

**Universität Ulm**  
**Institut für Angewandte Physiologie**  
**Prof. Dr. Dr. h.c. Frank Lehmann-Horn**

**N-C Interaktionen des Ca<sup>2+</sup>-aktivierten  
Kaliumkanals, *hSK3***

**Dissertation**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Humanbiologie (Dr. biol. hum.)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von  
**Eva Maria Barbara Frei**  
aus Krumbach  
2006

**Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin**

**1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stephan Grissmer**

**2. Berichterstatter: PD Dr. Karl Föhr**

**Tag der Promotion: 16.02.07**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die Familie der Ca <sup>2+</sup> aktivierten K <sup>+</sup> Kanäle	1
1.2 SK Kanäle und ihre Bedeutung für die Erregbarkeit von Neuronen	3
1.3 Die Aktivierung der SK Kanäle durch Ca <sup>2+</sup>	5
1.4 Funktion N- und C-terminaler Bereiche	8
1.4.1 Modulation der Aktivierung am Beispiel der CNG Kanäle	8
1.4.2 Kanalzusammenbau und Transport zur Zytoplasmamembran	8
1.4.3 Der CAG Polymorphismus im N-Terminus von SK3 Kanälen	9
<b>2 Zielsetzung</b>	<b>11</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>12</b>
3.1 Lösungen und Chemikalien für die Molekularbiologie	12
3.2 Hefeexpressionsvektoren und Kontrollplasmide	15
3.2.1 Hefeexpressionsvektoren	15
3.2.2 Kontrollvektoren	15
3.2.3 Plasmidkonstrukte für Fusionsproteine	16
3.3 Hefe- und Bakterienstämme	16
3.3.1 Hefestämme	16
3.3.2 Bakterienstämme	17
3.4 Allgemeine molekularbiologische Methoden	17
3.4.1 Transformation	17
3.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA	17
3.4.3 Bestimmung der DNA-Konzentration	17
3.4.4 Restriktionsenzymatischer DNA-Verdau	18
3.4.5 Agarose-Gelelektrophorese	18
3.4.6 DNA Sequenzierung	18
3.5 Versuche mit dem Hefe-zwei-Hybrid-System	18
3.5.1 Klonierung in Hefe-Zwei-Hybrid-Vektoren	19
3.5.2 Hefezellkultur	20
3.5.3 Optische Bestimmung der Zelldichte	20
3.5.4 Herstellung kompetenter Hefezellen	21
3.5.5 Transformation in Hefezellen	21
3.5.6 Test der Plasmidkonstrukte auf Autoinduktion	21
3.5.7 Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen im LexA System	22
3.6 Elektrophysiologie	22
3.6.1 Kultivierung der Zellen für die Elektrophysiologie	22
3.6.2 Klonierung von SK3N_299	23
3.6.3 Transfektion	23
3.6.4 Durchführung der <i>patch-clamp</i> Experimente	23
3.7 Messungen der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> Konzentration	25
3.8 Immunzytochemische Versuche	26

<b>4 Ergebnisse</b>	<b>28</b>
4.1 Charakterisierung einer Interaktion zwischen zytosolischen Abschnitten des SK3 Kanals im Hefe-Zwei-Hybrid-System	28
4.1.1 Test zum Ausschluss einer Autoinduktion	29
4.1.2 Protein-Protein Interaktionen in Hefe	31
4.1.3 Zusammenfassung der Hefeergebnisse	35
4.2 Untersuchung der funktionellen Bedeutung der N-C und N-N Interaktionen von SK3 Kanälen	36
4.2.1 Intrazelluläre Lokalisation von SK3N_299 in tsA201 Zellen	36
4.2.2 Überprüfung einer physiologischen Bedeutung von N-C Interaktionen in SK3 Kanälen	37
4.2.3 Transiente Expression der Aminosäuren 1-299 in PC12 Zellen, die endogen SK3 Kanäle besitzen	38
4.2.4 Überprüfung ob N-C Interaktionen möglicherweise die Ca <sup>2+</sup> Aktivierung endogener SK3 Kanäle in PC12 Zellen beeinflussen?	39
4.2.5 Überprüfung ob N-C Interaktionen möglicherweise die Kanalaktivierung endogener SK3 Kanäle in PC12 Zellen durch 1-EBIO beeinflussen?	41
4.2.6 Zusammenfassung der funktionellen Untersuchung der N-C und N-N Interaktionen des SK3 Kanals	43
<b>5 Diskussion</b>	<b>45</b>
5.1 Die polymorphe Glutaminwiederholung im N-Terminus von SK3 Kanälen	45
5.2 Intrazelluläre Lokalisation von SK3N_299	46
5.3 Welche Funktion haben die N-N Interaktionen des SK3 Kanals?	47
5.4 N-C Interaktionen des SK3 Kanals	49
5.5 Beispiele für N-C Interaktionen und deren Bedeutung für die Kanalaktivierung aus der Literatur	50
5.6 Ausblick	51
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>53</b>
<b>7 Literaturliste</b>	<b>55</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	DNA	Desoxyribonukleinsäure
Abb.	Abbildung		( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
AD	Aktivierungsdomäne	DNA-BD	Desoxyribonukleinsäure-
ADH1	Alkoholdehydrogenase 1		Bindedomäne
AHP	afterhyperpolarisation	DO	<i>dropout</i>
	Nachhyperpolarisation	DPBS	Dulbecco's Phosphat
Amp	Ampicillin		gepufferte Salzlösung
amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz	DsRed	red fluorescent protein
BD	DNA-Bindedomäne	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Aqua bidest.</i>	Zweimal destilliertes Wasser	1-EBIO	1-ethyl-2-benzimidazolinone
BK	Ca <sup>2+</sup> -gesteuerter K <sup>+</sup> -Kanal mit großer Leitfähigkeit	EDTA	Ethylendiamin- tetraessigsäure
bp	Basenpaare	EGTA	Ethylenglykol-bis-(2- aminoethylethyl)- tetraessigsäure
BU-Salze	Pufferlösung für Hefemedien		
BSA	Rinderserumalbumin		
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen	EGY48	Hefestamm
CAG	Cytosin-Adenin-Guanin- Basentriplett	<i>Et al.</i>	und andere ( <i>et alii</i> )
CaM	Calmodulin	FCS	Fötale Kälberserum
CaMBD	Calmodulin-Bindedomäne	G	Gramm
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary</i> <i>desoxynucleic acid</i> )	Gal	Galaktose
		GAL1	Galaktosidase 1
		GFP	green fluorescent protein
cm	Zentimeter	Glc	Glucose
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter	<i>H</i>	menschlich ( <i>human</i> )
CNG-Kanäle	durch Bindung zyklischer Nukleotide aktivierte ( <i>cyclic nucleotide-</i> <i>gated</i> ) Kanäle	H	Stunde
		-his	ohne Histidin
		<i>HIS3</i>	für Histidinprototrophie kodierendes Gen
		HS	Pferdeserum
C-Terminus	umfasst den zytoplasmatisch C-Terminalen Abschnitt	IK1, SK4	Ca <sup>2+</sup> -gesteuerter K <sup>+</sup> -Kanal mit mittlerer Leitfähigkeit
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	K <sup>+</sup>	Kalium
		Kb	Kilobasen
DMSO	Dimethylsulfoxid	kDa	Kilodalton

Kv	spannungsgesteuerter K <sup>+</sup> -Kanal	pS	Picosiemens (1 x 10 <sup>-12</sup> Siemens)
l	Liter	purum p. a.	Reinheit für analytische Zwecke geeignet (purum pro analysis)
L	Leucin		
<i>lacZ</i>	für β-Galaktosidase kodierendes Gen	Q	Glutamin
LB	Bakterienmedium (Luria- Bertani Medium)	Raf	Raffinose
-leu	ohne Leucin	rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
<i>LEU2</i>	für Leucinprototrophie kodierendes Gen	S	Sekunde
LexA	DNA-Bindedomäne des Hefe-Zwei-Hybrid Systems	S1-S6	transmembranäre Segmente 1 – 6 bei K <sup>+</sup> -Kanälen
LTP	long term potentiation Langzeitpotenzierung	SD	synthetisches Dextrose- Medium
M	Molar	SK1-3,	
mg	Milligramm (1 x 10 <sup>-3</sup> g)	<i>KCNN1-3</i>	humaner Ca <sup>2+</sup> -gesteuerter K <sup>+</sup> -Kanal mit kleiner Leitfähigkeit 1-3
min	Minute		
ml	Milliliter (1 x 10 <sup>-3</sup> l)		
mM	millimolar (mmol/l)	T1-Domäne	Tetramerisierungs-domäne von Kv-Kanälen
n	beliebige Zahl		
NLS	Nuclear localisation signal, Kernlokalisierungssignal	Tab.	Tabelle
N-Terminus	umfasst den zytoplasmatisch N-Terminalen Abschnitt	-trp	ohne Tryptophan
		-ura	ohne Uracil
		UV	ultraviolett
N-C	Interaktion zwischen den	V	Volt
Interaktion	zytoplasmatisch N- Terminalen und C- Terminalen Abschnitten	v/v	Volumen pro Volumen
		Vol.	Volumenanteile
		w/v	Gewicht pro Volumen
N-N	Interaktion zwischen den	X-Gal	Substrat für β-Galaktosidase (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β-D-Galaktosid)
Interaktion	zytoplasmatisch N- Terminalen Abschnitten		
OD <sub>n</sub>	optische Dichte bei Wellenlänge λ = n	XL1-Blue	Bakterienstamm
PCR	Polymeraseketten-reaktion	YPD	Hefemedium
PEG	Polyethylenglykol		

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Familie der $\text{Ca}^{2+}$ aktivierten $\text{K}^+$ Kanäle

1958 wurden  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierte  $\text{K}^+$  Kanäle erstmals in Erythrozyten entdeckt. Dort führte ihre Aktivierung zur Hyperpolarisation der Zellmembran und zum Schrumpfen der Zellen (Gardos, 1958). Wenig später wurde ihr Vorkommen im Nervensystem der Schnecke und in spinalen motorischen Neuronen der Katze nachgewiesen (Meech *et al.*, 1972; Krnjevic *et al.*, 1972). 1980 publizierten gleich mehrere Arbeitsgruppen, dass  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierte  $\text{K}^+$  Kanäle auch in CA1-CA3 Neuronen des Säugerhippokampus zu finden sind, wo sie die Nachhyperpolarisation nach einem Aktionspotential vermitteln (Alger *et al.*, 1980; Hotson *et al.*, 1980; Schwartzkroin *et al.*, 1980). Seit ihrer Entdeckung wurden  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierte  $\text{K}^+$  Kanäle auch noch in zahlreichen weiteren Zelllinien und Geweben nachgewiesen. Aufgrund der Ergebnisse aus Einzelkanalmessungen und Untersuchungen mit spezifischen Toxinen wurden  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierte  $\text{K}^+$  Kanäle in BK, IK und SK Kanäle unterteilt.

### BK Kanäle

BK Kanäle wurden erstmals in Neuronen der Schnecke als TEA sensitive Komponente eines  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierten  $\text{K}^+$  Stromes beschrieben (Thompson *et al.*, 1977). Wie weiterführende Studien belegten, vermittelte dieser  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierte  $\text{K}^+$  Strom die Repolarisation und die schnelle Phase der Nachhyperpolarisation nach einem Aktionspotential (Kaczorowski *et al.*, 1996). In Einzelkanalmessungen zeigte sich, dass BK Kanäle (big conductance  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{K}^+$  channels) mit bis zu 250 pS die größte Einzelkanalleitfähigkeit unter den  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierten  $\text{K}^+$  Kanälen besaßen (Pallotta *et al.*, 1981). Besonderheit von BK Kanälen ist, dass ihr Öffnungsmechanismus nicht allein von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration, sondern auch vom Membranpotential abhängig ist. Neben der oben erwähnten TEA Sensitivität ( $K_d = 0.14$  mM) werden BK Kanäle auch noch von Skorpiontoxinen wie dem Charybdotoxin ( $K_d = 2.9$  nM) und dem Iberiotoxin ( $K_d = 1.7$  nM) blockiert (Wei *et al.*, 2005). BK Kanäle können eindeutig durch ihre pharmakologischen und kinetischen Eigenschaften von IK und SK Kanälen unterschieden werden. Aber auch der Sequenzvergleich zeigt, dass BK Kanäle (die vom *KCNMA1* Gen kodiert werden) kaum Ähnlichkeit zu IK und SK Kanälen besitzen und deshalb auch einer

eigenen Genfamilie angehören.

### **IK Kanäle**

Eine weitere Gruppe von  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierten  $\text{K}^+$  Kanälen sind die IK Kanäle. Sie waren 1958 die ersten  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierten  $\text{K}^+$  Kanäle, die in der Literatur beschrieben wurden. Damals bezeichnete man sie noch nach ihrem Entdecker als Gardos Kanäle, wie sich später jedoch herausstellte, handelte es sich um  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierte  $\text{K}^+$  Kanäle, welche mit 20-40 pS eine mittlere Einzelkanalleitfähigkeit in der Familie der  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierten  $\text{K}^+$  Kanälen besaßen (intermediate conductance  $\text{Ca}^{2+}$  activated K channels) (Hoffman *et al.*, 2003). IK Kanäle wurden, im Gegensatz zu den anderen  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierten  $\text{K}^+$  Kanälen, hauptsächlich in nicht erregbarem Gewebe gefunden (Joiner *et al.*, 1997; Ishii *et al.*, 1997). So konnte ihr Vorkommen wie bereits oben beschrieben für Erythrozyten gezeigt werden. Sie wurden aber auch z.B. in T-Lymphozyten nachgewiesen (Logsdon *et al.*, 1997), für deren Aktivierung sie eine bedeutende Rolle spielen (Jensen *et al.*, 1999). Der Öffnungsmechanismus von IK Kanälen ist spannungsunabhängig und wird allein durch einen Anstiegs der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration bestimmt. Zu den spezifischen Blockern der IK Kanäle zählen Charybdotoxin ( $K_d = 5$  nM), Maurotoxin ( $K_d = 1$  nM), Clotrimazol ( $K_d = 70$  nM) und Tram-34 ( $K_d = 20$  nM) (Wei *et al.*, 2005). Neben diesen Blockern gibt es auch Kanalaktivatoren wie die Substanz 1-EBIO, welche durch eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$  Sensitivität des Kanals zu einer Steigerung der Kanalaktivität führt (Singh *et al.*, 2001). IK Kanäle werden durch das Gen *KCNN4* kodiert und bilden zusammen mit SK Kanälen eine Genfamilie, nämlich die *KCNN* Genfamilie. Die Aminosäuresequenzen von IK und SK Kanälen sind zu 50-55 % konserviert (Ishii *et al.*, 1997).

### **SK Kanäle**

Die jüngste Entdeckung unter den  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierten  $\text{K}^+$  Kanälen sind die SK Kanäle. Sie werden auch als Apamin-sensitive,  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierte  $\text{K}^+$  Kanäle bezeichnet, weil sie die einzigen bisher bekannten  $\text{K}^+$  Kanäle sind, die durch Apamin, einer Komponente des Giftes der europäischen Honigbiene (*Apis mellifera*), blockiert werden (SK1:  $K_d = 8$  nM; SK2:  $K_d = 60\text{--}200$  pM; SK3:  $K_d = 10$  nM) (Wei *et al.*, 2005). Daneben sind SK Kanäle

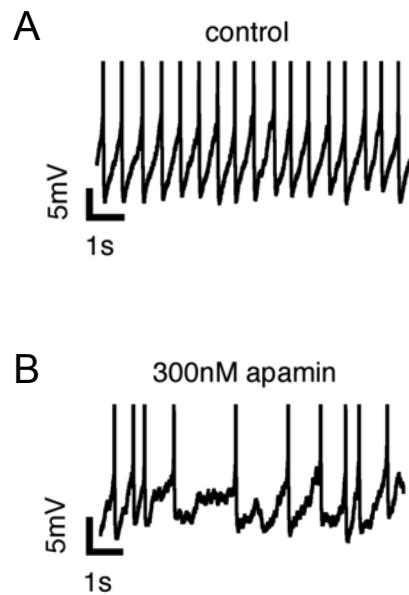


ebenfalls sensitiv gegenüber Skorpiontoxinen wie dem Tamapin (SK1:  $K_d = 42$  nM; SK2 und SK3:  $K_d = 24$  pM) oder dem Scyllatoxin (SK1:  $K_d = 325$  nM; SK2:  $K_d = 200$  pM; SK3:  $K_d = 1.1$  nM) (Wei *et al.*, 2005). Außer den peptidischen Blockern werden SK Kanäle auch noch durch organische Substanzen wie dem UCL1648 blockiert (SK1:  $K_d = 1$  nM; SK2:  $K_d = 250$  pM; SK3:  $K_d = 9.5$  nM) (Wei *et al.*, 2005). Ihre Sensitivität gegenüber dem Aktivator 1-EBIO teilen sie mit IK Kanälen (Pedarzani *et al.*, 2001). Wie Einzelkanalmessungen belegten, besitzen SK Kanäle (small conductance  $Ca^{2+}$  activated K channels) mit 9-10 pS die kleinste Einzelkanalleitfähigkeit unter den  $Ca^{2+}$  aktivierten  $K^+$  Kanälen und sie werden wie IK Kanäle ausschließlich durch  $Ca^{2+}$  aktiviert (Köhler *et al.*, 1996). SK Kanäle, von denen mittlerweile drei Mitglieder SK1, SK2 und SK3 kloniert wurden, gehören der *KCNN* Genfamilie an. SK1, SK2 und SK3 werden durch die Gene *KCNN1*, *KCNN2*, und *KCNN3* kodiert (Köhler *et al.*, 1996). Durch die Sensitivität gegenüber Apamin konnte eine wichtige Aufgabe der SK Kanäle identifiziert werden. SK Kanäle unterliegen wie BK Kanäle der Nachhyperpolarisation in Neuronen. Im Gegensatz zu BK Kanälen, welche die Repolarisation und die schnelle Phase der Nachhyperpolarisation vermitteln, wurde für SK Kanäle ein wichtiger Beitrag zur mittleren Phase der Nachhyperpolarisation nach Aktionspotentialen belegt. Da ich mich im Rahmen meiner Doktorarbeit mit SK Kanälen beschäftigt habe, möchte ich an dieser Stelle genauer auf die Familie der SK Kanäle eingehen.

## **1.2 SK Kanäle und ihre Bedeutung für die Erregbarkeit von Neuronen**

SK Kanäle kommen hauptsächlich im ZNS wie beispielsweise im Neokortex, Hippokampus, Thalamus, einigen kranialen Motoneuronen, subkorticalen Regionen und monoaminergen Neuronen des Mittelhirns vor (Stocker & Pedarzani 2000; Sailer *et al.*, 2002, 2004; Stocker *et al.*, 1999; Wolfart *et al.*, 2001).

Dort vermitteln sie die Nachhyperpolarisation nach einem Aktionspotential in Neuronen und beeinflussen dadurch entscheidend das Erregungsmuster dieser Neurone. Wird die SK Kanalaktivität, wie am Beispiel dopaminerger Neurone des Mittelhirns zu sehen ist, durch Apamin blockiert (Abb. 1), so verändert sich deren Erregungsmuster (Wolfahrt *et al.*, 2001). Die Regelmäßigkeit mit der dopaminerge Neurone normalerweise Aktionspotentiale generieren geht durch Blockade der SK Kanalaktivität verloren.



**Abb. 1:** Messungen von Aktionspotentialen in dopaminergen Neuronen der Substantia Nigra aus Wolfarth *et al.*, 2001. (A) Dopaminerge Neurone der Substantia Nigra generieren Aktionspotentiale mit großer Regelmäßigkeit. Die Abstände zwischen den einzelnen Aktionspotentialen sind sehr konstant und es gibt kaum eine Varianz. (B) Durch die Gabe von Apamin, einem sehr spezifischen SK Kanalblocker, geht die Regelmäßigkeit der generierten Aktionspotentiale verloren.

### Ein Blick auf die zelluläre Ebene

Wie soeben beschrieben unterliegen SK Kanäle der Nachhyperpolarisation nach einem Aktionspotential und kontrollieren dadurch die Erregung in Neuronen. Durch immer präziser werdende Untersuchungsmethoden kann mittlerweile bis auf zellulärer Ebene gezeigt werden, wie SK Kanäle die Erregung im Nervensystem beeinflussen. So fanden Ngo Anh und Koautoren (2005) vor kurzem, dass SK Kanäle mit NMDA-Rezeptoren in den dendritischen Dornfortsätzen von CA1 Neuronen kolokalisiert vorliegen (Ngo Anh *et al.*, 2005). Wenn NMDA-Rezeptoren während eines Endplattenpotentials  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle lassen (Sabatini *et al.*, 2002), werden SK Kanäle aktiviert und hyperpolarisieren die Zellmembran. Die Aktivität des NMDA-Rezeptors ist stark potentialabhängig und bei Potentialen nahe dem Ruhemembranpotential wird der NMDA-Rezeptor durch  $\text{Mg}^{2+}$  blockiert (Mayer *et al.*, 1984). Die SK Kanal vermittelte Hyperpolarisation führt folglich zur Inaktivierung des NMDA-Rezeptors. Dadurch besteht ein negativer Feedback-Mechanismus zwischen NMDA-Rezeptoren und SK Kanälen in CA1 Neuronen, welcher die Erregung beeinflusst.

