

Technische Universität München

Lehrstuhl für Biotechnologie

Analysen des spannungsabhängigen Calciumkanals $Ca_v1.2$
unter Verwendung des SNAP-Tag

Maximilian Anton Pinker

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. A. Itzen

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

2. Univ.-Prof. Dr. K.-L. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 29.11.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 28.02.2013 angenommen.

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Calcium als Signalmolekül.....	1
1.2	Spannungsabhängige Calciumkanäle.....	2
1.2.1	L-Typ Calciumkanäle	3
1.2.2	Ca _v 1.2 und seine Regulation	5
1.3	Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen	8
1.3.1	Der SNAP-Tag	9
1.3.2	Formaldehyd-Cross-Linking von Proteinen.....	11
1.4	Fragestellung und Zielsetzung	14
2	Material	16
2.1	Chemikalien und Reagenzien.....	16
2.2	Kits.....	18
2.3	Enzyme	18
2.3.1	Restriktionsenzyme.....	18
2.3.2	Andere Enzyme	19
2.4	Oligonukleotide.....	20
2.4.1	PCR-Primer zur Amplifikation von DNA-Fragmenten	20
2.4.2	PCR-Primer zur Sequenzierung	21
2.5	Antikörper	21
2.6	Geräte	22
2.7	Verbrauchsmaterial	23
3	Methoden	25
3.1	Bakterienkultur	25
3.1.1	Verwendete Plasmide und BACs.....	25
3.1.2	Verwendete Bakterienstämme.....	27
3.1.3	Medien	28
3.1.4	Kultivierung von Bakterienstämmen	29
3.1.5	Lagerung von Bakterien	29
3.1.6	Herstellung elektrokompenter Bakterien	29
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	30

Inhaltsverzeichnis

3.2.1	Isolierung von DNA	30
3.2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	30
3.2.1.2	Isolierung von genomischer DNA.....	30
3.2.2	Reinigung von DNA	31
3.2.2.1	Phenol-Chloroform-Extraktion.....	31
3.2.2.2	Ethanol-fällung	31
3.2.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	32
3.2.4	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	33
3.2.4.1	Restriktionsverdau	33
3.2.4.2	Dephosphorylierung von DNA	33
3.2.4.3	Ligation.....	34
3.2.4.4	Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit.....	34
3.2.5	Transformation von Bakterien.....	35
3.2.5.1	Elektroporation	35
3.2.5.2	Chemische Transformation.....	35
3.2.6	Agarosegelelektrophorese.....	35
3.2.7	Gelelution von DNA	36
3.2.7.1	Chemische Gelelution	37
3.2.7.2	Elektroelution.....	37
3.2.8	Polymerasekettenreaktion	37
3.2.8.1	PCR-Anwendungen	38
3.2.8.2	Verwendete Polymerasen.....	40
3.2.9	Sequenzanalyse von DNA	41
3.2.10	Southern Blot	41
3.2.10.1	Verwendete Lösungen	42
3.2.10.2	Restriktionsverdau und Gellauf	43
3.2.10.3	Blotting.....	43
3.2.10.4	Herstellung der Southern-Sonde	44
3.2.10.5	DNA-Sonden-Hybridisierung und Detektion.....	45
3.3	Zellkultur	46
3.3.1	Allgemeine Techniken.....	46
3.3.1.1	Medien	46

Inhaltsverzeichnis

3.3.1.2	Auftauen und Aussäen von eingefrorenen Zellen	47
3.3.1.3	Passagieren von Zellen.....	47
3.3.1.4	Einfrieren zur langfristigen Lagerung.....	48
3.3.1.5	Ernten von Zellen	48
3.3.2	H9c2-Zellen	48
3.3.3	Neuro2A-Zellen	49
3.3.4	Transfektionsoptimierung.....	49
3.3.4.1	Transfektion von H9c2-Zellen	49
3.3.4.2	Transfektion von Neuro2A-Zellen.....	50
3.3.5	Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen.....	50
3.3.5.1	SNAP-Cell Fluoreszenzfarbstoffe	50
3.3.5.2	Hoechst 33342	51
3.4	Methoden zur Erzeugung genetisch veränderter Mäuse.....	51
3.4.1	Cre/loxP-System, konditionales Gentergeting und ROSA26-Lokus.....	53
3.4.2	Kultivierung embryonaler Stammzellen	55
3.4.2.1	Verwendete Kulturgefäße.....	55
3.4.2.2	Medien	55
3.4.3	Embryonale Feederzellen	56
3.4.3.1	Erzeugung embryonaler Feederzellen	56
3.4.3.2	Verwendung embryonaler Feederzellen	57
3.4.4	Embryonale Stammzellen	58
3.4.4.1	Vorbereitung von Kulturgefäßen	58
3.4.4.2	Auftauen und Aussäen embryonaler Stammzellen	58
3.4.4.3	Passagieren embryonaler Stammzellen.....	58
3.4.4.4	Targeting embryonaler Stammzellen	59
3.5	Biochemische Methoden	61
3.5.1	Cross-Linking mittels Formaldehyd.....	61
3.5.2	Zell-Lyse und Solubilisierung von Membranproteinen.....	61
3.5.3	Proteinreinigung mittels SNAP-Tag.....	62
3.5.4	Proteinfällung.....	63
3.5.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	63
3.5.6	Western Blot	65

Inhaltsverzeichnis

3.6	Biophysikalische Methoden.....	67
3.6.1	Durchflusszytometrie.....	67
3.6.2	Fluoreszenzspektrometrie.....	67
4	Ergebnisse.....	68
4.1	Ca _v 1.2-SNAP-Vorversuche.....	68
4.1.1	Überexpression in H9c2-Zellkultur.....	68
4.1.2	Überexpression in Neuro2A-Zellkultur.....	69
4.1.3	Etablierung der Protein-Interaktom-Analyse.....	70
4.1.3.1	SNAP-Pulldown.....	71
4.1.3.2	SNAP-Binding-Assay.....	72
4.1.3.3	Formaldehyd-Cross-Linking.....	74
4.2	CACNA1C-SNAP-Mauslinie.....	76
4.2.1	Gentargeting-Strategie.....	76
4.2.2	Überprüfung des Gentargeting-Vektors.....	77
4.2.2.1	Sequenzierung.....	77
4.2.2.2	Funktionalität der loxP-Sequenzen.....	79
4.2.3	Gentargeting mittels homologer Rekombination.....	80
4.2.3.1	Screening-PCR.....	80
4.2.3.2	Southern Blot-Screening.....	82
4.2.3.3	Gentargeting und Analyse der ES-Zellklone.....	82
4.3	ROSA26(Ca _v 1.2-SNAP)-Mauslinie.....	83
4.3.1	Gentargeting-Strategie.....	83
4.3.2	Herstellung des Gentargeting-Vektors.....	85
4.3.3	Überprüfung des Gentargeting-Vektors.....	90
4.3.4	Southern Blot-Screening.....	91
4.4	Analyse von Serin1928-Mutanten in Neuro2A-Zellen.....	93
4.4.1	Herstellung von Ca _v 1.2-SNAP-Serin1928-Mutanten.....	93
4.4.2	SNAP-Imaging.....	95
4.4.3	Western Blot Analyse.....	97
5	Diskussion.....	98
5.1	Etablierung der SNAP-Tag-abhängigen Methoden.....	99
5.1.1	Bindung von Ca _v 1.2-SNAP an SNAP-Binding-Beads.....	100

Inhaltsverzeichnis

5.1.2	SNAP-Binding-Assay	103
5.1.3	Formaldehyd-Cross-Linking	104
5.2	Erste Schritte zur Erzeugung der CACNA1C-SNAP-Mauslinie	108
5.3	ROSA26(Ca _v 1.2-SNAP)-Mauslinie	110
5.4	Untersuchung von Serin1928-Mutanten	113
5.5	Ausblick	116
6	Zusammenfassung	117
7	Literaturverzeichnis	119

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 Einteilung der spannungsabhängigen Calciumkanäle	3
Abbildung 1-1 Aufbau eines L-Typ Calciumkanals	4
Abbildung 1-2 Struktur von Ca _v 1.2 und seiner funktionellen Bereiche	5
Abbildung 1-3 Reaktion des SNAP-Tag mit Benzylguanin-Derivaten	10
Abbildung 3-1 Aufbau des Southern Blots	43
Abbildung 4-1 Western Blot Analyse der Ca _v 1.2-SNAP Expression in H9c2-Zellen	69
Abbildung 4-2 Western Blot Analyse der Ca _v 1.2-SNAP Expression in Neuro-2A-Zellen	70
Abbildung 4-3 Arbeitsablauf der Protein-Interaktom-Analyse von Ca _v 1.2	71
Abbildung 4-4 SNAP-Pulldown	72
Abbildung 4-5 Arbeitsablauf des SNAP-Binding-Assay	73
Abbildung 4-6 SNAP-Binding-Assay	74
Abbildung 4-7 Formaldehyd-Cross-Linking	75
Abbildung 4-8 Ca _v 1.2-SNAP Gentergeting-Strategie	77
Abbildung 4-9 Sequenzierung des CACNA1C-SNAP Gentergeting-Vektors	78
Abbildung 4-10 Funktionalität der loxP-Sequenzen	79
Abbildung 4-11 Etablierung der Screening-PCR	81
Abbildung 4-12 Strategie des Southern Blot-Screening	82
Abbildung 4-13 ROSA26(Ca _v 1.2-SNAP) Gentergeting-Strategie	84
Abbildung 4-14 Herstellung des ROSA26(Ca _v 1.2-SNAP) Gentergeting-Vektors	85
Abbildung 4-15 Herstellung des Zwischenvektor 1: pB(HindIII-XbaI)	87
Abbildung 4-16 Herstellung des Zwischenvektor 2: pB(SmaI-SpeI)	88
Abbildung 4-17 Herstellung des Zwischenvektor 3: pB(HindIII-SmaI)	89
Abbildung 4-18 Herstellung des Zwischenvektor 4: pB(HindIII-SpeI)	89
Abbildung 4-19 Endligation des ROSA26(Ca _v 1.2-SNAP) Gentergeting-Vektors	90
Abbildung 4-20 Sequenzierung des ROSA26(Ca _v 1.2-SNAP) Gentergeting-Vektor	91
Abbildung 4-21 Sequenzierung des ROSA26(Ca _v 1.2-SNAP) Gentergeting-Vektor	91
Abbildung 4-22 Sequenzierung des ROSA26(Ca _v 1.2-SNAP) Gentergeting-Vektor	91
Abbildung 4-23 Strategie des ROSA26(Ca _v 1.2-SNAP) Southern Blot-Screenings	92
Abbildung 4-24 Klonierung der Ca _v 1.2-SNAP-Serin1928-Mutanten	94
Abbildung 4-25 Sequenzierung der Ca _v 1.2-SNAP-Serin1928-Mutanten	95
Abbildung 4-26 SNAP-Imaging der Serin1928-Mutanten	96
Abbildung 4-27 Western Blot Analyse der Ca _v 1.2-SNAP Expression für Mutanten von Serin1928	97
Abbildung 5-1 Kreuzungsstrategie zur ROSA26(Ca _v 1.2-SNAP)-Mauslinie	112

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Å	Ångström (10^{-10} m)
A	Adenin
A	Alanin
AKAP79	engl.: A kinase anchoring protein 79
Ala	Alanin
APS	Ammoniumpersulfat
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
β-ME	β-Mercaptoethanol
BAC	bacterial artificial chromosome
BG	O ⁶ -Benzylguanin
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
C-terminal	Carboxy-terminal
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CACNA1C	engl.: Calcium channel alpha 1 cardiac
CaM	Calmodulin
CaMKII	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CIP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
Cl	Chlor
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CMV	Cytomegalovirus
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cpm	Zerfälle pro Minute (engl.: Counts per minute)
CTV	CAG-STOP-EGFP-ROSA Targeting vector
D	Aspartat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: Desoxyribonucleic acid)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Glutamat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF-Zellen	embryonale Feederzellen
EGFP	verbessertes grün fluoreszierendes Protein (engl.: Enhanced green fluorescent protein)
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
et al.	und andere (lat: Et alii/aliae)
FBS	Fetales Kälberserum (engl.: Fetal bovine serum)
fg	Femtogramm
G	Guanin
g	Fallbeschleunigung in vielfachen von 9,81 m/s
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein (engl.: Green fluorescent protein)
Glu	Glutamat
H	Wasserstoff
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
hAGT	humanes DNA-Reparatur-Protein O ⁶ -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase

Abkürzungsverzeichnis

HCl	Salzsäure
HVA	engl.: High voltage activated
IQ	Isoleucin-Glutamin
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
K	Kalium
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	engl.: Lysogeny broth
LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
LVA	engl.: Low voltage activated
μ F	Mikrofarad
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar (10^{-6} Mol/Liter)
M	Molar (Mol/Liter)
m	Meter
MEM	Modified Eagle's Medium
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar (10^{-3} Mol/Liter)
mm	Millimeter
ms	Millisekunde
N-terminal	Amino-terminal
N-Terminus	Amino-Terminus
Na	Natrium
NaOH	Natronlauge
NCKX	engl.: $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - K^+ exchanger
NCX	engl.: $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar (10^{-9} Mol/Liter)
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
OH	Hydroxid
P	Phosphor
PBS	engl.: Phosphate buffered saline
PBST	PBS + 0,1 % Tween
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl.: Polymerase chain reaction)
pg	Pikogramm
PI	Protease Inhibitor
PKA	Proteinkinase A
PMCA	engl.: Plasma membrane calcium ATPase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PO ₄	Phosphat
PPIs	Protein-Protein-Interaktionen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: Rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
S	Serin
s	Sekunden
SBB	SNAP-Binding-Beads (SNAP-Capture Pull-Down Resin)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: Sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
SERCA	engl.: Sarcoendoplasmic reticular calcium ATPase
SO ₄	Sulfat
SSC	engl.: Standard saline citrate
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure (engl.: Single-stranded desoxyribonucleic acid)
T	Thymin

Abkürzungsverzeichnis

TALENs	engl.: Transcription Activator-Like Effector Nucleases
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
UV	Ultraviolett
V	Volt
VGCCs	spannungsabhängige Calciumkanäle (engl.: Voltage-gated calcium channels)
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen (engl.: Weight/volume)
ZFNs	Zinkfinger Nukleasen
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Calcium als Signalmolekül

Calcium-Ionen beeinflussen viele Aspekte des zellulären Lebens. Als ubiquitäres, intrazelluläres Signalmolekül (engl.: Second Messenger) regulieren sie unter anderem die zelluläre Exzitation, die Schrittmacher-Aktivität des Herzens, die Kontraktion von Herz- und Skelettmuskelzellen, Proliferation, Apoptose, Sekretion und Transkription (Ringer, 1882; Bootman und Berridge, 1995; Bers, 2002; Berridge, 2003; Clapham, 2007). Realisiert werden diese Effekte durch die Veränderung der intrazellulären Calcium-Konzentration. Diese liegt basal bei etwa 100 nM, wohingegen die extrazelluläre Konzentration etwa 20.000-fach höher ist (Berridge, 2004; Clapham, 2007).

Ein wichtiger Mechanismus zur schnellen Erhöhung der Calcium-Konzentration in der Zelle und damit zur Erzeugung von Calcium-Signalen sind spannungsabhängige Calcium-Kanäle (Bootman und Berridge, 1995). Sie können pro Sekunde jeweils rund eine Million Calcium-Ionen entlang des Konzentrationsgradienten einströmen lassen und damit in Millisekunden die intrazelluläre Calcium-Konzentration auf das mehr als zehnfache erhöhen (Clapham, 2007). Verstärkt wird dieser Vorgang durch eine Calcium-Freisetzung aus den intrazellulären Calcium-Speichern des Sarcoendoplasmatischen Retikulums in das Cytosol. Dies geschieht durch zwei Kanal-Familien: Ryanodin-Rezeptoren und Inositoltrisphosphat-Rezeptoren (Bootman und Berridge, 1995; Bers, 2002). Die direkte Wirkung des in das Cytosol einströmenden Calciums ist lokal begrenzt. Während Calcium-Ionen in einfacher Salzlösung 40 nm/ms zurücklegen (Einstein, 1905), wird diese Mobilität im dicht gepackten Cytosol nicht erreicht. Stattdessen ergibt sich im Bereich des Einstroms ein auf 20 nm begrenzter Konzentrationsgradient von einigen 10 μ M (Naraghi und Neher, 1997; Clapham, 2007).

Nach dem schnellen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration sinkt diese anschließend wieder auf basales Niveau (Bootman und Berridge, 1995). Dieser Vorgang wird durch das Zusammenspiel verschiedener Ionenpumpen erreicht. Die

Calcium-Pumpen SERCA (engl.: sarcoendoplasmic reticular calcium ATPase) und PMCA (engl.: plasma membrane calcium ATPase) pumpen Calcium unter Hydrolyse von ATP aus dem Cytosol. SERCA pumpt Calcium in das sarcoendoplasmatische Retikulum, PMCA aus der Zelle heraus in den extrazellulären Raum. Auch die Antiporter NCX (engl.: Na⁺/Ca²⁺ exchanger) und NCKX (engl.: Na⁺/Ca²⁺-K⁺ exchanger) transportieren Calcium über die Plasmamembran aus der Zelle heraus. Dies geschieht unter Nutzung des Na⁺-Gradienten an der Zellmembran (Bers, 2002; Clapham, 2007).

1.2 Spannungsabhängige Calciumkanäle

Spannungsabhängige Calciumkanäle (engl.: voltage-gated calcium channels, VGCCs) sind Proteinkomplexe, die sich in der Zellmembran befinden. Hier vermitteln sie in der Folge einer Depolarisation der Zelle den Einstrom von Calcium-Ionen aus dem extrazellulären Raum in das Cytosol.

VGCCs bestehen aus mehreren Untereinheiten. Die transmembranäre, 190-273 kDa schwere α_1 -Untereinheit ist die zentrale und funktionell wichtigste Untereinheit. Sie bildet die Kanalpore, enthält den Spannungssensor und ist für die Ionen-Selektivität verantwortlich. Die α_1 -Untereinheiten werden von zehn verschiedenen Genen codiert, anhand derer die VGCCs benannt und eingeordnet werden. Aufgrund ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften werden sie in HVA- und LVA-VGCCs (engl.: high voltage activated bzw. low voltage activated) eingeteilt (Yaari et al., 1987). Innerhalb dieser beiden Gruppen werden die VGCCs durch ihre Sensitivität gegenüber spezifischen Kanal-Blockern von einander unterschieden und verschiedenen Typen zugeordnet. Die HVA-VGCCs werden in L- (engl.: long-lasting), N- (engl.: neither L- nor T-Type), P/Q- (Purkinje) und R-Typ (engl.: Remaining) eingeteilt. Die LVA-VGCCs werden auch als T-Typ (engl.: tiny/transient) bezeichnet. Die verschiedenen VGCCs werden gewebespezifisch exprimiert.

Eine Übersicht über die Einteilung der VGCCs und ihre Gewebeexpression ist in Tabelle 1-1 dargestellt (Hofmann et al., 1999; Catterall, 2000; Catterall et al., 2005).

Bezeichnung			Gewebeexpression	Spezifische Blocker
HVA	L	Ca _v 1.1 (α _{1S})	Skelettmuskel	Dihydropyridine, Phenylalkylamine, Benzothiazepine
		Ca _v 1.2 (α _{1C})	Herzmuskel, glatte Muskulatur, Neuronen, endokrine Zellen	
		Ca _v 1.3 (α _{1D})	Sinusknoten, Haarzellen der Cochlea, Neuronen, endokrine Zellen	
		Ca _v 1.4 (α _{1F})	Retina, Rückenmark, Nebenniere, Mastzellen, lymphatisches Gewebe	
	P/Q	Ca _v 2.1 (α _{1A})	Neuronen, neuroendokrine Zellen	ω-Agatoxin IVA
	N	Ca _v 2.2 (α _{1B})	Neuronen, neuroendokrine Zellen	ω-Conotoxin GVIA
	R	Ca _v 2.3 (α _{1E})	Neuronen	SNX-482
LVA	T	Ca _v 3.1 (α _{1G})	Neuronen, Herzmuskel, glatte Muskulatur	keine
		Ca _v 3.2 (α _{1H})	Neuronen, Herzmuskel, glatte Muskulatur	keine
		Ca _v 3.3 (α _{1I})	Neuronen	keine

Tabelle 1-1 Einteilung der spannungsabhängigen Calciumkanäle. Übersicht der spannungsabhängigen Calciumkanäle, ihre Gewebeexpression und spezifische Kanal-Blocker (Catterall et al., 2005): Ca_v1.1 (Tanabe et al., 1987; De Jongh et al., 1991), Ca_v1.2 (Mikami et al., 1989; Biel et al., 1990; Snutch et al., 1991; Seino et al., 1992), Ca_v1.3 (Seino et al., 1992; Hell et al., 1993; Kollmar et al., 1997; Bohn et al., 2000), Ca_v1.4 (Strom et al., 1998; McRory et al., 2004), Ca_v2.1 (Mori et al., 1991), Ca_v2.2 (Dubel et al., 1992; Williams et al., 1992), Ca_v2.3 (Niidome et al., 1992; Jing et al., 2005), Ca_v3.1 (Perez-Reyes, 1998; Bohn et al., 2000), Ca_v3.2 (Cribbs et al., 1998; Bohn et al., 2000), Ca_v3.3 (Lee et al., 1999).

1.2.1 L-Typ Calciumkanäle

Die L-Typ Calciumkanäle zeigen im Vergleich zu anderen VGCCs eine hohe Leitfähigkeit, lange Öffnungszeit und werden erst bei ausgeprägter Depolarisation der Zellmembran aktiviert (Nowycky et al., 1985). Ihre Funktion ist vielseitig. Im Skelettmuskel vermitteln sie die Verknüpfung von Exzitation und Kontraktion. Im Herz erzeugen sie elektrische Impulse und initiieren die Kontraktion des Herzmuskels. In glatten Muskeln, wie beispielsweise in Blutgefäßen, sind sie in die Druckerzeugung involviert. In Neuronen liefern sie das für die Aktivierung von niedrig-leitfähigen, Calcium-aktivierten Kalium-Kanälen benötigte Calcium (Marrion und Tavalin, 1998; Hofmann et al., 1999; Moosmang et al., 2003). In endokrinen Zellen lösen sie die Freisetzung von Hormonen aus (Catterall, 2000). Außerdem sind sie an der Regulation der Genexpression beteiligt (Catterall, 2000).

L-Typ Calciumkanäle sind heterooligomere Proteinkomplexe (siehe Abbildung 1-1). Die eigentliche Kanalfunktion wird von der zentralen, transmembranären α_1 -Untereinheit realisiert. Der Transport des Kanals zur Membran, die Öffnungskinetik und die Amplitude des Calcium-Einstroms werden durch die weiteren Kanalbestandteile moduliert: Eine intrazelluläre β -Untereinheit, eine dimere $\alpha_2\delta$ -Untereinheit, den Calciumsensor Calmodulin und im Skelettmuskel eine transmembranäre γ -Untereinheit (Hofmann et al., 1999; Catterall, 2000; Melzer et al., 2006; van Petegem und Minor, 2006).

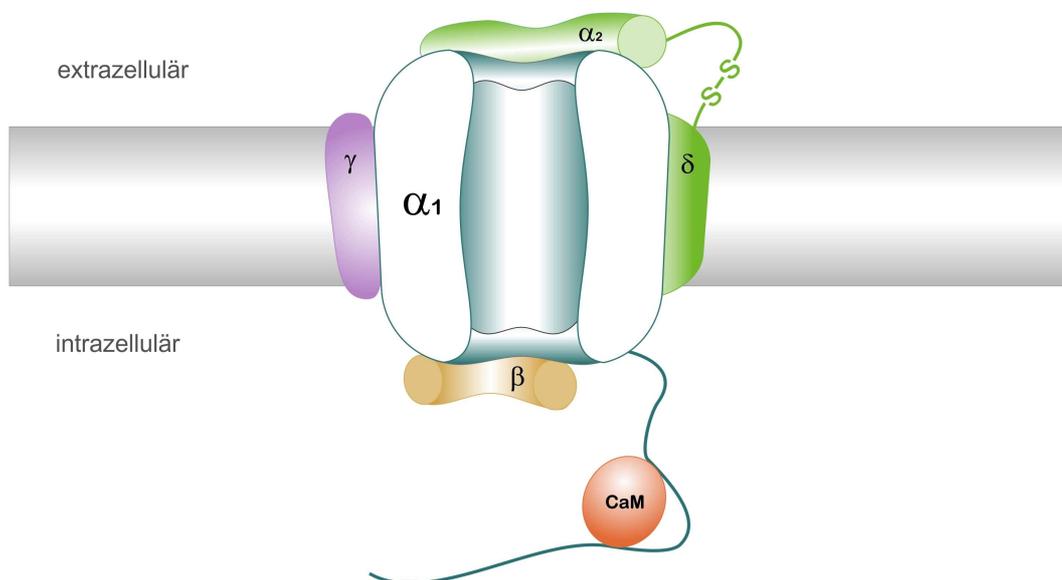


Abbildung 1-1 Aufbau eines L-Typ Calciumkanals. Zentral befindet sich die α_1 -Untereinheit, die mit ihrer Pore die Zellmembran durchspannt. Intrazellulär befinden sich die β -Untereinheit und Calmodulin. Extrazellulär liegt die α_2 -Untereinheit, die über die δ -Untereinheit in der Zellmembran verankert ist. Ebenfalls in der Zellmembran lokalisiert ist die im Skelettmuskel an $\text{Ca}_v1.1$ vorhandene γ -Untereinheit.

1.2.2 Ca_v1.2 und seine Regulation

Die α_1 -Untereinheit Ca_v1.2 wird im Herzmuskel, der glatten Muskulatur, endokrinen Zellen und Neuronen exprimiert (Mikami et al., 1989; Biel et al., 1990; Snutch et al., 1991; Seino et al., 1992; Hofmann et al., 1999). Der Ca_v1.2-Proteinkomplex umfasst neben der α_1 -Untereinheit eine β - und eine $\alpha_2\delta$ -Untereinheit sowie Calmodulin (Hofmann et al., 1999).

Das für Ca_v1.2 codierende Gen CACNA1C (engl.: Calcium channel alpha 1 cardiac) umfasst im Menschen etwa 150 kb und besteht aus 44 fixen und sechs variablen Exonen, die alternativem, gewebespezifischem Splicing unterliegen (Soldatov, 1994). Ca_v1.2 besteht aus vier Domänen (I bis IV), die wiederum aus jeweils sechs Transmembransegmenten (S1 bis S6) bestehen, welche die Membran als α -Helices durchspannen (siehe Abbildung 1-2) (Hofmann et al., 1999). Als Spannungssensor fungieren die jeweiligen S4-Segmente (Hofmann et al., 1999). Der Selektivitätsfilter und die Kanalpore werden von den extrazellulären Loops zwischen den Segmenten 5 und 6 gebildet (Hofmann et al., 1999).

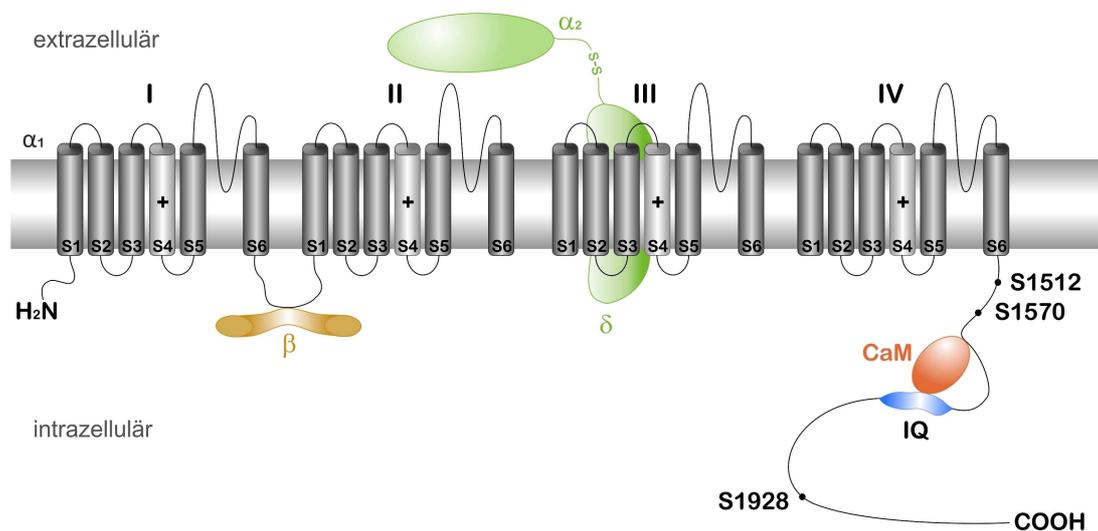


Abbildung 1-2 Struktur von Ca_v1.2 und seiner funktionellen Bereiche. Ca_v1.2 besteht aus vier Domänen (I-IV), die aus je sechs Segmenten (S1-S6) bestehen. Die S4-Segmente (durch „+“ hervorgehoben) bilden den Spannungssensor. Am intrazellulären Loop zwischen den Domänen I und II interagiert die β -Untereinheit. An Domäne III und weiteren Bereichen interagiert die δ -Domäne der $\alpha_2\delta$ -Untereinheit. Die zugehörige α_2 -Domäne befindet sich extrazellulär in räumlicher Nähe zur Kanalpore. Im C-Terminus interagiert Calmodulin (CaM) im Bereich des IQ-Motivs. Ebenfalls dargestellt sind die Phosphorylierungsstellen S1512, S1570 und S1928 im C-Terminus.

Im intrazellulären Bereich zwischen den Domänen I und II befindet sich die Interaktionsstelle für die β -Untereinheit (Hofmann et al., 1999; Fang und Colecraft, 2011). Die β -Untereinheit wird von vier verschiedenen Genen codiert (β_1 - β_4), die wiederum verschiedene Splicing-Varianten besitzen und zu Proteinen zwischen 50 und 72 kDa führen, wobei die Verteilung der verschiedenen Isoformen gewebespezifisch ist (Hofmann et al., 1999). Die β -Untereinheit ist entscheidend am Transport von $\text{Ca}_v1.2$ an die Zellmembran beteiligt und erhöht damit die Zahl an funktionsfähigen Kanälen und den Calcium-Einstrom (Gao et al., 1999; Fang und Colecraft, 2011). Außerdem erhöht die Anwesenheit der β -Untereinheit die Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanalpore (Shistik et al., 1995).

Die $\alpha_2\delta$ -Untereinheit wird von drei verschiedenen Genen codiert, die über verschiedene Splicing-Varianten verfügen, die gewebespezifisch gebildet werden. Die $\alpha_2\delta$ -Untereinheit ist ein 125 kDa schweres, hochgradig glykosyliertes Protein. Sie wird posttranslational geschnitten und verbleibt über Disulfidbrücken verknüpft. Die δ -Domäne ist über ein einzelnes Transmembransegment in der Zellmembran verankert und interagiert mit $\text{Ca}_v1.2$ an Domäne III und weiteren Abschnitten. Die α_2 -Domäne ist extrazellulär in räumlicher Nähe zur Kanalpore lokalisiert. Wenngleich diverse Untersuchungen unterschiedliche Effekte der $\alpha_2\delta$ -Untereinheit gezeigt haben, scheint es so, dass ihre Anwesenheit die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals und den Calcium-Einstrom erhöht. Auch eine Zunahme der Anzahl von in die Zellmembran eingebauten VGCCs wurde mit der $\alpha_2\delta$ -Untereinheit assoziiert (Shistik et al., 1995; Gurnett et al., 1996; Gurnett et al., 1997; Hofmann et al., 1999).

Der Calciumsensor Calmodulin ist ein 16,7 kDa schweres Protein und kann bis zu vier Calcium-Ionen binden. Die entsprechenden Bindestellen sind bei basaler cytoplasmatischer Calcium-Konzentration weitestgehend unbesetzt. Bei ansteigender Calcium-Konzentration binden sie Calcium in kooperativer Weise. Durch die Calcium-Bindung erfährt Calmodulin eine Konformationsänderung, die zu dessen Aktivierung führt (Zühlke et al., 1999; Zühlke et al., 2000; Maier und Bers, 2002). Im aktivierten Zustand bindet Calmodulin an ein Isoleucin-Glutamin-Motiv

(IQ-Motiv), welches sich am intrazellulären C-Terminus von Ca_v1.2 befindet (van Petegem et al., 2005). Auch ohne Calcium-Bindung ist es als Apocalmodulin funktionell wichtig, indem es am PreIQ₃-Motiv, das sich in räumlicher Nähe zum IQ-Motiv befindet, in anderer Konformation prä-assoziert ist (Peterson et al., 1999; Maier und Bers, 2002; Erickson et al., 2003; Kim et al., 2004). Durch seine Konformationsänderungen wirkt Calmodulin über das IQ-Motiv als Calciumsensor und reguliert so die calciumabhängige Inaktivierung und die Fazilitierung. Bei der Fazilitierung handelt es sich um eine „Über-Aktivierung“ des Kanals in Folge von häufigen starken Depolarisationen. Die Fazilitierung ist gekennzeichnet durch besonders lange Öffnungszeiten und hohe Öffnungswahrscheinlichkeiten des Kanals, wodurch der Calcium-Einstrom gesteigert wird (Gurney et al., 1989; Peterson et al., 1999; Zühlke et al., 1999; Dzhura et al., 2000; Zühlke et al., 2000; Kim et al., 2004). Die Bindung von Calmodulin an das IQ-Motiv ist außerdem essentiell für Calcium-abhängige Signalkaskaden vom Kanal zum Nucleus, welche dort die Transkription von Genen aktivieren (Dolmetsch et al., 2001). Calmodulin ist auch über seine Funktion in Ca_v1.2 hinaus ein wichtiges Signalmolekül in fast allen Zelltypen. Im Zusammenspiel mit Calcium reguliert es am Calcium-Transport beteiligte Proteine, den Zellmetabolismus, die Zellproliferation, die Genexpression und Proteinkinasen (Cheung, 1980; Frey et al., 2000; Maier und Bers, 2002).

Eine von Calmodulin regulierte Proteinkinase ist die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII), die in nahezu allen Zelltypen vorkommt und Calcium-Signale in einer Vielzahl von Substraten in veränderte Phosphorylierungszustände überträgt (Meyer et al., 1992; Maier und Bers, 2002). Die Aktivierung von CaMKII wird durch Calcium-Freisetzung vermittelt, sie kann aber auch nach Autophosphorylierung unabhängig von Änderungen der Calcium-Konzentration aktiviert bleiben (Lai et al., 1986; Miller und Kennedy, 1986; Schworer et al., 1986). Ca_v1.2 besitzt Phosphorylierungsstellen für die CaMKII an den Serinen 1512 und 1570, welche im C-Terminus liegen. Die β₂-Untereinheit besitzt eine CaMKII-Phosphorylierungsstelle an Threonin 498. Die Phosphorylierung an diesen Positionen trägt zur Fazilitierung des Kanals bei (Dzhura et al., 2000; Erxleben et al., 2006; Grueter et al., 2006; Lee et al., 2006).

Eine weitere für die Regulation von Ca_v1.2 wichtige Proteinkinase ist die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA). Diese wird durch ein AKAP (engl.: A kinase anchoring protein) in der Zellmembran verankert, was für die Regulation von Ca_v1.2 notwendig ist. Die PKA wird durch β -adrenerge Stimulation aktiviert und phosphoryliert daraufhin in Ca_v1.2 die Phosphorylierungsstelle Serin 1928, die sich im C-Terminus befindet (De Jongh et al., 1996; Gao et al., 1997; Hall et al., 2006; Hulme et al., 2006). Allgemein führt die β -adrenerge Stimulation zur Steigerung des Calcium-Einstroms durch Ca_v1.2. Für diese Regulation ist der C-Terminus von Ca_v1.2 erforderlich, jedoch hat sich gezeigt, dass die Phosphorylierung an Serin 1928 hierauf keinen Einfluss besitzt (Ganesan et al., 2006; Lemke et al., 2008). Im *in vitro* Experiment hat die β -adrenerge Stimulation zur PKA-Phosphorylierung der Serine 479 und 480 an der β_2 -Untereinheit geführt, wobei dies einen erhöhten Calcium-Einstrom mit sich brachte (Bünemann et al., 1999). Umgekehrt hat sich *in vivo* gezeigt, dass das Fehlen dieser Phosphorylierungsstellen keinen Einfluss auf den Calcium-Einstrom durch Ca_v1.2 hat (Brandmayr et al., 2012).

1.3 Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen

Proteine agieren nicht isoliert, sondern erfüllen ihre verschiedenen Funktionen in Komplexen, sowie durch dynamische Interaktionen mit anderen Proteinen. Die Untersuchung der Interaktionen von Proteinen ist von hoher Bedeutung, um einerseits ein besseres Verständnis der Prozesse zu erhalten, die notwendig sind, damit Proteine ihre Funktion erfüllen können und andererseits, um Einblick in die molekulare Umgebung von an pathologischen Zuständen beteiligten Proteinen zu erhalten. Dies wiederum erlaubt es für medizinische Fragestellungen, neue therapeutische Targets und diagnostische Marker zu finden (Markham et al., 2007).

Zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) stehen zahlreiche verschiedene Techniken zur Verfügung. Für Membranproteine, wie den spannungsabhängigen Calcium-Kanal Ca_v1.2, sind diese jedoch meist nicht ohne Weiteres anwendbar (Daley, 2008).

Die gängige Technik, um die Gesamtheit der PPIs, das Protein-Interaktom, eines bestimmten Proteins zu untersuchen, ist die Co-Immunopräzipitation (Co-IP). Bei dieser werden auf schweren Kügelchen (z.B. aus Agarose) immobilisierte, spezifische Antikörper verwendet, um an das Zielprotein zu binden. Anschließend können die entstehenden großen und schweren Komplexe isoliert und die enthaltenen Proteine mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden (Markham et al., 2007).

Eine Co-IP kann jedoch nicht für jedes gewünschte Zielprotein angewendet werden, da hierfür notwendige, hinreichend spezifische Antikörper nicht für jedes Protein zur Verfügung stehen. Eine Alternative ist in diesem Fall die genetische Markierung des Zielproteins mit einem Tag (engl. für Anhänger/Markierung). Das entstehende Fusionsprotein kann nun durch die spezifische Interaktion des Tags mit einer anderen Substanz oder Verbindung isoliert werden. Anschließend können die isolierten Proteine wiederum durch Massenspektrometrie analysiert und dadurch die PPIs des Zielproteins identifiziert werden. Inzwischen steht eine Vielzahl an verschiedenen Tags für diese Anwendung zur Verfügung, die alle verschiedene Vor- und Nachteile besitzen (Rigaut et al., 1999; Terpe, 2003; Vasilescu et al., 2004; Lichty et al., 2005; Sutherland et al., 2008).

Beiden Methoden ist gemein, dass mit ihnen sowohl echte, als auch artifizielle PPIs identifiziert werden können, was zu falsch-positiven Ergebnissen führt. Auch ist es möglich, dass echte, bereits vorher bekannte PPIs in der Analyse fehlen. Aus diesem Grund sind zusätzliche Experimente zur Bestätigung der Ergebnisse erforderlich (Markham et al., 2007).

1.3.1 Der SNAP-Tag

Der SNAP-Tag ist ein 20 kDa schwerer Protein-Tag, der auf dem humanen DNA-Reparatur-Protein O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (hAGT) basiert (Mollwitz et al., 2012). hAGT repariert O⁶-alkyliertes Guanin in der DNA, indem es die Alkylgruppe auf das eigene Cystein 145 transferiert. Die dabei entstehende Thioether-Bindung zwischen der Cystein-Seitenkette von hAGT und der Alkylgruppe

ist kovalent und irreversibel. Die Verwendung als Tag wird dadurch ermöglicht, dass auch O⁶-Benzylguanin (BG) als Substrat erkannt wird und die Reaktion nicht von der übertragenen Gruppe abhängt. Zur Erzeugung des SNAP-Tag wurde hAGT an mehreren Stellen mutiert, wodurch die Aktivität gegenüber BG erhöht und die Interaktion mit DNA verhindert wird (Juillerat et al., 2003; Keppler et al., 2003; Keppler et al., 2004). Der SNAP-Tag kann an Peptide und Proteine sowohl N- als auch C-terminal angehängt werden (Keppler et al., 2004). Die Reaktion des SNAP-Tag mit BG-Derivaten (siehe Abbildung 1-3) kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durchgeführt werden (Juillerat et al., 2003). Sie sollte nicht unter oxidierenden Bedingungen stattfinden, da die Oxidation von Cystein 145 zur reversiblen Inaktivierung des SNAP-Tag führt (Keppler et al., 2004).

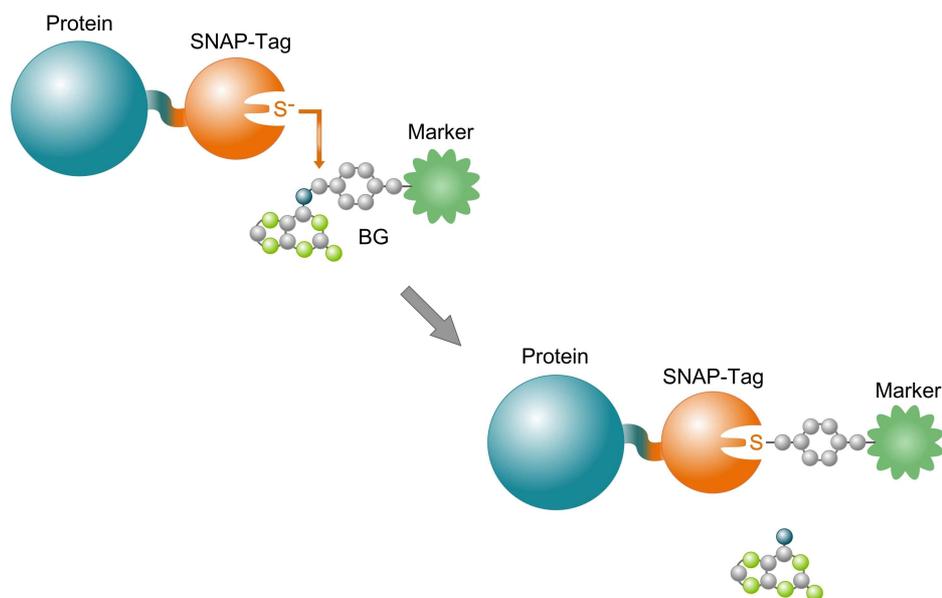


Abbildung 1-3 Reaktion des SNAP-Tag mit Benzylguanin-Derivaten. Ein Fusionsprotein, bestehend aus einem zu untersuchenden Protein und dem SNAP-Tag wird markiert. Hierfür wird ein beliebiger Marker als Benzylguanin(BG)-Derivat verwendet. Der SNAP-Tag reagiert mit dem BG-Derivat, wodurch das Cystein 145 des SNAP-Tag mit der Benzylgruppe und dem Marker des BG-Derivats irreversibel kovalent verknüpft wird.

