O bei 70 °C gelöst, 300 ml Ethanol, 70 ml Eisessig, filtriert) getaucht.

2.6.4 Kontrollfärbung nach Klüver und Barrera

Als Kontrollfärbung wurde die kombinierte Zell- und Faserfärbung nach KLÜVER UND BARRERA (1953) in modifizierter Weise nach GEISLER (2002) gewählt. Die Gewebeschnitte wurden aus dem PBS für 24 h in 70% Ethanol, und danach über Nacht bei 56 °C in 0,1% Luxol Fast Blue (0,1 g Solvent Blue 38, 100 ml 96% Ethanol, 0,5 ml 10% Ethansäure) gegeben. Anschließend wurden die Schnitte jeweils 3 min in bidest. H₂O, PBS und 0,05 % Lithiumcarbonatlösung (0,5 g Li₂CO₃, 1 l bidest. H₂O) gewaschen. Sie wurden dann für weitere 3 min in 70% Ethanol gegeben und zweimal je 5 min in PBS gewaschen.

In einem PBS Tropfen wurden die Schnitte auf mit Gelatine beschichtete Objektträger (Kap. 2.6.3) aufgezogen und die Flüssigkeit, unter kontinuierlichem Glätten des Schnittes abgesaugt. Die Schnitte wurden höchstens 30 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die aufgezogenen Schnitte wurden nun 2 min in bidest. H₂O, 30 min in 0,2% Kresylviolett (1,0 g Kresylviolett-Acetat, 500 ml Acetatpuffer, pH 4,0, filtriert; Acetatpuffer: 1,2 g Ethansäure gelöst in 1000 ml bidest. H₂O, pH 4,0) und wieder 2 min in bidest. H₂O gegeben. Anschließend wurden die Schnitte dehydriert und eingedeckt (Kap. 2.6.7).

2.6.5 Färbung mit P-Streptavidin DAB/Ni

Die Schnitte wurden zunächst 15 min bei Raumtemperatur gewaschen, danach 15 min in 1% Natriumborhydrid (1 g NaBH₄, in PBS) gegeben und anschließend 3 x 5 min in PBS gewaschen. Um das Gewebe zu permeabilisieren und die endogene Peroxidase zu zerstören wurden die Schnitte 30 min mit Triton X-100 und Phenylhydrazin (9,7 ml 10% NGS in PBS, 0,3 ml 10% Triton X-100 in bidest. H₂O, 5 µl Phenylhydrazin) behandelt. Danach wurde der Erstantikörper in Verdünnungen zwischen 1:1000 und 1:10.000 (verdünnt in 10% NGS-TAT: 9,7 ml 10% NGS, 0,3 ml 10% Triton X-100, 100 µl 10% NaN₃ in bidest. H₂O, 100 µl 1% Thimerosal in bidest. H₂O) für 36 h bei 4 °C auf die Schnitte gegeben. Nach drei Waschgängen von 2 x 15 min und 1 x 30 min in PBS und 60 min Vorinkubation in PBS-A (20 mg/ml BSA in PBS) wurde Zweitantikörperlösung (5 µl B-GaR, 0,3 ml 10% Triton X-100, 100 µl 10% NaN₃ zu 9,6 ml PBS-A) für 24 h bei 4 °C auf die Schnitte gegeben. Nach erneut 3 Waschgängen von 2 x 15 min und 1 x 30 min in PBS und 60 min Vorinkubation in PBS-A, wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C in 1:20.000 P-SA Lösung (2,5 µl 10% P-SA in PBS-A zu 5 ml PBS) gegeben, dessen Avidin-Anteil mit dem Biotin-Rest des Zweitantikörpers einen Komplex bildet. Das ungebundene P-SA wurde in drei Waschgängen (10, 20 und 30 min) mit PBS herausgewaschen und die Schnitte 15 min lang in eine Präinkubationslösung (1 ml 500 mM Tris [in bidest. H₂O, pH 7,6] gelöst in 8,8 ml bidest. H₂O, 100 µl 1 M Imidazol [in bidest. H₂O, pH 7,6], 100 µl DAB 50 mg/ml in bidest. H₂O) gegeben. Unmittelbar danach wurde die an das Gewebe gebundene Peroxidase mit Inkubationslösung (0,5 ml Präinkubationslösung, 50 µl 3% Ammoniumnickelsulfat in bidest. H₂O, 25 µl 0,03% H₂O₂ in bidest. H₂O) 15 min lang visualisiert und die Reaktion dann durch Ersetzen der Lösung mit 1000 µl PBS gestoppt. Nach 2 Waschgängen (20 und 30 min) wurden die Schnitte in einem PBS Tropfen auf mit Gelatine beschichtete Objektträger (Kap. 2.6.3) aufgezogen und höchstens 30 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Anschließend wurden die Schnitte dehydriert und eingedeckt (Kap. 2.6.7).

2.6.6 Blockadeversuch

Für die Blockadeversuche wurde der zwischen 1:1000 und 1:10.000 verdünnte Erstantikörper vor der Färbung 3 h bei Raumtemperatur mit dem jeweiligen Thioredoxin-Fusionsprotein in den Konzentrationen 10, 20 und 50 µg/ml vorinkubiert. Um die optimale Verdünnung des Antikörpers zu ermitteln, sowie die Blockade *in vitro* zu testen, wurde vor dem Blockadeversuch ein kompetitiver ELISA (Kap. 2.5.1) durchgeführt.

2.6.7 Eindecken der Schnitte auf Objektträgern

Die gefärbten und aufgezogenen Schnitte wurden dehydriert in dem sie durch eine Alkoholreihe in 70%, 80%, 96%, und zwei Chargen 100% Ethanol geführt wurden. Nun wurden die Schnitte zweimal in Xylol gegeben und schließlich in Entellan unter einem Deckglas blasenfrei eingedeckt.

3. Ergebnisse

3.1 Herstellung der Fusionsproteine

3.1.1 Auswahl der Sequenzen

Ein Alignment der Aminosäuresequenzen von rBK β ₁ bis rBK β ₄ (Abb. 3.1) zeigte deutlich, dass die extrazellulären Anteile der BK β -Untereinheiten erstens über eine geeignete Länge verfügen und zweitens an mehreren Stellen deutliche Unterschiede in ihren Sequenzen aufweisen. Vor allem die Sequenzunterschiede (Abb. 3.1, gelb markierte Areale) erschienen bezüglich der Vermeidung zu starker Kreuzreaktivitäten der späteren Antikörper anti-rBK β ₁ und anti-rBK β ₂ günstig. Deshalb wurde entschieden den gesamten extrazellulären Anteil der Proteine für die Antikörperherstellung zu verwenden.

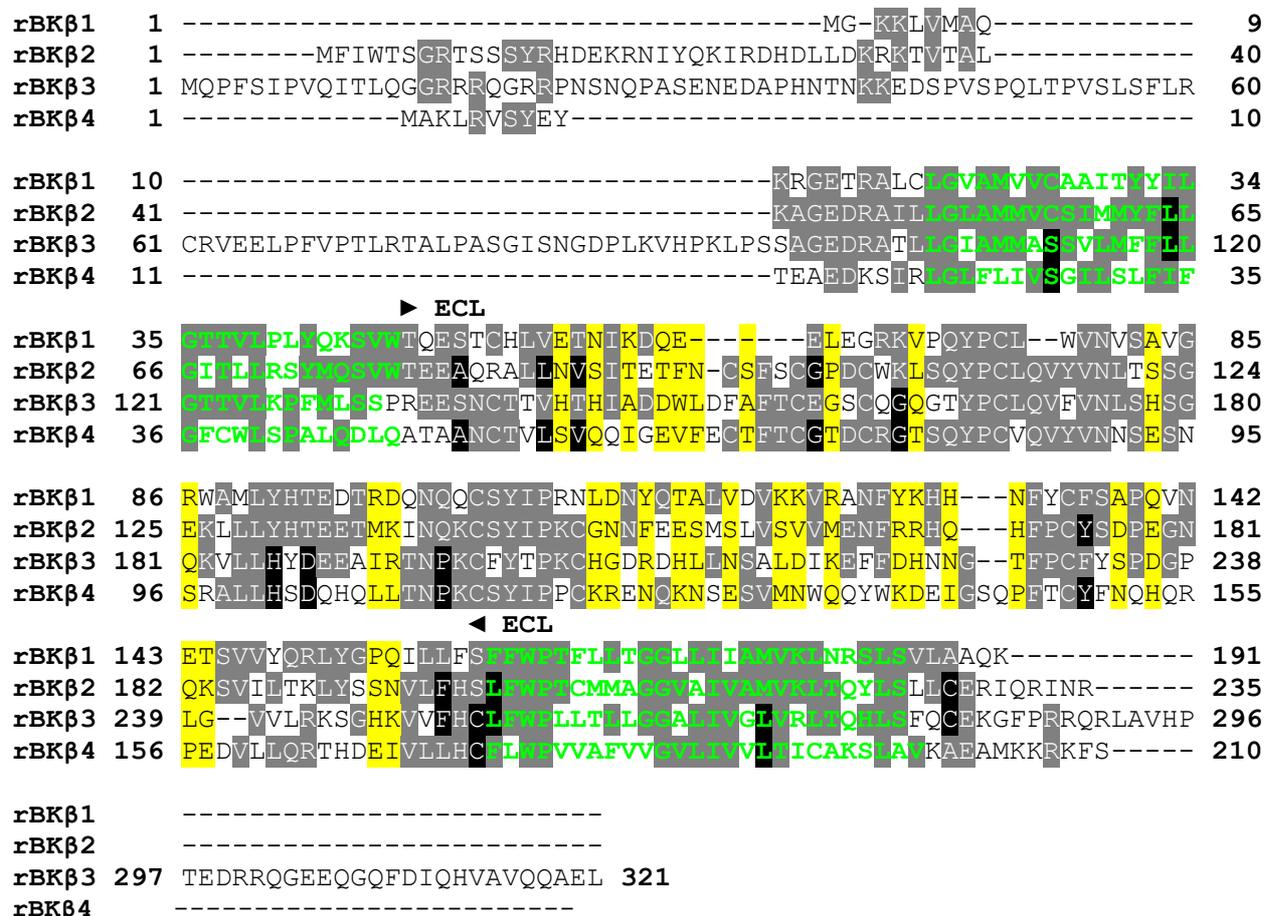


Abb. 3.1: Alignment der Aminosäuresequenzen von rBK β ₁ bis rBK β ₄. Die grün markierten Bereiche kennzeichnen die Transmembrandomänen, zwischen denen die extrazelluläre Schleife (ECL) lokalisiert ist. Homologien der Sequenzen sind grau und schwarz markiert. Bereiche innerhalb der extrazellulären Areale, in denen sich alle vier Sequenzen von einander unterscheiden sind gelb hervorgehoben.

3.1.2 Klonieren in Vektoren

Das Klonieren der mittels PCR amplifizierten Sequenzen von rBK β_1 und rBK β_2 erfolgte mit Hilfe der TA-Klonierung zunächst in den Vektor pGEM-T. Diese Klone konnten später als Grundlage für Ribosonden im Rahmen von *in situ* Hybridisierungen zur Verfügung gestellt werden. Die Umklonierung aus dem pGEM-T System in die Expressionsvektoren pGEX-4T-1 und pET32b(+) erfolgte danach mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *XhoI*. Sämtliche Klone wurden mittels Restriktionsanalyse überprüft und positive Klone sequenziert. Auf diese Weise konnten die korrekten Klone für die Expression der Fusionsproteine ausgewählt werden.

3.1.3 Fusionsproteine

Jeweils ein geeigneter Klon von rBK β_1 -pGEX-4T-1, rBK β_2 -pGEX-4T-1, rBK β_1 -pET32b(+) und rBK β_2 -pET32b(+) wurde in *E. coli* BL21DE3 retransformiert und anschließend die Transkription und Proteinexpression induziert. Jedes Fusionsprotein bestand nun aus einem Trägerprotein Glutathion-S-Transferase (GST) oder Thioredoxin mit HisTag-Anteil (TR6H) und einem Fusionsanteil, welcher von der jeweiligen extrazellulären Schleife des Kanalproteins rBK β_1 bzw. rBK β_2 gebildet wurde. Zur Trennung des überexprimierten Fusionsproteins von bakteriellen Proteinen wurden die TR6H-Fusionsproteine denaturierend mit Hilfe einer Ni-NTA Agarosematrix gereinigt, da der HisTag-Anteil des Thioredoxins durch diese Matrix gebunden werden kann. Die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte präparativ mit anschließender Elektroelution (Kap. 2.3.4). Die entscheidenden Schritte der Aufreinigung werden hier beispielhaft anhand von rBK β_2 dargestellt, da sich die Aufreinigung von rBK β_1 nicht wesentlich unterschieden hat.

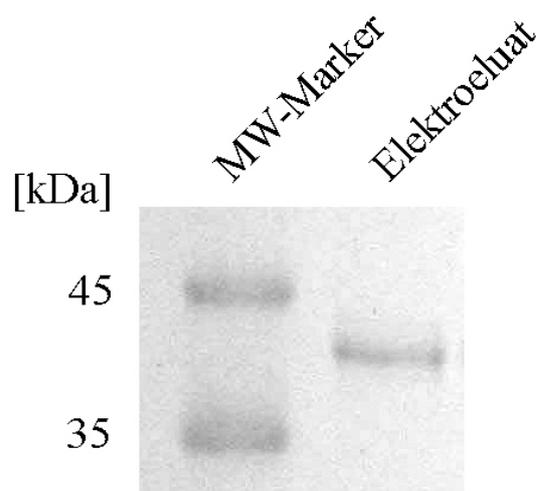


Abb. 3.2: SDS-PAGE Kontrolle der Elektroelution von rBK β_2 -GST. Zur Größenzuordnung wurde ein Low Molecular Weight Marker verwendet. Das Gel zeigt eine einzelne Proteinbande im Elektroeluat zwischen 35 und 45 kDa.

Im Anschluss an die Elektroelution wurde das eluierte Protein zusätzlich mittels SDS-PAGE auf verbliebene Verunreinigungen überprüft (Abb. 3.2). Es ist jedoch nur eine Bande im Gel des Elektroeluats zu erkennen, deren Größe zudem der theoretisch berechneten Größe von rBK β_2 -GST (~40 kDa) entspricht, was bedeutet, dass das Eluat frei von Kontaminationen durch andere Proteine ist. Die anschließende Analyse mittels BCA-Test ergab eine Proteinkonzentration von 1,24 mg/ml in 1,5 ml Gesamtvolumen. Die ebenfalls mittels BCA-Test ermittelte Proteinkonzentration von rBK β_1 -GST (39,3 kDa) betrug 0,6 mg/ml, bei einem Gesamtvolumen von 2 ml.

Die Kontrolle der denaturierenden Aufreinigung von rBK β_2 -TR6H mittels Ni-NTA Agarosematrix durch SDS-PAGE (Abb. 3.3) zeigte deutlich, dass nach Überexpression, Bakterienlyse und Zentrifugation im unlöslichen Pellet zwar noch Reste von rBK β_2 -TR6H (33,9 kDa) vorhanden sind, das meiste Protein aber mit dem löslichen Überstand abgenommen wurde. Der aufgefangene Durchlauf und der Waschgang der Säule enthielten kein rBK β_2 Protein. Somit hat das gesamte Fusionsprotein an die Ni-NTA Säule gebunden, und konnte nachfolgend durch Verringerung des pH-Wertes eluiert werden.

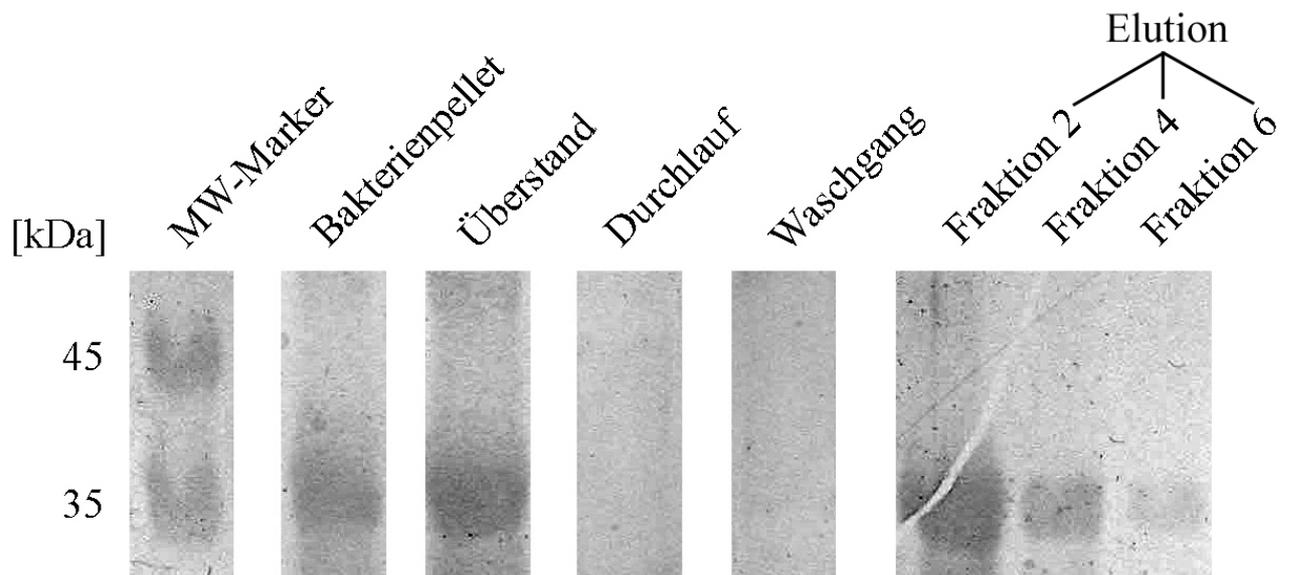


Abb. 3.3: SDS-PAGE Kontrolle der denaturierenden Aufreinigung von rBK β_2 -TR6H via Ni-NTA Agarosematrix. Zur Größenordnung wurde ein Low Molecular Weight Marker verwendet. Die aufgefangenen Fraktionen der Elution enthalten nachweislich das Fusionsprotein rBK β_2 -TR6H.

Die Austestung der aufgefangenen Fraktionen zeigte deutlich, dass besonders Fraktion 2, aber auch Fraktion 4 und in geringem Maße Fraktion 6 Fusionsprotein enthielten, da eine immer schwächer werdende Proteinbande zu sehen ist (Abb. 3.3). Daher wurden die Fraktionen 2-6

gepools. Die Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Test ergab eine Proteinkonzentration von 0,9 mg/ml in 4,5 ml Gesamtvolumen. Für rBK β_1 -TR6H (33,3 kDa) ergab sich eine Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml in einem Gesamtvolumen von 6 ml.