Durch den negativen Feedback-Mechanismus zwischen SK Kanälen und NMDA-Rezeptoren beeinflussen SK Kanäle eine wichtige Funktion im Gehirn, nämlich die sogenannte Langzeitpotenzierung (LTP). Die LTP bezeichnet einen Vorgang bei der eine starke Aktivierung von afferenten Neuronen zu einer lang anhaltenden Verbesserung der synaptischen Übertragung führt. Für die verbesserte synaptische Übertragung während der LTP ist ein erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom in die Postsynapse verantwortlich, und dieser erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom wird in CA1 Neuronen durch NMDA-Rezeptoren vermittelt. Die durch die Langzeitpotenzierung verbesserte synaptische Übertragung unterliegt höchstwahrscheinlich auf molekularer Ebene dem Lernen. Da ein negativer Feedback-Mechanismus zwischen SK Kanälen und den NMDA-Rezeptoren besteht, beeinflussen SK Kanäle also die LTP in CA1 Neuronen.

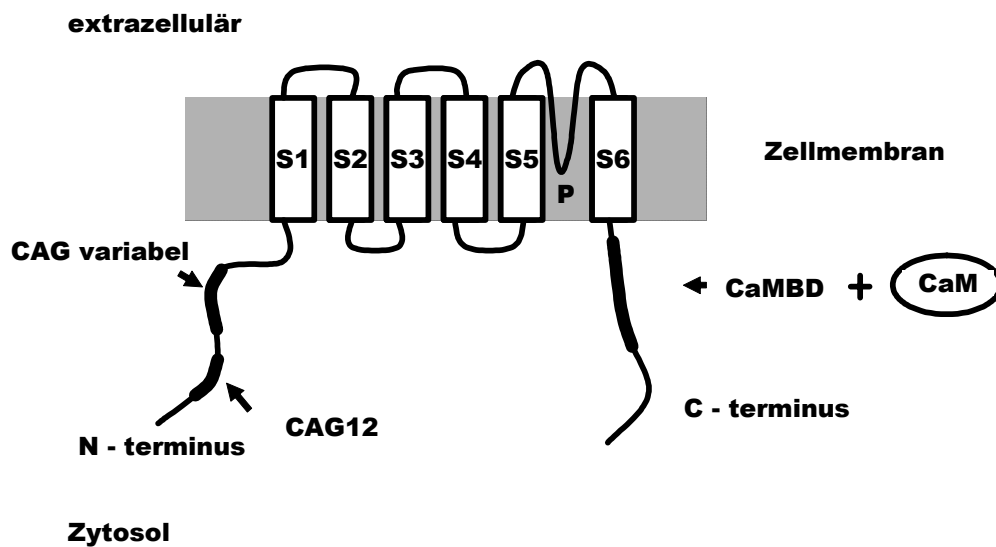
Wie schon in Tierversuchen mit dem SK Kanalblocker Apamin gezeigt wurde, kann in Mäusen die Fähigkeit zu lernen durch die Gabe von Apamin gesteigert werden. So wurde durch Apamin das Erlernen bestimmter Fähigkeiten, z.B. das Auffinden einer versteckten Plattform im Morris Wasserlabyrinth oder das Erkennen neuartiger Objekte, erleichtert (Stackman *et al.*, 2002). In Anbetracht der Ergebnisse von Ngo Anh und Koautoren (2005) beruht die gesteigerte Lernfähigkeit höchstwahrscheinlich auf einer Blockierung der SK Kanal Aktivität durch Apamin, wodurch es zur Steigerung der für den hippokampalen Lernvorgang entscheidenden NMDA-Rezeptor Aktivität kommt.

SK Kanäle sind zwar hauptsächlich im Nervensystem zu finden, ihr Vorkommen wurde aber auch außerhalb des Nervensystems für einige Zelllinien und Gewebe beschrieben, wie z.B. für eine Hypophysenzelllinie von Ratten (Lang & Ritchie, 1987), für adrenale, chromaffine Zellen (Park, 1994), für die Nebennieren, das Herz, (Köhler *et al.*, 1996), denervierten Skelettmuskel von Säugern (Pribnow *et al.*, 1999), Muskel von Patienten mit myotoner Dystrophie Typ 1 (Renaud *et al.*, 1986) und für menschliche leukämische T-Lymphozyten (Grissmer *et al.*, 1992; Jäger *et al.*, 2000).

### **1.3 Die Aktivierung der SK Kanäle durch $\text{Ca}^{2+}$**

SK Kanäle haben, ob sie nun im Nervensystem oder in anderen Zelllinien und Geweben vorkommen, eine grundlegende gemeinsame Eigenschaft: Ihre Öffnung erfolgt nicht spannungsabhängig sondern allein aufgrund eines Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration. Wie führt der Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration zur Öffnung des

Kanals? Die  $\alpha$ -Untereinheiten der SK Kanäle besitzen in ihrer Primärstruktur kein  $\text{Ca}^{2+}$  Bindemotiv. Die  $\text{Ca}^{2+}$  Aktivierung wird vielmehr durch das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindene Protein Calmodulin (CaM) vermittelt (Xia *et al.*, 1998). CaM ist als  $\beta$ -Untereinheit an alle 4 SK Kanal  $\alpha$ -Untereinheiten gebunden und vermittelt so die Aktivierung durch  $\text{Ca}^{2+}$ . Zur Verdeutlichung der Vorgänge bei der Kanalaktivierung ist in Abbildung 2 ist eine schematische Darstellung einer SK Kanal  $\alpha$ -Untereinheit zu sehen.



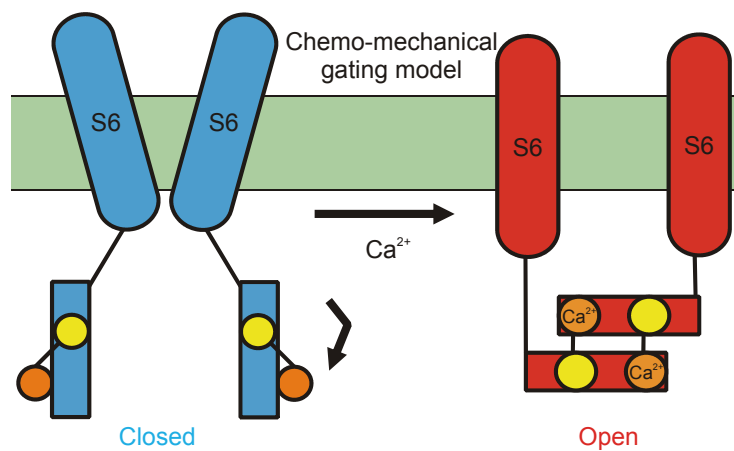
**Abb. 2:** Schematisches Modell einer  $\alpha$ -Untereinheit des SK3 Kanals. Gezeigt sind die 6 transmembranären Segmente S1-S6 und die Porenregion (P). N- und C-Termini der SK Kanäle liegen im Zytosol. Die Calmodulinbindedomäne (CaMBD) befindet sich im C-Terminus und bindet konstitutiv Calmodulin (CaM). Der SK3 Kanal besitzt im N-Terminus zwei Glutaminwiederholungen. Eine dieser Glutaminwiederholung besteht aus 12 Glutaminen, die zweite ist hoch polymorph.

4 SK  $\alpha$ -Untereinheiten formen normalerweise in funktionellen SK Kanälen ein Tetramer. Ähnlich wie bei Kv Kanälen besitzen SK Kanäle in jeder  $\alpha$ -Untereinheit 6 Transmembrandomänen (S1-S6). Der porenbildende Bereich (P) liegt zwischen dem 5. und 6. Transmembrandurchgang. CaM bindet konstitutiv und  $\text{Ca}^{2+}$  unabhängig am C-Terminus jeder der 4  $\alpha$ -Untereinheiten.

Die Region im C-Terminus, die CaM bindet, wird als Calmodulin-Bindedomäne (CaMBD) bezeichnet und schließt sich direkt an die S6 Helix an (Xia *et al.*, 1998; Keen *et al.*, 1999). Die CaMBD umfasst ca. 90 Aminosäuren. Zwischen den Aminosäurepositionen 421 und 440 liegen 30 Aminosäuren, welche die  $\text{Ca}^{2+}$  unabhängige Interaktion von CaM mit der CaMBD vermitteln (Schumacher *et al.*, 2001; Wissmann *et al.*, 2002). CaM ist ein

hantelförmiges Protein mit einer N- und einer C-terminalen globulären Domäne und einem flexiblen Verbindungsstück (Abb. 3). Beide globulären Domänen besitzen jeweils zwei sogenannte EF-Hand-Motive, bei welchen es sich um bekannte  $\text{Ca}^{2+}$  Bindemotive handelt. CaM bindet an die CaMBD über den C-terminalen globulären Bereich, wohingegen die  $\text{Ca}^{2+}$  Aktivierung durch die EF-Hände im N-terminalen Bereich vermittelt wird.

Mit Hilfe der Kristallstruktur von CaM und der CaMBD und biochemischen Daten konnte ein Modell entwickelt werden, welches die  $\text{Ca}^{2+}$  Aktivierung der SK Kanäle beschreibt (Keen *et al.*, 1999; Schumacher *et al.*, 2001). Während in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  der CaM-CaMBD Komplex monomer vorliegt (wie in der schematischen Darstellung in Abb. 3, linke Seite zu sehen ist), führt die  $\text{Ca}^{2+}$  Bindung zu einer Dimerisierung von CaM-CaMBD benachbart liegender Untereinheiten (Abb. 3, rechte Seite). Die Dimerisierung von CaM-CaMBD Komplexen induziert eine Rotationsbewegung der CaMBD, welche vermutlich an die angrenzende S6 Helix (SK Kanal Pore) weitergegeben wird und zur Öffnung des Kanals führt.



**Abb. 3: Chemo-mechanischer Öffnungsmechanismus der SK Kanäle nach Schumacher *et al.*, 2001.** Von den 6 Transmembrandurchgängen sind der Übersichtlichkeit halber nur die S6 Transmembrandurchgänge zweier Untereinheiten gezeigt. An diese schließen sich die CaMBD (Rechtecke) an, welche bereits CaM (gelber Kreis) konstitutiv und  $\text{Ca}^{2+}$  unabhängig gebunden haben. Die globuläre Domäne im N-Terminus von CaM (oranger Kreis) vermittelt die  $\text{Ca}^{2+}$  Aktivierung der SK Kanäle. In Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  erfolgt eine Dimerisierung der CaMBD zweier benachbart liegender Untereinheiten. Dies induziert möglicherweise eine Rotationsbewegung, welche an S6 weitergegeben wird und zur Öffnung der Pore führt.

## 1.4 Funktion N- und C-terminaler Bereiche

In SK Kanälen vermittelt der zytoplasmatische C-Terminus die Aktivierung durch  $\text{Ca}^{2+}$ . Neben der Aktivierung durch  $\text{Ca}^{2+}$  gibt es noch wenig Informationen über weitere Funktionen der zytoplasmatischen Abschnitte. Welche Funktion könnte den langen Abschnitten der SK Kanäle, die im Zytoplasma liegen, noch zukommen? Durch den Aufbau aus 6 Transmembrandomänen und langen zytoplasmatischen Abschnitten besitzen SK Kanäle große strukturelle Ähnlichkeit beispielsweise mit CNG Kanälen und Kv Kanälen, deren N- und C-Termini bezüglich funktioneller Eigenschaften bereits intensiv erforscht wurden.

### 1.4.1 Modulation der Aktivierung am Beispiel der CNG Kanäle

CNG (*cyclic nucleotide-gated*) Kanäle sind ligandengesteuerte Kanäle, deren Aktivierung durch die Bindung eines Liganden an einen zytoplasmatisch C-terminal gelegenen Abschnitt im Kanal vermittelt wird (Zagotta *et al.*, 1996). Interaktionen zytoplasmatischer N- und C-terminaler Abschnitte modulieren diesen Aktivierungsmechanismus (Varnum & Zagotta, 1997). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten zu CNG Kanälen könnte man sich auch bei SK Kanälen eine Modulation der Kanalaktivierung durch Interaktionen zytoplasmatischer Abschnitte vorstellen.

### 1.4.2 Kanalzusammenbau und Transport zur Zytoplasmamembran

Welche Funktion könnte den zytoplasmatischen Abschnitten der SK Kanäle noch zukommen? Der Blick zu Kv Kanälen zeigt, dass ein Bereich im zytoplasmatischen N-Terminus, die sogenannte T1 Domäne, eine wichtige Rolle beim Zusammenbau der Kanaluntereinheiten während der Kanalbiogenese spielt. T1 Domänen interagieren untereinander und gewährleisten eine subtypspezifische Tetramerisierung der 4  $\alpha$ -Untereinheiten (Shen *et al.*, 1995; Strang *et al.*, 2001). Wegen der strukturellen Ähnlichkeiten durch ihren Aufbau aus 6 Transmembrandomänen und langen Abschnitten im Zytoplasma, wird spekuliert, dass es in N- oder C-Termini der SK Kanäle ebenfalls eine Domäne gibt, welche die subtypspezifische Tetramerisierung reguliert. Für SK Kanäle konnte bisher jedoch noch keine Tetramerisierungsdomäne identifiziert werden.

Der Blick zu anderen  $K^+$  Kanälen verdeutlicht, dass zytoplasmatische Abschnitte verschiedenste Funktionen übernehmen. Weitere Untersuchungen sind nötig, um herauszufinden, ob die zytoplasmatischen Abschnitte der SK Kanäle neben der Aktivierung durch  $Ca^{2+}$  noch andere Funktionen besitzen.

### **1.4.3 Der CAG Polymorphismus im N-Terminus von SK3 Kanälen**

Möglicherweise besitzt der N-Terminus des SK3 Kanal durch eine strukturelle Eigenschaft eine besondere Funktion unter den SK Kanälen. Der N-Terminus des SK3 Kanals sticht unter den SK Kanälen durch zwei Glutaminwiederholungen hervor, von denen eine hoch polymorph ist (Abb. 2).

Während einige Studien einen Zusammenhang zwischen erblichen Schizophrenieerkrankungen sowie bipolaren affektiven Störungen und einer Verlängerung der polymorphen Glutaminwiederholungssequenz in SK3 aufzeigten (Chandy *et al.*, 1998; Cardno *et al.*, 1999; Dror *et al.*, 1999), konnten wiederum andere Studien diesen Befund jedoch nicht bestätigen (Li *et al.*, 1998; Antonarakis *et al.*, 1999; Bonnet-Brilhault *et al.*, 1999; Ujike *et al.*, 2001). Daneben erschien eine Studie, welche zeigte, dass nicht längere sondern gehäuft kürzere Wiederholungen in Patienten mit Schizophrenie auftreten (Stöber *et al.*, 1998). In einer weiteren Studie wurde beobachtet, dass sich die Länge der beiden Allele bei schizophrenen Patienten stärker unterscheidet als bei Kontrollpersonen (Saleem *et al.*, 2000).

In Kopplungsstudien wurde eine Verbindung bestimmter Formen von erblicher Schizophrenie mit dem Genlocus 1q21-22 aufgezeigt (Brzustowicz *et al.*, 2000). Da sich das *KCNN3*-Gen ebenfalls auf 1q21 befindet (Wittekindt *et al.*, 1998), bleibt der Verdacht weiterhin bestehen, dass *KCNN3* ein Kandidatengen für eine Form der erblichen Schizophrenie ist.

Natürlich stellt sich hier die Frage, weshalb eine Verlängerung einer Glutaminwiederholung im N-Terminus von SK3 die Entstehung von Schizophrenie begünstigen könnte? Wie durch Untersuchungen synthetischer Polyglutamine gezeigt wurde, bilden Glutaminwiederholungen Wasserstoffbrückenbindungen aus (Perutz *et al.*, 1994). So wurde spekuliert, dass eine Verlängerung der Glutaminwiederholung in SK3 die Interaktion der Untereinheiten des SK3 Kanals durch die vermehrte Entstehung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Kanaluntereinheiten verstärken könnte und so

zu einer veränderten Kanalexpression in der Membran führen könnte (Gargus *et al.*, 1998). Da der SK3 Kanal beispielsweise in dopaminergen Neuronen zu finden ist, welche mit der Entstehung von Schizophrenie in Verbindung gebracht werden, wäre ein pathogenes Feuern durch eine veränderte SK3 Kanalexpression vorstellbar (Wolfart *et al.*, 2001). Jedoch auch hier sind weitere Untersuchungen nötig, um eine mögliche physiologische Funktion der polymorphen Glutaminwiederholung im N-Terminus des SK3 Kanals aufzudecken.



## 2. Zielsetzung

Vorversuche zu dieser Arbeit hatten gezeigt, dass zytoplasmatische Abschnitte des SK3 Kanals in Hefe-Zwei-Hybrid-Versuchen miteinander interagieren (Doktorarbeit Isabell Spindler, Ulm). In diesen Versuchen interagierten sowohl die N-Termini miteinander als auch der N-Terminus mit dem C-Terminus. Der N-Terminus des SK3 Kanals ist durch zwei Glutaminwiederholungen gekennzeichnet, von denen eine hoch polymorph ist. Nur N-Termini mit einer Länge von 299 Aminosäuren und 19 Glutaminwiederholungen in der polymorphen Glutaminwiederholungssequenz interagierten in den Hefe-Zwei-Hybrid Versuchen miteinander. Fusionsproteine mit einer Länge von 274 Aminosäuren und 14 Glutaminen zeigten in Hefe-Zwei-Hybrid Versuchen keine Interaktion. Deshalb sollten in weiteren Hefe-Zwei-Hybrid-Versuchen folgende Fragen bearbeitet werden.

- 1.) Welchen Einfluss hat die Länge der polymorphen Glutaminwiederholung auf die N-C und N-N Interaktionen des SK3 Kanals bzw. welchen Einfluss hat die Länge des Fusionsproteins auf die Interaktion?
- 2.) In elektrophysiologischen Untersuchungen sollte eine mögliche physiologische Bedeutung der Interaktionen zytoplasmatischer Abschnitte des SK3 Kanals untersucht werden. Dabei stellten sich insbesondere folgende Fragen:
  - A.) Hat die N-C und / oder die N-N Interaktion eine Bedeutung für die Kanalexpression in der Membran?
  - B.) Führt eine Interaktion der N- oder C-Termini zu einer veränderten Kanalaktivierung durch  $\text{Ca}^{2+}$ ?
  - C.) Moduliert eine N-C oder N-N Interaktion in SK3 Kanälen die pharmakologischen Eigenschaften des Kanals?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Lösungen und Chemikalien für die Molekularbiologie

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland), Merck KGaA (Frankfurt, Deutschland), Invitrogen Ltd. (Paisley, Scotland, UK) und Carl Roth GmbH + Co-KG (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Weitere wichtige Substanzen und deren Bezugsquellen sind in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tab. 1: Herstellerangaben**

Substanz	Hersteller und weitere Angaben
Agarose	FMC Bioproducts, Rockland (MA), USA
DNA-Längenstandard	1 kb-Leiter Längenstandard von MBI Fermentas, St-Leon-Rot, Deutschland
-his-leu-trp-ura DO Supplement	4-fach Dropout von BD Biosciences Clontech, Palo Alto (CA), USA, Bestellnr.: 8616-1
Lachsspermien-DANN	Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande, Bestellnr.: 201190
Restriktionsenzyme	NEB, Frankfurt, Deutschland
Restriktionspuffer	Für alle kommerziellen Restriktionsenzyme von NEB wurden die entsprechenden Puffer mitgeliefert
SD Minimal Base	enthält Glukose als Kohlenstoffquelle, BD Biosciences Clontech, Palo Alto (CA), USA, Bestellnr.: 8602-1
SD/Gal/Raf Minimal Base	enthält Galaktose und Raffinose als Kohlenstoffquelle, BD Biosciences Clontech, Palo Alto (CA), USA, Bestellnr.: 8611-1
X-Gal	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Die Sterilisation der bezeichneten Lösungen erfolgte entweder für 20 min bei 121°C und einem Druck von 1,2 bar im Dampfdruckautoklaven oder durch Sterilfiltration mit

MILLEX<sup>®</sup>-GS Filtern der Firma Millipore (Molsheim, Frankreich) mit einer Porengröße von 0,22 µm. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Zusammensetzung der für molekularbiologische und biochemische Versuche verwendeten Lösungen. Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Substanzen in *Aqua bidest.* gelöst und der pH-Wert durch Titration mit 1 M Salzsäure, bzw. 1 M Natronlauge eingestellt.

**Tab. 2: Zusammensetzung der für molekularbiologische und Hefe-Zwei-Hybrid Versuche verwendeten Lösungen.**

Lösung	Zusammensetzung
Ampicillin-Stammlösung 1000x	100 mg/ml Na-Ampicillin in 50 % Ethanol; sterilfiltriert
BU-Salze 10x	70 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O, 30 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0
CaCl <sub>2</sub> -Lösung	0,1 M CaCl <sub>2</sub> ; autoklaviert
DNA-Ladepuffer	15 % Ficoll, 0,1 % Bromphenolblau
EDTA Stammlösung	0,5 M Ethylendiamintetraacetat-Na; pH 8,0
Ethidiumbromid	10 mg/ml
Glycerin 80 % (v/v)	Glycerin
LB Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl; pH 7,0
LB Agar	LB Medium mit 1,5 % (w/v) Agar, pH 7,0; autoklaviert
LiAc-Stammlösung 10x	1 M Lithiumacetat, pH 7,5
1x TE/LiAc-Lösung	10 mM Tris, 100 mM Lithiumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,5
PEG 50 %-Stammlösung	50 % (w/v) Polyethylenglykol 3350
PEG/LiAc-Lösung	40 % (w/v) Polyethylenglykol 3350, 100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
SD-ura-his-trp-leu-, SD-ura-his-trp-, SD-ura-his-, SD-ura-trp-Medien	Medien mit SD Minimal Base, -his-leu-trp-ura DO Supplement und zugegebener 100x Leucin- und/oder Tryptophan-Stammlösung
SD/Gal/Raf-ura-his-trp-leu ...	wie oben angegeben, nur mit SD/Gal/Raf Minimal Base
TBE-Puffer	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0
TE-Puffer	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5
TYGPN Medium	20 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l KNO <sub>3</sub> , 10 ml/l 80 % Glycerin, 5 g/l NA <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
X-Gal-Stammlösung	20 mg 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktosid/ml N,N-dimethylformamid
YPD Agar	YPD Hefe-Vollmedium mit 1,8 % Agar; autoklaviert
YPD Hefe-Vollmedium (YPD Flüssigmedium)	20 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Glukose, pH 5,8

Tabelle 3 gibt die Zusammensetzung der Aminosäurelösungen für die Hefe-Zwei-Hybrid Versuche wieder.