Durch die Verwendung von verschiedenen synthetischen BG-Derivaten kann der SNAP-Tag mit verschiedenen kleinen Molekülen verknüpft werden. Auf diese Weise können an den SNAP-Tag Fluoreszenzfarbstoffe, spezielle Moleküle, wie Biotin oder immobilisierte Alkylgruppen angehängt werden (Keppler et al., 2003; Keppler et al.,

2004; Keppler et al., 2006). Zur Bindung an den SNAP-Tag stehen zahlreiche, teils membranpermeable, Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung. Das verfügbare breite Farbspektrum erlaubt eine vielseitigere Anwendung, als dies bei einfarbigen Fluoreszenzproteinen der Fall ist (Keppler et al., 2006). Außerdem ist der SNAP-Tag auch nach der Bindung des Substrates kleiner als fluoreszierende Proteine, wodurch ein geringerer Einfluss auf die Faltung und Funktion des Ausgangsproteins erwartet werden kann (Tsien, 1998; Keppler et al., 2004). Auch das sequenzielle Markieren mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen *in vivo* ist möglich, wodurch markierte Fusionsproteine nach ihrem Synthesezeitpunkt unterschieden werden können (Keppler et al., 2004). Durch die Verwendung von immobilisierten BG-Derivaten lassen sich SNAP-Fusionsproteine isolieren und erlauben damit die Untersuchung ihrer PPIs (Kindermann et al., 2003; Keppler et al., 2004). Zusammengefasst besteht der SNAP-Tag gegenüber anderen Tag, die meist auf eine bestimmte Anwendung maßgeschneidert sind, durch seine vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten (Keppler et al., 2004).

1.3.2 Formaldehyd-Cross-Linking von Proteinen

Bei der Probenverarbeitung führt die Zell-Lyse dazu, dass die in der Zelle vorliegenden geordneten Proteinkomplexe zu ungeordneten und verdünnten Proteinlösungen werden. Dabei werden die räumlichen und zeitlichen Begrenzungen innerhalb der Zellen aufgehoben, welche die Interaktion von Proteinen bestimmen. Das ermöglicht die Interaktion von Proteinen, die sonst nicht in Kontakt treten würden und als falsch-positive PPIs identifiziert werden könnten. Umgekehrt gehen PPIs verloren, deren Wechselwirkung von schwacher oder vorübergehender Natur sind. Entsprechend führt die Probenverarbeitung zu einer Erhöhung der identifizierten falsch-positiven PPIs und einer Verringerung der identifizierten echten PPIs (Vasilescu et al., 2004; Vasilescu und Figeys, 2006; Toews et al., 2008).

Der Verlust der Ordnung in Proteinkomplexen kann durch den Einsatz von chemischem Cross-Linking teilweise verhindert werden. Dies geschieht durch die Bildung von kovalenten Bindungen, den Cross-Links, zwischen interagierenden

Proteinen. Diese sorgen dafür, dass PPIs während der Probenverarbeitung stabilisiert werden (Vasilescu et al., 2004; Guerrero et al., 2006; Vasilescu und Figeys, 2006; Sutherland et al., 2008).

Zur Reduzierung von falsch-positiven PPIs werden Proteinkomplexe während der Reinigung gewaschen. Wenngleich dies auf der einen Seite notwendig ist, hat es auf der anderen Seite aber auch den Nachteil, dass dadurch schwache echt-positive PPIs verloren gehen können (Gingras et al., 2007; Klockenbusch und Kast, 2010). Durch die Stabilisierung von Proteinkomplexen mittels der Verwendung von Cross-Links ist es möglich, diese Problematik zu entschärfen und die Nutzung von harschen Waschbedingungen zu ermöglichen. Dabei kann es sich beispielsweise um hohe Salzkonzentrationen oder den Einsatz von Tensiden handeln (Vasilescu et al., 2004; Markham et al., 2007). Diese Möglichkeit ist vor allem dann interessant, wenn Proteinkomplexe gereinigt werden sollen, die Membranproteine, wie Ca_v1.2 beinhalten. Hierbei ist es notwendig, Tenside zu verwenden, um die Zellmembranen zu solubilisieren und die Membranproteine in Lösung zu halten. Die dabei verwendeten Tensid-Konzentrationen sind so hoch, dass sie auch viele PPIs zerstören (Gingras et al., 2007).

Für die Untersuchung von PPIs ist Formaldehyd ein geeigneter Cross-Linker. Formaldehyd kann Zellmembranen sehr schnell durchdringen. Es erzeugt nach kurzer Inkubationszeit Cross-Links zwischen den Seitenketten der Aminosäuren Lysin und Tryptophan, sowie den freien Aminen der N-Termini von Proteinen (Sutherland et al., 2008; Toews et al., 2008). Aufgrund seiner geringen Größe verknüpft es nur Proteine, die einander sehr nah sind, mit 2,3-2,7 Å langen Cross-Links. Dadurch können Cross-Links nur zwischen Proteinen gebildet werden, die tatsächlich miteinander interagieren (Hall und Struhl, 2002; Vasilescu et al., 2004; Sutherland et al., 2008; Klockenbusch und Kast, 2010). Die Cross-Linking-Reaktion lässt sich durch die Zugabe von Tris abstoppen, das mit freiem Formaldehyd reagiert, wodurch dieses nicht mehr für die Reaktion verfügbar ist (Sutherland et al., 2008; Toews et al., 2008).

Durch die schnelle Ausbildung von Cross-Links wird mit Formaldehyd eine Momentaufnahme des Protein-Interaktoms einer lebenden Zelle unter physiologischen Bedingungen erzeugt und auch die Identifikation von PPIs ermöglicht, die nur zeitlich begrenzt existieren. Auch Degradierungsprozesse, wie der proteolytische Abbau, werden durch Formaldehyd abgestoppt (Hall und Struhl, 2002; Vasilescu et al., 2004; Sutherland et al., 2008; Müller et al., 2011).

Formaldehyd-Cross-Linking ist mit Antikörper-Bindungen und der Reinigung mittels Protein-Tags kompatibel, was bereits in zahlreichen Arbeiten gezeigt wurde. Dennoch kann eine Maskierung oder Veränderung von benötigten Epitopen oder funktionellen Gruppen in beiden Fällen die Effizienz reduzieren (Hall und Struhl, 2002; Vasilescu et al., 2004; Herzberg et al., 2007; Sutherland et al., 2008; Toews et al., 2008; Bousquet-Dubouch et al., 2009; Smart et al., 2009; Klockenbusch und Kast, 2010; Müller et al., 2011).

Formaldehyd-Cross-Links sind reversibel und können durch kurzes Aufkochen entfernt werden. Dies ist vor allem dann von Bedeutung, wenn die Bestandteile von Proteinkomplexen mittels SDS-PAGE oder Massenspektrometrie untersucht werden sollen (Vasilescu et al., 2004; Guerrero et al., 2006; Vasilescu und Figeys, 2006; Sutherland et al., 2008).

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Der spannungsabhängige Calciumkanal $Ca_v1.2$ und seine Regulation sind in verschiedenen physiologischen Abläufen von hoher Bedeutung. Erbliche Mutationen im für $Ca_v1.2$ codierenden CACNA1C-Gen können zu schweren Erkrankungen wie dem Timothy Syndrom (Long-QT 8 Syndrom) oder dem Brugada Syndrom führen und stehen auch im Zusammenhang mit bipolarer Störung (Erleben et al., 2006; Ferreira et al., 2008; Hedley et al., 2009; Green et al., 2010).

$Ca_v1.2$ ist ein wichtiges Target für die pharmakologische Behandlung verschiedener pathologischer Zustände. Blocker von $Ca_v1.2$ und von ihnen abgeleitete Substanzen werden häufig als Arzneimittel eingesetzt, so zum Beispiel zur Senkung des Blutdrucks bei arterieller Hypertonie oder zur Behandlung der stabilen Angina Pectoris (Triggle, 2006). Durch die steigende Verbreitung moderner Wohlstandskrankheiten ist für die Zukunft zu erwarten, dass pharmakologische Entwicklungen, die $Ca_v1.2$ betreffen, weiter an Bedeutung gewinnen werden.

Das Kanalprotein $Ca_v1.2$ funktioniert nicht isoliert, sondern als Teil von Proteinkomplexen. Einige Proteine in diesen Komplexen sind bereits längere Zeit bekannt und ihre Funktionen konnten teilweise geklärt werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass weiterhin nicht alle Interaktionen innerhalb der $Ca_v1.2$ -Komplexe bekannt sind. Auch ist anzunehmen, dass darüber hinaus viele zeitlich begrenzte Interaktionen bislang nicht nachgewiesen worden sind.

Für die Entwicklung neuer pharmakologisch relevanter Substanzen wird es entscheidend sein, die Umgebung von $Ca_v1.2$ besser kennen und verstehen zu lernen, um einerseits zusätzliche mögliche Targets für Arzneimittel aufzudecken und andererseits mögliche Risiken besser abschätzen zu können. Auch könnten hierdurch möglicherweise neue diagnostische Marker identifiziert werden.

In dieser Arbeit sollten durch die Markierung von Ca_v1.2 mit dem SNAP-Tag verschiedene Fragestellungen untersucht werden. Im Fokus stand die Analyse der Protein-Protein-Interaktionen von Ca_v1.2. Hierfür sollte unter Verwendung des SNAP-Tag eine Technik entwickelt werden, durch die Interaktionspartner von Ca_v1.2 isoliert werden können. Die Etablierung dieser Technik sollte *in vitro* durch die Verwendung von geeigneten Zellkulturen realisiert werden.

Des Weiteren sollten die Voraussetzungen für eine transgene Mauslinie erzeugt werden, die Ca_v1.2 als Fusionsprotein mit dem SNAP-Tag produziert. Die zuvor etablierten Methoden würden hier *in vivo* Anwendung finden, um die Protein-Protein-Interaktionen von Ca_v1.2 in der Maus zu analysieren. Damit könnten wertvolle Einblicke in die zelluläre Umgebung von Ca_v1.2 gegeben und neue Ansatzpunkte für die Erforschung von dessen Regulation geschaffen werden.

Die Funktion der PKA-Phosphorylierung von Serin 1928 gilt bislang als nicht verstanden. Viele verschiedene Untersuchungen haben teils sehr unterschiedliche Ergebnisse geliefert, die sich einander teils widersprachen oder widerlegten. Der SNAP-Tag sollte als ein Werkzeug verwendet werden, um den Einfluss von Serin 1928 auf die Stabilität und die Lokalisation des Kanals *in vitro* zu untersuchen. Hierfür sollten Ca_v1.2-Serin1928-Mutanten mittels Fluoreszenzmarkierung des SNAP-Tag untersucht werden.

2 Material

2.1 Chemikalien und Reagenzien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
2-log DNA Ladder	New England Biolabs
$\alpha_{32}\text{P}$ -dCTP	Hartmann Analytic
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 30% (29:1)	Bio-Rad
Agar-Agar	Roth
Agarose LE	Biozym
Ammoniumacetat	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ampicillin, Natriumsalz	Sigma-Aldrich
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Borsäure	Roth
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth
Bromphenolblau	Serva
Calpain-Inhibitor I	Appllichem
Calpain-Inhibitor II	Appllichem
Chloroform	Roth
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
DMEM (#11960)	Invitrogen
DMEM+GlutaMAX (#31966)	Invitrogen
dNTPs	Roth
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Invitrogen
Esgro LIF (Leukemia Inhibitory Factor)	Millipore
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Roth
Fötales Rinderserum (FBS; #10270098)	Invitrogen
Geneticin (G418)	Invitrogen
Glucose	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	Roth

<u>Bezeichnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Hefeextrakt	Roth
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kanamycinsulfat	Sigma-Aldrich
L-Glutamin	Invitrogen
Lipofectamin 2000	Invitrogen
M16-Medium	Sigma
M2-Medium	Sigma
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck
MEM (#21090)	Invitrogen
MEM Nicht Essentielle Aminosäuren Lösung, 100x	Invitrogen
Metafectene Pro	Biontex
Methanol	Roth
Milchpulver (Blotting-Grade Blocker, non fat dry milk)	Bio-Rad
N-Laurylsarcosin	Sigma-Aldrich
Natrium-Pyruvat Lösung, 100x	Invitrogen
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumcitrat	Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natronlauge	Roth
Opti-MEM Reduced Serum Medium (#51985)	Invitrogen
Paraformaldehyd	Roth
Penicillin/Streptomycin, 100x	Invitrogen
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth
Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Invitrogen
PMSF	Fluka
Precision Plus Dual Color Protein Standard	Bio-Rad
Propidiumiodid	Biochemika
Protease Inhibitor Cocktail (für Säugerzellen)	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Roche
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche
RNase A	Roche
Saccharose	Roth
Salzsäure	Roth
SNAP-Capture Pull-Down Resin	New England Biolabs
SNAP-Cell 360	New England Biolabs

<u>Bezeichnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
SNAP-Cell 505	New England Biolabs
SNAP-Cell TMR-Star	New England Biolabs
ssDNA (DNA aus Heringsperma)	Sigma-Aldrich
Superfect	Qiagen
Tetracyclin	Sigma-Aldrich
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Tris	Roth
Triton X-100	Sigma-Aldrich
tRNA	Roche
Trypsin/EDTA, 0,25 %	Invitrogen
Trypsin/EDTA, 0,5 %	Invitrogen
Trypton	Roth
Tween 20	Sigma-Aldrich

2.2 Kits

<u>Kit</u>	<u>Verwendung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Amersham ECL Prime	Western-Blot Detektions-Reagenz	GE Healthcare Life Sciences
Plasmid Maxi Kit	Maxipräparation von Plasmid-DNA	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Minipräparation von Plasmid-DNA	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Gelextraktion von DNA	Qiagen
QuikChangeLightning Kit	Genetische Mutationen	Stratagene
Random Primed Labeling Kit	Southern Blot Sondenherstellung	Roche
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit	Klonierung von Southern-Sonden	Invitrogen

2.3 Enzyme

2.3.1 Restriktionsenzyme

<u>Restriktionsenzym</u>	<u>Erkennungssequenz</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Acc65I	GGTACC	New England Biolabs
AfIII	CTTAAG	New England Biolabs
AgeI	ACCGGT	New England Biolabs
Ascl	GGCGCGCC	New England Biolabs
AsiSI	GCGATCGC	New England Biolabs
BamHI / BamHI-HF	GGATCC	New England Biolabs
BspHI	TCATGA	New England Biolabs
BstEII	GGTNACC	New England Biolabs
Clal	ATCGAT	New England Biolabs

<u>Restriktionsenzym</u>	<u>Erkennungssequenz</u>	<u>Bezugsquelle</u>
EcoRI / EcoRI-HF	GAATTC	New England Biolabs
EcoRV / EcoRV-HF	GATATC	New England Biolabs
HindIII	AAGCTT	New England Biolabs
KpnI-HF	GGTACC	New England Biolabs
NcoI	CCATGG	New England Biolabs
NheI	GCTAGC	New England Biolabs
NotI / NotI-HF	GCGGCCGC	New England Biolabs
PacI	TTAATTA	New England Biolabs
PstI	CTGCAG	New England Biolabs
PvuI / PvuI-HF	CGATCG	New England Biolabs
RsrII	CGGWCCG	New England Biolabs
Sall	GTCGAC	New England Biolabs
SmaI	CCCGGG	New England Biolabs
SpeI	ACTAGT	New England Biolabs
XbaI	TCTAGA	New England Biolabs
XhoI	CTCGAG	New England Biolabs
XmnI	GAANNNTTC	New England Biolabs

2.3.2 Andere Enzyme

<u>Enzym</u>	<u>Verwendung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	Dephosphorylierung	New England Biolabs
Cre Rekombinase	<i>in vitro</i> -Rekombination	New England Biolabs
GoTaq DNA Polymerase	Genotypisierung von ES-Zellen	Promega
Phusion HF DNA Polymerase	DNA-Amplifikation	New England Biolabs
Proteinase K	Zell-Lyse	Roche
T4 DNA Ligase	Ligation	New England Biolabs

2.4 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH hergestellt.

2.4.1 PCR-Primer zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

<u>Primerbezeichnung</u>	<u>Sequenz in 5'-3'-Richtung</u>	<u>Verwendung</u>
5'ArmScreenI_fw	GCG ATC GCG GCC GCT CAG TTC ATA GAG ATG G	Herstellung Screening-Testvektor
5'ArmScreen_rev	CCC AGA GCG GCC GCT TCT AGG TCA TGG TGG TAA C	Herstellung Screening-Testvektor
Scrn4fw	CAG ACA GTT ACC ACC ATG ACC	Screening-PCR
RE22_rev	GAA TTG ACC TGC AGG GGC CCT	Screening-PCR, Cre-Rekombinase Test
CreScrn_fw	GGA ATG ATG TCA GCT CTC ATG	Cre-Rekombinase Test
ScrnPCR_REV_1	CCA GTC CTT CTG AAA TCA AG	Cre-Rekombinase Test
5'Arm_Not_for	GCG CTC GCG GCC GCG ACA CTG GTC ACT GGG TGT GAT	Herstellung Southern-Sonde
5'SouS2_Bam_rv	CCC AGA GGA TCC GGT TAC TCC ACT CTT AGG TCC	Herstellung Southern-Sonde
LK1SNAP_FW	GCG ATC AAG CTT GGC GCG CCG CCG CCA CCA TGG TCA ATG AG	Herstellung ROSA26-Gentargeting Vektor
LK1SNAP_RV	GGC AAG CCT GGG CTG GGT TGA GGC GCG CCT CTA GAA GAC CC	Herstellung ROSA26-Gentargeting Vektor
LK1preSma_for	GGC CGA CGA CAT TCT CAG CGG	Herstellung ROSA26-Gentargeting Vektor
LK1SNAPMutRev	CCC AGA ACT AGT GGC GCG CCT CAA CCT GCA GGA CCC AGC CC	Herstellung ROSA26-Gentargeting Vektor
ROSA26probeFW	ATG GGA TTA GAG GCT TTA AGG T	Herstellung ROSA-Sonde
ROSA26probeRV	CGG AGA GAC AAA TAC AAA TCT G	Herstellung ROSA-Sonde
LK1_AlaMut1	GGT CGA AGG GCT GCC TTC CAC CTG GAG TG	S1928A-Mutation
LK1_AlaMut2	CAC TCC AGG TGG AAG GCA GCC CTT CGA CC	S1928A-Mutation
LK1_AspMut1	GGT CGA AGG GCT GAG TTC CAC CTG GAG TG	S1928D-Mutation
LK1_AspMut2	CAC TCC AGG TGG AAC TCA GCC CTT CGA CC	S1928D-Mutation
LK1_GluMut1	GGT CGA AGG GCT GAC TTC CAC CTG GAG TG	S1928E-Mutation
LK1_GluMut2	CAC TCC AGG TGG AAG TCA GCC CTT CGA CC	S1928E-Mutation

2.4.2 PCR-Primer zur Sequenzierung

<u>Primerbezeichnung</u>	<u>Sequenz in 5'-3'-Richtung</u>	<u>Verwendung</u>
T3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	diverse Sequenzierungen
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	diverse Sequenzierungen
RE22_rev	GAA TTG ACC TGC AGG GGC CCT	Ca _v 1.2-SNAP-Gentargeting Vektor
check1for	TAG GTC CCT CGA AGC TTA	Ca _v 1.2-SNAP-Gentargeting Vektor
TVSeq1	CCT TAT TTG GTG ATA GTG G	Ca _v 1.2-SNAP-Gentargeting Vektor
TVSeq2	GGC TGA CGC CTG CGA CAT GAC	Ca _v 1.2-SNAP-Gentargeting Vektor
TVSeq3	CAA TGT TCC TAA TGG GTT CG	Ca _v 1.2-SNAP-Gentargeting Vektor
TVSeq4	GCT TCG ATA TAT TCT GTG	Ca _v 1.2-SNAP-Gentargeting Vektor
TVSeq5	GGT CTA CAT TCC TTT CTC	Ca _v 1.2-SNAP-Gentargeting Vektor
TVSeq6	ACA CTT CTC AAC CAT CCA GAG	Ca _v 1.2-SNAP-Gentargeting Vektor
LK1seqA	GTC CAA ACT CAT CAA TGT	ROSA26-Gentargeting Vektor
LK1seqB	GGA TTC GAC GTG AAG GCG	ROSA26-Gentargeting Vektor
LK1seqC	CAC CGG ATC TCC AAG TCG	ROSA26-Gentargeting Vektor
LK1seqD	GCT GTG GAC AAC CTG GCT	ROSA26-Gentargeting Vektor
LK1seqE	CCA TTG GGA ACA TCG TGA	ROSA26-Gentargeting Vektor
LK1seqF	GAA CGC AGA GGA GAA CTC	ROSA26-Gentargeting Vektor
LK1seqG	GGA AAC CTG GAA CAA GCC	ROSA26-Gentargeting Vektor
LK1seqH	GCA GAG TGC TGC AGT GAG	ROSA26-Gentargeting Vektor
LK1seqI	CAG AAC GAG CAG GAC GCG A	ROSA26-Gentargeting Vektor
LK1seqJ	GAC GTG CTG TAC TGG GTC	ROSA26-Gentargeting Vektor
Test_Seq_for	GCA GCA TGG AAG CTC AGC TC	S1928-Mutationen
Screen1EQ_1_for	CTG GTC TCC ATG AAC ATG CCT	S1928-Mutationen
SNAP_Screen_for	GCT GAA AGT GGT GAA GTT CG	S1928-Mutationen

2.5 Antikörper

<u>Antikörper (Ursprung)</u>	<u>Zielprotein</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Anti-Ca _v β ₂ (rabbit)	Ca _v β ₂	1:200	Prof. F. Hofmann, TU München
Anti-β-Actin (rabbit)	β-Actin	1:1.000	Abcam
Anti-SNAP (rabbit)	SNAP-Tag	1:1.000	New England Biolabs
Anti-rabbit-HRP (Goat)	sekundärer Antikörper	1:10.000	Jackson ImmunoResearch

2.6 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Akku-Pipettierhilfe „Rotafiller 3000“	Roth
Bakterienschüttler „Innova 43“	New Brunswick Scientific
Belichtungskassette „Hypercassette“	Amersham Biosciences
Binokular „Axiovert 25“	Zeiss
Binokular „Stemi2000-C“	Zeiss
CO ₂ -Inkubator „HERACell“	Heraeus
Druckdosierer „CellTram Air“	Eppendorf
Druckdosierer „CellTram Vario“	Eppendorf
Durchflusssyztometer „Gallios“	Beckman Coulter
Elektroporator „Gene Pulser“	Bio-Rad
Elektroporator „Micropulser“	Bio-Rad
Feinwaage „AEJ“	Kern
Filmentwickler „Optimax“	Protec
Fluoreszenzmikroskop „CTR 6000“	Leica
Fluoreszenzspektrometer „Mithras LB 940“	Berthold Technologies
GelDoc	Peqlab
Heizblock „Thermomixer 5436“	Eppendorf
Heizrührer „MR 3001K“	Heidolph
Heizwasserbad „1092“	GFL
Homogenisator „Potter S“	Sartorius
Inkubator	Memmert
Mikromanipulator „Transferman NK2“	Eppendorf
Nanodrop „ND-1000“	Peqlab
PCR-Maschine „DNA Engine Peltier Thermal Cycler“	Bio-Rad
PCR-Maschine „Uno“	Biometra
PCR-Maschine „Uno II“	Biometra
pH-Meter „Seven Easy“	Mettler Toledo
Phosphoimager „Cyclon Plus“	Perkin Elmer
Phosphoimagerplatte	Kodak
Schüttler „Swip KM-2“	Edmund Bühler
Sicherheitswerkbank „HERAsafe“	Thermo Scientific
Spannungsquelle „Power Pac 300“	Bio-Rad
Spannungsquelle „Power Pac Basic“	Bio-Rad
Szintilationsmessgerät „Tri-Carb 2100 TR“	Packard
Taumelschüttler „Polymax 1040“	Heidolph
Tischzentrifuge	Neolab
Überkopfschüttler	Neolab

<u>Gerät</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Ultrazentrifuge „L-80“	Beckmann
UV-Crosslinker „Stratalinker 1800“	Stratagene
UV-Tisch „Transilluminator 4000“	Stratagene
Vortexer „REAX Top“	Heidolph
Waage „MC1 Laboratory LC 620 D“	Sartorius
Wasserreinigungsanlage „Milli-Q Advantage“	Millipore
Zentrifuge „Centrifuge 5415D“	Eppendorf
Zentrifuge „Centrifuge 5424“	Eppendorf
Zentrifuge „Mikro 22R“	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge „Rotanta 46R“	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge „Rotina 420R“	Hettich Zentrifugen

2.7 Verbrauchsmaterial

<u>Verbrauchsmaterial</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Amersham Biosciences Hybond-C Extra	GE Healthcare Life Sciences
Amersham Biosciences Hybond-N	GE Healthcare Life Sciences
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare Life Sciences
Amicon Ultra-0.5 ml, 100 kDa	Millipore
Dialyseschlauch (D0405-100FT)	Sigma-Aldrich
Elektroporationsküvetten, 2 mm, Bakterien	Peqlab
Elektroporationsküvetten, 4 mm, ES-Kultur	Peqlab
Haltekapillare 35° GC-100T-10	Biomedical Instruments
illustra NICK Columns	GE Healthcare Life Sciences
Injektionskapillare 20° 100, Gr.40	Biomedical Instruments
Kryoröhrchen	Nunc
Kulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²), ES-Kultur	Corning
Kulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²), Zellkultur	TPP
Kulturröhrchen (15 ml)	Falcon
Kulturschalen (55 cm ²)	Corning
Mini-Protean TGX Precast Gele	Bio-Rad
Multiwell-Platten (6-well, 12-well, 24-well), Zellkultur	Nunc
Multiwell-Platten (6-well, 24-well, 96-well), ES-Kultur	Corning
Multiwell-Platte, 96-well, transparenter Boden (#3631)	Corning
Parafilm	Roth
Pasteurpipetten	Roth
Petrischalen 10 cm, unbeschichtet	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
200 µl PCR-Stripes	Roth
0,5 ml Reaktionsgefäße	Abimed

Verbrauchsmaterial

1,5 ml Reaktionsgefäße
2,0 ml Reaktionsgefäße
Southernfolie
Stripetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)
Transferpipette, 115-124 µm
Transferpipette, 125-134 µm
Whatman 3MM CHR Filterpapier
Zellschaber
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)

Bezugsquelle

Axygen Biosciences
Eppendorf
GE Healthcare Life Sciences
Corning
Biomedical Instruments
Biomedical Instruments
GE Healthcare Life Sciences
TPP
Corning, Greiner, Sarstedt, TPP

3 Methoden

3.1 Bakterienkultur

3.1.1 Verwendete Plasmide und BACs

pcDNA3 (Invitrogen)

Der 5,4 kb große pcDNA3-Vektor wird für die Überexpression von Genen in der Zellkultur verwendet. Hierfür besitzt er einen CMV-Promotor vor der Multiple Cloning Site und ein PolyA-Signal dahinter. Für die Vermehrung in *E.coli* verfügt er zudem über einen pUC-ori-Replikationsursprung und eine Resistenz gegen Ampicillin.

pBluescript II KS(+) (Stratagene)

Der 3 kb große pBluescript II KS(+) wird für die Klonierung von Zwischenvektoren und die Amplifikation von DNA in *E.coli* verwendet. pBluescript II KS(+) besitzt sowohl einen pUC-ori-Replikationsursprung als auch eine Ampicillin-Resistenz.

CACNA1C-SNAP Gentergeting-Vektor (AG Moosmang)

Dieser etwa 14,3 kb große Gentergeting-Vektor wurde hergestellt, um den SNAP-Tag an das endogene CACNA1C-Gen anzuhängen (Details in 4.2).

5'Arm-floxed-pBlue (AG Moosmang)

Dieses 8,9 kb große Plasmid ist ein Zwischenvektor aus der Klonierung des CACNA1C-SNAP Gentergeting-Vektors. Er umfasst den 5'-Homologie-Arm und die NeoTK-Kassette, die in den pBluescript II KS(+) kloniert wurden.

CAG-STOP-EGFP-ROSA Targeting vector (CTV; Addgene)

Der CTV ist ein 16,1 kb großer, für den ROSA26-Lokus hergestellter Gentergeting Vektor. Über eine AscI-Schnittstelle kann ein Gen in den CTV ligiert werden, das in den ROSA26-Lokus eingebracht werden soll. Der CTV besitzt loxP-flankierte Neo- und Stop-Kassetten. Erstere vermittelt eine Resistenz gegen das Medikament Geneticin

(G418), letztere verhindert die Expression des dahinter ligierten Gens. Erst durch Einwirken von Cre-Recombinase werden die beiden Kassetten ausgeschnitten und die Expression des Gens ermöglicht. Dadurch eignet sich der CTV für konditionales Gentergeting (siehe 3.4.1). Die Expression des Gens erfolgt unter der Kontrolle des CAG-Promoters, der sich 5' vor den beiden Kassetten befindet. Durch eine IRES-EGFP-Kassette wird zusätzlich zum eingebrachten Gen auch EGFP exprimiert, das als Reportgen fungiert. Diese Kassette kann über flankierende FRT-Sequenzen (engl.: Flippase Recognition Target) mittels Flippase entfernt werden. Zusätzlich besitzt der CTV ein PolyA-Signal und Homologie-Regionen zum ROSA26-Lokus der *Mus musculus* Linie C57BL/6J. Der CTV wurde bereits in verschiedenen Arbeiten für das Targeting des ROSA26-Lokus eingesetzt (Thai et al., 2007; Xiao et al., 2007).

pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen)

Dieser 3,5 kb große Vektor ist Teil des Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kits (Invitrogen) und liegt linearisiert vor. Er besitzt am jeweiligen 3'-Ende der DNA-Stränge eine kovalent gebundene *Vaccinia* Virus DNA Topoisomerase I. Diese erlaubt die schnelle Insertion von PCR-Produkten ohne vorherigen Restriktionsverdau. Anschließend wird der pCR-Blunt II-TOPO in Bakterien transformiert. Die Selektion von Bakterienklonen, die den Vektor beinhalten, wird durch eine Kanamycin-Resistenz ermöglicht. Die Selektion von Bakterienklonen, in deren Vektor die Insertion des PCR-Produktes erfolgte, wird erreicht durch die Verhinderung der Expression des im Vektor enthaltenen *ccdB*-Gens, das andernfalls ein toxisches Produkt exprimiert.

pmaxGFP (Lonza)

Der 3,5 kb große pmaxGFP beinhaltet CopGreenGFP, eine GFP-Mutante, unter der Kontrolle des CMV-Promoters. Zur Vermehrung in *E.coli* besitzt das Plasmid einen pUC-ori-Replikationsursprung und eine Kanamycin-Resistenz.

pCDNA3-Ca_v1.2-SNAP (AG Moosmang)

Dieses 12,5 kb große Plasmid enthält die Ca_v1.2-cDNA aus der glatten Muskulatur von Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*). Sie wurde am 3'-Ende mit der für den

SNAP-Tag codierenden DNA-Sequenz fusioniert und in den für Säugerzellen geeigneten Expressionsvektor pcDNA3 eingebracht.

Hierfür wurde $Ca_v1.2$ über die EcoRI- und XbaI-Schnittstellen inseriert. Das Stop-Codon von $Ca_v1.2$ wurde entfernt und durch eine BamHI-Schnittstelle ersetzt. Über diese BamHI-Schnittstelle und diejenige für XbaI wurde der SNAP-Tag eingebracht.

pB- $Ca_v1.2$ (C-Term)-SNAP (AG Moosmang)

Zur Erzeugung dieses etwa 5,9 kb großen Zwischenvektors wurde aus pcDNA3- $Ca_v1.2$ -SNAP der 3'-Bereich des Inserts mittels EcoRV und XbaI ausgeschnitten und in pBluescript II KS(+) ligiert. Der umklonierte Bereich umfasst das 2,2 kb große 3'-Ende von $Ca_v1.2$ sowie den SNAP-Tag.

pcDNA3- $Ca_v\beta_2$ (AG Moosmang)

Dieser etwa 7,4 kb große pcDNA3-Vektor enthält die cDNA der $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit aus der glatten Muskulatur von Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) und wird zu deren Expression in der Zellkultur verwendet.

RP24 BAC (AG Moosmang)

Der RP24 BAC (engl.: bacterial artificial chromosome) enthält die genomische DNA des CACNA1C-Gens aus der *Mus musculus* Linie C57BL/6J. Er wird für die Erzeugung von PCR-Produkten verwendet, die homolog zu Sequenzen in diesem Locus sein sollen.

3.1.2 Verwendete Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden die Bakterienstämme XL1-Blue und XL10-Gold der Firma Stratagene verwendet. Ausgehend von den ausgänglichen XL1-Blue Bakterienzellen sind elektrokompente Bakterien hergestellt worden (siehe 3.1.6). Diese wurden für die meisten Transformationen verwendet (siehe 3.2.5.1). Bei dem Bakterienstamm XL10-Gold handelt es sich um chemisch kompetente Bakterien, welche besonders für die Transformation von großen Vektoren geeignet sind (siehe 3.2.5.2). Sie wurden

verwendet, wenn aufgrund zu hoher Vektorgröße eine Transformation von XL1-Blue nicht erfolgreich war.

Für die Erzeugung von nicht dam-methylierten Plasmiden wurde der chemisch kompetente Bakterienstamm One Shot INV110 (Invitrogen) verwendet, welcher dam- und dcm-defizient ist.

3.1.3 Medien

Flüssigkulturen von Bakterienstämmen wurden in LB-Vollmedium (engl.: lysogeny broth) kultiviert. Um ein selektives Wachstum zu erreichen, wurde dem Medium unmittelbar vor der Verwendung nach Bedarf ein Antibiotikum zugegeben.

Zum Wachstum von Bakterien in Petrischalen auf Festmedium wurde LB-Agar verwendet. LB-Agar wurde nach dem Autoklavieren auf 50 °C abgekühlt, das Antibiotikum zugesetzt und nach dem Mischen in Petrischalen gegossen.

Nach Transformationen wurde Bakterienzellen SOC(+)-Medium zugegeben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Antibiotika Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml), Kanamycin (Endkonzentration 50 µg/ml) und Tetrazyklin (Endkonzentration 10 µg/ml) verwendet.

LB-Medium		SOC(-)	
Trypton	10 g	Trypton	2 g
Hefeextrakt	10 g	Hefeextrakt	0,5 g
NaCl	5 g	5 M NaCl	0,2 ml
Glucose	1 g	1 M KCl	0,25 ml
H ₂ O	ad 1000 ml	H ₂ O	ad 100 ml
(autoklavieren)		(autoklavieren)	
Lagerung bei RT		Aliquotierung zu je 4,8 ml	
		Lagerung bei -20 °C	

LB-Agar		SOC(+)	
LB-Medium	500 ml	SOC(-)	4,8 ml
Agar	16 g	1 M MgCl ₂ (steril)	0,05 ml
(autoklavieren)		1 M MgSO ₄ (steril)	0,05 ml
Petrischalen befüllen		20 % Glucose (steril)	0,1 ml
Lagerung bei 4 °C		Lagerung bei -20 °C	

3.1.4 Kultivierung von Bakterienstämmen

Flüssigkulturen wurden bei 37 °C in Kulturröhrchen oder Erlenmeyerkolben inkubiert. Um ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, fand dies unter Schütteln bei 225 rpm statt. Für Bakterienstämme, die besonders große Plasmide beinhalten, wurde bei Bedarf die Inkubationstemperatur auf 30 °C abgesenkt, um langsamere Zellteilungen zu erreichen.

Kulturen auf LB-Agar wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.5 Lagerung von Bakterien

Kurzfristig wurden LB-Agar-Platten mit Bakterienkolonien bei 4 °C gelagert. Um Bakterienstämme längerfristig zu lagern, wurden Glycerinkulturen hergestellt. Hierfür wurde ein Aliquot einer dicht gewachsenen Flüssigkultur 1:1 mit Glycerin gemischt und bei -80 °C eingefroren.

3.1.6 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Für die Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurde von XL1-Blue-Zellen (Stratagene) ein Verdünnungsausstrich auf LB-Agarplatten mit Tetrazyklin durchgeführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde ein isolierter Klon gepickt, damit 7 ml LB-Medium ohne Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit 1 ml dieser Vorkultur eine 500 ml Kultur LB-Medium angeimpft und bei 37 °C und 225 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,5 bis 0,7 inkubiert. Ab diesem Punkt wurde auf strikte Kühlung auf Eis beziehungsweise 4 °C geachtet. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 3600 g für 10 min geerntet und zweimal mit sterilem H₂O gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift mit steriler 10 % Glycerin-Lösung wurden die Bakterien in 2 ml 10 % Glycerin-Lösung aufgenommen und zu je 50 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden schnell in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung von DNA

3.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Minipräparation von Plasmid-DNA

Für die Präparation von kleinen Mengen Plasmid-DNA zu analytischen Zwecken wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Maxipräparation von Plasmid-DNA

Für die Präparation von größeren Mengen Plasmid-DNA aus 100-500 ml Bakterienkultur wurde das Plasmid Maxi Kit (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

3.2.1.2 Isolierung von genomischer DNA

In dieser Arbeit wurde genomische DNA aus ES-Zellen isoliert. Aufgrund der großen Länge der genomischen DNA-Polymere können diese unter Scherkräften (z.B.: Pipettieren, Schütteln, Zentrifugieren) leicht zerbrechen. Daher wurde bei deren Isolierung auf entsprechende mechanische Einwirkung verzichtet.

Lysepuffer	
NaCl	0,3 g
0,5 M Tris/HCl pH 7,5	10 ml
EDTA	1,86 g
N-Laurylsarcosin	2,5 g
H ₂ O	ad 500 ml
(autoklavieren)	
Proteinase K vor Gebrauch zugeben,	
Endkonzentration:	0,25 mg/ml

ES-Zell-Klone wurden in 96-Well-Platten über Nacht bei 55 °C in 50 µl Lysepuffer inkubiert. Dabei wurden die Zellmembranen durch das im Puffer enthaltene Tensid N-Laurylsarcosin solubilisiert und Proteine durch Proteinase K zerstört. Hierdurch wurde die genomische DNA freigesetzt. Am Folgetag wurden je 150 µl 100 % Ethanol mit 75 mM Natriumacetat zugegeben und für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert, um die DNA zu fällen. Nach vorsichtigem Abgießen des Überstandes wurde mit 50 µl 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA getrocknet und dann in 30 µl H₂O gelöst.

3.2.2 Reinigung von DNA

3.2.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde angewendet, um DNA-Lösungen von Kontaminationen, wie Proteinen zu reinigen. Hierfür wurde ein Volumen einer wässrigen DNA-Lösung mit einem Volumen einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1, Roth) versetzt und gut gemischt. Durch anschließende Zentrifugation (20.000 g, 1 min) wurde das Gemisch in eine obere wässrige Phase und eine untere organische Phase aufgetrennt. Verunreinigungen sind in der unteren organischen Phase oder an der Grenzfläche zwischen den beiden Phasen enthalten. Die wässrige Phase, welche die DNA beinhaltet, wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Um verbliebene Spuren des giftigen Phenols zu entfernen, wurde mit einem Volumen Chloroform versetzt, gut gemischt, zentrifugiert (20.000 g, 1 min) und wiederum die obere wässrige Phase abgenommen. Anschließend wurde die DNA zur Aufkonzentrierung mittels Ethanol-Fällung präzipitiert (siehe 3.2.2.2).

3.2.2.2 Ethanolfällung

Aufkonzentrierung von DNA

Durch die Ethanolfällung wurde DNA aus einer wässrigen Lösung gefällt. Damit wurde die DNA isoliert und durch Lösen in einem geringeren Volumen Wasser aufkonzentriert. Ein Volumen wässriger DNA-Lösung wurde mit 2,5 Volumen 100 %

Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat versetzt, gut gemischt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation (20.000 g, 30 min) pelletiert und der Überstand abgegossen. Das Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, um die DNA von Salzrückständen zu befreien. Je Waschschrift wurde das Pellet in 800 µl 70 % Ethanol aufgenommen, wiederum durch Zentrifugation (20.000 g, 5 min) pelletiert und der Überstand abgegossen. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und im gewünschten Volumen Wasser aufgenommen.

Vorbereitung von DNA für die Elektroporation

Eine andere Variante der Ethanolfällung wurde in dieser Arbeit verwendet, um die DNA eines Ligationsansatzes vor der Elektroporation (siehe 3.2.5.1) von störenden Salzen zu befreien. Hierfür wurde ein Ligationsansatz in zwei Aliquots zu je 10 µl aufgeteilt. Es wurden jeweils 5 µl tRNA-Lösung (1 µg/µl), 10 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 50 µl 100 % Ethanol zugegeben. Die Gemische wurden gevortext und sofort bei 20.000 g für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit je 800 µl 70 % Ethanol durch vortexen und Zentrifugation (20.000 g, 5 min) gewaschen. Der Überstand wurde jeweils vorsichtig abgegossen und das Pellet nach dem letzten Waschschrift bei 37 °C getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 15 µl H₂O gelöst und für die Elektroporation (siehe 3.2.5.1) verwendet.

3.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von wässrigen DNA-Lösungen wurde mittels „Nanodrop ND-1000“ (Peglab) gemessen. Dieses Gerät misst spektrophotometrisch die optische Dichte (OD) der Probe bei verschiedenen Wellenlängen. Anhand der OD bei 260 nm wird die DNA-Konzentration in der Probe berechnet. Aus dem Quotienten der OD bei 260 nm zur OD bei 280 nm kann Rückschluss auf die Reinheit der Probe gezogen werden. Ein Quotient zwischen 1,8 und 2,0 ist typisch für eine saubere DNA-Lösung.

3.2.4 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

3.2.4.1 Restriktionsverdau

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme stammen von New England Biolabs und wurden gemäß Herstellerempfehlung angewendet.