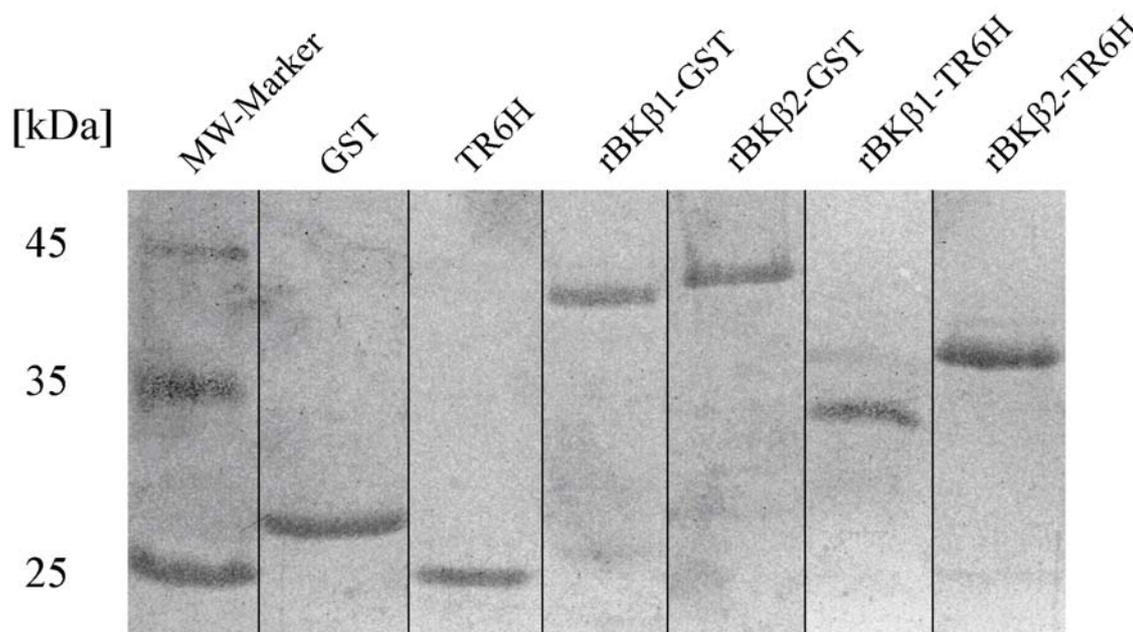


Abb. 3.4: SDS-PAGE der aufgereinigten Fusionsproteine. Zur Größenordnung wurde ein Low Molecular Weight Marker verwendet. Die Trägerproteine GST (26 kDa) und TR6H (20 kDa) ohne Fusionsanteil wurden mit aufgetragen, Färbung: Coomassie. Pro Spur wurde 1 μ g Protein verwendet.

Abb. 3.4 zeigt zusammenfassend alle vier aufgereinigten Fusionsproteine. Hierbei ist zu erwähnen, dass die theoretisch berechneten Molekulargewichte der unterschiedlichen Fusionsproteine sehr gut mit den experimentell ermittelten übereinstimmen, und sowohl die GST- als auch die TR6H-Fusionsproteine rBK β_1 und rBK β_2 für eine Immunisierung von Kaninchen (Kap. 2.3.6) und für die spätere Antikörperaufreinigung und -charakterisierung ausreichend sauber sind. Um einen ausreichenden Immunisierungsgrad der Tiere gegen das jeweilige Antigen zu gewährleisten, wurden die Präimmunsereen, und ab dem 42. Immunisierungstag wöchentliche Testabnahmen analysiert.

3.1.4 Testabnahmen

Die Antikörperaktivität der für die Antikörperaufreinigung verwendeten Tierseren wurde im indirekten ELISA getestet (Abb. 3.5). Die beiden Antikörper anti-rBK β_1 und anti-rBK β_2 wurden aus dem Rohserum des jeweils mit 80 μ g immunisierten Tieres (Tier 1) gewonnen.

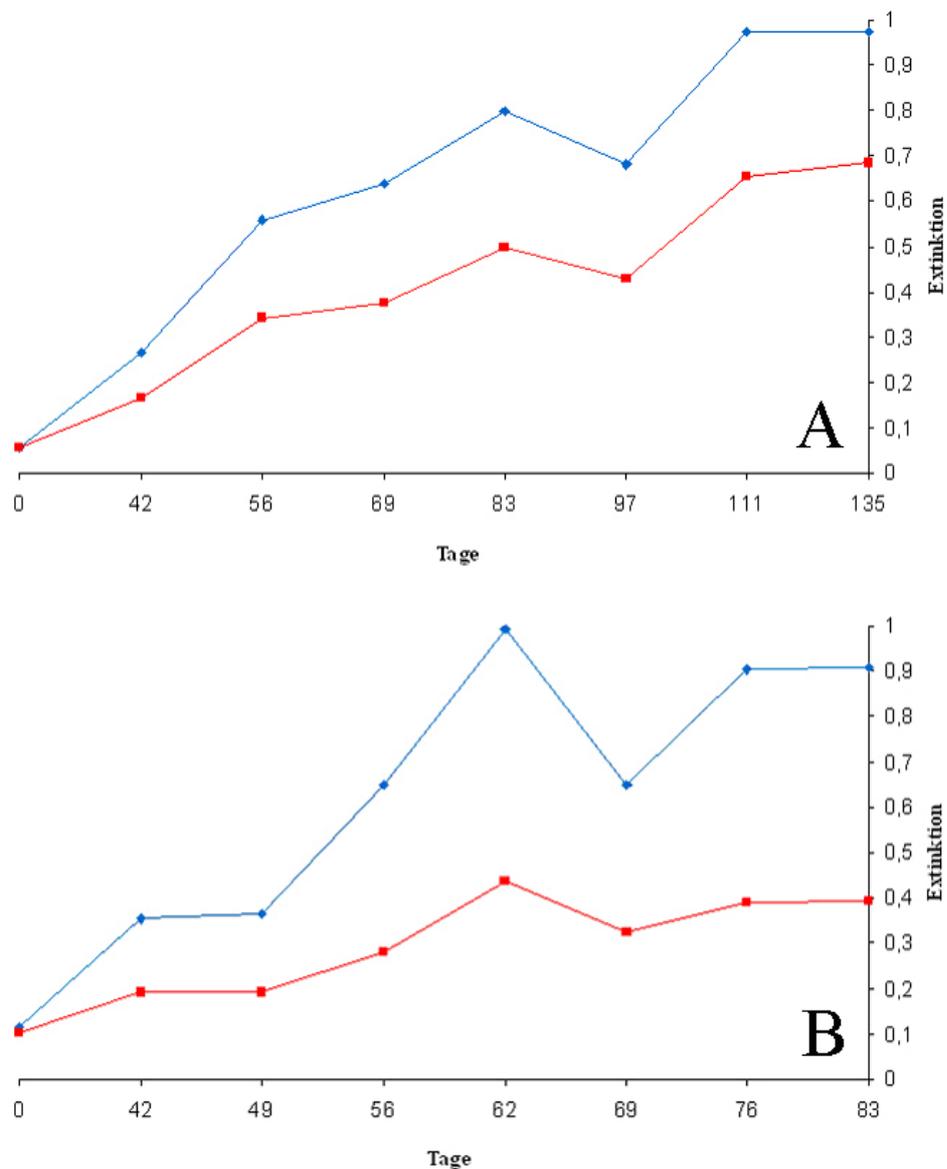


Abb. 3.5: ELISA zur Kontrolle der Aktivitätszunahme der Kaninchenserum im Verlauf der Immunisierung. A: Testabnahmen von anti-rBK β_1 (1:200.000 verdünnt), **B:** Testabnahmen von anti-rBK β_2 (1:100.000 verdünnt). Die blauen Kurven zeigen die Reaktivität gegen das jeweilige Fusionsprotein. Die roten Kurven kennzeichnen die Reaktivitätszunahme gegen das Trägerprotein GST. **A** und **B** zeigen deutlich die Aktivitätszunahme des jeweiligen Antiserums mit zunehmendem Immunisierungstag. Der 0. Tag kennzeichnet das jeweilige Präimmunserum, der jeweils letzte Tag den Tag der Ausblutung.

Abb. 3.5A zeigt die Austestung von Tier 1, welches mit 80 μ g rBK β_1 -GST immunisiert wurde. Getestet wurde das Präimmunserum (Immunisierungstag 0), die Immunisierungstage 42, 56, 69, 83, 97, 111, sowie der Tag der Ausblutung (Immunisierungstag 135). Abb. 3.5B zeigt die Aktivität der Testabnahmen des mit rBK β_2 -GST immunisierten Tieres 1. Getestet wurde

wiederum das Präimmunserum, die wöchentlichen Abnahmen ab Immunisierungstag 42, sowie der Tag der Ausblutung (Immunisierungstag 83). In beiden Abb. lässt sich eine deutliche Steigerung der Aktivität beider Seren sowohl gegen das jeweilige Fusionsprotein, als auch gegen das Trägerprotein GST mit zunehmendem Immunisierungstag erkennen. Die Aktivität der Präimmunseren entsprach in etwa der des gemessenen BSA-Leerwertes.

Grundsätzlich wurden auch die aus dem jeweils zweiten Tier gewonnenen Seren getestet und aufgereinigt. Der Antikörper anti-rBK β_1 unterschied sich dabei nicht wesentlich von dem aus Tier 1 gewonnenen Antikörper. Der aus dem mit rBK β_2 -GST immunisierten Tier 2 gewonnene Antikörper anti-rBK β_2 zeigte im Western Blot mit Membranfraktionen eine deutlich größere Bande, und wies in der immunzytochemischen Blockade eine starke unspezifische Komponente auf, weshalb er verworfen wurde.

3.2 Aufreinigung der Antikörper

3.2.1 Entfernung unspezifischer Serum-Komponenten und der IgM Immunglobuline

Zunächst wurden die Rohseren dekomplementiert, und anschließend mit 50 mg/ml Rattenleberextrakt präabsorbiert, um das Komplementsystem auszuschalten, sowie unspezifische, gegen Extrazellulärmatrix und Kollagenfasern gerichtete Antikörper zu entfernen. Schließlich wurden die Seren zur Trennung der eigentlich benötigten IgG (150 kDa) von den wesentlich größeren IgM (900 kDa) auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen. Nach der Gelfiltration wurde die Aktivität der fraktionierten IgG mittels ELISA getestet. Der erste Peak (Abb. 3.6, blaue Kurve ca. zwischen Fraktion 20 und 27) stellt dabei die Proteine mit dem größten Molekulargewicht (hauptsächlich IgM Immunglobuline) dar, wobei im ELISA deutlich zu sehen ist, dass hier keine IgG-Aktivität enthalten ist. Die IgG Immunglobuline konnten ausschließlich im zweiten Peak nachgewiesen werden (Abb. 3.6, rote Kurve). Die Fraktionen mit der höchsten IgG Aktivität wurden gepoolt. Bei anti-rBK β_1 waren das die Fraktionen 31 – 43, bei anti-rBK β_2 die Fraktionen 29 – 39 (Abb. 3.6, grün markierter Bereich).

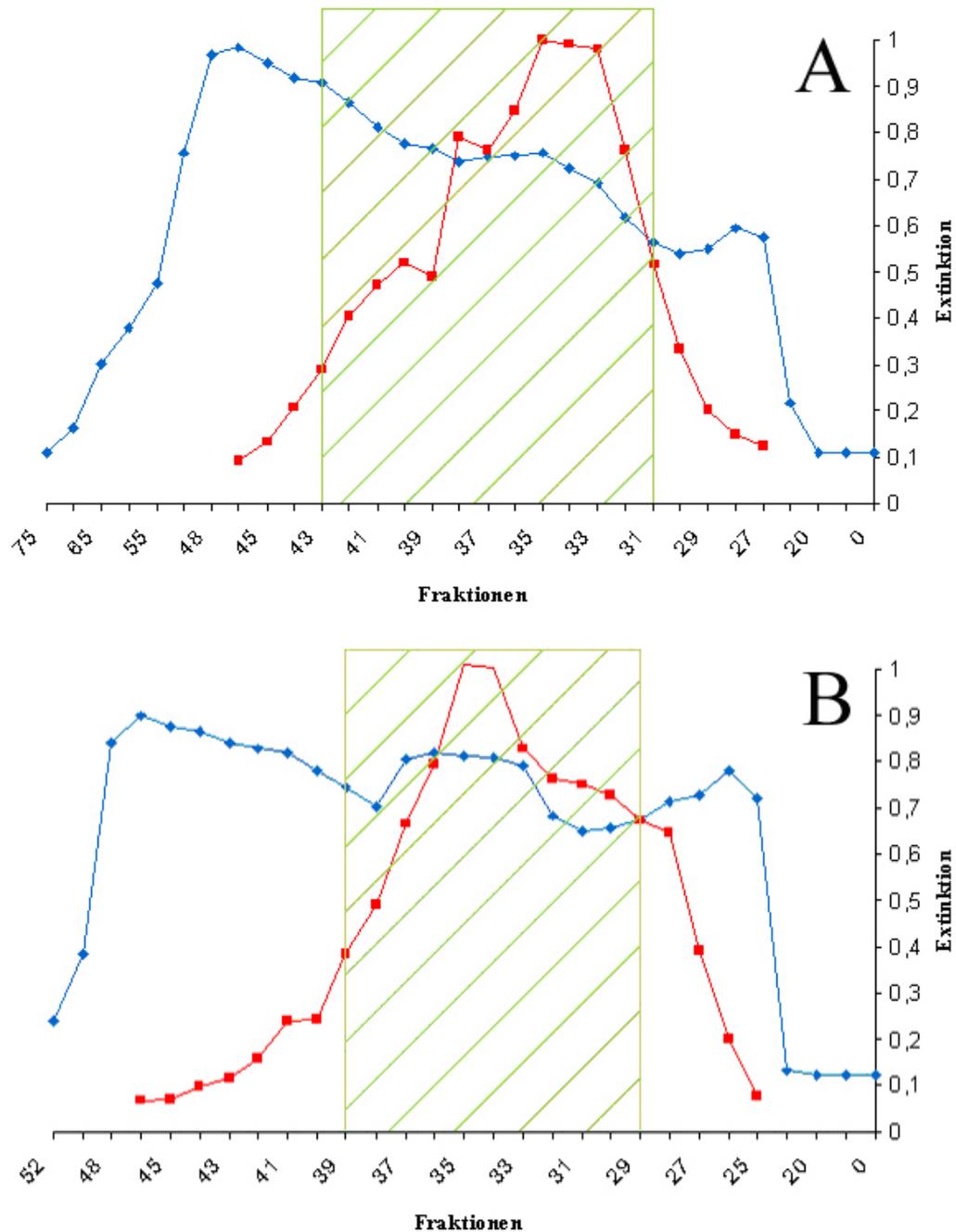


Abb. 3.6: Gelfiltration und ELISA der Seren anti-rBK β_1 und anti-rBK β_2 durch die Superdex 200 Säule. A: anti-rBK β_1 , B: anti-rBK β_2 . Die blaue Kurve zeigt die Passage des gesamten Serums durch die Gelfiltrationssäule (Extinktion bei 280 nm), die rote Kurve die anschließende Auswertung der IgG Aktivität mittels indirektem ELISA (Extinktion bei 405 nm). Das grün markierte Areal kennzeichnet die gepoolten Fraktionen. Die Verdünnungen der Antiseren im ELISA betragen 1:20.000.

3.2.2 Detektion und Entfernung der Kreuzreaktivität

Die Kreuzreaktivität der Rohseren anti-rBK β_1 und anti-rBK β_2 gegen die paralogen Fusionsproteine, sowie gegen die Trägerproteine GST und TR6H wurde zunächst mittels ELISA

detektiert (Abb. 3.7 und 3.8). Die Entfernung der Kreuzreaktivitäten wurde durch Präabsorption mit Bakteriensedimenten erzielt, welche nur den GST-Fusionsanteil oder die paralogen BK β Proteine überexprimiert haben. Anschließend erfolgten eine Affinitätsreinigung, sowie die Einengung der Antikörper.

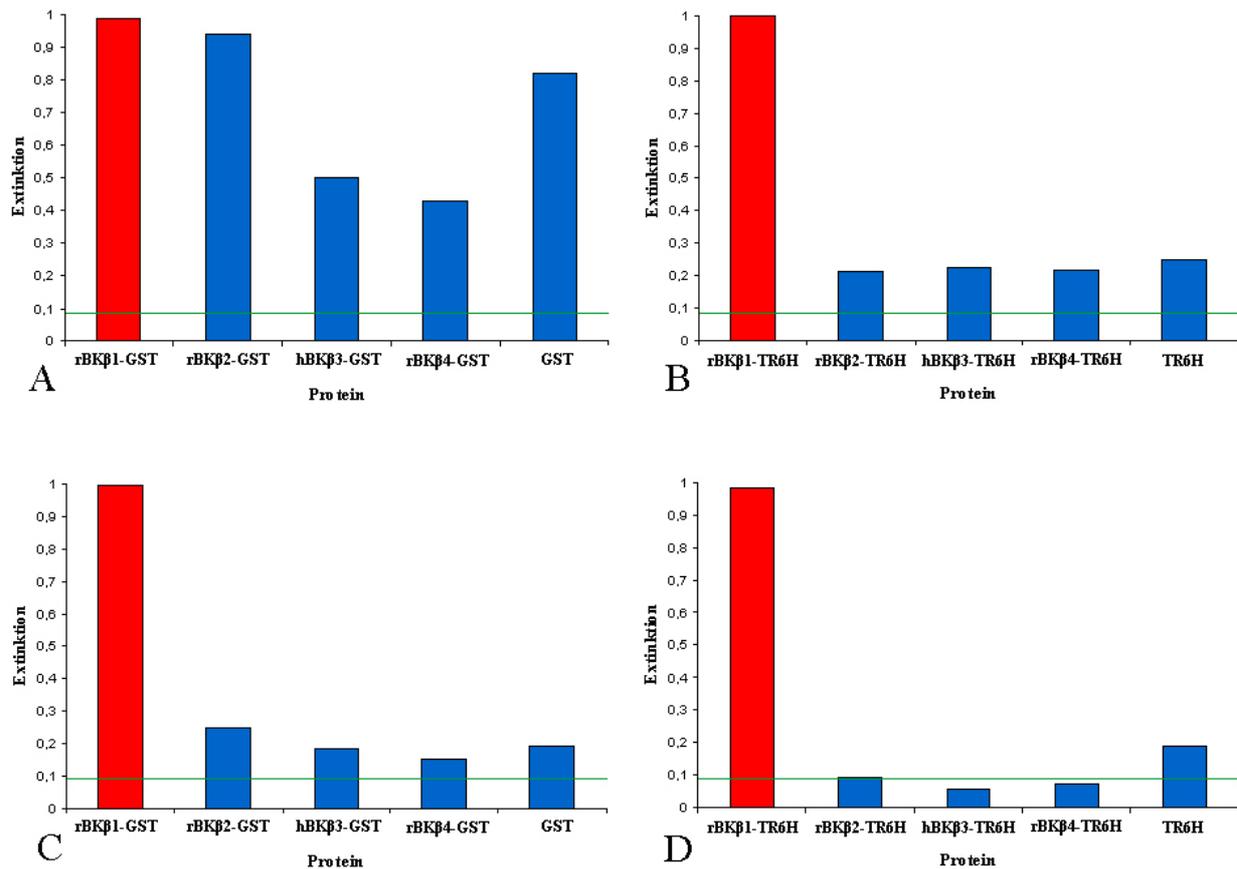


Abb. 3.7: Kreuzreaktivität im indirekten ELISA. A und B: Rohserum anti-rBK β_1 , C und D: gereinigter Antikörper anti-rBK β_1 . Rot ist das Fusionsprotein dargestellt, gegen welches das Serum gerichtet ist, blau die paraloge Fusionsproteine, sowie die Trägerproteine GST und TR6H. Die Grüne Achse zeigt den BSA-Leerwert. Verdünnungen: A 1:20.000, B 1:10.000, C 1:10.000, D 1:5.000.

Die Kreuzreaktivitäten beider Rohseren sowohl gegen die GST-Fusionsproteine, als auch gegen das eigentliche Trägerprotein GST sind deutlich höher, als gegen die TR6H-Fusionsproteine (Abb. 3.7 und 3.8 A, B). Das bedeutet, dass die Kreuzreaktivität gegen GST einen Großteil der Gesamtkreuzreaktivität ausmacht.