**Tab. 3: Aminosäurelösungen für die Hefe-Zwei-Hybrid Versuche.**

<b>Aminosäurelösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Histidin 1000x	L-Histidin HCl-Monohydrat 20 g/l
Leucin 100x	L-Leucin 10 g/l
Tryptophan 100x	L-Tryptophan 2 g/l
Uracil 10x	L-Uracil 200 mg/l

## 3.2 Hefeexpressionsvektoren und Kontrollplasmide

### 3.2.1 Hefeexpressionsvektoren

In Tabelle 4 sind die Eigenschaften der benutzten Hefeexpressionsvektoren dargestellt.

**Tab. 4:** Eigenschaften der benutzten Hefeexpressionsvektoren.

Name	Größe in kb	Promotor	Gen	Auxotrophien	Resistenzen
pLexA (Gyuris <i>et al.</i> , 1993)	10,2	ADH1	<i>LexA</i> <sub>(1-202)</sub>	<i>his3</i>	amp <sup>r</sup>
pB42AD (Gyuris <i>et al.</i> , 1993)	6,45	GAL1	Acidic activator B42	<i>trp1</i>	amp <sup>r</sup>
p8op-lacZ (Golemis <i>et al.</i> , 1994) Estojak <i>et al.</i> , 1995)	10,3	LexA <sub>op(x8)</sub>	<i>lacZ</i>	<i>ura3</i>	amp <sup>r</sup>

### 3.2.2 Kontrollvektoren

In Tabelle 5 sind alle benutzten Kontrollvektoren mit ihren Eigenschaften aufgelistet.

**Tab. 5:** Kontrollvektoren.

Name	Größe in kb	Promotor	Fusionsprotein	Auxotrophien	Resistenzen
pLexA-53 (Iwabuchi <i>et al.</i> , 1993)	11,1	ADH1	murines p53 <sub>(72-390)</sub>	<i>His3</i>	amp <sup>r</sup>
pB42AD-T (Chien <i>et al.</i> , 1993 ; Li & Fields, 1993)	8,5	GAL1	SV40 large T-Antigen <sub>(87-708)</sub>	<i>Trp1</i>	amp <sup>r</sup>
pLexA-Pos (Golemis <i>et al.</i> , 1994)	13,5	ADH1	LexA/GAL4 AD	<i>His3</i>	amp <sup>r</sup>
pLexA-Lam (Bartel <i>et al.</i> , 1993)	10,6	ADH1	humanes Lamin C <sub>(66-230)</sub>	<i>His3</i>	amp <sup>r</sup>

### 3.2.3 Plasmidkonstrukte für Fusionsproteine

Tabelle 6 fasst die in Hefe-Zwei-Hybrid Versuche eingesetzten SK3 Kanal Konstrukte zusammen (siehe Abb. 4).

**Tab. 6:** Benutzte SK3 Kanal Konstrukte.

Name	Größe in kb	Promotor	Fusionsprotein	Auxotrophien und Resistenzen	
SK3N_294-pLexA	11,1	ADH1	SK3N_294	<i>his3</i>	amp <sup>r</sup>
SK3N_297-pLexA	11,1	ADH1	SK3N_297	<i>his3</i>	amp <sup>r</sup>
SK3N_299-pLexA	11,1	ADH1	SK3N_299	<i>his3</i>	amp <sup>r</sup>
SK3N_300-pLexA	11,1	ADH1	SK3N_300	<i>his3</i>	amp <sup>r</sup>
SK3N_165-pLexA	10,7	ADH1	SK3N_165	<i>his3</i>	amp <sup>r</sup>
SK3N_274-pLexA	11	ADH1	SK3N_274	<i>his3</i>	amp <sup>r</sup>
SK3C-pLexA	10,8	ADH1	SK3C	<i>his3</i>	amp <sup>r</sup>
SK3N_299-pB42AD	7,3	GAL1	SK3N_299	<i>trp1</i>	amp <sup>r</sup>
SK3N_300-pB42AD	7,3	GAL1	SK3N_300	<i>trp1</i>	amp <sup>r</sup>
pB42AD-SK3C	7,0	GAL1	SK3C	<i>trp1</i>	amp <sup>r</sup>

## 3.3 Hefe- und Bakterienstämme

### 3.3.1 Hefestämme

Für die Hefe-Zwei-Hybrid Versuche in dieser Arbeit wurde der Hefestamm EGY48 benutzt (Genotyp: MATa, *his3, trp1, ura3, (lexAop)<sub>6</sub>* – LEU2,) (Estojak *et al.*, 1995).

### **3.3.2 Bakterienstämme**

Für die Transformation in Bakterien wurde der *Escherichia coli* (*E. coli*)-Bakterienstamm XL-1 Blue verwendet (Genotyp: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F<sup>c</sup> proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15, Tn10 (Tet<sup>r</sup>)] (Bullock *et al.*, 1987).

## **3.4 Allgemeine molekularbiologische Methoden**

### **3.4.1 Transformation**

Um ausreichend Plasmid-DNA für spätere Transfektionen in Säuger- und Hefezellen zu erhalten, wurden alle verwendeten Plasmide zunächst mittels Transformation in kompetente *E. coli*-Bakterien Stamm XL-1 Blue eingebracht und dort im Vermehrungszyklus vervielfältigt. Anschließend erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA mit Hilfe eines Quiagen Plasmid Midi Kits (siehe unten). Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien kam die CaCl<sub>2</sub>-Methode zum Einsatz (Mandel & Higa, 1970; Cohen *et al.*, 1972). Nach Transformation wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Bei Transformationen mit Plasmiden, die ein Gen für eine Ampicillinresistenz trugen, wurden die transformierten Bakterien auf LB Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Für die Transformation mit Plasmiden, die ein Gen für eine Kanamycinresistenz trugen, wurden die transformierten Bakterien auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Kanamycin ausplattiert.

### **3.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA**

Für die Isolierung der Plasmid-DNA wurde zunächst eine Vorkultur mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 kultiviert. Anschließend wurde mit dieser Vorkultur die Hauptkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag erfolgte die Isolierung der Plasmid DNA mit dem Quiagen Plasmid Midi Kit nach der Vorgabe des Herstellers.

### **3.4.3 Bestimmung der DNA-Konzentration**

Für Transformationen in Bakterien, für Transfektionen in eukaryontische Zellen und

weitere Anwendungen wie Klonierungen und Sequenzierungen war es sehr wichtig die Konzentration der eingesetzten DNA zu kennen. Deshalb wurde die Konzentration von DNA-Lösungen im Photometer bei 260 nm bestimmt, wobei eine optische Dichte von 1,0 ca. 50 µg Plasmid-DNA entsprach (Sambrook *et al.*, 1989). Zusätzlich wurde die DNA elektrophoretisch aufgetrennt und die Größe durch Vergleich mit einem Längenstandard abgeschätzt.

#### **3.4.4 Restriktionsenzymatischer DNA-Verdau**

Für Klonierungen wurde Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers im Restriktionsverdau enzymatisch geschnitten.

#### **3.4.5 Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Größenbestimmung von DNA und zur Aufreinigung geschnittener Plasmid-DNA wurden DNA-Proben mit 1/10 Volumen 10x DNA-Probenaufgabepuffer (nach Sambrook *et al.*, 1998) versetzt und je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente auf 0,8 bis 1 %igen Agarose-TBE-Gelen mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid aufgetragen und elektrophoretisch bei 100-130 V in TBE-Laufpuffer aufgetrennt. Die Länge der aufgetrennten DNA wurde in einem UV-Transilluminator durch Vergleich mit einem ebenfalls aufgetragenen Längenstandard bestimmt.

#### **3.4.6 DNA Sequenzierung**

Die Sequenzierung der DNA wurde von der Firma GATC Biotech, Konstanz, Deutschland durchgeführt.

### **3.5 Versuche mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System**

Das Hefe-Zwei-Hybrid System dient zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktion und kam im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung der N-N und N-C Interaktionen des SK3 Kanals zum Einsatz.

Im Hefe-Zwei-Hybrid-System macht man sich den Aufbau eukaryontischer Transkriptionsfaktoren zu nutze, die aus zwei trennbaren funktionellen Domänen, einer



DNA-Bindedomäne (BD) und einer Aktivierungsdomäne (AD) bestehen. Die BD dient der Bindung an die Operatorsequenz der DNA, die AD bindet an die DNA-abhängige RNA-Polymerase und ermöglicht so den Start der Transkription (Hope & Struhl, 1986; Keegan *et al.*, 1986). Normalerweise befinden sich beide Domänen in einem Protein. Die beiden Domänen können jedoch auch getrennt werden und die AD kann an ein Protein X und die BD an ein Protein Y fusioniert werden. Interagieren die Proteine X und Y, so werden die AD und BD in räumliche Nähe gebracht und können ihre Funktion als Transkriptionsfaktor ausüben, wodurch es zum Ablesen von Reportergenen kommt (Fields & Song, 1989).

In dieser Doktorarbeit wurde das LexA Matchmakersystem (Clontech) zur Überprüfung einer Interaktion zwischen zytosolischen Abschnitten des SK3 Kanals verwendet. Als BD kam LexA, ein 202 Aminosäuren großes bakterielles Protein zum Einsatz, welches an den LexA Operator bindet. Das als AD verwendete Protein umfasste 88 Aminosäuren. Bei den Reportergenen handelte es sich um das *LEU2*-Gen und das *lacZ*-Gen, welche beide unter der Kontrolle eines *LexA*-Promotors stehen. Das *LEU2*-Gen war ins Genom von EGY48 integriert und das *lacZ*-Gen befand sich auf dem Plasmid p8op-lacZ. Zu Beginn der Heferversuche wurde das Plasmid p8op-lacZ in den Hefestam EGY48 transformiert und in allen weiteren Versuchen wurde durch Abwesenheit von Uracil auf dieses Plasmid selektioniert.

### **3.5.1 Klonierung in Hefe-Zwei-Hybrid-Vektoren**

Um die SK Kanalsequenzen auf eine Protein-Protein-Interaktion zu testen wurden die SK-Kanalsequenzen entweder mit der BD oder der AD von LexA fusioniert. Die SK Konstrukte SK3C-B42AD, SK3N\_299-LexA, SK3N\_299-pB42AD, SK3N\_274 und SK3N\_165 wurden von Dr. Heike Jäger, Ulm, hergestellt. Entsprechend SK3N\_299-LexA, stellte ich verschiedene weitere Konstrukte, welche für SK3 Kanal Fusionsproteine mit verschieden langer Glutaminwiederholungssequenz kodierten, über PCR Amplifikation der AAD14 Sequenz des SK3 Kanals (Bereich des SK3 Kanals, welcher die polymorphe Glutaminwiederholung enthält) (Imbert *et al.*, 1996) von Patienten-DNA und anschließender TOPO TA Klonierung® in den Vektor pcDNA3.1/V5-His© TOPO® (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) her (AAD14 DNA wurde freundlicherweise von Dr. Deborah J. Morris-Rosendahl, Universität Freiburg, Freiburg, Deutschland zur Verfügung gestellt). Dazu wurde der 5'Primer: AAGTGCCCCTGTCCATCCTCT; und der

3'Primer: GCCAAGCAAGTGGTCATTGAG verwendet.

Anschließend wurde aus SK3N\_299-LexA ein *PstI/ BamHI* Fragment in den Vektor pcDNA3.1/V5-His© TOPO®, welcher das AAD14 Fragment enthielt, kloniert. Dadurch wurde die AAD14 DNA Sequenz in pcDNA3.1/V5-His© TOPO® um das *PstI/ BamHI* SK3 Fragment aus SK3N\_299-LexA verlängert. Es folgte eine *XhoI/ BamHI* Klonierung des verlängerten AAD14 Fragments aus dem Plasmid pcDNA3.1/V5-His© TOPO® in den Vektor pGEX-6P-1 (GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland). Aus pGEX-6P-1 wurden mit den Enzymen *EcoRI/ XhoI* SK3 Fragmente ausgeschnitten und in pLexA- und pB42AD Vektoren kloniert (Gyuris *et al.*, 1993). Alle Konstrukte, welche über PCR hergestellt wurden, wurden anschließend über eine Sequenzierung kontrolliert. Bis auf SK3C-LexA zeigte keines der Konstrukte eine Autoinduktion in Hefe.

### **3.5.2 Hefezellkultur**

Die Kultivierung der Hefezellen erfolgte entweder in YPD-Vollmedium oder in synthetischem Minimal-Medium SD bei 30°C im Brutschrank oder im Fall von Flüssigkulturen im Warmluftschüttler mit 250 rpm.

Aminosäurelösungen wurden entsprechend der Auxotrophiemarker des Hefestamms EGY48 und den verwendeten Plasmiden eingesetzt. Dazu wurde die Aminosäurelösung in 10 bis 1000-facher Konzentration angesetzt und in SD-Medium verdünnt.

### **3.5.3 Optische Bestimmung der Zelldichte**

Das Wachstum der Hefezellen in Flüssigkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm kontrolliert.

### **3.5.4 Herstellung kompetenter Hefezellen**

Einen Tag vor der Transformation wurden 50 ml Vorkultur mit einer Einzelkolonie des Hefestamms EGY48 inokuliert. Die Zellen wurden über Nacht im Warmluftschüttler inkubiert. Mit der Vorkultur wurde am nächsten Tag die Hauptkultur auf einen OD-Wert von 0,2 angeimpft. Die Hauptkultur wurde bis zu einer OD von 0,6 kultiviert und die Zellen wurden anschließend gerntet. Für die Zellernte wurden die Zellen für 10 Minuten bei 2000facher Erdbeschleunigung in sterilen 50 ml Falcon-Röhrchen zentrifugiert. Die

Zellpellets wurden einmal in 25 ml steriliem Aqua bidest resuspendiert und erneut pelletiert. Danach wurden die Zellen in 1x TE/LiAc-Lösung (siehe Tab. 2) aufgenommen.

### **3.5.5 Transformation in Hefezellen**

Für den Test auf Protein-Protein-Interaktion wurden die SK3 Fusionsproteine in verschiedenen Kombinationen in den Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] transformiert. Die transformierten Plasmide besaßen verschiedene Auxotrophiemarker für die der Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] defizient war. Deshalb konnte durch Kultivieren auf SD-Minimalmedien, welchen die entsprechenden Aminosäuren fehlten, auf das Vorhandensein der verschiedenen Plasmide selektioniert werden.

Für die Transformation in Hefe wurden 0,5 µg Plasmid-DNA mit 100 µg denaturierter Lachsperrnien-DNA als Träger-DNA versetzt und zu 100 µl kompetenter Hefezellen gegeben. Zu dieser Mischung wurden 600 µl frisch angesetzter PEG/LiAc-Lösung gegeben und 30 min bei 30°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 70 µl DMSO zugegeben und es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 15 min im Wasserbad. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen pelletiert, in 200 µl 1x TE aufgenommen und auf SD-Selektionsplatten ohne die jeweiligen Auxotrophie-Aminosäuren ausplattiert und bei 30°C für 3-5 Tage inkubiert.

### **3.5.6 Test der Plasmidkonstrukte auf Autoinduktion**

Vor dem eigentlichen Test auf Protein-Protein-Interaktion mussten die SK3 Fusionsproteine auf eine mögliche Autoinduktion getestet werden. Der Test auf Autoinduktion sollte ausschließen, dass BD-Fusionen allein bereits die Transkription der Reportergene aktivieren können. Die Expression der AD-Fusionen wird im LexA-System durch einen GAL1-Promotor kontrolliert. Dies bedeutet, dass die Expression der AD-Fusionen nur in Gegenwart von Galaktose und Raffinose erfolgt, während die Expression der AD-Fusionen durch die Verwendung von Glucose als Kohlenstoffquelle unterdrückt wird. Um auf Protein-Protein-Interaktion zu testen, müssen Transformanden deshalb auf Medien kultiviert werden, welche Galaktose und Raffinose als Kohlenstoffquelle enthalten.

Um auf Autoinduktion zu testen, wurden alle in dieser Arbeit verwendeten AD-Fusionen einzeln in den Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] transformiert und anschließend wurden Einzelkolonien auf SD/Gal/Raf-Platten ausgestrichen. Bei Blaufärbung der Kolonien lag

eine Autoinduktion vor.

### **3.5.7 Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen im LexA System**

Im Falle einer Protein-Protein-Interaktion zwischen zwei Proteinen werden die fusionierten Transkriptionsfaktor-Domänen in räumliche Nähe gebracht, wodurch sie die Transkription der Reportergene *LEU2* und *lacZ* aktivieren können. Durch Expression des *LEU2*-Gens ist die Hefezelle in der Lage Leucin herzustellen und kann daher auf Leucin-freiem Medium wachsen.

Das zweite Reportergen *lacZ* kodiert für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase. Dieses Enzym spaltet die normalerweise farblose Verbindung X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid) zu dem tiefblauen 5-Brom-4-Chlor-Indigo, weshalb blaue Hefekolonien auf eine Protein-Protein-Interaktion hinweisen.

Mindestens 4 Einzelkolonien wurden aus jeder Transformation (jede Transformation wurde mindestens dreimal wiederholt) auf verschiedene Selektionsmedien ausgestrichen und bei 30 °C inkubiert. Wachstum und Farbe der Hefekolonien wurden nach 3-5 Tagen protokolliert.

## **3.6 Elektrophysiologie**

In elektrophysiologischen Versuchen sollte die Funktion der N-C und N-N Interaktionen mit Hilfe der *patch-clamp* Methode an endogen exprimierten SK3 Kanälen in PC12 Zellen untersucht werden. Der Vorteil der *patch-clamp* Methode lag darin, eine mögliche Auswirkung der N-C und N-N Interaktionen direkt am funktionellen Ionenkanal zu untersuchen.

### **3.6.1 Kultivierung der Zellen für die Elektrophysiologie**

Die elektrophysiologischen Versuche in dieser Arbeit wurden an endogen exprimierten SK3 Kanälen in PC12 Zellen durchgeführt. PC12 Zellen wurden dazu in DMEM-Medium mit 15 % FCS bei 37°C unter 5 Vol. % CO<sub>2</sub> in einem luftbefeuchteten Inkubator kultiviert. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen durch kräftige Spülen mit frischem Medium abgelöst und im Verhältnis 1:3 bis 1:5 in neues Medium überführt. Für elektrophysiologische Experimente wurden die Zellen auf poly-Lysin beschichtete Deckgläschen ausplattiert.

Zuvor war auf die Deckgläschen ein Teflonring mit einem Durchmesser von 2 cm mit Sylgard®, einem hitzeresistenten Silikon-Elastomer, aufgeklebt worden (Dow Corning, Senneffe, Belgien) (Rauer *et al.*, 1996).

### **3.6.2 Klonierung von SK3N\_299**

Die Aminosäuren von 1-299 von SK3 (SK3N\_299) (NCBI: AJ251016) wurden über PCR Amplifikation mit einer Kozak Konsensus Sequenz fusioniert und in den Vektor pcDNA3.1 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) kloniert. Dazu wurden folgende Primer verwendet: 5`GCCATGGACACTTCTGGG CA; 3`GATTTTTGGGATGTTTGGATGAG. Der Erfolg der Klonierung von SK3N\_299 in pcDNA3.1 (pSK3N\_299) wurde anschließend über eine Sequenzierung kontrolliert.

### **3.6.3 Transfektion**

Um die Aminosäuren 1-299 von SK3 in PC12 Zellen zu exprimieren, wurden PC12-Zellen mit dem Plasmid pSK3N\_299, welches die Expression von SK3N\_299 (Aminosäuren 1-299 von SK3) gewährleistet, mit der Reagenz MATra (IBA GmbH, Göttingen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers in PC12 Zellen transfiziert. Für Kontrollversuche wurden die Zellen entweder mit pDsRed1-N1 oder mit pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto (CA), USA) transfiziert. Für immunzytochemische Versuche in tsA-Zellen erfolgte die Transfektion mit der Reagenz FUGENE 6 (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland), ebenfalls nach Angaben des Herstellers.

### **3.6.4 Durchführung der *patch-clamp* Experimente**

Die elektrophysiologischen Messungen an PC12 Zellen wurden in der whole-cell Konfiguration durchgeführt (Hamill *et al.*, 1981). Um in diesen Messungen sehr hohe Abdichtwiderstände zwischen Pipette und Zellmembran, sogenannte Giga-seals (Hamill *et al.*, 1981), zu erhalten, wurden Glaspipetten aus Borosilikatkapillaren (Clark Electromedical Instruments, Reading, England) erst am Versuchstag mit Hilfe eines dmZ-Universal-Pullers (Zeitz, Augsburg, Deutschland) in drei Stufen ausgezogen. Anschließend wurden die so erhaltenen Pipetten mit einem glühenden Draht an einer Microforge (Eigenbau der Abteilung) feuerpoliert. Pipetten wurden mit Innenlösung befüllt und in den

Messkopf eingesetzt, so dass über einen chlorierten Silberdraht Kontakt zur leitenden Lösung bestand. Außerdem wurde die Badelektrode an den Verstärker des Messkopfes angeschlossen. Die Badelektrode bestand aus einem chlorierten Silberdraht, der über eine Agarbrücke aus säugerspezifischer Ringerlösung mit der Außenlösung in der Messschale in Verbindung stand.