Reaktionsansätze für analytische Restriktionsschnitte wurden meist für 1-2 h inkubiert, diejenigen für präparative Restriktionsschnitte für mindestens 4 h oder über Nacht. Alle Inkubationen fanden unter Schütteln in einem Heizblock statt.

Beispielansatz eines Restriktionsverdaues	
DNA-Lösung	x µl
10x Puffer	2 µl
10x BSA-Lösung	2 µl
Enzym	y µl
H ₂ O	ad 20 µl

3.2.4.2 Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung von DNA wird angewendet, um die durch einen Restriktionsverdau geschnittene DNA für die Ligation vorzubereiten. In der Ligationsreaktion können DNA-Stränge nur dann miteinander verknüpft werden, wenn je einer einen 5'-Phosphat- und einer einen 3'-Hydroxyl-Überhang besitzt. Um eine intramolekulare Re-Ligation zu verhindern, wird daher Vektor-DNA vor der Ligation dephosphoryliert. Dadurch kann eine Ligation der Vektor-DNA nur mit der Insert-DNA stattfinden, da ausschließlich diese über 5'-Phosphat-Überhänge verfügt. Auf diese Weise wird die Effizienz der folgenden Ligation deutlich gesteigert und der Aufwand, der für die Analyse von transformierten Ligationsprodukten notwendig ist, wesentlich reduziert.

In dieser Arbeit wurde die Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP, New England Biolabs) verwendet. Da sie in den Puffern der üblicherweise verwendeten Restriktionsenzyme von New England Biolabs aktiv ist, wurde sie am Ende der Inkubationszeit des Restriktionsverdaues diesem ohne weitere Zwischenschritte

zugegeben. Zu einem fertigen Restriktionsansatz wurde 1 μ l CIP hinzugefügt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 3.2.6), die Vektor-DNA aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert (siehe 3.2.7) und schließlich für die Ligation verwendet (siehe 3.2.4.3).

3.2.4.3 Ligation

Mittels Ligation werden zwei doppelsträngige DNA-Stücke über ihre 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Überhänge unter Ausbildung von Phosphodiesterbindungen verknüpft. Diese Reaktion wird durch ATP-abhängige Ligasen realisiert. In dieser Arbeit wurde hierfür die T4 DNA Ligase (New England Biolabs) verwendet. Sie verknüpft die restriktionsverdaute, dephosphorylierte und aufgereinigte Vektor-DNA mit der restriktionsverdauten und aufgereinigten Insert-DNA zu einem geschlossenen Plasmid. Die DNA des Ligationsansatzes wird anschließend in der Transformation eingesetzt (siehe 3.2.5), um entstandene Plasmid-DNA zur Vermehrung in Bakterien einzubringen.

Die Ligationsreaktion wurde bei 16 °C über Nacht durchgeführt. Eingesetzt wurden üblicherweise 5 ng Vektor-DNA und ein Insert-DNA-Überschuss in einem molaren Verhältnis zwischen 3:1 und 10:1.

Beispielansatz einer Ligationsreaktion	
restriktionsverdaute Vektor-DNA	x μ l
restriktionsverdaute Insert-DNA	y μ l
10x T4 Ligase-Puffer	2 μ l
T4 DNA Ligase	2 μ l
H ₂ O	ad 20 μ l

3.2.4.4 Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit

Der Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen) wurde gemäß den Herstellerangaben zur Klonierung von PCR-Produkten verwendet.

3.2.5 Transformation von Bakterien

3.2.5.1 Elektroporation

Für die Elektroporation wurden 50 µl elektrokompente Bakterien (siehe 3.1.6) auf Eis aufgetaut. Es wurden 2 mm Elektroporationsküvetten (Peqlab) gründlich mit H₂O gespült, getrocknet und unmittelbar vor der Verwendung auf Eis gestellt. Die entsalzte, zu elektroporierende DNA-Lösung (siehe 3.2.2.2) wurde ebenfalls auf Eis abgekühlt. Sobald die Bakterien vollständig aufgetaut waren, wurden sie auf die DNA-Lösung überführt, vorsichtig gemischt und 1 min auf Eis inkubiert. Dann wurde das Gemisch frei von Luftbläschen in die Elektroporationsküvette gegeben. Die Küvette wurde anschließend rundum abgewischt, um Eis und Wasser zu entfernen und mittels „Micropulser“ (Bio-Rad) bei 2,5 kV (entspricht dem vom Hersteller vorgefertigten Programm „Ec2“) elektroporiert. Konnte die Elektroporation ohne Kurzschluss stattfinden, wurde sofort 1 ml SOC(+)-Medium zugegeben. Danach wurden die Zellen mit dem Medium in ein Kulturröhrchen überführt und für 60-90 min bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde der Erfolg der Elektroporation überprüft.

3.2.5.2 Chemische Transformation

Chemische Transformationen wurden in dieser Arbeit mit dem Bakterienstamm XL10-Gold (Stratagene) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.6 Agarosegelelektrophorese

Zur Herstellung von Agarosegelen wurden 0,7-2,0 % (w/v) Agarose (Biozym) in 1x TBE unter Kochen in der Mikrowelle gelöst. Die Lösung wurde anschließend bis auf etwa 50 °C abgekühlt und Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich) zu einer Endkonzentration von 0,8 µg/ml zugegeben. Nach dem Mischen wurde das Gemisch in Gelschlitten gegossen. Durch das Verwenden von Kämmen wurden dem Gel Probenauftragstaschen der gewünschten Zahl und Größe hinzugefügt. Nach dem

Aushärten wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt und diese bis zur Bedeckung des Gels mit 1x TBE befüllt. Im Anschluss wurde der Kamm vorsichtig entfernt und die DNA-Proben sowie der DNA-Standard (2-log DNA Ladder, New England Biolabs) aufgetragen. Zur Auftrennung der in den Proben enthaltenen DNA wurde ein elektrisches Feld (5-10 V/cm) angelegt. Anhand des im Ladepuffer enthaltenen Bromphenolblau wurde der Gellauf verfolgt, nach Erreichen der gewünschten Laufweite beendet und das Gel aus der Kammer genommen. Für analytische Agarosegelelektrophoresen wurde das Gel in der Geldoc (Peqlab) unter UV-Licht analysiert. Für präparative Gelläufe wurde das Gel auf einen UV-Tisch („Transilluminator 4000“, Stratagene) gelegt und mit der Unterstützung des UV-Lichtes die DNA-Fragmente der gewünschten Größe mit einem sauberen Skalpel ausgeschnitten. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mittels Gelelution aus dem Gel isoliert.

10x TBE		6x Ladepuffer	
Tris-HCl	540 g	Ficoll 400	7,5 g
Borsäure	275 g	1 M Tris-HCl (pH 8,1)	1 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	200 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)	6,6 ml
H ₂ O	ad 1000 ml	10 % SDS	500 µl
		Bromphenolblau	Spatelspitze
		H ₂ O	ad 50 ml

3.2.7 Gelelution von DNA

Die Elution von DNA aus Agarosegelstücken, welche durch eine präparative Agarosegelelektrophorese (siehe 3.2.6) gewonnen wurden, wurde durch zwei verschiedene Techniken durchgeführt. Bei der chemischen Gelelution wird das Gelstück aufgelöst und anschließend die enthaltene DNA aus der Lösung isoliert. Bei der Elektroelution wird die DNA über ein elektrisches Feld aus dem Gelstück befördert. Die chemische Gelelution wurde für DNA-Fragmente bis 10 kb verwendet. Für größere DNA-Fragmente sinkt die Ausbeute mit dem verwendeten QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) stark ab, weshalb in diesem Fall die Elektroelution verwendet wurde.

3.2.7.1 Chemische Gelelution

Für die chemische Gelelution wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

3.2.7.2 Elektroelution

Für die elektrische Gelelution von DNA aus Gelstücken werden diese zusammen mit 1x TBE-Puffer in einen Dialyseschlauch (Sigma-Aldrich) überführt, der mit Klammern dicht verschlossen wird. Der Dialyseschlauch mit dem Gelstück wird dann in eine Elektrophoresekammer gegeben. Durch eine angelegte Spannung wandert die DNA elektrophoretisch durch das Gel, bis sie dieses verlässt und durch den Dialyseschlauch aufgehalten wird. Anschließend wird der 1x TBE-Puffer, der jetzt die DNA beinhaltet, abgenommen und die DNA mittels Ethanolfällung (siehe 3.2.2.2) präzipitiert.

3.2.8 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction, PCR) ist eine *in vitro* Methode, um bestimmte DNA-Fragmente zu amplifizieren. Sie besteht aus drei Schritten, die zyklisch wiederholt werden: Die Denaturierung, das Annealing, die Elongation. In der Denaturierung wird bei 95 °C die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge aufgespalten. Anschließend werden im Annealing-Schritt für die jeweilige Reaktion spezifische Oligonukleotide, die Primer, an komplementäre Bereiche der einzelsträngigen DNA gebunden. Die Primer definieren mit ihrem Bindungsort die Ränder des zu amplifizierenden DNA-Bereichs. Je einer bindet am codierenden und am nicht-codierenden Strang. Die Temperatur während des Annealings hängt von den verwendeten Primersequenzen ab. Sie wird hoch genug gewählt, dass unspezifische Primer-Bindungen unterbleiben, aber niedrig genug, dass die spezifische Bindung stattfinden kann. In der folgenden Elongation füllt eine DNA-Polymerase in 5'- nach 3'-Richtung, von einem gebundenen Primer ausgehend, den fehlenden Strang komplementär zum vorhandenen Strang mit Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) auf. Hierdurch entsteht wiederum

doppelsträngige DNA, wodurch ein Zyklus abgeschlossen ist. Die für die Elongation erforderliche Temperatur hängt von der verwendeten Polymerase ab, liegt aber in den meisten Fällen bei 72 °C. Durch die zyklische Wiederholung der drei Schritte wird der zwischen den Primern befindliche DNA-Bereich exponentiell vermehrt. Die PCR wird durch spezielle, programmierbare Maschinen, so genannte PCR-Cycler, automatisiert durchgeführt.

3.2.8.1 PCR-Anwendungen

Die PCR wurde in dieser Arbeit verwendet, um die genomische DNA von embryonalen Zellen zu analysieren (Screening-PCR), künstliche Mutationen in DNA einzubringen (Mutagenese-PCR) und um einzelne Basen innerhalb einer DNA-Sequenz zu verändern (QuikChange Mutagenese).

Screening-PCR

Die Screening-PCR wird angewendet, um nach dem Targeting von embryonalen Stammzellen selektionierte Zellklone auf eine mögliche homologe Rekombination am gewünschten Locus zu untersuchen.

Für Screening-PCRs wurde die GoTaq DNA Polymerase (Promega) verwendet.

Mutagenese-PCR

Diese PCR wird verwendet, um Veränderungen in eine vorliegende DNA einzubringen. Mit ihr können Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme eingebracht oder entfernt werden, sowie die DNA-Sequenz manipuliert werden, um zu einer anderen Aminosäuresequenz im codierten Protein zu führen. Diese Methode wird durch die Verwendung von Primern realisiert, die zu einem Teil komplementär zu dem Locus der DNA-Sequenz sind, an dem die Veränderung eingebracht werden soll und zum anderen Teil diejenige DNA-Sequenz beinhalten, welche an dieser Stelle eingebracht werden soll. Auf diese Weise binden die Primer an die vorliegende DNA und die Polymerase produziert in der Folge den um die gewünschte Veränderung verlängerten DNA-Strang.

Für Mutagenese-PCRs wurde die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) verwendet.

QuikChange Mutagenese

Sollen in einer vorliegenden DNA nur sehr wenige Basen verändert, eingebaut oder entfernt werden, ist das QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) eine effiziente Alternative zur Mutagenese-PCR. Die QuikChange kann nur auf DNA-Plasmide, nicht jedoch auf DNA-Fragmente angewendet werden. Sie besteht aus drei Schritten und verwendet eine modifizierte Pfu-basierte DNA Polymerase. In Schritt eins erfolgt eine PCR, für die zwei zueinander revers komplementäre Primer verwendet werden, die homolog zu dem DNA-Lokus sind, an dem die Modifikation vorgenommen werden soll. Sie beinhalten in ihrer Mitte die gewünschte Modifikation, welche während der PCR in neu synthetisierte DNA eingebracht wird. In Schritt zwei wird das modifizierte Restriktionsenzym Dpn I zugegeben und hiermit inkubiert. Dpn I zerschneidet dam-methylierte DNA-Stränge. Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme erzeugen dam-methylierte DNA-Plasmide, die *in vitro* erzeugte DNA ist jedoch nicht methyliert. Daher führt die Inkubation mit Dpn I zu einem Abbau des Ausgangs-Plasmids, wodurch lediglich neu gebildete DNA aus der PCR verbleibt. Anschließend wird im dritten Schritt die erzeugte DNA mittels chemischer Transformation in XL10-Gold Ultracompetent cells eingebracht und erzeugte Bakterienklone auf den Erfolg der Mutation analysiert. Zu beachten ist, dass während der QuikChange Mutagenese auch unerwünschte Punktmutationen auftreten können. Daher müssen nach dieser Methode alle relevanten Bereiche der DNA einer Sequenzanalyse unterzogen werden.

Das QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit wurde in dieser Arbeit gemäß den Herstellerangaben angewendet.

3.2.8.2 Verwendete Polymerasen

GoTaq DNA Polymerase (Promega)

Für die PCR-Analyse von aus der Embryonalen Stammzellkultur hervorgegangenen Zellklonen wurde die GoTaq DNA Polymerase verwendet. Für die Reaktionsansätze wurden etwa 100-500 ng genomische DNA eingesetzt.

Reaktionsansatz		PCR-Programm (Beispiel)	
DNA	x µl	- 95 °C	2 min
5x GoTaq-Buffer	10 µl		
Primer A (10 µM)	2,5 µl	- 35 Zyklen:	- 95 °C 30 s
Primer B (10 µM)	2,5 µl		- 50 °C 30 s
dNTPs (1,25 mM)	8 µl		- 72 °C 2 min
GoTaq DNA Polymerase	0,25 µl		
H ₂ O	ad 50 µl	- 72 °C	5 min

Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs)

Zur Durchführung von Mutagenese-PCRs wurde die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase verwendet. Sie besitzt eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die als Korrekturfunktion wirkt. Dadurch erzeugt sie DNA-Fragmente mit einer deutlich geringeren Wahrscheinlichkeit von zufällig eingebauten falschen dNTPs.

Für die Reaktionsansätze wurden etwa 5-20 ng Plasmid-DNA verwendet. Aufgrund der bei Mutagenese-PCRs schwierig vorherzusagenden optimalen Annealing-Temperatur für die verwendeten Primer, wurden vor den eigentlichen Amplifikationszyklen zusätzliche „Touch Down“-Zyklen durchgeführt. Bei diesen wird ein erster Zyklus mit einer als zu hoch angenommenen Annealing-Temperatur durchgeführt. Hierauf folgen wenige weitere Zyklen mit jeweils sinkender Annealing-Temperatur, bis die eigentlichen Amplifikations-Zyklen mit einer als etwas zu niedrig angenommenen Annealing-Temperatur stattfinden. Der Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass man ohne die Kenntnis der optimalen Annealing-Temperatur eine PCR durchführen kann, die das gewünschte Produkt liefert. Außerdem wurde ein so genannter „Hot Start“ durchgeführt. Das bedeutet, dass die Polymerase erst nach dem ersten Denaturierungsschritt zugegeben wird.

Hiermit sollen mögliche Fehlprodukte durch initiale Fehlhybridisierungen der Primer verhindert werden.

Reaktionsansatz		PCR-Programm (Beispiel)	
DNA	x µl	- 98 °C	30 s
5x Phusion HF Buffer	10 µl		
DMSO	0-6 µl	- 10 Zyklen:	- 98 °C 10 s
Primer A (10 µM)	2,5 µl		- 65 °C 30 s ΔT -1 °C
Primer B (10 µM)	2,5 µl		- 72 °C 30 s/kb
dNTPs (1,25 mM)	10 µl		
Phusion DNA Polymerase	0,5 µl	- 30 Zyklen:	- 98 °C 10 s
H ₂ O	ad 50 µl		- 56 °C 30 s
			- 72 °C 30 s/kb
		- 72 °C	10 min

3.2.9 Sequenzanalyse von DNA

Damit gewährleistet werden kann, dass molekularbiologisch erzeugte oder veränderte DNA tatsächlich diejenige Sequenz besitzt, die erwartet wird, ist es erforderlich, diese einer Sequenzanalyse zu unterziehen. Um eine Sequenzanalyse durchführen zu können, werden geeignete und für die zu sequenzierende DNA spezifische Primer benötigt, die individuell geplant oder ausgewählt wurden. Die Herstellung der Primer sowie die Sequenzanalyse wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH durchgeführt.

3.2.10 Southern Blot

Der Southern Blot ist eine Methode zur Analyse von DNA-Fragmenten auf das Vorhandensein bestimmter Sequenzen (Southern, 1975). Sie findet bei der Analyse von genomischer DNA Anwendung (siehe 3.2.1.2). Zunächst wird genomische DNA durch einen Restriktionsverdau in Fragmente zerkleinert (siehe 3.2.4.1). Diese werden dann mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 3.2.6) aufgetrennt und dann im eigentlichen Southern Blot auf eine Membran übertragen. Anschließend wird eine

radioaktiv markierte Sonde an passende DNA-Fragmente auf der Membran hybridisiert. Mit dieser wird die gesuchte Ziel-DNA durch die Verwendung von Phosphoimagerplatten detektiert und mittels Entwickler sichtbar gemacht.

3.2.10.1 Verwendete Lösungen

Depurinierungslösung	
HCl (37 %)	40 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

Denaturierungslösung	
NaOH	40 g
NaCl	175,3 g
H ₂ O	ad 2000 ml

1 M Na ₂ HPO ₄	
Na ₂ HPO ₄	178 g
H ₂ O	ad 1000 ml

1 M NaH ₂ PO ₄	
NaH ₂ PO ₄	156 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Neutralisierungslösung	
Tris	121 g
NaCl	351 g
mit HCl pH einstellen auf 7,4	
H ₂ O	ad 2000 ml

0,5 M EDTA	
Na ₂ EDTA*2 H ₂ O	93,95 g
H ₂ O	ad 500 ml

20x SSC	
NaCl	175 g
Na ₃ Citrat*2H ₂ O	88 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Hybridisierungs-/Church-Puffer	
BSA	40 g
1 M Na ₂ HPO ₄	193,5 ml
1 M NaH ₂ PO ₄	56,5 ml
20 % SDS	175 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	1 ml
ssDNA (10 mg/ml)	5 ml
H ₂ O	ad 500 ml

20 % SDS	
SDS	100 g
H ₂ O	ad 500 ml

ssDNA (10 mg/ml)	
DNA from hering sperm	0,5 g
H ₂ O	ad 50 ml
vor Gebrauch denaturieren	

1 M Tris (pH 8,0)	
Tris	60,5 g
mit HCl pH einstellen auf 8,0	
H ₂ O	ad 500 ml

3.2.10.2 Restriktionsverdau und Gellauf

Etwa 10-20 µg der zu untersuchenden genomischen DNA wurden mit 20 U eines geeigneten Restriktionsenzym über Nacht verdaut. Dann wurde die verdaute DNA in einer Agarosegelelektrophorese (0,8 % Agarose-Gehalt; siehe 3.2.6) bei 120 V für 2-3 h aufgetrennt. Um später die entwickelte Aufnahme des Blots auswerten zu können, wurde das Gel mit einem Lineal als Größenmaßstab unter UV-Licht zur Detektion des Markers fotografiert. Anschließend wurde das Gel erst für 15 min mit Depurinierlösung, dann für 30 min mit Denaturierlösung und abschließend für 45 min mit Neutralisierungslösung geschwenkt.

3.2.10.3 Blotting

Die Übertragung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran (Hybond-N, GE Healthcare Life Sciences) wurde durch Kapillarblotting mit 10x SSC erreicht. Hierfür wurde der Aufbau gemäß Abbildung 3-1 verwendet.

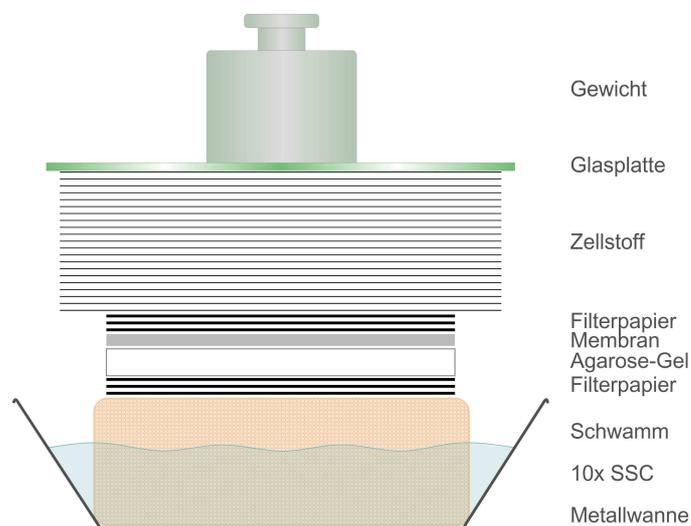


Abbildung 3-1 Aufbau des Southern Blots.

Während das hochosmolare 10x SSC mittels Kapillarkraft nach oben steigt, zieht es die im Agarosegel enthaltene DNA mit. Diese kann die Membran nicht durchqueren, sondern bleibt an dieser haften. Nach dem über Nacht erfolgenden Transfer wurden auf der Membran die Ausmaße des Gels markiert, um später den Vergleich mit dem

zuvor fotografierten Größenmaßstab ziehen zu können. Anschließend wurde die DNA via Cross-Linking mittels UV-Licht (UV-Stratalinker 1800, Stratagene) auf der Membran fixiert. Dann wurde die Membran bei 80 °C für 1-2 h zur Trocknung inkubiert.

3.2.10.4 Herstellung der Southern-Sonde

Die im Southern Blot verwendeten Sonden wurden mittels PCR aus genomischer DNA hergestellt und zur Vermehrung in den pBluescript II KS(+) oder den pCR-Blunt II-TOPO (siehe 3.2.4.4) eingebracht. Vor der Markierung der Sonde wurde diese mittels Restriktionsverdau (siehe 3.2.4.1) aus dem Vektor geschnitten und durch eine präparative Agarosegelelektrophorese (siehe 3.2.6), anschließende Elektroelution (siehe 3.2.7.2) und Ethanolfällung (siehe 3.2.2.2) gereinigt.

Die Markierung erfolgte durch das Random Primed Labeling Kit (Roche). Dieses Kit verwendet das Klenow-Fragment, ein Protein, das über eine 5'-3'-DNA-Polymerase-Aktivität und eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität verfügt und damit entlang von einzelsträngiger DNA mittels Primern den Strang auffüllen kann. Als Primer dienen Zufalls-Hexamere des Random Primed Labeling Kits. Als Markierung wurde radioaktives $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP verwendet, das wie die anderen nicht-markierten dATP, dGTP und dTTP bei der DNA-Synthese durch das Klenow-Fragment eingebaut wurden. Pro Markierungs-Reaktion wurden 100-200 ng der gereinigten Sonde für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Synthese-Reaktion erfolgte für 90 min bei 37 °C (Smith, 1993).

Ansatz der Labeling-Reaktion	
denaturierte Sonden-DNA	8 μl
dXTP-Mix (dATP, dGTP, dTTP; je 0,5 mM)	3 μl
10x Reaktions-Puffer	2 μl
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	6 μl
Klenow-Fragment	1 μl

Anschließend wurde die Sonde von nicht-eingebautem $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP mittels illustra Nick Column (GE Healthcare) gemäß Herstellerangaben gereinigt. Die gereinigte Sonde wurde dann anhand eines Szintillationszählers auf ihre Radioaktivität untersucht. Anschließend wurde sie im Hybridisierungspuffer auf einen Zielwert von 5×10^6 cpm/ml verdünnt.

3.2.10.5 DNA-Sonden-Hybridisierung und Detektion

Um unspezifisches Binden der markierten Sonde zu verhindern, wurde die Membran für 4 h bei 60 °C mit Hybridisierungspuffer unter Schwenken inkubiert. Die im Hybridisierungspuffer enthaltene ssDNA sättigt dabei Stellen auf der Membran ab, die während des Blottings nicht mit DNA besetzt wurden. Anschließend wurde die im Hybridisierungspuffer verdünnte Sonde über Nacht bei 60 °C mit der Membran unter Schwenken inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran in mehreren Einzelschritten gewaschen, um ungebundene Sonde zu entfernen und damit unspezifische Hintergrundstrahlung zu reduzieren. Zunächst wurde kurz in auf 60 °C vorgewärmtem Waschpuffer 1, dann für 15 min bei 60 °C in Waschpuffer 2 und dann für je 30 min erst bei 65 °C, dann 70 °C und dann 72 °C in Waschpuffer 3 geschwenkt.

Waschpuffer 1		Waschpuffer 2		Waschpuffer 3	
20x SSC	100 ml	20x SSC	100 ml	20x SSC	20 ml
		20 % SDS	5 ml	20 % SDS	5 ml
H ₂ O	ad 1000 ml	H ₂ O	ad 1000 ml	H ₂ O	ad 1000 ml

Im Anschluss wurde die Membran zur Belichtung einer Phosphoimagerplatte (Kodak) für mehrere Tage in einer Fotokassette gelagert. Danach wurde die Phosphoimagerplatte durch den Cyclone Plus Entwickler (Perkin Elmer) analysiert.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Allgemeine Techniken

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturen H9c2 und Neuro2A wurden in CO₂-Inkubatoren bei 37 °C mit kontrollierter und konstanter CO₂-Konzentration inkubiert. Die CO₂-Atmosphäre realisiert im Zusammenspiel mit der in den Medien enthaltenen Puffersubstanz Natriumbicarbonat die Stabilisierung des pH-Wertes in den Kulturgefäßen. Der verwendete CO₂-Gehalt hing von der jeweils verwendeten Zellkultur und dem zugehörigen Medium ab.

Es wurden Kulturflaschen mit 25 cm² und 75 cm² Grundfläche (TPP) und Multiwell-Platten (6-well, 12-well, 24-well; Nunc) verwendet.

Gefäß	Mediumvolumen	Trypsin/EDTA-Volumen
75 cm ² Flasche	10 ml	3 ml
25 cm ² Flasche	5 ml	1,5 ml
6-well Platte	2 ml/well	-
12-well Platte	1 ml/well	-
24-well Platte	500 µl/well	-

3.3.1.1 Medien

H9c2-Wachstumsmedium	
DMEM	450 ml
FBS	50 ml
Natrium-Pyruvat	5 ml
L-Glutamin	5 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml

Neuro2A-Wachstumsmedium	
MEM	450 ml
FBS	50 ml
Natrium-Pyruvat	5 ml
L-Glutamin	5 ml
Nicht Ess. Aminosäuren	5 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml

2x Einfriermedium – H9c2	
H9c2-Wachstumsmedium	9 ml
DMSO	1 ml

2x Einfriermedium – Neuro2A	
Neuro2A-Wachstumsmed.	9 ml
DMSO	1 ml

Trypsin/EDTA, 0,05 %	
Trypsin/EDTA, 0,25 %	10 ml
PBS	40 ml
Sterilfiltrieren	

3.3.1.2 Auftauen und Aussäen von eingefrorenen Zellen

In flüssigem Stickstoff eingefrorene Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut. Anschließend wurden sie in 7 ml des entsprechenden Wachstumsmediums überführt und bei 200 g für 3-5 min abzentrifugiert. Dann wurden die Zellen in einem kleinen Volumen Wachstumsmedium resuspendiert. Der gewünschte Anteil wurde in ein Kulturgefäß mit vorgelegtem Wachstumsmedium überführt und die Zellen durch Bewegung des Gefäßes gleichmäßig verteilt.

3.3.1.3 Passagieren von Zellen

Erreichen die Zellen im Kulturgefäß einen hohen Bedeckungsgrad, muss dieser reduziert werden, da eine zu hohe Zelldichte verschiedene negative Auswirkungen auf die Zellen haben kann. Hierfür werden die Zellen passagiert. Das bedeutet, dass sie aus dem Kulturgefäß abgelöst und in kleinerer Zahl neu ausgebracht werden.

Zunächst wurde das Wachstumsmedium aus dem Kulturgefäß abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde den Zellen Trypsin/EDTA zugegeben und bei 37 °C bis zur Ablösung vom Gefäßboden inkubiert. Dann wurde zur Inaktivierung von Trypsin ein 1,5-2-faches Volumen Wachstumsmedium zugegeben. Die Zellen wurden mit diesem Gemisch durch mehrmaliges, sanftes Auf- und Abpipettieren gegen den Gefäßboden vereinzelt und bei 200 g für 3-5 min abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in einem kleinen Volumen Wachstumsmedium resuspendiert und ein geeigneter Anteil in ein neues Kulturgefäß mit

vorgelegtem Wachstumsmedium überführt, wobei die Zellen durch Bewegung des Gefäßes gleichmäßig verteilt wurden.

3.3.1.4 Einfrieren zur langfristigen Lagerung

Zur langfristigen Lagerung wurden Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und in Wachstumsmedium gewaschen (siehe 3.3.1.3). Anschließend wurden sie in Wachstumsmedium aufgenommen, resuspendiert und das gleiche Volumen 2x Einfriermedium zugegeben. Die Zellen wurden dann zu je 1 ml in CryoTubes aliquotiert. Im Anschluss wurden die Zellen in einer „Einfrierbox Cryo-Safe“ (Neolab), die mit bei 4 °C vorgekühltem Isopropanol befüllt war, in einem -80 °C Gefrierschrank über Nacht eingefroren. Anschließend wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

3.3.1.5 Ernten von Zellen

Zu erntende Zellen wurden, ohne sie abzulösen, mit PBS gewaschen und dann mit einem Zellschaber vorsichtig abgekratzt. Anschließend wurden die Zellen in PBS aufgenommen und bei 200 g für 5 min abzentrifugiert. Dann wurden die Zellen entweder direkt weiterverwendet oder bei -80 °C eingefroren.

3.3.2 H9c2-Zellen

H9c2-Zellen (ATCC, CRL-1446) sind eine adhärente Herzmuskel-Zelllinie aus *Rattus norvegicus* (Kimes und Brandt, 1976). Ihre Calcium-Einströme zeigen alle Charakteristika von Ca_v1.2-Kanälen, wodurch sie ein gutes Werkzeug für die Untersuchung von Herz-spezifischen Fragestellungen sind (Hescheler et al., 1991).

H9c2-Zellkulturen wurden in dieser Arbeit mit H9c2-Wachstumsmedium bei 10 % CO₂ inkubiert. Abgelöst wurden sie durch die Verwendung von 0,05 % Trypsin/EDTA, das für etwa 3-5 min einwirken musste.

3.3.3 Neuro2A-Zellen

Die Neuro2A-Zelllinie (ATCC, CCL-131) ist eine murine Neuroblastom-Tumor Linie, die im November 1967 für die *in vitro* Kultur adaptiert wurde. Die Zellen proliferieren als adhärente, einzelschichtige Kultur und können verzweigende Fortsätze (Neuriten) bilden (Olmsted et al., 1970). Des Weiteren exprimieren Neuro2A-Zellen Ca_v1.2 (Tang et al., 2009).

Neuro2A-Zellen wurden mit Neuro2A-Wachstumsmedium bei 5 % CO₂ inkubiert. Aufgrund ihrer starken Adhärenz wurden sie mit 0,25 % Trypsin/EDTA für 5-10 min inkubiert, um sie abzulösen.

3.3.4 Transfektionsoptimierung

Um die Expression von fremder DNA in Zellen zu erreichen, wurden Zellen transient mit Expressionsvektoren transfiziert. Zur Etablierung von optimierten Transfektionsbedingungen für H9c2- und Neuro2A-Zellen wurden verschiedene Transfektionsreagenzien gemäß Herstellerangaben getestet. Die Versuche erfolgten jeweils mit dem Plasmid pmaxGFP, was bei erfolgreicher Transfektion und Überexpression zur Produktion einer GFP-Mutante führt. Daher wurde der Erfolg der Transfektionen am Fluoreszenzmikroskop überprüft und die Transfektionseffizienz, sowie die Letalität der Zellen mittels Durchflusszytometrie (siehe 3.6.1) quantifiziert.

Auf den hierbei gewonnenen Erkenntnissen aufbauend wurde anschließend die Transfektion und Überexpression von pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP in H9c2- und Neuro2A-Zellen optimiert. Hier wurde der Erfolg mittels Western-Blot (siehe 3.5.6) bei Verwendung des Anti-SNAP Antikörpers ermittelt.

3.3.4.1 Transfektion von H9c2-Zellen

Die besten Resultate konnten mit dem Transfektionsreagenz Superfect (Qiagen) erzielt werden. Bei Transfektion von pmaxGFP konnte bei geringer Zellsterblichkeit (unter 3 %) eine Transfektionseffizienz von 30-40 % erreicht werden.

Für die Transfektion von H9c2-Zellen wurden in 12-Wellplatten 80.000 Zellen je Well ausgebracht und 24 h später transfiziert. Hierfür wurde zu 120 µl Opti-MEM Reduced

Serum Medium zunächst gereinigte Plasmid-DNA gegeben, dann 10 µl Superfect hinzugefügt. Die Lösung wurde wenige Sekunden mittels Vortexer gemischt und dann für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden der Lösung 700 µl H9c2-Wachstumsmedium zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Zellen wurden mit DPBS gewaschen und nach dessen Abnahme die Lösung auf die Zellen eines Wells gegeben. Nach einer Inkubation von 3 h wurde die Lösung abgenommen und frisches H9c2-Wachstumsmedium zugegeben, um die Transfektion abzuschließen.

3.3.4.2 Transfektion von Neuro2A-Zellen

Die Verwendung des Transfektionsreagenzes Metafectene Pro (Biontex) zeigte in Neuro2A-Zellen die besten Ergebnisse. Bei Transfektion von pmaxGFP wurden bei geringer Zellsterblichkeit (unter 3 %) bis zu 100 % Transfektionseffizienz erreicht.

Für die Transfektion von Neuro2A-Zellen wurden in 24-Wellplatten 100.000 Zellen je Well in 500 µl Neuro2A-Wachstumsmedium ausgebracht und 24 h später transfiziert. Dafür wurde gereinigte Plasmid-DNA beziehungsweise 2 µl Metafectene Pro zu je 25 µl Opti-MEM Reduced Serum Medium gegeben und jeweils vorsichtig gemischt. Anschließend wurden die beiden Lösungen miteinander vermischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das Gemisch ohne vorherigen Mediumwechsel auf die zu transfizierenden Zellen eines Wells gegeben. Nach einer Inkubation für 16 h wurde die Lösung abgenommen und frisches Neuro2A-Wachstumsmedium zugegeben, um die Transfektion abzuschließen.

3.3.5 Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen

3.3.5.1 SNAP-Cell Fluoreszenzfarbstoffe

Die Färbung mit den SNAP-Farbstoffen SNAP-Cell 505 (New England Biolabs) oder SNAP-Cell TMR-Star (New England Biolabs) erfolgte gemäß Herstellerangaben. Hierfür wurden Zellen in 24-Wellplatten je Well mit 250 µl einer 5 µM (SNAP-Cell 505) oder 3 µM (SNAP-Cell TMR-Star) Färbelösung in Wachstumsmedium für 30 min bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Entfernung ungebundenen

Farbstoffes wurden die Zellen dreimal mit Wachstumsmedium gewaschen und dann in Wachstumsmedium mit einer 30 min Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ gewaschen.

3.3.5.2 Hoechst 33342

Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) ist ein membrangängiger Farbstoff, der zur Färbung der Zellkerne verwendet wird.

In dieser Arbeit wurden Zellen mit 2 µg/ml Hoechst 33342 in DPBS gefärbt. Dazu wurde Zellen in 24-Wellplatten je Well 250 µl der Hoechst 33342 Lösung zugegeben und 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit Wachstumsmedium gewaschen und dann wiederum in Wachstumsmedium mit einer 30 min Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ gewaschen.

3.4 Methoden zur Erzeugung genetisch veränderter Mäuse

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) sind pluripotente Zellen, die aus Embryonen gewonnen werden. Durch ihre Pluripotenz sind sie dazu in der Lage, sich an der Entwicklung aller Gewebearten zu beteiligen.

Zur Erzeugung von genetisch veränderten Mäusen werden embryonale Stammzellen aus der inneren Zellmasse des im Blastozystenstadium befindlichen Embryos am Tag 3,5 nach der Befruchtung entnommen und kultiviert (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981). Es ist wichtig, dass ES-Zellen unter optimalen Wachstumsbedingungen auf embryonalen Feederzellen (EF-Zellen) gehalten werden und nicht zu dicht wachsen, da sie sonst ihre Pluripotenz einbüßen. Aber auch unter optimalen Bedingungen verringert sich ihre Eignung für die Erzeugung genetisch veränderter Mäuse mit dem Alter zunehmend (Nagy et al., 1993).

Veränderungen im Genom von ES-Zellen können durch das Einbringen von Fremd-DNA induziert werden. Hierfür wird ein Gentergeting-Vektor durch Elektroporation in ES-Zellen eingebracht. Er beinhaltet in seiner Sequenz die

gewünschten genetischen Veränderungen, beiderseits flankiert von so genannten Homologie-Armen. Bei diesen handelt es sich um DNA-Sequenzen, die homolog zu derjenigen Region im Genom sind, in der die genetischen Veränderungen vorgenommen werden sollen. Durch die Homologie-Arme findet in etwa einer unter 100.000 Zellen, die den Gentergeting-Vektor empfangen haben, eine homologe Rekombination statt, durch die am Zielort im Genom die gewünschte Mutation erzeugt wird. Daneben finden auch etwa 100 mal häufiger nicht-homologe Rekombinationen des Gentergeting-Vektors an zufälligen Orten im Genom statt (Thomas et al., 1986; Chu et al., 1987; Doetschman et al., 1987; Thomas und Capecchi, 1987; Capecchi, 1989).

Durch das Vorhandensein eines Selektionsmarkers im Gentergeting-Vektor können Zellen, in denen eine homologe oder nicht-homologe Rekombination stattgefunden hat, von solchen Zellen getrennt werden, in denen dies nicht der Fall war. In dieser Arbeit werden dafür Kassetten verwendet, die eine Resistenz gegen das Medikament Geneticin (G418) vermitteln. ES-Zellen mit dieser Resistenz reichern sich in Gegenwart von G418 zu so genannten ES-Zellklonen an, während andere ES-Zellen sterben (Capecchi, 1989; Rajewsky et al., 1996).

Anschließend werden die ES-Zellklone daraufhin untersucht, ob in ihnen eine homologe Rekombination am gewünschten Genort stattgefunden hat. Ein ES-Zellklon, in dem dies der Fall ist, wird dann isoliert kultiviert. Dann werden diese ES-Zellen in das Blastocoel von Blastozysten injiziert und diese in den Uterus einer Leihmutter implantiert. Auf diese Weise kommt es zu chimärem Mausnachwuchs, dessen Erbgut teils aus Zellen der Blastocyste und teils aus Donor-ES-Zellen stammt. Sofern die Mutation in den Keimdrüsen des Nachwuchses vorhanden ist, können anschließend über die Kreuzung mit Wildtyp-Tieren heterozygote und nach weiterer Kreuzung homozygote Tiere gezüchtet werden (Bradley et al., 1984; Gossler et al., 1986; Robertson et al., 1986; Capecchi, 1989).

3.4.1 Cre/loxP-System, konditionales Gentergeting und ROSA26-Lokus

Die Cre-Rekombinase ist ein Protein, das DNA mittels loxP-Sequenzen verändern kann. Sind in einem DNA-Strang zwei loxP-Sequenzen in derselben Orientierung angeordnet, wird die DNA zwischen ihnen ausgeschnitten. Hierfür verbindet die Cre-Rekombinase diese beiden loxP-Sequenzen unter Bildung eines zirkulären Protein-DNA-Komplexes. Dabei wird aus der DNA zwischen den loxP-Sequenzen ein geschlossener DNA-Ring mit einer loxP-Sequenz geformt. Im ursprünglichen DNA-Strang fehlt nun dieser DNA-Abschnitt und es bleibt lediglich eine loxP-Sequenz zurück. Die Cre-Rekombinase-Reaktion kann auch *in vitro* durchgeführt und damit auf vorliegende DNA getestet werden (Abremski et al., 1983; Abremski und Hoess, 1984; Hamilton und Abremski, 1984; Hoess und Abremski, 1984; Oberdoerffer et al., 2003).

Das Cre/loxP-System ist eine häufig verwendete Methode, um genomische DNA nach einem erfolgreichen Gentergeting zu einem späteren Zeitpunkt zu manipulieren. So werden Selektionsmarker mit loxP-Sequenzen flankiert, um diese entfernen zu können, wenn sie nicht mehr benötigt werden. Selektionsmarker sind zwar erforderlich, um in der ES-Zellkultur erfolgreich rekombinierte Zellklone zu identifizieren, aber im transgenen Tier können sie und ihre Promoter und Enhancer unerwünschte Nebeneffekte verursachen. Darum kann es nötig sein, dass sie nach der Selektion wieder entfernt werden. Um dies zu ermöglichen, wird das Cre/loxP-System verwendet, indem durch transiente Transfektion mit einem Cre-Expressionsvektor der loxP-flankierte Selektionsmarker aus dem ES-Zell-Genom ausgeschnitten wird. Die einzelne zurückbleibende loxP-Sequenz gilt dabei als unauffällig (Rajewsky et al., 1996).

Eine andere Möglichkeit das Cre/loxP-System zu nutzen ist das konditionale, also zelltyp-spezifische Gentergeting. Hierbei wird die Cre-Rekombinase genutzt, um ein zu exprimierendes Gen „freizuschalten“. Dies kann zum Beispiel erreicht werden, indem eine loxP-flankierte DNA-Sequenz oder Kasette vorangestellt ist, welche die Expression des Gens verhindert. Durch die Aktivität der Cre-Rekombinase wird die

DNA-Sequenz oder Kasette entfernt und das Gen kann exprimiert werden. Dies geschieht beim konditionalen Gentergeting typischerweise durch die Kreuzung mit Mauslinien, die Cre-Rekombinase zelltyp-spezifisch oder induzierbar exprimieren. Dadurch ist es möglich, dass Mauslinien erzeugt werden, in denen die Mutation nur unter entsprechend definierten Bedingungen, beispielsweise nur im Herz, aktiv ist (Rajewsky et al., 1996).