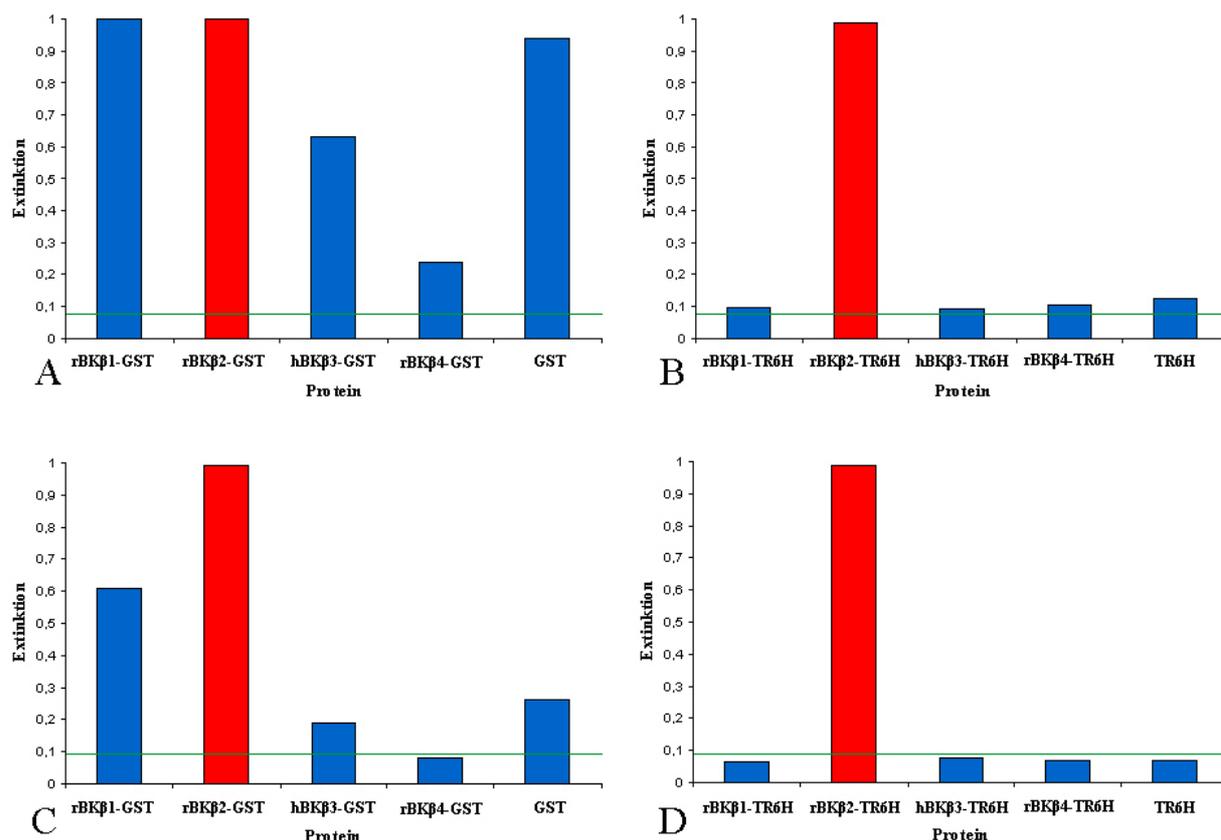


Abb. 3.8: Kreuzreaktivität im indirekten ELISA. A und B: Rohserum anti-rBKβ₂, C und D: gereinigter Antikörper anti-rBKβ₂. Rot ist das Fusionsprotein dargestellt, gegen welches das Serum gerichtet ist, blau die paraloge Fusionsproteine, sowie die Trägerproteine GST und TR6H. Die Grüne Achse zeigt den BSA-Leerwert. Verdünnungen: A 1:20.000, B 1:20.000, C 1:10.000, D 1:5.000.

Letztlich lässt sich trotz Präabsorption und Affinitätsreinigung eine restliche Kreuzreaktivität der Antikörper gegen den GST-Fusionsanteil nicht vollständig verhindern, was vor allem in den Abb. 3.7C und 3.8C ersichtlich wird. Da das verwendete GST jedoch bakteriellen Ursprungs ist, und somit in den Geweben von *Rattus norvegicus* nicht vorkommt (Kaelin et al. 1992), hat die beschriebene Restkreuzreaktivität gegen das Trägerprotein für die späteren immunzytochemischen Versuche keine Relevanz. Vergleicht man diese zusätzlich mit der Kreuzreaktivität der Antikörper gegen die TR6H-Fusionsproteine (Abb. 3.7D und 3.8D), so zeigt sich, dass die Kreuzreaktivität von anti-rBKβ₁ und anti-rBKβ₂ gegen paraloge BKβ-Untereinheiten zum Großteil im Bereich des jeweils mitbestimmten BSA-Leerwert liegt (grüne Achse), und somit nicht nachweisbar ist.

3.2.3 Bilanz nach der Aufreinigung

Nach Präabsorption, Affinitätsreinigung und Einengung lagen die Antikörper in einem Volumen von 1,5 ml vor, wobei für die Aufreinigung eine Menge von 2,0 ml Rohserum eingesetzt wurde. Die Aktivität der polyklonalen, monospezifischen Antikörper betrug nach der Aufreinigung im Vergleich zum Rohserum (= 100%) ca. 45%.

3.3 Charakterisierung der polyklonalen, monospezifischen BK β Antiseren

3.3.1 Kreuzreaktivität gegen paraloge Proteine

Nach der Aufreinigung wurde die Kreuzreaktivität von anti-rBK β_1 und anti-rBK β_2 gegen paraloge BK β -Untereinheiten weiterführend untersucht.

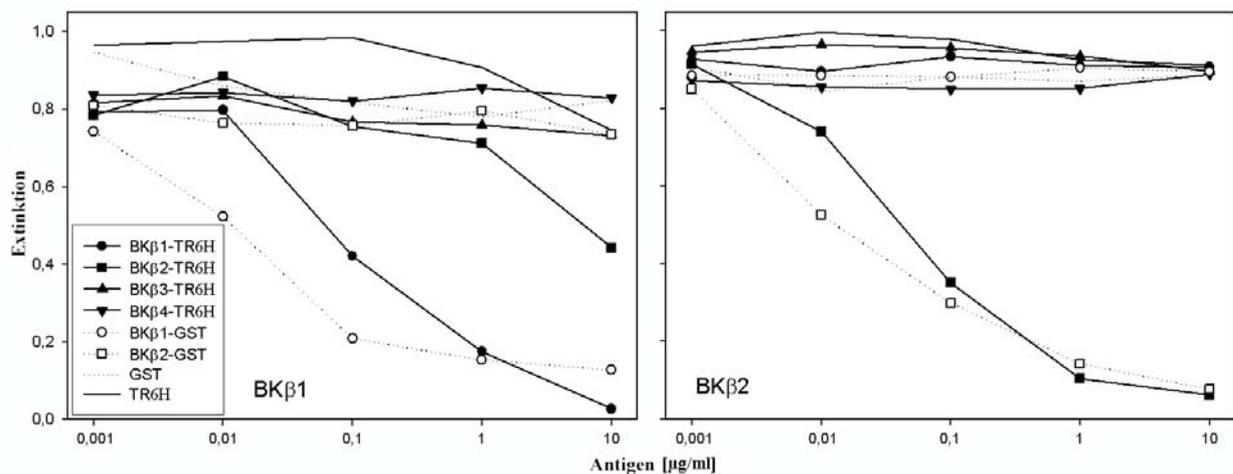


Abb. 3.9: anti-rBK β_1 und anti-rBK β_2 im kompetitiven ELISA. Die Antikörper wurden jeweils mit Verdünnungsreihen der vier TR6H-Fusionsproteine, rBK β_1 -GST, rBK β_2 -GST, sowie beider Trägerproteine ohne Fusionsanteil vorinkubiert und 1:10.000 verdünnt eingesetzt.

Im kompetitiven ELISA zeigt sich deutlich, dass die beiden Antikörper bei ausreichenden Mengen Antigen lediglich durch das entsprechende GST- und TR6H-Fusionsprotein zunehmend blockiert werden (Abb. 3.9). So bindet anti-rBK β_1 nur an rBK β_1 -GST und rBK β_1 -TR6H. Entsprechend bindet anti-rBK β_2 nur an rBK β_2 -GST und rBK β_2 -TR6H. Diese Ergebnisse zeigen, dass die aufgereinigten Antikörper keine Immunreaktivität gegen paraloge BK β -Untereinheiten mehr enthalten. Auch im Western Blot (Abb. 3.10) zeigen sich Banden nur dort, wo die entsprechenden rekombinanten Proteine aufgetragen waren.

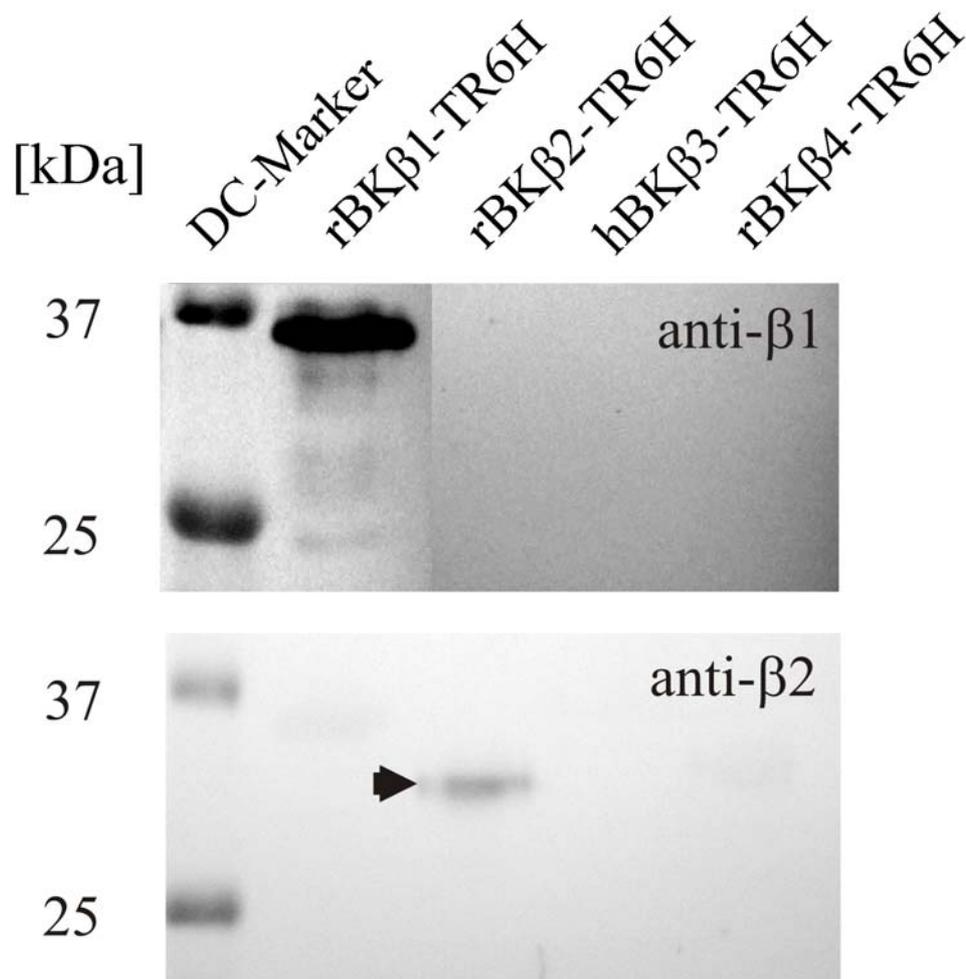


Abb. 3.10: Western Blot mit BK β ₁- β ₄ TR6H-Fusionsproteinen. Zur Größenzuordnung wurde Dual-Color Marker benutzt. Beide Antikörper erzeugen jeweils nur eine Bande in der entsprechenden Spur. Der Erstantikörper wurde jeweils 1:10.000 verdünnt eingesetzt.

3.3.2 Expression von BK β ₁ und BK β ₂ im Großhirn der Ratte

Die Expression von BK β ₁ und BK β ₂ im Großhirn der Ratte wurde durch eine Western Blot Analyse von Membranfraktionen des Großhirns untersucht (Abb. 3.11). Sowohl anti-rBK β ₁, als auch anti-rBK β ₂ erzeugen spezifische Banden. Diese befinden sich jeweils bei ca. 29 kDa, was wiederum der theoretisch berechneten Größe von 21,9 kDa für BK β ₁ bzw. 27,1 kDa für rBK β ₂ (deglykosyliert und ohne Fusionsanteil des Trägerproteins) nahe kommt.

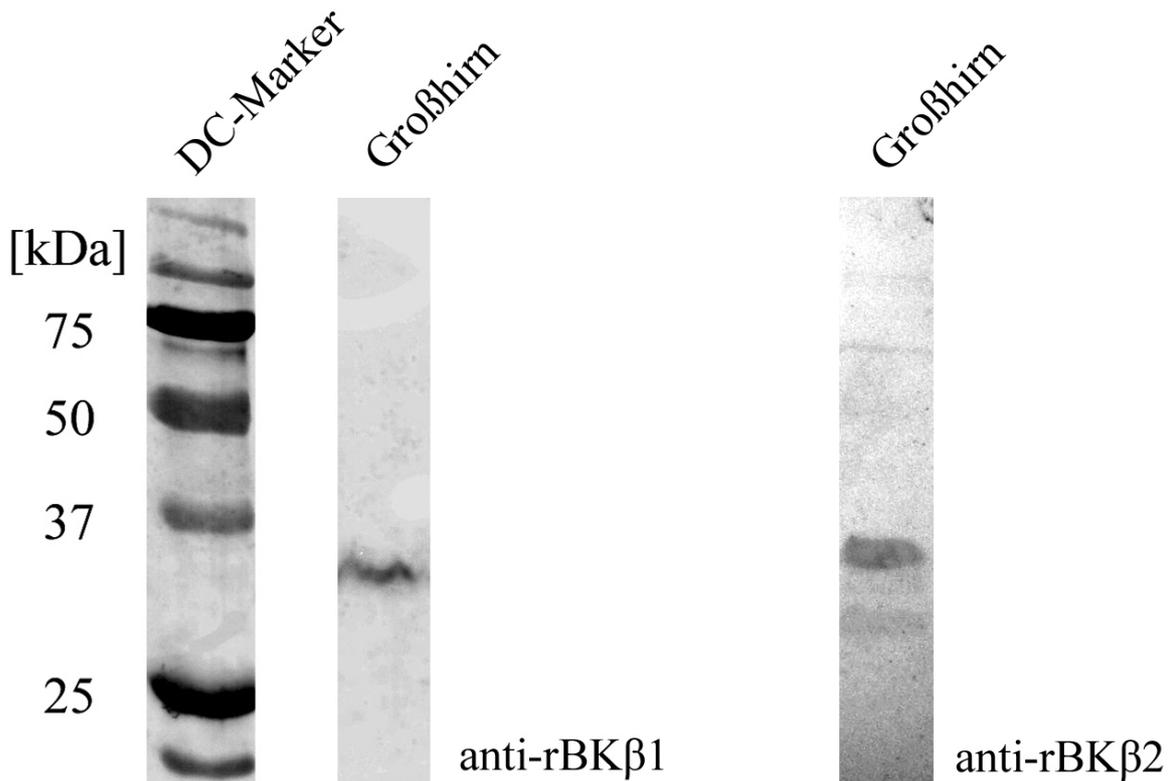


Abb. 3.11: Western Blot von anti-rBK β_1 und anti-rBK β_2 mit Membranfraktionen. Die Erstantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:500, die Membranfraktionen in einer Proteinkonzentration von 75 $\mu\text{g}/\text{Spur}$ eingesetzt. Die experimentell ermittelte Größe der Proteinbanden korreliert sehr gut mit den theoretisch ermittelten Größen.

3.3.3 Blockade im ELISA

Die vollständige Blockierbarkeit der Immunreaktion von anti-rBK β_1 und anti-rBK β_2 bei Vorinkubation mit steigenden Konzentrationen des zugehörigen Antigens wurde mittels kompetitivem ELISA (Abb. 3.12) und Western Blot (Abb. 3.13) untersucht. Die Immunreaktionen beider Antikörper lassen sich mit zunehmender Konzentration ihres zugehörigen Antigens blockieren, so dass sich ab einer Antigenkonzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (TR6H-Fusionsprotein) eine vollständige Blockade beider Antikörper im kompetitiven ELISA zeigen lässt.

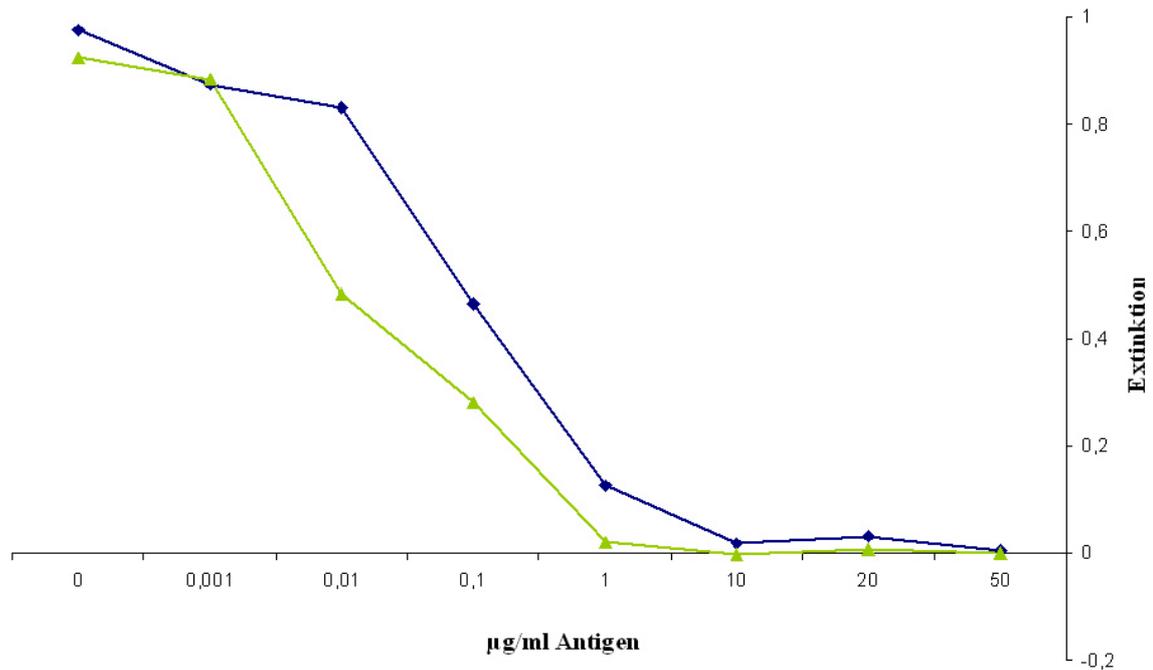


Abb. 3.12: Blockade von anti-rBKβ₁ und anti-rBKβ₂ im kompetitiven ELISA. anti-rBKβ₁ wurde 1:10.000 (blaue Kurve) und anti-rBKβ₂ 1:5000 (grüne Kurve) verdünnt eingesetzt. Beide Antikörper lassen sich bei zunehmender Menge Antigen (TR6H-Fusionsprotein) vollständig blockieren.

