

Aus dem Zentrum Physiologie und Pathophysiologie der Universität zu Köln
Institut für Neurophysiologie
Geschäftsführender Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Hescheler

Identifizierung und funktionelle Charakterisierung
einer neuen Spleißvariante des Ca_v2.3 / R-Typ Calciumkanals

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Dipl. Chem. Rolf Vajna
aus Köln
2001

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	VI
Abstract (engl.)	VII
Abkürzungs- und Einheitenverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Eigenschaften spannungsabhängiger Calciumkanäle	1
1.1.1 Quartärstruktur	1
1.1.2 Hochspannungsaktivierte Calciumkanäle	4
1.1.3 Niederspannungsaktivierte Calciumkanäle	6
1.1.4 Der R-Typ-Calciumkanal	6
1.1.5 Regulation spannungsabhängiger Calciumkanäle	8
1.2 Insulinsekretion als Beispiel einer regulierten Erregungs-Sekretionskopplung	10
1.3 Aufgabenstellung	12
2 Material	13
2.1 Zell- und Gewebematerial	13
2.1.1 Gewebepräparationen	13
2.1.1.1 Organentnahme	13
2.1.1.2 Isolation von Langerhans`schen Inseln	13
2.1.2 Zellkultursysteme	14
2.1.2.1 Zelllinien	14
2.1.2.2 Embryonale Stammzellen und ES-Zellen-Aggregate	15
2.1.2.3 Zellkultur stabil transfizierter INS-1-Klone	15
2.1.2.4 Expression rekombinanter Ca _v 2.3d-cDNS in HEK293-Zellen	17
2.1.3 Fremdpräparationen	17
2.1.4 Verwendete Mauslinien	17
2.2 Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer und Lösungen	18
2.3 Oligodesoxynukleotide	19
2.3.1 Oligonukleotide für die Expressionsanalyse	19
2.3.2 Oligonukleotide für die Struktur-Funktionsanalyse	19
2.4 Vektoren	22
3 Methoden	22
3.1 Molekularbiologische Arbeiten	22
3.1.1 Genetische Transformation von <i>E. coli</i>	22
3.1.1.1 Verwendete Bakterienstämme	22
3.1.1.2 Genetische Transformation von <i>E. coli</i>	22
3.1.2 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren	23
3.1.2.1 Isolierung genomischer DNS aus kultivierten Zellen	23
3.1.2.2 Isolierung von Gesamt-RNS aus Rattengeweben und ES-Zellen-Aggregaten	23
3.1.2.3 Isolierung von Gesamt-RNS aus kultivierten Zellen	25
3.1.2.4 Analytische Plasmid-DNS-Isolierung aus <i>E. coli</i>	26
3.1.2.5 Präparative Plasmid-DNS-Isolierung aus <i>E. coli</i>	26
3.1.2.6 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gelen	27
3.1.2.7 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Lösungen	27
3.1.3 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	28
3.1.3.1 DNS-Agarose-Gelelektrophorese	28
3.1.3.2 Denaturierende RNS-Agarose-Gelelektrophorese	28
3.1.3.3 Größenstandards	29
3.1.4 Detektion und Identifizierung von Nukleinsäuren	30
3.1.4.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30

3.1.4.2	<i>Southern-Blotting</i>	30
3.1.4.3	<i>Sequenzierung</i>	32
3.1.5	Modifikation von Nukleinsäuren	32
3.1.5.1	<i>Spaltung von DNS mit DNS-Restriktionsendonukleasen</i>	32
3.1.5.2	<i>Generierung stumpfer Plasmid-DNS-Enden</i>	33
3.1.5.3	<i>Dephosphorylierung von DNS</i>	33
3.1.5.4	<i>Ligation von DNS</i>	34
3.1.5.5	<i>Radioaktive Markierung</i>	34
3.1.5.6	<i>In vitro-Punktmutagenese</i>	34
3.1.5.7	<i>Reverse Transkription</i>	35
3.1.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	36
3.1.6.1	<i>Analytische PCR-Amplifikation</i>	37
3.1.6.2	<i>Präparative PCR-Amplifikation</i>	38
3.1.6.3	<i>Einzelzell-RT-PCR</i>	39
3.2	Proteinbiochemische Arbeiten	40
3.2.1	Extraktion von Proteinen	40
3.2.1.1	<i>Mikrosomenpräparation</i>	40
3.2.1.2	<i>Proteinextraktion mit hypotonischen Zellaufschluss</i>	41
3.2.1.3	<i>Proteinextraktion mit Glyzerin</i>	42
3.2.2	Quantifizierung von Proteinen	42
3.2.2.1	<i>BCA-Methode</i>	42
3.2.2.2	<i>Bradford-Assay</i>	43
3.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Ca _v 2.3-Proteinen	43
3.2.4	Elektrotransfer von Ca _v 2.3-Proteinen auf PVDF-Membranen	45
3.2.5	Detektion und Identifizierung von Ca _v 2.3-Proteinen	46
3.3	Radioimmunoassay (Insulinnachweis)	47
3.4	Insulinsekretionsmessungen	49
3.4.1	Stimulation der Insulinsekretion in INS-1-Zellen	49
3.4.2	Stimulation der Insulinsekretion in isolierten Langerhans'schen Inseln	51
3.4.3	SNX-Denaturierung	51
4	Ergebnisse	51
4.1	Gewebespezifische mRNS-Expression von Ca_v2.3-Spleißvarianten in kultivierten Zellsystemen sowie neuronalen und nicht-neuronalen Geweben	51
4.1.1	Nachweis von Ca _v 2.3 -Spleißvarianten in kultivierten ES-Zellen-Aggregaten	52
4.1.2	Nachweis von Ca _v 2.3 in einzelnen Neuronen kultivierter ES-Zellen-Aggregate mittels Einzelzell-RT-PCR	54
4.1.3	Nachweis von Ca _v 2.3 in Körnerzellen-Primärkulturen und neuronalen Geweben der Ratte	56
4.1.4	Nachweis spannungsabhängiger Ca ²⁺ -Kanäle in ausgewählten Zelllinien	60
4.1.5	Nachweis spannungsabhängiger Ca ²⁺ -Kanäle in der Insulinoma-Zelllinie INS-1 und in Langerhans'schen Inseln der Ratte	60
4.1.5.1	<i>cDNS-Analyse</i>	61
4.1.5.2	<i>Protein-Analyse</i>	63
4.2	Pharmakologische Funktionsanalyse des Ca_v2.3e-Proteins in INS-1-Zellen	65
4.2.1	Die SNX-482-vermittelte Sekretionsinhibition	66
4.2.2	Effekt der Kultivierungsdauer auf die SNX-482-Inhibition	68
4.2.3	Vergleich der inhibitorischen Effekte von L-Typ-, P-Typ- und R-Typ- Ca ²⁺ -Antagonisten	69
4.3	Funktionsanalyse des Ca_v2.3e-Proteins in INS-1-Zellen nach stabiler Überexpression von Ca_v2.3-Antisense-RNS	72
4.3.1	Konstruktion des Vektors	72
4.3.2	Nachweis der genomischen Vektorinkorporation	73
4.3.3	Überexpression von Sense- und Antisense-RNS der Ca _v 2.3-Untereinheit	75

4.3.4 Charakterisierung der stabil transfizierten INS-1-Zellklone	75
4.3.5 Die Stimulus-induzierte Insulinsekretion in transfizierten INS-1-Zellen	79
4.4 Analyse der Glukose-stimulierten Insulinsekretion von isolierten Langerhans'schen Inseln der Maus	81
4.4.1 Die SNX-vermittelte Sekretionsinhibition	81
4.4.2 Vergleich der Glukose-stimulierten Insulinsekretion von Langerhans'schen Inseln aus C57Bl/6- bzw. $\alpha 1E(-/-)$ - Mäusen	82
4.5 Untersuchungen zur Modulation des $Ca_v2.3$-Proteins im heterologen Expressionssystem und in stabil transfizierten INS-1-Zellen	84
4.5.1 Eigenschaften der Modulation von $Ca_v2.3$ d-induzierten Ba^{2+} -Strömen durch Phorbol ester bzw. Somatostatin in HEK293-Zellen	84
4.5.2 Synthesestrategie	85
4.5.3 Punktmutationen	86
4.5.3.1 Rekombinante Synthese von <i>pcDNA3-$\alpha 1Ed-M2(Ala414)$ und -$M3(Gly418)$</i>	87
4.5.4 Chimärenkonstruktion	89
4.5.5 Deletionen	89
4.5.5.1 Carboxyterminale Deletion	89
4.5.5.2 Aminoterninale Deletion	90
4.5.6 Vergleich der Somatostatin-induzierten Inhibition der Insulinsekretion in Wildtyp- und transfizierten INS-1-Zellen	92
5 Diskussion	94
5.1 Die neue Spleißvariante $Ca_v2.3e$	94
5.2 Funktionelle Bedeutung von $Ca_v2.3e$ in der Insulinsekretion	97
5.2.1 Der SNX-482-Effekt	97
5.2.2 Die Antisense-Repression	99
5.2.3 Die $Ca_v2.3$ -defiziente Mauslinie	100
5.2.4 Regulation des $Ca_v2.3$ -Proteins	101
5.2.5 Hypothese für eine Beteiligung von $Ca_v2.3$ an der Insulinsekretion	102
6 Anhang	103
6.1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	103
6.2 Fremdexperimente	105
6.3 Literaturverzeichnis	111
6.4 Danksagung	124
6.5 Publikationen	125
6.6 Lebenslauf	127
6.7 Eidesstattliche Erklärung	128

Zusammenfassung

Plasmamembranäre spannungsgesteuerte Calciumkanäle sind an der physiologischen Aktivität elektrisch erregbarer Zellen beteiligt: Zum einen führt der Einstrom von Calciumionen zu einer Membrandepolarisation, zum anderen wird das Kation zur Kopplung mit Signalkaskaden sowie mit zellphysiologischen Aktivitäten wie z. B. Kontraktion und Sekretion genutzt.