Der ROSA26-Lokus in *Mus musculus* eignet sich für die Erzeugung von knock-in Mäusen. Hier eingebrachte Gene werden ubiquitär exprimiert. Das Transkript des ROSA26-Gens selbst besitzt aber keinen Phänotyp, weshalb seine Beschädigung ohne Folgen ist. Des weiteren ist der ROSA26-Lokus für Cre-Rekombinase-Aktivität zugänglich, womit er sich für konditionales Gentergeting mittels Cre/loxP-System eignet (Friedrich und Soriano, 1991; Zambrowicz et al., 1997; Kisseberth et al., 1999; Soriano, 1999).

Neben dem Cre/loxP-System existieren weitere, ähnliche Rekombinase-Systeme, wie zum Beispiel das Flp/FRT-System, welches im in dieser Arbeit genutzten CAG-STOP-EGFP-ROSA Targeting vector (CTV) Verwendung findet (Schlake und Bode, 1994; Zhu und Sadowski, 1995).

3.4.2 Kultivierung embryonaler Stammzellen

3.4.2.1 Verwendete Kulturgefäße

Es wurden Kulturf Flaschen mit 25 cm², 75 cm² und 175 cm² Grundfläche (Corning), Kulturschalen mit 55 cm² Grundfläche (Corning) und Multiwell-Platten (6-well, 24-well, 96-well; Corning) verwendet.

Gefäß	Mediumvolumen	Trypsin/EDTA-Volumen
175 cm ² Flasche	20 ml	5 ml
75 cm ² Flasche	10 ml	3 ml
25 cm ² Flasche	5 ml	1,5 ml
55 cm ² Kulturschalen	10 ml	3 ml
6-well Platte	3 ml/well	1,5 ml/well
24-well Platte	1 ml/well	500 µl/well
96-well Platte	200 µl/well	40 µl/well

3.4.2.2 Medien

β-Mercaptoethanol (50 mM)	
β-Mercaptoethanol	73,5 µl
PBS	21 ml
Sterilfiltrieren	

LIF (5*10⁵ U/ml)	
LIF	1 ml
EF-Medium	19 ml
Sterilfiltrieren	

ES-Medium	
DMEM (+GlutaMAX)	400 ml
FBS	100 ml
β-ME (50 mM)	1 ml
LIF (5*10 ⁵ U/ml)	1 ml

EF-Medium	
DMEM (+GlutaMAX)	450 ml
FBS	50 ml

2x ES-Einfriermedium	
ES-Medium	8 ml
DMSO	2 ml

2x EF-Einfriermedium	
EF-Medium	8 ml
DMSO	2 ml

G418-Lösung	
Geneticin (G418)	4 g
PBS	50 ml
Sterilfiltrieren	

ES-G418-Medium	
ES-Medium	502 ml
G418-Lösung	5 ml

1x Trypsin/EDTA	
Trypsin/EDTA, 0,5 %	5 ml
PBS	45 ml
Sterilfiltrieren	

2x Trypsin/EDTA	
Trypsin/EDTA, 0,25 %	10 ml
PBS	40 ml
Sterilfiltrieren	

3.4.3 Embryonale Feederzellen

3.4.3.1 Erzeugung embryonaler Feederzellen

Zur Herstellung von embryonalen Feederzellen (EF-Zellen) wurden weibliche C57Bl6-Mäuse mit männlichen, homozygoten C57Bl/6J-TgN(pGKneobpA)³Ems-Mäusen verpaart. Die Uteri von befruchteten Weibchen wurden am Tag 14,5 p.c. steril entnommen und die Embryonen von Kopf, Extremitäten und inneren Organen befreit. Anschließend wurde der verbliebene Rumpf zerkleinert und mit 1 ml 1x Trypsin/EDTA pro Embryo für 10 min bei 37 °C inkubiert. Durch Auf- und Abpipettieren wurde das Gewebe homogenisiert und mit EF-Medium auf 40 ml aufgefüllt. Je 2 ml des Gemisches wurden in 175 cm² Flaschen zu 19 ml vorgelegtem EF-Medium gegeben, gemischt und bis zur Konfluenz der Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (1. Passage).

Bei Konfluenz wurden die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen und für 5 min bei 37 °C mit 1x Trypsin/EDTA inkubiert, um sie abzulösen und dann durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Es wurden 5 ml EF-Medium zugegeben, um das Trypsin zu

inaktivieren. Anschließend wurden die Zellen bis auf einen Rest von 1 ml abgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zum verbliebenen Rest in der Flasche wurden 19 ml EF-Medium gegeben und die Zellen wiederum bis zur Konfluenz bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (2. Passage). Auf diese Weise wurden die Zellen aller Flaschen abgenommen und durch Zentrifugation bei 200 g für 5 min pelletiert. Die pelletierten Zellen wurden in EF-Medium resuspendiert und in 20 ml EF-Medium in einem einzelnen 50 ml Zentrifugenröhrchen vereinigt. Anschließend wurden die Zellen inaktiviert durch γ -Bestrahlung (5000 Rad) im Institut für Mikrobiologie am Klinikum rechts der Isar. Hierdurch konnten sich die Zellen nicht mehr teilen, womit verhindert wurde, dass sie in Kultur ES-Zellen überwachsen. Dann wurden die Zellen bei 200 g für 5 min abzentrifugiert und in 10 ml EF-Medium resuspendiert. Es wurden 10 ml 2x EF-Einfriermedium zugegeben, gemischt und die Zellen zu je 1 ml in Kryoröhrchen aliquotiert und langsam eingefroren für 1-3 h bei -20 °C, über Nacht bei -80 °C und anschließend in flüssigem Stickstoff.

Die Prozedur wurde für drei Passagen wiederholt.

3.4.3.2 Verwendung embryonaler Feederzellen

Vor dem erstmaligen Verwenden einer Passage EF-Zellen für die ES-Zellkultur wurde durch Aussäen eines Aliquots überprüft, dass sich die Zellen tatsächlich nicht vermehren konnten und ermittelt, in welcher Verdünnung sie für die Verwendung mit ES-Zellen vorgelegt werden mussten.

Um in flüssigem Stickstoff eingefrorene EF-Zellen auszusäen, wurden sie im Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut. Anschließend wurden sie in 7 ml EF-Medium überführt und bei 200 g für 5 min abzentrifugiert. Dann wurden die Zellen in EF-Medium resuspendiert und nach Bedarf verdünnt. Im Anschluss wurden sie in ein Kulturgefäß mit vorgelegtem EF-Medium überführt und durch Bewegung des Gefäßes gleichmäßig verteilt.

3.4.4 Embryonale Stammzellen

In dieser Arbeit wurden R1 (Genotyp: 129X1/SvJx129S1/SV-+p+^{Tyr-c}Kitl^{Sl-J}/+) ES-Zellen verwendet. Diese werden aus Blastocysten von agoutifarbenen Mäusen gewonnen (Nagy et al., 1993).

3.4.4.1 Vorbereitung von Kulturgefäßen

In Kulturgefäße, die für die Kultivierung von ES-Zellen verwendet werden sollen, wurden zuvor EF-Zellen in EF-Medium ausgesät (siehe 3.4.3.2). Einen Tag vor der Verwendung der Kulturgefäße wurde das EF-Medium durch ES-Medium bzw. ES-G418-Medium ersetzt.

3.4.4.2 Auftauen und Aussäen embryonaler Stammzellen

In flüssigem Stickstoff eingefrorene ES-Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut. Anschließend wurden sie in 7 ml ES-Medium überführt und bei 200 g für 5 min abzentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 1 ml ES-Medium resuspendiert, in ein vorbereitetes Kulturgefäß (siehe 3.4.4.1) überführt und die Zellen durch Bewegung des Gefäßes gleichmäßig verteilt.

3.4.4.3 Passagieren embryonaler Stammzellen

Zunächst wurde das ES-Medium aus dem Kulturgefäß abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde den Zellen 1x Trypsin/EDTA zugegeben und bei 37 °C für 3 min inkubiert. Dann wurde zur Inaktivierung von Trypsin ein 1,5-2-faches Volumen ES-Medium zugegeben. Die Zellen wurden mit diesem Gemisch durch mehrmaliges, sanftes Auf- und Abpipettieren gegen den Gefäßboden vereinzelt und bei 200 g für 5 min abzentrifugiert. Dann wurden die Zellen in einem kleinen Volumen ES-Medium resuspendiert und in ein vorbereitetes Kulturgefäß (siehe 3.4.4.1) überführt, wobei die Zellen durch Bewegung des Gefäßes gleichmäßig verteilt wurden.

3.4.4.4 Targeting embryonaler Stammzellen

Vorbereiten des Gtargeting-Vektors

Für das primäre ES-Zell-Targeting wurden 100 µg des zu transfizierenden Gtargeting-Vektors durch Restriktionsverdau linearisiert (siehe 3.2.4.1), durch Phenol-Chloroform-Fällung (siehe 3.2.2.1) gereinigt und mittels Ethanol-Fällung (siehe 3.2.2.2) isoliert. Die DNA wurde unter einer Sicherheitswerkbank steril getrocknet und in 20 µl H₂O gelöst. Hiervon wurden 4 µl mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.2.6) und Konzentrationsbestimmung am Nanodrop (siehe 3.2.3) überprüft. Für eine Elektroporation wurden 10-50 µg linearisierten Gtargeting-Vektors eingesetzt. Das entsprechende Volumen der gereinigten DNA wurde mit PBS auf 100 µl aufgefüllt.

Elektroporation

Für die Elektroporation wurden ES-Zellen in einer 75 cm² Flasche auf 60-70 % Konfluenz wachsen gelassen. Sie wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 1x Trypsin/EDTA bei 37 °C für 3 min inkubiert, um sie abzulösen. Es wurde ES-Medium auf 7 ml zugegeben und die ES-Zellen bei 200 g für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zell-Pellet in 900 µl PBS aufgenommen und in eine Elektroporationsküvette (4 mm, Peqlab) überführt. Hierzu wurden die 100 µl vorbereiteter Gtargeting-Vektor gegeben. Dann wurde das Gemisch mittels „Genepulser“ (Bio-Rad) bei 0,23 kV und 500 µF elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen zur Schonung für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden sie zu gleichen Teilen auf 8-12 mit EF-Zellen vorbereitete 55 cm² Kulturschalen verteilt.

Selektion mit G418

Nach 24 h wurde das ES-Medium durch ES-G418-Medium ersetzt, wodurch die Selektionierung auf ES-Zellen begann, die den Gtargeting-Vektor in ihr Genom integrieren konnten. Aufgrund des einsetzenden Zellsterbens musste das Medium 1-3 mal pro Tag ausgewechselt werden.

Picken von ES-Zellklonen

Nach etwa 7-10 Tagen wurden für 5-7 Tage überlebende ES-Zellklone gepickt. Unter Zuhilfenahme eines Binokulars wurden die Klone einzeln mit einer 20 µl Pipette vom Boden der Kulturschalen abgekratzt und mit wenig Medium eingesaugt. Die Klone wurden in jeweils ein einzelnes Well einer 96-Well-Platte überführt. Je Well wurden zuvor 30 µl PBS vorgelegt. Anschließend wurden 30 µl 2x Trypsin/EDTA pro Well zugegeben und für 3 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die Klone durch Auf- und Abpipettieren mit einer Multikanalpipette vereinzelt und 60 µl ES-G418-Medium zugegeben. Die nun pro Well enthaltenen 120 µl Zell-Suspension wurden auf zwei mit EF-Zellen vorbereitete 96-Well-Platten (A-Platte und B-Platte) zu je 60 µl aufgeteilt.

Einfrieren der A-Platte (Sicherungs-Platte)

Bei Erreichen von 60-70 % Konfluenz wurde die A-Platte eingefroren. Zuerst wurden die Wells mit PBS gewaschen, die Zellen mit 30 µl 1x Trypsin/EDTA für 3 min bei 37 °C abgelöst und dann 150 µl 1x ES-Einfriermedium zugegeben. Die Platten wurden für 1-3 h bei -20 °C langsam eingefroren und dann auf -80 °C überführt.

Weiterverarbeitung der B-Platte (Screening-Platte)

Die B-Platte wurde nach Erreichen von über 70 % Konfluenz auf drei neue Platten (B-Platte, C-Platte und D-Platte) passagiert. Dies geschah durch Waschen mit PBS, Ablösen mit 30 µl 1x Trypsin/EDTA für 3 min bei 37 °C und Zugabe von 60 µl ES-G418-Medium. Die 90 µl Zell-Suspension wurde zu gleichen Teilen auf drei mit EF-Zellen vorbereitete 96-Well-Platten aufgeteilt. Die ES-Zellen wurden bis zur Konfluenz wachsen gelassen und bei Bedarf mehrfach das Medium gewechselt. Sobald die Zellen hinreichend dicht gewachsen waren, wurden sie mit PBS gewaschen und die Platten bei -20 °C eingefroren.

Screening der Screening-Platten

Die Zellen der Screening-Platten wurden lysiert und die genomische DNA isoliert (siehe 3.2.1.2). Anschließend wurde die DNA mittels Screening-PCR (siehe 3.2.8.2 GoTaq DNA Polymerase) und Agarose-Gelelektrophorese analysiert (siehe 3.2.6).

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Cross-Linking mittels Formaldehyd

Sollten die Proteine und Protein-Protein-Interaktionen innerhalb einer Zelle stabilisiert werden, erfolgte dies durch Formaldehyd-Cross-Linking. Die Zellen wurden geerntet, in PBS aufgenommen und durch Zentrifugation (200 g, 5 min) pelletiert. Anschließend wurden sie mit 1 ml PBS resuspendiert und FA-Mix zugegeben. Das zugegebene Volumen des FA-Mix richtete sich nach der gewünschten Ziel-Konzentration an Formaldehyd während des Cross-Linkings. Nach einer Inkubation für 20 min unter leichtem Schütteln wurden 6 ml Neutralisier-Puffer zugegeben, um die Reaktion abzustoppen. Nach einer Zentrifugation (200 g, 5 min) wurde der Überstand verworfen. Die Zellen wurden anschließend entweder bei -80 °C eingefroren oder direkt weiterverwendet.

FA-Mix (2 % Formaldehyd)	
Paraformaldehyd	1 g
PBS	ad 50 ml
Zum Lösen auf 50 °C erhitzen	

Neutralisier-Puffer	
NaCl	0,44 g
Tris	6,06 g
mit HCl pH einstellen auf 7,4	
H ₂ O	ad 50 ml

3.5.2 Zell-Lyse und Solubilisierung von Membranproteinen

Die Zell-Lyse und Solubilisierung von Membranproteinen wurde mit einem „Potter S“ Elvehjem Homogenisator (Sartorius) durchgeführt. Hierbei treibt der Motor des Gerätes einen Pistill an, dessen Kopf in einem ihn sehr eng (etwa 0,1-0,2 mm Abstand) umschließenden Mörsergefäß rotiert. Durch die Rotation (1500 rpm) des Pistills im Gefäß entstehen starke Scherkräfte im Zwischenraum, die Zellen lysieren und bei Tensid-haltigem Puffer Membranproteine solubilisieren. Da bei diesem Prozess die Lösung rasch erhitzt wird, muss das Mörsergefäß während der Homogenisierung permanent von außen mit Eiswasser gekühlt werden.

Zu lysierende Zellen, deren Membranproteine zu solubilisieren waren, wurden nach der Ernte in eisgekühltem TX-Puffer mit Protease-Inhibitoren (1 ml TX-Puffer pro 1 Mio. Zellen) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension im Potter bei 1500 rpm homogenisiert, unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation (3.600 g, 5 min, 4 °C) pelletiert und der Überstand zur weiteren Verwendung in ein neues Gefäß überführt.

TX-Puffer		Protease-Inhibitoren	
Tris	0,61 g	PMSF (100 mM)	2 µl
EDTA	3,7 g	PI-Mix (Sigma)	2 µl
EGTA	3,8 g	Calpain Inhibitor I	8 µg
DTT	0,077 g	Calpain Inhibitor II	8 µg
Triton X-100	5 ml	zu je 1 ml TX-Puffer	
mit NaOH pH einstellen auf 7,4			
H ₂ O	ad 500 ml		

3.5.3 Proteinreinigung mittels SNAP-Tag

Zur selektiven Immobilisierung und Präzipitation von SNAP-Fusionsproteinen wurden die SNAP-Binding-Beads (SBB; SNAP-Capture Pull-Down Resin, New England Biolabs) verwendet. Dabei handelt es sich um Agarose-Kügelchen, die auf ihrer Oberfläche das SNAP-Tag-Substrat Benzylguanin (BG) tragen. Sie binden dadurch selektiv SNAP-Fusionsproteine und können anschließend aufgrund ihrer Dichte durch Zentrifugation pelletiert werden.

Das benötigte Volumen SBB wurde zweimal mit TX-Puffer gewaschen. Je Waschschrift wurden 500 µl TX-Puffer zugegeben, die SBB durch Zentrifugation (11.000 g, 1 min) pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde den SBB die Proteinlösung zugegeben, deren SNAP-Fusionsproteine gebunden werden sollten. Dann wurde das Gemisch für 16 h bei 4 °C unter langsamer Rotation mittels Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die SBB und an ihnen gebundene SNAP-Fusionsproteine durch Zentrifugation (11.000 g, 1 min) präzipitiert.

3.5.4 Proteinfällung

In dieser Arbeit wurden Proteine mittels Methanol-Chloroform-Fällung präzipitiert. Diese Methode ist sowohl für hydrophile, als auch für hydrophobe Proteine, zu denen Membranproteine gehören, geeignet. Die Fällung wird dabei weder durch Tenside, wie Triton X-100, noch Lipide oder Salze gestört (Wessel und Flügge, 1984). Einem Volumen Proteinlösung wurden vier Volumen Methanol zugegeben, kurz mittels Vortexer gemischt und dann zentrifugiert (9.000 g, 30 s). Anschließend wurde ein Volumen Chloroform zugegeben und wiederum durch kurzes vortexen gemischt und zentrifugiert (9.000 g, 30 s). Dann wurden drei Volumen H₂O zugegeben, heftig durch vortexen gemischt, zentrifugiert (9.000 g, 1 min) und die obere Phase abgenommen und verworfen. Danach wurden drei Volumen Methanol zugegeben, mittels Vortexer gemischt und zentrifugiert (20.000 g, 2 min). Der Überstand wurde vollständig verworfen und das Protein-Pellet getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in Lämmli-Puffer resuspendiert, aufgekocht und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

3.5.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wird verwendet, um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Zu diesem Zweck ist es nötig, dass zuvor ihre räumlichen Strukturen durch Denaturierung zerstört werden. Hierfür werden die Proteine in einem denaturierenden Auftragspuffer (Lämmli-Puffer) aufgekocht. Das im Puffer enthaltene anionische Tensid SDS (Natriumdodecylsulfat) trägt zur Denaturierung bei und überdeckt durch seine stark-negativen Ladungen die Eigenladung der Proteine. Insgesamt hängt dadurch die Laufgeschwindigkeit eines Proteins nicht mehr von seiner räumlichen Struktur oder eigenen Ladung ab, sondern nur noch von seinem Molekulargewicht.

4x Tris/SDS (pH 8,8)		4x Tris/SDS (pH 6,8)		10x Elektrophoresepuffer	
Tris	9,1 g	Tris	3,02 g	Tris	30,2 g
SDS	0,2 g	SDS	0,2 g	Glycin	144 g
mit HCl pH einstellen auf 8,8		mit HCl pH einstellen auf 6,8		SDS	10 g
H ₂ O	ad 50 ml	H ₂ O	ad 50 ml	H ₂ O	ad 1000 ml

Trenngel 10 %		Sammelgel		2x Lämmli-Puffer	
Acrylamid 29:1	1,67 ml	Acrylamid 29:1	325 µl	Tris	0,76 g
4x Tris/SDS (pH 8,8)	1,25 ml	4x Tris/SDS (pH 6,8)	625 µl	SDS	2 g
H ₂ O	2,08 ml	H ₂ O	1,525 ml	Glycerin	10 ml
20 % APS	25 µl	20 % APS	25 µl	β-ME	5 ml
TEMED	5 µl	TEMED	5 µl	mit HCl pH einstellen auf 6,8	
				Spatelspitze Bromphenolblau	
				H ₂ O	ad 50 ml

Für das Gießen der SDS-Gele und den Gellauf wurde das Mini-Protean-System (Bio-Rad) verwendet. Zur Herstellung des Gels wurde die Trenngel-Lösung zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Gel durch Polymerisierung ausgehärtet war, wurde der Isopropanol vollständig abgenommen und die Sammelgel-Lösung zugegeben. In die noch flüssige Lösung wurde ein Kamm eingesetzt, der Aussparungen für die Probenauftragstaschen schafft. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde das Gel mit den Glasplatten in die Gelkammer eingefügt und diese mit 1x Elektrophoresepuffer befüllt. Zur Auftrennung von großen Proteinen, wie Ca_v1.2-SNAP, wurden fertig gegossene „Mini-Protean TGX Precast Gele“ (Bio-Rad) verwendet, deren Trenngel einen Polyacrylamid-Gradienten von 4-20 % umfasst. Die aufzutragenden Protein-Proben wurden mit Lämmli-Puffer versetzt, für 5 min bei 95 °C inkubiert und dann in die Probenauftragstaschen pipettiert. Zudem wurde als Größenstandard der „Precision Plus Dual Color Protein Standard“ (Bio-Rad) aufgetragen. Der Gellauf wurde durchgeführt bei zunächst 50 V für 30 min und dann bei 120 V bis zur gewünschten Laufweite. Die Laufweite wurde durch den im Lämmli-Puffer enthaltenen Farbstoff Bromphenolblau verfolgt.

3.5.6 Western Blot

Der Western Blot dient der Übertragung von Proteinen, die in einer SDS-PAGE (siehe 3.5.5) aufgetrennt wurden, auf eine Membran. Die Membran wird im Anschluss dazu verwendet, um bestimmte Zielproteine mit einer sehr niedrigen Nachweisgrenze sichtbar zu machen. Hierfür werden spezifische Antikörper gegen das Zielprotein verwendet, um an dieses zu binden. Anschließend werden sekundäre Antikörper eingesetzt, die spezifisch an die ersteren, die primären Antikörper binden. An die sekundären Antikörper ist eine Meerrettichperoxidase gekoppelt, welche eine Licht emittierende Reaktion katalysiert. Das erzeugte Licht wird verwendet, um einen Fotofilm zu belichten. Durch anschließendes Entwickeln des Fotofilms kann indirekt das Vorhandensein des Zielproteins auf der Membran nachgewiesen werden.

Blottingpuffer		PBST	
10x Elektrophoresepuffer	100 ml	10x PBS	100 ml
Methanol	200 ml	Tween	1 ml
H ₂ O	ad 1000 ml	H ₂ O	ad 1000 ml

In dieser Arbeit wurde das Western Blotting mit dem Tank Transfer System durchgeführt. Zunächst wurden zwei Stücke Zellstoff, vier Stücke Whatman 3 MM Papier und eine „Hybond-C Extra“ Western Blot Membran (GE Healthcare Life Sciences) in Blottingpuffer eingeweicht. Es wurde darauf geachtet, dass die einzelnen Stücke in etwa die gleiche Größe haben und diejenige Größe des SDS-Gels etwas übersteigen. Für den Blotting-Prozess wurde eine pufferdurchlässige Kassette verwendet, welche in die mit Blottingpuffer befüllte Blottingkammer „Mini Trans-Blot cell“ (Bio-Rad) eingesetzt wurde. Die Kassette wurde von der Kathode zur Anode luftblasenfrei mit einem Stück Zellstoff, zwei Stücken Whatman 3 MM Papier, dem SDS-Gel, der Membran, zwei Stücken Whatman 3 MM Papier und einem Stück Zellstoff befüllt. Der Proteintransfer wurde über Nacht bei 30 V und 4 °C durchgeführt, wodurch auch große Proteine wie Ca_v1.2-SNAP übertragen werden konnten.

Anschließend wurde der übertragene Protein-Größenstandard mit Bleistift nachgezeichnet. Dann wurde die Membran für 3 h bei Raumtemperatur unter Schwenken mit PBST + 5 % Milchpulver (Bio-Rad) inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für je 10 min unter Schwenken mit PBST gewaschen. Anschließend wurde der primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 bis 1:1000 (nach Herstellerangabe) in PBST + 5 % Milchpulver auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran wiederum dreimal für je 10 min unter Schwenken mit PBST gewaschen. Dann wurde der sekundäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:10.000 in PBST + 5 % Milchpulver zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für 5 min und zweimal für 10 min mit PBST gewaschen. Dann wurde das Farbreagenz „ECL Prime Western Blotting Detection Reagent“ (GE Healthcare Life Sciences) auf die Membran gegeben und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran in Frischhaltefolie eingepackt und mit ihr in einem Dunkelraum der Fotofilm „Hyperfilm ECL“ (GE Healthcare Life Sciences) belichtet. Der Fotofilm wurde dann mit dem Entwicklergerät „Optimax“ (Protec) entwickelt. Abschließend wurde auf dem entwickelten Fotofilm der Größenstandard nachgezeichnet, der auf der Membran mit Bleistift markiert wurde.

3.6 Biophysikalische Methoden

3.6.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, mittels der in kurzer Zeit eine große Anzahl an Zellen auf ihre Oberflächenbeschaffenheit und Fluoreszenz untersucht werden können.

In dieser Arbeit wurde das Durchflusszytometer „Gallios“ (Beckman Coulter) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet, um die Transfektionseffizienz des Plasmids pmaxGFP in H9c2- und Neuro2A-Zellen zu quantifizieren. Hierfür wurden transfizierte Zellen mittels Trypsin/EDTA aus ihrem Kulturgefäß abgelöst, in Wachstumsmedium gewaschen (siehe 3.3.1.3) und anschließend in PBS + 2 % FBS aufgenommen. Damit auch die relative Anzahl an toten Zellen bestimmt werden konnte, wurde den Zellen Propidiumiodid in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben. Propidiumiodid durchdringt die Membran von toten Zellen und interkaliert in die DNA, wodurch sich sein Absorptions- und Emissionsspektrum ändert (Bedner et al., 1999). Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer auf ihre Fluoreszenz untersucht.

3.6.2 Fluoreszenzspektrometrie

Die Fluoreszenzspektrometrie wurde in dieser Arbeit zur quantitativen Messung der Fluoreszenz des Farbstoffes SNAP-Cell 360 (New England Biolabs) in Lösungen angewendet. Zu untersuchende Lösungen wurden in 96-Wellplatten mit transparentem Boden (Corning) überführt und mittels „Mithras LB 940“ (Berthold Technologies) analysiert. Hierfür wurde für die 75 W Halogenlampe eine Intensität von 1000/65535 eingestellt und an vier verschiedenen Punkten pro Well für je 1,0 s gemessen. Verwendet wurden ein 340 nm Exzitationsfilter und ein 460 nm Emissionsfilter.

4 Ergebnisse

4.1 Ca_v1.2-SNAP-Vorversuche

Durch die Erzeugung von Fusionsproteinen, bestehend aus Ca_v1.2 und dem SNAP-Tag, sollten Rückschlüsse auf das Protein-Interaktom des Kanals gezogen werden. Bevor Untersuchungen unter physiologischen Bedingungen durchgeführt werden konnten, sollten die geplanten Methoden durch die Überexpression eines Ca_v1.2-SNAP-Plasmids in Zellkultur getestet und optimiert werden.

Die Überexpression in Zellkultur hat mehrere Vorteile. Zum einen ist die Probenherstellung vergleichsweise schnell und preiswert, zum anderen können hierdurch größere Protein-Mengen erzeugt werden, was wiederum die Analyse erleichtert und damit die Etablierung der Methoden überhaupt erst ermöglicht.

Für diesen Zweck wurde das Expressionsplasmid pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP verwendet, mittels dem ein Ca_v1.2-SNAP-Fusionsprotein produziert werden kann. Die Überexpression wurde in der Herzmuskel-Zelllinie H9c2 und in der Neuroblastom-Tumor Zelllinie Neuro2A durchgeführt.

4.1.1 Überexpression in H9c2-Zellkultur

Um eine Überexpression von pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP in H9c2-Zellen zu erreichen, wurden Transfektionsbedingungen für diese Zelllinie optimiert (siehe 3.3.4).

Anhand dieser optimierten Transfektionsbedingungen wurden H9c2-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP transfiziert und für verschieden lange Zeiträume nach der Transfektion inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch vorsichtiges Abkratzen geerntet. Die Expression von pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP wurde mittels Anti-SNAP Antikörper im Western Blot untersucht (Abbildung 4-1). Als Ladekontrolle wurde β -Actin verwendet.

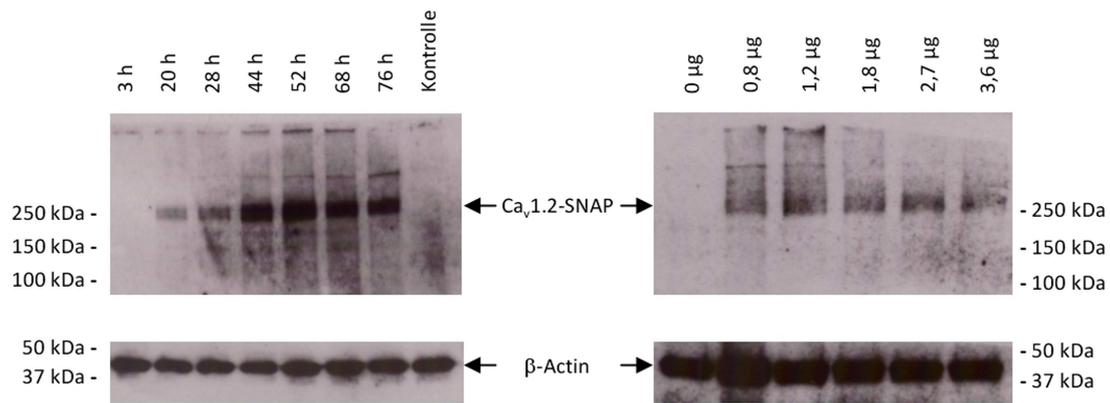


Abbildung 4-1 Western Blot Analyse der Ca_v1.2-SNAP Expression in H9c2-Zellen. Je Spur wurde das gesamte Zell-Lysat eines Wells einer 12-Wellplatte aufgetragen. Anti-SNAP wurde als Antikörper verwendet, β -Actin diente als Ladekontrolle; links: Zeitabhängige Expression von Ca_v1.2-SNAP. Angegeben ist die verstrichene Zeit seit Beginn der Transfektion. Transfiziert wurde mit 1,2 μ g DNA. Kontrolle: Untransfizierte Zellen; rechts: Abhängigkeit der Ca_v1.2-SNAP-Expression von der transfizierten DNA-Menge. Geerntet wurde nach 44 h.

Die Expression von pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP führte in H9c2-Zellen zur erfolgreichen Produktion von Ca_v1.2-SNAP. Das Protein war ab 20 h nach der Transfektion nachweisbar, wobei nach etwa zwei Tagen die größte Menge des Proteins in den Zellen vorhanden war (Abbildung 4-1, links).

Die Expression in Abhängigkeit von der für die Transfektion eingesetzten DNA-Menge zeigte im Bereich von 0,8-3,6 μ g DNA die höchste Produktion bei einem Einsatz von 1,2 μ g DNA (Abbildung 4-1, rechts).

4.1.2 Überexpression in Neuro2A-Zellkultur

Zur Überexpression von pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP in Neuro2A-Zellen wurde wie für diejenige in H9c2-Zellen verfahren (siehe 4.1.1).

Um die Expression von Ca_v1.2-SNAP in Neuro2A-Zellen zu untersuchen, wurden diese mit verschiedenen Konzentrationen pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP transfiziert und für verschieden lange Zeiträume nach der Transfektion inkubiert. Die Expression von pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP wurde mittels Anti-SNAP Antikörper im Western Blot untersucht (Abbildung 4-1). Als Ladekontrolle wurde β -Actin verwendet.

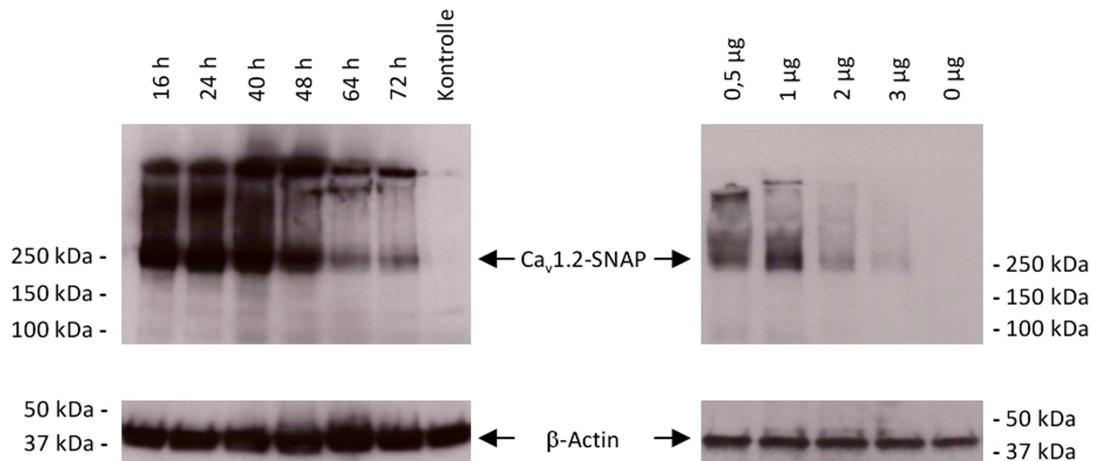


Abbildung 4-2 Western Blot Analyse der $\text{Ca}_v1.2\text{-SNAP}$ Expression in Neuro-2A-Zellen. Je Spur wurde das gesamte Zell-Lysat eines Wells einer 24-Wellplatte aufgetragen. Anti-SNAP wurde als Antikörper verwendet, β -Actin diente als Ladekontrolle; links: Zeitabhängige Expression von $\text{Ca}_v1.2\text{-SNAP}$. Angegeben ist die verstrichene Zeit seit Beginn der Transfektion. Transfiziert wurde mit $1 \mu\text{g}$ DNA. Kontrolle: Untransfizierte Zellen; rechts: Abhängigkeit der $\text{Ca}_v1.2\text{-SNAP}$ -Expression von der transfizierten DNA-Menge. Geerntet wurde nach 16 h.

Bereits nach der 16 h Inkubation mit dem Transfektionsgemisch wurde $\text{Ca}_v1.2\text{-SNAP}$ in großer Menge produziert (Abbildung 4-2, links). Diese Proteinmenge war auch für die folgenden 24 h zu beobachten, bevor sie dann allmählich abnahm. Außerdem wurde die Abhängigkeit der $\text{Ca}_v1.2\text{-SNAP}$ -Produktion von der transfizierten DNA-Menge untersucht (Abbildung 4-2, rechts). Hier zeigte sich die höchste Produktion von $\text{Ca}_v1.2\text{-SNAP}$ bei einer Transfektion von $1 \mu\text{g}$ DNA.

4.1.3 Etablierung der Protein-Interaktom-Analyse

Die geplante Analyse des Protein-Interaktoms von $\text{Ca}_v1.2$ sollte über mehrere Einzelschritte stattfinden (Abbildung 4-3), die zum Teil unabhängig voneinander auf ihre Funktionalität zu testen waren.

Zunächst wird die Umgebung von $\text{Ca}_v1.2$ durch Cross-Linking mittels Formaldehyd fixiert (siehe 3.5.1). Dann erfolgt die Zell-Lyse und Solubilisierung der Membranproteine (siehe 3.5.2). Anschließend werden SNAP-Binding-Beads (SBB) verwendet, um mit dem SNAP-Tag fusioniertes Protein zu binden und zu präzipitieren (siehe 3.5.3). Um mögliche unspezifische Interaktionspartner zu entfernen, wird das präzipitierte Proteingemisch mehrfach gewaschen. Anschließend werden die isolierten Protein-Proben in Lämmli-Puffer aufgeköcht, um die

Formaldehyd-Cross-Links zu entfernen. Dann werden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 3.5.5). Das Gel wird dann in einzelne Fraktionen zerschnitten und die enthaltenen Proteine können durch Trypsinierung und massenspektrometrische Analyse identifiziert werden.

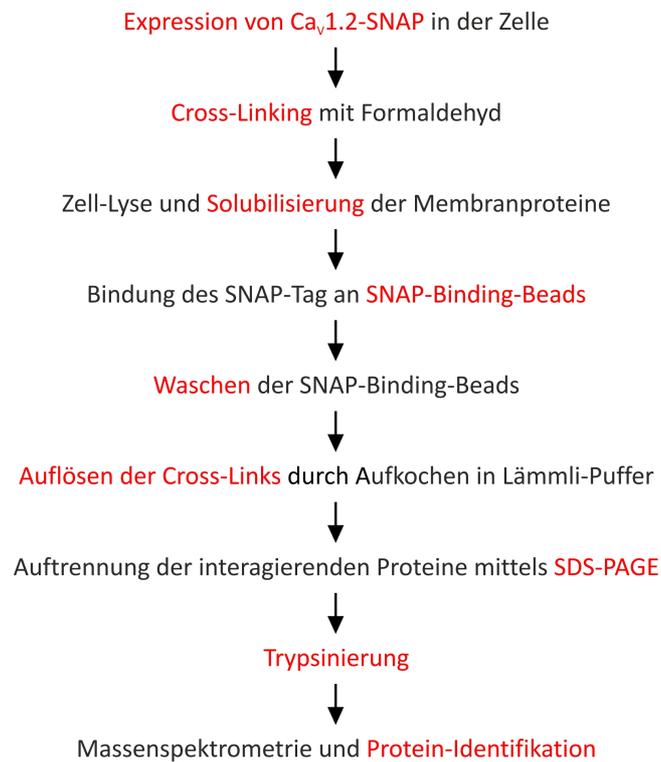


Abbildung 4-3 Arbeitsablauf der Protein-Interaktom-Analyse von CaV1.2.

4.1.3.1 SNAP-Pulldown

Es galt zu überprüfen, ob Ca_v1.2-SNAP überhaupt durch die Verwendung der SNAP-Binding-Beads (SBB) gebunden und präzipitiert werden kann.

Zu diesem Zweck wurden Neuro2A-Zellen, die mit pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP transfiziert waren (siehe 4.1.2), in einem Potter-Homogenisator solubilisiert (siehe 3.5.2) und das gesamte Zell-Lysat auf Aliquots aufgeteilt, die je 500.000 Zellen entsprachen. Diese Aliquots wurden mit verschiedenen Volumina SBB inkubiert (siehe 3.5.3). Nach der Inkubation wurden die SBB und damit an ihnen gebundenes Ca_v1.2-SNAP abzentrifugiert. Die Überstände wurden durch Methanol-Chloroform-Fällung gefällt (siehe 3.5.4) und mittels Western Blot (siehe 3.5.6) auf die verbliebene, ungebundene Menge von Ca_v1.2-SNAP untersucht (Abbildung 4-4).

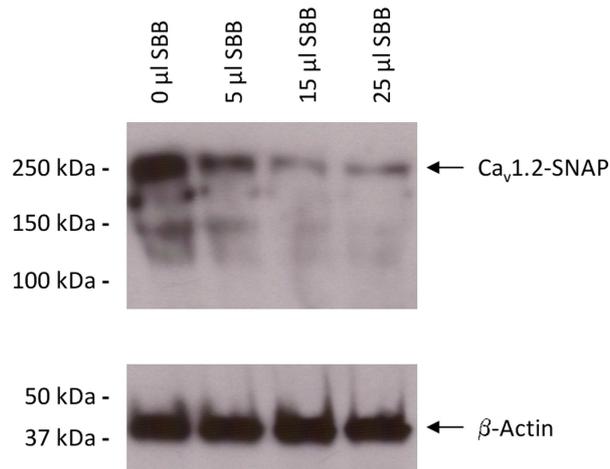


Abbildung 4-4 SNAP-Pulldown. Je Spur wurde der Überstand des Zell-Lysates von 500.000 Neuro2A-Zellen nach Inkubation mit dem angegebenen Volumen SBB aufgetragen. Anti-SNAP wurde als Antikörper verwendet, β-Actin diente als Ladekontrolle.

Wie die Western Blot Analyse zeigt, führen steigende Volumina von SBB zu einer reduzierten Menge an ungebundenem Ca_v1.2-SNAP im Überstand. Des Weiteren zeigt sich, dass Ca_v1.2-SNAP mit SBB vermutlich nicht rückstandslos gebunden und gefällt werden kann, da auch bei Verwendung des hohen Volumens von 25 µl SBB noch ungebundenes Ca_v1.2-SNAP verbleibt.

4.1.3.2 SNAP-Binding-Assay

Um den Anteil des durch verwendete Volumina an SBB gebundenen Ca_v1.2-SNAP quantitativ zu bestimmen, wurde der SNAP-Binding-Assay etabliert. Dieser kombiniert die Fähigkeit des SNAP-Tag, über SNAP-Binding-Beads (SBB) gebunden und gefällt zu werden, mit der Fähigkeit, Fluoreszenzfarbstoffe zu binden. Dadurch erlaubt es der SNAP-Binding-Assay die SBB-Bindung quantitativ zu bestimmen.

Der SNAP-Binding-Assay besteht aus mehreren Einzelschritten (Abbildung 4-5). Zunächst werden mit pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP transfizierte Neuro2A-Zellen (siehe 4.1.2) in einem Potter-Homogenisator solubilisiert (siehe 3.5.2) und das gesamte Zell-Lysat aliquotiert. Die Aliquots werden mit verschiedenen Volumina SBB inkubiert (siehe 3.5.3). Nach der Inkubation werden die SBB und damit an ihnen gebundenes Ca_v1.2-SNAP abzentrifugiert. Die Überstände werden anschließend mit dem SNAP-bindenden, membrangängigen Fluoreszenzfarbstoff SNAP-Cell 360 (New England Biolabs) markiert. Dann wird ungebundener Farbstoff durch Dialyse über

Filter-Röhrchen (Amicon Ultra-0.5 ml, Millipore) mit einer Ausschlussgrenze von 100 kDa entfernt. Filter mit kleineren Ausschlussgrenzen führen zur Anreicherung des im Puffer enthaltenen Triton X-100 und sind daher ungeeignet. Durch die Dialyse des Puffers verbleiben nur noch diejenigen Moleküle des Fluoreszenzfarbstoffes in der Lösung, die an $\text{Ca}_v1.2\text{-SNAP}$ gebunden sind. Die Menge dieses Fluoreszenzfarbstoffes wurde durch anschließende Analyse im Fluoreszenzspektrometer bestimmt. Hierdurch wurde eine indirekte Bestimmung des Anteils an $\text{Ca}_v1.2\text{-SNAP}$ ermöglicht, der durch SBB gebunden wurde und damit nicht mehr für die Bindung an den Fluoreszenzfarbstoff verfügbar war.