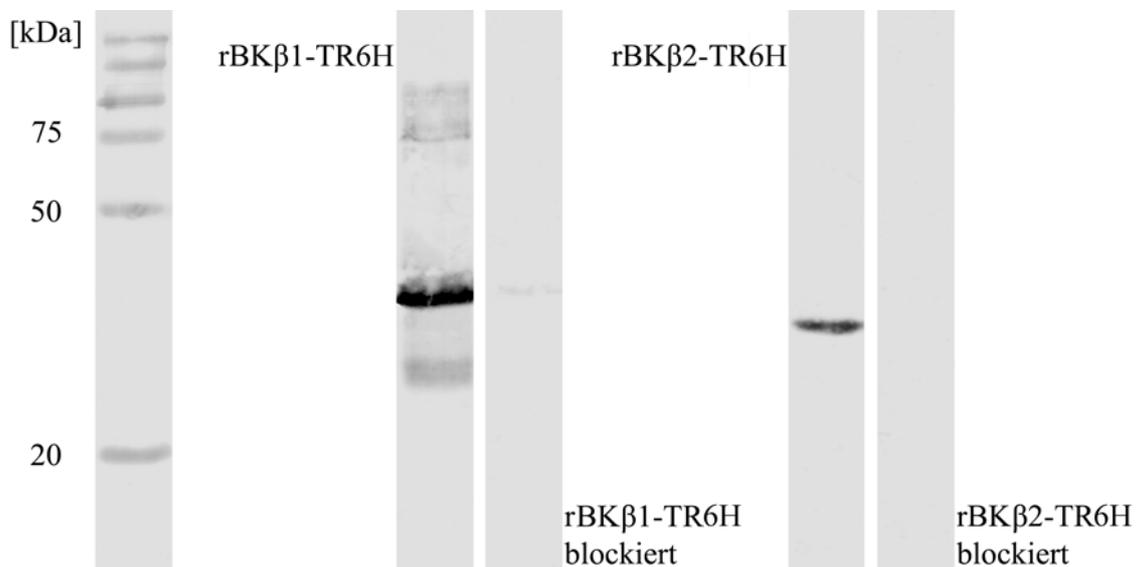


Abb. 3.13: Blockade von anti-rBKβ₁ und anti-rBKβ₂ im Western Blot. Bei einer Vorinkubation mit 20 μg/ml Antigen (TR6H-Fusionsprotein) können die spezifischen Immunreaktionen gegen die Proteinbanden nahezu vollständig geblockt werden. Die Erstantikörper wurden 1:10.000 verdünnt.

Für die Blockade im Western Blot wurde der jeweilige Antikörper mit 20 μg/ml des entsprechenden TR6H-Fusionsproteins vorinkubiert. Unblockierter und blockierter Western Blot sind zum Vergleich jeweils nebeneinander abgebildet. Es ist deutlich erkennbar, dass sich die

Immunreaktion gegen die Proteinbanden bei der gewählten Antigenkonzentration auch im Western Blot vollständig blockieren lässt.

3.4 Immunzytochemische und lichtmikroskopische Untersuchungen

3.4.1 Blockade im Gefrierschnitt

Zur Überprüfung der Spezifität der Antikörper wurden immunzytochemische Experimente an ausgewählten Strukturen durchgeführt, bei denen der entsprechende Antikörper vorher mit seinem spezifischen Antigen blockiert wurde. Hierbei sollte kein Immunsignal nachweisbar sein. Diese Spezifitätskontrolle ist hier am Beispiel der hippocampalen CA3 Region dargestellt (Abb. 3.14 und 3.15). Darüber hinaus konnte die spezifische Blockade aber auch in weiteren untersuchten Regionen wie dem dorsalen Hypothalamus gezeigt werden.

In beiden Abb. ist zu sehen, dass das im Stratum pyramidale der hippocampalen CA3 Region erzeugte Signal (Abb. 3.14A und 3.15A) durch Vorinkubation mit 10 µg/ml Antigen spezifisch blockierbar ist (Abb. 3.14B und 3.15B).

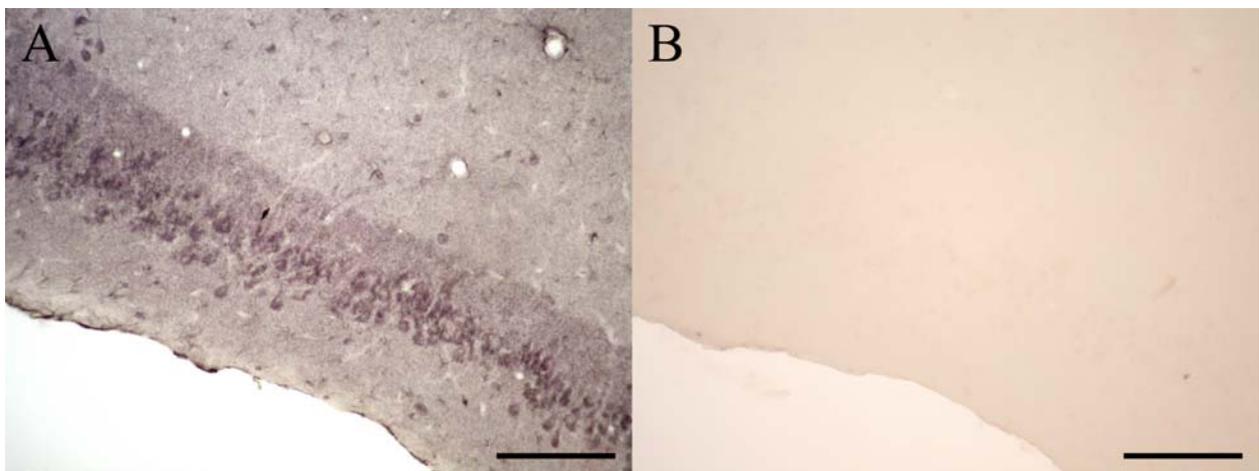


Abb. 3.14: Blockade des Antikörpers anti-rBK β ₁. **A:** CA3 Region des Hippocampus der Ratte. Der Antikörper wurde 1:200 verdünnt und in **B** mit 10 µg/ml Antigen (GST-Fusionsprotein) vorinkubiert. Das deutliche Signal im Stratum pyramidale lässt sich so spezifisch blockieren. Der Maßstabsbalken entspricht 125 µm (20 x Vergrößerung).

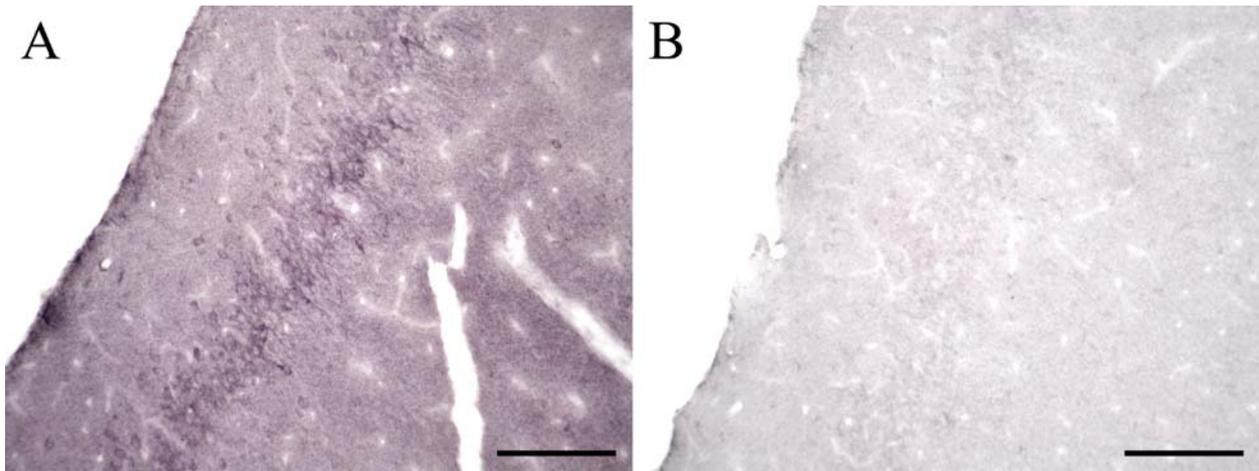


Abb. 3.15: Blockade des Antikörpers anti-rBK β ₂. A: CA3 Region des Hippocampus der Ratte. Der Antikörper wurde 1:200 verdünnt und in B mit 10 μ g/ml Antigen (GST-Fusionsprotein) vorinkubiert. Das deutliche Signal im Stratum pyramidale lässt sich so spezifisch blockieren. Der Maßstabsbalken entspricht 125 μ m (20 x Vergrößerung).

3.4.2 Verteilung von BK β ₁ und BK β ₂ im Gehirn der Ratte

Um die Verteilung von BK β ₁ und BK β ₂ genauer untersuchen zu können, wurden Schnittserien unterschiedlicher Hirnregionen angefertigt. Es stellte sich heraus, dass sowohl BK β ₁, als auch BK β ₂ in verschiedenen Arealen des Gehirns der Ratte exprimiert werden. So konnte BK β ₁ außer im Hypothalamus und im Hippocampus beispielsweise auch im Neocortex, in der medialen Habenula und in Astrozyten, und BK β ₂ zusätzlich zum Hippocampus ebenfalls im Neocortex, im Subkommissuralorgan sowie in der Substantia nigra pars reticulata nachgewiesen werden.

3.4.3 Expression von BK β ₁ und BK β ₂ im Hypothalamus

Der Hypothalamus liegt im ventralen Diencephalon und ist das oberste Integrationsorgan vegetativer Funktionen. Er beginnt rostral mit den präoptischen Kerngebieten bei Bregma -0,26 mm und erstreckt sich occipital bis zu den mammilären Kernen bei Bregma -5,60 mm. Seine Kerne dienen der Aufrechterhaltung zahlreicher Körperfunktionen (zum Beispiel zirkadiane Rhythmik, Nahrungsaufnahme, Blutdruck- und Thermoregulation) und sind durch Sekretion verschiedener Neurohormone in unterschiedliche Regelkreise eingebunden.

Einer immunzytochemischen Darstellung des anterolateralen Hypothalamus bei Bregma -1,8 mm mit anti-rBK β ₁ (Abb. 3.16B) wurde zur besseren Orientierung eine schematische Darstellung der einzelnen Kerngebiete und Fasertrakte dieser Region gegenüber gestellt (Abb. 3.16A). Bereits in der Übersicht ist deutlich zu erkennen, dass der Antikörper in mehreren

Kerngruppen ein deutliches spezifisches Signal erzeugt. Es konnte gezeigt werden, dass $BK\beta_1$ in mehreren Kerngebieten des Hypothalamus exprimiert wird (Abb. 3.17-3.19). Zur besseren Zuordnung der Kerngebiete wurde stets eine Abb. mit Färbung nach Klüver-Barrera gegenüber gestellt.

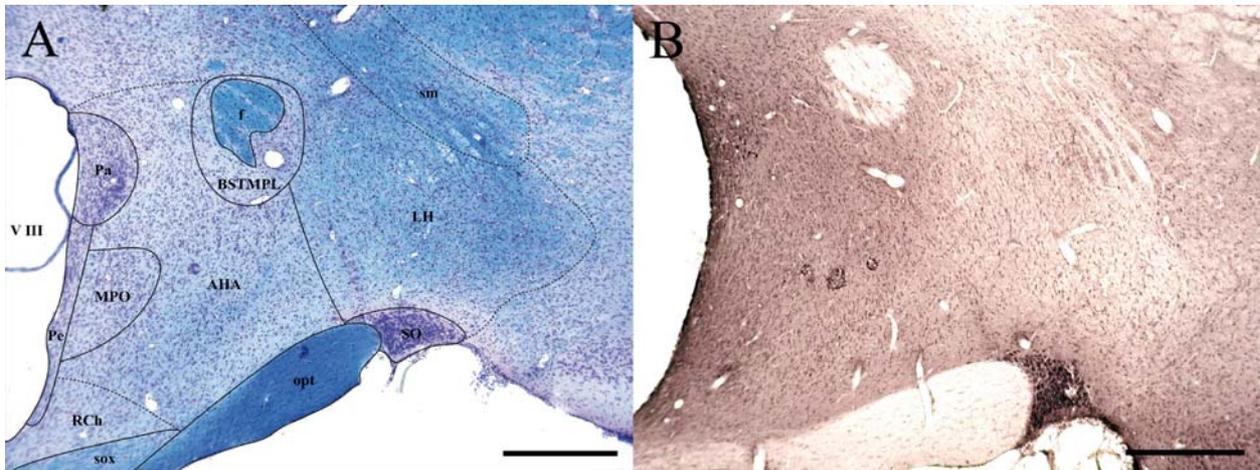


Abb. 3.16: Übersicht des anterolateralen Hypothalamus. **A** zeigt eine Klüver-Barrera Färbung, **B** eine immunzytochemische Darstellung mit anti-r $BK\beta_1$ (1:2000 verdünnt). **AHA:** Area hypothalami anterior, **BSTMPL:** Bed-Kern der Stria terminalis, mediale Sektion, posterolateraler Abschnitt, **f:** Fornix, **LH:** Area hypothalami lateralis, **MPO:** Area preoptica medialis, **opt:** Tractus opticus, **Pa:** Ncl. paraventricularis hypothalami, **Pe:** Ncl. periventricularis, **RCh:** Area retrochiasmatica, **sm:** Stria medullaris, **SO:** Ncl. supraopticus, **sox:** Decussatio supraoptica, **VIII:** Dritter Ventrikel. Der Maßstabsbalken entspricht 500 μm (5 x Vergrößerung).

Der Ncl. supraopticus (**SO**) (Abb. 3.17) gehört zu der vorderen Kerngruppe des Hypothalamus und ist, wie auch der Ncl. paraventricularis hypothalami (**Pa**) (Abb. 3.18), Teil des neuroendokrinen Systems des Hypophysenhinterlappens. Seine Zellgruppen (magnozelluläres neuroendokrines System) produzieren die Hormone Vasopressin und Oxytocin. Diese Zellgruppen können durch anti-r $BK\beta_1$ spezifisch detektiert werden (Abb. 3.17B). Das deutliche Signal spricht für eine starke Expression von $BK\beta_1$.

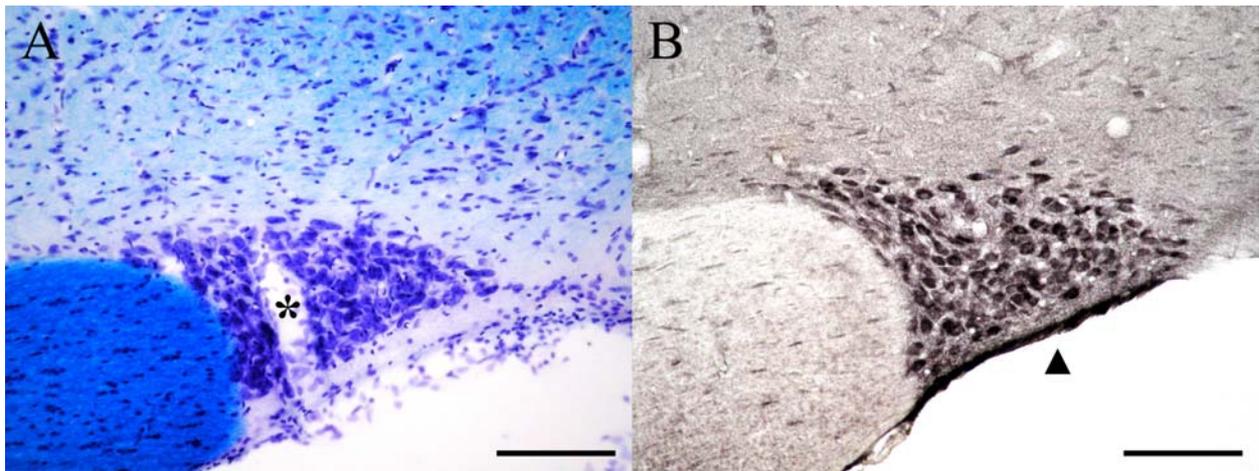


Abb. 3.17: Expression von BK β ₁ im Ncl. supraopticus. **A:** Färbung nach Klüver-Barrera, *: Blutgefäß
B: Die immunzytochemische Darstellung mit anti-rBK β ₁ (1:5000 verdünnt) zeigt eine besonders starke Färbung der Somata der neurosekretorischen Neurone des Ncl. supraopticus. ▲: Der schwarze Randsaum ist ein unspezifisches Artefakt. Der Maßstabsbalken entspricht 125 μ m (20 x Vergrößerung).

Der Ncl. paraventricularis hypothalami liegt in der Seitenwand des 3. Ventrikels (**VIII**) und produziert mit seinem magnozellularen Anteil, ebenso wie der Ncl. supraopticus (**SO**), die Hormone Oxytocin und Vasopressin. Über Fortsätze, die bis in die Neurohypophyse reichen, sezernieren seine Zellgruppen, auf entsprechende Reize hin, die Hormone in den Blutkreislauf. Sein parvozellulärer Anteil projiziert unter anderem in die Eminentia mediana, wo die von diesen Zellgruppen gebildeten Peptidhormone an das Pfortadersystem des Hypophysenvorderlappens abgegeben werden (parvozelluläres neuroendokrines System).

Sowohl die Zellgruppen des Ncl. paraventricularis hypothalami (Abb. 3.18B), als auch die funktionell dazugehörigen neuroendokrinen Inseln („akzessorischer magnozellularer Nucleus“) im Bereich des anterioren hypothalamischen Areals (**AHA**) (Abb. 3.18D), lassen sich mit anti-rBK β ₁ spezifisch darstellen. Darüber hinaus zeigt sich ein positives Signal im Ependym des 3. Ventrikels (Abb. 3.18B), was für eine Expression von BK β ₁ in Ependymzellen spricht.

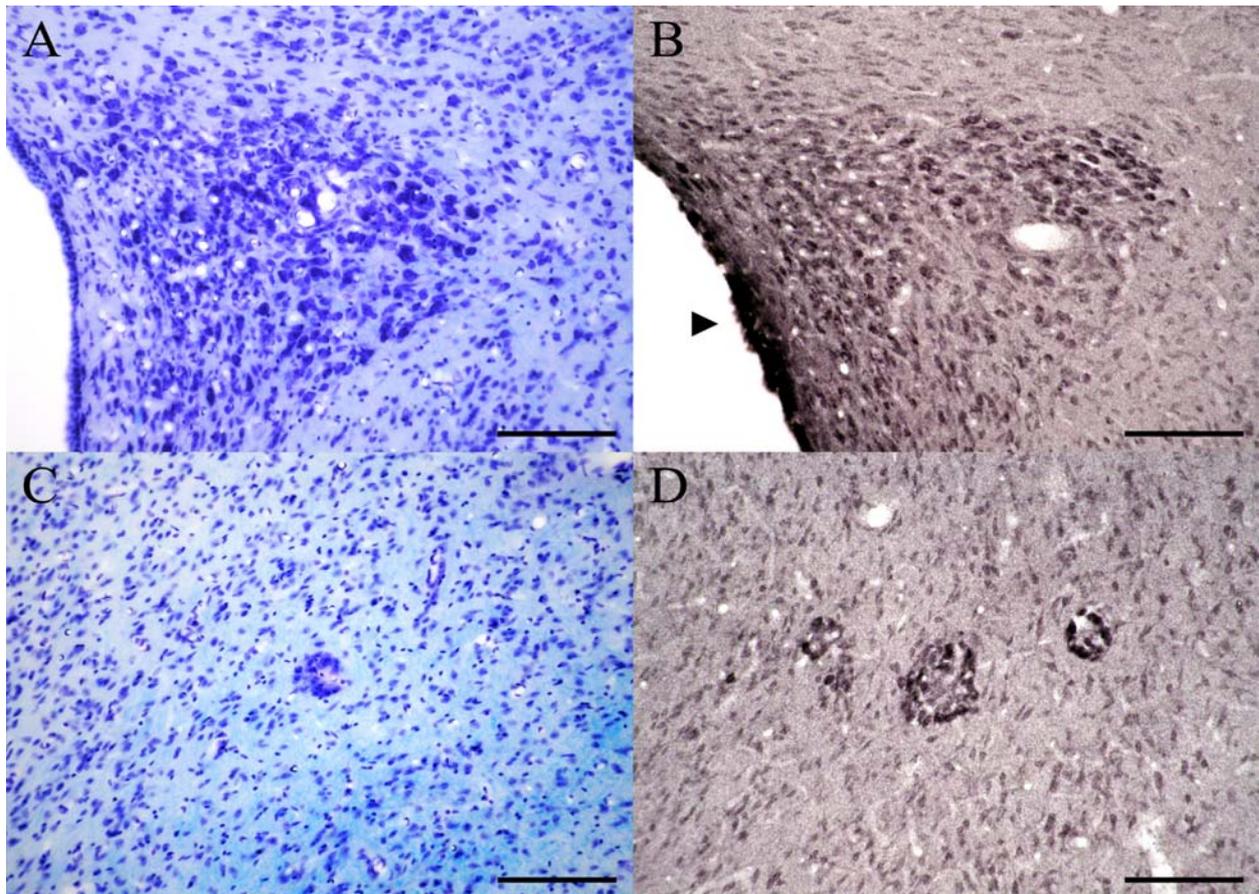


Abb. 3.18: Expression von $BK\beta_1$ im Ncl. paraventricularis hypothalami und zugehörigen neuroendokrinen Zellgruppen. A und C: Färbung nach Klüver-Barrera, B und D: Immunzytochemische Darstellung mit anti-r $BK\beta_1$ (1:2000 verdünnt). Sowohl magnozellularer, als auch parvozellulärer Anteile stellen sich deutlich positiv dar. ►: Positives Signal im Ependym des 3. Ventrikels. Der Maßstabsbalken entspricht 125 μm (20 x Vergrößerung).