Das $Ca_v2.3$ -Protein bildet die ionenleitende Pore eines spannungsaktivierten R-Typ-Calciumkanals, der aufgrund seiner Resistenz gegenüber den bekannten Calciumkanalantagonisten pharmakologisch nicht eingehend untersucht werden konnte. Das Protein wurde in Form mehrerer Spleißvariationen kloniert, deren Gewebeverteilung bislang nicht ermittelt wurde. Ziel der Arbeit war es, eine mögliche physiologische Bedeutung für das $Ca_v2.3$ -Protein zu finden, indem Aussagen zu Spleißvariantenstruktur und Gewebeverteilung sowie zu einer möglichen physiologischen Funktion gewonnen werden sollten.

Bei der Untersuchung verschiedener Ratten- und Mausegewebe wurden mit $Ca_v2.3c$ und $Ca_v2.3e$ nur zwei cDNS-Varianten identifiziert; letztere konnte in dieser Arbeit erstmalig beschrieben werden. Darüber hinaus wurde eine gewebespezifische Expression der Varianten in neuronalem ($Ca_v2.3c$) und (neuro-)endokrinem ($Ca_v2.3e$) Gewebe ermittelt.

Durch den Einsatz des $Ca_v2.3$ -selektiven Peptidtoxins SNX-482, das seit 1998 bekannt ist, konnte die Glukose-induzierte Insulinsekretion in der Insulinoma-Zelllinie INS-1 reduziert werden. Bei gleichzeitiger Verwendung des Toxins mit L- bzw. P-Typ-Antagonisten, die weitere für die Insulinsekretion wichtige Calciumkanäle blockieren, trat keine Additivität der Inhibitionen auf. In stabil mit $Ca_v2.3$ -Antisense-RNS transfizierten INS-1-Zellen wurde eine erniedrigte Glukose-induzierte Insulinsekretion nachgewiesen. Die Reduktion war stärker als die durch SNX-482 beobachtete transiente Inhibition. Demgegenüber war die KCl-stimulierte Insulinsekretion in Antisense- und Kontroll-INS-1-Zellen nicht signifikant verschieden. Für Langerhans'sche Inseln der Maus wurde eine nicht signifikante Reduktion der Glukose-induzierten Insulinsekretion durch SNX-482 beobachtet. In $Ca_v2.3$ -defizienten Mäusen konnte dagegen keine Glukose-induzierte Insulinsekretion der Inseln nachgewiesen werden.

Durch Struktur-Funktionsanalyse heterolog exprimierter $Ca_v2.3$ -cDNS wurde ermittelt, dass Somatostatin die Aktivität der Untereinheit direkt inhibiert. In stabil mit $Ca_v2.3$ -Antisense-RNS transfizierten INS-1-Zellen konnte eine verminderte Sensitivität der Glukose- bzw. KCl-induzierten Insulinsekretion gegenüber Somatostatin beobachtet werden.

Die Experimente belegen eine Beteiligung $Ca_v2.3e$ -haltiger Kanäle, die durch Somatostatin-induzierte Signalwege reguliert werden, an der Glukose-induzierten Insulinsekretion in β -Zellen Langerhans'scher Inseln. Durch Aktivierung des Kanals bei Membranpotentialen zwischen denen von nieder- und hochspannungsaktivierten Calciumkanälen könnte ihm eine Verstärkerfunktion zukommen, die eine nachfolgende Öffnung der P- und L-Typ-Kanäle steuert.

Abstract (engl.)

The family of voltage-gated calcium channels, located in the plasma membrane of electrically excitable cells, contributes to cellular physiology in a twofold manner. Firstly, channel opening and subsequent influx of calcium ions generates membrane depolarisation; secondly, the cation is coupled to different signal transduction pathways and thereby mediating basic cellular activities like e.g. contraction or secretion.

Ca_v2.3, the ion-conducting pore of the R-type-calcium channel, has been cloned in a variety of splice variants, for which tissue distribution has not been investigated so far. Moreover, functional studies about R-Type-channels are lacking because of their resistance towards common calcium channel antagonists.

In this study, two major cDNAs Ca_v2.3c and Ca_v2.3e were detected in various tissues of rat and mouse. Ca_v2.3e is the predominant variant in endocrine tissues, while Ca_v2.3c is mainly expressed in neurons.

The Ca_v2.3-selective antagonist SNX-482, a 1998 detected peptide toxin from *tarantula gigas*, reduced glucose-activated insulin secretion in the rat insulinoma cell-line INS-1. However, co-application of the peptide toxin together with antagonists of L- and P-type-calcium channels, which resemble the most abundant calcium channels in the β-cell, led to an inhibitory effect, which was smaller than the sum by adding the antagonists separately. Glucose- but not KCl-induced insulin secretion was reduced in stable with an antisense-Ca_v2.3-RNA-construct transfected INS-1-cells. The extend of reduction was more pronounced as observed after adding SNX-482 to wild-type cells. In islets of Langerhans from mice, the SNX-482-induced reduction of glucose-activated insulin secretion was not statistically significant. However, in contrast to islets from wild type mice, Ca_v2.3-deficient mice displayed no glucose-induced release.

Mutational analysis of heterologous expressed Ca_v2.3-cDNA revealed, that Somatostatin-induced inhibition is due to a direct interaction with the ion-conducting protein. Antisense-INS-1-cells did exhibit a desensitisation in glucose- resp. KCl-induced insulin secretion towards treatment with Somatostatin.

In summary, the present study shows for the first time the involvement of Ca_v2.3e-containing R-type-channels in glucose-induced insulin release in β cells and islets of Langerhans. A mechanism is considered, by which Ca_v2.3-containing channels are activated at membrane potentials in between the voltage for low- and high-voltage-activated calcium channels, and subsequently trigger further openings of L- and P-type-calcium channels.

Abkürzungs- und Einheitenverzeichnis

Die Nomenklatur der ionenleitenden Untereinheit spannungsabhängiger Calciumkanäle wurde kürzlich geändert¹. In diesem Zusammenhang wurde aus der $\alpha 1E$ - die $Ca_v2.3$ -Untereinheit. Die alte Bezeichnung taucht in dieser Arbeit in einigen Oligonukleotid-, Antikörper- und Vektornamen noch auf. Außerdem wurde er in einigen übernommenen Abbildungen verwendet.

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
[c]-DNS	[komplementäre] Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES-Zelle	Embryonale Stammzelle
GFP	Grünes fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-Ethan-sulfonsäure
IP ₃	Inositoltriphosphat
KO	Knockout (-Mausmodell)
MOPS	3-(N-Morpholino-)propansulfonsäure
nt	Nukleotidposition
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Polypropylen
[m]-RNS	[Boten]-Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
(RT)-PCR	(Reverse Transkriptions-)Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
TWEEN	Polyoxyethylensorbitan

Vol.	Volumen
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Einheiten

bp	Basenpaare
g	Gramm
Da	Dalton
mol	Mol
M	Molarität
min	Minute
sek	Sekunde
h	Stunde
m	Meter
l	Liter
V	Volt
A	Ampere
S	Siemens
Ω	Ohm
F	Farad
xg	Gravitationskraft
Upm	Umdrehungen pro Minute
OD	Optische Dichte
RT	Raumtemperatur
$^{\circ}\text{C}$	Celsius-Grad

Präfixes

Mega (M-)	10^6
Kilo (K-)	10^3
Zenti (c-)	10^{-2}
Milli (m-)	10^{-3}
Mikro (μ -)	10^{-6}
Nano (n-)	10^{-9}
Pico (p-)	10^{-12}
Femto (f-)	10^{-15}

1 Einleitung

Grundlegende Prozesse wie Entwicklung und Differenzierung, Adhäsion, Bewegung, Kontraktion und Sekretion werden durch die intrazelluläre Erhöhung der Calciumkonzentration reguliert. Im Unterschied zu anderen „second messengern“, die erzeugt und abgebaut werden, kann das Ca^{2+} -Ion unter Energieaufwand lediglich umverteilt werden: Extrazellulär beträgt die Konzentration des Ca^{2+} etwa 2×10^{-3} M, im Zytosol dagegen 10^{-7} - 10^{-8} M²; auch im Lumen des sarko- bzw. (kernnahen) endoplasmatischen Retikulums und in Mitochondrien liegt eine höhere Ca^{2+} -Konzentration als im Zellplasma vor. Die Zelle nutzt das elektrochemische Potential der gebildeten Konzentrationsgradienten als treibende Kraft der Signalaktivierung.