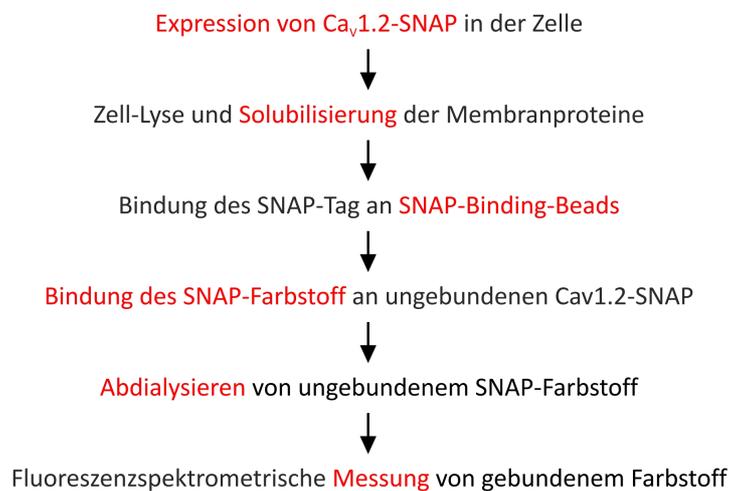


Abbildung 4-5 Arbeitsablauf des SNAP-Binding-Assay.

Das gesamte Zell-Lysat von transfizierten Neuro2A-Zellen (siehe 4.1.2 und 3.5.2) wurde in Aliquots aufgeteilt, die je 500.000 Zellen entsprachen. Die Aliquots wurden mit 0 μl , 5 μl oder 10 μl SBB inkubiert (siehe 3.5.3). In der gleichen Weise erzeugte Aliquots von nicht-transfizierten Neuro2A-Zellen wurden als Kontrolle ohne SBB inkubiert. Nach Abzentrifugieren der SBB und an ihnen gebundenem $\text{Ca}_v1.2\text{-SNAP}$ wurde den Überständen je 5 μl einer 1 mM SNAP-Cell 360-Lösung zugegeben. Die Gemische wurden für 30 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln und Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden die Gemische durch Dialyse und wiederholtes Nachfüllen von frischem TX-Puffer bis zu einem Verdünnungsfaktor über 1000 von ungebundenem SNAP-Cell 360 gereinigt. Die Lösungen wurden dann mit dem Fluoreszenzspektrometer „Mithras LB 940“ (Berthold Technologies) auf ihre

Fluoreszenz analysiert (siehe 3.6.2). Die graphische Auswertung dieser Analyse ist in Abbildung 4-6 dargestellt.

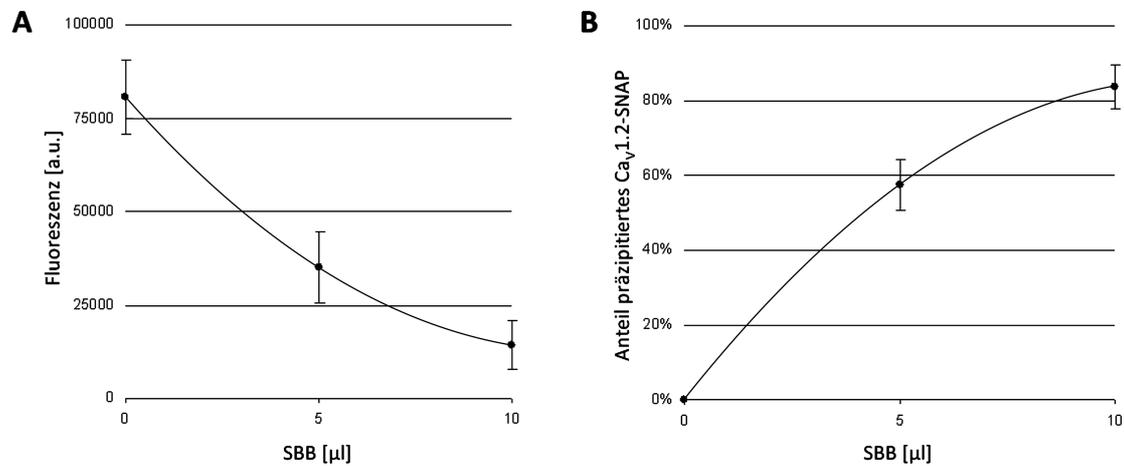


Abbildung 4-6 SNAP-Binding-Assay. A: Der Mittelwert der Fluoreszenz, abzüglich der gemessenen Fluoreszenz der jeweiligen Kontrolle, aus drei unabhängigen Experimenten des SNAP-Binding-Assay. Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes dar. B: Die in A dargestellten Messergebnisse wurden auf den jeweiligen Anteil an präzipitierten Ca_v1.2-SNAP umgerechnet. Dazu wurde für die Einzelexperimente der jeweilige Messwert bei 0 µl SBB als 0 % präzipitiertes Ca_v1.2-SNAP und eine gemessene Fluoreszenz von 0 als 100 % präzipitiertes Ca_v1.2-SNAP definiert. Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes dar.

In der Darstellung der Ergebnisse des SNAP-Binding-Assay ist zu sehen, dass die Inkubation mit steigenden Volumina SBB zu einer Reduktion der gemessenen Fluoreszenz führte (Abbildung 4-6A).

Um aus diesen Messwerten den jeweiligen Anteil an Ca_v1.2-SNAP zu bestimmen, der durch SBB gebunden wurde, wurden zwei Annahmen zu Grunde gelegt. Zum einen ist dies der Umstand, dass bei Verwendung von 0 µl SBB kein Ca_v1.2-SNAP über SBB gebunden wird. Zum anderen ist anzunehmen, dass bei einer Bindung von allem Ca_v1.2-SNAP die gemessene Fluoreszenz verschwindet. Auf Basis dieser Annahmen wurden die in Abbildung 4-6A dargestellten Messungen in den jeweiligen Anteil an präzipitiertem Ca_v1.2-SNAP umgerechnet (Abbildung 4-6B).

4.1.3.3 Formaldehyd-Cross-Linking

In Neuro2A-Zellen wurde der Effekt des Formaldehyd-Cross-Linkings auf PPIs von Ca_v1.2-SNAP untersucht. Aufgrund der im Vergleich zum überexprimierten Ca_v1.2-SNAP geringen stöchiometrischen Menge anderer Proteine in den

Zell-Lysaten gestaltet sich eine reproduzierbare Analyse schwierig. Um diesem Problem beizukommen, wurden Neuro2A-Zellen mit einem 1:1-DNA-Gemisch an pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP und pcDNA3-Ca_vβ₂ transfiziert (siehe 4.1.2). Nach der Ernte wurden die Zellen in Aliquots zu je 1 Mio. Zellen aufgeteilt. Diese Aliquots wurden bei einem Gesamtvolumen von je 2 ml mit 0 %, 0,3 %, 0,6 % und 1,0 % Formaldehyd für 20 min unter leichtem Schütteln inkubiert (siehe 3.5.1). Nach dem Abstoppen der Cross-Linking-Reaktion wurden die Zellen lysiert und die Membranproteine solubilisiert (siehe 3.5.2). Anschließend wurden die Zell-Lysate mit je 20 µl SBB inkubiert (siehe 3.5.3). Die pelletierten SBB und an ihnen gebundenes Protein wurden zunächst mit 1 ml TX-Puffer + 1 M NaCl und dann mit 1 ml TX-Puffer + 2 % Triton X-100 gewaschen. Dann wurden die SBB in 30 µl 1x Lämmli-Puffer aufgenommen und zur Auflösung von Formaldehyd-Cross-Links und zur Denaturierung der Proteine für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 3.5.5) und durch Western Blot Analyse (siehe 3.5.6) mit dem Antikörper Anti-Ca_vβ₂ auf die Menge an Ca_vβ₂ in den Proben untersucht (Abbildung 4-7).

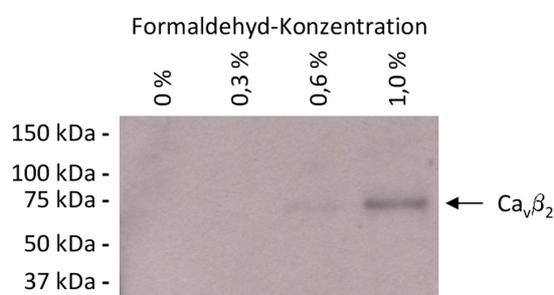


Abbildung 4-7 Formaldehyd-Cross-Linking. Es wurden je Spur die mit den SBB co-präzipitierten Proteingemische aufgetragen. Angegeben ist jeweils die Formaldehyd-Konzentration, mit der die untersuchten Zellen zuvor behandelt wurden. Anti-Ca_vβ₂ wurde als Antikörper verwendet.

Wie sich zeigt, kann Ca_vβ₂ bei ausreichendem Formaldehyd-Cross-Linking mit den SBB und Ca_v1.2-SNAP co-präzipitiert werden. Ab einer eingesetzten Formaldehyd-Konzentration von 0,6 % wird im Western-Blot eine schwache Bande für Ca_vβ₂ sichtbar. Diese nimmt bei 1,0 % Formaldehyd deutlich zu. Bei geringerem oder ohne Formaldehyd-Cross-Linking werden keine nachweisbaren Mengen Ca_vβ₂ mit den SBB und Ca_v1.2-SNAP co-präzipitiert.

4.2 CACNA1C-SNAP-Mauslinie

Zur Analyse der Protein-Protein-Interaktionen von Ca_v1.2 sollte eine Mauslinie erzeugt werden, deren endogener Ca_v1.2-Kanal mit dem SNAP-Tag markiert ist. Dafür sollte an das 3'-Ende des für die α_1 -Untereinheit des Kanals codierenden CACNA1C-Gens die für den SNAP-Tag codierende DNA-Sequenz angehängt werden. Erreicht werden sollte dies über eine homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen. Zu diesem Zweck war der CACNA1C-SNAP Gentergeting-Vektor erzeugt worden, der in dieser Arbeit verwendet werden sollte.

4.2.1 Gentergeting-Strategie

Das Design des CACNA1C-SNAP Gentergeting-Vektor und die Gentergeting-Strategie können Abbildung 4-8 entnommen werden. Die SNAP-Tag-Sequenz wurde in frame an das 3'-Ende des letzten Exons (Exon 47) von CACNA1C angehängt. Hierfür wurde das Stop-Codon von CACNA1C entfernt und durch eine BamHI-Schnittstelle ersetzt, die zur Ligation des SNAP-Tag an diese Stelle verwendet wird. Zur Terminierung der Transkription *in vivo* wurde an das 3'-Ende des SNAP-Tag ein neues Stop-Codon angefügt. Um die Insertion in die genomische DNA durch homologe Rekombination zu ermöglichen, sind im Gentergeting-Vektor Sequenzen erforderlich, die zum Zielort der Insertion homolog sind. Als homologe Sequenz im 3'-Bereich von Exon 47 dienten die ersten 4,1 kb des dort gelegenen intronischen Bereichs. Die homologe Sequenz im 5'-Bereich wurde durch Exon 47 und das hiervon 5' gelegene Intron gebildet. Die 5' gelegene homologe Sequenz umfasst 1,8 kb. In den intronischen Anteil dieser Sequenz wurde die 4,8 kb große NeoTK-Kassette kloniert, die als Selektionsmarker verwendet wird. Sie ist von zwei loxP-Erkennungssequenzen flankiert. Als Vektor für die Amplifikation des Konstruktes in Bakterien wurde das Plasmid pBluescript II KS(+) verwendet. Damit umfasst der CACNA1C-SNAP Gentergeting-Vektor insgesamt 14,3 kb.

Bei erfolgreicher homologer Rekombination soll durch den CACNA1C-SNAP Gentergeting-Vektor der SNAP-Tag mit dem neuen Stop-Codon an Exon 47 angefügt

werden und zusätzlich die NeoTK-Kassette in den intronischen Bereich zwischen den Exonen 46 und 47 eingebracht werden (Abbildung 4-8).

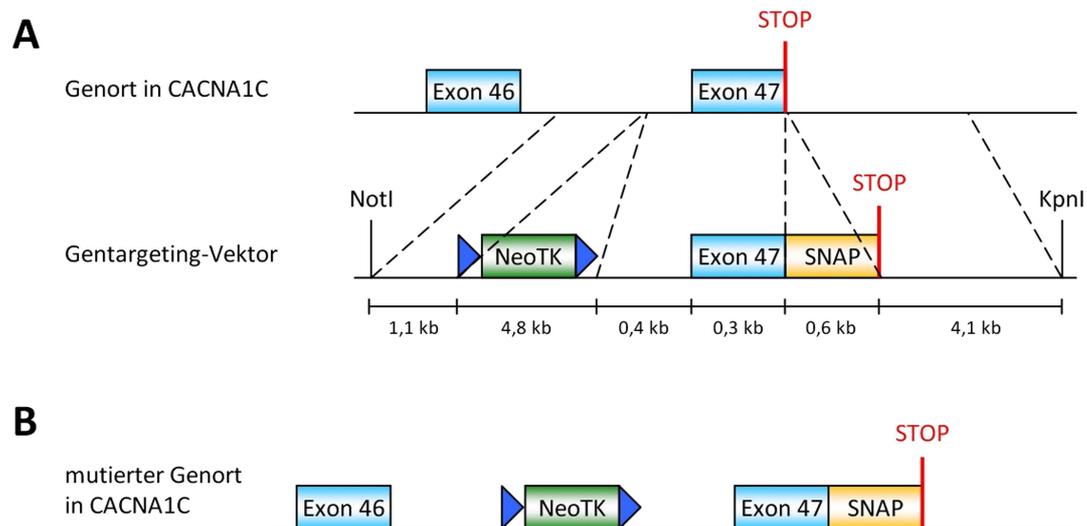


Abbildung 4-8 Ca_v1.2-SNAP Gentargeting-Strategie. A: Der Genort in CACNA1C mit Stop-Codon am Ende von Exon 47 und der CACNA1C-SNAP Gentargeting-Vektor mit neuem Stop-Codon, dem SNAP-Tag und der mit loxP-Sequenzen flankierten NeoTK-Kassette, sowie den Schnittstellen NotI und KpnI, welche die homologen Bereiche des Vektors begrenzen. Die homologen Regionen zwischen dem unmutierten Genort und dem CACNA1C-SNAP Gentargeting-Vektor sind durch gestrichelte Linien veranschaulicht. B: Der mutierte Genort in CACNA1C nach einer erfolgreichen homologen Rekombination. Die NeoTK-Kassette wird in das Intron zwischen den Exonen 46 und 47 inseriert und der SNAP-Tag mit dem neuen Stop-Codon wird an Exon 47 angefügt.

4.2.2 Überprüfung des Gentargeting-Vektors

4.2.2.1 Sequenzierung

Der CACNA1C-SNAP Gentargeting-Vektor wurde nach der Herstellung durch Sequenzierung überprüft, um unerwünschte Mutationen auszuschließen und das korrekte Anfügen des SNAP-Tag an Exon 47, sowie das neue Stop-Codon bestätigen zu können. Die Sequenzierung des entsprechenden Bereichs des CACNA1C-SNAP Gentargeting-Vektors an Exon 47 und SNAP-Tag ist in Abbildung 4-9 zu sehen.

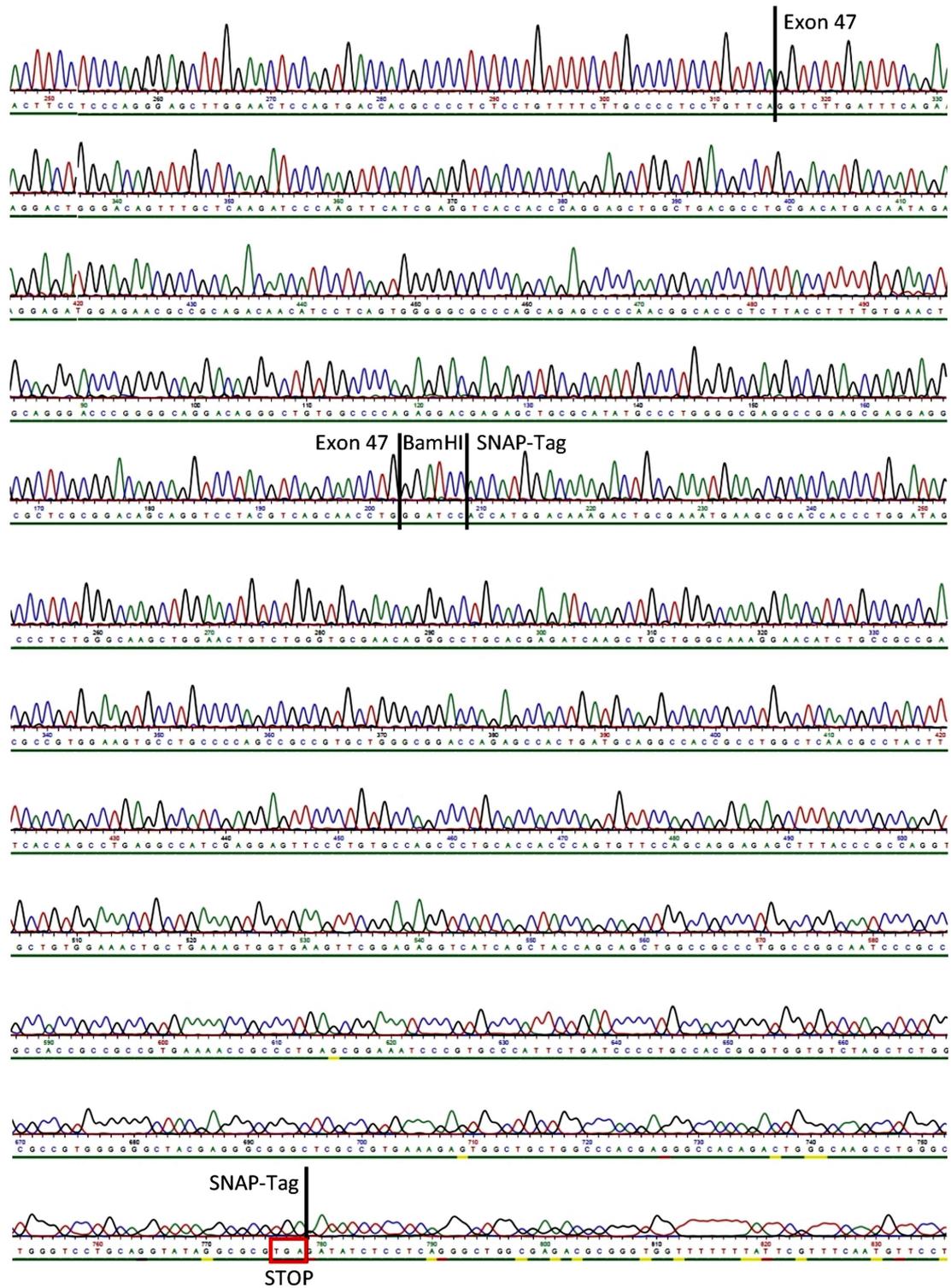


Abbildung 4-9 Sequenzierung des CACNA1C-SNAP Gentargeting-Vektors. Beginn und Ende von Exon 47 und SNAP-Tag wurden jeweils markiert. Der SNAP-Tag wurde in frame über eine BamHI-Schnittstelle an Exon 47 angehängt. Am Ende des SNAP-Tag befindet sich das Stop-Codon (roter Kasten).

4.2.2.2 Funktionalität der loxP-Sequenzen

Die NeoTK-Kassette ist durch zwei loxP-Erkennungssequenzen flankiert. Diese dienen dazu, dass die NeoTK-Kassette *in vivo* aus dem Genom entfernt werden kann (Abbildung 4-10). Dies geschieht durch das Enzym Cre-Rekombinase (siehe 3.4.1).

Die Funktionalität der loxP-Sequenzen im CACNA1C-SNAP Genterging-Vektor wurde *in vitro* durch die Verwendung von Cre-Rekombinase (New England Biolabs) überprüft. Zunächst wurde der CACNA1C-SNAP Genterging-Vektor mit Cre-Rekombinase inkubiert und danach eine PCR mit drei Primern (CreScr_n_fw, RE22_rev und ScrnPCR_REV_1) durchgeführt. Der Forward-Primer CreScr_n_fw bindet im 5'-Bereich vor der ersten loxP-Sequenz, der Reverse-Primer RE22_rev bindet am 5' Ende der NeoTK-Kassette und der zweite Reverse-Primer ScrnPCR_REV_1 bindet zwischen der NeoTK-Kassette und Exon 47. Im ausganglichen Genterging-Vektor führt diese PCR zu einem DNA-Fragment von etwa 500 bp. Im rekombinierten Vektor ergibt die PCR dagegen ein DNA-Fragment von etwa 850 bp (Abbildung 4-10).

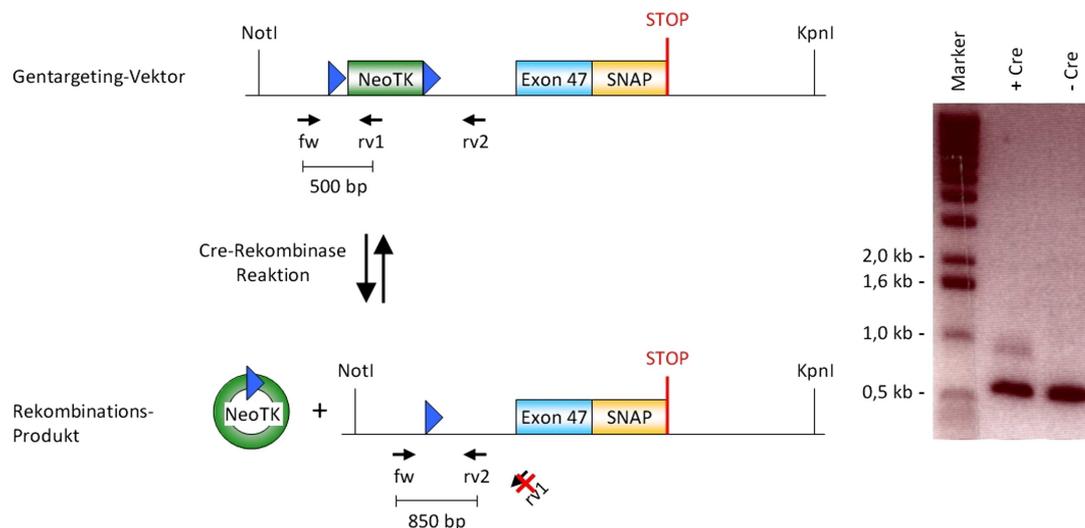


Abbildung 4-10 Funktionalität der loxP-Sequenzen. Die Cre-Rekombinase Reaktion führt auf den CACNA1C-SNAP Genterging-Vektor angewendet zum Herausschneiden der NeoTK-Kassette und einer loxP-Sequenz und deren zirkulärer Verknüpfung. Eine loxP-Sequenz verbleibt im Vektor. Auf den ausganglichen CACNA1C-SNAP Genterging-Vektor angewendet führt die PCR mit drei Primern zu einem 500 bp langen DNA-Produkt, auf das Rekombinationsprodukt angewendet zu einem 850 bp langen DNA-Fragment. Rechts: PCR-Produkte mit und ohne Zugabe von Cre-Rekombinase.

Wie in Abbildung 4-10 zu sehen ist, führte die Inkubation des CACNA1C-SNAP Gentergeting-Vektors mit Cre-Rekombinase zum Auftreten eines etwa 850 bp großen DNA-Fragmentes. Das weitere Vorhandensein eines etwa 500 bp großen DNA-Fragmentes weist darauf hin, dass weiterhin auch nicht-rekombinierter Vektor im Gemisch vorkommt.

4.2.3 Gentergeting mittels homologer Rekombination

In Folge der Elektroporation von murinen ES-Zellen mit dem Gentergeting-Vektor (siehe 3.4.4.4) konnten ES-Zellklone isoliert werden, welche die Selektion mit G418 überlebten. Sie trugen also die NeoTK-Kassette in ihrem Genom. Es musste überprüft werden, ob in diesen ES-Zellklonen das Gentergeting-Konstrukt am richtigen Locus inseriert wurde oder an einem zufälligen, ungewünschten Ort im Genom. Hierfür wurden zwei Techniken entwickelt: Eine Screening-PCR und ein Southern Blot Screening.

4.2.3.1 Screening-PCR

Die Screening-PCR wurde mit einem Primerpaar durchgeführt, das unter homologer Rekombination des Gentergeting-Vektors am richtigen Genlocus ein DNA-Fragment einer definierten Größe amplifiziert. Hierfür wurde ein Forward-Primer (Scrn4fw) gewählt, dessen Bindestelle sich in 5'-Richtung außerhalb der vom Gentergeting-Vektor umfassten DNA-Sequenz befindet. Der Reverse-Primer (RE22_rev) liegt in der NeoTK-Kassette und kann in ES-Zellen entsprechend nur auf genomischer DNA binden, wenn dieser Abschnitt des Gentergeting-Vektors integriert wurde. An einem erfolgreich mutierten Genort würde sich mit diesen Primern ein DNA-Fragment einer Größe von etwa 1,3 kb erzeugen lassen (Abbildung 4-11).

Um die Screening-PCR zu etablieren, wurde ein Screening-Testvektor erzeugt, der eine erfolgreiche homologe Rekombination in genomischer DNA simuliert. Der Screening-Testvektor wurde hergestellt unter Verwendung eines Zwischenvektors (5'Arm-floxed-pBlue) aus der Klonierung des Gentergeting-Vektors, der den 5'

gelegenen homologen Bereich und die NeoTK-Kassette umfasst. Dieser Zwischenvektor wurde um die nächsten etwa 900 bp in 5'-Richtung verlängert, indem dieser Bereich aus dem BAC RP24 mit den Primern 5'ArmScreenI_fw und 5'ArmScreen_rev amplifiziert und über die NotI-Schnittstellen in den Zwischenvektor ligiert wurde. Der Screening-Testvektor wurde in verschiedenen Mengen mit genomischer DNA aus ES-Zellen vermischt und die Screening-PCR auf dieses Gemisch getestet (Abbildung 4-11).

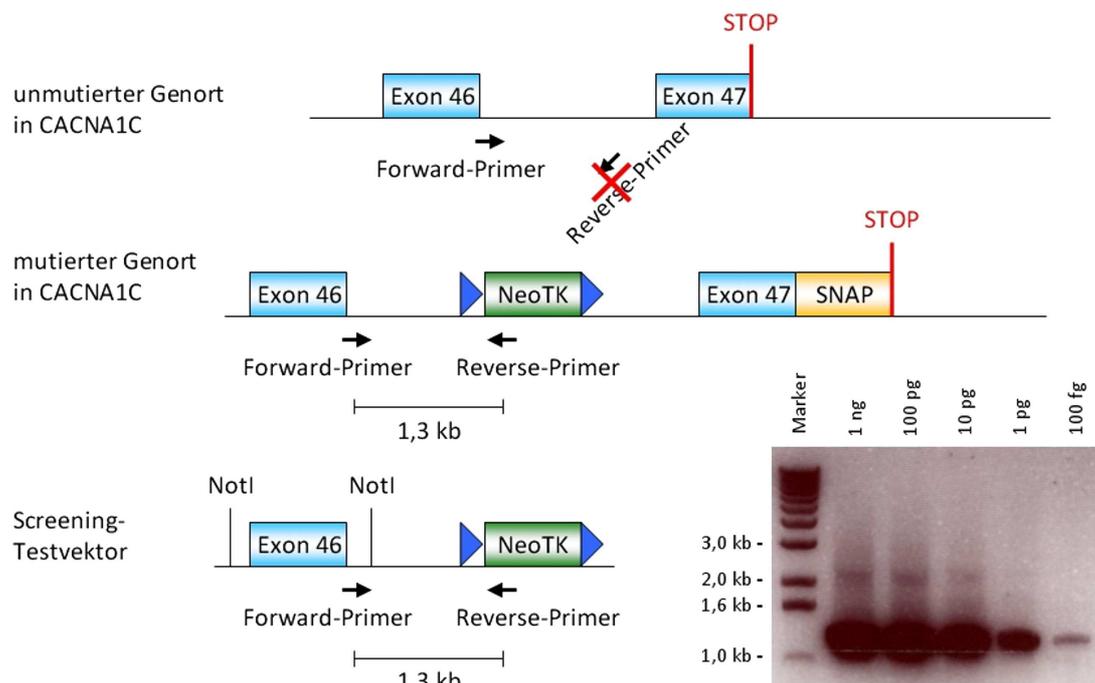


Abbildung 4-11 Etablierung der Screening-PCR. Am unmutierten Genort findet keine Bindung des Reverse-Primers statt. Am mutierten Genort binden sowohl der Forward-Primer als auch der Reverse-Primer, wodurch mittels PCR ein 1,3 kb großes DNA-Fragment erzeugt wird. Der Screening-Testvektor simuliert den mutierten Genort und erzeugt in einer PCR das selbe DNA-Fragment; unten rechts: Der Screening-Testvektor wurde in einer Verdünnungsreihe von 1 ng bis 100 fg bei einem Hintergrund von 190 ng genomischer DNA aus ES-Zellen in der Screening-PCR eingesetzt.

Es ist zu sehen, dass die auf den Screening-Testvektor etablierte Screening-PCR mit den verwendeten Primern (Scrn4fw und RE22_rev) wie erwartet ein etwa 1,3 kb großes PCR-Produkt erzeugt. Dieses DNA-Fragment ist trotz des Hintergrundes von genomischer DNA auch bei sehr geringen eingesetzten Mengen des Screening-Testvektors zu beobachten.

4.2.3.2 Southern Blot-Screening

Es wurde eine DNA-Sonde erzeugt, die für ein Screening mittels Southern Blot verwendet werden kann. Hierfür wurde ein im CACNA1C-SNAP Gentargeting-Vektor vorkommender intronischer Bereich zwischen den Exonen 46 und 47 ausgewählt. Diese wurden mit den Primern 5'Arm_Not_for und 5'SouS2_Bam_rv aus dem BAC RP24 heraus amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen NotI und BamHI in das Plasmid pBluescript II KS(+) kloniert. Für den Einsatz im Southern Blot wurde dieses DNA-Stück wiederum über die selben Schnittstellen ausgeschnitten und anschließend die Sonde durch radioaktive Markierung hergestellt (siehe 2.2.10.4). Für den Southern Blot wird genomische DNA mit EcoRI geschnitten und mit der Sonde markiert (siehe 2.2.10). Bei unveränderter genomischer DNA markiert die Sonde ein etwa 3,8 kb großes DNA-Fragment. Wenn eine homologe Rekombination am gewünschten Genort stattgefunden hat, wurden mit der NeoTK-Kassette zusätzliche EcoRI-Schnittstellen in diesen Bereich eingefügt und es kommt zur Markierung eines etwa 1,7 kb großen DNA-Fragments (Abbildung 4-12).

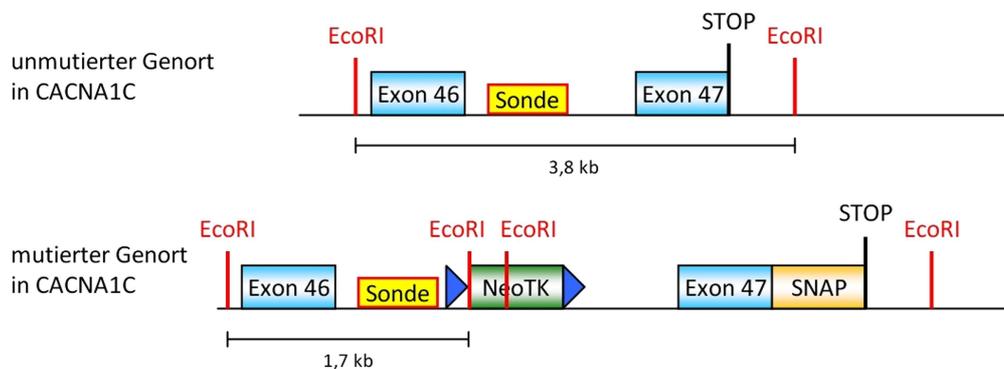


Abbildung 4-12 Strategie des Southern Blot-Screening. Durch die Insertion der NeoTK-Kassette am gewünschten Genort werden zusätzliche EcoRI-Schnittstellen eingefügt und die Sonde markiert ein DNA-Fragment anderer Größe.

4.2.3.3 Gentargeting und Analyse der ES-Zellklone

Zur Durchführung des Gentargetings wurde der CACNA1C-SNAP Gentargeting-Vektor mit NotI oder Acc65I linearisiert und durch Chloroform-Phenol-Fällung gereinigt. Die Elektroporation der ES-Zellen fand mit jeweils 20-40 µg des linearisierten Vektors statt. Das Gentargeting wurde dreimal durchgeführt. Diese drei Anläufe erbrachten

insgesamt 269 ES-Zellklone, von denen keiner die gewünschte Mutation aufwies. Da die Zahl der ES-Zellklone bei den ersten drei Durchführungen verglichen mit Erfahrungswerten gering war, wurde anschließend das Gentergeting mit sechs Elektroporationen, also dem sechsfachen Umfang, durchgeführt. Hierbei ergaben sich 340 ES-Zellklone, von denen aber wiederum keiner die gewünschte Mutation zeigte.

4.3 ROSA26(Ca_v1.2-SNAP)-Mauslinie

Als Alternative zur Erzeugung einer transgenen Mauslinie, deren endogener Ca_v1.2-Kanal mit dem SNAP-Tag markiert ist, sollte eine Mauslinie erzeugt werden, die den markierten Kanal gewebespezifisch exprimieren kann.

4.3.1 Gentergeting-Strategie

Hierfür sollte ein Gentergeting-Vektor erzeugt werden, der für Ca_v1.2 codierende cDNA, an die der SNAP-Tag angehängt wurde, in den ROSA26-Lokus einbringt. Zu diesem Zweck wurde das Insert des vorhandenen Plasmids pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP in den CAG-STOP-EGFP-ROSA Targeting Vector (CTV; Addgene; siehe 3.1.1) kloniert, der für das Targeting des ROSA26-Lokus entwickelt wurde. Bei erfolgreicher homologer Rekombination wird das Ca_v1.2-SNAP-Konstrukt im ROSA26-Lokus zwischen den Exonen 1 und 2 integriert. Die Gentergeting-Strategie ist in Abbildung 4-13 schematisch dargestellt.

Durch die Neo- und STOP-Kassetten, die mit dem Gentergeting-Vektor direkt 5' vor dem Ca_v1.2-SNAP-Konstrukt integriert werden, wird eine Expression von Ca_v1.2-SNAP in transgenen Mäusen verhindert. Durch die Kreuzung dieser Mäuse mit Cre-Deleter Stämmen, die gewebespezifisch Cre-Rekombinase exprimieren, werden die Neo- und STOP-Kassetten entfernt. Entsprechend kommt es in der Nachkommenschaft dieser Mäuse zur gewebespezifischen Expression von Ca_v1.2-SNAP (Abbildung 4-13).

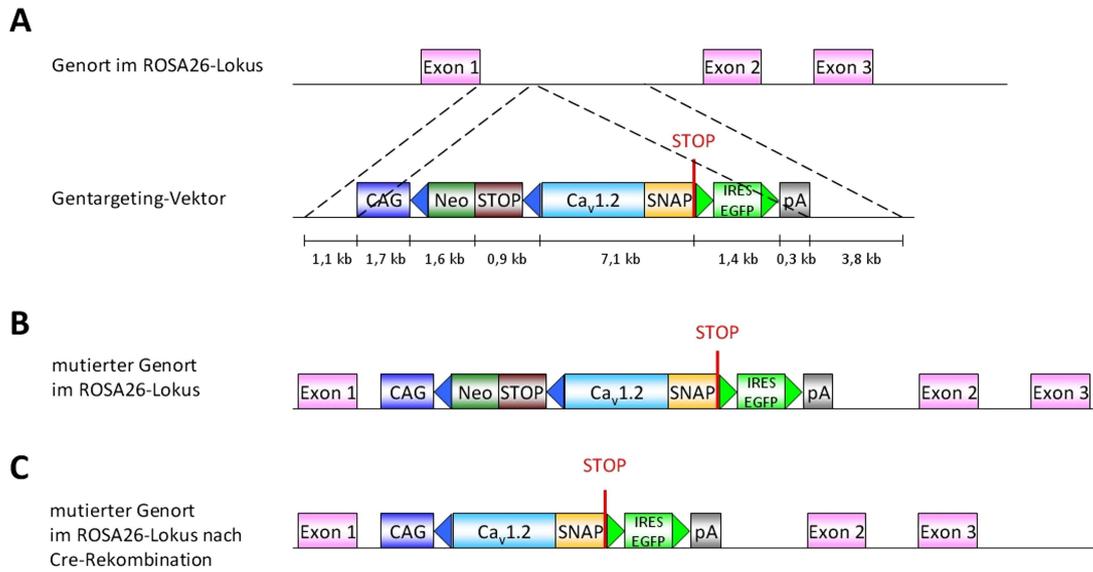


Abbildung 4-13 ROSA26(Ca_v1.2-SNAP) Gentargeting-Strategie. A: Der Genort im ROSA26-Lokus und der Gentargeting-Vektor mit CAG-Promotor, von loxP-Sequenzen flankierten Neo- und STOP-Kassetten, Ca_v1.2-SNAP-Konstrukt, FRT-flankierter IRES-EGFP-Reportergergen-Kassette und Poly-Adenylierungssequenz. B: Der mutierte Genort im ROSA26-Lokus nach einer erfolgreichen homologen Rekombination. Der Inhalt des Gentargeting-Vektors wird 3' nach Exon 1 inseriert. Die Expression von Ca_v1.2-SNAP wird durch die 5' davor gelegene STOP-Kassette unterbunden. C: Durch Cre-Rekombination werden die Neo- und STOP-Kassetten entfernt und die Expression von Ca_v1.2-SNAP ermöglicht.

4.3.2 Herstellung des Gentergeting-Vektors

Für die Herstellung des Gentergeting-Vektors dienten zwei Plasmide als Ausgangspunkt: pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP und der CAG-STOP-EGFP-ROSA Targeting Vector (CTV; Addgene; siehe 3.1.1). Durch mehrere Klonierungsschritte wurde das Insert des ersten Plasmids, Ca_v1.2-SNAP, über die Ascl-Schnittstelle in den CTV eingefügt. Eine Übersicht dieser Klonierungsschritte ist schematisch in Abbildung 4-14 dargestellt. Details zu den einzelnen Schritten sind in den Abbildungen 4-15 bis 4-19 zu sehen.

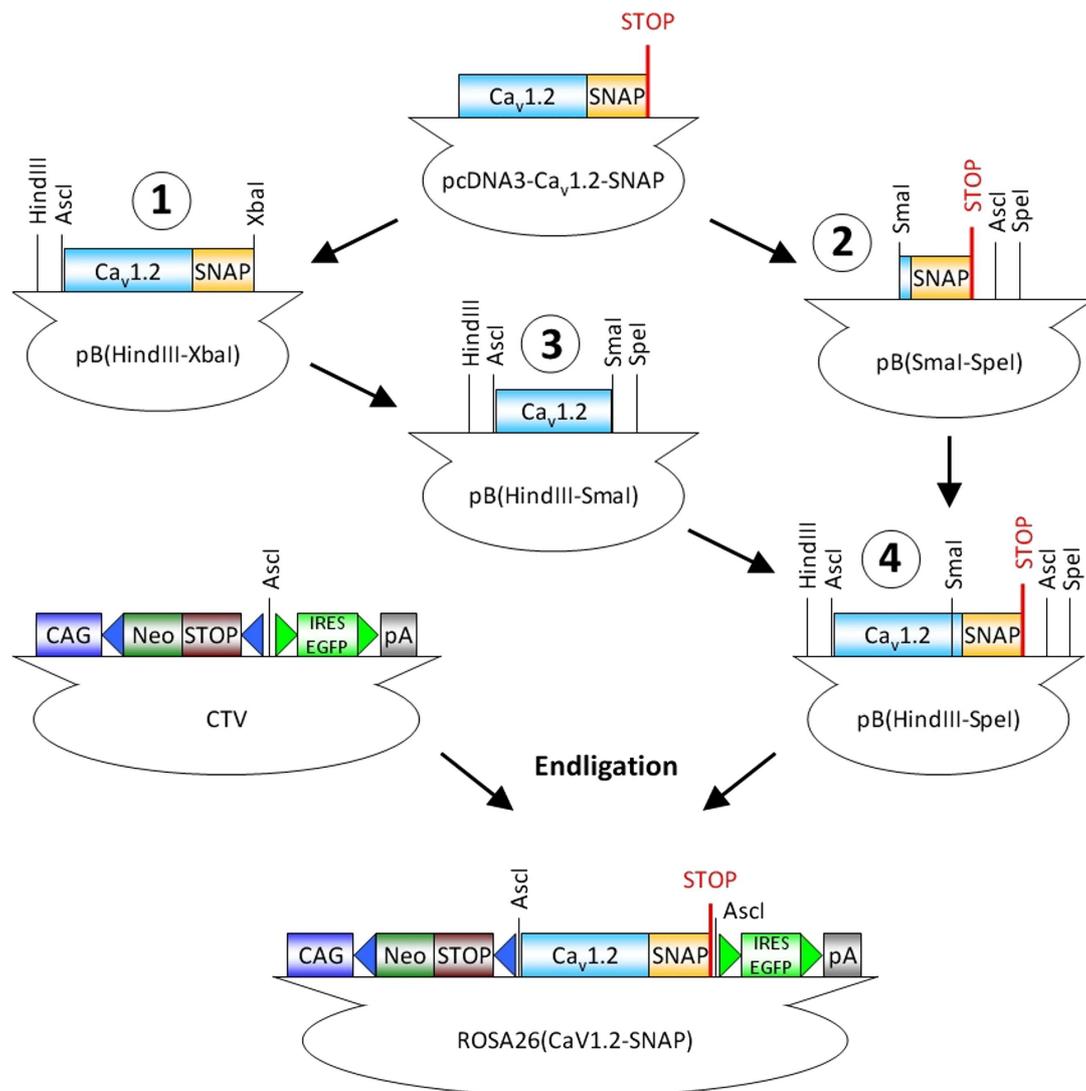


Abbildung 4-14 Herstellung des ROSA26(Ca_v1.2-SNAP) Gentergeting-Vektors. Ausgehend von pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP und CTV wurde der Gentergeting-Vektor über vier Zwischenvektoren hergestellt.