Der Ncl. arcuatus der Ratte liegt dorsal der Area retrochiasmatica (**RCh**) und beginnt etwa bei Bregma -2.12 mm (Abb. 3.19). Zur besseren Orientierung sind die anliegenden Strukturen in Abb. 3.19A schematisch eingezeichnet. Ebenso wie der Ncl. paraventricularis hypothalami ist der Ncl. arcuatus Teil des parvozellulären neuroendokrinen Systems und sezerniert mit seinem parvozellulären Anteil Steuerhormone für den Hypophysenvorderlappen. Darüber hinaus ist der Ncl. arcuatus über die Interaktion einer Vielzahl verschiedener Neuropeptide maßgeblich an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt. Die Neuronengruppen dieses Kerns lassen sich ebenfalls durch anti-r $BK\beta_1$ nachweisen. Das immunzytochemische Signal ist hier jedoch etwas schwächer als im Ncl. paraventricularis hypothalami und im Ncl. supraopticus (Abb. 3.19B).

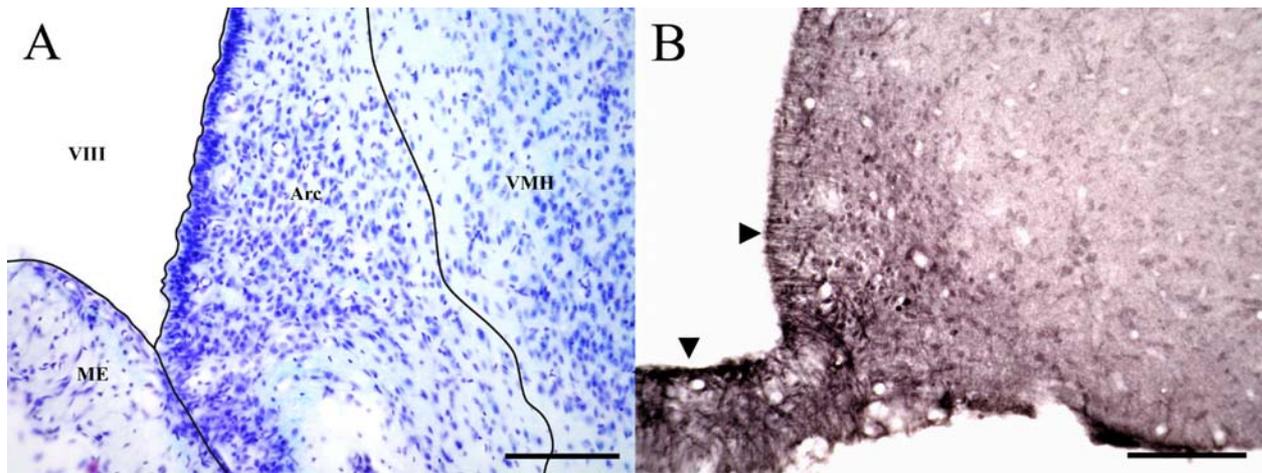


Abb. 3.19: Expression von $BK\beta_1$ im Ncl. arcuatus. A: Färbung nach Klüver-Barrera. Arc: Nucleus arcuatus, ME: Eminentia mediana, VIII: 3. Ventrikel, VMH: Ncl. ventromedialis hypothalami. B: Immunzytochemische Darstellung mit anti-r $BK\beta_1$ (1:2000 verdünnt). Innerhalb des Kerns stellen sich deutlich positive Zellen dar, was für eine Expression von $BK\beta_1$ spricht. ▼: Positives Signal im Ependym des 3. Ventrikels, ►: Positives Signal in Tanyzyten. Der Maßstabsbalken entspricht 250 μm (10 x Vergrößerung).

Die weiteren Ergebnisse zum Hypothalamus sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. $BK\beta_1$ wird demnach vor allem in neuroendokrin aktiven Kerngebieten des Hypothalamus verstärkt exprimiert. Neuroendokrine Zellen werden hierbei über Transmitterreize aktiviert. Da der Hormonhaushalt sehr fein reguliert wird, und eine Beteiligung von BK Kaliumkanälen an der Regulation der Transmitterausschüttung bereits beschrieben wurde (Hu et al. 2001), könnte $BK\beta_1$ in diesem Fall als Modulator der Feinregulation der Hormonausschüttung wirken.

Im Bereich des 3. Ventrikels stellten sich außerdem auch Tanyzyten positiv dar (Abb. 3.19B). Da darüber hinaus auch eine Expression von $BK\beta_1$ in Astrozyten gezeigt werden konnte (ohne Abb.), ist davon auszugehen, dass $BK\beta_1$ auch in unterschiedlichen Gliazellen (Ependymzellen, Tanyzyten und Astrozyten) exprimiert wird.

Region	BK β_1
Ncl. striohypothalamicus	-
Area preoptica	
<i>medialis</i>	-
<i>lateralis</i>	-
Nuclei preoptici	-
Ncl. periventricularis	○
Ncl. supraopticus	+++
Fornix	-
Ncl. suprachiasmaticus	-
Ncl. lateroanterior hypothalami	-
Area hypothalamica	
<i>anterior</i>	-
<i>lateralis</i>	++
<i>dorsalis</i>	-
<i>posterior</i>	-
Ncl. paraventricularis hypothalami	
<i>magnozellular</i>	+++
<i>parvozellulär</i>	++
Tuber cinereum	○
Decussatio supraoptica	-
Tractus opticus	-
Ncl. ventromedialis hypothalami	-
Ncl. arcuatus	+
Ncl. supraopticus, pars retrochiasmatica	+
Eminencia mediana	+
Ncl. dorsomedialis hypothalami	○
Nuclei tuberales	-
Ncl. premammilaris	-
Ncl. supramammilaris	-
Nuclei mammilares	-

Tab 3.1: Expression von BK β_1 im Hypothalamus der Ratte. Aufgelistet sind die Kerne und Areale des Hypothalamus. +++: Sehr starkes Signal, ++: Starkes Signal, +: Schwaches Signal, ○: Sehr schwaches Signal, -: Kein erkennbares positives Signal.

3.4.4 Expression von BK β_1 und BK β_2 im Hippocampus

Der Hippocampus ist als wichtiges funktionelles Zentrum für die Generierung von Gedächtnisinhalten anzusehen. Darüber hinaus ist er Bestandteil des limbischen Systems und wird mit endokrinen, viszeralen und emotionalen Vorgängen in Zusammenhang gebracht. Die Einteilung des Hippocampus ist innerhalb der gängigen Literatur bezüglich der Zugehörigkeit einzelner Strukturen uneinheitlich. Die folgenden Ausführungen beziehen sich daher auf eine von PAXINOS UND WATSON (1980) gewählte Differenzierung. Grundsätzlich wird der Hippocampus von drei Anteilen gebildet - dem Gyrus dentatus, dem Cornu ammonis (CA), welches nochmals in die Regionen CA1-CA3 aufgeteilt wird, und dem Subiculum. Den Großteil seiner Afferenzen erhält der Hippocampus dabei aus dem entorhinalen Kortex, die über den Tractus perforans sowohl den Gyrus dentatus, als auch die CA1 Region erreichen. Darüber hinaus erhält der Hippocampus auch direkte Afferenzen beispielsweise aus dem Hypothalamus und dem Corpus amygdaloideum. Seine Efferenzen ziehen über den Fornix unter anderem wieder zurück zum Hypothalamus (hauptsächlich zu den Corpora mammilaria), sowie in Kerngebiete des basalen Vorderhirns (beispielsweise zum Ncl. accumbens).

Eine Übersicht des Hippocampus bei Bregma -3,6 mm zeigt bereits, dass anti-rBK β_1 sowohl im Cornu ammonis, als auch im Gyrus dentatus ein spezifisches Signal erzeugt (Abb. 3.20B). Zur besseren Orientierung ist eine Abb. mit Färbung nach Klüver-Barrera gegenüber gestellt (Abb. 3.20A).

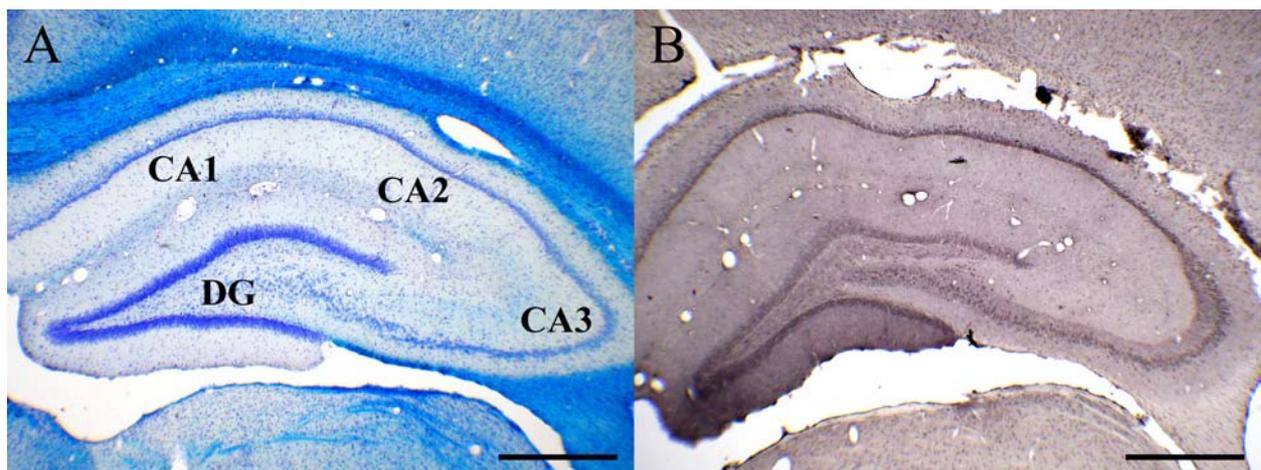


Abb. 3.20: Übersicht des Hippocampus (BK β_1). A: Färbung nach Klüver-Barrera, Regionen CA1-CA3, DG: Gyrus dentatus B: Immunzytochemische Darstellung mit anti-rBK β_1 (1:200 verdünnt). Der Maßstabsbalken entspricht 600 μ m (4 x Vergrößerung).

Auch in der immunzytochemischen Darstellung mit anti-rBK β_2 ist in der Übersicht ein spezifisches Signal erkennbar (Abb. 3.21B). Bei 4 x Vergrößerung erscheint das Signal hier zunächst schwächer als mit anti-rBK β_1 .

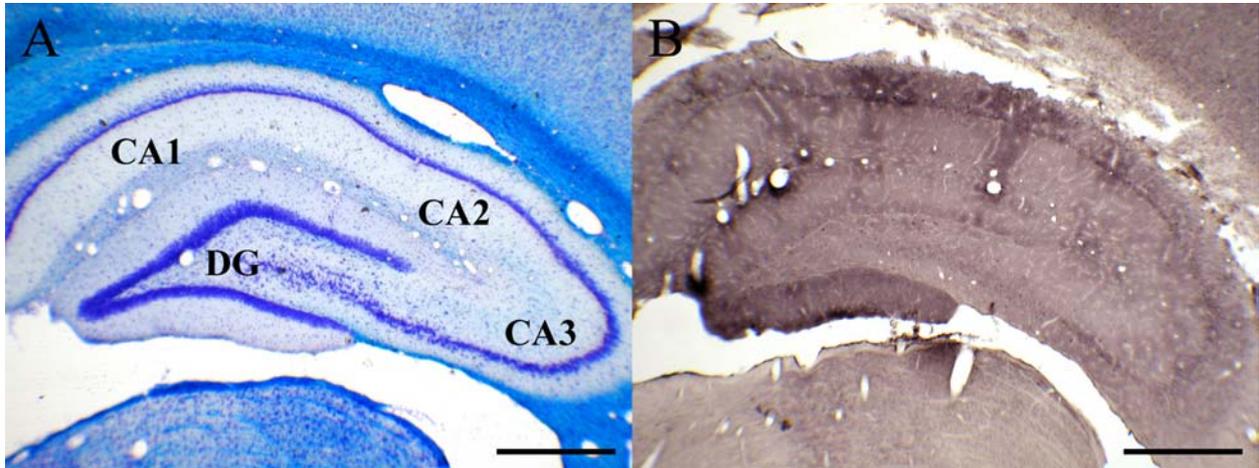


Abb. 3.21: Übersicht des Hippocampus (BK β_2). A: Färbung nach Klüver-Barrera, Regionen CA1-CA3, DG: Gyrus dentatus B: Immunzytochemische Darstellung mit anti-rBK β_2 (1:200 verdünnt). Der Maßstabsbalken entspricht 600 μm (4 x Vergrößerung).

Den Regionen CA1-CA3 des Cornu ammonis ist gemeinsam, dass ihr Schichtaufbau nahezu identisch ist. Die prominenteste Schicht ist die Pyramidenzellschicht (Stratum pyramidale) – hier konnte in den immunzytochemischen Darstellungen sowohl mit anti-rBK β_1 als auch mit anti-rBK β_2 das deutlichste Signal nachgewiesen werden, was für eine starke Expression beider Proteine in Somata von Pyramidenzellen spricht (Abb. 3.22 und 3.23 A-C). Direkt unter dem Stratum pyramidale befindet sich das relativ zellfreie Stratum oriens, in dem keine Expression von BK β_1 oder BK β_2 gezeigt werden konnte (Tabelle 3.2). Die Region CA3, nicht aber die Regionen CA1 und CA2, verfügt über eine dünne Schicht, das Stratum lucidum, welche durch die Axone der Moosfasern gebildet wird. Diese Schicht lässt sich mit dem Antikörper anti-rBK β_1 , nicht aber mit anti-rBK β_2 , spezifisch darstellen (Abb. 3.22C). Daraus kann gefolgert werden, dass BK β_1 in Axonen von Körnerzellen des Gyrus dentatus (siehe unten) exprimiert wird. Über dem Stratum lucidum, und in den Regionen CA1 und CA2 direkt über dem Stratum pyramidale, schließt sich das Stratum radiatum an. Die oberflächlichste Schicht wird durch das Stratum lacunosum moleculare gebildet. Im Stratum lacunosum moleculare konnte eine schwache zelluläre Expression von BK β_1 bzw. BK β_2 gezeigt werden, während im Stratum radiatum nur BK β_1 nachgewiesen werden konnte (Tabelle 3.2).

Der Gyrus dentatus verfügt über drei Schichten. Die oberflächlichste und relativ zellfreie Schicht ist das Stratum moleculare. Darunter befindet sich das als Hauptschicht des Gyrus dentatus angesehene Stratum granulosum. Die tiefste Schicht wird durch den so genannten „Hilus“ bzw. die polymorphe Zellschicht gebildet. Das deutlichste immunzytochemische Signal konnte mit den beiden Antikörpern anti-rBK β_1 und anti-rBK β_2 jeweils im Stratum granulosum nachgewiesen werden (Abb. 3.22D und 3.23D). Darüber hinaus ist jedoch auch ein Signal in der polymorphen Zellschicht zu erkennen, was in beiden Fällen für eine Expression von BK β_1 und BK β_2 spricht (Tabelle 3.2). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zur Expression von BK β_1 und BK β_2 im Hippocampus ist in Tabelle 3.2 dargestellt.

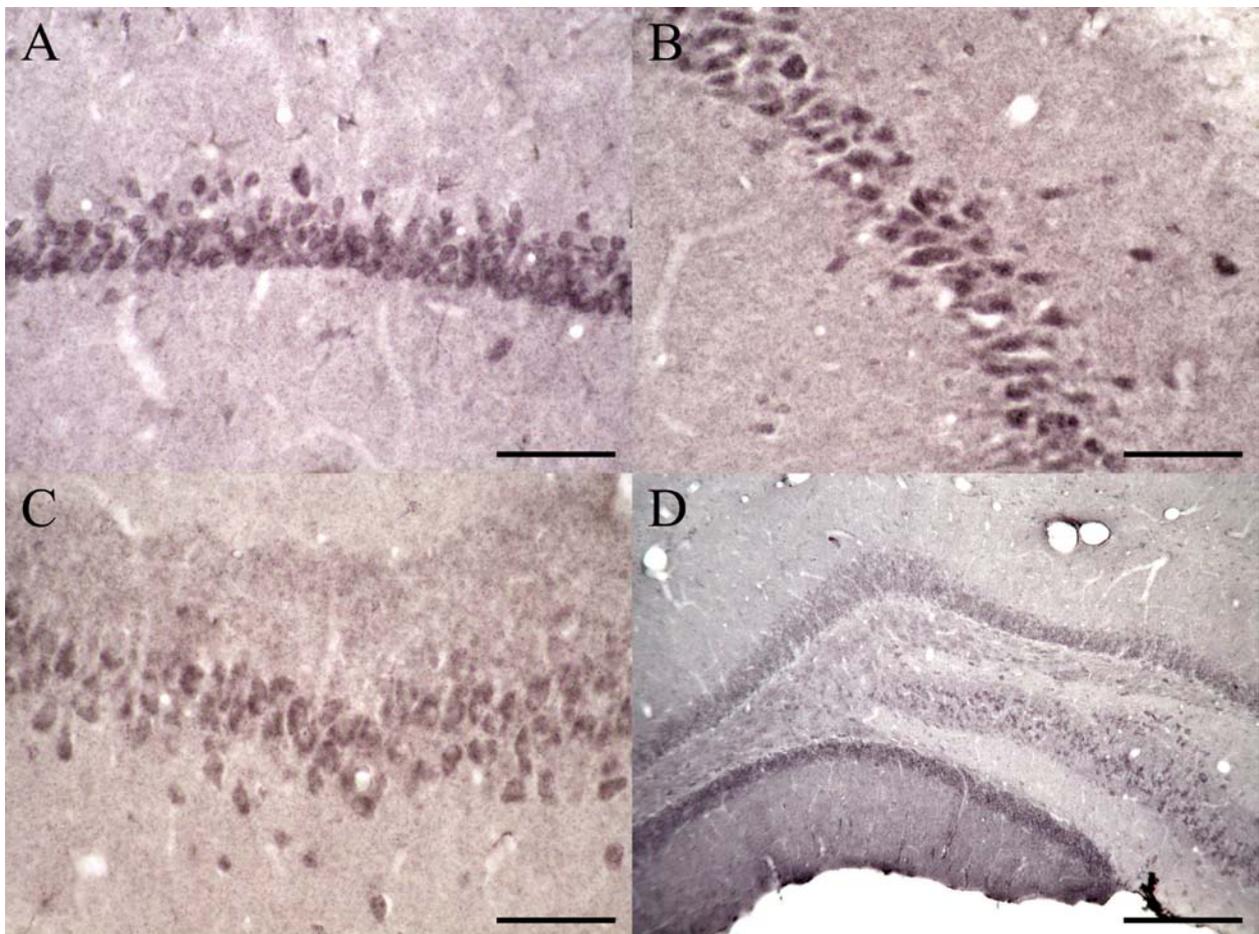


Abb. 3.22: Expression von BK β_1 im Hippocampus. A-C: Stratum pyramidale der Regionen CA1, CA2 und CA3. Der Maßstabsbalken entspricht 62,5 μm (40 x Vergrößerung). D: Gyrus dentatus. Der Maßstabsbalken entspricht 250 μm (10 x Vergrößerung). Der Antikörper anti-rBK β_1 wurde 1:200 verdünnt eingesetzt. Zu sehen ist das deutlich positive Signal im Stratum pyramidale (A-C), im Stratum lucidum (C), sowie im Stratum granulosum (D).