Der regulierbare und selektive Calciumeinstrom in das Zytosol wird durch verschiedene Ionenkanäle gewährleistet: Die Freisetzung aus den intrazellulären Speichern wird durch IP_3 - und Ryanodinrezeptoren ermöglicht. Aus dem Extrazellulärraum gelangt Calcium über spannungs- und ligandengesteuerte Calciumkanäle (Ca-release-activated calcium channels) in die Zelle. Letztere öffnen bei Entleerung der Calciumspeicher im ER, ohne dass der intrazelluläre Ligand bekannt ist³. Demgegenüber öffnen, schließen und inaktivieren spannungsgesteuerte Calciumkanäle (voltage-gated calcium channels, VGCCs) in Abhängigkeit vom Membranpotential. Sie werden durch eine Membrandepolarisation in Abhängigkeit vom Kanaltyp für eine jeweils spezifische Zeitspanne aktiviert.

VGCCs übernehmen in allen erregbaren Zellen eine entscheidende Rolle bei der Umwandlung des elektrischen in ein biochemisches Signal⁸. Die Interaktion eingeströmter Ca^{2+} -Ionen mit intrazellulären Ca^{2+} -bindenden Proteinen führt zur Kopplung der Depolarisation mit zellphysiologischen Vorgänge wie z.B. der Sekretion. Spannungsgesteuerte Calciumkanäle wiederum werden durch Proteine der zellulären Signaltransduktion reguliert und ermöglichen die Kontrolle und Anpassung der Membrandepolarisation an unterschiedliche intrazelluläre Zustände.

1.1 Eigenschaften spannungsabhängiger Calciumkanäle

1.1.1 Quartärstruktur

VGCCs sind heteromere Proteinkomplexe, die neben der ionenleitenden Ca_v -Untereinheit die akzessorischen Proteine $\alpha 2\delta$, β und wahrscheinlich auch γ enthalten (Abbildung 1). Die funktionellen Merkmale spannungsabhängiger Calciumkanäle wie Leitfähigkeit und Selektivität werden größtenteils durch die molekularen Eigenschaften des jeweiligen Ca_v -Proteins bestimmt. Die Hilfsuntereinheiten der VGCCs ändern die kinetischen und pharmakologischen Eigenschaften der Ca_v -Untereinheit und beeinflussen die zelluläre Regulation der Calciumkanäle^{4,5,13}.

Ca_v-Untereinheit. Die zehn bislang klonierten Ca_v-cDNS kodieren 212-262 kDa große, glykosylierte Proteine. Zwischen den wahrscheinlich zytoplasmatischen amino- und carboxy-terminalen Enden befinden sich vier strukturell zueinander homologe Bereiche, die als Domänen I, II, III und IV bezeichnet werden⁶ und jeweils 6-8 Transmembransegmente enthalten. Das α -helikale Transmembransegment S4 jeder Domäne, in dem alternierend positiv geladene Arginyl- und Lysyl-Seitenreste durch unpolare Reste voneinander getrennt sind, gilt in Analogie zum Natriumkanal⁷ als Spannungssensor.

Die Sequenzschleifen der Transmembransegmente zwischen S5 und S6 aller Domänen bilden den äußeren Teil der Porenregion, welche im Modellⁱ die Struktur eines umgedrehten Kegels besitzt. In der Zone der größten Verengung auf halber Strecke durch die Membran wird als Selektivitätsfilter ein Ring aus vier Glutamatresten postuliert.

Die zytoplasmatische Schleife zwischen Domäne II und III ist der Interaktionsort für intrazelluläre Ca²⁺-bindende Effektorproteine im Rahmen der Erregungs-Kontraktions- bzw. Erregungs-Sekretionskopplung.

Für eine direkte Regulation bzw. Modulation von VGCCs durch intrazelluläre Proteinkinasen und G-Proteine⁹ konnten bislang amino- und carboxyterminale Bereiche sowie die zytoplasmatische Schleife zwischen Domäne I und II als bedeutsam identifiziert werden.

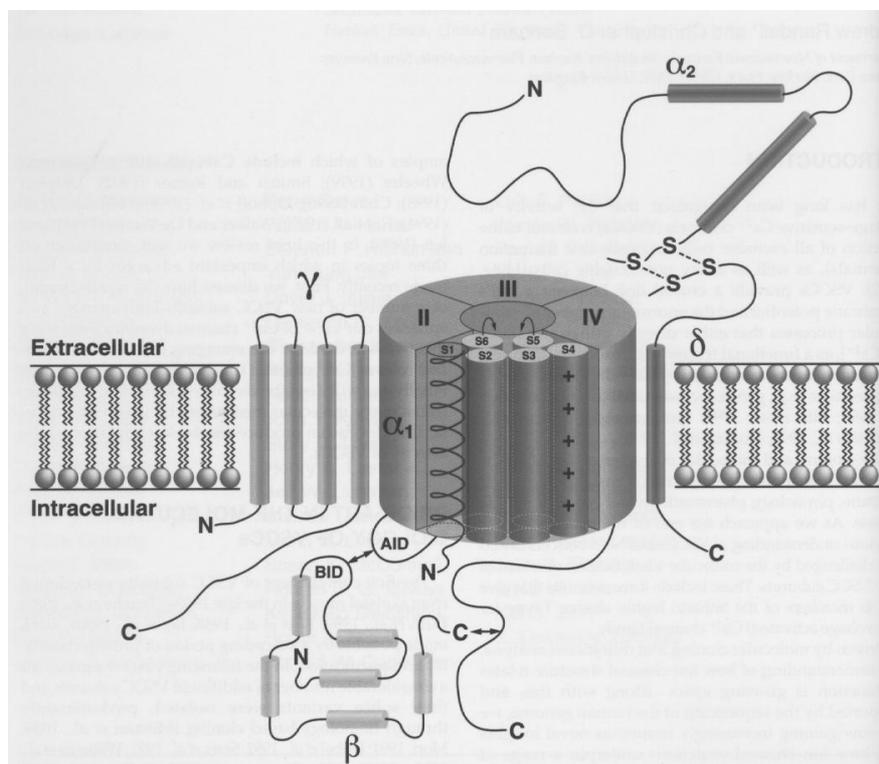


Abbildung 1: Schematische Quartärstruktur eines VGCCs¹⁰.

Für die ionenleitende Untereinheit wurde mit α_1 (= Ca_v) die alte Nomenklatur verwendet.

ⁱ Die Beschreibung stützt sich u.a. auf Hydrophobizitätsberechnungen¹⁶⁴, da VGCCs bislang nicht röntgenspektroskopisch untersucht werden konnten. Mit der Röntgenstrukturanalyse der ionenleitenden Pore des Kaliumkanals aus *Streptomyces lividans*¹⁶⁵ gelang ein wichtiger Fortschritt in dieser Richtung.

β -Untereinheit. Bislang wurden vier intrazelluläre β -Hilfsuntereinheiten zwischen 55 und 72 kDa kloniert¹¹. Es gibt Hinweise darauf, dass die Proteine durch eine Chaperon-ähnliche Interaktion für die korrekte Faltung, den Transport und die funktionelle Expression der Ca_v -Untereinheit in der Plasmamembran von entscheidender Bedeutung sind¹². Dabei besetzt die β -Hilfsuntereinheit möglicherweise ein bislang nicht lokalisiertes Retentionssignal in der Schleife zwischen Domäne I und II des Ca_v -Proteins, welches dieses im ER zurückhält¹³. Alle β -Proteine binden *in vitro* über ein aminotermiales Motiv^{14,15} mit hoher Affinität ($K_D \cong 5 \text{ nM}$) an einen Sequenzabschnitt in der zytoplasmatischen Schleife zwischen Domäne I und II der Ca_v -Untereinheit¹⁶; einige Arbeitsgruppen ermittelten darüber hinaus auch Interaktionen mit carboxyterminalen ($K_D > 100 \text{ nM}$)¹⁷ und aminoterminalen Bereichen^{18,19} des Porenbildners. Offensichtlich überlappen daher die Bindungsplätze von β -Hilfsuntereinheit und regulatorischen Proteinen²⁰.