Zwischenvektor 1: pB(HindIII-XbaI)

Zunächst war geplant, den Gargeting-Vektor über nur einen Zwischenvektor zu erzeugen. Durch eine PCR auf das Plasmid pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP mit den Mutationsprimern LK1SNAP_FW und LK1SNAP_RV sollte das Ca_v1.2-SNAP-Insert des Plasmids mit umfangreichen Anhängen amplifiziert werden.

Vom 5' Ende her sollte dies in 5'-3'-Richtung ein kurzer Überhang zur Unterstützung des Restriktionsverdauens, eine HindIII-Schnittstelle und eine Ascl-Schnittstelle sein. Das entspricht einem nicht-homologen Mutationsbereich von 20 bp bei 70 % GC-Gehalt.

Vom 3'-Ende her waren in 3'-5'-Richtung ein kurzer Überhang zur Unterstützung des Restriktionsverdauens, eine XbaI-Schnittstelle, eine Ascl-Schnittstelle und ein neues Stop-Codon geplant. Dies wiederum entspricht einem nicht-homologen Mutationsbereich von 23 bp bei 65 % GC-Gehalt.

Die Ascl-Schnittstellen sind für die Ligation in den CTV notwendig. Über die HindIII- und XbaI-Schnittstellen sollte in den pBluescript-Vektor zwischenkloniert werden. Das neue Stop-Codon musste eingebracht werden, da sich am 3'-Ende des SNAP-Tag eine endogene Ascl-Schnittstelle befand, die entfernt werden musste. Da sie außerhalb des für die SNAP-Tag-Funktion notwendigen Bereichs liegt, ist ihre Entfernung für die Verwendung des SNAP-Tag ohne Konsequenz. Entsprechend wurde der Reverse-Primer so gewählt, dass das neue Stop-Codon mehrere Basen-Triplets in 5'-Richtung verschoben und damit die endogene Ascl-Schnittstelle übermutiert wird.

Das so erzeugte PCR-Produkt wurde mit HindIII und XbaI geschnitten und in den pBluescript-Vektor ligiert. Wie sich zeigte, war aufgrund der Länge und des GC-Gehaltes der verwendeten Mutationsprimer eine fehlerfreie Erzeugung des gewünschten PCR-Produktes nicht möglich. Der Reverse-Primer bildete vermutlich eine Schleife, wodurch im 3'-Ende des PCR-Produktes zwar sowohl die für diesen Klonierungsschritt erforderliche XbaI-Schnittstelle vorhanden als auch die SNAP-Tag-Sequenz fehlerfrei war, jedoch eine dazwischen liegende Sequenz von „TGAGGCGCGC“ fehlte. Diese Sequenz umfasste das neue Stop-Codon und 7 von 8 Basen der einzubringenden Ascl-Schnittstelle. Veränderungen der PCR-Bedingungen brachten keine Verbesserung der Mutation im 3'-Bereich.

Andererseits konnten die Mutationen am Forward-Primer wie geplant eingebracht werden. Daher wurde die Klonierungs-Strategie entsprechend angepasst und das teilweise fehlerhafte Produkt als erster von vier Zwischenvektoren weiterverwendet (Abbildung 4-15).

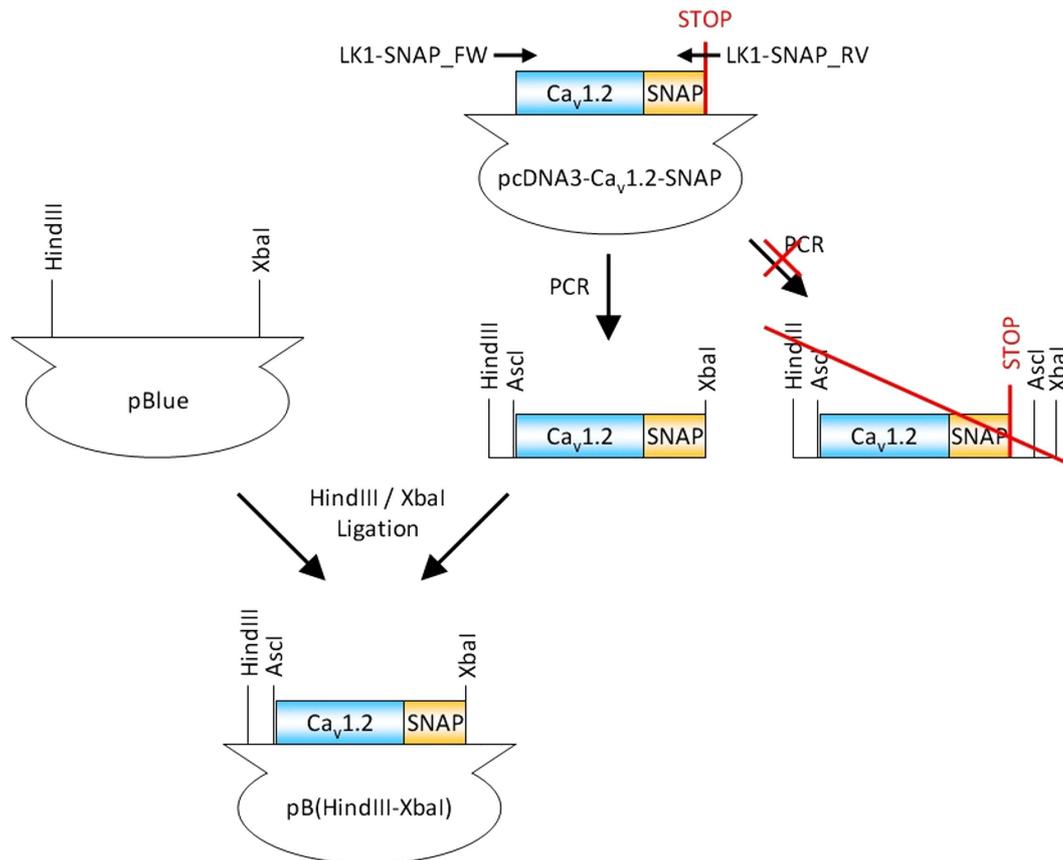


Abbildung 4-15 Herstellung des Zwischenvektor 1: pB(HindIII-XbaI). Das ausgehend von pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP geplante PCR-Produkt konnte nicht erzeugt werden. Das Alternativprodukt wurde in pBluescript ligiert und als erster Zwischenvektor pB(HindIII-XbaI) weiterverwendet.

Zwischenvektor 2: pB(SmaI-SpeI)

Mit dem zweiten Zwischenvektor wurden die erwünschten Mutationen für das 3'-Ende von Ca_v1.2-SNAP realisiert. Hierfür wurde eine PCR auf das Plasmid pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP mit den Primern LK1preSma_for und LK1SNAPMutRev durchgeführt. Der mutierende Reverse-Primer LK1SNAPMutRev brachte das neue Stop-Codon, die AscI-Schnittstelle, eine SpeI-Schnittstelle und einen Überhang für den Restriktionsverdau ein. Der Forward-Primer LK1preSma_for ist ein nicht-mutierender Primer, der etwa 60 bp 5' von einer SmaI-Schnittstelle bindet, die wiederum etwa 100 bp 5' vor dem Beginn der SNAP-Tag-Sequenz liegt. Anschließend

wurde das erzeugte PCR-Produkt mit SmaI und SpeI restriktionsgeschnitten und in den Vektor pBluescript ligiert (Abbildung 4-16).

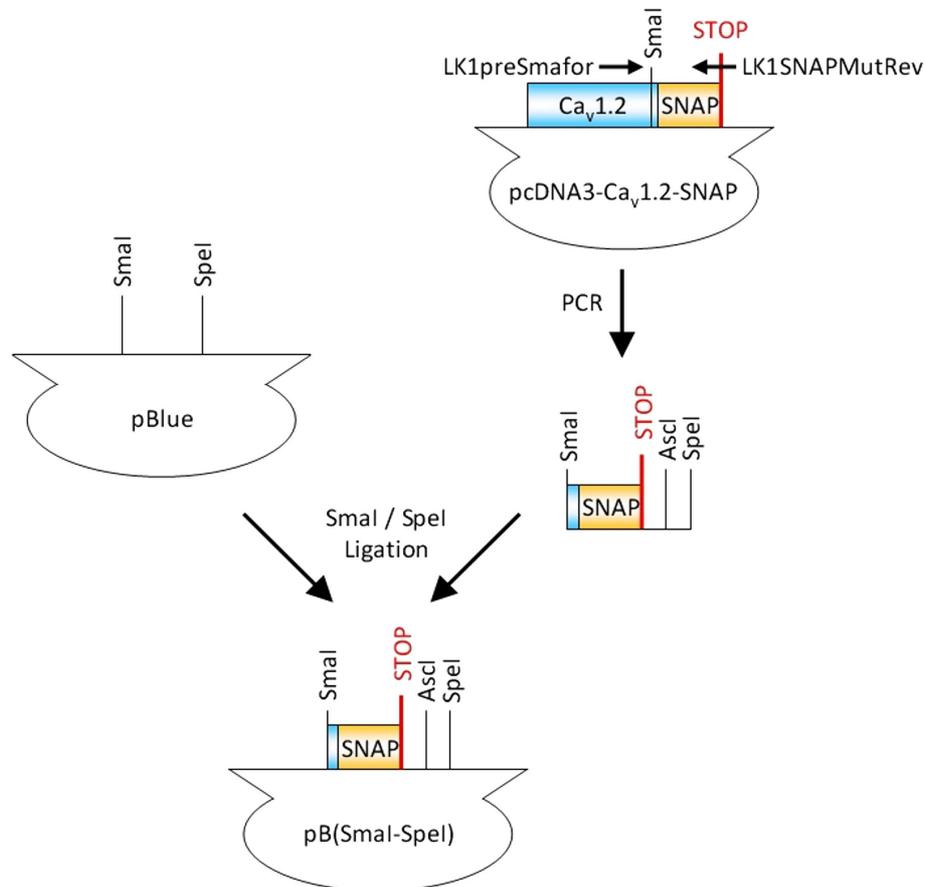


Abbildung 4-16 Herstellung des Zwischenvektor 2: pB(SmaI-SpeI). Auf das Plasmid pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP wurde eine PCR zur Erzeugung eines DNA-Fragmentes durchgeführt, das am 3'-Ende über das neue Stop-Codon, eine AscI- und eine SpeI-Schnittstelle verfügt. Über SmaI und SpeI wurde das PCR-Produkt in den Vektor pBluescript ligiert.

Zwischenvektor 3: pB(HindIII-SmaI)

Nachdem die angestrebten Mutationen am 5'- und 3'-Ende erreicht werden konnten, mussten die beiden DNA-Abschnitte zusammengefügt werden. Als Verknüpfungsstelle wurde die endogene SmaI-Schnittstelle gewählt. Als Zwischenschritt wurde der 5'-Abschnitt von Ca_v1.2-SNAP aus dem Zwischenvektor 1 über HindIII und SmaI in den Vektor pBluescript ligiert (Abbildung 4-17).

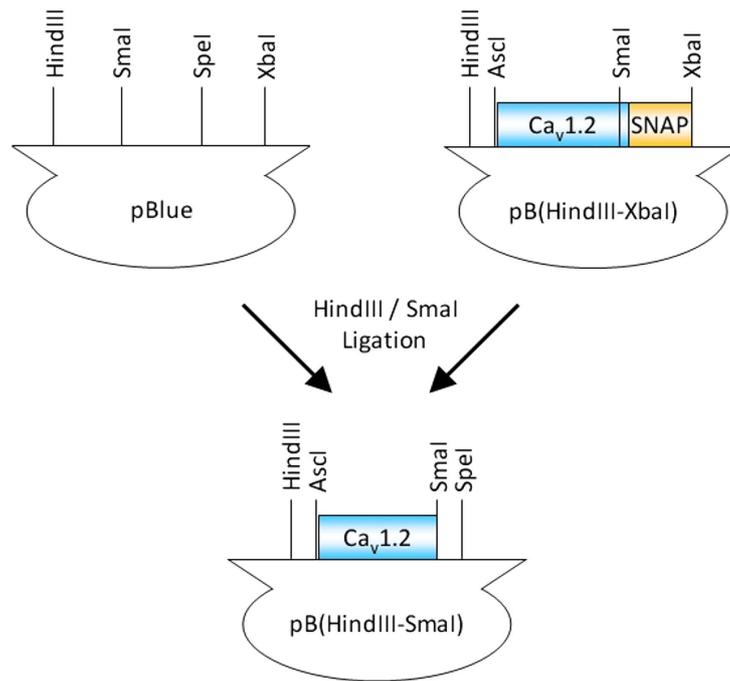


Abbildung 4-17 Herstellung des Zwischenvektor 3: pB(HindIII-SmaI). Der 5'-Bereich von Ca_v1.2-SNAP des Zwischenvektors 1 wurde über HindIII und SmaI in den Vektor pBluescript ligiert.

Zwischenvektor 4: pB(HindIII-SpeI)

Zur Verknüpfung der beiden Abschnitte von Ca_v1.2-SNAP wurden die Zwischenvektoren 2 und 3 mit SmaI und SpeI restriktionsverdaut und ligiert (Abbildung 4-18).

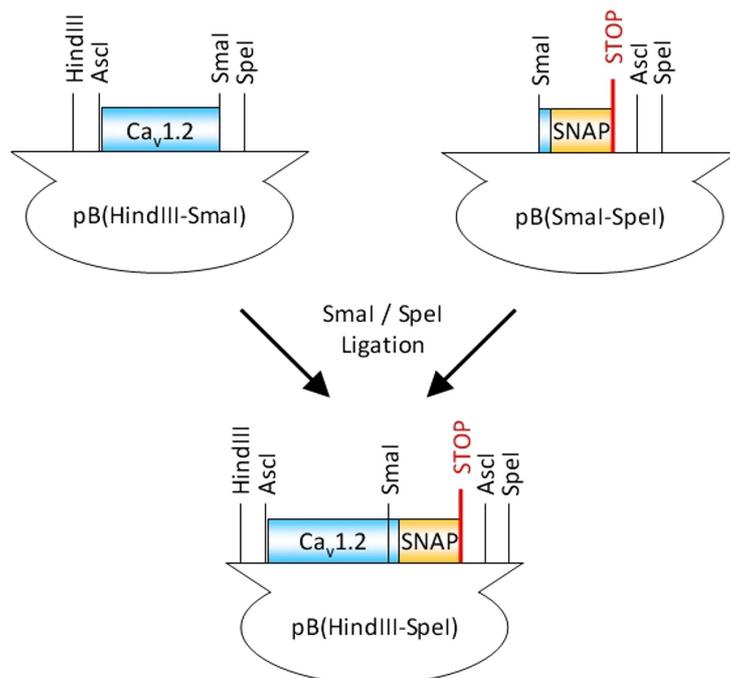


Abbildung 4-18 Herstellung des Zwischenvektor 4: pB(HindIII-SpeI). Die Zwischenvektoren 2 und 3 wurden über SmaI und SpeI ligiert.

Endligation des ROSA26(Ca_v1.2-SNAP) Gentargeting-Vektors

Das Insert aus Zwischenvektor 4 wurde über die Ascl-Schnittstellen in den CTV ligiert, wodurch der fertige ROSA26(Ca_v1.2-SNAP) Gentargeting-Vektor entstand (Abbildung 4-19). Aufgrund der Größe des Gesamtkonstruktes von etwa 23,2 kb war eine Transformation in den Bakterienstamm XL10-Gold (Stratagene) nötig, der sich besonders für die Transformation von großen Vektoren eignet.

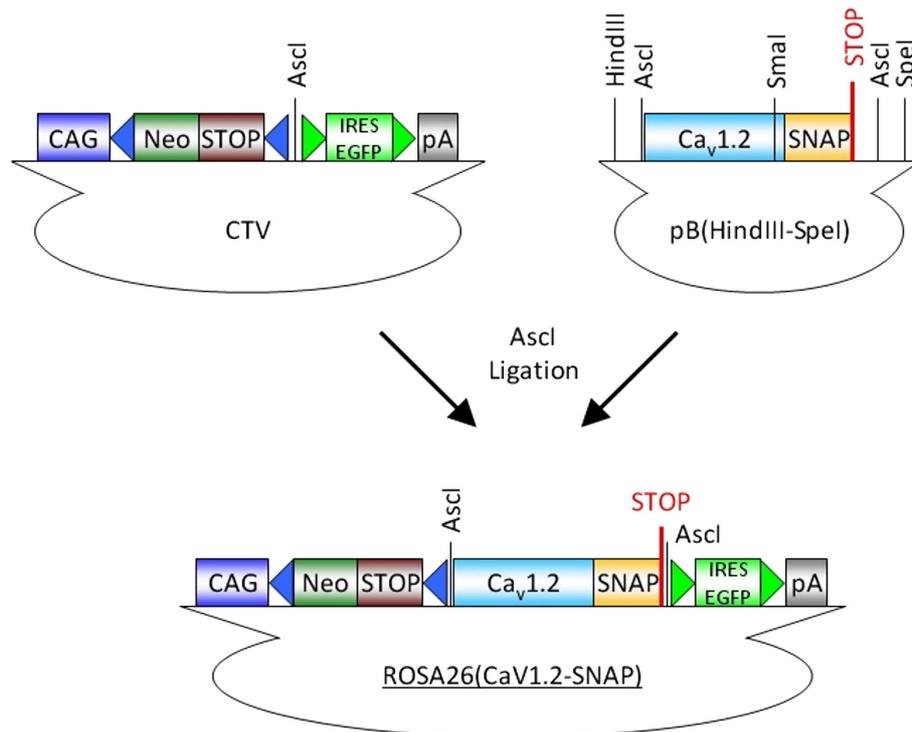


Abbildung 4-19 Endligation des ROSA26(Ca_v1.2-SNAP) Gentargeting-Vektors. Das Insert aus Zwischenvektor 4 wurde über Ascl in den CTV ligiert.

4.3.3 Überprüfung des Gentargeting-Vektors

Das Insert des Gentargeting-Vektors wurde vollständig und überlappend sequenziert, um die Richtigkeit der Sequenz sowie das Vorhandensein der Kozak-Sequenz und des Stop-Codons zu gewährleisten. Exemplarisch sind das 5'-Ende (Abbildung 4-20), der Übergang von der Ca_v1.2- zur SNAP-Tag-Sequenz (Abbildung 4-21) und das 3'-Ende (Abbildung 4-22) dargestellt.

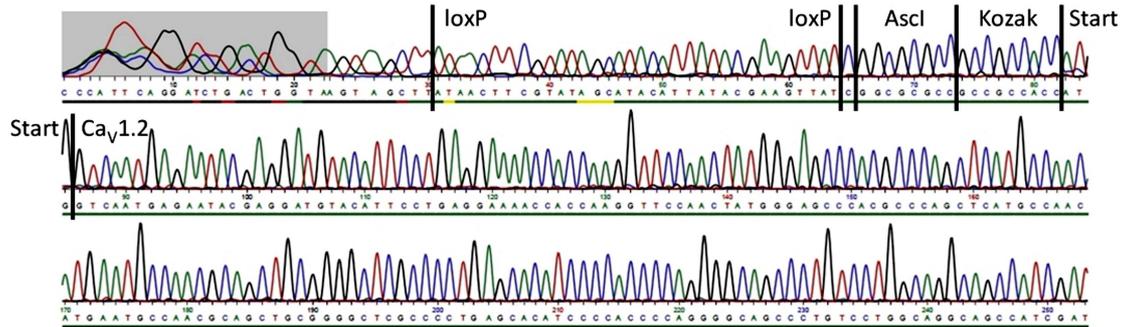


Abbildung 4-20 Sequenzierung des ROSA26(Ca_v1.2-SNAP) Gentargeting-Vektor. Das 5'-Ende des Inserts. Die 3'-gelegene loxP-Sequenz, die Ascl-Schnittstelle, über die ligiert wurde, die Kozak-Sequenz, das Start-Codon und der Beginn der Ca_v1.2-Sequenz, sind markiert.

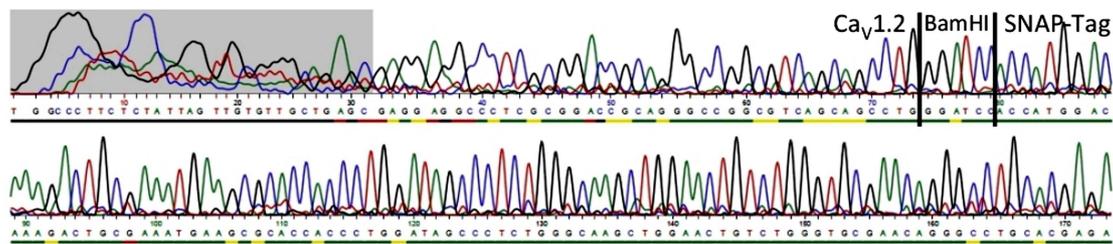


Abbildung 4-21 Sequenzierung des ROSA26(Ca_v1.2-SNAP) Gentargeting-Vektor. Der Übergang von Ca_v1.2- zu SNAP-Tag-Sequenz. Das Ende der Ca_v1.2-Sequenz, der Beginn der SNAP-Tag-Sequenz und die dazwischenliegende BamHI-Schnittstelle, sind markiert.

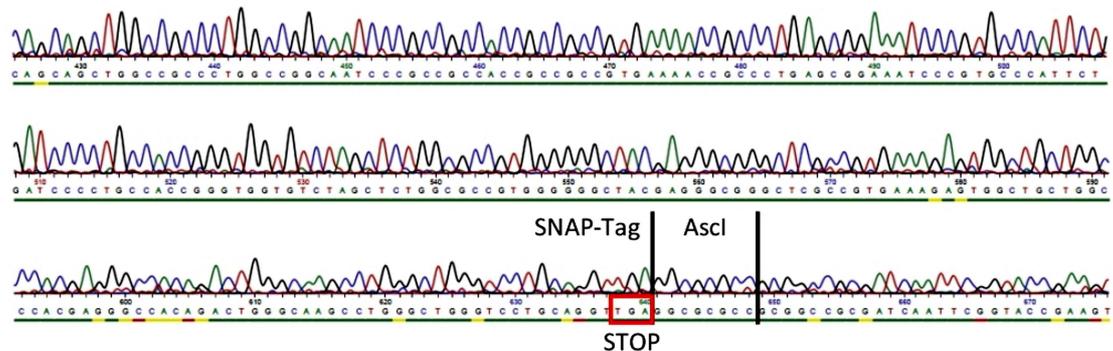


Abbildung 4-22 Sequenzierung des ROSA26(Ca_v1.2-SNAP) Gentargeting-Vektor. Das 3'-Ende des Inserts. Das Ende der SNAP-Tag-Sequenz, das Stop-Codon (roter Kasten) und die Ascl-Schnittstelle, über die ligiert wurde, sind markiert.

4.3.4 Southern Blot-Screening

Zur Herstellung einer Southern Blot-Sonde, die für ein Southern Blot-Screening verwendet werden sollte, wurde auf genomische DNA aus ES-Zellen eine PCR mit den Primern ROSA26probeFW und ROSA26probeRV durchgeführt. Das entstehende

PCR-Produkt von knapp 900 bp Länge wurde in den Vektor pcR-Blunt II-TOPO ligiert (siehe 3.2.4.4).

Durch Restriktionsverdau mit EcoRI und PacI wird ein DNA-Fragment von 693 bp erzeugt, das als Southern Blot-Sonde verwendet wird. Für den Southern Blot wird die zu analysierende genomische DNA mit EcoRI restriktionsverdaut. Die Bindung der Sonde führt am nicht-mutierten ROSA26-Lokus zur Markierung eines DNA-Fragments von 15,6 kb. Ein erfolgreich mutierter ROSA26-Lokus führt durch das Einbringen zusätzlicher EcoRI-Schnittstellen zur Markierung eines DNA-Fragments von 5,9 kb (Abbildung 4-23).

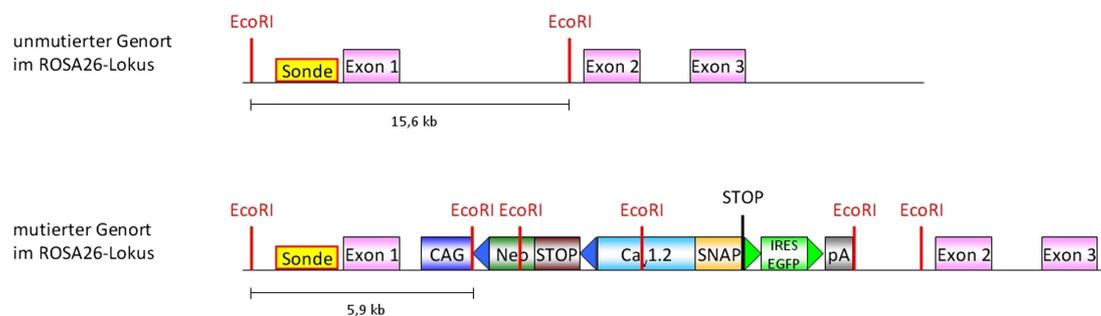


Abbildung 4-23 Strategie des ROSA26(Ca_v1.2-SNAP) Southern Blot-Screenings. Durch die Insertionen des Gentergeting-Vektors am gewünschten Genort werden zusätzliche EcoRI-Schnittstellen eingefügt und die Sonde markiert ein DNA-Fragment anderer Größe.

4.4 Analyse von Serin1928-Mutanten in Neuro2A-Zellen

Der Einfluss der Phosphorylierung an Serin1928 auf die Stabilität und die Lokalisation von Ca_v1.2 in der Zelle sollte untersucht werden. Hierfür sollten Mutanten von Ca_v1.2-SNAP erzeugt werden, die an der Phosphorylierungsstelle Serin1928 zu Alanin, Aspartat oder Glutamat verändert sind. Durch die nicht-phosphorylierbare (Alanin) beziehungsweise die phosphomimetischen (Aspartat und Glutamat) Mutationen sollten die verschiedenen Phosphorylierungszustände an Serin1928 nachgebildet werden.

Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen Mutanten beinhaltende Plasmide erzeugt (siehe 4.4.1) und mit den optimierten Transfektionsbedingungen (siehe 4.1.2) im 24-well-Format in Neuro2A-Zellen überexprimiert. Anschließend wurden die Mutanten zur Analyse im Fluoreszenzmikroskop mittels SNAP-spezifischen Farbstoffen markiert (siehe 4.4.2) und die jeweilige Proteinmenge mittels Western Blot (siehe 4.4.3) bestimmt.

4.4.1 Herstellung von Ca_v1.2-SNAP-Serin1928-Mutanten

Die Herstellung der Ca_v1.2-SNAP-Serin1928-Mutanten ging von den zwei vorhandenen Plasmiden pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP und pB-Ca_v1.2(C-Term)-SNAP aus. Letzteres ist ein pBluescript-Plasmid, in das über die EcoRV- und XbaI-Schnittstellen der 3'-Bereich des Inserts von pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP ligiert wurde. Dieses Insert umfasst die 3'-terminale, knapp 2,2 kb lange Region von Ca_v1.2, sowie den SNAP-Tag. Hieraus wurden Expressionsvektoren erzeugt, deren Translationsprodukte an der phosphorylierbaren Aminosäure Serin1928 zu Alanin, Aspartat oder Glutamat mutiert sind (Abbildung 4-24).

Hierfür wurde zunächst pB-Ca_v1.2(C-Term)-SNAP einer QuikChange Mutagenese unterzogen. Das für Serin1928 codierende Triplet TCC wurde zu GCC (Alanin), GAC (Aspartat) beziehungsweise GAG (Glutamat) mutiert. Für die Mutagenese zu GCC wurden die Primer LK1_AlaMut1 und LK1_AlaMut2 verwendet, für diejenige zu GAC LK1_AspMut1 und LK1_AspMut2 und für diejenige zu GAG LK1_GluMut1 und

LK1_GluMut2. Die erfolgreiche Mutation des Triplets und eine ansonsten mutationsfreie DNA-Sequenz wurde durch vollständige Sequenzierung des Inserts überprüft. Anschließend wurden die erzeugten Plasmide und pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP in dam-negative Bakterien (One Shot INV110, Invitrogen) transformiert. Dieser Schritt ist notwendig, da die im folgenden Schritt benötigte XbaI-Schnittstelle andernfalls durch dam-Methylierung blockiert ist. Aus den drei mutierten Plasmiden wurde über XbaI und BstEII das Insert ausgeschnitten. Aufgrund der ähnlichen Größe von Insert und übrigem Plasmid wurde letzteres zusätzlich mittels BspHI zerkleinert, damit eine Isolierung des Inserts möglich war. Die so erzeugten Inserts wurden über die XbaI- und BstEII-Schnittstellen in pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP eingefügt. Dadurch wurden die Plasmide pcDNA3-Ca_v1.2(S1928A)-SNAP, pcDNA3-Ca_v1.2(S1928D)-SNAP und pcDNA3-Ca_v1.2(S1928E)-SNAP erzeugt (Abbildung 4-24), die durch Sequenzanalysen überprüft wurden. In Abbildung 4-25 sind die jeweiligen Sequenzen am Mutationsort dargestellt.

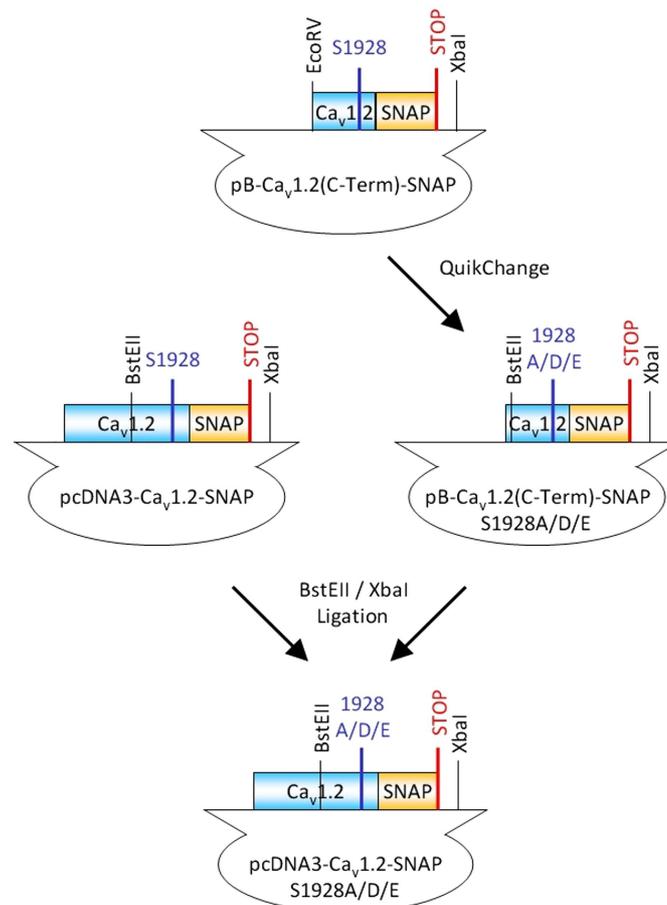


Abbildung 4-24 Klonierung der Ca_v1.2-SNAP-Serin1928-Mutanten. Das für Serin1928 codierende Basentriplett wurde durch QuikChange in pB-Ca_v1.2(C-Term)-SNAP mutiert. Anschließend wurde das Insert dieses Plasmids über die BstEII- und XbaI-Schnittstelle in pcDNA3-Ca_v1.2-SNAP ligiert.

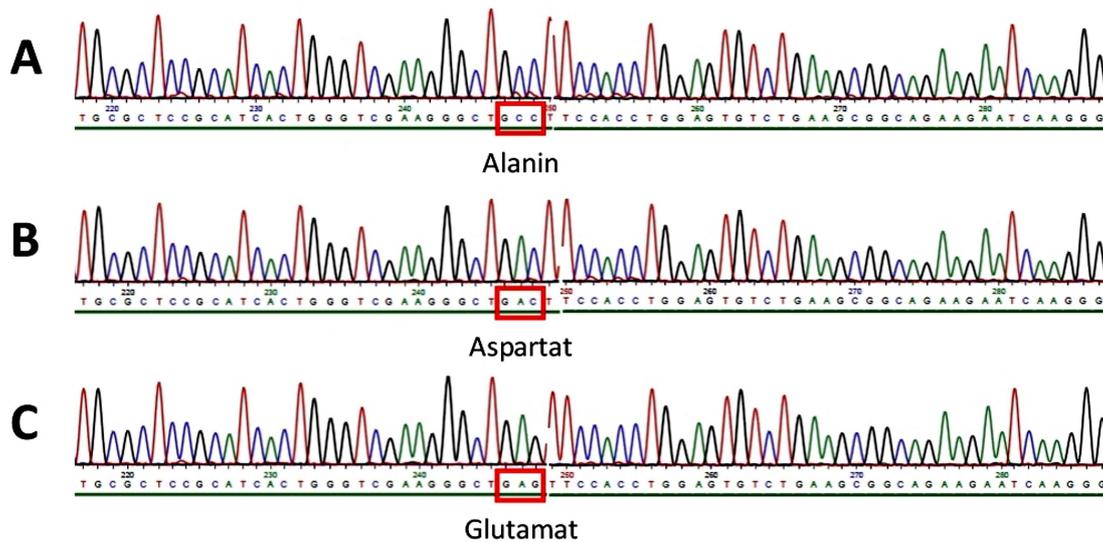


Abbildung 4-25 Sequenzierung der Ca_v1.2-SNAP-Serin1928-Mutanten. Dargestellt ist jeweils das mutierte Basentriplet und die umgebende DNA-Sequenz. A: Die Alanin-Mutante pcDNA3-Ca_v1.2(S1928A)-SNAP, B: Die Aspartat-Mutante pcDNA3-Ca_v1.2(S1928D)-SNAP, C: Die Glutamat-Mutante pcDNA3-Ca_v1.2(S1928E)-SNAP.

4.4.2 SNAP-Imaging

Die Serin1928-Mutanten von Ca_v1.2-SNAP wurden in Neuro2A-Zellen überexprimiert (siehe 4.1.2). Nach Abnehmen des Transfektionsgemisches wurden die Zellen mit jeweils einem der beiden membrangängigen SNAP-Farbstoffe SNAP-Cell 505 (New England Biolabs) oder SNAP-Cell TMR-Star (New England Biolabs) gefärbt (siehe 3.3.5.1). Anschließend erfolgte eine zusätzliche Färbung mit Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) zur Färbung der Zellkerne (siehe 3.3.5.2). Anschließend wurde die Färbung der Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert, wobei für eine geringere Störung der Analyse das Neuro2A-Wachstumsmedium durch DPBS ersetzt wurde. Repräsentative Fluoreszenzbilder für die Expression von Ca_v1.2-SNAP (WT), der Alanin-Mutante Ca_v1.2(S1928A)-SNAP (1928Ala), der Aspartat-Mutante Ca_v1.2(S1928D)-SNAP (1928Asp) und der Glutamat-Mutante Ca_v1.2(S1928E)-SNAP (1928Glu) sind in Abbildung 4-26 dargestellt.

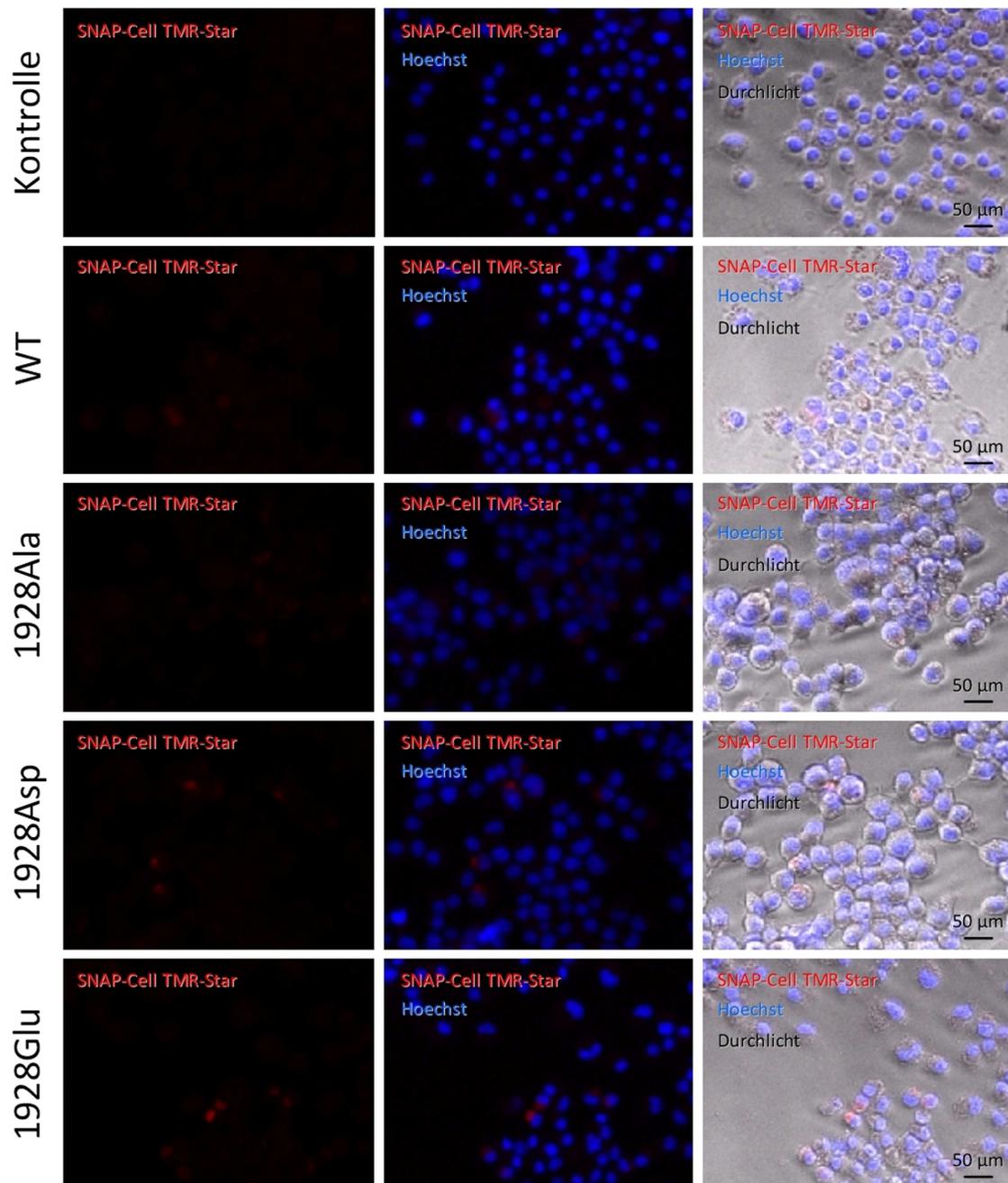


Abbildung 4-26 SNAP-Imaging der Serin1928-Mutanten. Dargestellt sind repräsentative Fluoreszenzaufnahmen von Neuro2A-Zellen, die $\text{Ca}_v1.2$ -SNAP (WT), $\text{Ca}_v1.2$ (S1928A)-SNAP (1928Ala), $\text{Ca}_v1.2$ (S1928D)-SNAP (1928Asp) oder $\text{Ca}_v1.2$ (S1928E)-SNAP (1928Glu) exprimieren. Sie wurden mit SNAP-Cell TMR Star sowie Hoechst 33342 gefärbt. Als Kontrolle wurden nicht-transfizierte Zellen verwendet, die in gleicher Weise gefärbt wurden.

Wie in Abbildung 4-26 zu sehen ist, führt die Färbung mit SNAP-Cell TMR Star zu einem schwachen, die Fluoreszenz von untransfizierten Zellen deutlich übersteigenden Fluoreszenzsignal in Neuro2A-Zellen, die mit $\text{Ca}_v1.2$ -SNAP-Konstrukten transfiziert wurden. Es ist auffallend, dass Zellen, welche die phosphomimetischen S1928D- und S1928E-Mutanten produzieren, eine deutlich

stärkere Fluoreszenz aufweisen als diejenigen Zellen, die das unmutierte $\text{Ca}_v1.2\text{-SNAP}$ oder die nicht-phosphorylierbare S1928A-Mutante produzieren. Das verstärkte Signal ist in der ganzen Zelle, unter Aussparung des Zellkerns, zu beobachten. Hierbei ist keine besondere Konzentrierung auf die Zellmembran, den physiologischen Wirkungsort von $\text{Ca}_v1.2$, zu erkennen.

4.4.3 Western Blot Analyse

Die Serin1928-Mutanten von $\text{Ca}_v1.2\text{-SNAP}$ wurden in Neuro2A-Zellen überexprimiert (siehe 4.1.2) und nach Abnehmen des Transfektionsgemisches geerntet und mittels Western Blot analysiert (Abbildung 4-27).

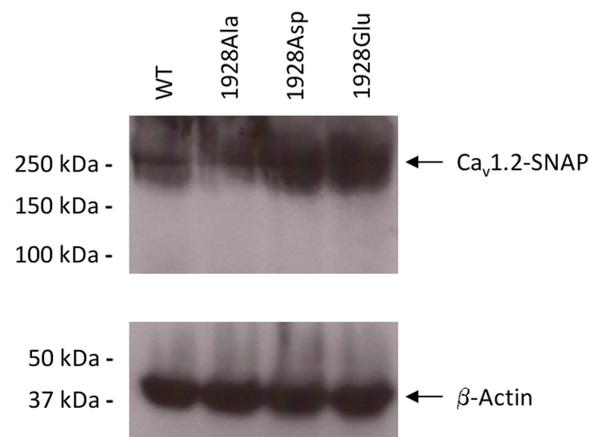


Abbildung 4-27 Western Blot Analyse der $\text{Ca}_v1.2\text{-SNAP}$ Expression für Mutanten von Serin1928. Je Spur wurde das gesamte Zell-Lysat eines Wells einer 24-Wellplatte aufgetragen. Anti-SNAP wurde als Antikörper verwendet, $\beta\text{-Actin}$ diente als Ladekontrolle. WT: $\text{Ca}_v1.2\text{-SNAP}$; 1928Ala: $\text{Ca}_v1.2(\text{S1928A})\text{-SNAP}$; 1928Asp: $\text{Ca}_v1.2(\text{S1928D})\text{-SNAP}$; 1928Glu: $\text{Ca}_v1.2(\text{S1928E})\text{-SNAP}$.

Der Vergleich der Proteinmenge der verschiedenen Serin1928-Mutanten von $\text{Ca}_v1.2\text{-SNAP}$ zeigt, dass die phosphomimetischen S1928D- und S1928E-Mutanten zu einer deutlich höheren Proteinmenge führen, als das unmutierte $\text{Ca}_v1.2\text{-SNAP}$. Umgekehrt ist die Proteinmenge der nicht-phosphorylierbaren S1928A-Mutante etwas reduziert.