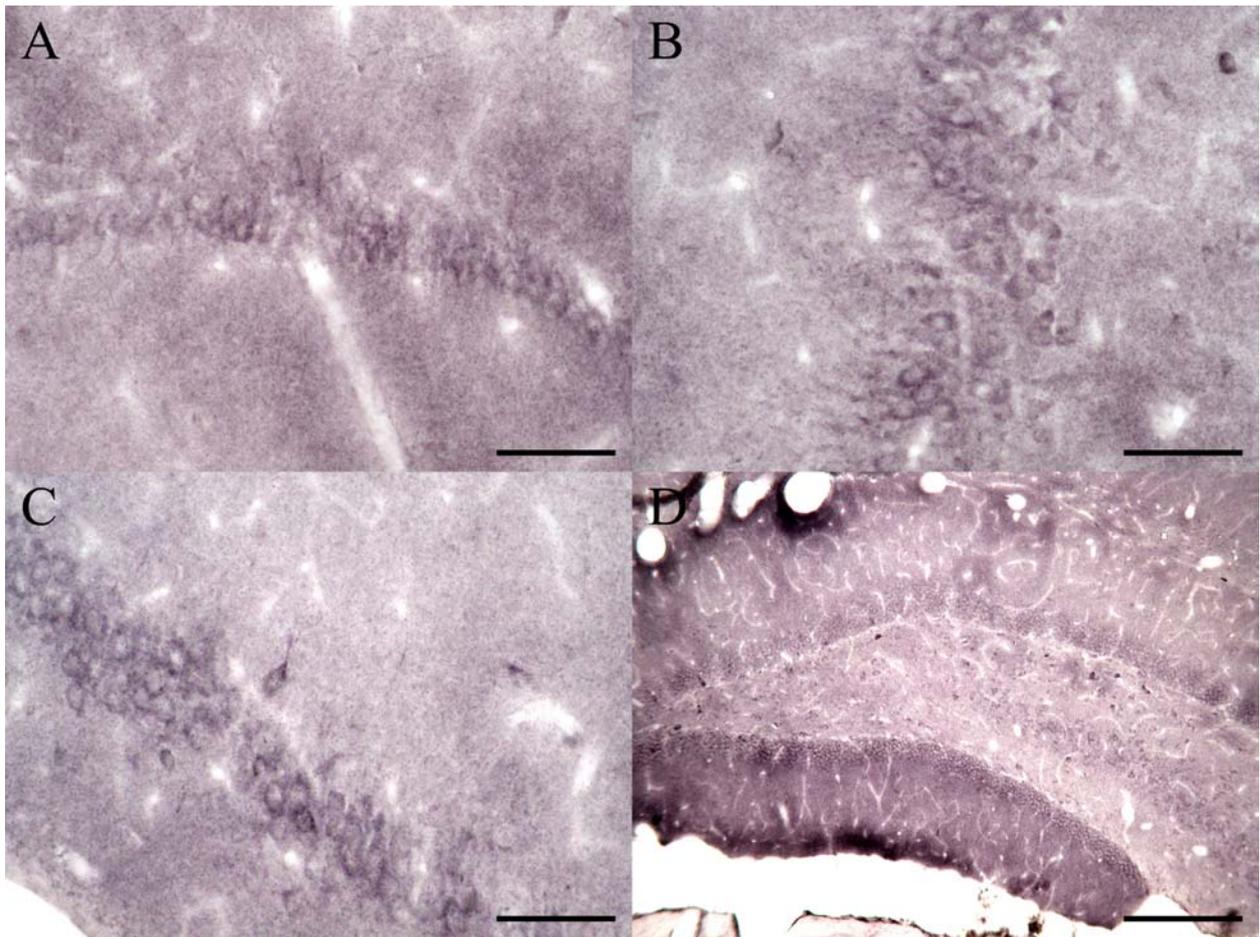


Abb. 3.23: Expression von BK β_2 im Hippocampus. A-C: Stratum pyramidale der Regionen CA1, CA2 und CA3. Der Maßstabsbalken entspricht 62,5 μm (40 x Vergrößerung). D: Gyrus dentatus. Der Maßstabsbalken entspricht 250 μm (10 x Vergrößerung). Der Antikörper anti-rBK β_2 wurde 1:200 verdünnt eingesetzt. Es zeigt sich ein positives Signal im Stratum pyramidale der Regionen CA1-CA3 (A-C), und im Stratum granulosum des Gyrus dentatus (D).

Region	BK β 1	BK β 2
CA1		
<i>Stratum oriens</i>	-	-
<i>Stratum pyramidale</i>	+++	+
<i>Stratum radiatum</i>	o	-
<i>Stratum lacunosum moleculare</i>	+	o
CA2		
<i>Stratum oriens</i>	-	-
<i>Stratum pyramidale</i>	+++	++
<i>Stratum radiatum</i>	o	-
<i>Stratum lacunosum moleculare</i>	+	o
CA3		
<i>Stratum oriens</i>	-	-
<i>Stratum pyramidale</i>	+++	++
<i>Stratum lucidum</i>	++	-
<i>Stratum radiatum</i>	o	-
<i>Stratum lacunosum moleculare</i>	+	o
Gyrus dentatus		
<i>Stratum moleculare</i>	-	-
<i>Stratum granulosum</i>	+++	++
<i>Hilus</i>	++	+
Subiculum	++	n. u.

Tab 3.2: Expression von BK β ₁ und BK β ₂ im Hippocampus der Ratte. Aufgelistet sind die Regionen des Hippocampus. **+++**: Sehr starkes Signal, **++**: Starkes Signal, **+**: Schwaches Signal, **o**: Sehr schwaches Signal, **-**: Kein erkennbares positives Signal, **n. u.**: nicht untersucht.

4. Diskussion

4.1 Spezifität der Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Verteilung der Untereinheiten BK β ₁ und BK β ₂ in verschiedenen Gehirnarealen der Ratte untersucht. Zu diesem Zweck wurden polyklonale, monospezifische Antikörper hergestellt, die gegen die extrazelluläre Schleife von BK β ₁ bzw. BK β ₂ gerichtet sind. Dabei wurde darauf geachtet, dass Probleme bezüglich der Spezifität der Antikörper, wie sie häufig bei kommerziell erhältlichen Antisera beschrieben wurden (Pradidarcheep et al. 2008), durch eine intensive Charakterisierung mittels ELISA, Western Blot Analysen und immunzytochemischen Methoden ausgeschlossen werden konnten. Somit konnten wir nahezu alle von Saper (2009) aufgestellten Kriterien (siehe unten) für eine adäquate Antikörpercharakterisierung erfüllen, ohne jedoch auf die jeweiligen Knock-out Tiere zurückgreifen zu können.

Im Gehirn wird hauptsächlich BK β ₄ exprimiert (Brenner et al. 2000a), während BK β ₁ und BK β ₂ nur in einzelnen Bereichen des Gehirns vorkommen. Eine Kreuzreaktivität der beiden im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Antikörper anti-rBK β ₁ und anti-rBK β ₂ gegen BK β ₄ kann jedoch ausgeschlossen werden, da Voruntersuchungen mittels ELISA und Western Blot keine Kreuzreaktivität gegen paraloge BK β -Untereinheiten zeigten, und BK β ₄ ohnehin nur eine geringe Homologie im Bereich der extrazellulären Schleife mit BK β ₁ und BK β ₂ besitzt (Orio et al. 2002). Zudem zeigt die immunzytochemische Untersuchung ein distinktes Verteilungsmuster, welches gut zu den bisher bekannten Verteilungen für BK β ₁ passt (Chang et al. 1997). Darüber hinaus korrelieren die Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchungen für BK β ₁ und BK β ₂ sehr gut mit *in situ* Hybridisierungen welche parallel in unserem Labor durchgeführt wurden (K. N. Seidel, persönliche Mitteilung). Als weiteres Kriterium für die Spezifität kann die Western Blot Analyse von Membranfraktionen des Gehirns herangezogen werden (Saper 2009). Hierbei wird sowohl für BK β ₁ als auch für BK β ₂ eine einzelne Bande detektiert (Saper 2009), deren Molekulargewicht sehr gut mit den durch Experimente anderer Autoren ermittelten Größen übereinstimmt (Knaus et al. 1994, Uebele et al. 2000). Aus diesen Gründen kann eine Kreuzreaktivität gegen andere gehirnspezifische Proteine nahezu ausgeschlossen werden. Zusammenfassend lässt sich folgern, dass die beiden Antikörper anti-rBK β ₁ und anti-rBK β ₂ spezifisch an ihr Zielprotein binden können, und somit zur Untersuchung der Verteilung von BK β ₁ und BK β ₂ im Gehirn der Ratte geeignet sind.

4.2 BK β_1 und BK β_2 im Gehirn der Ratte

Die Frage nach einer möglichen Expression von BK β_1 und BK β_2 im Gehirn konnte lange Zeit nicht eindeutig beantwortet werden (Wanner et al. 1999). BK β_1 mRNA konnte jedoch im Hippocampus (Tseng-Crank et al. 1996) und Hypothalamus (Chang et al. 1997), und BK β_2 mRNA im Großhirn gezeigt werden (Wallner et al. 1999, Brenner et al. 2000a). Außerdem ist kürzlich auch der Nachweis von BK β_1 und BK β_2 im Gehirn mit Hilfe von quantitativen PCR Versuchen gelungen (Poulsen et al. 2009). Darüber hinaus weisen auch elektrophysiologische Untersuchungen auf eine Expression von BK β_1 und BK β_2 im Großhirn hin (Sun et al. 2003). Unsere Untersuchungen mit Membranfraktionen im Western Blot bestätigen, dass BK β_1 und BK β_2 im Großhirn der Ratte exprimiert werden. Zudem war es möglich mit Hilfe der beiden affinitätsgereinigten, monospezifischen Antikörper, erstmalig eine Expression des BK β_1 und BK β_2 Proteins in verschiedenen Arealen des Gehirns zu zeigen.

4.3 Kollokalisierung von α - und β -Untereinheit

Die α -Untereinheit von BK Kaliumkanälen wird in vielen Arealen des Gehirns der Ratte exprimiert (Kap. 1.8). Einige Autoren gehen hierbei davon aus, dass BK α -Untereinheiten nicht notwendiger Weise mit BK β -Untereinheiten koexprimiert werden müssen, da ein nur aus α -Untereinheiten bestehendes Tetramer bereits einen funktionsfähigen Kaliumkanal bilden kann (Salkoff et al. 2006). Da aber lediglich ein Gen für die BK α -Untereinheit kodiert, stellt die Interaktionen mit BK β -Untereinheiten eine Möglichkeit dar, die Funktionalität dieser Kaliumkanäle an unterschiedlichste Anforderungen in verschiedenen Geweben anzupassen (McManus et al. 1995). Die vorliegende Arbeit zeigt jetzt, dass es eine deutlich umfassendere Verteilung von BK β -Untereinheiten und Koexpression des $\alpha\beta$ -Modells im Gehirn gibt, als bislang angenommen wurde. Außerdem ist die Lokalisation von BK β_1 und BK β_2 offenbar, wie auch die der α -Untereinheit, nicht auf das ZNS beschränkt (Pluznick et al. 2005, Grimm et al. 2007).

Die Lokalisation der α -Untereinheit im Gehirn wurde sowohl axonal (Knaus et al. 1996), an prä- und postsynaptischen Membranen (Hu et al. 2001, Sailer et al. 2006), als auch somatodendritisch (Lancaster et al. 1987, Womack et al. 2004, Sausbier et al. 2006) beschrieben. Unsere immunzytochemischen Untersuchungen zeigten jedoch hauptsächlich eine somatodendritische Verteilung von BK β_1 und BK β_2 . Lediglich in der hippocampalen Moosfaserzone konnte BK β_1 in axonalen Faserverbindungen gezeigt werden. Dies könnte bedeuten, dass BK Kaliumkanäle in Axonen und terminalen Nervenendigungen mit anderen BK β -Untereinheiten, beispielsweise mit

BK β_4 , assoziiert sind (Wynne et al. 2009). Darüber hinaus haben wir eine Expression von BK β_1 in Ependymzellen, Astrozyten und in Tanyzyten nachweisen können, so dass davon auszugehen ist, dass BK β -Untereinheiten auch an der Funktion nicht erregungsleitender Zellen beteiligt sind.

4.4 β -Untereinheiten verändern die pharmakologischen Eigenschaften von BK Kaliumkanälen

BK Kaliumkanäle sind bezüglich der mit ihnen zusammenhängenden therapeutischen Möglichkeiten durchaus viel versprechend, da ihre repolarisierenden Eigenschaften vielfältig einsetzbar sein könnten. So ist beispielsweise bekannt, dass BK β_1 eine Bindungsstelle für Estradiol enthält (Valverde et al. 1999), so dass auch auf diese Weise eine Ligandenaktivierung des BK Kaliumkanals erfolgen kann. Kürzlich wurde gezeigt, dass der Blocker von Östrogenrezeptoren Tamoxifen eine Dämpfung der neuronalen Erregbarkeit hippocampaler Neurone, unter anderem über BK-Ströme, erzeugt (Zhang et al. 2009). Ein solcher Mechanismus bedeutet eine Art „Notbremse“ bei übermäßiger Erregung (Hicks et al. 1998, Pacheco Otalora et al. 2008). Darüber hinaus können BK Kaliumkanäle durch eine Reihe von Toxinen geblockt werden, was möglicherweise bei der Therapie diverser chronischer Lungenerkrankungen von Bedeutung ist (Rogers et al. 1996), wobei BK β -Untereinheiten auch hier die Bindungseigenschaften des Toxinrezeptors mitbestimmen (Orio et al. 2002). Da BK β_1 -defiziente Mäuse (*KCNMB1* *-/-*) hypertensiv sind (Plüger et al. 2000, Grimm et al. 2009), spielen BK Kaliumkanäle, insbesondere in Verbindung mit der β_1 -Untereinheit, vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus. Aus diesem Grund ergeben sich auch hier durchaus pharmakotherapeutisch relevante Perspektiven (Tanaka et al. 2004, Tang et al. 2004). Schließlich konnten BK Kaliumkanäle auch in Verbindung mit Toleranzentwicklung bei Ethanolkonsum gebracht werden, da Ethanol in pharmakologischer Konzentration (EC_{50} von 24-65 mmol/l entsprechend 1,1 – 3,0 Promille) den Kanal aktivieren kann (Weiger et al. 2002). Zudem kommt es nach längerer Ethanoldiät bei Versuchstieren zu einer verringerten und diffusen Oberflächenexpression von BK Kaliumkanälen, was wiederum zu einer veränderten Neurohormonausschüttung im Hypothalamus-Neurohypophysen-System führt (Pietrzykowski et al. 2004). Andererseits scheint BK β_1 den Kanal insensitive gegenüber Ethanol zu machen, was bedeuten könnte, dass die Toleranzentwicklung nicht an Somata entsteht, sondern an der terminalen Nervenendigung, wo BK β_4 aber nicht BK β_1 in entsprechenden Neuronen des Hypothalamus exprimiert wird (Wynne et al. 2009).

4.5 BK β_1 wird in neuroendokrinen aktiven Kerngebieten des Hypothalamus exprimiert

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals detailliert die Lokalisation von BK β_1 in der Hypothalamusregion der Ratte. Die Daten zeigen eine deutliche Expression von BK β_1 im Ncl. supraopticus, Ncl. paraventricularis hypothalami und Ncl. arcuatus. Eine Expression im Ncl. suprachiasmaticus konnte nicht gezeigt werden, obwohl BK Kaliumkanäle in diesem Kern beschrieben wurden (Pitts et al. 2006). Es ist jedoch durchaus möglich, dass eine andere BK β -Untereinheit im Ncl. suprachiasmaticus exprimiert wird oder β -Untereinheiten freie BK Kanäle entsprechende Ströme generieren. Das immunzytochemische Signal im magnozellularen Anteil des Ncl. supraopticus korreliert sehr gut mit elektrophysiologischen Daten. Die Ca²⁺-Sensitivität von BK-Strömen in Zellkörpern magnozellularer Neurone des Ncl. supraopticus sind deutlich größer, als an terminalen Nervenendigungen dieser Zellgruppe (Dopico et al. 1999). Außerdem ist bekannt, dass BK Kaliumkanäle im Ncl. supraopticus, unter anderem NO-abhängig, exprimiert werden (Kadekaro et al. 2006). Da die [Ca²⁺]_i an terminalen Nervenendigungen im Rahmen der Ca²⁺-gesteuerten Transmitterfreisetzung steigt, würde eine niedrige Ca²⁺-Schwelle von BK Kaliumkanälen dort möglicherweise zu dauerhafter Hyperpolarisation führen, und so die Transmitterfreisetzung behindern. Dies ist vereinbar mit der von Wynne et al. (2009) aufgestellten Hypothese. Diese besagt, dass es eine somatodendritische $\alpha\beta_1$ -Assoziation und eine axonale $\alpha\beta_4$ -Assoziation in magnozellularen Neuronen des Ncl. supraopticus gibt. Dabei beschränkt sich eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung keineswegs nur auf BK Kaliumkanäle. Unterschiedliche Splicevarianten des spannungsabhängigen K⁺-Kanals K_v3.1 werden in Somata und Axonen derselben Neuronengruppen exprimiert (Ozaita et al. 2002). Darüber hinaus wurden unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen verschiedener Isoformen auch für T-Typ Ca²⁺-Kanäle (McKay et al. 2006) und HCN-Kanäle (*engl. hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels*, Brewster et al. 2007) beschrieben. Letztlich unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit die Möglichkeit einer unterschiedlichen subzellulären Verteilung von BK β -Untereinheiten (Wynne et al. 2009), da eine starke Expression von BK β_1 im Zellkörper magnozellularer Neurone des Ncl. supraopticus detektiert wurde, und BK β_1 eine höhere Ca²⁺-Sensitivität des BK Kanals erzeugt (Brenner et al. 2000b).