$\alpha 2\delta$ -Untereinheit. Die extrazelluläre, glykosylierte $\alpha 2$ -Untereinheit ist über eine Disulfidbrücke kovalent mit der δ -Untereinheit verbunden, die das $\alpha 2$ -Protein über ein einzelnes Transmembransegment in der Membran verankert²¹. Die Molekülmasse des $\alpha 2\delta$ -Proteins beträgt 170 kDa. Es existieren mindestens drei Gene mit geringer Homologie^{22,23}; in den Transkripten befindet sich die δ -Sequenz am 3'-Ende der $\alpha 2$ -cDNS²⁴. Koexpression von $\alpha 2\delta$ -1²⁵- bzw. $\alpha 2\delta$ -2²⁶ mit Ca_v - und β -Untereinheiten führen zu einer Erhöhung der Ganzzell-Calciumströme und zu einer Beschleunigung der Aktivierung und Verschiebung der Spannungsabhängigkeit von Aktivierung und Inaktivierung zu negativeren Potentialwerten hin. Im Falle von $\alpha 2\delta$ -2 wird eine Beteiligung an der idiopathischen generalisierten Epilepsie diskutiert²⁷.

γ -Untereinheit. Aus dem gereinigten Proteinkomplex des skelettmuskulären Ca^{2+} -Kanals konnte die 25 kDa (bzw. 32 kDa im glykosylierten Zustand) große $\gamma 1$ -Untereinheit isoliert werden²⁸. Die Genfamilie umfasst inzwischen fünf Mitglieder²⁹. Im Knockout-Mausmodell konnte eine Erhöhung der Stromdichte im skelettmuskulären L-Typ-Kanal festgestellt werden³⁰, die auf eine verlangsamte Inaktivierung sowie einer Verschiebung dieser zu positiveren Potentialen hin zurückgeführt wurde.

Spannungsgesteuerte Calciumkanäle lassen sich aufgrund ihres Schwellenpotentials der Aktivierung unterscheiden. Hochspannungsaktivierte Ca^{2+} -Kanäle (high voltage-activated, HVA) werden bei Membrandepolarisationen von -40 bis -10 mV aktiviert, während niederspannungsaktivierte (low voltage-activated, LVA) zwischen -70 und -50 mV öffnen. Die zehn bislang klonierten Ca_v -Untereinheiten konnten pharmakologisch definierten VGCC-Typen im Expressionsexperiment zugeordnet werden (Tabelle 1).

1.1.2 Hochspannungsaktivierte Calciumkanäle

L-Typ-Kanäle. L-Typ-Calciumkanäle werden durch drei klassische Gruppen von Calciumkanal-Antagonisten inhibiert: Dihydropyridine, Phenylalkylamine und Benzothiazepine³¹. Sie besitzen hohe Leitfähigkeiten von 25 pS und inaktivieren langsam (L = „long lasting“). Bei Verwendung von Ba²⁺- anstatt Ca²⁺-Ionen als Ladungsträger erhöht sich die Leitfähigkeit, während die Inaktivierung verringert istⁱⁱ.

Die Ca_v1.1-Untereinheit, dessen Gen ein Locus muskulärer Erbkrankheiten darstellt²², bildet die ionenleitende Pore des skelettmuskulären L-Typ-Kanals. Funktionell bedeutsam ist die Protein-Protein-Interaktion mit dem Ryanodinrezeptor im Rahmen der Erregungs-Kontraktions-Kopplung des Skelettmuskels.

Ca_v1.2 bildet einen L-Typ-Kanal, der in neuronalen, muskulären und endokrinen Gewebe exprimiert wird. In Kardiomyozyten strömt Ca²⁺ durch einen L-Typ-Kanal in die Zelle, der diese Untereinheit enthält³² und initiiert die Ca²⁺-Ausschüttung aus dem ER. Ca_v1.2-defiziente Mäuse sterben pränatal zum Zeitpunkt der Herzbildung³³.

Ca_v1.3 wurde im neuronalen und endokrinen Gewebe detektiert³⁴ und bildet den wichtigsten VGCC der Haarzellen im Ohr des Säugetiers. Die erzeugten Knockout-Mäuse waren taub und wiesen eine sino-atriale Dysfunktion auf, jedoch keine endokrinen Anomalien³⁵.

Kürzlich wurde durch Sequenzvergleich mit dem Retina-spezifischen Ca_v1.4-Protein ein neues Mitglied der L-Typ-Familie als Genlocus identifiziert. Mutationen im Gen führen zur unvollständigen kongenitalen X-chromosomalen Nachtblindheit^{36,37}. Bislang sind noch keine funktionellen Expressionsstudien publiziert worden.

N- und P/Q-Typ-Kanäle. N- und P/Q-Typ-Ca²⁺-Kanäle, die bei Substitution von Ca²⁺- durch Ba²⁺-Ionen ebenfalls eine erhöhte Leitfähigkeit aufweisen, werden zusammen mit dem R-Typ zur Familie der Non-L-Typ-VGCCs zusammengefasst.

Die neuronalen N-Typ-Kanäle inaktivieren schneller als L-Typ-VGCCs und werden selektiv durch Blocker wie ω-Conotoxin GVIIa und ω-Conotoxin MVIIa gehemmt³⁸. Die ionenleitende Pore Ca_v2.2 interagiert mit den SNARE-Proteinen im Rahmen der synaptischen Transmitterfreisetzung³⁹.

ⁱⁱIn der Literatur wird zwischen schneller und langsamer Inaktivierung unterschieden. Während die langsame Inaktivierung eine potentialabhängige Eigenschaft des Kanals darstellt, wird die schnelle Inaktivierung durch die Calmodulin-vermittelte bzw. direkte Kanalinaktivierung durch intrazelluläres Ca²⁺ verursacht¹⁶⁶. Daher tritt bei Substitution von Ca²⁺- durch Ba²⁺-Ionen bei einigen VGCCs eine erhöhte Leitfähigkeit auf (s.u.).

Typ	Elektrophysiologische Charakterisierung	Spleißvarianten	Gewebeexpression	Knockout-Phänotyp bzw. humane Krankheit
Ca _v 1.1	HVA L-Typ		Skelettmuskel	Hypokalämische periodische Paralyse; maligne Hyperthermie
Ca _v 1.2	HVA L-Typ	Ca _v 1.2a Ca _v 1.2b Ca _v 1.2c	Herz Glattmuskel ZNS, Herz, Hypophyse, Nebenniere ZNS, Niere, endokrine Systeme	KO: letal, Tod ab Tag 12,5 post coitum
Ca _v 1.3	HVA L-Typ		ZNS, Niere, endokrine Systeme	KO: Taubheit; sino-atriale Dysfunktion
Ca _v 1.4	L-Typ ?		Retina	Kongenitale X-chromosomale Nachtblindheit
Ca _v 2.1	HVA Non-L-Typ	Ca _v 2.1a Ca _v 2.2b	ZNS, Cochlea, Hypophyse ZNS, Cochlea, Hypophyse	Spinozerebellare Ataxie Typ6; Petit-Mal Epilepsie; familiäre hemiplegische Migräne KO: progressive Ataxie
Ca _v 2.2	HVA Non-L-Typ	Ca _v 2.2a Ca _v 2.2b	ZNS ZNS	KO : Dysfunktion sympathischer Neurone; gestörte Nozizeption
Ca _v 2.3	HVA Non-L-Typ	Ca _v 2.3-a,c,d	ZNS, Cochlea, Retina, Herz, Hypophyse, Testes, Milz, Pankreas	KO: veränderte Schmerz Wahrnehmung; gestörtes räumliches Erinnerungsvermögen
Ca _v 3.1	LVA T-Typ		ZNS, Hypophyse, Pankreas	KO : Unterdrückung Ca ²⁺ -getragener Aktionspotentiale in thalamokortikalen Neuronen
Ca _v 3.2	LVA T-Typ		Niere, ZNS, Herz	-
Ca _v 3.3	LVA T-Typ		ZNS	-

Tabelle 1: Übersicht über die klonierten Ca_v-Untereinheiten (verändert, nach: Ertel, 2000¹).
Die Aufzählung der Spleißtypen ist unvollständig. Im Falle von Ca_v2.3⁴⁰ wird die Zuordnung der Gewebeexpression zu einzelnen Spleißvarianten in Kapitel 1.4 durchgeführt. KO: Knockout-Mausmodell

Ca_v2.1, welches in mehreren Isoformen existiert, bildet die zentrale Untereinheit der elektro-physiologisch und pharmakologisch verschiedenen P- und Q-Typ-VGCCs. Der zuerst in Purkinje-Neuronen identifizierte P-Typ-Ca²⁺-Kanal⁴¹, welcher durch ω-Agatoxin IVA und ω-Conotoxin MVIIc selektiv blockiert wird, unterscheidet sich vom Q-Typ nur durch die niedrigere Inaktivierungsrate und eine um den Faktor 50 erhöhte Sensitivität gegenüber ω-Agatoxin IVA. Bei einer systematischen Untersuchung mittels RT-PCR und Patch-clamp-Studien gelang der Nachweis, dass zwei kurze Insertionen für die pharmakologische und kinetische Unterscheidung von P- und Q-Typ-Kanal verantwortlich sind^{42,154}. Eine Ca_v2.1-Isoform⁴³ interagiert mit SNARE-Proteinen in endokrinen und synaptischen Prozessen⁴⁴; im Knockout-Mausmodell und in vererbten Gendefekten wurden bislang nur neurologische bzw. neuronale Defekte^{45,151} beschrieben.