5 Diskussion

Ein zentraler Mechanismus für die Regulation der Calciumkonzentration im Herzmuskel, der glatten Muskulatur, den Neuronen und endokrinen Zellen ist der spannungsabhängige Calciumkanal $Ca_v1.2$ (Hofmann et al., 1999). $Ca_v1.2$ ist auf verschiedene Weise an mehreren pathologischen Zuständen beteiligt und beispielsweise bei der Behandlung der arteriellen Hypertonie oder der stabilen Angina Pectoris ein wichtiges pharmakologisches Target (Erleben et al., 2006; Triggle, 2006; Ferreira et al., 2008; Hedley et al., 2009; Green et al., 2010). $Ca_v1.2$ nimmt seine Funktion nicht als einzelnes, isoliertes Protein wahr, sondern als Teil eines heterooligomeren Protein-Komplexes und wird wesentlich von anderen Proteinen reguliert (Shistik et al., 1995; Gao et al., 1999; Dzhura et al., 2000; Zühlke et al., 2000; Kim et al., 2004; Fang und Colecraft, 2011). Dieser Umstand lässt es vielversprechend erscheinen, dass unter den mit $Ca_v1.2$ interagierenden Proteinen neue Targets für Arzneimittel oder neue diagnostische Marker identifiziert werden könnten.

Daher sollte in dieser Arbeit eine geeignete Methode etabliert werden, um die Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) von $Ca_v1.2$ zu identifizieren. Da für $Ca_v1.2$ kein hinreichend spezifischer Antikörper zur Co-Immunopräzipitation zur Verfügung steht, wurde als Strategie die Affinitäts-Reinigung unter Zuhilfenahme eines geeigneten Tags gewählt. Verwendet wurde hierfür der SNAP-Tag.

Der SNAP-Tag eignet sich für die Zielsetzung dieser Arbeit aus mehreren Gründen. Er wird als Fusionsprotein verwendet und kann damit an die für $Ca_v1.2$ codierende DNA angehängt werden. Aufgrund seiner kleinen Größe hat er einen geringen Einfluss auf die Faltung und Funktion des Fusionspartners. Spezifische Binding Beads für die Präzipitation von SNAP-Tag-Fusionsproteinen, die das SNAP-Tag-Substrat Benzylguanin (BG) tragen, sind kommerziell verfügbar. Zudem ist die Bindung des SNAP-Tag an sein Substrat kovalent und irreversibel. Das hat den Vorteil, dass das Fusionsprotein, auch bei harschen Waschbedingungen, während der

Affinitäts-Reinigung nicht von den Binding Beads gelöst wird, dadurch gut von interagierenden Proteinen abgetrennt werden kann und damit nicht beim Nachweis von PPIs als Hintergrund stört. Darüber hinaus besitzt der SNAP-Tag auch die Möglichkeit weiterer Anwendungen, wie insbesondere der Bindung von SNAP-Tag-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen (Kindermann et al., 2003; Keppler et al., 2004; Keppler et al., 2006).

5.1 Etablierung der SNAP-Tag-abhängigen Methoden

Die wesentlichen Arbeitsschritte (siehe 4.1.3 Abbildung 4-3), die zur Isolation von mit $Ca_v1.2$ interagierenden Proteinen notwendig sind, sollten zunächst *in vitro* getestet und etabliert werden, um ihre Funktionalität nachzuweisen. Dies sollte durch die Überexpression von pcDNA3- $Ca_v1.2$ -SNAP in Zellkultur durchgeführt werden.

Zwei Zelllinien wurden hierfür ausgewählt: Die Herzmuskel-Zelllinie H9c2 aus *Rattus norvegicus* (Kimes und Brandt, 1976) und die Neuroblastom-Tumor Zelllinie Neuro2A aus *Mus musculus* (Olmsted et al., 1970). Diese Zelllinien wurden ausgewählt, da sie zwei wesentliche Gewebetypen repräsentieren, in denen $Ca_v1.2$ unter physiologischen Bedingungen vorkommt und weil sie beide $Ca_v1.2$ exprimieren (Hescheler et al., 1991; Tang et al., 2009). Aufgrund dieser beiden Umstände liegt es nahe, dass sie sich für *in vitro* Studien mit überexprimiertem $Ca_v1.2$ besser eignen als Zelllinien, die diese Voraussetzungen nicht erfüllen.

Es galt zu überprüfen, welche dieser beiden Zelllinien der Zielsetzung besser dienen würde, $Ca_v1.2$ -SNAP schnell und in ausreichender Menge zu produzieren, um hiermit die Folgeexperimente durchführen zu können. Wie sich zeigte, konnte $Ca_v1.2$ -SNAP in beiden Zelllinien produziert werden (siehe 4.1.1 und 4.1.2). Auffallend ist jedoch, dass Neuro2A-Zellen das Maximum in der Produktion bereits rund einen Tag früher erreichen als H9c2-Zellen. Daher und aufgrund der, subjektiv wahrgenommenen, einfacheren Handhabung wurden die folgenden Experimente mit Neuro2A-Zellen durchgeführt.

5.1.1 Bindung von Ca_v1.2-SNAP an SNAP-Binding-Beads

Es war zunächst wichtig zu überprüfen, ob Ca_v1.2-SNAP-Fusionsproteine mit den kommerziell verfügbaren SNAP-Binding-Beads (SBB) überhaupt effizient gefällt werden können. Dies ist insbesondere deshalb nicht selbstverständlich, da Ca_v1.2-SNAP als Membranprotein während der Reinigung unter Pufferbedingungen vorliegt, welche für die Aktivität von Proteinen, wie den SNAP-Tag, als anspruchsvoll bezeichnet werden können. Der verwendete Reinigungspuffer (TX-Puffer, siehe 3.5.2) enthält unter anderem EDTA, EGTA und Triton X-100.

Die Chelatbildner von bivalenten Kationen, EDTA und EGTA, sollten im Zusammenhang mit dem SNAP-Tag für Pufferlösungen eigentlich vermieden werden, da der SNAP-Tag für seine Funktion die Bindung eines Zink-Ions benötigt (Rasimas et al., 2003). Dennoch wurde auf EDTA und EGTA nicht verzichtet, da sie zur Inhibierung von Metalloproteasen geeignet sind, welche die Identifizierung von PPIs stören könnten. Diese Problematik betrifft vor allem die Calcium-abhängigen Proteasen Calpain I und II. Diese beiden Calpain-Isoformen kommen wie Ca_v1.2 im ZNS vor und es wurde gezeigt, dass sie *in vitro* eine Schnittstelle im C-Terminus von Ca_v1.2 besitzen (Hell et al., 1996). Da eine entsprechende Proteolyse auch den SNAP-Tag im C-Terminus von Ca_v1.2 abtrennen würde, ist es entscheidend, die Calpaine zuverlässig zu inaktivieren. Daher wurden im TX-Puffer zum einen spezifische Calpain Inhibitoren verwendet, zum anderen wurde aber auch getestet, ob EDTA und EGTA trotz ihres potentiellen Einflusses auf den SNAP-Tag genutzt werden können.

Das nicht-ionische Tensid Triton X-100 wurde im TX-Puffer verwendet, um die Zellmembranen zu solubilisieren und Ca_v1.2 in Lösung zu halten. Nach den Angaben des SNAP-Tag-Herstellers können nicht-ionische Tenside, wie Triton X-100, mit dem SNAP-Tag prinzipiell verwendet werden, jedoch muss dies nicht zwangsläufig bedeuten, dass Triton X-100 nicht störend auf die Bindung der SBB Einfluss nimmt. Zum Beispiel wäre es denkbar, dass von Triton X-100 geformte Mizellen als räumliche Barrieren wirken und damit den Zugang von SBB an den SNAP-Tag erschweren.

Um zu überprüfen, ob der SNAP-Tag als Teil eines Fusionsproteins mit Ca_v1.2 im TX-Puffer an die SBB binden kann, wurden Zell-Lysate, die überexprimiertes Ca_v1.2-SNAP enthalten, mit verschiedenen Mengen SBB inkubiert und die Lösungen anschließend mittels Western Blot auf ungebundenes Ca_v1.2-SNAP untersucht (siehe 4.1.3.1).

Dabei zeigte sich, dass Ca_v1.2-SNAP im verwendeten Puffer durch die SBB gebunden werden kann und die Menge an gebundenem SNAP-Tag mit der Menge an eingesetzten SBB ansteigt. Es fällt aber auch auf, dass selbst mit dem höchsten verwendeten Volumen von 25 µl SBB noch ungebundenes Ca_v1.2-SNAP in der Lösung verbleibt. Außerdem ist zu beobachten, dass sich die Menge an ungebundenem Ca_v1.2-SNAP zwischen den beiden höchsten eingesetzten SBB-Volumina anscheinend nicht unterscheidet.

Dies lässt vermuten, dass unter den verwendeten Bedingungen eine vom SBB-Volumen unabhängige Sättigung der Bindung und Fällung von Ca_v1.2-SNAP vorliegt. Die Gründe hierfür sind entsprechend bei Ca_v1.2-SNAP selbst zu suchen. Aufgrund der zuvor ausgeführten Problematik in Bezug auf die Verwendung von EDTA und EGTA erscheint dies die wahrscheinlichste Erklärung zu sein: Während in den meisten Ca_v1.2-SNAP-Fusionsproteinen der SNAP-Tag seine Aktivität behält, verliert möglicherweise ein kleiner Anteil durch die Chelatbildner sein Zink-Ion und hierdurch seine Aktivität. Ein anderer Grund könnte die Denaturierung des SNAP-Tag in diesem Anteil sein, auch wenn der SNAP-Tag über eine hohe Stabilität verfügt (Mollwitz et al., 2012). So könnten die harsche Solubilisierung der Membranproteine mittels Pottern (siehe 3.5.2), die lange Inkubationszeit von 16 h bei 4 °C (siehe 3.5.3) oder der Einfluss von Triton X-100 zu Strukturveränderungen führen, die sich negativ auf die Funktion des SNAP-Tag auswirken. Ein solcher Effekt und derjenige durch EDTA und EGTA könnten einander auch bedingen oder unterstützen.

Umgekehrt erscheint ein proteolytischer Abbau, der die Bindung verhindert, aufgrund des verwendeten, komplexen Protease Inhibitor Mix, EDTA und EGTA

unwahrscheinlich (siehe 3.5.2). Außerdem würde in diesem Fall das degradierte Protein wohl nicht zur im Western Blot zu sehenden Bande beitragen. Auch eine Störung der SBB-Bindung durch eine sterische Hinderung aufgrund der Größe von Ca_v1.2 ist nicht wahrscheinlich. Aufgrund der langen Inkubationszeit unter Agitation der Lösung und der enthaltenen SBB, würde ein solcher Einfluss vermutlich entweder jegliche Bindung verhindern oder nicht unabhängig von der SBB-Konzentration sein.

Es stellt sich die Frage, ob es für die Isolation von mit Ca_v1.2 interagierenden Proteinen günstiger ist, auf EDTA und EGTA zu verzichten. Einerseits könnte dadurch vermutlich mehr Ca_v1.2-SNAP präzipitiert werden und damit die Ausbeute an interagierenden Proteinen steigen. Andererseits würde man damit aber den proteolytischen Abbau eines Anteils an Ca_v1.2-SNAP und von interagierenden Proteinen riskieren. Die Verwendung von EDTA und EGTA ist damit ein Kompromiss zwischen dem Schutz der Proteine und einer Reduktion der SNAP-Tag-Aktivität. Aufgrund des geringen beobachteten Ausbeuteverlustes ist es vermutlich besser, auf diesen Anteil an Ca_v1.2-SNAP zu verzichten, als den proteolytischen Abbau von Ca_v1.2-SNAP oder der damit interagierenden Proteine zu riskieren.

Hinzu kommt die Überlegung, dass für die Isolation von mit Ca_v1.2 interagierenden Proteinen zusätzlich Formaldehyd-Cross-Linking zum Einsatz kommen soll. Dies könnte die Frage nach der Verwendung von EDTA und EGTA aus zwei Gründen hinfällig werden lassen. Zum einen könnte das Cross-Linking dazu führen, dass der SNAP-Tag in seiner Struktur stabilisiert wird und damit das enthaltene Zink-Ion vor einer Auslösung durch die Chelatbildner geschützt wird. Zum anderen ist bekannt, dass Formaldehyd-Cross-Linking auch den proteolytischen Abbau von Proteinen deutlich einschränkt (Sutherland et al., 2008). Daher ist anzunehmen, dass die positiven wie negativen Einflüsse von EDTA und EGTA durch vorheriges Cross-Linking reduziert würden.

5.1.2 SNAP-Binding-Assay

Der SNAP-Binding-Assay entstand aus der Zielsetzung heraus, eine Methode zu entwickeln, mit der die Bindung des SNAP-Tag an die SNAP-Binding-Beads (SBB) nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ nachgewiesen werden könnte. Hierfür wurden die beiden Funktionen des SNAP-Tag – die Bindung an SBB und die Bindung an SNAP-Fluoreszenzfarbstoffe – in einem Experiment, dem SNAP-Binding-Assay, kombiniert (siehe 4.1.3.2).

Zur Durchführung des SNAP-Binding-Assay wurde überexprimiertes $Ca_v1.2$ -SNAP aus Neuro2A-Zellen mit verschiedenen Mengen SBB inkubiert und ungebundenes $Ca_v1.2$ -SNAP mit dem Fluoreszenzfarbstoff SNAP-Cell 360 markiert. Anschließend wurde $Ca_v1.2$ -SNAP, welches nicht durch SBB gebunden wurde, indirekt über die Quantifizierung der Fluoreszenzfärbung nachgewiesen.

Die eingesetzten Volumina an SBB waren hier geringer gewählt als für den Nachweis mittels Western Blot (siehe 4.1.3.1), damit der Bindungserfolg unterhalb der dort gezeigten maximalen $Ca_v1.2$ -SNAP-Bindung untersucht werden konnte. Dadurch sollte die Effizienz der SBB-Bindung in einem Bereich quantifiziert werden, in dem die SBB nicht im Überschuss vorlagen.

Wie zuvor für die Analyse mittels Western Blot zeigte sich wiederum, dass mit steigendem SBB-Volumen mehr $Ca_v1.2$ -SNAP gebunden werden konnte. Es zeigte sich darüber hinaus, dass offenbar mit zunehmendem SBB-Volumen die Effizienz der SBB-Bindung absinkt. Dies ist wahrscheinlich mit der im Verlauf der SBB-Bindung stattfindenden Reduktion der Konzentration an freiem $Ca_v1.2$ -SNAP zu begründen.

Es ist festzustellen, dass der Anteil des im SNAP-Binding-Assay nicht an SBB gebundenen $Ca_v1.2$ -SNAP nicht mit dem Anteil gleichzusetzen ist, der in der Western Blot Analyse nicht gebunden wurde. Der Grund hierfür ist, dass der ungebundene Anteil dort, wie zuvor beschrieben (siehe 5.1.1), vermutlich überwiegend inaktiviertem SNAP-Tag zuzuschreiben ist. Inaktivierter SNAP-Tag

könnte jedoch mittels SNAP-Binding-Assay nicht nachgewiesen werden, da in diesem Fall keine Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes an Ca_v1.2-SNAP erfolgen würde. Auch kann es sich nicht um proteolytisch degradiertes Ca_v1.2-SNAP handeln, welches über einen aktiven SNAP-Tag verfügt, da dieses durch die Dialyse vor der Fluoreszenzmessung abgetrennt worden wäre. Daraus lässt sich umgekehrt folgern, dass die im SNAP-Binding-Assay gemessene Fluoreszenz intaktes Ca_v1.2-SNAP repräsentiert, das durch zu wenige vorhandene SBB oder zu kurze Inkubation von diesen nicht gebunden wurde.

Die vielleicht wichtigste Erkenntnis aus dem SNAP-Binding-Assay ist jedoch, dass er ein mit der Western Blot Analyse (siehe 4.1.3.1) vergleichbares Ergebnis zeigt. Die Voraussetzung hierfür ist nämlich, dass in Ca_v1.2-SNAP beide Einsatzmöglichkeiten des SNAP-Tag funktionieren. Würde der SNAP-Tag den Fluoreszenzfarbstoff binden, nicht aber die SBB, würden im folgenden Arbeitsschritt alle Proben die gleiche Menge an Ca_v1.2-SNAP beinhalten. In der Folge würden alle Proben die gleiche Menge an Fluoreszenzfarbstoff binden und damit zu in etwa gleichen Fluoreszenzintensitäten führen. Würde der SNAP-Tag die SBB binden, aber nicht den Fluoreszenzfarbstoff, würden alle Proben die Fluoreszenzintensität der untransfizierten Kontrolle, die kein Ca_v1.2-SNAP beinhaltet, aufweisen. Dies wäre auch dann der Fall, wenn beide Einsatzmöglichkeiten des SNAP-Tag nicht funktionieren würden.

5.1.3 Formaldehyd-Cross-Linking

Formaldehyd eignet sich für die Verwendung zum Cross-Linking bei der Aufklärung von Protein-Protein-Interaktionen (PPIs), da es schnell in lebende Zellen eindringt und deren Proteine durch kovalente Cross-Links verknüpft. Durch diese Cross-Links werden schwache und transiente PPIs fixiert und darüber hinaus proteolytischer Abbau eingeschränkt. Die reversible Natur dieser Cross-Links macht Formaldehyd zudem kompatibel mit anschließenden Analyseverfahren (Vasilescu et al., 2004; Vasilescu und Figeys, 2006; Sutherland et al., 2008).

Daher sollte Formaldehyd verwendet werden, um die PPIs von Ca_v1.2 zu stabilisieren. Dies ist insbesondere deshalb erforderlich, da für die Solubilisierung von Ca_v1.2 das Tensid Triton X-100 in einer Konzentration verwendet werden muss, die geeignet ist, um PPIs zu zerstören (Gingras et al., 2007).

Es galt zu überprüfen, ob die Verwendung von Formaldehyd die Bindung des SNAP-Tag an die SBB behindert. Prinzipiell ist Formaldehyd-Cross-Linking mit der Verwendung von Protein-Tags, wie dem SNAP-Tag, kompatibel. Zudem ist das reaktive Cystein 145 des SNAP-Tag keines der erstrangigen Reaktionsziele von Formaldehyd, welches primär die Seitenketten von Lysinen, Tryptophanen und die Amine der N-Termini verknüpft. Dennoch könnte eine Maskierung oder Veränderung im Reaktionszentrum des SNAP-Tag Einfluss auf die Effizienz der Bindung von SBB haben (Guerrero et al., 2006; Sutherland et al., 2008; Toews et al., 2008).

Zudem sollte überprüft werden, unter welchen Cross-Linking-Bedingungen das vielleicht „beste“ Ergebnis erzielt werden könnte. Diese Bedingungen werden typischerweise durch zwei Variablen definiert: Die Formaldehyd-Konzentration und die Inkubationszeit. Werden diese Variablen zu niedrig gewählt, ist der Effekt des Cross-Linkings gering. Werden die Variablen zu hoch gewählt, werden zwar viele Cross-Links ausgebildet und viele PPIs stabilisiert, umgekehrt führt dies aber gleichzeitig auch zur Ausbildung unlöslicher Proteinaggregate, die nicht mehr aufgelöst werden können und damit dem Nachweis entzogen werden (Sutherland et al., 2008).

Der Effekt des Cross-Linkings sollte anhand von mit Ca_v1.2 interagierenden Proteinen nachgewiesen werden. Da in Ca_v1.2-SNAP überexprimierenden Neuro2A-Zellen andere Proteine in vergleichsweise niedrigem molaren Verhältnis vorkommen, ist dies aber schwierig. Zur Lösung dieser Problematik wurde zusätzlich zu Ca_v1.2-SNAP die β₂-Untereinheit des Kanals überexprimiert. Hierdurch kommt in den Zellen ein weiteres Protein, dessen Interaktion mit Ca_v1.2 unter physiologischen Bedingungen bekannt ist, in ähnlicher Menge vor wie Ca_v1.2-SNAP.

Neuro2A-Zellen, die beide Proteine produzieren, wurden mit verschiedenen Formaldehyd-Konzentrationen inkubiert, Ca_v1.2-SNAP mittels SBB präzipitiert und co-präzipitierte β_2 -Untereinheit mittels Western Blot nachgewiesen (siehe 4.1.3.3). Die hierbei verwendeten Cross-Linking-Bedingungen wurden in einem Rahmen gewählt, der in anderen Arbeiten als geeignet identifiziert wurde (Vasilescu et al., 2004; Guerrero et al., 2006; Herzberg et al., 2007; Sutherland et al., 2008; Klockenbusch und Kast, 2010; Müller et al., 2011). Es zeigte sich, dass ab einer Formaldehyd-Konzentration von 0,6 % co-präzipitierte β_2 -Untereinheit zu beobachten ist. Bei einer Formaldehyd-Konzentration von 1,0 % war deutlich mehr β_2 -Untereinheit im Präzipitat festzustellen.

Der Nachweis der β_2 -Untereinheit im Präzipitat könnte durch drei Effekte erklärt werden: Die Co-Präzipitation mit SBB durch unspezifische Interaktion, die Co-Präzipitation durch die Interaktion mit Ca_v1.2-SNAP oder die Formierung von Aggregaten, die unabhängig von SBB abzentrifugiert und isoliert werden.

Die Co-Präzipitation der β_2 -Untereinheit mit SBB durch unspezifische Interaktion ist unwahrscheinlich, da in diesem Fall zu erwarten wäre, dass die β_2 -Untereinheit unabhängig von den verwendeten Cross-Linking-Bedingungen präzipitiert würde.

Die Bildung von unlöslichen Aggregaten der β_2 -Untereinheit ist bei steigender Zahl an Formaldehyd-Cross-Links durchaus wahrscheinlich und zu erwarten. Kleine Aggregate würden bei einer Zentrifugation von 1.100 g für 1 min jedoch nicht pelletiert werden. Hierfür wären relativ große Aggregate nötig. In diesem Fall wiederum wäre zu erwarten, dass sich diese Aggregate bei der Probenvorbereitung für die SDS-PAGE und den Western Blot nicht wieder vollständig in Lösung bringen ließen und im Western Blot zu zusätzlichen Signalen oberhalb der Monomer-Masse führen würden.

Entsprechend ist anzunehmen, dass die beobachteten Banden im Western Blot, zumindest weitestgehend, der spezifischen oder unspezifischen Bindung an Ca_v1.2-SNAP zuzuschreiben sind, welches wiederum durch Bindung an SBB

präzipitiert wurde. Die Zunahme der mit Ca_v1.2-SNAP co-präzipitierten β_2 -Untereinheit durch höhere Formaldehyd-Konzentrationen während des Cross-Linkings kann durch zwei Effekte erzeugt werden: Direkte und indirekte Interaktion mit Ca_v1.2-SNAP. Bei direkter Interaktion wurde die β_2 -Untereinheit durch Formaldehyd-Cross-Links direkt an Ca_v1.2-SNAP fixiert. Bei indirekter Interaktion wurde die β_2 -Untereinheit über andere ihrer Monomere oder sonstige Proteine und mehrere Cross-Links mit Ca_v1.2-SNAP verknüpft.

Bei der Wahl geeigneter Cross-Linking-Bedingungen für die Untersuchung der PPIs von Ca_v1.2-SNAP ist ein Kompromiss zwischen dem Verlust von spezifischen Interaktionen und der irreversiblen Aggregation von Proteinen einzugehen (Sutherland et al., 2008). Für die Identifikation der PPIs von Ca_v1.2 aus *in vivo* erzeugten Proben wäre ausgehend von den hier erzielten Ergebnissen (siehe 4.1.3.3) möglicherweise ein Cross-Linking mit 0,6 % Formaldehyd für 20 min zu wählen, da hier einerseits ein erkennbares Cross-Linking von interagierenden Proteinen stattfindet, dieses aber andererseits nicht so stark ausgeprägt ist, dass umfangreiche Verluste durch Aggregation zu befürchten wären. Eine endgültige Entscheidung hierüber könnte aber erst nach der massenspektrometrischen Analyse von entsprechend erzeugten Proteinproben getroffen werden.

5.2 Erste Schritte zur Erzeugung der CACNA1C-SNAP-Mauslinie

Primärer Ansatz war die Erzeugung einer transgenen Mauslinie (siehe 3.4), deren endogener $Ca_v1.2$ mit dem SNAP-Tag fusioniert ist. Anhand der *in vitro* etablierten Methoden zur Isolierung der mit $Ca_v1.2$ -SNAP interagierenden Proteine könnte eine solche Mauslinie dafür verwendet werden, um die PPIs von $Ca_v1.2$ *in vivo* zu analysieren.

Hierfür wurde ein zuvor in der Arbeitsgruppe erzeugter Gentergeting-Vektor verwendet, um mittels homologer Rekombination an das für $Ca_v1.2$ codierende Gen CACNA1C die für den SNAP-Tag codierende DNA anzuhängen (siehe 4.2). Mit dem Gentergeting Vektor elektroporierte embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurden mittels G418 selektioniert, wodurch nur ES-Zellklone überlebten, die das Genkonstrukt in ihr Genom inseriert hatten. Zur Analyse der ES-Zellen auf eine erfolgreiche homologe Rekombination wurde ein Screening-Verfahren etabliert und getestet. Dieses wurde auf die in insgesamt vier Gentergeting-Versuchen erzeugten 609 ES-Zellklone angewandt (siehe 4.2.3.1). Dabei zeigte sich jedoch, dass keiner der ES-Zellklone über die gewünschte homologe Rekombination verfügte.

Im Allgemeinen erwartet man, dass etwa einer unter 100 ES-Zellklonen am gewünschten Locus über eine Rekombination der DNA des Gentergeting Vektors mit der endogenen DNA verfügt (Thomas et al., 1986). Andererseits ist aber auch bekannt, dass die Rekombinationswahrscheinlichkeit vom Ziellokus im Genom abhängt und diese deutlich variieren kann (Hasty et al., 1991). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass der ausgewählte Locus um das Exon 47 des CACNA1C-Gens aus nicht näher bekannten Gründen für das Gentergeting ungünstig ist.

Dass eine erfolgreiche homologe Rekombination stattgefunden hätte und mit der verwendeten Screening-Methode nicht hätte nachgewiesen werden können, ist unwahrscheinlich. Für die Etablierung der verwendeten Screening-Methode (siehe 4.2.3.1) wurde ein Screening-Testvektor erzeugt, der anhand der selben

genomischen DNA hergestellt wurde wie der Gentergeting-Vektor. Diese genomische DNA stimmt auch mit dem entsprechenden Locus in den ES-Zellen überein. Der Screening-Testvektor simulierte eine erfolgreiche homologe Rekombination am gewünschten Locus in Gegenwart von nicht-mutierter genomischer DNA aus ES-Zellen. Die Screening-Methode wurde anhand dieses DNA-Gemisches erfolgreich verifiziert.

Bezüglich des Gentergeting Vektors sind hauptsächlich die Homologie-Arme und die Größe des einzubringenden Konstruktes für die Rekombinationswahrscheinlichkeit am Ziellokus verantwortlich. Im verwendeten Gentergeting Vektor entspricht beides den gängigen Ansprüchen, sowohl nach Erfahrungswerten innerhalb der Arbeitsgruppe als auch aus der Literatur (Hasty et al., 1991; Lemke et al., 2008; Blaich et al., 2010; Poomvanicha et al., 2011).

Nachdem vier Gentergeting-Versuche zu keiner homologen Rekombination geführt hatten, wäre eine weitere Durchführung ohne Anpassung der Strategie vermutlich wenig erfolgversprechend. Ein möglicher Ansatz, um die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination zu erhöhen, könnten Zinkfinger Nukleasen (ZFNs) oder TAL Effektor Nukleasen (TALENs) sein. Dabei handelt es sich um künstlich hergestellte Restriktionsenzyme, deren Erkennungssequenz für jede Anwendung individuell erzeugt wird und im Regelfall nur ein einziges Mal im gesamten Genom vorkommt. Die für diese Enzyme codierende RNA wird in Zellen eingebracht und translatiert. In der Zelle erzeugen sie dann in der genomischen DNA durch glatte Restriktionsschnitte Doppelstrangbrüche. Im Zuge der zellulären DNA-Reparatur wird in Gegenwart eines Gentergeting-Vektors die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination an diesem Locus deutlich erhöht. ZFNs und TALENs wurden bereits in verschiedenen Spezies verwendet, unter anderem auch in *Mus musculus*. Ein erfolgreiches Gentergeting kann aber auch bei Verwendung dieser neuen Werkzeuge nicht garantiert werden, da auch unter deren Nutzung die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination weiterhin vom Genlocus und dem Gentergeting-Vektor abhängt (Meyer et al., 2010; Hockemeyer et al., 2011; Wood et al., 2011).

5.3 ROSA26(Ca_v1.2-SNAP)-Mauslinie

Nachdem sich abgezeichnet hatte, dass das Anfügen des SNAP-Tag an das endogene CACNA1C-Gen möglicherweise nicht erfolgreich sein würde, wurde eine alternative Strategie entwickelt, um *in vivo* erzeugten Ca_v1.2 mit dem SNAP-Tag zu markieren.

Das Ziel war die Erzeugung einer transgenen Mauslinie, die durch ein konditionales Gentargeting Ca_v1.2-SNAP in Abhängigkeit von Cre-Rekombinase exprimiert (siehe 3.4.1 und 4.3). Durch Kreuzung mit Mauslinien, die Cre-Rekombinase unter gewebespezifischen Promotern exprimieren, lassen sich Mäuse erzeugen, die Ca_v1.2-SNAP nur im entsprechenden Gewebe exprimieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Gentargeting-Strategie entwickelt und der Gentargeting-Vektor für die Erzeugung dieser Mauslinie hergestellt werden.

Das Ca_v1.2-SNAP-Konstrukt für diese Strategie wurde aus demjenigen Expressionsvektor entnommen, mittels dem die SNAP-abhängigen Methoden etabliert wurden (siehe 4.1 und 5.1). Als Zielort für das konditionale Gentargeting wurde der ROSA26-Lokus gewählt, der für die ubiquitäre Expression von hier eingebrachten Genen verwendet werden kann (Kisseberth et al., 1999).

Als Ausgangspunkt für die Erzeugung eines Gentargeting-Vektors wurde der CAG-STOP-EGFP-ROSA Targeting Vector (CTV) ausgewählt, der bereits in verschiedenen Arbeiten für die Insertion von Genen in den ROSA26-Lokus verwendet wurde (Thai et al., 2007; Xiao et al., 2007). Ca_v1.2-SNAP wurde über mehrere Zwischenschritte in den CTV ligiert, wodurch der ROSA26(Ca_v1.2-SNAP) Gentargeting-Vektor erzeugt wurde. Der CTV besitzt neben geeigneten Homologie-Armen für die Insertion in den ROSA26-Lokus mehrere weitere Elemente. Für das konditionale Gentargeting ist insbesondere die STOP-Kassette von Bedeutung, welche die Expression des dahinter ligierten Ca_v1.2-SNAP verhindert. Die STOP-Kassette ist durch zwei loxP-Sequenzen flankiert, die mittels Cre-Rekombinase ausgeschnitten werden können, wodurch die Expression von Ca_v1.2-SNAP ermöglicht wird.

Mit dem erzeugten ROSA26(Ca_v1.2-SNAP) Gentergeting-Vektor wird das Gentergeting und anschließend die Selektion auf ES-Zellklone mit Rekombination des Gentergeting Vektors in das Genom durchzuführen sein. Die Analyse der ES-Zellklone auf erfolgreiche homologe Rekombination wird mittels Southern Blot-Screening unter Zuhilfenahme derjenigen Sonde durchgeführt werden, die von Thai et al. und Xiao et al. verwendet wurde. Ausgehend von einem ES-Zellklon mit korrekter homologer Rekombination würde dann die transgene ROSA26(Ca_v1.2-SNAP)-Mauslinie erzeugt werden (siehe 3.4).

Durch verschiedene Kreuzungen, würden anhand dieser transgenen Mauslinie Tiere erzeugt werden, die gewebespezifisch Ca_v1.2-SNAP exprimieren, während das endogene Ca_v1.2 ausgeschaltet wäre. Dies könnte zum Beispiel durchgeführt werden, indem die ROSA(Ca_v1.2-SNAP)-Mauslinie mit der Ca_v1.2^{L2/L2}-Mauslinie zur Homozygotie beider Allele gekreuzt wird. In der Ca_v1.2^{L2/L2}-Mauslinie sind die Exone 14 und 15 des CACNA1C-Gens mit loxP-Sequenzen flankiert. Durch Expression von Cre-Rekombinase kommt es zur Deletion dieser Exone und zur Zerstörung des endogenen Ca_v1.2 (Seisenberger et al., 2000). Damit würde eine Mauslinie entstehen, in der durch eine gewebespezifische Cre-Rekombinase im entsprechenden Gewebe das endogene Ca_v1.2 ausgeschaltet und stattdessen das im ROSA26-Lokus befindliche Ca_v1.2-SNAP exprimiert wird. Gewebespezifische Cre-Rekombinase könnte zum Beispiel durch Kreuzung mit den Mauslinien Nestin-Cre (ZNS-spezifische Expression) oder MerCreMer (Herz-spezifische Expression) vermittelt werden (Tronche et al., 1999; Sohal et al., 2001). Eine Übersicht über die mögliche Kreuzungsstrategie zur Erzeugung einer gewebespezifischen Expression von Ca_v1.2-SNAP ist in Abbildung 5-2 dargestellt.

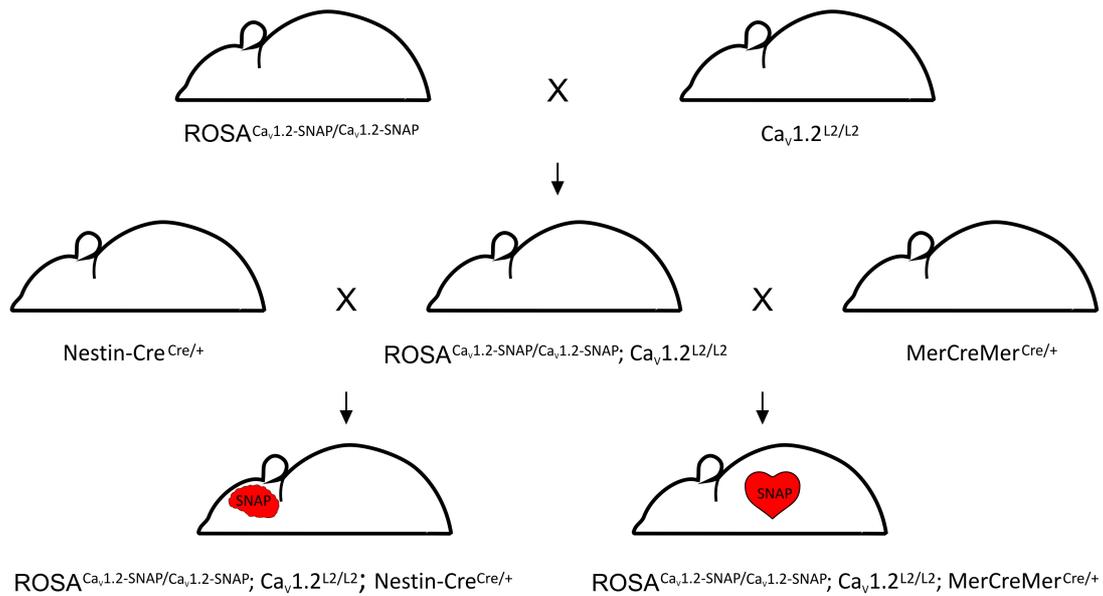


Abbildung 5-1 Kreuzungsstrategie zur ROSA26(Ca_v1.2-SNAP)-Mauslinie. Durch Kreuzung mit der Ca_v1.2^{L2/L2}-Mauslinie zur Homozygotie und anschließende Kreuzung mit der Nestin-Cre- oder MerCreMer-Mauslinie lassen sich Mauslinien erzeugen, deren endogenes Ca_v1.2 gewebespezifisch durch das im ROSA26-Lokus exprimierte Ca_v1.2-SNAP ersetzt wird.

Aus Mauslinien, die auf diese Weise erzeugt würden, würden sich anhand der zuvor etablierten Methoden zur Isolation von mit Ca_v1.2-SNAP interagierenden Proteinen (siehe 4.1 und 5.1), die PPIs von Ca_v1.2 *in vivo* untersuchen lassen.

5.4 Untersuchung von Serin1928-Mutanten

In Kardiomyozyten führt die β -adrenerge Stimulation zur Erhöhung der Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) und zu einer Erhöhung des Calcium-Einstroms durch $Ca_v1.2$ (Hulme et al., 2006). Im C-Terminus von $Ca_v1.2$ liegt Serin1928, das sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als einzige Phosphorylierungsstelle der PKA identifiziert wurde (De Jongh et al., 1996; Mitterdorfer et al., 1996; Hulme et al., 2006). In HEK-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung des cAMP-Levels zu einer Erhöhung des Calcium-Einstroms durch $Ca_v1.2$ führt und eine Mutation von Serin1928 zu Alanin diese Erhöhung eliminiert (Gao et al., 1997). In Kardiomyozyten hingegen wurde beobachtet, dass zwar der C-Terminus für die β -adrenerge Stimulation von $Ca_v1.2$ benötigt wird, Serin1928 hierauf aber scheinbar keinen Einfluss hat (Ganesan et al., 2006). Die Mutation von Serin1928 zu Alanin führte in einer transgenen Mauslinie weder zu einer Veränderung des Calcium-Einstroms durch $Ca_v1.2$ noch zu einer Veränderung der β -adrenergen Stimulation des Kanals. Auch die Expression von $Ca_v1.2$ blieb durch diese Mutation unverändert (Lemke et al., 2008). Es wurde des Weiteren gezeigt, dass Serin1928 *in vitro* auch von der Proteinkinase C phosphoryliert wird. Physiologische Konsequenzen hieraus sind aber noch nicht bekannt (Yang et al., 2009).

Da der SNAP-Tag durch die Möglichkeit der Fluoreszenzfärbung möglicherweise ein geeignetes Mittel ist, um den Umsatz und die Lokalisierung von $Ca_v1.2$ in der Zelle zu untersuchen, wurden Serin1928-Mutanten von $Ca_v1.2$ -SNAP hergestellt, die in Neuro2A-Zellen überexprimiert wurden (siehe 4.4). Die Expression dieser Mutanten wurde mittels SNAP-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen und Western Blot Analyse untersucht.

Durch die Fluoreszenzfärbung zeigte sich, dass in Zellen, welche die phosphomimetischen Mutanten (Ser1928Asp und Ser1928Glu) exprimierten, offenbar mehr $Ca_v1.2$ vorkommt als in Zellen, die das unmutierte $Ca_v1.2$ -SNAP oder die nicht-phosphorylierbare Mutante (Ser1928Ala) exprimierten. Wird von einer

fehlenden Lokalisation im Zellkern abgesehen, schien Ca_v1.2-SNAP in den Zellen, unabhängig von der exprimierten Mutante, keine Präferenz bezüglich der Lokalisation zu haben. Des Weiteren ist zu beobachten, dass nicht alle Zellen eines Ansatzes eine gleich starke SNAP-spezifische Fluoreszenzfärbung aufweisen. Der Grund hierfür ist vermutlich eine ungleiche Verteilung der Expressionsplasmide auf die Zellen während der Transfektion.

Um die Beobachtung, dass die phosphomimetischen Ca_v1.2-SNAP-Mutanten im SNAP-Imaging Experiment stärker exprimiert werden, zu verifizieren, wurde die Expression der verschiedenen Serin1928-Mutanten zusätzlich mittels Western Blot analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die phosphomimetischen Ca_v1.2-SNAP-Mutanten zu einer höheren Proteinmenge in den Zellen führen, als dies für nicht-mutiertes Ca_v1.2-SNAP der Fall ist. Umgekehrt zeigte die nicht-phosphorylierbare Ser1928Ala-Mutante eine geringfügig reduzierte Proteinmenge.

Zusammengenommen zeigen beide Experimente eine Abhängigkeit der Menge an Ca_v1.2-SNAP in den Zellen vom durch die Mutation nachgebildeten Phosphorylierungszustand. Es ist unwahrscheinlich, dass diese Beobachtung auf eine unterschiedliche Expression der jeweiligen Gene zurückzuführen ist, da sich die vier verwendeten Vektoren nur in maximal drei Basen, nämlich dem mutierten Triplet, unterscheiden und damit sowohl die gleichen Promotoren als auch Genlängen besitzen. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Mutation von Serin1928 einen Einfluss auf die Abbaurate der erzeugten Proteine besitzt. Dies wiederum gibt Grund zur Annahme, dass eine Phosphorylierung an Serin1928 die mittlere Lebensdauer von Ca_v1.2 verlängert.

Auf der anderen Seite, könnten die erhaltenen Ergebnisse aber auch dem heterologen Expressionssystem geschuldet sein. So stammt das untersuchte Ca_v1.2-Fusionsprotein aus einem anderen Organismus und Gewebe (Kaninchen-Lunge), als die verwendete Zelllinie (Maus-Nervengewebe). Auch ist es möglich, dass der beobachtete Phänotyp durch die spezifische Umgebung innerhalb der Neuro2A-Zellen verursacht wird und in anderen Zellen eine andere Beobachtung gemacht würde. Des Weiteren ist es auch denkbar, dass die unterschiedlichen

Ca_v1.2-Proteinmengen nur aufgrund der Überexpression zu beobachten sind und unter physiologischen Proteinmengen nicht auftreten würden.

Die hier gemachten Beobachtungen widersprechen Befunden aus einer Mauslinie, in der Serin1928 zu Alanin mutiert wurde. Dort sind weder im Herz noch im Hirngewebe veränderte Proteinmengen für Ca_v1.2 beobachtet worden (Lemke et al., 2008).

Diese gegensätzlichen Ergebnisse müssen einander aber nicht zwingend ausschließen. So ist es auch denkbar, dass in einem lebenden Organismus mit physiologischen Proteinmengen eine einzelne Mutation durch andere Regulationsmechanismen ausgeglichen wird. Im Gegensatz dazu könnte in einem heterologen Expressionssystem mit einem überexprimierten Gen hierfür vielleicht die Möglichkeit zur Gegenregulation fehlen, wodurch hier der Phänotyp sichtbar wird. Damit könnte es auch sein, dass der in der Zellkultur beobachtete Effekt *in vivo* nur durch kurze und vorübergehende Änderungen des Phosphorylierungszustandes, nicht aber durch eine permanente Mutation, nachweisbar würde.