BK Kaliumkanäle sind für die schnelle Nachhyperpolarisation in Neuronen mitverantwortlich, wodurch sie sowohl die Wiedererregung durch einzelne Aktionspotentiale, als auch die Frequenz von Salven mitbestimmen (Greffrath et al. 2004). Ferner sind BK Kaliumkanäle nicht als isoliertes transmembranes Protein in der Zellmembran verankert, sondern sind mit weiteren

Kanalproteinen kolokalisiert, was eine Funktion als Einheit nahe legt. So wurden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vom L-, N-, P/Q-, und R-Typ bereits im Ncl. supraopticus charakterisiert (Joux et al. 2001), und eine sowohl axonale, als auch somatodendritische Kolokalisation von BK Kaliumkanälen und spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen in diversen Arealen des Gehirns beschrieben (Marrion et al. 1998, Grunnet et al. 2004). BK Kaliumkanäle liegen außerdem in unmittelbarer Nähe zu NMDA-Rezeptoren (Isaacson et al. 2004). Diese Kolokalisation könnte auch darauf beruhen, dass $\text{BK}\beta$ -Untereinheiten die Oberflächenexpression der $\text{BK}\alpha$ -Untereinheit über endozytotische trafficking-Mechanismen steuern (Toro et al. 2006, Zarei et al. 2007). Diese Überlegungen treffen nicht nur auf den Ncl. supraopticus, sondern auch auf magno- und parvozellulären Anteil des Ncl. paraventricularis hypothalami, sowie auf neurosekretorisch aktive Zellgruppen des Ncl. arcuatus zu, da in allen genannten Arealen eine Expression von $\text{BK}\beta_1$ in Zellkörpern gezeigt werden konnte. Damit übereinstimmend konnten in Neuronen des Ncl. arcuatus elektrophysiologisch bereits BK-Ströme gemessen werden (Yang et al. 2009). Außerdem wiesen $\text{BK}\alpha$ -defiziente Mäuse (*KCNMA -/-*) eine deutliche Hyporeagibilität der hypothalamischen Achse, sowie eine signifikant niedrigere Expression von CRH mRNA im parvozellulären Ncl. paraventricularis hypothalami im Vergleich zum Wildtyp auf (Brunton et al. 2007).

4.6 $\text{BK}\beta_1$ als Modulator bei der Ausschüttung von Neurohormonen im Hypothalamus

Die Ausschüttung der Neurohormone Oxytocin und Vasopressin im magnozellulären neuroendokrinen System des Hypothalamus ist eng an das Muster, sowie die Frequenz eingehender erregender Salven gekoppelt. Es existiert also eine Verbindung zwischen der elektrischen Aktivität des Zellkörpers und der ausgeschütteten Neurohormonmenge an der terminalen Nervenendigung (Cazalis et al. 1985). $\text{BK}\beta_1$ könnte daher indirekt die Neurohormonausschüttung an der terminalen Nervenendigung modulieren, indem die Ca^{2+} -Sensitivität von BK Kaliumkanälen im Zellkörper erhöht wird. Der BK Kaliumkanal kann so viel differenzierter auf Depolarisationvorgänge und den damit verbundenen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle reagieren und die Frequenz der Erregung modulieren, die wiederum zur Neurohormonausschüttung an der terminalen Nervenendigung führt.

Früher wurde der Informationsfluss in Neuronen als linear betrachtet, wobei die Information über die Dendriten ankommt, im Soma prozessiert wird und über das Axon weitergeleitet wird. Heute weiss man jedoch, dass es auch eine retrograde, dendritische Transmitterausschüttung gibt, welche vor allem der Kommunikation mit umliegenden Strukturen, sowie der Modulation

der synaptischen Übertragung dient (Ludwig et al. 2003, Bergguist et al. 2008). Eine weitere Möglichkeit wäre somit, dass BK β_1 an der Regulation der dendritischen, nicht aber der axonalen Neurohormonausschüttung beteiligt ist. Terminale Nervenendigung und Dendriten können unabhängig voneinander Oxytocin und Vasopressin sezernieren, wobei die Sekretionsvorgänge teilweise unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegen (Ludwig et al. 2006). Die Tatsache, dass BK β_1 somatodendritisch, nicht aber axonal in neurosekretorischen Zellen nachgewiesen werden konnte, würde eine solche Hypothese durchaus stützen.

4.7 BK β_1 und BK β_2 werden im Hippocampus exprimiert

Unsere Ergebnisse zeigen, dass sowohl BK β_1 , als auch BK β_2 in Somata von Pyramidenzellen und Körnerzellen exprimiert werden. Darüber hinaus zeigte sich eine schwächer ausgeprägte dendritische Expression beider Proteine. Die überlappende Expression beider BK β -Untereinheiten in Pyramiden- und Körnerzellen korreliert möglicherweise mit der gängigen Ansicht, dass unterschiedliche BK β -Typen mit einem BK α Tetramer assoziiert sein können (Brenner et al. 2000a). Des Weiteren konnte BK β_1 , nicht jedoch BK β_2 , in der Moosfaserzone des Gyrus dentatus und im Stratum lucidum gezeigt werden. Dieser Fasertrakt wird von Axonen der Körnerzellen gebildet, durch welche die Pyramidenzellen der CA3-Region innerviert werden. Nur sehr geringe bis gar keine Expression von BK β_1 bzw. BK β_2 konnte hingegen in den übrigen Schichten des Hippocampus nachgewiesen werden. Ausgehend vom $\alpha\beta$ -Modell decken sich diese Ergebnisse nur zum Teil mit denen anderer Autoren, da die α -Untereinheit immunzytochemisch hauptsächlich axonal (Knaus et al. 1996) und nur in geringen Mengen in Somata von Pyramiden- und Körnerzellen gezeigt werden konnte (Sailer et al. 2006, Sausbier et al. 2006). Andererseits gibt es elektrophysiologische Untersuchungen, die auch auf eine somatodendritische Expression von BK Kaliumkanälen in hippocampalen Neuronen hinweisen (Shao et al. 1999).

4.8 Die Rolle von BK β_1 und BK β_2 im Hippocampus

Hippocampale Pyramidenzellen feuern typischerweise Salven von 2-10 Aktionspotentialen bei einer Frequenz von 100-300 Hz, wobei es zum Ende der Erregung zu einer Verbreiterung der einzelnen Aktionspotentiale kommt (Fox et al. 1981). Da der größte Anteil an Ca²⁺ am Ende des Aktionspotentials in die Zelle strömt (Llinàs et al. 1982), erweist sich eben diese Verbreiterung als effizienter Mechanismus, den Ca²⁺-Einstrom zu erhöhen. Daraus ergeben sich zwei interessante Schlussfolgerungen. Einerseits erhöhen sowohl BK β_1 , als auch BK β_2 die Ca²⁺-Sensitivität von BK Kaliumkanälen, was bei Depolarisation der Zelle und starkem Ca²⁺-

Einstrom bei Verbreiterung der erregenden Salven schneller zu einer Aktivierung und Hyperpolarisation im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus kommt. Andererseits wäre denkbar, dass BK β_2 durch seinen intrazellulären „ball and chain“ Anteil den Kanal schnell verschließt, um eine weitere Erregung der Zelle zu gewährleisten.

BK Kaliumkanäle haben in Pyramidenzellen der CA3 Region je nach subzellulärer Lokalisation unterschiedliche Aufgaben, da sie in Somata an der Repolarisation des Aktionspotentials beteiligt sind, im terminalen Axon jedoch nicht (Hu et al. 2001, Raffaelli et al. 2004). Dies könnte auf eine Assoziation mit unterschiedlichen BK β -Untereinheiten auf subzellulärer Ebene hinweisen. Da BK β_1 und BK β_2 hauptsächlich somatodendritisch exprimiert werden, liegt somit die Hypothese nahe, dass sie, außer in Moosfasern, primär an der Modulation der Erregung, nicht aber an der Transmitterausschüttung beteiligt sind. In diesem Zusammenhang könnten sie an Lernvorgängen beteiligt sein, da die schnelle Nachhyperpolarisation bei Versuchstieren nach Lernprozessen deutlich verringert ist, was zu einer stärkeren Erregbarkeit hippocampaler Neurone führt (Mathews et al. 2008). BK β_1 wird auch in Axonen von Körnerzellen (Moosfaserzone und Stratum lucidum der CA3 Region) exprimiert. Da nach pharmakologischer Blockade von BK Kaliumkanälen mit Toxinen in der CA3-Region eine erhöhte Transmitterausschüttung gemessen wurde (Raffaelli et al. 2004), könnte BK β_1 dort die Transmitterausschüttung modulieren. Diese Hypothese wird dadurch bestärkt, dass einige blockierende Toxine (zum Beispiel Charybdotoxin) kovalent an die BK β_1 -Untereinheit binden, bzw. dass BK β_1 zumindest einen Teil des extrazellulären Toxinrezeptors bildet (Knaus et al. 1994a). Weshalb BK β_1 nicht auch in anderen Fasertrakten exprimiert wird, ist unklar. Denkbar wäre dort eine Koexpression der α -Untereinheit mit anderen BK β -Untereinheiten, oder die Expression unterschiedlicher Splicevarianten der α -Untereinheit, die eine entsprechende Funktion übernehmen. Denkbar wäre auch, dass BK β_1 deswegen nicht vorrangig axonal exprimiert wird, um die Transmitterausschüttung durch eine zu hohe Ca²⁺-Sensitivität nicht zu beeinflussen (siehe Kap. 4.5).

Die Tatsache, dass BK β_1 und BK β_2 , nicht aber die BK α -Untereinheit in großen Mengen in Somata von Pyramiden- und Körnerzellen exprimiert werden, könnte noch auf einen anderen bisher noch nicht erwähnten Umstand zurückzuführen sein. Möglicherweise werden BK β -Untereinheiten unabhängig von BK α -Untereinheiten exprimiert, und interagieren stattdessen mit anderen Ionenkanälen (Yang et al. 2010). Es gibt zu diesem Modell jedoch

bislang zu wenig wissenschaftliche Daten, weshalb über die Funktion von BK β_1 und BK β_2 in Assoziation mit anderen Ionenkanälen lediglich spekuliert werden könnte.

4.9 Abschließende Überlegungen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente und die daraus resultierenden Schlussfolgerungen ergänzen den derzeitigen Stand der Wissenschaft, da aufgrund elektrophysiologischer Untersuchungen am Hippocampus und Hypothalamus aufgestellte Hypothesen morphologisch belegt werden. Dabei erweisen sich die beiden neuen polyklonalen monospezifischen Antikörper anti-rBK β_1 und anti-rBK β_2 als leistungsfähiges Hilfsmittel, denn erstmals wird ein detailliertes morphologisches Korrelat für die Expression der Untereinheiten BK β_1 und BK β_2 im Großhirn der Ratte präsentiert. Da BK Kaliumkanäle durchaus auch von pharmakologischem Interesse sind, tragen die Ergebnisse dieser Arbeit zum weiteren Verständnis der Funktion und spezifischen Gewebeverteilung von BK Kaliumkanälen bei, und eröffnen perspektivisch neue therapeutische Möglichkeiten.

5. Zusammenfassung

β -Untereinheiten tragen maßgeblich zur Funktionalität und Vielfalt spannungsabhängiger Ca^{2+} -aktivierbarer BK Kaliumkanäle in verschiedenen Geweben bei. Durch die Modulation der physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften ermöglichen sie eine vielfältige Integration in diverse Signalkaskaden. Die Funktion der beiden Untereinheiten $\text{BK}\beta_1$ und $\text{BK}\beta_2$ ist elektrophysiologisch beschrieben, aber noch unzureichend verstanden. Ihre Lokalisation im Gehirn ist bisher im Detail noch nicht bekannt. Das Ziel dieser Arbeit ist deshalb die Untersuchung der genauen Lokalisation von $\text{BK}\beta_1$ und $\text{BK}\beta_2$ im Gehirn der Ratte mit immunzytochemischen Methoden. Perspektivisch soll damit der Grundstein für neue pharmakotherapeutische Möglichkeiten gelegt, sowie zum Verständnis der Rolle von BK Kaliumkanälen bei (patho-) physiologischen Vorgängen beigetragen werden.

Ein für die gesamte extrazelluläre Schleife der Untereinheiten $\text{BK}\beta_1$ und $\text{BK}\beta_2$ kodierender cDNA-Abschnitt wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und in die Expressionsvektoren pGEX-4T-1 und pET32b(+) kloniert. Nach Transformation in *E. coli* Bakterien erfolgte eine Überexpression der Proteine als entsprechendes Glutathion-S-Transferase- bzw. Thioredoxin-Fusionsprotein. Die Fusionsproteine wurden aufgereinigt und die GST-Fusionsproteine zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Die nach etwa 100 Immunisierungstagen gewonnenen Rohseren wurden dekomplementiert und die IgG-Komponente unter Entfernung der IgM-Komponente und unspezifischer gegen Extrazellulärmatrix und Kollagenfasern gerichteter Antikörper, angereichert. Die Kreuzreaktivität der Antiseren gegen das Trägerprotein, sowie gegen paraloge $\text{BK}\beta$ -Untereinheiten wurde entfernt und anschließend eine Affinitätsreinigung durchgeführt. Das Resultat waren polyklonale, monospezifische Antikörper gegen den extrazellulären Anteil der Proteine $\text{BK}\beta_1$ und $\text{BK}\beta_2$, deren Spezifität mittels Western Blot Analysen und ELISA Techniken charakterisiert wurde.

Die immunzytochemischen Untersuchungen zeigten eine Expression von $\text{BK}\beta_1$ im Hypothalamus, Hippocampus, Neocortex, in der medialen Habenula, sowie in unterschiedlichen Gliazellen. Eine Expression von $\text{BK}\beta_2$ konnte unter anderem im Hippocampus, im Neocortex und im Subkommissuralorgan detektiert werden. Die deutliche Expression von $\text{BK}\beta_1$ in Somata neuroendokrin aktiver Zellgruppen des Hypothalamus, besonders im Ncl. supraopticus, Ncl.

paraventricularis hypothalami und Ncl. arcuatus, legt eine Beteiligung an der Modulation der Erregungsfrequenz und der damit zusammenhängenden Hormonausschüttung an der präsynaptischen Membran der Zelle nahe.

Im Hippocampus werden BK β_1 und BK β_2 hauptsächlich in den Somata von Pyramiden- und Körnerzellen exprimiert. Es ist nahe liegend, dass beide Proteine an der Regulation eingehender erregender Salven beteiligt sind. Sie erhöhen die Ca²⁺-Sensitivität des BK Kaliumkanals und ermöglichen der Zelle sehr differenziert auf Änderungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration sowie des Membranpotentials zu reagieren. Zusätzlich konnte BK β_1 auch in der Moosfaserzone nachgewiesen werden, und ist dort möglicherweise an der Transmitterausschüttung beteiligt.

6. Literaturverzeichnis

Atkinson NS, Robertson GA, Ganetzky B. A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus. *Science* 1991;253:551-5.

Bao L, Cox DH. Gating and ionic currents reveal how the BKCa channel's Ca^{2+} sensitivity is enhanced by its beta1 subunit. *J Gen Physiol* 2005;126:393-412.

Bao L, Kaldany C, Holmstrand EC, Cox DH. Mapping the BKCa channel's " Ca^{2+} bowl": side-chains essential for Ca^{2+} sensing. *J Gen Physiol* 2004;123:475-89.

Bentrop D, Beyermann M, Wissmann R, Fakler B. NMR structure of the "ball and chain" domain of KCNMB2, the beta 2-subunit of large conductance Ca^{2+} -and voltage-activated potassium channel. *J Biol Chem* 2001;276:42116-21.

Bergguist F, Ludwig M. Dendritic transmitter release: a comparison of two model systems. *J Neuroendocrinol* 2008;20:677-86.

Brenner R, Jegla TJ, Wickenden A, Liu Y, Aldrich RW. Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel beta subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *J Biol Chem* 2000a;275:6453-61.

Brenner R, Pérez GJ, Bonev AD et al. Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* 2000b;407:870-6.

Brewster AL, Chen Y, Bender RA, Yeh A, Shigemoto R, Baram TZ. Quantitative analysis and subcellular distribution of mRNA and protein expression of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels throughout development in rat hippocampus. *Cereb Cortex* 2007;17:702-12.

Brunton PJ, Sausbier M, Wietzorrek G et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis hyporesponsiveness to restraint stress in mice deficient for large-conductance calcium- and voltage-activated potassium (BK) channels. *Endocrinology* 2007;148:5496-506.

Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981;112:195-203.

Butler A, Tsunoda S, McCobb DP, Wei A, Salkoff L. mSlo, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels. *Science* 1993;261:221-4.

Cazalis M, Dayanithi G, Nordmann JJ. The role of patterned burst and interburst interval on the excitation-coupling mechanism in the isolated rat neural lobe. *J Physiol* 1985;369:45-60.

Chang CP, Dworetzky SI, Wang J, Goldstein ME. Differential expression of the alpha and beta subunits of the large-conductance calcium-activated potassium channel: implication for channel diversity. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;45:33-40.

Cox DH, Aldrich RW. Role of the β_1 subunit in large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel gating energetics. Mechanisms of enhanced Ca^{2+} sensitivity. *J Gen Physiol* 2000;116:411-32.

Derst C, Karschin A. Evolutionary link between prokaryotic and eukaryotic K^+ channels. *J Exp Biol* 1998;201:2791-9.

Diaz L, Meera P, Amigo J et al. Role of the S4 segment in a voltage-dependent calcium-sensitive potassium (hSlo) channel. *J Biol Chem* 1998;273:32430-6.

Dopico M, Widmer H, Wang G, Lemos JR, Treistman SN. Rat supraoptic magnocellular neurones show distinct large conductance, Ca^{2+} -activated K^+ channel subtypes in cell bodies versus nerve endings. *J Physiol* 1999;519:101-14.

Du P, Cui GB, Wang YR, Zhang XY, Ma KJ, Wie JG. Down regulated expression of the beta1 subunit of the big-conductance Ca^{2+} sensitive K^+ channel in sphincter of Oddi cells from rabbits fed with a high cholesterol diet. *Acta Biochim Biophys Sin* 2006;38:893-9.

Du W, Bautista JF, Yang H et al. Calcium-sensitive potassium channelopathy in human epilepsy and paroxysmal movement disorder. *Nat Genet* 2005;37:733-8.

Elkins T, Ganetzky B, Wu CF. A Drosophila mutation that eliminates a calcium-dependent potassium current. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;3:8415-9.

Fox SE, Ranck JB Jr. Electrophysiological characteristics of hippocampal complex-spike cells and theta cells. *Exp Brain Res* 1981;41:399-410.

Garcia-Calvo M, Knaus HG, McManus OB, Giangiaco KM, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Purification and reconstruction of the high-conductance, calcium-activated potassium channel from tracheal smooth muscle. *J Biol Chem* 1994;69:676-82.

Garcia-Calvo M, Vasquez J, Smith M, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Characterization of the solubilized charybdotoxin receptor from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry* 1991;30:11157-64.

Geisler S, Heilmann H, Veh RW. An optimized method for simultaneous demonstration of neurons and myelinated fiber tracts for delineation of individual trunco- and palliothalamic nuclei in the mammalian brain. *Histochem Cell Biol* 2002;117:69-79.

Greffrath W, Magerl W, Disque-Kaiser U, Martin E, Reuss S, Boehmer G. Contribution of Ca^{2+} -activated K^{+} channels to hyperpolarizing after-potentials and discharge pattern in rat supraoptic neurones. *J Neuroendocrinol* 2004;16:577-88.

Grimm PR, Foutz RM, Brenner R, Sansom SC. Identification and localization of BK-beta subunits in the distal nephron of the mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293:350-9.

Grimm PR, Irsik DL, Settles DC, Holtzclaw JD, Sansom SC. Hypertension of *Kcnmb1*^{-/-} is linked to deficient K secretion and aldosteronism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:11800-5.

Grunnet M, Kaufmann WA. Coassembly of big conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels and L-type voltage-gated Ca^{2+} channels in rat brain. *J Biol Chem* 2004;279:36445-53.

Heginbotham L, Abramson T, McKinnon R. A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K^{+} channels. *Science* 1992;258:1152-5.

Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, McKinnon R. Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J* 1994;66:1061-7.