1.1.3 Niederspannungsaktivierte Calciumkanäle

T-Typ-Kanäle, die zur Gruppe der LVA-Kanäle gerechnet werden, aktivieren und inaktivieren schnell und weisen eine geringe Leitfähigkeit von etwa 10 pS auf (T = „tiny“). Sie werden durch Mibefradil, Kurtoxin⁴⁶ und Amilorid sowie Ni²⁺-Ionen (in Abhängigkeit von der Ca_v-Untereinheit^{47,48}) inhibiert.

Die ionenleitenden Untereinheiten der T-Typ-Kanäle, Ca_v3.1 – 3.3, bilden eine eigene Unterfamilie und besitzen nur eine Sequenzidentität von etwa 30% gegenüber HVA-Kanälen^{49,50}. Über die Interaktion mit anderen zellulären Proteinen ist nichts bekannt, ebenso ist bislang die Existenz akzessorischer Proteine in T-Typ-Kanälen nicht sicher nachgewiesen worden. Aufgrund der Aktivierung bei niedrigen Potentialwerten könnten die Kanäle eine wichtige Rolle in der Unterstützung Ca²⁺-getragener Aktionspotentiale besitzen⁵¹. In den thalamokortikalen Relaiszellen Ca_v3.1-defizienter Mäuse ist die Ausbildung Ca²⁺-vermittelter Depolarisationsplateaus („bursts“) größtenteils unterbunden⁵².

1.1.4 Der R-Typ-Calciumkanal

In Patch-clamp-Analysen zerebellärer Körnerzellen^{53,54} der Ratte verblieb nach Applikation von L-, N- und P/Q-Typ-Blockern ein hochspannungsaktivierter Reststrom, der von Cd²⁺- (blockiert HVA-VGCCs) und Ni²⁺ gehemmt wurde. Offenbar enthielt dieser Reststrom eine unbekannte Anzahl weiterer Ca²⁺-Kanäle⁵⁵, von denen bis jetzt ein R-Typ (R= „remaining“) aufgrund der Klonierung der ionenleitenden Pore bestimmt werden konnte. Während einige Autoren den R-Typ-Kanal zunächst als LVA-Kanal charakterisierten^{56,57,58} wird er inzwischen in der Literatur als HVA-Kanal beschrieben¹. Mit einem Schwellenwert der Aktivierung zwischen denen von LVA- und den anderen HVA-Kanälen, einer schnellen Inaktivierung und

einer Leitfähigkeit von etwa 14 pS besitzt er elektrophysiologische Eigenschaften, die ihn von Restströmen aufgrund unvollständiger Blockierung anderer HVA-Kanäle unterscheiden.

R-Typ-Ströme wurden in Körnerzellen-Primärkulturen sowohl im dendritischen Bereich^{59,60} als auch präsynaptisch⁴⁴ identifiziert.

Bislang konnte eine Beteiligung des R-Typs an der Oxytozin-Sekretion aus Neurohypophysenendigungen der Ratte⁶¹, an der schnellen Katecholaminsekretion aus murinen chromaffinen Zellen⁶² und an der Neurotransmitterfreisetzung an Synapsen des Calyx-Typs im ZNS der Ratte⁴⁴ nachgewiesen werden. In der letztgenannten Arbeit wird die Kopplung dieses Kanals an die Sekretionsmaschinerie im Gegensatz zu den P-Typ- und N-Typ-Ca²⁺-Kanälen als weniger effizient beschrieben. Die Autoren begründen dies mit einer angenommenen größeren räumlichen Distanz zum Membranfusionsbereich der Vesikel.

Die Expression der menschlichen Ca_v2.3-Untereinheit in *Xenopus laevis* Oozyten lieferte einen Strom mit den Eigenschaften des R-Typ-VGCCs¹⁴⁴. Die mit der Klonierung der murinen Ca_v2.3-cDNS verbundene RNS-Analyse mittels RT-PCR zeigte neben einer starken Expression in neuronalen Geweben auch schwache Signale in Milz, Herz, Retina und Pankreas⁶³. Der Vermutung, es handle sich hierbei um Signale aus der vegetativen Innervation der betreffenden Organe, stand die Beobachtung entgegen, dass die Expression von Antisense-Oligonukleotiden, die gegen verschiedene Sequenzabschnitte der Ca_v2.3-cDNS entworfen wurden, in isolierten und kultivierten atrialen Myozyten den basalen und durch IGF-induzierten T-Typ-Strom hemmten⁶⁴. Auch in den neuroendokrinen Zelllinien βTC-3 (einer Insulinoma-Linie der Maus) und AtT-20 (aus der murinen Hypophyse) konnten durch einen RNase Protection Assay Ca_v2.3-cDNS-Fragmente identifiziert werden⁶⁵.

Die funktionelle Bedeutung der neuronalen Expression wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass Ca_v2.3-defiziente Mäuse ein verändertes Schmerzverhalten⁶⁶ sowie ein gestörtes räumliches Gedächtnis⁶⁷ aufweisen.

1998 wurde mit SNX-482 ein R-Typ-selektiver Blocker als Peptidtoxin aus dem Gift der Tarantelart *Hysterocrates gigas* isoliert und resynthetisiert¹³⁹. Elektrophysiologisch konnten mit Hilfe dieses Antagonisten zwei R-Typen R_a (IC₅₀ ≅ 6 nM) und R_b (IC₅₀ ≅ 81 nM) mit verschiedenen Affinitäten gegenüber dem Toxin in Körnerzellen-Primärkulturen der Ratte unterschieden werden⁶⁸. Daneben existiert in diesen Zellen eine dritte R-Typ-Komponente R_c, die keine SNX-482-Sensitivität besitzt, aber auch durch Expression von Ca_v2.3-Antisense-Oligonukleotiden unterdrückt wird und in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften rekombinanten Ca_v2.1-haltigen Kanäle ähnelt. Es gibt jedoch keinen Anhaltspunkt, welche strukturellen Ursachen diese Heterogenität Ca_v2.3-haltiger Kanäle ermöglichen.

Der R_a -Typ wurde von Wang⁶¹ in Nervenendigungen der Neurohypophyse identifiziert, wohingegen R_b in CA1-Neuronen des Hippokampus bzw. kortikalen pyramidalen Neuronen zu 37-60% den R-Typ-Strom trägt⁶⁹ und durch Applikation von 1 μ M SNX-482 gehemmt wird.

In den entsprechenden Zelltypen $Ca_v2.3$ -defizienter Tiere ist der R-Typ-Stromanteil um 70% (CA1-Neurone) bzw. 73% (Pyramidenzellen) verringert und die eliminierte Komponente ähnelt in ihren Eigenschaften dem R_c -Typ. Daneben gibt es aber auch Körnerzellen des Gyrus Dentatus oder des Zerebellums, deren R-Typ-Ströme in $Ca_v2.3$ -defizienten Tieren nicht oder nur zum Teil vermindert ist.

Zusammenfassend gilt daher, dass wahrscheinlich nicht jeder $Ca_v2.3$ -haltige Kanal SNX-482-sensitiv ist und dass nicht jeder R-Typ-Strom von $Ca_v2.3$ -haltigen VGCCs getragen wird.

1.1.5 Regulation spannungsabhängiger Calciumkanäle

Im Netzwerk der intrazellulären Signalübertragung sind spannungsabhängige Calciumkanäle in mehrere Signalkaskaden involviert.

Die Bindung von Adrenalin an die kardialen β_1 und β_2 -Rezeptoren führt im Rahmen des cAMP-Signalwegs zur Aktivierung der Proteinkinase A. Diese phosphoryliert die β -Hilfsuntereinheit⁷¹ bzw. das kardiale $Ca_v1.2$ -Protein, wodurch sich dessen Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht⁷⁰. Daneben existieren auch $Ca_v1.2$ -Isoformen, die durch Proteinkinase C stimuliert werden⁷².

Aus Rattenhirn konnte ein heteromerer Signalkomplex isoliert werden, welcher die $Ca_v1.2$ -Untereinheit in direkter Assoziation mit dem β_2 -Rezeptor enthielt⁷³. In dem Komplex waren außerdem ein G_s -Protein, Proteinkinase A und die Phosphatase PP2A vertreten.

Im Gegensatz zu G_s -Proteinen interagieren G_o - und G_i -Proteine direkt mit Non-L-Typ-Calciumkanälen, wodurch es zu einer potentialabhängigen Verringerung der Kanalöffnungswahrscheinlichkeit kommt⁷⁴ (Abbildung 2).