Wenngleich der beobachtete Phänotyp durch die Mutation von Serin1928 aufgrund der angeführten Nachteile der Überexpression in Zellkultur nicht überbewertet werden sollte, könnte er doch einen weiteren Ansatz für die Funktionsaufklärung der Serin1928-Phosphorylierung liefern. Es werden jedoch weitere Untersuchungen notwendig sein, bevor die hier gemachten Beobachtungen richtig eingeordnet werden können. Außerdem wird zu untersuchen sein, ob die hier beobachtete veränderte Abbaurate von Ca_v1.2 mit einer unterschiedlichen Lokalisation in der Zelle einhergeht. Hierfür sollte das SNAP-Imaging Experiment mittels konfokaler Mikroskopie, die sich besser für die Untersuchung der Lokalisation eignet, wiederholt werden.

5.5 Ausblick

In dieser Arbeit wurden *in vitro* Methoden etabliert, anhand derer die mit Ca_v1.2 interagierenden Proteine unter Verwendung des SNAP-Tag für eine anschließende Analyse isoliert werden können. Diese Methoden sollen als nächstes *in vivo* angewendet werden, um die PPIs von Ca_v1.2 zu untersuchen. Hierfür wurden in dieser Arbeit die notwendigen Voraussetzungen geschaffen. Unter Verwendung des hergestellten ROSA26(Ca_v1.2-SNAP) Gentergeting-Vektors soll durch homologe Rekombination eine transgene Mauslinie erzeugt werden. Durch entsprechende Verpaarungen (siehe 5.3) sollen wiederum Mauslinien erzeugt werden, deren endogenes Ca_v1.2 gewebespezifisch durch Ca_v1.2-SNAP ersetzt wird. Mit den hier etablierten Methoden sollen dann die mit Ca_v1.2 interagierenden Proteine im jeweiligen Gewebe isoliert und anschließend durch Trypsinierung und Massenspektrometrie analysiert und identifiziert werden.

Dies kann im Anschluss dahingehend fortgesetzt werden, dass die PPIs in Abhängigkeit von physiologischen oder pathophysiologischen Zuständen sowie verabreichten Medikamenten untersucht werden.

Es könnte versucht werden, die auf diese Weise in der Maus erzeugten Erkenntnisse auf den Menschen zu übertragen. Dies könnte zum Beispiel durch die Verwendung von humanen IPS-Zellen (induzierte pluripotente Stammzellen) erfolgen, die sich durch Reprogrammierung aus somatischen Zellen erzeugen lassen. Mittels Gentergeting und homologer Rekombination könnte in IPS-Zellen an das endogene für Ca_v1.2 codierende CACNA1C-Gen der SNAP-Tag angehängt werden. Durch eine anschließende Ausdifferenzierung der IPS-Zellen in einen somatischen Zelltyp könnten dann die PPIs von Ca_v1.2 im entsprechenden Zelltyp für den individuellen Zell-Donor analysiert werden. Dies könnte insbesondere für die Untersuchung der erblichen Mutationen interessant sein, die im Zusammenhang mit einem Krankheitsbild stehen.

6 Zusammenfassung

Der spannungsabhängige Calciumkanal $Ca_v1.2$ ist an zahlreichen zellulären Vorgängen beteiligt. Seine Funktion wird durch das Zusammenspiel verschiedener Untereinheiten und weiterer Proteine beeinflusst und reguliert. $Ca_v1.2$ spielt in verschiedenen pathophysiologischen Zuständen und Krankheitsbildern eine Rolle und ist daher pharmakologisch von großer Bedeutung. Daher ist es wichtig, die zelluläre Umgebung von $Ca_v1.2$ zu verstehen und seine Interaktionspartner möglichst umfassend zu identifizieren.

Die Analyse der Protein-Protein-Interaktionen von $Ca_v1.2$ galt bislang als schwierig, da die Reinigung des Proteins in Gegenwart von Tensiden stattfinden muss und geeignete Antikörper für eine Co-Immunopräzipitation fehlen. In dieser Arbeit wurden grundlegende Vorarbeiten geleistet und Methoden etabliert, um in Zukunft Proteine, die *in vivo* mit $Ca_v1.2$ interagieren, identifizieren zu können. Hierfür wurden Fusionsproteine aus $Ca_v1.2$ und dem vielfältig anwendbaren SNAP-Tag erzeugt. Durch Überexpression dieser Fusionsproteine in einer Neuro2A-Zellkultur wurden die Bedingungen für eine Präzipitation mittels SNAP Binding Beads und eine Co-Präzipitation von Interaktionspartnern optimiert. Zudem wurden ebenfalls die optimalen Bedingungen für ein Formaldehyd-Cross-Linking zur Stabilisierung von Protein-Protein-Interaktionen ausgetestet.

Im Sinne des Fernziels, diese *in vitro* etablierten Methoden unter *in vivo*-Bedingungen in einem Mausmodell einsetzen zu können, sollte eine Gentergeting-Strategie zur Generierung einer $Ca_v1.2$ -SNAP exprimierenden Mauslinie etabliert werden. Hierfür wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt.

Der erste Ansatz sah die Fusionierung des endogenen, für $Ca_v1.2$ codierenden Gens CACNA1C mit dem SNAP-Tag vor. Hierfür wurden für die Verwendung eines CACNA1C-SNAP Gentergeting-Vektors geeignete Screening-Methoden etabliert. Da es jedoch trotz viermaligen Gentergetings in murinen embryonalen Stammzellen

nicht gelang, einen die homologe Rekombination tragenden Stammzellklon zu isolieren, wurde dieser erste Ansatz nicht weiter verfolgt.

Der Fokus lag daher im Weiteren auf einem alternativen Ansatz, der die Erzeugung einer transgenen Mauslinie zum Ziel hat, die unter konditionalen Bedingungen ein rekombinantes Ca_v1.2-SNAP exprimiert. Hierfür wurden die Voraussetzungen durch die Klonierung eines Gentargeting-Vektors geschaffen. Dieser Vektor wird es in zukünftigen Arbeiten ermöglichen, das rekombinante Ca_v1.2-SNAP in den ROSA26-Lokus von embryonalen Stammzellen einzubringen und eine entsprechende transgene Mauslinie zu generieren. In dieser Mauslinie sollen unter Verwendung der *in vitro* etablierten Methoden die Protein-Protein-Interaktionen von Ca_v1.2 *in vivo* in verschiedenen Geweben identifiziert werden.

Des Weiteren wurde die Bedeutung der Phosphorylierungsstelle Serin1928 von Ca_v1.2 für die Proteinstabilität und dessen Lokalisation untersucht. Hierfür wurden Ca_v1.2-SNAP-Mutanten erzeugt, die an zu nicht-phosphorylierbaren oder phosphomimetischen Aminosäuren mutiert waren. Durch die Expression dieser Mutanten in Neuro2A-Zellen wurde der Einfluss dieser Phosphorylierungsstelle untersucht. Hierfür wurde die Vielseitigkeit des SNAP-Tag mittels SNAP-spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe und die Western Blot Analyse angewandt. Es zeigte sich, dass unter den verwendeten Bedingungen die phosphomimetischen Mutanten zu einer erhöhten Proteinmenge gegenüber dem Wildtyp oder der nicht-phosphorylierbaren Mutante führten. Diese erhöhte Proteinmenge repräsentiert vermutlich eine langsamere Abbaurate von Ca_v1.2 durch die Phosphorylierung von Ser1928.

Die in dieser Arbeit etablierten Methoden und erzeugten Ergebnisse sollen eine Grundlage bilden, um in zukünftigen Arbeiten die *in vivo* relevanten Protein-Protein-Interaktionen von Ca_v1.2 unter verschiedenen Bedingungen aufzuklären und so ein tieferes Verständnis der Regulation von Ca_v1.2 zu erlangen.

7 Literaturverzeichnis

- Abremski, K. and Hoess, R. (1984). "Bacteriophage P1 Site-specific Recombination." *The Journal of Biological Chemistry* **259**(3): 1509-1514.
- Abremski, K., Hoess, R. and Sternberg, N. (1983). "Studies on the Properties of P1 Site-Specific Recombination: Evidence for Topologically Unlinked Products following Recombination." *Cell* **32**: 1301-1311.
- Bedner, E., Li, X., Gorczyca, W., Melamed, M. and Darzynkiewicz, Z. (1999). "Analysis of Apoptosis by Laser Scanning Cytometry." *Cytometry* **35**: 181-195.
- Berridge, M. (2003). "Cardiac calcium signalling." *Biochemical Society Transactions* **31**(5): 930-933.
- Berridge, M. (2004). "Calcium signal transduction and cellular control mechanisms." *Biochimica et Biophysica Acta* **1742**: 3-7.
- Bers, D. (2002). "Cardiac excitation–contraction coupling." *Nature* **415**: 198-205.
- Biel, M., Ruth, P., Bosse, E., Hullin, R., Stühmer, W., Flockerzi, V. and Hofmann, F. (1990). "Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung." *FEBS Letters* **269**(2): 409-412.
- Blaich, A., Welling, A., Fischer, S., Wegener, J., Köstner, K., Hofmann, F. and Moosmang, S. (2010). "Facilitation of murine cardiac L-type $\text{Ca}_v1.2$ channel is modulated by Calmodulin kinase II–dependent phosphorylation of S1512 and S1570." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**(22): 10285-10289.
- Bohn, G., Moosmang, S., Conrad, H., Ludwig, A., Hofmann, F. and Klugbauer, N. (2000). "Expression of T- and L-type calcium channel mRNA in murine sinoatrial node." *FEBS Letters* **481**: 73-76.
- Bootman, M. and Berridge, M. (1995). "The Elemental Principles of Calcium Signaling." *Cell* **83**: 675-678.
- Bousquet-Dubouch, M., Baudelet, E., Guerin, F., Matondo, M., Uttenweiler-Joseph, S., Burlet-Schiltz, O. and Monsarrat, B. (2009). "Affinity Purification Strategy to Capture Human Endogenous Proteasome Complexes Diversity and to Identify Proteasome-interacting Proteins." *Molecular & Cellular Proteomics* **8**: 1150-1164.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. and Robertson, E. (1984). "Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines." *Nature* **309**: 255-256.
- Brandmayr, J., Poomvanicha, M., Domes, K., Ding, J., Blaich, A., Wegener, J., Moosmang, S. and Hofmann, F. (2012). "Deletion of the C-terminal Phosphorylation Sites in the Cardiac β -Subunit Does Not Affect the Basic β -Adrenergic Response of the Heart and the $\text{Ca}_v1.2$ Channel." *Journal of Biological Chemistry* **287**(27): 22584-22592.
- Bünemann, M., Gerhardstein, B., Gao, T. and Hosey, M. (1999). "Functional Regulation of L-type Calcium Channels via Protein Kinase A-mediated Phosphorylation of the β_2 Subunit." *The Journal of Biological Chemistry* **274**(48): 33851-33854.
- Capecci, M. (1989). "Altering the Genome by Homologous Recombination." *Science* **244**: 1288-1292.

-
- Catterall, W. (2000). "Structure and Regulation of Voltage-Gated Ca²⁺ Channels." *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**: 521-555.
- Catterall, W., Perez-Reyes, E., Snutch, T. and Striessnig, J. (2005). "International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels." *Pharmacological Reviews* **57**(4): 411-425.
- Cheung, W. (1980). "Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation." *Science* **207**(4426): 19-27.
- Chu, G., Hayakawa, H. and Berg, P. (1987). "Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA." *Nucleic Acids Research* **15**(3): 1311-1326.
- Clapham, D. (2007). "Calcium Signaling." *Cell* **131**: 1047-1058.
- Cribbs, L., Lee, J., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M., Fox, M., Rees, M. and Perez-Reyes, E. (1998). "Cloning and Characterization of α 1H From Human Heart, a Member of the T-Type Ca²⁺ Channel Gene Family." *Circulation Research* **83**: 103-109.
- Daley, D. (2008). "The assembly of membrane proteins into complexes." *Current Opinion in Structural Biology* **18**: 420-424.
- De Jongh, K., Murphy, B., Colvin, A., Hell, J., Takahashi, M. and Catterall, W. (1996). "Specific Phosphorylation of a Site in the Full-Length Form of the α 1 Subunit of the Cardiac L-Type Calcium Channel by Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate-Dependent Protein Kinase." *Biochemistry* **35**: 10392-10402.
- De Jongh, K., Warner, C., Colvin, A. and Catterall, W. (1991). "Characterization of the two size forms of the α 1 subunit of skeletal muscle L-type calcium channels." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10778-10782.
- Doetschman, T., Gregg, R., Maeda, N., Hooper, M., Melton, D., Thompson, S. and Smithies, O. (1987). "Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells." *Nature* **330**: 576-578.
- Dolmetsch, R., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J. and Greenberg, M. (2001). "Signaling to the Nucleus by an L-type Calcium Channel-Calmodulin Complex Through the MAP Kinase Pathway." *Science* **294**: 333-339.
- Dubel, S., Starr, T., Hell, J., Ahlijanian, M., Enyeart, J., Catterall, W. and Snutch, T. (1992). "Molecular cloning of the α -1 subunit of an ω -conotoxin-sensitive calcium channel." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5058-5062.
- Dzhura, I., Wu, Y., Colbran, R., Balsler, J. and Anderson, M. (2000). "Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels." *Nature Cell Biology* **2**: 173-177.
- Einstein, A. (1905). "Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen." *Annalen der Physik* **17**: 549-560.
- Erickson, M., Liang, H., Mori, M. and Yue, D. (2003). "FRET Two-Hybrid Mapping Reveals Function and Location of L-Type Ca²⁺ Channel CaM Preassociation." *Neuron* **39**: 97-107.
- Erxleben, C., Liao, Y., Gentile, S., Chin, D., Gomez-Alegria, C., Mori, Y., Birnbaumer, L. and Armstrong, D. (2006). "Cyclosporin and Timothy syndrome increase mode 2 gating of CaV1.2 calcium channels through aberrant phosphorylation of S6 helices." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**(10): 3932-3937.

- Evans, M. and Kaufman, M. (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." *Nature* **292**: 154-156.
- Fang, K. and Colecraft, H. (2011). "Mechanism of auxiliary β -subunit-mediated membrane targeting of L-type ($\text{Ca}_v1.2$) channels." *J Physiol* **589.18**: 4437-4455.
- Ferreira, M., O'Donovan, M., Meng, Y., Jones, I., Ruderfer, D., Jones, L., Fan, J., Kirov, G., Perlis, R., Green, E., Smoller, J., Grozeva, D., Stone, J., Nikolov, I., Chambert, K., Hamshere, M., Nimgaonkar, V., Moskvina, V., Thase, M., Caesar, S., Sachs, G., Franklin, J., Gordon-Smith, K., Ardlie, K., Gabriel, S., Fraser, C., Blumenstiel, B., Defelice, M., Breen, G., Gill, M., Morris, D., Elkin, A., Muir, W., McGhee, K., Williamson, R., MacIntyre, D., MacLean, A., St Clair, D., Robinson, M., Van Beck, M., Pereira, A., Kandaswamy, R., McQuillin, A., Collier, D., Bass, N., Young, A., Lawrence, J., Ferrier, I., Anjorin, A., Farmer, A., Curtis, D., Scolnick, E., McGuffin, P., Daly, M., Corvin, A., Holmans, P., Blackwood, D., Consortium, W. T. C. C., Gurling, H., Owen, M., Purcell, S., Sklar, P. and Craddock, N. (2008). "Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder." *Nature Genetics* **40(9)**: 1056-1058.
- Frey, N., McKinsey, T. and Olson, E. (2000). "Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function." *Nature Med* **6**: 1221-1227.
- Friedrich, G. and Soriano, P. (1991). "Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice." *Genes Dev.* **5(9)**: 1513-1523.
- Ganesan, A., Maack, C., Johns, D., Sidor, A. and O'Rourke, B. (2006). " β -Adrenergic Stimulation of L-type Ca^{2+} Channels in Cardiac Myocytes Requires the Distal Carboxyl Terminus of α_{1C} but Not Serine 1928." *Circulation Research* **98**: e11-e18.
- Gao, T., Chien, A. and Hosey, M. (1999). "Complexes of the α_{1C} and β Subunits Generate the Necessary Signal for Membrane Targeting of Class C L-type Calcium Channels." *The Journal of Biological Chemistry* **274(4)**: 2137-2144.
- Gao, T., Yatani, A., Dell'Acqua, M., Sako, H., Green, S., Dascal, N., Scott, J. and Hosey, M. (1997). "cAMP-Dependent Regulation of Cardiac L-Type Ca^{2+} Channels Requires Membrane Targeting of PKA and Phosphorylation of Channel Subunits." *Neuron* **19**: 185-196.
- Gingras, A., Gstaiger, M., Raught, B. and Aebersold, R. (2007). "Analysis of protein complexes using mass spectrometry." *Molecular Cell Biology* **8**: 645-654.
- Gossler, A., Doetschman, T., Korn, R., Serfling, E. and Kemler, R. (1986). "Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 9065-9069.
- Green, E., Grozeva, D., Jones, I., Jones, L., Kirov, G., Caesar, S., Gordon-Smith, K., Fraser, C., Forty, L., Russel, E., Hamshere, M., Moskvina, V., Nikolov, I., Farmer, A., McGuffin, P., Consortium, W. T. C. C., Holmans, P., Owen, M., O'Donovan, M. and Craddock, N. (2010). "The bipolar disorder risk allele at CACNA1C also confers risk of recurrent major depression and of schizophrenia." *Molecular Psychiatry* **15**: 1016-1022.
- Grueter, C., Abiria, S., Dzhura, I., Wu, Y., Ham, A., Mohler, P., Anderson, M. and Colbran, R. (2006). "L-Type Ca^{2+} Channel Facilitation Mediated by Phosphorylation of the β Subunit by CaMKII." *Molecular Cell* **23**: 641-650.
- Guerrero, C., Tagwerker, C., Kaiser, P. and Huang, L. (2006). "An Integrated Mass Spectrometry-based Proteomic Approach: Quantitative Analysis of Tandem Affinity-Purified *In Vivo* Cross-Linked Protein Complexes (QTAX) to decipher the 26 S Proteasome-Interacting Network." *Molecular & Cellular Proteomics* **5.2**: 366-378.

- Gurnett, C., De Waard, M. and Campbell, K. (1996). "Dual function of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha 2 delta subunit in current stimulation and subunit interaction." *Neuron* **16**(2): 431-440.
- Gurnett, C., Felix, R. and Campbell, K. (1997). "Extracellular Interaction of the Voltage-dependent Ca²⁺ Channel $\alpha_2\delta$ and α_1 Subunits." *The Journal of Biological Chemistry* **272**(29): 18508-18512.
- Gurney, A., Charnet, P., Pye, J. and Nargeot, J. (1989). "Augmentation of cardiac calcium current by flash photolysis of intracellular caged-Ca²⁺ molecules." *Nature* **341**: 65-68.
- Hall, D., Feekes, J., Don, A., Shi, M., Hamid, J., Chen, L., Strack, S., Zamponi, G., Horne, M. and Hell, J. (2006). "Binding of Protein Phosphatase 2A to the L-Type Calcium Channel Ca_v1.2 next to Ser1928, Its Main PKA Site, Is Critical for Ser1928 Dephosphorylation." *Biochemistry* **45**: 3448-3459.
- Hall, D. and Struhl, K. (2002). "The VP16 Activation Domain Interacts with Multiple Transcriptional Components as Determined by Protein-Protein Cross-linking in Vivo." *The Journal of Biological Chemistry* **277**(48): 46043-46050.
- Hamilton, D. and Abremski, K. (1984). "Site-specific Recombination by the Bacteriophage P1 lox-Cre system." *J. Mol. Biol.* **178**: 481-486.
- Hasty, P., Rivera-Perez, J. and Bradley, A. (1991). "The Length of Homology Required for Gene Targeting in Embryonic Stem Cells." *Molecular and Cellular Biology* **11**(11): 5586-5591.
- Hedley, P., Jorgensen, P., Schlamowitz, S., Moolman-Smook, J., Kanters, J., Corfield, V. and Christiansen, M. (2009). "The Genetic Basis of Brugada Syndrome: A Mutation Update." *Human Mutation* **30**: 1256-1266.
- Hell, J., Westenbroek, R., Breeze, L., Wang, K., Chavkin, C. and Catterall, W. (1996). "N-Methyl-D-aspartate receptor-induced proteolytic conversion of postsynaptic class C L-type calcium channels in hippocampal neurons." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 3362-3367.
- Hell, J., Westenbroek, R., Warner, C., Ahlijanian, M., Prystay, W., Gilbert, M., Snutch, T. and Catterall, W. (1993). "Identification and Differential Subcellular Localization of the Neuronal Class C and Class D L-Type Calcium Channel α_1 Subunits." *The Journal of Cell Biology* **123**(4): 949-962.
- Herzberg, C., Weidinger, L., Dörrbecker, B., Hübner, S., Stülke, J. and Commichau, F. (2007). "SPINE: A method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions *in vivo*." *Proteomics* **7**: 4032-4035.
- Hescheler, J., Meyer, R., Plant, S., Krautwurst, D., Rosenthal, W. and Schultz, G. (1991). "Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart." *Circulation Research* **69**(6): 1476-1486.
- Hockemeyer, D., Wang, H., Kiani, S., Lai, C., Gao, Q., Cassady, J., Cost, G., Zhang, L., Santiago, Y., Miller, J., Zeitler, B., Cheron, J., Meng, X., Hinkley, S., Rebar, E., Gregory, P., Urnov, F. and Jaenisch, R. (2011). "Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases." *Nature Biotechnology* **29**(8): 731-734.
- Hoess, R. and Abremski, K. (1984). "Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 1026-1029.
- Hofmann, F., Lacinová, L. and Klugbauer, N. (1999). "Voltage-Dependent Calcium Channels: From Structure to Function." *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **139**: 33-87.

- Hulme, J., Westenbroek, R., Scheuer, T. and Catterall, W. (2006). "Phosphorylation of serine 1928 in the distal C-terminal domain of cardiac $\text{Ca}_v1.2$ channels during $\beta 1$ -adrenergic regulation." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**(44): 16574-16579.
- Jing, X., Li, D., Olofsson, C., Salehi, A., Surve, V., Caballero, J., Ivarsson, R., Lundquist, I., Pereverzev, A., Schneider, T., Rorsman, P. and Renström, E. (2005). " $\text{Ca}_v2.3$ calcium channels control second-phase insulin release." *The Journal of Clinical Investigation* **115**(1): 146-154.
- Juillerat, A., Gronemeyer, T., Keppler, A., Gendreizig, S., Pick, H., Vogel, H. and Johnsson, K. (2003). "Directed Evolution of O^6 -Alkylguanine-DNA Alkyltransferase for Efficient Labeling of Fusion Proteins with Small Molecules In Vivo." *Chemistry & Biology* **10**: 313-317.
- Keppler, A., Arrivoli, C., Sironi, L. and Ellenberg, J. (2006). "Fluorophores for live cell imaging of AGT fusion proteins across the visible spectrum." *BioTechniques* **41**(2): 1-7.
- Keppler, A., Gendreizig, S., Gronemeyer, T., Pick, H., Vogel, H. and Johnsson, K. (2003). "A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules *in vivo*." *Nature Biotechnology* **21**: 86-89.
- Keppler, A., Kindermann, M., Gendreizig, S., Pick, H., Vogel, H. and Johnsson, K. (2004). "Labeling of fusion proteins of O^6 -alkylguanine-DNA alkyltransferase with small molecules in vivo and in vitro." *Methods* **32**: 437-444.
- Keppler, A., Pick, H., Arrivoli, C., Vogel, H. and Johnsson, K. (2004). "Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**(27): 9955-9959.
- Kim, J., Ghosh, S., Nunziato, D. and Pitt, G. (2004). "Identification of the Components Controlling Inactivation of Voltage-Gated Ca^{2+} Channels." *Neuron* **41**: 745-754.
- Kimes, B. and Brandt, B. (1976). "Properties of a Clonal Muscle Cell Line from Rat Heart." *Experimental Cell Research* **98**: 367-381.
- Kindermann, M., George, N., Johnsson, N. and Johnsson, K. (2003). "Covalent and Selective Immobilization of Fusion Proteins." *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 7810-7811.
- Kisseberth, W., Brettingen, N., Lohse, J. and Sandgren, E. (1999). "Ubiquitous expression of marker transgenes in mice and rats." *Dev Biol.* **214**(1): 128-138.
- Klockenbusch, C. and Kast, J. (2010). "Optimization of Formaldehyde Cross-Linking for Protein Interaction Analysis of Non-Tagged Integrin $\beta 1$." *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2010**: 927585.
- Kollmar, R., Fak, J., Montgomery, L. and Hudspeth, A. (1997). "Hair cell-specific splicing of mRNA for the α_{1D} subunit of voltage-gated Ca^{2+} channels in the chicken's cochlea." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 14889-14893.
- Lai, Y., Nairn, A. and Greengard, P. (1986). "Autophosphorylation reversibly regulates the Ca^{2+} /calmodulin-dependence of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 4253-4257.
- Lee, J., Daud, A., Cribbs, L., Lacerda, A., Pereverzev, A., Klöckner, U., Schneider, T. and Perez-Reyes, E. (1999). "Cloning and Expression of a Novel Member of the Low Voltage-Activated T-Type Calcium Channel Family." *The Journal of Neuroscience* **19**(6): 1912-1921.

- Lee, T., Karl, R., Moosmang, S., Lenhardt, P., Klugbauer, N., Hofmann, F., Kleppisch, T. and Welling, A. (2006). "Calmodulin Kinase II Is Involved in Voltage-dependent Facilitation of the L-type $\text{Ca}_v1.2$ Calcium Channel." *The Journal of Biological Chemistry* **281**(35): 25560-25567.
- Lemke, T., Welling, A., Christel, C., Blaich, A., Bernhard, D., Lenhardt, P., Hofmann, F. and Moosmang, S. (2008). "Unchanged β -Adrenergic Stimulation of Cardiac L-type Calcium Channels in $\text{Ca}_v1.2$ Phosphorylation Site S1928A Mutant Mice." *The Journal of Biological Chemistry* **283**(50): 34738-34744.
- Lichty, J., Malecki, J., Agnew, H., Michelson-Horowitz, D. and Tan, S. (2005). "Comparison of affinity tags for protein purification." *Protein Expression and Purification* **41**: 98-105.
- Maier, L. and Bers, D. (2002). "Calcium, Calmodulin, and Calcium-Calmodulin Kinase II: Heartbeat to Heartbeat and Beyond." *J Mol Cell Cardiol* **34**: 919-939.
- Markham, K., Bai, Y. and Schmitt-Ulms, G. (2007). "Co-immunoprecipitations revisited: an update on experimental concepts and their implementation for sensitive interactome investigations of endogenous proteins." *Anal Bioanal Chem* **389**: 461-473.
- Marrion, N. and Tavalin, S. (1998). "Selective activation of Ca^{2+} -activated K^+ channels by co-localized Ca^{2+} channels in hippocampal neurons." *Nature* **395**(6705): 900-905.
- Martin, G. (1981). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**(12): 7634-7638.
- McRory, J., Hamid, J., Doering, C., Garcia, E., Parker, R., Hamming, K., Chen, L., Hildebrand, M., Beedle, A., Feldcamp, L., Zamponi, G. and Snutch, T. (2004). "The CACNA1F Gene Encodes an L-Type Calcium Channel with Unique Biophysical Properties and Tissue Distribution." *The Journal of Neuroscience* **24**(7): 1707-1718.
- Melzer, W., Andronache, Z. and Ursu, D. (2006). "Functional roles of the gamma subunit of the skeletal muscle DHP-receptor." *J Muscle Res Cell Motil* **27**(5-7): 307-314.
- Meyer, M., de Angelis, M., Wurst, W. and Kühn, R. (2010). "Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**(34): 15022-15026.
- Meyer, T., Hanson, P., Stryer, L. and Schulman, H. (1992). "Calmodulin Trapping by Calcium-Calmodulin-Dependent Protein Kinase." *Science* **256**: 1199-1202.
- Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiya, S. and Numa, S. (1989). "Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel." *Nature* **340**(6230): 230-233.
- Miller, S. and Kennedy, M. (1986). "Regulation of brain type II Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: a Ca^{2+} -triggered molecular switch." *Cell* **44**(6): 861-870.
- Mitterdorfer, J., Froschmayr, M., Grabner, M., Moebius, F., Glossmann, H. and Striessnig, J. (1996). "Identification of PK-A phosphorylation sites in the carboxyl terminus of L-type calcium channel alpha 1 subunits." *Biochemistry* **35**(29): 9400-9406.
- Mollwitz, B., Brunk, E., Schmitt, S., Pojer, F., Bannwarth, M., Schiltz, M., Rothlisberger, U. and Johnsson, K. (2012). "Directed evolution of the suicide protein O^6 -alkylguanine-DNA alkyltransferase for increased reactivity results in an alkylated protein with exceptional stability." *Biochemistry* **51**(5): 986-994.

- Moosmang, S., Schulla, V., Welling, A., Feil, R., Feil, S., Wegener, J., Hofmann, F. and Klugbauer, N. (2003). "Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel $Ca_v1.2$ for blood pressure regulation." *The EMBO Journal* **22**(22): 6027-6034.
- Mori, Y., Friedrich, T., Kim, M., Mikami, A., Nakai, J., Ruth, P., Bosse, E., Hofmann, F., Flockerzi, V., Furuichi, T. and al., e. (1991). "Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel." *Nature* **350**(6317): 398-402.
- Müller, V., Jungblut, P., Meyer, T. and Hunke, S. (2011). "Membrane-SPINE: An improved method to identify protein-protein interaction partners of membrane proteins in vivo." *Proteomics* **11**: 2124-2128.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. and Roder, J. (1993). "Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8424-8428.
- Naraghi, M. and Neher, E. (1997). "Linearized Buffered Ca^{2+} Diffusion in Microdomains and Its Implications for Calculation of $[Ca^{2+}]$ at the Mouth of a Calcium Channel." *The Journal of Neuroscience* **17**(18): 6961-6973.
- Niidome, T., Kim, M., Friedrich, T. and Mori, Y. (1992). "Molecular cloning and characterization of a novel calcium channel from rabbit brain." *FEBS Letters* **308**(1): 7-13.
- Nowycky, M., Fox, A. and Tsien, R. (1985). "Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity." *Nature* **316**(6027): 440-443.
- Oberdoerffer, P., Otipoby, K., Maruyama, M. and Rajewsky, K. (2003). "Unidirectional Cre-mediated genetic inversion in mice using the mutant loxP pair lox66/lox71." *Nucleic Acids Research* **31**(22): e140.
- Olmsted, J., Carlson, K., Klebe, R., Ruddle, F. and Rosenbaum, J. (1970). "Isolation of Microtubule Protein from Cultured Mouse Neuroblastoma Cells." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **65**(1): 129-136.
- Perez-Reyes, E. (1998). "Molecular characterization of a novel family of low voltage-activated, T-type, calcium channels." *J Bioenerg Biomembr.* **30**(4): 313-318.
- Peterson, B., DeMaria, C. and Yue, D. (1999). "Calmodulin Is the Ca^{2+} Sensor for Ca^{2+} -Dependent Inactivation of L-Type Calcium Channels." *Neuron* **22**: 549-558.
- Poomvanicha, M., Wegener, J., Blaich, A., Fischer, S., Domes, K., Moosmang, S. and Hofmann, F. (2011). "Facilitation and Ca^{2+} -dependent Inactivation Are Modified by Mutation of the $Ca_v1.2$ Channel IQ Motif." *The Journal of Biological Chemistry* **286**(30): 26702-26707.
- Rajewsky, K., Gu, H., Kühn, R., Betz, U., Müller, W., Roes, J. and Schwenk, F. (1996). "Conditional Gene Targeting." *J. Clin. Invest.* **98**(3): 600-603.
- Rasimas, J., Kanugula, S., Dalessio, P., Ropson, I., Fried, M. and Pegg, A. (2003). "Effects of zinc occupancy on human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase." *Biochemistry* **42**(4): 980-990.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. and Séraphin, B. (1999). "A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration." *Nature Biotechnology* **17**: 1030-1032.
- Ringer, S. (1882). "A Further Contribution Regarding the Influence of the Different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart." *J Physiol* **4**: 29-39.

- Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M. and Evans, M. (1986). "Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector." *Nature* **323**: 445-448.
- Schlake, T. and Bode, J. (1994). "Use of mutated FLP recognition target (FRT) sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci." *Biochemistry* **33**(43): 12746-12751.
- Schworer, C., Colbran, R. and Soderling, T. (1986). "Reversible Generation of a Ca²⁺-independent Form of Ca²⁺(calmodulin)-dependent Protein Kinase II by an Autophosphorylation Mechanism." *The Journal of Biological Chemistry* **261**(19): 8581-8584.
- Seino, S., Chen, L., Seino, M., Blondel, O., Takeda, J., Johnson, J. and Bell, G. (1992). "Cloning of the α_1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic β cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 584-588.
- Seisenberger, C., Specht, V., Welling, A., Platzner, J., Pfeifer, A., Kühbandner, S., Striessnig, J., Klugbauer, N., Feil, R. and Hofmann, F. (2000). "Functional Embryonic Cardiomyocytes after Disruption of the L-type α_{1C} (Ca_v1.2) Calcium Channel Gene in the Mouse." *The Journal of Biological Chemistry* **275**(50): 39193-39199.
- Shistik, E., Ivanina, T., Puri, T., Hosey, M. and Dascal, N. (1995). "Ca²⁺ current enhancement by α_2/δ and β subunits in *Xenopus* oocytes: contribution of changes in channel gating and α_1 protein level." *Journal of Physiology* **489**.1: 55-62.
- Smart, S., Mackintosh, S., Edmondson, R., Taverna, S. and Tackett, A. (2009). "Mapping the local protein interactome of the NuA3 histone acetyltransferase." *Protein Science* **18**: 1987-1997.
- Smith, D. (1993). "Random primed labeling of DNA." *Methods Mol Biol* **18**: 445-447.
- Snutch, T., Tomlinson, W., Leonard, J. and Gilbert, M. (1991). "Distinct calcium channels are generated by alternative splicing and are differentially expressed in the mammalian CNS." *Neuron* **7**(1): 45-57.
- Sohal, D., Nghiem, M., Crackower, M., Witt, S., Kimball, T., Tymitz, K., Penninger, J. and Molkentin, J. (2001). "Temporally Regulated and Tissue-Specific Gene Manipulations in the Adult and Embryonic Heart Using a Tamoxifen-Inducible Cre Protein." *Circulation Research* **89**: 20-25.
- Soldatov, N. (1994). "Genomic Structure of Human L-Type Ca²⁺ Channel." *Genomics* **22**: 77-87.
- Soriano, P. (1999). "Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain." *Nature Genetics* **21**(1): 70-71.
- Southern, E. (1975). "Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis." *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Strom, T., Nyakatura, G., Apfelstedt-Sylla, E., Hellebrand H, Lorenz, B., Weber, B., Wutz, K., Gutwillinger, N., Rütger, K., Drescher, B., Sauer, C., Zrenner, E., Meitinger, T., Rosenthal, A. and Meindl, A. (1998). "An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness." *Nature Genetics* **19**: 260-263.
- Sutherland, B., Toews, J. and Kast, J. (2008). "Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein–protein interactions." *Journal of Mass Spectrometry* **43**: 699-715.
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T. and Numa, S. (1987). "Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle." *Nature* **328**: 313-318.

- Tang, Z., Zheng, S., Nikolic, J. and Black, D. (2009). "Developmental Control of CaV1.2 L-Type Calcium Channel Splicing by Fox Proteins." *Molecular and Cellular Biology* **29**(17): 4757-4765.
- Terpe, K. (2003). "Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems." *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 523-533.
- Thai, T., Calado, D., Casola, S., Ansel, K., Xiao, C., Xue, Y., Murphy, A., Friendewey, D., Valenzuela, D., Kutok, J., Schmidt-Supprian, M., Rajewsky, N., Yancopoulos, G., Rao, A. and Rajewsky, K. (2007). "Regulation of the Germinal Center Response by MicroRNA-155." *Science* **316**: 604-608.
- Thomas, K. and Capecchi, M. (1987). "Site-Directed Mutagenesis by Gene Targeting in Mouse Embryo-Derived Stem Cells." *Cell* **51**: 503-512.
- Thomas, K., Folger, K. and Capecchi, M. (1986). "High Frequency Targeting of Genes to Specific Sites in the Mammalian Genome." *Cell* **44**: 419-428.
- Toews, J., Rogalski, J., Clark, T. and Kast, J. (2008). "Mass spectrometric identification of formaldehyde-induced peptide modifications under *in vivo* protein cross-linking conditions." *Analytica Chimica Acta* **618**: 168-183.
- Triggle, D. (2006). "L-type calcium channels." *Curr Pharm Des.* **12**(4): 443-457.
- Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P., Bock, R., Klein, R. and Schütz, G. (1999). "Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety." *Nature Genetics* **23**(1): 99-103.
- Tsien, R. (1998). "The Green Fluorescent Protein." *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 509-544.
- van Petegem, F., Chatelain, F. and Minor, D. (2005). "Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the Ca_v1.2 IQ domain–Ca²⁺/calmodulin complex." *Nat Struct Mol Biol.* **12**(12): 1108-1115.
- van Petegem, F. and Minor, D. (2006). "The structural biology of voltage-gated calcium channel function and regulation." *Biochem Soc Trans* **34**(Pt 5): 887-893.
- Vasilescu, J. and Figeys, D. (2006). "Mapping protein–protein interactions by mass spectrometry." *Current Opinion in Biotechnology* **17**: 394-399.
- Vasilescu, J., Guo, X. and Kast, J. (2004). "Identification of protein-protein interactions using *in vivo* cross-linking and mass spectrometry." *Proteomics* **4**: 3845-3854.
- Wessel, D. and Flügge, U. (1984). "A Method for the Quantitative Recovery of Protein in Dilute Solution in the Presence of Detergents and Lipids." *Analytical Biochemistry* **138**: 141-143.
- Williams, M., Feldman, D., McCue, A., Brenner, R., Velicelebi, G., Ellis, S. and Harpold, M. (1992). "Structure and Functional Expression of α_1 , α_2 , and β Subunits of a Novel Human Neuronal Calcium Channel Subtype." *Neuron* **8**: 71-84.
- Wood, A., Lo, T., Zeitler, B., Pickle, C., Ralston, E., Lee, A., Amora, R., Miller, J., Leung, E., Meng, X., Zhang, L., Rebar, E., Gregory, P., Urnov, F. and Meyer, B. (2011). "Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs." *Science* **333**(6040): 307.
- Xiao, C., Calado, D., Galler, G., Thai, T., Patterson, H., Wang, J., Rajewsky, N., Bender, T. and Rajewsky, K. (2007). "MiR-150 Controls B Cell Differentiation by Targeting the Transcription Factor c-Myb." *Cell* **131**: 146-159.

-
- Yaari, Y., Hamon, B. and Lux, H. (1987). "Development of Two Types of Calcium Channels in Cultured Mammalian Hippocampal Neurons." *Science* **235**: 680-682.
- Yang, L., Doshi, D., Morrow, J., Katchman, A., Chen, X. and Marx, S. (2009). "Protein kinase C isoforms differentially phosphorylate Ca(v)1.2 alpha(1c)." *Biochemistry* **48**(28): 6674-6683.
- Zambrowicz, B., Imamoto, A., Fiering, S., Herzenberg, L., Kerr, W. and Soriano, P. (1997). "Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**(8): 3789-3794.
- Zhu, X. and Sadowski, P. (1995). "Cleavage-dependent ligation by the FLP recombinase. Characterization of a mutant FLP protein with an alteration in a catalytic amino acid." *J Biol Chem.* **270**(39): 23044-23054.
- Zühlke, R., Pitt, G., Deisseroth, K., Tsien, R. and Reuter, H. (1999). "Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels." *Nature* **399**(6732): 159-162.
- Zühlke, R., Pitt, G., Tsien, R. and Reuter, H. (2000). "Ca²⁺-sensitive Inactivation and Facilitation of L-type Ca²⁺ Channels Both Depend on Specific Amino Acid Residues in a Consensus Calmodulin-binding Motif in the α_{1c} subunit." *The Journal of Biological Chemistry* **275**(28): 21121-21129.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz besonders bei Prof. Dr. Karl-Ludwig Laugwitz und Prof. Dr. Johannes Buchner für alles entgegengebrachte Vertrauen bedanken und dafür, dass sie es mir ermöglicht haben, meine Promotion zu Ende zu führen.

Prof. Dr. Karl-Ludwig Laugwitz möchte ich außerdem ganz besonders dafür danken, dass er mich in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen und mir häufig mit seinem Rat geholfen hat.

Prof. Dr. Sven Moosmang möchte ich danken für die Übertragung der Aufgabenstellung und die Einführung in die Thematik der Calciumkanäle. Auch möchte ich ihm für die zahlreichen Tipps im Verlauf der Arbeit danken.

Ganz herzlich danken möchte ich Dr. Alessandra Moretti für alle ihre Ratschläge und Anregungen, insbesondere im Hinblick auf die Zellkultur, aber auch für ihre aufbauende Art, wenn die Experimente mal nicht so gut liefen.

Ebenfalls danken möchte ich Prof. Dr. Aymelt Itzen für seine Bereitschaft, den Prüfungsvorsitz für diese Promotionsarbeit zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gebührt auch Dr. Daniel Sinnecker für die kompetente und gründliche Durchsicht dieser Dissertation trotz der knappen Zeit.

Der ganzen AG Laugwitz und ganz besonders Tatjana und Elvira möchte ich für alle Unterstützung danken, auch dafür, dass es immer wieder mal etwas zu lachen gab.

Außerdem möchte ich den ehemaligen Kollegen am Biederstein für die kurzweilige Zeit danken, die es manchmal auch etwas später hat werden lassen. Besonders danken möchte ich Katrin dafür, dass sie auf meine Fragen immer eine kompetente Antwort hatte.

Nicht zuletzt will ich meiner Familie für all den Rückhalt danken, ohne den diese Arbeit wohl kaum möglich gewesen wäre. Auch möchte ich euch für das Verständnis dafür danken, dass ihr mich in letzter Zeit weniger gesehen habt.

Bei Franziska möchte ich mich für die viele Unterstützung, das Motivieren und den fachlichen Austausch bedanken. Ob du es glaubst oder nicht, du hast es auch bald geschafft!