Heyer CB, Lux HD. Control of the delayed outward potassium currents in bursting pace-maker neurones of the snail, *Helix pomatia*. *J Physiol* 1976;262:349-82.

Hicks GH, Marrion NV. Ca²⁺-dependent inactivation of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channels in rat hippocampal neurones produced by pore block from an associated particle. *J Physiol* 1998;508:721-34.

Hu H, Shao LR, Chavoshy S et al. Presynaptic Ca²⁺-activated K⁺ channels in glutamatergic hippocampal terminals and their role in spike repolarization and regulation of transmitter release. *J Neurosci* 2001;21:9585-97.

Isaacson JS, Murphy GJ. Glutamate-mediated extrasynaptic inhibition: direct coupling of NMDA receptors to Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Neuron*;31:1027-34.

Jiang Z, Wallner M, Meera P, Toro L. Human and rodent MaxiK channel beta-subunit genes: cloning and characterization. *Genomics* 1999;55:57-67.

Joux N, Chevalyere V, Alonso G et al. High voltage-activated Ca²⁺ currents in rat supraoptic neurones: biophysical properties and expression of the various channel alpha1 subunits. *J Neuroendocrinol* 2001;13:638-49.

Kadekaro M, Su G, Chu R, Lei Y, Li J, Fang L. Nitric oxide up-regulates the expression of calcium-dependent potassium channels in the supraoptic nuclei and neural lobe of rats following dehydration. *Neurosci Lett* 2006;404:50-5.

Kaelin WG Jr, Krek W, Sellers WR et al. Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell* 1992;70:351-64.

Klüver H, Barrera E. A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 1953;12:400-3.

Knaus HG, Eberhart A, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Covalent attachment of charybdotoxin to the β -Subunit of the High conductance Ca^{2+} -activated K^+ Channel. *J Biol Chem* 1994a;269:23336-42.

Knaus HG, Folander K, Garcia-Calvo M et al. Primary sequence and immunological characterization of β -Subunit of high conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel from smooth muscle. *J Biol Chem* 1994b;269:17274-8.

Knaus HG, Garcia-Calvo M, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Subunit composition of the high conductance calcium-activated potassium channel from smooth muscle, a representative of the mSlo and slowpoke family of potassium channels. *J Biol Chem* 1994c;269:3921-4.

Knaus HG, Schwarzer C, Koch RO et al. Distribution of high-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels in rat brain: targeting to axons and nerve terminals. *J Neurosci* 1996;16:955-63.

Korovkina VP, Brainard AM, Ismail P, Schmidt TJ, England SK. Estradiol binding to maxi-K channels induces their down-regulation via proteasomal degradation. *J Biol Chem* 2004;279:1217-23.

Lagrutta A, Shen KZ, North RA, Adelman JP. Functional differences among alternatively spliced variants of Slowpoke, a *Drosophila* calcium-activated potassium channel. *J Biol Chem* 1994;269:20347-51.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.

Lancaster B, Nicoll RA. Properties of two calcium-activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurones. *J Physiol* 1987;389:187-203.

Langer P, Gründer S, Rüsçh A. Expression of Ca^{2+} -activated BK channel mRNA and its splice variants in the rat cochlea. *J Comp Neurol* 2003;455:198-209.

Latorre R, Oberhauser A, Labarca P, Alvarez O. Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annu Rev Physiol* 1989;51:385-99.

-
- Li W, Gao SB, Lv CX et al.** Characterization of voltage- and Ca^{2+} -activated K^+ channels in rat dorsal root ganglion neurons. *J Cell Physiol* 2007;212:348-57.
- Liu G, Shi J, Yang L, Cao L, Park SM, Cui J, Marx SO.** Assembly of a Ca^{2+} -dependent BK channel signaling complex by binding to beta2 adrenergic receptor. *EMBO J* 2004;23:2196-205.
- Liu G, Zakharov SI, Yang L et al.** Locations of the beta1 transmembrane helices in the BK potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:10727-32.
- Llinás R, Sugimori M, Simon SM.** Transmission by presynaptic spike-like depolarization in the squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:2415-9.
- Lu R, Alioua A, Kumar Y, Eghabali M, Stefani E, Toro L.** MaxiK channel partners: physiological impact. *J Physiol* 2006;570:65-72.
- Ludwig M, Leng G.** Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:126-36.
- Ludwig M, Pittman QJ.** Talking back: dendritic neurotransmitter release. *Trends Neurosci* 2003;26:255-61.
- Magleby KL.** Gating mechanism of BK (Slo1) channels: so near, yet so far. *J Gen Physiol* 2003;121:81-96.
- Marrion NV, Tavalin SJ.** Selective activation of Ca^{2+} -activated K^+ channels by co-localized Ca^{2+} channels in hippocampal neurons. *Nature* 1998;395:900-5.
- Martin G, Puig S, Pietrzykowski A, Zadek P, Emery P, Treistman S.** Somatic localization of a specific large-conductance calcium-activated potassium channel subtype controls compartmentalized ethanol sensitivity in the Ncl. accumbens. *J Neurosci* 2004;24:6563-72.
- Marty A.** Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature* 1981;291:497-500.

Matthews EA, Weible AP, Shah S, Disterhoff JF. The BK-mediated fAHP is modulated by learning a hippocampus-dependent task. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:15154-9.

McGahon MK, Zhang X, Scholfield CN, Curtis TM, McGeown JG. Selective downregulation of the BKbeta1 subunit in diabetic arteriolar myocytes. *Channels* 2007;1:141-3.

McKay BE, McRory JE, Molineux ML et al. Ca(V)₃ T-type calcium channel isoforms differentially distribute to somatic and dendritic compartments in rat central neurons. *Eur J Neurosci* 2006;24:2581-94.

McManus OB, Helms LM, Pallanck L, Ganetzky B, Swanson R, Leonard RJ. Functional Role of the beta subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. *Neuron* 1995;14:645-50.

Meera P, Wallner M, Song M, Toro L. Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S0) C terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:14066-71.

Meis S, Pape HC. Properties of a Ca²⁺-activated K⁺ conductance in acutely isolated pyramidal-like neurons from the rat basolateral amygdaloid complex. *J Neurophysiol* 1997;78:1256-62.

Morrow JP, Zakharov SI, Liu G, Yang L, Sok AJ, Marx SO. Defining the BK channel domains required for beta1-subunit modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:5096-101.

Nagar D, Liu XT, Rosenfeld CR. Estrogen regulates {beta}1-subunit expression in Ca²⁺-activated K⁺ channels in arteries from reproductive tissues. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H1417-27.

Nelson MT, Bonev AD. The beta1 subunit of the Ca²⁺-sensitive K⁺ channel protects against hypertension. *J Clin Invest* 2004;113:955-7.

Nishimaru K, Eghabali M, Lu R, Marijic J, Stefani E, Toro L. Functional and molecular evidence of MaxiK channel beta1 subunit decrease with coronary artery ageing in the rat. *J Physiol* 2004a;559:849-62.

Nishimaru K, Eghabali M, Stefani E, Toro L. Function and clustered expression of MaxiK channels in cerebral myocytes remain intact with aging. *Exp Gerontol* 2004b;39:831-9.

Niu X, Qian X, Magleby KL. Linker-gating ring complex as passive spring and Ca^{2+} -dependent machine for a voltage- and Ca^{2+} -activated potassium channel. *Neuron* 2004;42:745-56.

Orio P, Latorre R. Differential effects of beta 1 and beta 2 subunits on BK channel activity. *J Gen Physiol* 2005;125:395-411.

Orio P, Rojas P, Ferreira G, Latorre R. New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits. *News Physiol Sci* 2002;17:156-61.

Ozaita A, Martone ME, Ellisman MH, Rudy B. Differential subcellular localization of the two alternatively spliced isoforms of the Kv3.1 potassium channel subunit in brain. *J Neurophysiol* 2002;88:394-408.

Pacheco Otalora LF, Hernandez EF, Arshadmansab MF et al. Down-regulation of BK channel expression in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 2008;1200:116-31.

Pallanck L., Ganetzky B. Cloning and characterization of human and mouse homologs of the *Drosophila* calcium-activated potassium channel gene, slowpoke. *Hum Mol Genet* 1994;3:1239-43.

Pallotta BS, Magleby KL, Barrett JN. Single channel recordings of Ca^{2+} -activated K^+ currents in rat muscle cell culture. *Nature* 1981;293:471-4.

Paxinos G, Watson CR, Emson PC. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods* 1980;3:129-49.

Pietrzykowski AZ, Martin GE, Puig SI, Knott TK, Lemos JR, Treistman SN. Alcohol tolerance in large-conductance, calcium-activated potassium channels of CNS terminals is intrinsic and includes two components: decreased ethanol potentiation and decreased channel density. *J Neurosci* 2004;24:8322-32.

Pitts GR, Ohta H, McMahon DG. Daily rhythmicity of large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ currents in suprachiasmatic Ncl. neurons. *Brain Res* 2006;1071:54-62.

Plüger S, Faulhaber J, Fürstenau M et al. Mice with disrupted BK channel beta1 subunit gene feature abnormal $\text{Ca}(2+)$ spark/STOC coupling and elevated blood pressure. *Circ Res* 2000;87:E53-60.

Pluznick JL, Wei P, Grimm PR, Sansom SC. BK-beta1 subunit: immunolocalization in the mammalian connecting tubule and its role in the kaliuretic response to volume expansion. *Am J Physiol. Renal Physiol* 2005;288:F846-54.

Poulsen AN, Wulf H, Hay-Schmidt A, Jansen-Olesen I, Olesen J, Klaerke DA. Differential expression of BK channel isoforms and beta-subunits in rat neuro-vascular tissues. *Biochim Biophys Acta* 2009;1788:380-9.

Pradidarcheep W, Labruyère WT, Dabhoiwala NF, Lamers WH. Lack of specificity of commercially available antisera: better specifications needed. *J Histochem Zytochem* 2008;56:1099-111.

Pyott SJ, Meredith AL, Fodor AA, Vazquez AE, Yamoah EN, Aldrich RW. Cochlear function in mice lacking the BK channel alpha, beta1, or beta4 subunits. *J Biol Chem* 2007;282:3312-24.

Raffaelli G, Saviane C, Mohajerani MH, Pedarzani P, Cherubini E. BK potassium channels control transmitter release at CA3-CA3 synapses in the rat hippocampus. *J Physiol* 2004;557:147-57.

Robitaille R, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Charlton MP. Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron* 1993;11:645-55.

Rogers DF. Scorpion venoms: taking the sting out of lung disease. *Thorax* 1996;51:546-8.

Sailer SA, Kaufmann WA, Kogler M et al. Immunolocalization of BK channels in hippocampal pyramidal neurons. *Eur J Neurosci* 2006;24:442-54.

Santarelli LC, Chen J, Heinemann SH, Hoshi T. The beta1 subunit enhances oxidative regulation of large-conductance calcium-activated K⁺ channels. *J Gen Physiol* 2004;124:357-70.

Saper CB. A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. *J Histochem Cytochem* 2009;57:1-5.

Sausbier M, Hu H, Arntz C et al. Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca²⁺-activated K⁺ channel deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:9474-8.

Sausbier U, Sausbier M, Sailer CA et al. Ca²⁺-activated K⁺ channels of the BK-type in the mouse brain. *Histochem Cell Biol* 2006;125:725-41.

Salkoff L, Butler A, Ferreira G, Santi C, Wei A. High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:921-31.

Savalli N, Kondratiev A, de Quintana SB, Toro L, Olcese R. Modes of operation of the BKCa channel beta2 subunit. *J Gen Physiol* 2007;130:117-31.

Schreiber M, Salkoff L. A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys J* 1997;73:1355-63.

Schubert R, Nelson MT. Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:505-12.

Shanley LJ, O'Malley D, Irving AJ, Ashford ML, Harvey J. Leptin inhibits epileptiform-like activity in rat hippocampal neurones via PI 3-kinase-driven activation of BK channels. *J Physiol* 2002;545:933-44.

Shao LR, Halvorsrud R, Borg-Graham L, Storm JF. The role of BK-type Ca^{2+} -dependent K^+ channels in spike broadening during repetitive firing in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 1999;521:135-46.

Shen KZ, Lagrutta A, Davies NW, Standen NB, Adelman JP, North RA. Tetraethylammonium block of Slowpoke calcium-activated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes: evidence for tetrameric channel formation. *Pflügers Arch* 1994;426:440-5.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76-85.

Somogyi P, Tagaki H. A note on the use of picric acid-paraformaldehyde-glutaraldehyde fixative for correlated light and electron microscopic immunocytochemistry. *Neuroscience* 1982;7:1779-83.

Sun X, Gu XQ, Haddad GG. Calcium influx via L- and N-type calcium channels activates a transient large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ current in mouse neocortical pyramidal neurons. *J Neurosci* 2003;23:3639-48.

Tanaka Y, Koike K, Alioua A, Shigenobu K, Stefani E, Toro L. Beta1-subunit of MaxiK channel in smooth muscle: a key molecule which tunes muscle mechanical activity. *J Pharmacol Sci* 2004;94:339-47.

Tang XD, Garcia ML, Heinemann SH, Hoshi T. Reactive oxygen species impair Slo1 BK channel function by altering cysteine-mediated calcium sensing. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11:171-8.

Toro B, Cox N, Wilson RJ et al. KCNMB1 regulates surface expression of a voltage and Ca^{2+} -activated K^+ channel via endocytic trafficking signals. *Neuroscience* 2006;142:661-9.

Tseng-Crank J, Foster CD, Krause JD et al. Cloning, expression, and distribution of functionally distinct Ca^{2+} -activated K^+ channel isoforms from human brain. *Neuron* 1994;13:1315-30.

Tseng-Crank J, Godinot N, Johansen TE et al. Cloning expression and distribution of Ca^{2+} -activated K^+ channel beta subunit from human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9200-5.

Uebele VN, Lagrutta A, Wade T et al. Cloning and functional expression of two families of beta-subunits of the large conductance calcium-activated K^+ channel. *J Biol Chem* 2000;275:23211-8.

Valverde MA, Rojas P, Amigo J et al. Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science* 1999;285:1929-31.

Wallner M, Meera P, Toro L. Molecular basis of fast inactivation in voltage and Ca^{2+} -activated K^+ channels: a transmembrane beta-subunit homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:4137-42.

Wang B, Brenner R. An S6 mutation in BK channels reveals beta1 subunit effects on intrinsic and voltage-dependent gating. *J Gen Physiol* 2006;128:731-44.

Wang YW, Ding JP, Xia XM, Lingle CJ. Consequences of the stoichiometry of Slo1 alpha and auxiliary beta subunits on functional properties of large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels. *J Neurosci* 2002;22:1550-61.

Wang ZW, Kunkel MT, Wei A, Butler A, Salkoff L. Genomic organization of nematode 4TM K^+ channels. *Ann N Y Acad Sci* 1999;868:286-303.

Wanner SG, Koch RO, Koschak A et al. High-conductance calcium-activated potassium channels in rat brain: pharmacology, distribution and subunit composition. *Biochemistry* 1999;38:5392-400.

Weiger TM, Hermann A, Levitan IB. Modulation of calcium-activated potassium channels. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 2002 Mar;188(2):79-87.

Womack MD, Khodakhah K. Dendritic control of spontaneous bursting in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 2004;24:3511-21.

Wong AH, Lipska BK, Likhodi O et al. Cortical gene expression in the neonatal ventral-hippocampal lesion rat model. *Schizophr Res* 2005;77:261-70.

Wulf H, Hay-Schmidt A, Poulsen AN, Klaerke DA, Olesen J, Jansen-Olesen T. Molecular studies of BK(Ca) channels in intracranial arteries: presence and localization. *Cell Tissue Res* 2008;334:359-69.

Wynne PM, Puig SI, Martin GE, Treistman SN. Compartmentalized beta subunit distribution determines characteristics and ethanol sensitivity of somatic, dendritic, and terminal large-conductance calcium-activated potassium channels in the rat central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;329:978-86.

Yang CT, Zeng XH, Xia XM, Lingle CJ. Interactions between beta subunits of the KCNMB family and Slo3: beta4 selectively modulates Slo3 expression and function. *PloS One* 2009;4:e6135.

Yang MJ, Wang F, Wang JH et al. PI3-k integrates the effects of insulin and leptin on large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in neuropeptide Y neurons of the hypothalamic arcuate Ncl.. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298:E193-201.

Zarei MM, Song M, Wilson RJ et al. Endocytic trafficking signals in KCNMB2 regulate surface expression of a large conductance voltage and Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Neuroscience* 2007;147:80-9.

Zhang H, Xie M, Schools GP et al. Tamoxifen mediated estrogen receptor activation protects against early impairment of hippocampal neuron excitability in an oxygen/glucose deprivation brain slice ischemia model. *Brain Res* 2009;1247:196-211.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bidest.	bidestilliert
[Ca²⁺]_i	intrazelluläre Calciumkonzentration
Ca²⁺	Calciumionen
cDNA	komplementäre (<i>engl. complementary</i>) DNA
Cl⁻	Chloridionen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
EC₅₀	mittlere effektive Konzentration
g	Fallbeschleunigung
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
K⁺	Kaliumionen
Kap.	Kapitel
kb	kilo-Basen
kDa	kilo-Dalton
Ncl.	Nucleus
M	Mol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Na⁺	Natriumionen
pS	pico-Sievert
r	Präfix rattus- (Proteine), bzw. rabbit- (Antikörper)
u	units (<i>engl.</i>) Angabe der Aktivität
ZNS	Zentrales Nervensystem

Alle nicht aufgeführten Abkürzungen physikalischer Größen und deren Einheiten entsprechen dem SI-System (*franz. Système International d' Unités*). Ebenfalls nicht aufgeführt sind sämtliche Abkürzungen, die im Text erläutert werden, sowie gebräuchliche nicht-SI Einheiten.

Erklärung

Ich, Mikhail Salzmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Herstellung, Aufreinigung und Charakterisierung von polyklonalen Antikörpern gegen die β_1 - und β_2 -Untereinheit von BK Kaliumkanälen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

- Originalarbeit** **Salzmann M, Seidel KN, Bernard R, Prüss H, Veh RW, Derst C.** BK β 1 subunits contribute to BK channel diversity in rat hypothalamic neurons. Cell Mol Neurobiol 2010;30(6):967-76.
- Kongressbeiträge** **Seidel KN, Salzmann M, Marinc C et al.** Differential localization of BK potassium channel β -subunits in rat brain. FENS Forum 2008, Geneva.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Rüdiger W. Veh für die Überlassung des interessanten Themas, die stetige Geduld und Unterstützung, sowie für zahlreiche wertvolle Anregungen bedanken.

Herrn Dr. Christian Derst danke ich für die hervorragende Betreuung, die freundschaftliche Atmosphäre, die unermüdliche Hilfe bei technischen und moralischen Angelegenheiten, sowie das häufige Korrekturlesen.

Ich bedanke mich für die qualifizierte Unterstützung von Frau Semanur Ünsal, Frau Ina Wolter, Frau Heike Heilmann und Herrn Reinhard Lommel bei der Laborarbeit, sowie für viel Zeit und Geduld. Vielen Dank auch an Frau Annett Kaphahn für die technische Unterstützung.

Herrn Dr. René Bernard danke ich für die Motivation zum Vortrag innerhalb der Arbeitsgruppe, da dieser sehr zur Fertigstellung meiner Arbeit beitrug.

Frau Katharina N. Seidel danke ich vor allem für ihren Beistand bei den durchgeführten Experimenten.

Ganz besonders danke ich meinen Freunden, die mich während der gesamten Arbeit unterstützt und ermutigt haben.

Außerordentlicher Dank gebührt meinen Eltern, die mir das alles erst ermöglicht haben.