Nach Aktivierung des entsprechenden Rezeptors dissoziieren die heterotrimeren G-Proteine in die signalaktiven $G\alpha$ - und $G\beta\gamma$ -Untereinheiten. In Analogie zu anderen $G\beta\gamma$ -Effektoren⁷⁵ wurde ein QXXER-Motiv, welches in der zytoplasmatischen Schleife zwischen Domäne I und II von Non-L-Typ-VGCCs existiert, als Bindungssequenz des $G\beta\gamma$ -Dimers postuliert¹⁵. Die funktionelle Bedeutung dieser Region ist unklar, da eine $Ca_v2.3$ -Untereinheit, welche die I-II-Schleife der G_i -Protein-insensitiven $Ca_v1.2$ -Untereinheit enthält, noch durch G-Proteine moduliert werden kann¹⁷. Weitere G-Protein-bindende Bereiche wurden im Aminoterminus⁷⁶ von $Ca_v2.2$ sowie im Carboxyterminus von $Ca_v2.3$ ⁷⁷ entdeckt. Da die Bindungsplätze überein-

stimmen, könnte die An- oder Abwesenheit der β -Hilfsproteine einen wesentlichen Einfluss auf die G-Protein-Interaktion besitzen⁷⁸.

Furukawa et al.⁷⁹ konnten zeigen, dass sowohl eine Interaktion des $\beta\gamma$ -Dimers mit der Schleife zwischen Domäne I und II von $Ca_v2.1$ bzw. $Ca_v2.2$ als auch von $G_{i3}\alpha$ mit den jeweiligen Carboxytermini stattfindet; beide Interaktionen führten zur Inhibition des Ca^{2+} -Einstroms⁸⁰.

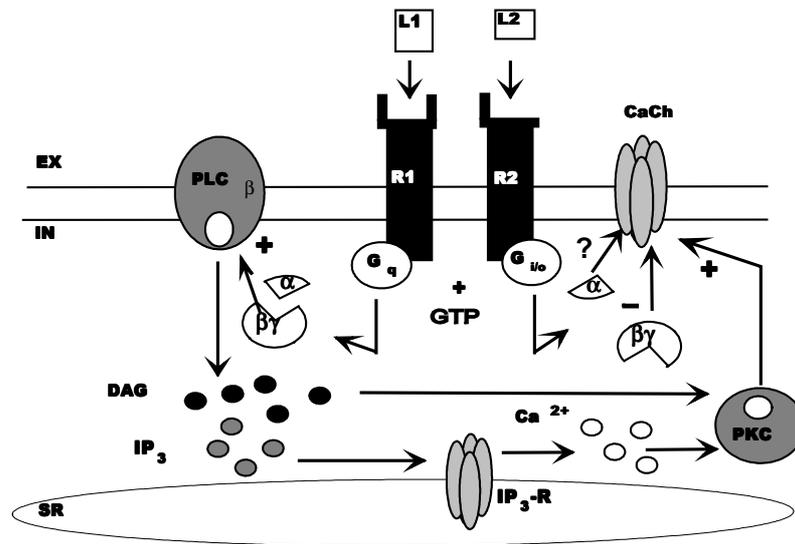


Abbildung 2: G-Protein-Beteiligung an der Rezeptor-vermittelten Regulation von Ionenkanälen. Vereinfacht dargestellt sind nur die direkte G-Protein-Inhibition sowie der IP_3 -Signalweg. Abkürzungen: EX, Extrazellulärraum; IN, Intrazellulärraum, SR, sarkoplasmatisches Retikulum; PLC β , Phospholipase C (β -Isoform); DAG, Diazylglycerin; IP_3 , Inositoltriphosphat; R1, R2, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren; L1, L2 Liganden; GTP, Guanosintriphosphat; VC, CaCh, spannungsgesteuerter Calciumkanal; IP_3 -R, IP_3 -Rezeptor; PKC, Proteinkinase C

Für die $Ca_v2.3$ -Untereinheit konnten bei Koexpression mit verschiedenen M-Azetylcholinrezeptoren in HEK293-Zellen abweichende Effekte registriert werden⁸¹: Einer schnellen Inhibition durch ein $G\beta\gamma$ -Dimer folgte eine langsamere Stimulation, die möglicherweise durch das $G_q\alpha$ -Protein vermittelt wird⁸².

Innerhalb der Non-L-Typ-Familie werden $Ca_v2.2$ und $Ca_v2.3$ in HEK293-Zellen sowie $Ca_v1.2$ in der Gefäßmuskulatur durch Proteinkinase C-Aktivierung stimuliert, während sich die $Ca_v2.1$ -Untereinheit insensitiv verhält^{83,84,85}.

Im Falle der $Ca_v2.2$ -Untereinheit verhindert die Mutation von Thr422 oder Ser425 in der zytoplasmatischen Schleife zwischen Domäne I und II zu den entsprechenden Alaninresten die PKC-Stimulation. Darüber hinaus unterbindet die Phosphorylierung von Thr422 eine nachfolgende G_i -Protein-Inhibition des $Ca_v2.2$ -Proteins⁸⁶; nach Zamponi⁸⁷ wird dieser Effekt als „Cross talk“ bezeichnet. Dementsprechend überlappen die Bindungsplätze für PKC und $G\beta\gamma$ -Dimere.

1.2 Insulinsekretion als Beispiel einer regulierten Erregungs-Sekretionskopplung

Das Peptidhormon Insulin, welches u.a. die Glukose-Homöostase des Körpers steuert, befindet sich in der β -Zelle der pankreatischen Langerhans'schen Inseln in Vesikeln, die sowohl Speicher- als auch Transportfunktionen übernehmen. Da auch bei maximaler Stimulation der Insulinausschüttung nur ein geringer Teil des gespeicherten Hormons sezerniert wird, hängt die Insulinkonzentration im Blut in erster Linie von der Regulation der Sekretion und nicht von der Syntheserate des Hormons ab⁸⁸.

Die Insulinsekretion wird durch Calcium gesteuertⁱⁱⁱ. Ein komplexer Signalapparat vermittelt die Wirkungen von Stimulatoren und Inhibitoren auf den exozytotischen Prozess, in dem spannungsgesteuerte Calciumkanäle eine entscheidende Rolle spielen (Abbildung 3).

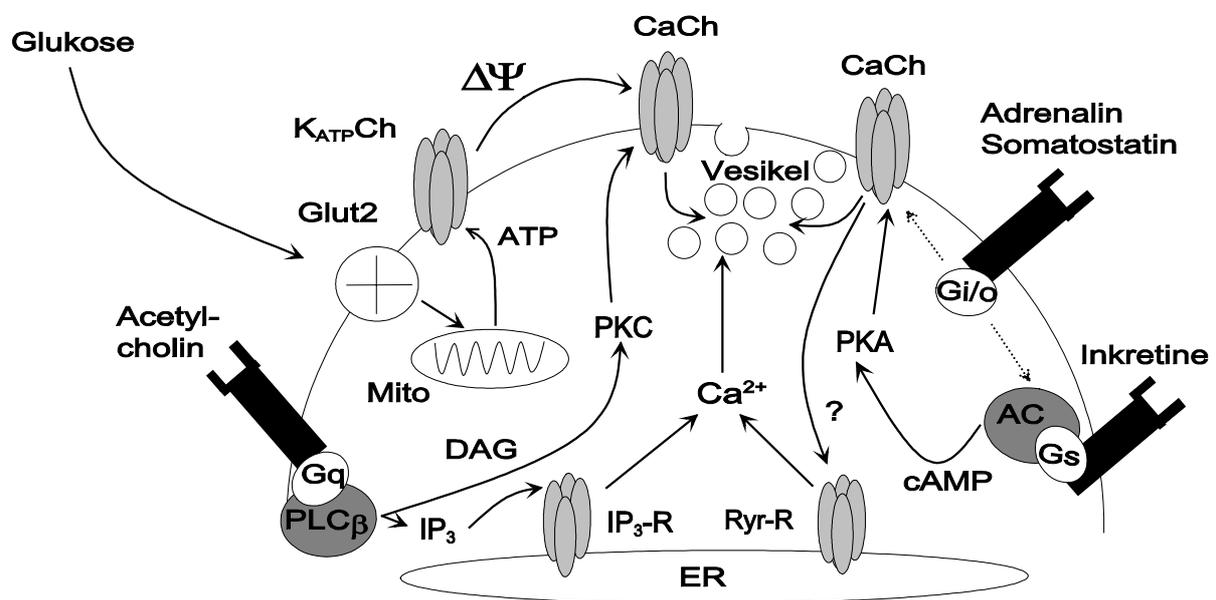


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Aktivierung bzw. Regulation der Insulinsekretion in β -Zellen Langerhans'scher Inseln.