Durch Eintauchen der Pipette in die Ringer-Lösung des Messschälchens, wurde ein Strom gemessen, der vom *Pulse*-Programm (HEKA elektronik, Lambrecht, Deutschland) über den Verstärker EPC-9 (HEKA elektronik, Lambrecht, Deutschland) appliziert wurde. Dieser Strom war proportional zum Widerstand der Meßpipette. Nach Abgleichen des *Offset*-Potentials wurde die Pipette an die Zellmembran angenähert und durch das Anlegen von leichtem Unterdruck in der Pipette wurde die Zellmembran so an die Glaspipette gezogen, dass ein *Giga-Seal* erzeugt wurde. Damit befand sich die Zelle im cell-attached Modus. Durch Verstärken des Unterdrucks riss die Zellmembran ein und es bestand eine Verbindung zwischen der Pipettenlösung und dem Zytoplasma der Zelle, wodurch sich die Zelle im whole-cell Modus befand. In diesem Modus konnten die Ströme aller Kanäle dieser Zelle gemessen werden. Nach Erreichen des whole-cell-Modus konnten mit Hilfe des *Pulse*-Programms (HEKA elektronik, Lambrecht, Deutschland) die entsprechenden Messparameter an der Zelle über den Verstärker gesteuert werden. Die Auswertung der Daten erfolgte später im Analyse-Programm *Pulsefit* (HEKA elektronik, Lambrecht, Deutschland).

Die intrazelluläre Lösung für die Experimente in Kapitel 4.2.3 enthielt (mM): 145 K-Aspartat, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 K<sub>2</sub>EGTA, and 8.6 CaCl<sub>2</sub> (pH: 7.2; 300-320 mosM). Dies entsprach einer freien Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 1 µM (Portzehl *et al.*, 1964). Für die Messungen in Kapitel 4.2.5 enthielt die intrazelluläre Lösung 0.5 µM freies Ca<sup>2+</sup>. Als extrazelluläre Lösungen der Kapitel 4.2.3 und 4.2.5 wurden folgende Lösungen verwendet: Die Na-Lösung enthielt (mM): 160 Na-Aspartat, 4.5 K-Aspartat, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub> and 5 HEPES, pH 7.4. Für die K-Lösung wurde Na-Aspartat durch 160 mM K-Aspartat ausgetauscht. Für die Messungen in Kapitel 4.3.5 wurde eine 1 M 1-EBIO Stocklösung (Tocris Cookson, Bristol, UK) in DMSO angesetzt. Danach wurden mit dieser Stammlösung 0.2, 0.3, 0.5, and 1 mM 1-EBIO Lösungen in K-Lösung angesetzt. Die Stromamplituden in Na-Lösung bei -80 mV stellten Hintergrundstrom dar und wurden von den Stromamplituden bei -80 mV in K-Lösung abgezogen.

Um die SK3 Kanalaktivierung mit der intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Konzentration zu korrelieren,

wurde gleichzeitig zu elektrophysiologischen Versuchen die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration mit Hilfe der Fura-2-Methode bestimmt (siehe Kapitel 3.7).

Für die Messungen der  $\text{Ca}^{2+}$  Aktivierung wurden die Pipetten in der Spitze mit einer so genannten Tip-Lösung (50  $\mu\text{M}$  Fura-2, 135 mM K-Aspartat, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM HEPES, 10 mM EGTA, pH 7.2), befüllt, welche nahezu kein freies  $\text{Ca}^{2+}$  enthielt. Die Tip-Lösung wurde mit einer Pipettenlösung (50  $\mu\text{M}$  Fura-2, 135 mM K-Aspartat, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, and 0.95  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , pH 7.2), welche 3  $\mu\text{M}$  freies  $\text{Ca}^{2+}$  enthielt, überschichtet.

PC12 Zellen besitzen endogene Kir Kanäle. Die elektrophysiologischen Messungen in Kapitel 4.2.3 und 4.2.5 wurden nach dem Auswaschen der Kir Kanäle, welches nach der Dialyse des Zellinhaltes innerhalb weniger Minuten erfolgte, gestartet. Die Messungen zur Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$  Aktivierung (Kapitel 4.2.4) musste direkt gestartet werden, da sich Tip-Lösung und Pipettenlösung innerhalb von 10 Minuten vermischten. Da bekannt ist, dass  $\text{Cs}^+$  Kir Kanäle blockiert und SK3 Kanäle einen signifikanten  $\text{Cs}^+$  Strom tragen können, wurden die Messungen des SK3 Stroms in  $\text{Cs}^+$ -Lösung durchgeführt (McCloskey *et al.*, 1990; Wittekindt *et al.*, 2004). Die  $\text{Cs}^+$ -Lösung enthielt (mM): 165  $\text{Cs}^+$ -Aspartat, 2  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\text{MgCl}_2$  and 5 HEPES, pH 7.4.

Die Werte in den elektrophysiologischen Versuchen wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung mit n der Anzahl der Versuche angegeben.

### **3.7 Messungen der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ Konzentration**

Für die Visualisierung der Zellen während den Messungen der  $\text{Ca}^{2+}$  Aktivierung von SK3 Kanälen wurden die PC12 Zellen auf ein Axiovert 100 Mikroskop gelegt, welches mit einem Zeiss 40 X Neofluar 1.30 Öobjektiv ausgestattet war. Die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wurde mit dem *ETM  $\text{Ca}^{2+}$  imaging system* (ETM Systems, Irvine, Kalifornien, USA) gemessen. Dazu wurde das Licht von einer 75-W Xenon-Bogenlampe wahlweise durch Erregungsbandpassfilter mit 350 nm oder 380 nm geleitet, welche von einer Computergesteuerten Lambda-10 Filterradeinheit (Sutter Instruments, Novato, Kalifornien, USA) gewechselt wurden. Eine Hamamatsu C2400 Kamera (Hamamatsu Photonics, Herrsching am Ammersee, Deutschland) erhielt Licht von einem 400 nm dichroitischen Spiegel und einem 480 nm Langpassemissionsfilter. Hintergrund korrigierte Bilder aus dem 350/380 Verhältnis wurden alle 5 s aufgenommen und für die Berechnung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$

herangezogen. Die  $[Ca^{2+}]_i$  wurde aus dem Verhältnis  $[Ca^{2+}]_i = K_{eff} \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$  bestimmt, wobei R das Verhältnis  $F_{350}/F_{380}$  ( $F_{350}$  und  $F_{380}$  bezeichnet die Intensität des emittierten Lichtes der Wellenlänge von 510 nm des Fura-2 Farbstoffes, wenn Fura-2 mit Licht der Wellenlänge von 350 bzw. 380 nm angeregt wird),  $R_{min}$  und  $R_{max}$  das Verhältnis bei minimaler  $[Ca^{2+}]$  und bei sättigender  $[Ca^{2+}]$  ( $3 \mu M$ ), und  $K_{eff}$  die effektive Dissoziationskonstante sind. Für die Kalibrierung wurde der Inhalt der Zellen mit intrazellulärer Lösung ausgetauscht, welche entweder eine minimale  $Ca^{2+}$  Konzentration, eine sättigende  $Ca^{2+}$  Konzentration oder  $0.5 \mu M Ca^{2+}$  und jeweils auch noch  $50 \mu M$  Fura-2 enthielt. Die Kalibrierung der Zellen ergab für  $K_{eff}$ ,  $R_{min}$ , and  $R_{max}$  folgende Werte:  $1.135 \mu M$ ,  $0.18$ , und  $0.74$ .

### 3.8 Immunzytochemische Versuche

Für die immunzytochemischen Versuche wurden tsA201 Zellen (eine HEK Zelllinie, welche mit dem SV40 T-Antigen stabil transfiziert wurde (Heinzel *et al.*, 1988; DuBridg e *et al.*, 1987)) in DMEM-Medium mit 10 % FCS bei  $37^\circ C$  unter 10 Vol. %  $CO_2$  in einem luftbefeuchteten Inkubator kultiviert. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage durch kräftiges Spülen mit frischem Medium abgelöst und im Verhältnis 1:10 in neues Medium überführt. Für die immunzytochemische Färbung wurden tsA201 Zellen auf poly-Lysin beschichtete Deckgläschen ausplattiert und für 15 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Anschließend folgte dreifaches Waschen in Dulbecco's Phosphat gepufferter Salzlösung (DPBS). Für die Permeabilisierung wurden die Deckgläschen für 30 Minuten in 0.05 % Saponin in DPBS gegeben. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, erfolgte die Inkubation in 1 % BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen für 1 Stunde mit einem anti-SK3-spezifischen Antikörper, welcher mit dem N-Terminus von SK3 (rabbit anti-SK3 Antikörper<sub>2-21</sub>) (Alamone Labs, Jerusalem, Israel) interagiert, inkubiert. Der Antikörper war zuvor in Trägerlösung (1 % BSA in DPBS) gelöst worden. Nach dreimaligem Waschen mit DPBS wurden die Zellen mit Sekundärantikörper Alexa 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wurde überschüssiger Sekundärantikörper durch Waschen in DPBS entfernt. Am Ende dieser Prozedur wurden die Zellen mit Fluorescent Mounting Medium (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) überschichtet und im Dunkeln aufbewahrt.



Der Wildtyp SK3 Kanal, der in diesem Versuch zum Einsatz kam, wurde freundlicherweise von Dr. Oliver Wittekindt, Universität Ulm, Deutschland zur Verfügung gestellt

Die Fluoreszenzdetektion der gefärbten Zellen erfolgte durch konfokale Mikroskopie mit dem Laser-Scanning-System Radiance 200 (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland), welches an ein invertiertes Mikroskop (Nikon Eclipse TE300, Nikon, Düsseldorf, Deutschland) angeschlossen ist. Die Aufnahme und Analyse der Daten erfolgte mit dem Lasersharp 2000 Software Packet (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung einer Interaktion zwischen zytosolischen Abschnitten des SK3 Kanals im Hefe-Zwei-Hybrid-System

Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte ich Interaktionen zytoplasmatischer Anteile des SK3 Kanals. In Vorversuchen zu dieser Arbeit (Doktorarbeit Isabell Spindler, Ulm) hatten die N-Termini (N-N Interaktion) und die N- und C-Termini des SK3 Kanals (N-C Interaktion) im Hefe-Zwei-Hybrid System miteinander interagiert. Nur Konstrukte mit einer Länge von 299 Aminosäuren und 19 Glutaminwiederholungen (SK3N<sub>299</sub>, Q19) in der polymorphen Glutaminwiederholungssequenz interagierten miteinander. N-terminale Konstrukte mit einer Länge von 274 Aminosäuren und 14 Glutaminen (SK3N<sub>274</sub>, Q14) zeigten keine Interaktion. In weiteren Hefe-Zwei-Hybrid Versuchen untersuchte ich, ob eine Verkürzung der Glutaminwiederholungssequenz von 19 auf 14 Glutamine oder ob die Verkürzung des gesamten Konstruktes von 299 auf 274 Aminosäuren ursächlich dafür war, dass SK3N<sub>274</sub>, Q14 im Gegensatz zu SK3N<sub>299</sub>, Q19 nicht mehr in Hefe interagierte. Dazu stellte ich Fusionsproteine des SK3 N-Terminus mit variabler Länge der Glutaminwiederholung und LexA und AD der Hefe-Zwei-Hybrid Vektoren pLexA und pB42AD her und testete sie auf Interaktion im Hefe-Zwei-Hybrid System (Material und Methoden). Tabelle 7 zeigt eine Liste, Abbildung 4 eine schematische Darstellung der Fusionsproteine des SK3 Kanals, die in Hefe-Zwei-Hybrid Versuchen eingesetzt wurden.

**Tab. 7:** Auflistung der einzeln in EGY48[p8op-lacZ] transformierten SK3-Kanal Konstrukte. SK3N<sub>X</sub> bezeichnet die im Konstrukt enthaltenen Aminosäuren der SK-Kanalsequenzen. QX kennzeichnet die Anzahl der Glutaminwiederholungen in der zweiten Polyglutaminsequenz des SK3 Kanals.

SK3 Konstrukte
pLexA-SK3N <sub>165</sub> , Q14
pLexA-SK3N <sub>274</sub> , Q14
pLexA-SK3N <sub>294</sub> , Q14
pLexA-SK3N <sub>297</sub> , Q17
pLexA-SK3N <sub>299</sub> , Q19
pLexA-SK3N <sub>300</sub> , Q20
pB42AD-SK3N <sub>299</sub> , Q19
pB42AD-SK3N <sub>300</sub> , Q20
pB42AD-SK3C

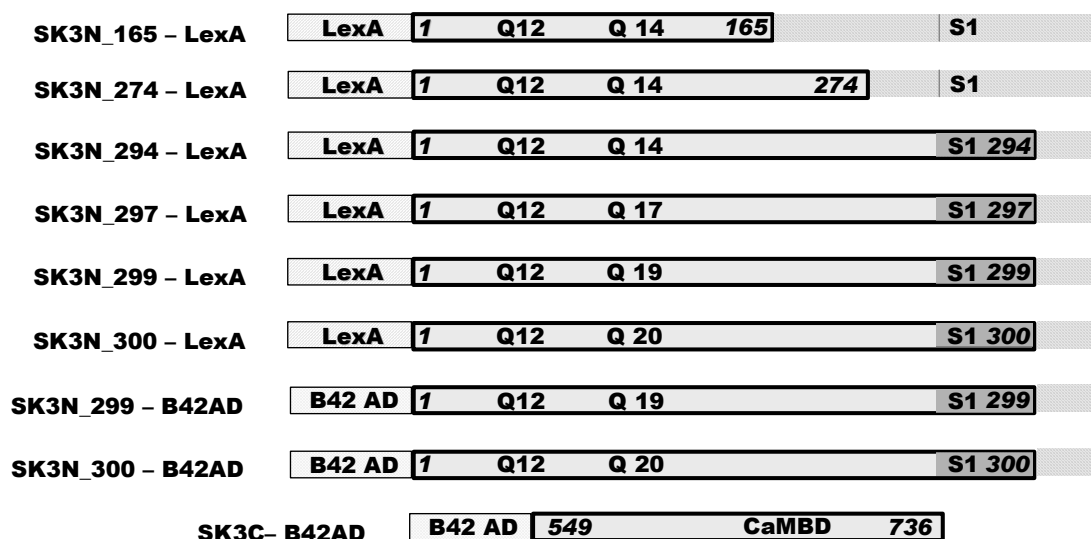


Abb. 4: Schematische Darstellung der verschiedenen Fusionsproteine, die in einem LexA basierten Hefe-Zwei-Hybrid-System auf Interaktion getestet wurden.

#### 4.1.1 Test zum Ausschluss einer Autoinduktion

Vor dem eigentlichen Test auf Interaktion in Hefe-Zwei-Hybrid-Versuchen mussten zunächst jedoch alle SK3 Fusionsproteine und die entsprechenden Kontrollplasmide einzeln in den Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] transformiert werden, um eine mögliche Autoinduktion auszuschließen. Im Falle einer Autoinduktion können bereits die transformierten Plasmide bzw. deren Genprodukte die Transkription der Reportergene *lacZ* und *Leu* induzieren und ihr Einsatz in Hefe-Zwei-Hybrid-Versuche würde sich erübrigen. Jeweils mindestens 4 Transformanten wurden auf Selektions- und Induktionsplatten ausgestrichen. Die Tabellen 8 und 9 geben die Phänotypen der Transformanten auf den verschiedenen Selektions- und Induktionsmedien (Mediumsplatten) wieder.

Tab. 8: Kontrollplasmide und deren erwarteter Phänotyp.

Kontrollvektor mit DNA-BD	Kontrollvektor mit AD	Wachstum auf SD/Gal/Raf	Erwarteter LacZ-Phänotyp (Koloniefarbe)
pLexA-Pos	-	-his-ura	blau
pLexA-53	-	-his-ura	weiß
-	pB42AD-T	-trp-ura	weiß
pLexA-53	pB42-AD	-his-trp-ura	weiß
pLexA-53	pB42AD-T	-his-leu-trp-ura	blau

Als Positivkontrollen wurden die Plasmide pLexA-53 und pB42AD-T verwendet, von denen aus der Literatur bekannt ist, dass sie miteinander interagieren. „53“ steht in diesem Fall für murines p53 und „T“ für *SV40 large T*-Antigen. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pB42AD verwendet. Dem Leervektor pB42AD fehlt die Sequenz für das *SV40 large T*-Antigen, weshalb es bei der Kotransformation mit pLexA-53 zu keiner Protein-Protein-Interaktion kommt. Die Kontrollplasmide zeigten den erwarteten Phänotyp.

**Tab. 9: Phänotypen der einzeln in EGY48[p8op-lacZ] transformierten SK3 Kanal Konstrukte.**

Trans- formierte Konstrukte in EGY48 [p8op-lacZ]	Wachstum auf X-Gal enthaltendem Medium						
	YPD	SD -his-ura	SD -his-trp -ura	SD -his-leu -trp-ura	SD/ Gal/Raf -trp-ura	SD/ Gal/Raf -his-trp -ura	SD/ Gal/Raf -his-leu -trp-ura
pLexA- SK3N_294, Q14	+/w	+/w	-	-	-	-	-
pLexA- SK3N_297, Q17	+/w	+/w	-	-	-	-	-
pLexA- SK3N_299, Q19	+/w	+/w	-	-	-	-	-
pLexA- SK3N_300, Q20	+/w	+/w	-	-	-	-	-
pLexA- SK3C	+/w	+/b	-	-	-	-	-
pB42AD- SK3N_299, Q19	+/w	-	-	-	+/w	-	-
pB42AD- SK3N_300, Q20	+/w	-	-	-	+/w	-	-
pB42AD- SK3C	+/w	-	-	-	+/w	-	-
pLexA-Pos	+/w	+/b	-	-	-	-	-
pLexA-53	+/w	+/w	-	-	-	-	-
pB42AD-T	+/w	-	-	-	+/w	-	-
pLexA-53 und pB42AD-T	+/w	+/w	+/w	-	+/b	+/b	+/b
pLexA-53 und pB42AD	+/w	+/w	+/w	-	+/w	+/w	-

**Beurteilung des Wachstums: - : kein Wachstum, + : Wachstum  
Färbung der Hefekolonien: w: weiß, b : blau**

Bei den einzeln transformierten SK3 Kanal kodierenden Plasmiden war bis auf pLexA-SK3C keine Autoinduktion zu beobachten. Für die Untersuchung der N-C Interaktionen wurde das pB42AD-SK3C Konstrukt verwendet, welches keine Autoinduktion zeigt.

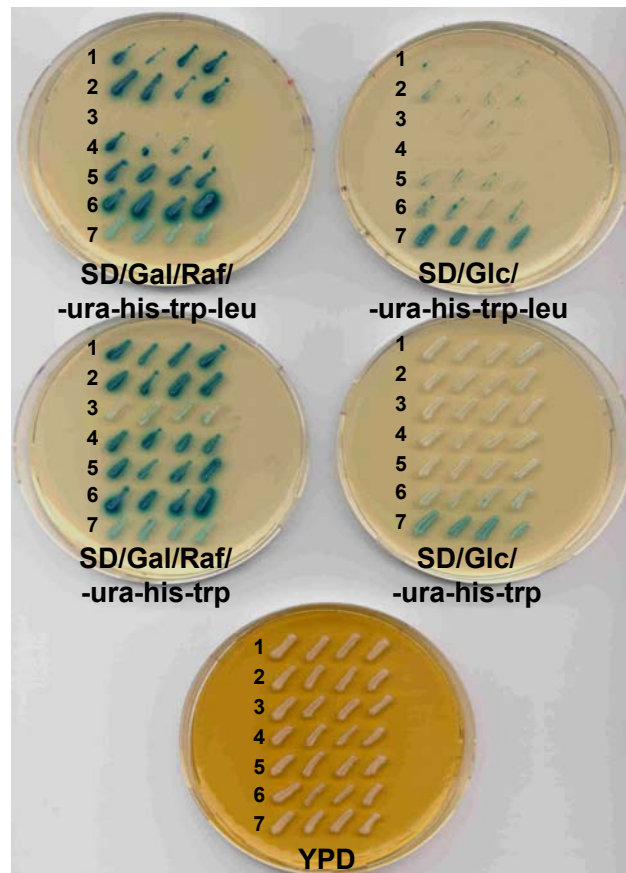
#### 4.1.2 Protein-Protein Interaktionen in Hefe

Nach Ausschluss einer Autoinduktion wurden die verschiedenen SK3 Fusionsproteine auf Protein-Protein-Interaktionen untersucht. Für den Test auf Protein-Protein-Interaktion wurden die pLexA und pB42AD Fusionen des SK3 N-Terminus in verschiedenen Kombinationen in den Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] transformiert und anschließend wurden jeweils mindestens 4 Transformanten als Einzelkolonien auf Selektions- und Induktionsmedien ausgestrichen.

Abbildung 5 zeigt den Test auf Protein-Protein-Interaktion in Hefe: Hefekolonien in Reihe 1, 2, 4, und 5, 6 wuchsen auf der SD/Gal/Raf-ura-his-trp-leu-Platte und entwickelten blaue Farbe. Dieser Phänotyp weist auf die Transkription der Reportergene *Leu* und *lacZ* und damit auf eine Protein-Protein-Interaktion zwischen SK3N\_294-LexA, Q14/ SK3N\_294-B42AD, Q14 (Reihe1), SK3N\_294-LexA, Q14/ SK3N\_299-B42AD, Q19 (Reihe 2), SK3N\_297-LexA, Q17/ SK3N\_299-B42AD, Q19 (Reihe 4), und SK3N\_299-LexA, Q19/ SK3N\_299-B42AD, Q19 (Reihe 5), hin. Die Interaktion fand also unabhängig von der Länge der polymorphen Glutaminwiederholung statt. Die Positivkontrolle p53-LexA/ T-B42AD in Reihe 6 zeigte den erwarteten Phänotyp.