In dem vereinfachten Schema sind die Interaktionen der Hauptsignalwege mit den spannungsgesteuerten Calciumkanälen beschrieben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden zwei Calciumkanäle eingezeichnet; sie stehen stellvertretend für die Gesamtheit der VGCCs. Abkürzungen: $K_{ATP}Ch$, ATP-aktivierter Kaliumkanal; $\Delta\Psi$, Membrandepolarisation; $CaCh$, spannungsgesteuerter Calciumkanal; GLUT2, Glukosetransporter Typ2; Mito, Mitochondrien; IP_3-R , IP_3 -Rezeptor; Ryr-R, Ryanodin-Rezeptor; G_x , G Protein; $PLC\beta$, Phospholipase C β -Isoform; AC, Adenylat-Zyklase.

Der inhibitorische Effekt der $G_{i/o}$ -Proteine ist durch gestrichelte Pfeile gekennzeichnet.

Aufnahme der Glukose über den Glukosetransporter GLUT2 und nachfolgende Metabolisierung führt zur Erhöhung des ATP/ADP-Verhältnisses und damit zur Schließung der ATP-sensitiven Kaliumkanäle ($K_{ATP}Ch$).

ⁱⁱⁱ Daneben existiert auch ein Ca^{2+} -unabhängiger Signalweg, der zur Insulinsekretion führt⁸⁸ und durch die Erhöhung der intrazellulären GTP-Konzentration ausgelöst wird; bei maximaler Stimulation vermittelt dieser Signalweg jedoch nur etwa 5% der Exozytose¹⁶⁷ und ist daher von geringerer physiologischer Bedeutung.

Ausgehend vom Ruhepotential der β -Zelle bei -70 mV kommt es zu einer langsamen Depolarisation, die, das Schwellenpotential von -50 mV überschreitend, zur elektrischen Aktivität der Plasmamembran führt. Aufgrund eines bislang unvollständig verstandenen Zusammenspiels von VGCCs und Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanälen⁹⁶ entstehen langsame Oszillationen des Membranpotentials („bursts“). Diese resultieren in Depolarisationsplateaus, die von Aktionspotentialen („spikes“) überlagert sind. Fusion und Entleerung der Insulin-haltigen Vesikel erfolgen im Zuge Ca^{2+} -getragener Aktionspotentiale. Sowohl für den L-Typ^{142,143} als auch für den P/Q-Typ¹⁴⁴ konnten bislang funktionelle Beteiligungen an der Insulinsekretion nachgewiesen werden.

Die Stimulation von VGCCs durch die Proteinkinasen A und C führt in β -Zellen zur Erhöhung der Sekretionsrate⁸⁹.

Inkretine⁹⁰ umfassen Hormone des Verdauungsprozesses wie GLP-1 (Glucagon-like peptid) oder GIP (glucose-dependent insulinotropic protein) und aktivieren durch Bindung an ihre Rezeptoren die cAMP-Signalkaskade, wodurch die nachfolgend aktivierte Proteinkinase A VGCCs stimuliert⁹¹.

Einen ähnlichen Effekt verursacht die Aktivierung des IP_3 -Signalwegs nach Bindung des parasymphatischen Transmitters Azetylcholin an den muskarinergen M2-Rezeptor. Die im weiteren Verlauf aktivierte Proteinkinase C phosphoryliert VGCCs und erhöht damit die Öffnungswahrscheinlichkeit⁹².

Der Depolarisations-induzierte Einstrom des Calciums ist stärker mit der Exozytose gekoppelt als das aus intrazellulären Speichern mobilisierte Ion⁹³. Dennoch potenziert die Öffnung der Calciumkanäle im ER die sekretorische Antwort auf die Erhöhung der Glukosekonzentration im Blut, z.B. durch Vergrößerung der Vesikelzahl, die zur Fusion mit der Plasmamembran zur Verfügung stehen⁹⁶. Aktivierung der intrazellulären IP_3 -Kaskade ermöglicht nachfolgend durch Öffnung des IP_3 -Rezeptors den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem ER in das Zytosol⁹⁴. Dies ist auch durch den Ryanodinrezeptor möglich⁹⁵; neben Calciumionen und c-ADP-Ribose wird dabei ein Depolarisations-abhängiger Mechanismus als Aktivator des ER-Calciumkanals diskutiert⁹⁶.

Die Hormone Somatostatin und Galanin sowie der sympathische Transmitter Adrenalin hemmen die Insulinsekretion. Nach Bindung der Hormone und Dissoziation der Rezeptor-assoziierten G_i - bzw. G_o -Proteine erfolgt die Inhibition durch direkte Interaktion der G-Proteine mit der Adenylat-Zyklase und K_{ATP} - sowie spannungsabhängigen Calciumkanälen⁹⁷.

1.3 Aufgabenstellung

Der $Ca_v2.3$ / R-Typ-Calciumkanal nimmt unter den HVA-Calciumkanälen eine Sonderstellung ein: Die elektrophysiologischen Eigenschaften der klonierten und heterolog exprimierten $Ca_v3.3$ -Untereinheit verhinderten eine eindeutige Zuordnung zu HVA- oder LVA-VGCCs. Wegen der Resistenz gegenüber verfügbaren Kanalblockern konnte seine physiologische Funktion in der Vergangenheit nicht untersucht werden.

Das porenbildende $Ca_v2.3$ -Protein wurde in unterschiedlichen Isoformen in mehreren Laboren kloniert. Die menschliche Isoform $Ca_v3.3d$ wies neben anderen Spleißvariationen als einzige im Carboxyterminus eine 129 bp lange Insertion auf. Während gezeigt werden konnte, dass Varianten mit kürzerem Carboxyterminus zentralnervös exprimiert werden, war unklar, ob die $Ca_v2.3d$ -Isoform auf einem Klonierungsartefakt oder einer *in vivo* exprimierten Variante beruht. Darüber hinaus bestand keine Kenntnis darüber, welche der permutativ möglichen Isoformen *in vivo* tatsächlich exprimiert werden.

Daher sollte zunächst die Struktur der $Ca_v2.3$ -mRNS in verschiedenen Geweben und *in vitro*-Zellsystemen ermittelt werden. Im Mittelpunkt der weiteren Arbeiten stand die Funktionsanalyse des $Ca_v2.3$ -Proteins.

Ziele der vorliegenden Arbeiten waren

- a) die Durchmusterung verschiedener Gewebe und Zellkultursysteme, um die Expression von $Ca_v2.3$ -Varianten nachzuweisen;
- b) die Etablierung eines geeigneten Zellkultur-Modellsystems, um Aussagen über die Bedeutung des Kanals für zellphysiologische Prozesse zu erhalten. In diesem Zusammenhang sollten die Auswirkungen transienter und stabiler Hemmung der Expression des $Ca_v2.3$ / R-Typ-Calciumkanals miteinander verglichen werden;
- c) Struktur-Funktionsanalysen rekombinanter $Ca_v2.3$ -Proteine im heterologen Expressionssystem und Regulationsmechanismen in geeigneten Modellsystemen zur Untersuchung der Regulation des $Ca_v2.3$ / R-Typ-Calciumkanals;
- d) die Übertragung der *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse auf die Situation *in vivo*.

2 Material

2.1 Zell- und Gewebematerial

2.1.1 Gewebepräparationen

2.1.1.1 Organentnahme

Gesunde Mäuse und Ratten aus der institutseigenen Tierhaltung wurden mittels zervikaler Dislokation (Maus) oder durch Begasung mit CO₂ (Ratte) getötet. Mit Hilfe eines mit Ethanol desinfizierten Präparierbestecks (Knochenschere und Skalpell) wurden die benötigten Organe entfernt, auf –80°C schockgefroren und anschließend zur RNS-Isolation weiterverarbeitet.

2.1.1.2 Isolation von Langerhans'schen Inseln

Langerhans'sche Inseln wurden mittels duktaler Injektion von Kollagenase P (Serva, Heidelberg) in den Pankreas von Ratten (200–300 g) und Mäusen (Alter 2-12 Monate) isoliert⁹⁸. Dazu wurde nach Betäubung der Tiere mit 6 mg Nembutal (Delta-Pharma, Pfullingen) pro 100 g Körpergewicht durch einen dazu berechtigten Arzt ein Katheter in den Ductus pancreaticus vom Darm kommend eingeführt. Anschließend wurden die narkotisierten Tiere durch Durchtrennung der Aorta carotis getötet. Alternativ wurden den Tieren erst nach Tötung durch den berechtigten Arzt der Katheter eingeführt. Durch den Katheter wurden vorsichtig 3 ml (Maus) bzw. 6,5 ml (Ratte) einer eisgekühlten Hanks-Lösung (siehe 2.2) injiziert, welcher 5,8 mM CaCl₂ und 0,3 mg/ml (Maus) bzw. 1 mg/ml (Ratte) Kollagenase (Serva, Heidelberg) zugegeben worden war. Dabei wurde darauf geachtet, dass der dorsale Abschnitt des Pankreas, indem sich die meisten Inseln befinden, befüllt wurde.