Hefekolonien in Reihe 3 wuchsen nicht auf Gal/Raf-Platten ohne Leucin. Hier fand folglich keine Transkription der Reportergene statt. Dieser Phänotyp zeigt, dass SK3N\_274 und SK3N\_299 nicht miteinander interagierten.

Auf der Glc/-ura/-his/-trp/-leu Platte wurde weder Wachstum noch Blaufärbung der Kolonien in Reihe 1, 2, 3, 4, 5, und 6 beobachtet. Durch Glucose wurde die Expression der AD Fusionsproteine durch den vorgeschalteten Gal1-Promotor unterdrückt. Die Interaktion der Fusionsproteine bzw. die Transkription der Reportergene *lacZ* und *Leu* war auf dieser Platte also nicht möglich. Das Ausstreichen der Hefekolonien auf der Glc/-ura/-his/-trp/-leu Platte stellte damit ein weiteres Kontrollexperiment dar. Das Auftreten von blauen Kolonien auf der Glc/-ura/-his/-trp/-leu Platte hätte eine Autoinduktion der transformierten Plasmide aufgezeigt.



**Abb. 5:** Die Interaktion zwischen den N-Termini von SK3 zeigt keine größere Abhängigkeit von der Länge der polymorphen Glutaminwiederholung. Von jeder Transformation wurden mindestens 4 Transformanten ausgetestet. Reihe 1: SK3N\_294-LexA, (Q14)/ SK3N\_294-B42AD, (Q14); Reihe 2: SK3N\_294-LexA, (Q14)/ SK3N\_299-B42AD, (Q19); Reihe 3: SK3N\_274-LexA, (Q14)/ SK3N\_299-B42AD, (Q19); Reihe 4: SK3N\_297-LexA, (Q17)/ SK3N\_299-B42AD, (Q19); Reihe 5: SK3N\_299-LexA, (Q19)/ SK3N\_299-B42AD, (Q19); Reihe 6: p53-LexA/ T-B42AD; Reihe 7: Kontrolle „falsch positiv“

Hefekolonien in Reihe 7 wuchsen auf der Glc/-ura/-his/-trp/-leu Platte und entwickelten blaue Farbe. Blaue Kolonien auf glucosehaltigen Medien ohne Leucin sind auf unspezifische Interaktionen der Plasmid DNA und nicht auf eine Protein-Protein Interaktion zurückzuführen. Die Kolonien in Reihe 7 wurden als Beispiel für eine sogenannte „falsch positive Interaktionen“ ausgestrichen.

Kolonien in den Reihen 1-6 wuchsen auf Glc/-ura/-his/-trp Platten und waren weiß. Hier wurde lediglich auf die Aminosäuremarker der einzelnen Plasmide selektioniert, wodurch sichergestellt wurde, dass die Hefekolonien die transformierten Plasmide aufgenommen hatten. Die Transkription der AD Fusionsproteine wurde durch die Anwesenheit von

Glucose unterdrückt, weshalb die Kolonien weiß gefärbt waren. Tabelle 10 fasst die Phänotypen der Transformationen aus dem Test auf Protein-Protein-Interaktion zusammen. Diese Ergebnisse zeigen, dass SK3 N-Termini mit 14-, 17-, und 19 Glutaminen mit einem SK3 N-Terminus mit 19 Glutaminen interagierten.

**Tab. 10: Zusammenfassung der Wachstumsversuche zum Test auf Protein-Protein-Interaktion zwischen N- und C-Termini des SK3 Kanals.**

pLexA-Konstrukt mit	pB42AD-Konstrukt mit	Wachstum und Koloniefarbe auf SD-Platten mit X-Gal			
		Galaktose/Raffinose		Glukose	
		-His-Leu -Trp-Ura	-His -Trp-Ura	-His-Leu -Trp-Ura	-His -Trp-Ura
SK3N_294, Q14	SK3N_299, Q19	+/b	+/b	-	+/w
SK3N_297, Q17	SK3N_299, Q19	+/b	+/b	-	+/w
SK3N_299, Q19	SK3N_299, Q19	+/b	+/b	-	+/w
SK3N_300, Q20	SK3N_299, Q19	+/b	+/b	-	+/w
SK3N_294, Q14	SK3N_300, Q20	+/b	+/b	-	+/w
SK3N_297, Q17	SK3N_300, Q20	+/b	+/b	-	+/w
SK3N_299, Q19	SK3N_300, Q20	+/b	+/b	-	+/w
SK3N_300, Q20	SK3N_300, Q20	+/b	+/b	-	+/w
SK3N_294, Q14	SK3C	+/b	+/b	-	+/w
SK3N_299, Q19	SK3C	+/b	+/b	-	+/w
SK3N_300, Q20	SK3C	+/b	+/b	-	+/w
SK3N_274, Q14	SK3N_299, Q19	-	+/w	-	+/w
pLexA-53	pB42AD-T	+/b	+/b	-	+/w

**Beurteilung des Wachstums: - : kein Wachstum, + : Wachstum  
Färbung der Hefekolonien: w: weiß, b : blau**

Neben den SK3 N-Termini in Abbildung 5 wurden noch SK3 N-Termini mit 14-, 17-, und 19 Glutaminen auf Interaktion mit einem SK3 N-terminalen Konstrukt mit 20 Glutaminen und auf Interaktion mit dem C-Terminus von SK3 getestet. Alle Kombinationen interagierten und die Länge der polymorphen Glutaminwiederholung hatte folglich keinen größeren Einfluss auf die N-N und N-C Interaktion des SK3 Kanals im Hefesystem (Tab. 11).

**Tab. 11: Interaktion N-terminaler SK3 Abschnitte mit verschiedener Länge in der polymorphen Glutaminwiederholungssequenz.**

	<b>SK3N_299- B42 AD Q19</b>	<b>SK3N_300- B42 AD Q20</b>	<b>SK3C- B42 AD</b>
<b>SK3N_294 -LexA Q14</b>	+	+	+
<b>SK3N_297 -LexAQ17</b>	+	+	/
<b>SK3N_299 -LexA Q19</b>	+	+	+
<b>SK3N_300 -LexA Q20</b>	/	+	+

**- : keine Interaktion, + : Interaktion, / : nicht untersucht**

Die Verkürzung des SK3 N-Terminus von 299 Aminosäuren (SK3N\_299) auf 274 Aminosäuren (SK3N\_274) hob im Gegensatz dazu die Fähigkeit zur N-N Interaktion des SK3 Kanals auf (Tab. 12).



**Tab. 12: Einfluss der Verkürzung des SK3 N-Terminus auf die Interaktion N-terminaler SK3 Abschnitte.**

	<b>SK3N_299- B42 AD</b>
<b>SK3N_165 -LexA (Q14)</b>	-
<b>SK3N_274 -LexA (Q14)</b>	-
<b>SK3N_294 -LexA (Q14)</b>	+
<b>SK3N_299 -LexA (Q19)</b>	+

- : keine Interaktion, + : Interaktion

### 4.1.3 Zusammenfassung der Hefeergebnisse

Tabellen 11 und 12 fassen die Ergebnisse zusammen, welche in Hefe-Zwei-Hybrid Versuchen gewonnenen wurden. LexA Fusionsproteine mit 14, 17 und 19 Glutaminwiederholungen (in der Bevölkerung treten Allele mit 19 Glutaminwiederholungen am häufigsten auf (Chandy *et al.*, 1998)) interagierten mit B42AD Fusionsproteinen mit 19 und 20 Glutaminwiederholungen (Tab. 11). Außerdem interagierten LexA Fusionsproteine mit 14, 19 und 20 Glutaminen mit dem B42AD Fusionsprotein des SK3 C-Terminus. Die Länge der Glutaminwiederholungssequenz hatte also keinen größeren Einfluss auf die N-N und N-C Interaktionen in Hefe.

Eine Verkürzung des SK3 N-Terminus auf 274 Aminosäuren hob hingegen die Fähigkeit zur Interaktion auf, wie in Tabelle 12 zu sehen ist.

## 4.2 Untersuchung der funktionellen Bedeutung der N-C und N-N Interaktionen von SK3 Kanälen

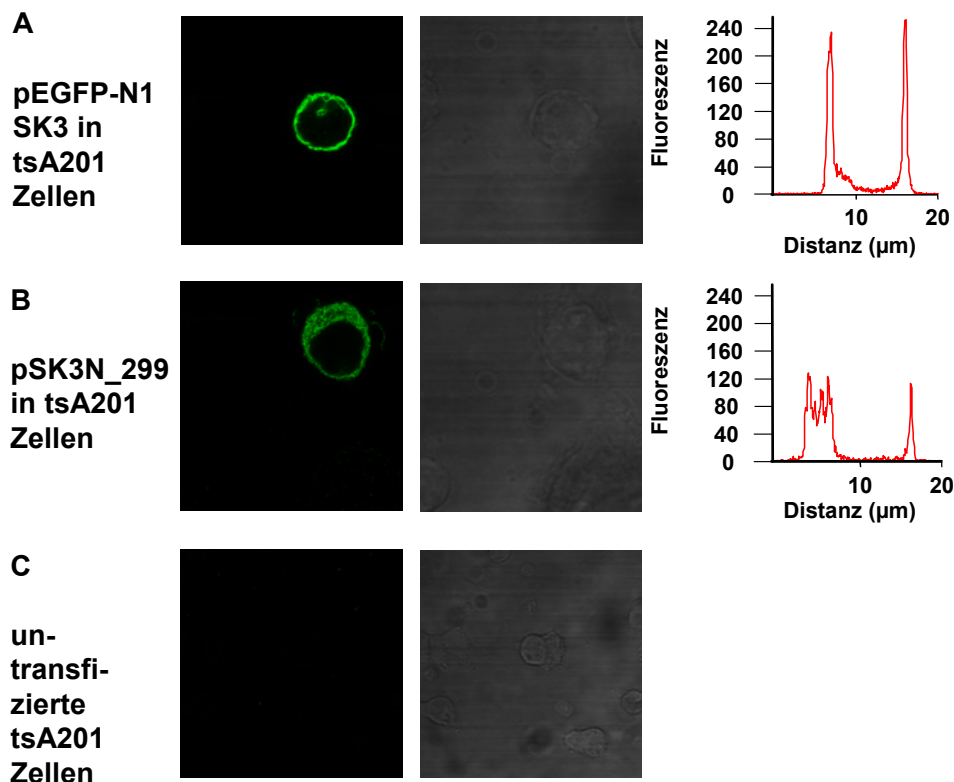
In den Hefe-Zwei-Hybrid Versuchen interagierten die N-Termini miteinander und der N-Terminus mit dem C-Terminus von SK3. In weiteren Versuchen sollte eine mögliche funktionelle Bedeutung dieser Interaktionen untersucht werden. Dazu wurden *patch-clamp* Versuche an endogen exprimierten SK3 Kanälen in PC12 Zellen durchgeführt (Sun *et al.*, 2001; Terstappen, 1999). In diesen Zellen exprimierte ich die Aminosäuren 1-299 (= SK3N\_299; Aminosäuren 1-299 von SK3, die im Hefesystem interagierten) des SK3 Kanals und testete ob die Aminosäuren 1-299 möglicherweise über N-C oder N-N Interaktionen mit endogenen SK3 Kanälen interagieren und ob diese Interaktionen eine Funktion besitzen.

Vor der elektrophysiologischen Untersuchung klärte ich jedoch zunächst ab, ob SK3N\_299 im Zytoplasma vorliegt und für eine mögliche N-C oder N-N Interaktion mit SK3 Kanälen in der Membran überhaupt zur Verfügung steht oder ob es sich möglicherweise im Kern ansammelt wie es von kürzeren N-terminalen Abschnitten des SK3 Kanals aus der Literatur bekannt war (Miller *et al.*, 2001).

### 4.2.1 Intrazelluläre Lokalisation von SK3N\_299 in tsA201 Zellen

Die Expression des SK3 Wildtypkanals, zeigte, dass der SK3 Wildtypkanal sich nicht im Kern ansammelte (Abb. 6A). Dies konnte man auch im dazugehörigen Intensitätshistogramm sehen, welches die stärkste Fluoreszenzintensität am Zellrand und nicht im Kern zeigte (Abb. 6A, rechts). Um SK3N\_299 intrazellulär zu lokalisieren, exprimierte ich SK3N\_299 heterolog in tsA201 Zellen und wies SK3N\_299 immunhistochemisch mit einem spezifischen Antikörper gegen Aminosäuren 2-21 des SK3 Kanals nach. Auch für SK3N\_299 war keine Anreicherung im Kern von tsA201 Zellen zu beobachten wie in Abbildung 6B und im dazugehörigen Intensitätshistogramm (Abb.6B, rechts) zu sehen ist. Wie in Abbildung 6C zu sehen ist, besitzen untransfizierte tsA201 Zellen unter den gewählten Bedingungen keine Autofluoreszenz.

SK3N\_299 lag also zytoplasmatisch vor und stand für weitere Untersuchungen einer möglichen funktionellen Bedeutung der N-C oder N-N Interaktion des SK3 Kanals zur Verfügung.



**Abb. 6:** Aufnahmen im konfokalen und im Durchlicht-Mikroskop von tsA201 Zellen nach Immunfärbung mit einem anti-SK3 Antikörper und die dazugehörigen Intensitätshistogramme. (A) tsA201 Zellen, die mit SK3 Kanälen transfiziert waren, (B) tsA201 Zellen, die mit SK3N\_299 transfiziert waren, (C) in untransfizierten tsA201 Zellen sind keine SK3 Kanäle vorhanden.

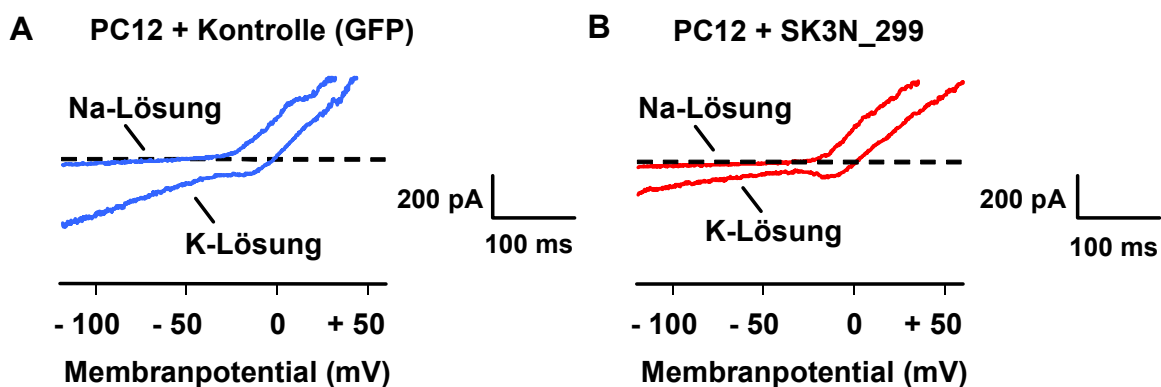
#### 4.2.2 Überprüfung einer physiologischen Bedeutung von N-C Interaktionen in SK3 Kanälen

Nachdem ich abgeklärt hatte, dass SK3N\_299 zytoplasmatisch vorliegt, konnte ich mit der Untersuchung der N-N und N-C Interaktionen des SK3 Kanals beginnen. Für diese Untersuchungen wurden PC12 Zellen mit SK3N\_299 transfiziert und anschließend wurden Ganzzellströme endogener SK3 Kanäle in PC12 Zellen mit Hilfe der *patch-clamp*-Technik gemessen.

Für Kontrollexperimente wurden PC12 Zellen mit pEGFP-N1 (pEGFP-N1 gewährleistet die Expression von GFP) transfiziert. Kontrollexperimente mit GFP sollten ausschließen, dass bereits die Expression eines zusätzlichen Proteins einen unspezifischen Effekt auf die Expression endogener SK3 Kanäle besitzt.

### 4.2.3 Transiente Expression der Aminosäuren 1-299 in PC12 Zellen, die endogen SK3 Kanäle besitzen

Zunächst sollte untersucht werden, ob SK3N\_299 möglicherweise mit Untereinheiten von SK3 Kanälen voller Länge interagiert und dadurch die Anzahl funktioneller Kanäle in der Membran reduziert.

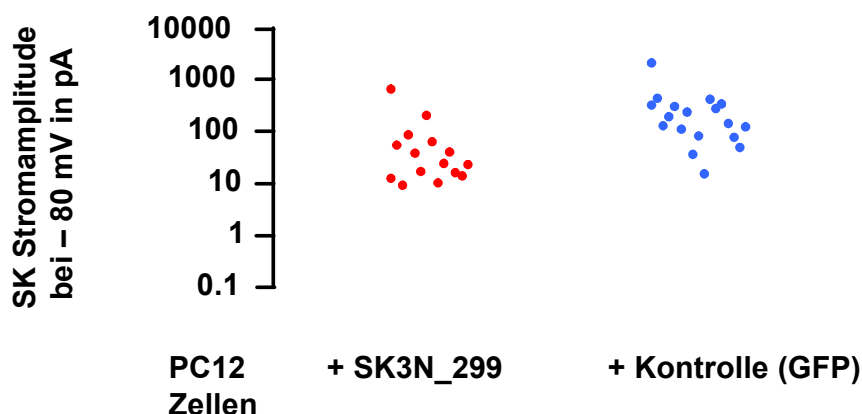


**Abb. 7:** Endogene SK3 Ströme in PC12 Zellen in Ab- und Anwesenheit von SK3N\_299. PC12 Zellen wurden entweder mit einer Kontrolle (pEGFP-N1) oder mit pSK3N\_299 transfiziert und anschließend wurden Ganzzellableitungen mit Hilfe der *patch-clamp*-Technik gemessen. SK3 Ströme wurden mit 1  $\mu$ M freiem  $\text{Ca}^{2+}$  in der Pipette aktiviert, Na- und K-Lösungen wurden als externe Lösungen verwendet und Ströme wurden gemessen indem das Membranpotential von -120 mV bis +60 mV innerhalb von 400 ms verändert wurde. Gezeigt sind repräsentative endogene SK3 Ströme in Zellen, die mit der Kontrolle (A) bzw. mit pSK3N\_299 (B) transfiziert wurden.

Abbildung 7A zeigt ein repräsentatives Kontrollexperiment. Die Stromamplitude bei -80 mV in Na-Lösung betrug -14 pA und stellte Leckstrom dar. Beim Wechsel in K-Lösung nahm die Stromamplitude bei -80 mV auf -211 pA zu. Abbildung 7B zeigt ein repräsentatives Experiment von PC12 Zellen, die SK3N\_299 exprimierten. Die Stromamplitude beträgt in Na-Lösung bei -80 mV -11 pA und nahm in K-Lösung auf -95 pA zu.

Abbildung 8 fasst die Stromampituden bei -80 mV der SK3N\_299 exprimierenden und der Kontrollzellen zusammen. Bei Betrachtung der Abbildungen 7 und 8 scheint SK3N\_299 zu einer verringerten SK3 Stromamplitude zu führen. Vergleicht man jedoch die Stromamplituden der Kontrolle und der SK3N\_299 exprimierenden Zellen mit einem zweiseitigen studentischen T-Test, so sind die Stromamplituden nicht signifikant unterschiedlich ( $p = 0.08$ ). SK3N\_299 hatte folglich keinen Einfluss auf die Anzahl an SK3

Kanälen in der Membran. Ich schloss aus diesen Ergebnissen, dass N-N oder N-C Interaktionen mit SK3N\_299 die Kanalexpression endogener SK3 Kanäle in PC12 Zellen nicht beeinflussten.

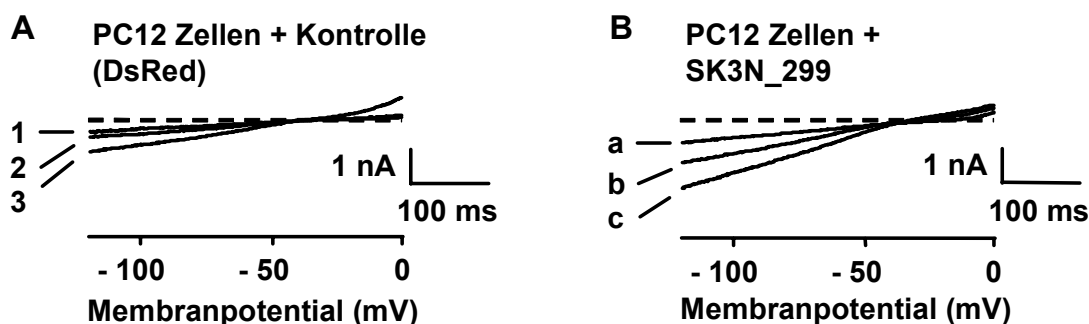


**Abb. 8:** Zusammenfassung aller gemessenen Stromamplituden von SK3N\_299 transfizierten Zellen im Vergleich zu Kontrollexperimenten. Stromamplituden bei -80 mV in Na-Lösung stellten Hintergrundstrom dar und wurden deshalb von Stromamplituden bei -80 mV in K- Lösung abgezogen.

#### 4.2.4 Überprüfung ob N-C Interaktionen möglicherweise die Ca<sup>2+</sup> Aktivierung endogener SK3 Kanäle in PC12 Zellen beeinflussen?

SK3N\_299 hatte zwar keinen Einfluss auf die Anzahl an SK3 Kanälen in der Membran, möglicherweise könnte jedoch die Funktion dieser SK3 Kanäle durch SK3N\_299 verändert worden sein, denn in Hefe wurde ja eine Interaktion zwischen den N- und C-Termini von SK3 gefunden und im C-Terminus liegt die CaMBD an welche CaM konstitutiv gebunden ist und die Kanalaktivierung durch Ca<sup>2+</sup> vermittelt (Xia *et al.*, 1998; Keen *et al.*, 1999). Es wäre also vorstellbar, dass SK3N\_299 – wie der N-Terminus des SK3 Kanals - mit dem C-Terminus des Kanals interagiert und dadurch die Aktivierung durch Ca<sup>2+</sup> moduliert. Deshalb untersuchte ich, ob SK3N\_299 die Aktivierung endogener SK3 Kanäle durch Ca<sup>2+</sup> beeinflusst. Dazu führte ich Messungen von Ganzzellströmen endogener SK3 Kanäle in PC12 Zellen, die SK3N\_299 exprimierten mit Hilfe der *patch-clamp* Technik durch. Parallel zur elektrophysiologischen Messung bestimmte ich die zytoplasmatische Ca<sup>2+</sup> Konzentration mit Hilfe der Fura-2-Methode. Als Kontrolle exprimierte ich DsRed (Zellen wurden mit pDsRed1-N1 transfiziert, welches die Expression von DsRed gewährleistet) in

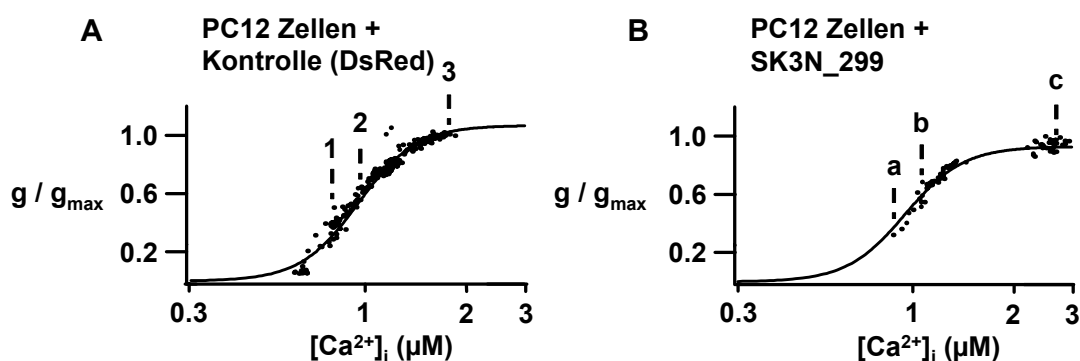
PC12 Zellen, um einen unspezifischen Effekt des Vektors ausschließen zu können. Abbildung 9 zeigt repräsentative Experimente der Kontrolle und von SK3N\_299 exprimierenden Zellen. Mit steigender  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration wächst auch die SK3 Stromamplitude bei -80 mV.



**Abb. 9:**  $\text{Ca}^{2+}$  Aktivierung endogener SK3 Ströme in PC12 Zellen, in denen eine Kontrolle (A) oder SK3N\_299 (B) exprimiert wurde. Das Membranpotential wurde von -120 mV auf +60 mV in 400 ms kontinuierlich verändert. Parallel dazu wurde die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration mit Hilfe der Fura-2-Methode gemessen. Als extrazelluläre Lösung wurde  $\text{Cs}^+$ -Aspartat-Lösung verwendet. Die Pipetten wurden mit 2 bis 4  $\mu\text{l}$  intrazellulärer Lösung befüllt, die 10 mM EGTA enthielt und zu der kein zusätzliches  $\text{Ca}^{2+}$  zugegeben wurde. Auf diese Schicht folgte eine Pipettenlösung mit 3  $\mu\text{M}$  freiem  $\text{Ca}^{2+}$  mit 1 mM EGTA (außerdem enthielten beide Pipettenlösungen 50  $\mu\text{M}$  Fura-2).

Nach Abzug der Autofluoreszenz verwendete ich das Verhältnis der  $F_{350}$  und  $F_{380}$  Werte der Fura-2-Messungen, um die  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration entsprechend der Gleichung in Material und Methoden zu berechnen. Für die weitere Analyse der Daten wurde einzeln für jedes Experiment die Ganzzelleleitfähigkeit gegen die gleichzeitig bestimmte  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration aufgetragen, wie in Abbildung 10 für ein repräsentatives Kontrolllexperiment und ein repräsentatives Experiment einer SK3N\_299 exprimierenden Zelle gezeigt ist. Die Graphen wurden per Auge entsprechend der Gleichung  $g / g_{max} = 1 / (1 + (\text{EC}_{50} / [\text{Ca}^{2+}])^{n_H})$  gefittet. Dabei bezeichnet  $g_{max}$  die maximale Leitfähigkeit,  $\text{EC}_{50}$  die  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration, bei der die Hälfte aller Kanäle aktiviert sind, und  $n_H$  den Hill Koeffizient. Die Bestimmung der  $\text{EC}_{50}$  Werte und des Hill Koeffizienten ergab, dass SK3N\_299 keinen Effekt auf die  $\text{Ca}^{2+}$  Sensitivität endogener SK3 Kanäle in PC12 Zellen besaß. Für SK3N\_299 exprimierende Zellen betrug der  $\text{EC}_{50} = 1 \pm 0.1 \mu\text{M}$  und der Hill Koeffizient  $= 4.8 \pm 0.8$  ( $n=3$ ). In Kontrolllexperimenten lag der  $\text{EC}_{50}$  bei  $1 \pm 0.1 \mu\text{M}$  und der Hill Koeffizient bei  $5.7 \pm 1.2$  ( $n=3$ ). Diese Ergebnisse zeigten, dass SK3N\_299 die  $\text{Ca}^{2+}$  Aktivierung endogener SK3 Kanäle nicht beeinflusste. Aus diesen Ergebnissen schloss ich, dass eine Interaktion von

SK3N\_299 mit dem C-Terminus endogener SK3 Kanäle keinen Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$  Aktivierung hatte.



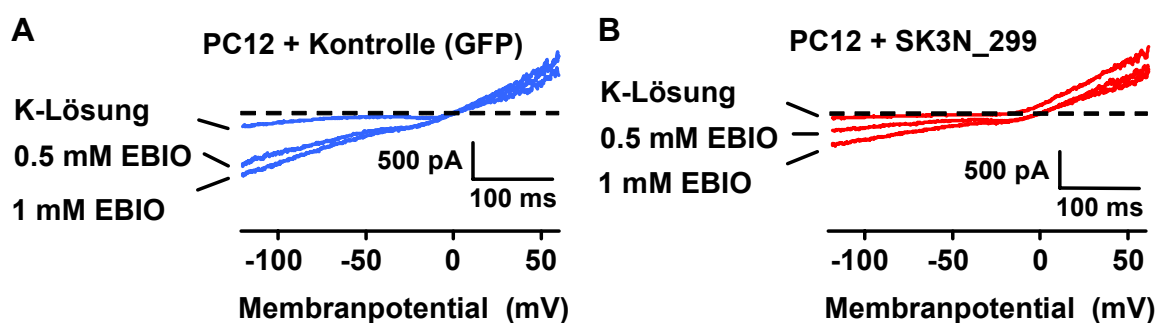
**Abb. 10:** Bestimmung der  $\text{EC}_{50}$  Werte und des Hill-Koeffizienten für  $\text{Ca}^{2+}$ . Dazu wurde die Steigung des Rampenstroms, wie in Abbildung 9 im Bereich von -100 bis -50 mV bestimmt, gegen die gleichzeitig dabei gemessene  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration aufgetragen. Die Kurven wurden per Auge und nach folgender Formel gefittet:  $g/g_{\text{max}} = 1/(1 + (\text{EC}_{50} / [\text{Ca}^{2+}])^{n_H})$ , wobei  $g_{\text{max}}$  die maximale Leitfähigkeit,  $\text{EC}_{50}$  die  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration, bei der die Hälfte aller Kanäle aktiviert sind, und  $n_H$  der Hill Koeffizient ist. (A) repräsentatives Kontrolllexperiment mit einem  $\text{EC}_{50}$  von  $0.95 \mu\text{M}$  und einem Hill-Koeffizient von 5, (B) repräsentativer Versuch mit SK3N\_299 mit einem  $\text{EC}_{50}$  von  $0.95 \mu\text{M}$  und einem Hill-Koeffizient von 5. 1, 2, 3 bzw. a, b, c in Abbildung 10 bezeichnet die Steigung der Rampenströme der entsprechenden Spuren (1, 2, 3 und a, b, c) in der Abbildung 9.

#### 4.2.5 Überprüfung ob N-C Interaktionen möglicherweise die Kanalaktivierung endogener SK3 Kanäle in PC12 Zellen durch 1-EBIO beeinflussen?

Neben dem Effekt auf die  $\text{Ca}^{2+}$  Aktivierung endogener SK3 Kanäle in PC12 Zellen könnte man sich auch eine Veränderung der 1-EBIO Sensitivität durch N-C Interaktionen von SK3N\_299 mit SK3 Kanälen vorstellen. 1-EBIO erhöht die  $\text{Ca}^{2+}$  Sensitivität von SK Kanälen und es wird angenommen, dass die 1-EBIO Sensitivität durch den C-Terminus von SK Kanälen vermittelt wird (Pedarzani *et al.*, 2001). Eine N-C Interaktion könnte also die 1-EBIO Sensitivität durch eine Behinderung der 1-EBIO Bindungsstelle oder durch das Stören des 1-EBIO Aktivierungsmechanismus verändern.

Um diesen Sachverhalt zu untersuchen wurde SK3N\_299 in PC12 Zellen exprimiert und untersucht, ob SK3N\_299 die Aktivierung durch 1-EBIO verändert. Für Kontrolllexperimente wurde GFP (pEGFP-N1) in PC12 Zellen exprimiert. Für die Aktivierung von SK3 Strom enthielt die intrazelluläre Pipettenlösung  $0,5 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . 1-EBIO

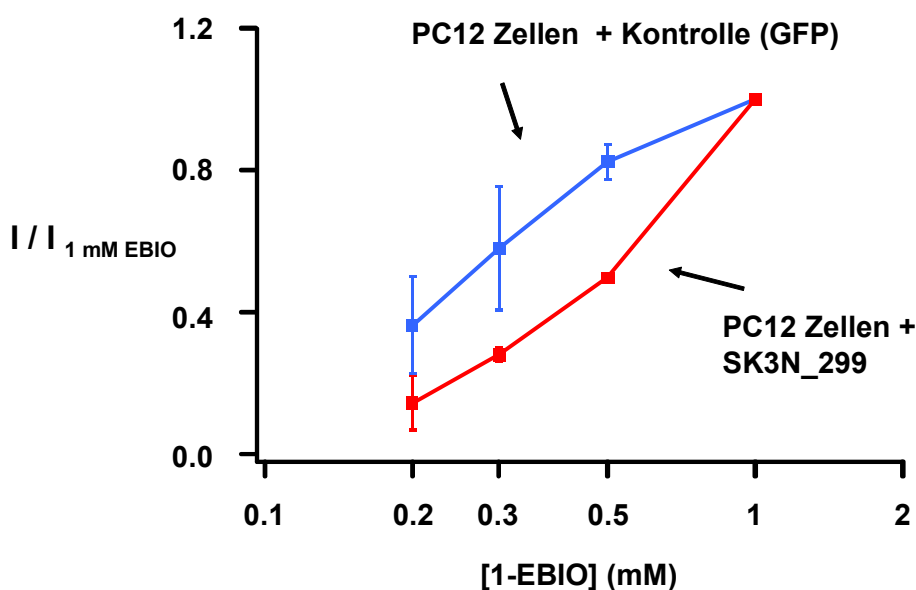
Konzentrationen von 0,2, 0,3, 0,5, und 1 mM 1-EBIO wurden über die Badlösung appliziert. Wie in einem repräsentativen Kontrollexperiment in Abbildung 11 zu sehen ist, betrug die Stromamplitude bei -80 mV -87 pA in K-Lösung und stieg auf -392 pA in K-Lösung mit 0,5 mM 1-EBIO und auf -485 pA in K-Lösung mit 1 mM 1-EBIO. Abbildung 11 zeigt eine Zunahme der SK3 Stromamplitude in pSK3N\_299 transfizierten PC12 Zellen bei -80 mV von -41 pA in K-Lösung auf -145 pA in K-Lösung mit 0,5 mM 1-EBIO und auf -255 pA in K-Lösung mit 1 mM 1-EBIO.



**Abb. 11:** Aktivierung endogener SK3 Ströme in Gegenwart von 1-EBIO in Kontroll- (A) und pSK3N\_299 (B) transfizierten PC12-Zellen. SK3 Ströme wurden mit 0,5  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  in der Pipette aktiviert. Ganzzelleableitungen wurden mit Hilfe der *patch-clamp* Technik gemessen. Das Membranpotential wurde innerhalb von 400 ms von -120 mV bis +60 mV verändert. Die Aktivierung der SK3 Ströme erfolgte mit 0,5  $\mu\text{M}$  freiem  $\text{Ca}^{2+}$  in der Pipette und als externe Lösung wurde K-Lösung mit 0,2, 0,3, 0,5, und 1 mM 1-EBIO verwendet (zur besseren Übersichtlichkeit ist hier nur der SK3 Strom in K-Lösung (Kontrolle) und mit 0,5 und 1 mM 1-EBIO dargestellt).

Das Diagramm in Abbildung 12 zeigt die SK3 Stromamplitude bei verschiedenen 1-EBIO Konzentrationen im Verhältnis zur SK3 Stromamplitude bei 1 mM 1-EBIO. In Kontrollexperimenten aktivierte 0,2 mM 1-EBIO 36 %, 0,3 mM 1-EBIO 58 % und 0,5 mM 1-EBIO 82 % der Kanäle, die bei einer 1-EBIO Konzentration von 1 mM aktiviert waren. In PC12 Zellen, die Aminosäuren 1-299 von SK3 exprimierten, aktivierten 0,2 mM 1-EBIO 14 %, 0,3 mM 1-EBIO 28 % und 0,5 mM 1-EBIO 50 % der Kanäle, die bei einer 1-EBIO Konzentration von 1 mM aktiviert waren. Aminosäuren 1-299 von SK3 reduzierten also die 1-EBIO Sensitivität endogener SK3 Kanäle in PC12 Zellen. Aus diesen Ergebnissen schloss ich, dass die Aminosäuren 1-299 von SK3 mit endogenen SK3 Kanälen in PC12 Zellen interagierten und dabei deren Aktivierung durch 1-EBIO modulierten.





**Abb. 12:** Aktivierung von SK3 Strömen bei unterschiedlichen 1-EBIO Konzentrationen (im Vergleich zur Aktivierung des SK3 Stroms bei 1 mM 1-EBIO). PC12-Zellen wurden entweder mit einer Kontrolle (pEGFP-N1) oder mit pSK3N\_299 transfiziert. Stromamplituden in Na-Lösung bei  $-80$  mV stellen Hintergrundstrom dar und wurden von Stromamplituden in K-Lösung bei  $-80$  mV abgezogen. Das Verhältnis der Aktivierung des SK3 Stroms bei unterschiedlichen 1-EBIO Konzentrationen im Vergleich zur Aktivierung des SK3 Stroms bei 1 mM 1-EBIO war in SK3N\_299 exprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle reduziert.

#### 4.2.6 Zusammenfassung der funktionellen Untersuchung der N-C und N-N Interaktionen des SK3 Kanals

Aus Hefe-Zwei-Hybrid-Versuchen war bekannt, dass N-Termini und N- und C-Termini des SK3 Kanals miteinander interagierten. In elektrophysiologischen Versuchen sollte eine mögliche physiologische Bedeutung dieser Interaktionen identifiziert werden. Um eine mögliche physiologische Bedeutung der N-C und N-N Interaktionen von SK3 zu identifizieren, exprimierte ich die Aminosäuren 1-299 in PC12 Zellen, die endogen SK3 Kanäle besitzen.

1. In diesen Versuchen untersuchte ich zunächst, ob die Expression der Aminosäuren 1-299 von SK3 die Anzahl endogener SK3 Kanäle in der Membran beeinflusst. Dazu bestimmte ich mit Hilfe der *patch-clamp* Methode Ganzzellströme von endogenen SK3 Kanälen in PC12 Zellen, welche die Aminosäuren 1-299 exprimierten. In diesen Versuchen war die Amplitude endogener SK3 Ströme durch die Expression der Aminosäuren 1-299 nicht

signifikant unterschiedlich zu Kontrolleexperimenten. Daraus folgerte ich, dass die Expression der Aminosäuren 1-299 keinen Einfluss auf die Kanalexpression hatte.

2. Da der C-Terminus von SK3 die Kanalaktivierung vermittelt, könnten N-C Interaktionen die Kanalaktivierung der SK3 Kanäle beeinflussen. Deshalb untersuchte ich, ob die Kanalaktivierung durch  $\text{Ca}^{2+}$  in Zellen, welche die Aminosäuren 1-299 von SK3 exprimierten, verändert war. Dazu bestimmte ich mit Hilfe der *patch-clamp* Methode Ganzzellströme endogener SK3 Kanäle und gleichzeitig dazu die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration mit der Fura-2-Methode, um die Aktivierung der SK3 Kanäle mit der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration zu korrelieren. Die Sensitivität der SK3 Kanäle gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$  blieb durch die Expression der Aminosäuren 1-299 von SK3 unverändert. Daraus schloss ich, dass N-C Interaktionen mit SK3N\_299 die Aktivierung von SK3 durch  $\text{Ca}^{2+}$  nicht beeinflussten.

3. In weiteren Versuchen untersuchte ich, ob die Aminosäuren 1-299 von SK3 durch N-C oder N-N Interaktionen die Bindung von größeren Interaktionspartnern wie dem 1-EBIO veränderten. 1-EBIO erhöht die  $\text{Ca}^{2+}$  Sensitivität von SK Kanälen und es wird angenommen, dass dies über eine Stabilisierung der Interaktion von  $\text{Ca}^{2+}$ / CaM mit dem C-Terminus von SK Kanälen erfolgt (Pedarzani *et al.*, 2001). Um zu untersuchen, ob die 1-EBIO Sensitivität verändert war, führte ich *patch-clamp* Messungen von Ganzzellströmen endogener SK3 Kanäle in PC12 Zellen durch. In diesen Versuchen war die Sensitivität der SK3 Kanäle gegenüber 1-EBIO durch die Expression der Aminosäuren 1-299 von SK3 reduziert. Aus diesen Ergebnissen folgerte ich, dass Aminosäuren 1-299 mit endogenen SK3 Kanälen in PC12 Zellen interagierten und zu einer Veränderung der 1-EBIO Sensitivität führten.

## 5. Diskussion

Ausgangspunkt dieser Arbeit war der Befund von Interaktionen zwischen den zytoplasmatischen Abschnitten (N-C und N-N Interaktionen) des SK3 Kanals in Hefe-Zwei-Hybrid-Versuchen (Doktorarbeit Isabell Spindler, Ulm). Im Rahmen dieser Arbeit zeigte ich in Hefe-Zwei-Hybrid-Versuchen, dass die Interaktionen der zytoplasmatischen Abschnitte des SK3 Kanals unabhängig von der Länge der polymorphen Glutaminwiederholung im N-Terminus von SK3 waren. Mit Hilfe elektrophysiologischer Versuche an PC12 Zellen, welche endogene SK3 Kanäle besitzen, untersuchte ich eine mögliche physiologische Funktion der Interaktionen des SK3 Kanals. Dazu exprimierte ich die Aminosäuren 1-299 von SK3 (SK3N\_299) in PC12 Zellen. In diesen Versuchen veränderte SK3N\_299 die 1-EBIO Sensitivität von SK3 Kanälen.

### 5.1 Die polymorphe Glutaminwiederholung im N-Terminus von SK3 Kanälen

Die Überprüfung der Bedeutung der Länge der polymorphen Glutaminwiederholung im N-Terminus von SK3 auf die Interaktionsstärke der N-C und N-N Interaktionen des SK3 Kanals war aus folgendem Grund besonders interessant: In Anlehnung an Triplet-Expansionserkrankungen, bei welchen eine Verlängerung einer Polyglutaminwiederholungen mit der Erkrankung einhergeht, wurde bereits in mehreren Assoziationsstudien ein möglicher Zusammenhang zwischen einer Verlängerung der Glutaminwiederholung im N-Terminus von SK3 und einer neurologischen Erkrankungen wie beispielsweise der Schizophrenie untersucht. Aufgrund einiger Assoziationsstudien, welche zeigten, dass längere Glutaminwiederholungen in SK3 häufiger in Patienten mit Schizophrenie auftreten (Chandy *et al.*, 1998; Cardno *et al.*, 1999; Dror *et al.*, 1999) und aufgrund von Untersuchungen, welche zeigten, dass Glutaminwiederholungen Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden (Perutz *et al.*, 1994), wurde vermutet, dass längere Glutaminwiederholungen in SK3 die Bindungen zwischen den Kanaluntereinheiten stärken und dadurch zu erhöhter SK3 Kanaldichte in der Membran führen (Gargus *et al.*, 1998). Eine veränderte SK3 Kanaldichte in der Membran könnte wiederum zu einer pathogenen Veränderung der zugrunde liegenden AHPs führen.

Bisher gab es noch keine Untersuchungen dazu, ob verlängerte Glutaminwiederholungen

im N-Terminus von SK3, die Interaktion zwischen den Kanaluntereinheiten stärken und einen Effekt auf die Kanaldichte in der Membran haben. Vorversuche zu meiner Doktorarbeit hatten gezeigt, dass die zytoplasmatischen Abschnitte des SK3 Kanals in Hefe-Zwei-Hybrid-Versuchen miteinander interagierten. In Anbetracht der Daten von Perutz und Kollegen (1994), welche an synthetischen Polyglutaminen zeigten, dass Polyglutamine Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, wäre vorstellbar, dass auch die Glutaminwiederholungen im N-Terminus von SK3 Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, welche für die N-C und N-N Interaktion des SK3 Kanals von Bedeutung sind. Wie ich im Rahmen dieser Arbeit zeigte, hatte dabei die Länge der polymorphen Glutaminwiederholung keinen Einfluss auf die N-C und N-N Interaktionen des SK3 Kanals. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern also keinen Hinweis darauf, dass die Bindungen der Kanaluntereinheiten durch die Länge der polymorphen Glutaminwiederholung in größerem Ausmaß beeinflusst werden.

Eine genauere Quantifizierung ob möglicherweise die Länge der polymorphen Glutaminwiederholung zu Abstufungen in der Interaktionsstärke führt, wäre mit einem qualitativen Testsystem wie beispielsweise dem  $\beta$ -Gal-Enzymtest möglich. Um eine Veränderung der Kanaldichte in der Membran zu untersuchen könnte man auch SK3 Kanäle mit unterschiedlich langen Glutaminwiederholungen heterolog exprimieren und die resultierende Stromamplitude mit der Glutaminlänge im N-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheiten vergleichen. Da eine Untersuchung der physiologischen Funktion von N-C und N-N Interaktionen im Vordergrund stand, habe ich die oben beschriebenen Versuche nicht durchgeführt.

## **5.2 Intrazelluläre Lokalisation von SK3N\_299**

Eine weitere Hypothese wie der SK3 Kanal an der Entstehung von Schizophrenie beteiligt sein könnte, basiert auf der Entdeckung einer seltenen Leserastermutation in SK3. Diese Leserastermutation (kodierend für Aminosäureposition 286) führt zu einem vorzeitigen Stoppkodon. Es entsteht dadurch ein stark verkürztes SK3 Polypeptid, welches nur den zytosolisch N-terminalen Bereich besitzt und vor S1 endet. Dieses SK3 Polypeptid wanderte, teilweise durch zwei NLS Motife (NLS = nuclear localisation sequence) vermittelt, in den Zellkern und unterdrückte endogene SK2 Ströme in Jurkat Zellen (Miller *et al.*, 2001).

Das in dieser Arbeit verwendete SK3 Konstrukt SK3N\_299 enthielt zusätzlich zum gesamten zytosolischen N-terminalen Abschnitt außerdem noch zusätzlich fast die Hälfte von S1. SK3N\_299 zeigte keine Ansammlung im Kern. Für diesen Effekt könnten Aminosäuren in S1 verantwortlich sein. Möglicherweise führten die zusätzlichen Aminosäuren in S1 zu Konformationsänderungen, wodurch die NLS Motive unwirksam oder abgeschirmt wurden und wodurch SK3N\_299, ähnlich wie der SK3 Wildtypkanal, nicht in den Kern wanderte.

Konformationsänderungen könnten möglicherweise auch dafür verantwortlich sein, dass das N-terminale SK3 Fragment SK3N\_299 in Hefe interagiert wohingegen eine Verkürzung auf 274 Aminosäuren (SK3N\_274) nicht mehr interagiert. Alternativ dazu könnten die Aminosäuren, welche in SK3N\_299 im Vergleich zu SK3N\_274 zusätzlich enthalten sind, die Interaktion stärken.

### **5.3 Welche Funktion haben die N-N Interaktionen des SK3 Kanals?**

In Hefe-Zwei-Hybrid Versuchen interagierten die N-Termini der SK3 Kanäle. Weder die N-Termini von SK1 und SK2 interagierten miteinander, noch konnte eine Interaktion unter den N-Termini der verschiedenen Mitglieder der SK Kanalfamilie identifiziert werden (Doktorarbeit Isabell Spindler, Ulm). Welche physiologische Bedeutung könnte hinter der N-N Interaktion von SK3 stecken? SK Kanäle besitzen durch ihren Aufbau große Ähnlichkeit mit spannungsabhängigen  $K^+$  Kanälen, von welchen man ebenfalls N-N Interaktionen kennt. N-N Interaktionen in Kv Kanälen spielen eine Rolle bei der Biogenese, also den Vorgängen beim Zusammenbau von Kanaluntereinheiten und deren Transport zur Zytoplasmamembran. Shen und Koautoren (1995) identifizierten eine Domäne im N-Terminus von Kv Kanälen, welche dafür sorgt, dass nur eng verwandte Kanaluntereinheiten miteinander tetramerisieren (Shen *et al.*, 1995). Diese Domäne im N-Terminus von Kv Kanälen wurde T1 Domäne genannt. T1 Domänen tetramerisieren untereinander und Kanäle mit modifizierten T1 Domänen sind weniger stabil (Strang *et al.*, 2001). Nur die N-Termini von SK3 interagierten miteinander, weder für SK1 und SK2 konnte eine Interaktion N-terminaler Abschnitte gefunden werden. Falls die N-terminalen Abschnitte der SK Kanäle eine ähnliche Funktion wie die N-terminalen T1-Domänen von Kv Kanälen besitzen, könnte die relativ starke N-N Interaktion des SK3 Kanals eine SK3

Homotetramerisierung begünstigen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in PC12 Zellen elektrophysiologisch untersucht, ob SK3N<sub>299</sub> möglicherweise über N-N Interaktionen während der Kanalbiogenese mit endogenen SK3 Untereinheiten von voller Länge assembliert und dadurch die Kanalexpression verändert. Die Expression der Aminosäuren 1-299 hatte jedoch keinen Einfluss auf die Anzahl an SK3 Kanälen in der Membran. Die elektrophysiologische Untersuchung ergab folglich keinen Hinweis darauf, dass N-N Interaktionen während der Kanalbiogenese von Bedeutung sind. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass N-N Interaktionen eine Rolle für die Kanalbiogenese der SK3 Kanäle spielen. Wie nämlich Arbeiten von Tu und Kollegen (1995) zeigten, können Untersuchungsergebnisse zur Kanalbiogenese teilweise stark vom verwendeten Expressionssystem abhängen (Tu *et al.*, 1995). In ihrer Arbeit wiesen sie nach, dass für die Kanalassemblierung von Kv1.3 der N-Terminus und S1 eine Rolle spielen. Dies zeigten sie unter anderem durch den Effekt verkürzter Kv1.3 Kanalfragmente auf die Kanalexpression des Wildtypkanals. So unterdrückte ein verkürztes Kv1.3 Fragment, welches den N-Terminus und S1 beinhaltet, Ströme des in *Xenopus* Oozyten und einer zytotoxischen T-Zelllinie der Maus heterolog exprimierten Kv1.3 Wildtypkanals. Während das gleiche verkürzte Kv1.3 Fragment keinen Einfluss auf konstitutiv exprimierte K<sup>+</sup> Ströme in Jurkat Zellen und in GH3 Zellen hatte, konnte es in GH3 Zellen, in welchen die Expression der K<sup>+</sup> Ströme hochreguliert wurde, die Expression des Kv1.3 Wildtypkanals unterdrücken. Die Autoren diskutierten, dass die Protein „Turnover“-Rate endogener Kanäle in GH3 Zellen möglicherweise für einen Effekt eines verkürzten Kv1.3 Fragments auf die Kanalexpression zu gering war. Das verkürzte Kv1.3 Fragment hätte im Fall einer geringen „Turnover“-Rate keine Möglichkeit während der Kanalbiogenese mit konstitutiv exprimierten K<sup>+</sup> Strömen zu interagieren.

Am Beispiel von Kv Kanälen wurde gezeigt, dass die N-terminalen T1 Domänen der Kanaluntereinheiten bereits im ER assemblieren, wenn der Rest des Proteins noch am Ribosom gebunden ist (Lu *et al.*, 2001). So wäre auch vorstellbar, dass Wildtyp Untereinheiten voller Länge bereits während der Translation im ER zusammengebaut werden und ein verkürztes Fragment erst später hinzukommt. Die Kanaluntereinheiten wären bereits zum Kanal tetramerisiert und ein verkürztes Fragment hätte wenig Chance einen experimentell messbaren Effekt auf die Kanalbiogenese auszuüben. Auch könnte eine große Diskrepanz zwischen der Syntheserate von endogenen Wildtyp Kanälen und

verkürztem Fragment bestehen. Falls zu wenig verkürztes Fragment gebildet wird, könnten vermehrt Wildtypkanal Untereinheiten mit voller Länge assemblieren.

Möglicherweise trafen eine oder mehrere Möglichkeiten auf die Expression der Aminosäuren 1-299 von SK3 zu und machten dadurch einen Nachweis von N-N Interaktionen auf die Kanalbiogenese unmöglich.

Aufgrund der oben angeführten Gründe müsste sichergestellt werden, dass der Wildtypkanal und das verkürzte Kanalfragment in gleicher Proteinmenge in der Zelle vorkommen. Für eine Interaktion von Wildtypkanal und verkürztem Fragment könnte es möglicherweise auch wichtig sein, dass beide Proteine gleichzeitig translatiert werden. Eventuell könnte dies gewährleistet sein, wenn sowohl das verkürzte Kanalfragment als auch der Wildtypkanal exogen exprimiert werden.

## 5.4 N-C Interaktionen des SK3 Kanals

Während die Aminosäuren 1-299 von SK3 die 1-EBIO Pharmakologie von SK3 Kanälen veränderten, war kein Einfluss auf die  $Ca^{2+}$  Aktivierung zu beobachten.

1-EBIO ist eine Substanz, welche die  $Ca^{2+}$  Sensitivität von SK und IK Kanälen, vermutlich über eine Stabilisierung der Bindung zwischen  $Ca^{2+}$ -CaM und der SK Kanal  $\alpha$ -Untereinheit, stabilisiert (Pedarzani *et al.*, 2001). Pedarzani und Kollegen (2001) gaben Einblick in den Mechanismus der 1-EBIO Wirkung. Sie zeigten, dass 1-EBIO ohne  $Ca^{2+}$  oder bei  $Ca^{2+}$  Sättigung keinen Effekt auf die  $Ca^{2+}$  Sensitivität von SK Kanälen ausübt. In weiteren Versuchen untersuchten sie die Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik der  $Ca^{2+}$  Aktivierung von SK Kanälen in Gegenwart von 1-EBIO. 1-EBIO verlängerte die Deaktivierung des Kanals wohingegen die Kanalaktivierung durch  $Ca^{2+}$  in Gegenwart von 1-EBIO kaum beeinflusst war. Die  $Ca^{2+}$  Aktivierung von SK Kanälen wird durch CaM vermittelt, welches konstitutiv an den C-Terminus aller 4 Untereinheiten gebunden ist. In Versuchen mit CaM, welches durch Einfügen von Mutationen in seiner Fähigkeit  $Ca^{2+}$  zu binden stark eingeschränkt war, hatte 1-EBIO keinen Einfluss auf die  $Ca^{2+}$  Sensitivität. Im letzten Experiment ihrer Arbeit tauschten Pedarzani und Koautoren (2001) den N-Terminus des SK2 Kanals mit dem N-Terminus des IK Kanals aus. Die 1-EBIO-Sensitivität von IK Kanälen ist normalerweise 20mal größer als die von SK2. Chimere SK2 Kanäle mit dem C-Terminus von IK waren ähnlich sensitiv gegenüber 1-EBIO wie IK Kanäle.

Es wird also angenommen, dass 1-EBIO am C-Terminus von SK Kanälen wirkt und wie ich in meinen Ergebnissen zeigte, verändern die Aminosäuren 1-299 von SK3 die 1-EBIO Sensitivität von SK3 Kanälen. Vorgehende Versuche im Hefe-Zwei-Hybrid-System hatten gezeigt, dass der N-Terminus des SK3 Kanals mit dem C-Terminus des SK3 Kanals interagiert. In Anbetracht der N-C Interaktionen in Hefe, interagierten die Aminosäuren 1-299 von SK3 möglicherweise über N-C Interaktionen mit endogenen SK3 Kanälen und führten zur beobachteten Veränderung der 1-EBIO Sensitivität. Möglicherweise beeinflusste das SK3N\_299 Peptid einen Teil der physiologischen Bindungsstelle von 1-EBIO im N-terminalen Bereich des Wildtypkanals. Auch wäre vorstellbar, dass SK3N\_299 mit N-C Interaktionen innerhalb oder zwischen den SK3 Untereinheiten konkurrierte. Aus diesen Ergebnissen schließe ich, dass N-C Interaktionen im SK3 Kanal stattfinden und für die Kanalfunktion von Bedeutung sind.

## **5.5 Beispiele für N-C Interaktionen und deren Bedeutung für die Kanalaktivierung aus der Literatur**

Wie der Blick zu anderen  $K^+$  Kanälen verrät, können N-C Interaktionen die Aktivierung von Ionenkanälen auf unterschiedlichste Weise modulieren. Eines der Beispiele kommt von CNG Kanälen, die einen ähnlichen Aufbau wie SK oder Kv Kanäle besitzen. Vier  $\alpha$ -Untereinheiten kommen zusammen, um eine wassergefüllte,  $K^+$ -selektive Pore zu bilden. Jede der 4  $\alpha$ -Untereinheiten besitzt 6 Transmembrandomänen an die sich N- und C-terminale Abschnitte anschließen, die im Zytoplasma liegen (Zagotta *et al.*, 1996). N-C Interaktionen von CNG Kanälen spielen sowohl für deren Aktivierung durch zyklische Nukleotide als auch für deren Blockierbarkeit durch  $Ca^{2+}$ /CaM eine Rolle. Normalerweise binden zyklische Nukleotide an einen zytosolisch gelegenen C-terminalen Bereich des CNG Kanals und vermitteln dadurch dessen Aktivierung. CNG Kanäle sind außerdem sensitiv gegenüber  $Ca^{2+}$ /CaM, wobei  $Ca^{2+}$ /CaM CNG Kanäle blockiert. Varnum und Zagotta (1997) zeigten für olfaktorische CNG Kanäle der Ratte, dass N- und C-Termini *in vitro* miteinander interagieren und, dass  $Ca^{2+}$ /CaM diese Interaktion verhindert. Deletionen im N-Terminus zerstörten die N-C Interaktionen. In elektrophysiologischen Versuchen waren CNG Kanäle, deren Fähigkeit zur N-C Interaktionen durch Deletionen aufgehoben war, weniger sensitiv gegenüber zyklischen Nukleotiden und  $Ca^{2+}$ /CaM. Ein weiteres Beispiel wie Interaktionen zytoplasmatischer Abschnitte die Aktivität eines



Ionenkanäle modulieren können, kommt von Kir1.1 (ROMK) Kanälen, die zur Familie der einwärts gleichrichtenden (Kir) K Kanäle gehören. Kir1.1 Kanäle sind sehr sensitiv gegenüber Veränderungen des pH-Wertes im physiologischen Bereich (Schulte *et al.*, 2000). Kir Kanäle bestehen aus 4 Untereinheiten und jede dieser Untereinheiten ist aus 2 Transmembrandurchgängen und einer Porenhelix aufgebaut. An die Transmembrandurchgänge schließen sich lange N- und C-terminale Bereiche an, welche im Zytoplasma liegen. Es liegen bereits sowohl von den zytoplasmatischen Domänen zweier Säugerkanäle als auch von der gesamten Struktur von 2 prokaryotischen Kir Kanälen, Kristallstrukturen vor. Basierend auf den Kristallstrukturen stellten Rapedius und Kollegen (2006) ein Modell vom Kir1.1 Kanal auf, welches zeigt, dass N- und C-Termini innerhalb einer Untereinheit und C-Termini der 4 Untereinheiten miteinander interagieren. Durch Mutationsanalyse konnten Rapedius und Kollegen (2006) die Aminosäuren identifizieren, welche für die N-C Interaktion einer Untereinheit als auch für die C-C Interaktionen zwischen den verschiedenen Untereinheiten von Bedeutung waren. Die Beeinträchtigung der N-N und N-C Interaktionen durch Mutationen veränderte die pH-Sensitivität des Kir1.1 Kanals.

## 5.6 Ausblick

Wie ich im Rahmen dieser Arbeit zeigte, modulieren N-C Interaktionen die Kanalaktivierung des SK3 Kanals. In zukünftigen Untersuchungen könnte der Frage nachgegangen werden, ob N-C Interaktionen auf SK3 Kanäle beschränkt sind oder ob sie bei allen SK Kanälen vorkommen. SK Kanäle weisen in ihrem zytoplasmatisch C-terminalen Bereich ähnliche Strukturen auf und besitzen alle in ihrem C-Terminus eine CaMBD, die CaM konstitutiv gebunden hat.

Für den Fall, dass N-C Interaktionen in allen SK Kanälen vorkommen könnte man über einen Sequenzvergleich konservierte Aminosäuren identifizieren, diese durch Punktmutationen austauschen und auf diesem Wege ließe sich zeigen, welche Aminosäuren für die N-C Interaktionen eine Rolle spielen.

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die Proteinkinase CK2 und die Proteinphosphatase 2A mit den N- und C-Termini des SK2 Kanals interagieren (Bildl *et al.*, 2004). Falls N-C Interaktionen in allen SK Kanälen stattfinden, wäre vorstellbar, dass Liganden wie die Proteinkinase CK2 und die Proteinphosphatase 2A, über eine Beeinflussung von N-C

Interaktionen die Kanalaktivierung des SK2 Kanals beeinflussen.

Die Entwicklung eines Liganden, welcher mit N- oder C-Termini des SK3 Kanals interagiert und dabei möglicherweise die N-C Interaktion des SK3 Kanals verändert, wäre eine interessante Möglichkeit die SK3 Kanalaktivierung zu modulieren.

## 6. Zusammenfassung

SK Kanäle sind durch lange N- und C-terminale Abschnitte, die im Zytosol liegen, gekennzeichnet. Der zytoplasmatisch C-terminal gelegene Abschnitt von SK Kanälen vermittelt die Kanalöffnung durch  $\text{Ca}^{2+}$ , bezüglich weiterer möglicher Funktionen der zytoplasmatischen Abschnitte stellen SK Kanäle jedoch ein relativ unerforschtes Gebiet dar. Vorversuche zu dieser Arbeit hatten gezeigt, dass der N-Terminus mit dem C-Terminus und die N-Termini des SK3 Kanals miteinander interagieren.

- 1.) Im Rahmen dieser Arbeit wurden Fusionsproteine des SK3 Kanals, die alle im S1 Segment endeten, sich aber in der Länge der polymorphen Glutaminwiederholung unterschieden, in Hefe-Zwei-Hybrid Versuchen auf Interaktion getestet. Alle Fusionsproteine interagierten, unabhängig von der Länge der polymorphen Glutaminwiederholung. Diese Ergebnisse ergaben damit keinen Hinweis darauf, dass die Länge der polymorphen Glutaminwiederholung die Interaktionen der Kanaluntereinheiten in größerem Ausmaß beeinflusst.

Im Gegensatz dazu hob die Verkürzung der Gesamtlänge des SK3 N-Terminus von 1-299 auf 1-274 Aminosäuren die Fähigkeit zur N-N Interaktion auf. Möglicherweise sind hier die zusätzlichen Aminosäuren im S1 Segment in den längeren Konstrukten für eine funktionelle Konformation von Bedeutung.

- 2.) In elektrophysiologischen Untersuchungen wurde der Frage nachgegangen, ob die N-C und N-N Interaktionen des SK3 Kanals eine physiologische Bedeutung besitzen.

A.) Dazu wurden die Aminosäuren 1-299 von SK3 (= SK3N<sub>299</sub>) in PC12 Zellen exprimiert und es wurde überprüft ob SK3N<sub>299</sub> möglicherweise über N-N Interaktionen mit endogenen SK3 Untereinheiten in nicht funktionelle Kanäle assembliert und dadurch zu einer veränderten Kanalexpression in der Membran führt. Wie *patch-clamp* Versuche zeigten, hatte SK3N<sub>299</sub> keinerlei Einfluss auf die Kanalexpression endogener SK3 Kanäle. Diese Versuche ergaben damit keinen Hinweis darauf, dass N-N des SK3 Kanals während der Kanalbiogenese von Bedeutung sind.

B.) In weiteren elektrophysiologischen Untersuchungen wurde überprüft ob SK3N<sub>299</sub> möglicherweise – wie der N-Terminus des Kanals – mit dem

C-Terminus des Kanals interagiert und zu einer veränderten Kanalaktivierung durch  $\text{Ca}^{2+}$  führt. Dazu wurden *patch-clamp* Versuche und gleichzeitig Messungen der  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration durchgeführt, um die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration mit der Kanalaktivierung zu korrelieren. In diesen Versuchen hatte SK3N\_299 keinen Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$  Aktivierung der SK3 Kanäle.

- C.) Im Gegensatz dazu modulierte in weiteren elektrophysiologischen Messungen das SK3N\_299 Peptid die Pharmakologie endogener SK3 Kanäle gegenüber der Substanz 1-EBIO. Von 1-EBIO ist bekannt, dass es die  $\text{Ca}^{2+}$  Sensitivität von SK Kanälen erhöht und man glaubt, dass dies durch eine Stabilisierung der Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ / CaM und dem C-Terminus erfolgt. In Anbetracht der N-C Interaktionen im Hefe-Zwei-Hybrid-System, interagierte SK3N\_299 möglicherweise über N-C Interaktionen mit endogenen SK3 Kanälen und führte so zur Veränderung der 1-EBIO Bindung. SK3N\_299 modulierte dabei eventuell die Bindungsstelle von 1-EBIO am Kanal. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass SK3N\_299 mit N-C Interaktionen des Kanals konkurrierte, die für die Kanalfunktion von Bedeutung sein könnten.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit schließe ich, dass N-C Interaktionen im SK3 Kanal stattfinden und für die Kanalfunktion von Bedeutung sind.

Teile dieser Arbeit sind zur Veröffentlichung im Druck (Frei *et al.*, 2006).

## 7. Literaturliste

- Alger, B. E. & Nicoll, R. A. (1980). Epileptiform burst afterhyperpolarization: calcium-dependent potassium potential in hippocampal CA1 pyramidal cells. *Science* **210**, 1122-1124.
- Antonarakis, S. E., Blouin, J. L., Lasseter, V. K., Gehrig, C., Radhakrishna, U., Nestadt, G., Housman, D. E., Kazazian, H. H., Kalman, K., Gutman, G., Fantino, E., Chandy, K. G., Gargus, J. J. & Pulver, A. E. (1999). Lack of linkage or association between schizophrenia and the polymorphic tri gewährleistet nucleotide repeat within the *KCNN3* gene on chromosome 1q21. *Am. J. Med. Genet.* **88**, 348-351.
- Bartel, P. L., Chien, C.T., Sternglanz, R. & Fields, S. (1993). Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In *Cellular Interactions in Development : A Practical Approach.*, Hrsg.: Hartley, D.A., Oxford University Press, Oxford, USA, 153-179.
- Bildl, W., Strassmaier, T., Thurm, H., Andersen, J., Eble, S., Oliver, D., Knipper, M., Mann, M., Schulte, U., Adelman, J.P., Fakler, B. (2004) Protein kinase CK2 is coassembled with small conductance Ca<sup>(2+)</sup>-activated K<sup>+</sup> channels and regulates channel gating. *Neuron* **43**, 847-858.
- Bonnet-Brilhault, F., Laurent, C., Campion, D., Thibaut, F., Lafargue, C., Charbonnier, F., Deleuze, J.F., Ménard, J.F., Jay, M., Petit, M., Frebourg, T., and Mallet, J. (1999) No evidence for involvement of *KCNN3* (*hSKCa3*) potassium channel gene in familial and isolated cases of schizophrenia. *Eur. J. Hum. Genet.* **7**, 247-250
- Brzustowicz, L. M., Hodgkinson, K. A., Chow, E. W., Honer, W. G. & Bassett, A. S. (2000). Location of a major susceptibility locus for familial schizophrenia on chromosome 1q21-q22. *Science* **288**, 678-682.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M. (1987). XL1-blue : A high efficiency plasmid transforming recombinant Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-379.
- Cardno, A. G., Bowen, T., Guy, C. A., Jones, L. A., McCarthy, G., Williams, N. M., Murphy, K. C., Spurlock, G., Gray, M., Sanders, R. D., Craddock, N., McGuffin, P., Owen, M. J. & O'Donovan, M. C. (1999). CAG repeat length in the *hSKCa3* gene and symptom dimensions in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **45**, 1592-1596.
- Chandy, K. G., Fantino, E., Wittekindt, O., Kalman, K., Tong, L. L., Ho, T. H., Gutman, G. A., Crocq, M. A., Ganguli, R., Nimgaonkar, V., Morris-Rosendahl, D. J. & Gargus, J. J. (1998). Isolation of a novel potassium channel gene *hSKCa3* containing a polymorphic CAG repeat: A candidate for schizophrenia and bipolar disorder? *Mol. Psychiatry* **3**, 32-37.
- Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R. & Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 9578-9582.

Cohen, S. N., Chang, A. C. & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, 2110-2114.

Dror, V., Shamir, E., Ghanshani, S., Kimhi, R., Swartz, M., Barak, Y., Weizman, R., Avivi, L., Litmanovitch, T., Fantino, E., Kalman, K., Jones, E. G., Chandy, K. G., Gargus, J. J., Gutman G. A., and Navon, R. (1999). *hKCa3/KCNN3* potassium channel gene: association of longer CAG repeats with schizophrenia in Israeli Ashkenazi Jews, expression in human tissues and localization to chromosome 1q21. *Mol. Psychiatry* **4**, 254-260.

DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H., Calos, M. P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 379-387.

Estojak, J., Brent, R. & Golemis, E. A. (1995). Correlation of two-hybrid affinity data with *in vitro* measurements. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5820-5829.

Fields, S. & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Trends Genet.* **10**, 286-292.

Frei, E. Spindler I., Grissmer S., Jäger H. (2006). Interactions of N-terminal and C-terminal parts of the small conductance  $Ca^{2+}$  activated  $K^{+}$  channel, *hSK3*. *Cell. Physiol. Biochem.* im Druck

Gardos G. (1958) The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 653-654

Gargus J. J., Fantino E., Gutman G. A. (1998). A piece in the puzzle: an ion channel candidate gene for schizophrenia. *Mol. Med. Today.* **4**, 518-524.

Golemis, E. A., Gyuris, J. & Brent, R. (1994). Interaction trap/two-hybrid systems to identify interacting proteins. In *Current Protocols in Molecular Biology*, Hrsg.: Ausubel, F. M., John Wiley & Sons, New York, Kapitel 13.14.

Grissmer, S., Lewis, R. S. & Cahalan, M. D. (1992).  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels in human leukemic T cells. *J. Gen. Physiol.* **99**, 63-84.

Guthrie, C. & Fink, G. R. (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. In *Methods in Enzymology*, Hrsg.: Guthrie, C. & Fink, G. R., Academic Press, San Diego, USA, **194**, 1-932.

Gyuris, J., Golemis, E. A., Chertkov, H. & Brent, R. (1993). Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**, 791-803.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* **391**, 85-100.

Heinzel, S. S., Krysan, P. J., Calos M. P., DuBridg R. B. (1988). Use of simian virus 40 replication to amplify Epstein-Barr virus shuttle vectors in human cells. *J. Virol.* **62**, 3738-3746.

Hoffman, J. F., Joiner, W., Nehrke, K., Potapova, O., Foye, K., Wickrema, A. (2003). The *hSK4 (KCNN4)* isoform is the  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel (Gardos channel) in human red blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 7366-7371.

Hotson, J. R. & Prince, D. A. (1980). A calcium-activated hyperpolarization follows repetitive firing in hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* **43**, 409-419.

Hope, I. A. & Struhl, K. (1986). Functional dissection of a eukaryotic transcriptional protein, GNN4 of yeast. *Cell* **46**, 885-894.

Imbert, G., Saudou, F., Yvert, G., Devys, D., Trottier, Y., Garnier, J. M., Weber, C., Mandel, J. L., Cancel, G., Abbas, N., Durr, A., Didierjean, O., Stevanin, G., Agid, Y., Brice, A. (1996). Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nat. Genet.* **14**, 285-291.

Ishii, T. M., Silvia, C., Hirschberg, B., Bond, C. T., Adelman, J. P. & Maylie, J. (1997). A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 11651-11656.

Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P. L. & Fields, S. (1993). Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* **8**, 1693-1696.

Jäger, H., Adelman, J. P. & Grissmer, S. (2000). SK2 encodes the apamin-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in the human leukemic T cell line, Jurkat. *FEBS Lett.* **469**, 196-202.

Jensen, B.S., Strobaek, D., Christophersen, P., Jorgensen, T.D., Hansen, C., Silahtaroglu, A., Olesen, S.P., Ahring, P.K., 1998. Characterization of the cloned human intermediate-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel. *Am. J. Physiol.* **275**, C848-C856.

Joiner, W. J., Wang, L.-Y., Tang, M. D. & Kaczmarek, L. K. (1997). *hSK4*, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 11013-11018.

Keegan, L., Gill, G. & Ptashne, M. (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* **231**, 699-704.

Keen, J. E., Khawaled, R., Farrens, D. L., Neelands, T., Rivard, A., Bond, C. T., Janowsky, A., Fakler, B., Adelman, J. P., Maylie, J. (1999) Domains responsible for constitutive and  $\text{Ca}^{(2+)}$ -dependent interactions between calmodulin and small conductance  $\text{Ca}^{(2+)}$ -activated potassium channels. *J. Neurosci.* **19**, 8830-8838.

Köhler, M., Hirschberg, B., Bond, C. T., Kinzie, J. M., Marrion, N. V., Maylie, J. & Adelman, J. P. (1996). Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* **273**, 1709-1713.

Kaczorowski, G.J., Knaus, H.G., Leonard, R.J., McManus, O.B., Garcia, M.L., 1996. High-conductance calcium-activated potassium channels: structure, pharmacology, and function. *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**, 255–267.

Krnjevic, K., Lisiewicz, A., (1972). Injections of calcium ions into spinal motoneurons. *J. Physiol. (Lond.)* **225**, 363–390.

Lang, D. G. & Ritchie, A. K. (1987). Large and small conductance calcium-activated potassium channels in the GH3 anterior pituitary cell line. *Pflügers Arch.* **410**, 614-622.

Li, B. & Fields, S. (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 T-antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J.* **7**, 957-963.

Li, T., Hu, X., Chandy, K. G., Fantino, E., Kalman, K., Gutman, G., Gargus, J. J., Freeman, B., Murray, R. M., Dawson, E., Liu, X., Bruinvels, A. T., Sham, P. C. & Collier, D. A. (1998). Transmission disequilibrium analysis of a triplet repeat within the hKCa3 gene using family trios with schizophrenia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 662-665.

Logsdon, N. J., Kang, J. Togo, J. A., Christian, E. P., Aiyar, J. (1997). A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 32723-32726.

Lu, J., Robinson, J. M., Edwards, D. & Deutsch, C. (2001). T1-T1 interactions occur in ER membranes while nascent Kv peptides are still attached to ribosomes. *Biochemistry* **40**, 10934-10946.

Mandel, M. & Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159-162.

Mayer, M.L., Westbrook, G.L., Guthrie P.B. (1984) Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* **309**, 261-263.

McCloskey, M. A., Cahalan, M. D. (1990). G protein control of potassium channel activity in a mast cell line. *J. Gen. Physiol.* **95**, 205-227.

Meech, R.W., (1972). Intracellular calcium injection causes increased potassium conductance in aplysia nerve cells. *Comp. Biochem. Physiol. A.* **42**, 493–499.

Miller, M. J., Rauer, H., Tomita, H., Rauer, H., Gargus, J. J. , Gutman, G. A., Cahalan, M. D., Chandy, K. G. (2001) Nuclear localization and dominant-negative suppression by a mutant SKCa3 N-terminal channel fragment identified in a patient with schizophrenia. *J. Biol. Chem.* **276**, 27753-27756.

Ngo-Anh, T. J., Bloodgood B. L, Lin M., Sabatini B. L., Maylie, J. & Adelman, J. P. (2005) SK channels and NMDA receptors form a Ca<sup>2+</sup>-mediated feedback loop in dendritic spines. *Nat. Neurosci.* **8**, 642-649.

Pallotta, B. S., Magleby, K. L., Barrett, J. N., 1981. Single channel recordings of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents in rat muscle cell culture. *Nature* **293**, 471–474.



Park, Y. B. (1994). Ion selectivity and gating of small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in cultured rat adrenal chromaffin cells. *J. Physiol.* **481**, 555-570.

Pedarzani, P., Mosbacher, J., Rivard, A., Cingolani, L. A., Oliver, D., Stocker, M., Adelman, J. P., Fakler, B. (2001). Control of electrical activity in central neurons by modulating the gating of small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels. *J. Biol. Chem.* **276**, 9762-9769.

Perutz, M. F., Johnson, T., Suzuki, M., Finch, J. T. (1994). Glutamine repeats as polar zippers: Their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 5355-5358.

Portzehl, H., P. C. Caldwell, and J. C. Ruegg. (1964). The dependence of contraction and relaxation of muscle fibres from the crab *Maia squinado* on the internal concentration of free calcium ions. *Biochim. Biophys. Acta* **79**:581-591.

Pribnow, D., Johnson-Pais, T., Bond, C. T., Keen, J., Johnson, R. A., Janowsky, A., Silvia, C., Thayer, M., Maylie, J. & Adelman, J. P. (1999). Skeletal muscle and small-conductance calcium-activated potassium channels. *Muscle Nerve* **22**, 742-750.

Rapedius, M., Haider, S., Browne, K.F., Shang, L., Sansom, M.S., Baukrowitz, T., Tucker, S.J. (2006). Structural and functional analysis of the putative pH sensor in the Kir1.1 (ROMK) potassium channel. *EMBO Rep.* **7**, 611-616.

Rauer, H., Grissmer, S. (1996). Evidence for an internal phenylalkylamine action on the voltage-gated potassium channel Kv1.3. *Mol. Pharmacol.* **50**, 1625-1634.

Renaud, J. F., Desnuelle, C., Schmid-Antomarchi, H., Hugues, M., Serratrice, G. & Lazdunski, M. (1986). Expression of apamin receptor in muscles of patients with myotonic muscular dystrophy. *Nature* **319**, 678-680.

Saleem, Q., Dash, D., Gandhi, C, Kishore, A, Benegal, V, Sherrin, T, Mukherjee, O, Jain, S and Brahmachari, SK. (2001). Association of CAG repeat loci on chromosome 22 with schizophrenia and bipolar disorder. *Mol. Psychiatry* **6**, 694-700.

Sabatini, B. L., Oertner, T. G., Svoboda K. (2002). The life cycle of  $\text{Ca}^{(2+)}$  ions in dendritic spines. *Neuron* **33**, 439-452.

Sailer, C. A., Hu, H., Kaufmann, W. A., Trieb, M., Schwarzer, C., Storm, J. F. & Knaus, H.-G. (2002). Regional differences in distribution and functional expression of small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in rat brain. *J. Neurosci.* **22**, 9698-9707.

Sailer, C. A., Kaufmann, W. A., Marksteiner, J., Knaus, H. G. (2004). Comparative immunohistochemical distribution of three small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated potassium channel subunits, SK1, SK2, and SK3 in mouse brain. *Mol. Cell. Neurosci.* **26**, 458-469.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, Anhang **C1**, 10.27-10.37.

Singh S., Syme C. A., Singh A. K., Devor D. C., and Bridges R. J. (2001). Benzimidazolone activators of chloride secretion: potential therapeutics for cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296**, 600-611.

Schulte, U., Fakler, B. (2000). Gating of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels by intracellular pH. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5837-5841.

Schumacher, M. A., Rivard, A. F., Bachinger, H. P., Adelman, J. P. (2001). Structure of the gating domain of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel complexed with Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *Nature* **410**, 1120-1124.

Schwartzkroin, P. A. & Stafstrom, C. E. (1980). Effects of EGTA on the calcium-activated afterhyperpolarization in hippocampal CA3 pyramidal cells. *Science* **210**, 1125-1126.

Shen, N. V. and Pfaffinger, P. J. (1995). Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated K<sup>+</sup> channel subunit proteins. *Neuron* **14**, 625-633.

Stackman, R. W., Hammond, R. S., Linardatos, E., Gerlach, A., Maylie, J., Adelman, J. P. & Tzounopoulos, T. (2002). Small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels modulate synaptic plasticity and memory encoding. *J. Neurosci.* **22**, 10163-10171.

Soh, H. & Park, C. S. (2001). Inwardly rectifying current-voltage relationship of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels rendered by intracellular divalent cation blockade. *Biophys. J.* **80**, 2207-2215.

Stocker, M., Krause, M., Pedarzani P. (1999). An apamin-sensitive Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in hippocampal pyramidal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 4662-4667.

Stocker, M. & Pedarzani, P. (2000). Differential distribution of three Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel subunits, SK1, SK2 and SK3, in the adult rat central nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* **15**, 476-493.

Stöber, G., Jatzke, S., Meyer, J., Okladnova, O., Knapp, M., Beckmann, H., Lesch, K. P. (1998). Short CAG repeats within the *hSKCa3* gene associated with schizophrenia: results of a family-based study. *Neuroreport* **9**, 3595-3599

Strang, C., Cushman, S. J., DeRubeis, D., Peterson, D. & Pfaffinger, P. J. (2001). A central role for the T1 domain in voltage-gated potassium channel formation and function. *J. Biol. Chem.* **276**, 28493-28502.

Sun, G., Tomita, H., Shakkottai, V. G., Gargus, J. J. (2001). Genomic organization and promoter analysis of human *KCNN3* gene. *J. Hum. Genet.* **46**, 463-470.

Terstappen, G. C. (1999). Functional analysis of native and recombinant ion channels using a high-capacity nonradioactive rubidium efflux assay. *Anal. Biochem.* **272**, 149-155.

Thompson, S. H., (1977). Three pharmacologically distinct potassium channels in molluscan neurones. *J. Physiol. (Lond.)* **265**, 465-488.

Tu, L., Santarelli, V., Deutsch, C. (1995). Truncated K<sup>+</sup> channel DNA sequences specifically suppress lymphocyte K<sup>+</sup> channel gene expression. *Biophys. J.* **68**, 147–156.

Ujike H., Yamamoto A., Tanaka Y., Takehisa Y., Takaki M., Taked T., Kodama M., Kuroda S. (2001). Association study of CAG repeats in the *KCNN3* gene in Japanese patients with schizophrenia, schizoaffective disorder and bipolar disorder. *Psychiatry Res.* **101**, 203-207.

Varnum, M. D. & Zagotta, W. N. (1997). Interdomain interactions underlying activation of cyclic nucleotide-gated channels. *Science* **278**, 110-113.

Wei, A. D., Gutman, G. A., Aldrich, R., Chandy, K. G., Grissmer, S., Wulff, H. (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol. Rev.* **57**, 463-472.

Wittekindt, O., Jauch, A., Burgert, E., Scharer, L., Holtgreve-Grez, H., Yvert, G., Imbert, G., Zimmer, J., Hoehe, M. R., Macher, J. P., Chiaroni, P., van Calker, D., Crocq, M. A. & Morris-Rosendahl, D. J. (1998). The human small conductance calcium-regulated potassium channel gene (*hSKCa3*) contains two CAG repeats in exon 1, is on chromosome 1q21.3, and shows a possible association with schizophrenia. *Neurogenetics* **1**, 259-265.

Wittekindt, O. H., Visan V., Tomita, H., Imtiaz, F., Gargus, J. J., Lehmann-Horn, F., Grissmer, S., Morris-Rosendahl, D. J. (2004). An Apamin- and Scyllatoxin-Insensitive Isoform of the Human SK3 Channel. *Mol. Pharmacol.* **65**, 788-801.

Wolfart, J., Neuhoff, H., Franz, O., Roeper, J., (2001). Differential expression of the small-conductance, calcium-activated potassium channel SK3 is critical for pacemaker control in dopaminergic midbrain neurons. *J. Neurosci.* **21**, 3443–3456.

Wissmann, R., Bildl, W., Neumann, H., Rivard, A.F., Klocker, N., Weitz, D., Schulte, U., Adelman, J.P., Bentrop, D., Fakler, B. (2002). A helical region in the C terminus of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels controls assembly with apocalmodulin. *J. Biol. Chem.* **277**, 4558–4564.

Xia, X. M., Fakler, B., Rivard, A., Wayman, G., Johnson-Pais, T., Keen, J. E., Ishii, T., Hirschberg, B., Bond, C. T., Lutsenko, S., Maylie, J. & Adelman, J. P. (1998). Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* **395**, 503-507.

Zagotta, W. N., Siegelbaum, S.A. (1996). Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Annu. Rev. Neurosci.* **19**, 235-263.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stephan Grissmer für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen. Dabei möchte ich seine freundliche Hilfe, seine produktive Diskussionsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre besonders hervorheben. Mein Dank gilt Frau Dr. Heike Jäger für ihre stetige Hilfestellung sowie die für mich sehr wichtigen Diskussionen.

Dem Leiter der Abteilung für Angewandte Physiologie der Universität Ulm, Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Lehmann-Horn, möchte ich für seine Unterstützung sowie die Unterstützung durch seine Mitarbeiter danken. Herrn PD Dr. Karl Föhr danke ich für die Begutachtung meiner Dissertation.

Herrn Dr. Oliver Wittekindt, Frau Dr. Deborah J. Morris-Rosendahl, Herrn Dr. John. P. Adelman und Herrn Dr. K. George Chandy danke ich für die Überlassung von SK3 DNA.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Stephan Grissmer möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit, die angenehme Atmosphäre in unserer Gruppe und für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft danken. Frau Katharina Ruff und Frau Christiane Buchholz danke ich für ihre Hilfe bei molekularbiologischen Arbeiten. Frau Isabell Spindler, Herrn Tobias Dreker, Frau Zerrin Kuras, Frau Sylvia Prütting, Frau Violeta Visan und Frau Aura G. Teodorescu danke ich für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Herrn Dr. Oliver Wittekindt möchte ich besonders für die fruchtbaren Diskussionen und seine Ratschläge danken.

Allen Mitarbeitern der Abteilungen für Angewandte Physiologie und Allgemeine Physiologie, die mir bei der Durchführung der Arbeit geholfen haben, möchte ich natürlich ebenfalls danken.

Meinem Freund Tobias, meiner Familie und meinen Freunden danke ich dafür, dass sie mich auf meinem Weg unterstützt und mit großem Verständnis begleitet haben.

## PUBLIKATIONSLISTE

Bräuer M., **Frei E.**, Claes L., Grissmer S., and Jäger H., (2003). Influence of K-Cl cotransporter activity on activation of volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channels in human osteoblasts. *American Journal of Cell Physiology*, 285: C22-C30

**Frei, E.**, Spindler I., Grissmer S., Jäger H. (2006). Interactions of N-terminal and C-terminal parts of the small conductance Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channel, hSK3. *Cell. Physiol. Biochem.* im Druck