Der Pankreas wurde entnommen, in ein 50 ml-Röhrchen überführt, mit 6 ml Hanks-Medium übergossen und für 15 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 30 ml 4°C kaltem Hanks-Medium, dem 3%ig BSA (Biomol, Hamburg) zugesetzt worden war, und Überführung des Ansatzes auf Eis wurde der Verdau gestoppt. Durch eine Zentrifugation bei 120 x g und 4°C für eine Minute wurde das Gewebe sedimentiert und der Überstand dekantiert. Mit einer Spritze und einer 21-gauche Kanüle wurde die Gewebelösung fünfmal durch Zug und Druck möglichst ohne Schaumbildung mechanisch zerkleinert. Nach Auffüllen mit Hanks-Medium wurde erneut zu denselben Bedingungen zentrifugiert, der Überstand verworfen, das resuspendierte Gewebepellet dreimal durch die Kanüle gezogen, Hanks-Medium zugegeben und die Prozedur noch einmal wiederholt. Nach dem Dekantieren wurde das Sediment durch ein mit Hanks-Medium benetztes Sieb in eine schwarz emaillierte Glasschale gegeben. Unter einem Binokular konnten die Inseln von parakrinen Geweberesten durch ihre runde Form und ihre hellere Farbe unterschieden und getrennt werden. Obgleich die Ausbeute an intakten Inseln vom Alter der Tiere abhängt, konnten auf diese Weise etwa 100-200 Inseln aus Maus bzw. 300-500 Inseln aus Ratte isoliert werden.

2.1.2 Zellkultursysteme

2.1.2.1 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden für Experimente verwendet und von Dr. Pereverzev kultiviert:

βTC-3. (Insulinoma-Zelllinie der Maus; mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Walther, Greifswald)

Kultivierung: RPMI 1640 Medium ohne Glukose (Gibco BRL/ Life Technologies, Eggenstein) mit 2 mM L-Glutamin, 10% fötalem Kälberserum, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin sowie 0,8 mM Glukose

AtT20. (Adenohypophysen-Zelllinie der Maus, ECACC NO. 87021902)

Kultivierung: DMEM Medium (Gibco BRL/ Life Technologies, Eggenstein) plus 2mM Glutamin, 10% fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

AtT20-P. (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Philipson, Chicago)

Kultivierung: DMEM Medium (GibcoBRL/ Life Technologies, Eggenstein) plus 1,65 mM Glutamin, 5 mM Glukose, 15% Pferdeserum und 2,5% BSA

GH₃. (Adenohypophysen-Zelllinie der Ratte)

Kultivierung: RPMI 1640 (GibcoBRL/ Life Technologies, Eggenstein) plus 2 mM L-Glutamin, 15% Pferdeserum, 2,5% fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

HEK293-2C6. (embryonale Nieren-Zelllinie des Menschen, stabil transfiziert mit humanen α 1Ed-cDNA in pcDNA3¹²⁰)

Kultivierung: s. AtT20

INS-1. (Insulinoma-Zelllinie der Ratte, freundlicherweise von Prof. Dr. Wollheim zur Verfügung gestellt)

Kultivierung: RPMI 1640 (Gibco BRL/ Life Technologies, Eggenstein) plus 10% fötalem Kälberserum, 50 µl/l 2-Mercaptoethanol, 1mM Natriumpyruvat, 10 mM HEPES pH 7,4, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

N1E-115. (Neuroblastoma-Zelllinie der Maus)

Kultivierung: s. AtT20

NG108. (Hybridoma-Zelllinie aus murinen Neuroblastom und Gliom der Ratte)

Kultivierung: s. AtT20

NS20Y. (Neuroblastoma-Zelllinie der Maus)

Kultivierung: s. AtT20

RIN-a2. (Insulinoma-Zelllinie der Ratte)

Kultivierung: RPMI 1640 (Gibco BRL/ Life Technologies, Eggenstein) plus 2mM L-Glutamin, 10% fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

SH-SY5Y. (Neuroblastoma-Zelllinie des Menschen)

Kultivierung: s. AtT20

2.1.2.2 Embryonale Stammzellen und ES-Zellen-Aggregate

Die Kultivierung der embryonalen Stammzellen und ihrer Aggregate wurde von Dr. Stefan Arnhold (BLC 6) bzw. Dr. Eugen Kolossov (D3/Aat 17) durchgeführt:

Die embryonalen Stammzellen wuchsen auf Feeder-Monolayer, die aus 7-10 Tage alten Mäuseembryonen gewonnen werden. Diese enthalten hauptsächlich Fibroblasten, welche durch Freisetzung von LIF (leukemia inhibitory factor) die Differenzierung der pluripotenten Stammzellen verhindern.

BLC6. Die pluripotente Zelllinie BLC 6 wurde aus den Blastozyst-Zellen einer 129/Sv Gat-Maus isoliert⁹⁹. Die Zugabe von final 50-100 nM Retinolsäure¹⁰⁰ während der Aggregationsphase in hängenden Tropfen fördert das Auftreten neuronaler Zellen im wachsenden ES-Zellen-Aggregat¹⁰¹. Dieses Multizellsystem enthält auch Gliazellen und daneben in Mehrzahl nicht-neuronale Zellen und ist etwa 15-20 Tage in Kultur stabil. Nach Trypsinierung des Zellgemisches und Zählung der dissoziierten Zellen wurden pro Ansatz 400 Zellen in „hängenden Tropfen“ aus DMEM (Biochrom, Berlin), angereichert mit 20% fötalem Kälberserum (Gibco BRL/ Life Technologies, Eggenstein), 2 mM Glutamin (Gibco BRL), nicht-essentielle Aminosäuren (1:100-Verd. der Stammlsg von Biochrom), 100 U/ml Penicillin (Biochrom), 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom) und 50 µM β-Mercaptoethanol für zwei Tage im Brutschrank kultiviert (37°C, 5% CO₂). Anschließend wurden die Tropfen in 5 ml angereichertem DMEM abgespült und für weitere zwei Tage in Suspension gehalten. Die unter der Lupe sichtbaren ES-Zellen-Aggregate wurden in einzelne Vertiefungen einer 24-Loch-Gewebekulturschale („multi-well plate“, Nunc, GibcoBRL/ Life Technology, Eggenstein) auf Gelatine-beschichtete Glasplättchen pipettiert. Die Schalen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert; während der nachfolgenden Differenzierung bzw. Alterung wurde alle zwei Tage ein Mediumwechsel mit frischem supplementierten DMEM durchgeführt.

D3/Aat17. Die pluripotente Zelllinie D3 wurde ebenfalls aus Blastozysten-Zellen gewonnen¹⁰². Während der Wachstumsphase des ES-Zellen-Aggregates kommt es zur herzzellähnlichen Differenzierung sich spontan kontrahierender Bereiche („schlagende Areale“). Durch eine stabile Transfektion der D3-ES-Zelllinie mit dem Vektor pcAGGS, welcher die cDNS des grünen fluoreszierenden Proteins unter der Kontrolle des herzspezifischen α-Aktin-Promotor exprimiert, wurde der ES-Zellklon D3/Aat17 erzeugt¹⁰³.

2.1.2.3 Zellkultur stabil transfizierter INS-1-Klone

Auftauen. 10 ml supplementiertes RPMI-Medium (s. 2.1.2.1) wurde auf 37°C vorgewärmt und in einem sterilen Polypropylengefäß („pp-tube“) vorgelegt. Die Kryogefäße (Nunc, GibcoBRL/ Life Technology, Eggenstein) und die darin enthaltenen Zell-Aliquots wurden aus

dem Stickstofftank direkt in das 37°C Bad überführt und anschließend unter die sterile Werkbank gebracht. Nach äußerlicher Desinfektion mit 70%igem Ethanol wurde das Gefäß kurz über die Gasflamme gehalten, geöffnet und der Inhalt zum RPMI-Medium in das pp-tube überführt. Gewinde und Deckel des pp-tubes wurden kurz abgeflammt, das Gefäß geschlossen und für 5 min. bei 500 x g bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 2 ml RPMI-Medium durch zehnmaliges Aufziehen mit einer 1 ml-Pipette blasenfrei resuspendiert. Die Suspension wurde in eine sterile Petrischale (Ø 90 mm; Falcon) überführt, in der 8 ml angereichertes RPMI-Medium vorgelegt wurden. Nach Zugabe von Geneticin (G-418; Roth, Karlsruhe) bis zu einer finalen Konzentration von 1 mg/ml wurde die Zellsuspension im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Mediumwechsel. Nach zwei bis drei Tagen Inkubation wurde das alte Medium abgesaugt, der Zellrasen zweimal mit 10 ml sterilem PBS (siehe 2.3) gewaschen und dann 10 ml frisches angereichertes RPMI-Medium mit 1 mg/ml Geneticin zugegeben.

Zellpassagierung. Unter den angegebenen Bedingungen war der INS-1-Zellrasen nach 8-10 Tagen konfluent. Daher wurden die kultivierten Zellen wöchentlich passagiert. Das alte Medium wurde abgesaugt, dreimal mit 10 ml sterilem PBS (siehe 2.3) gewaschen und 3 ml einer Trypsinlösung (GibcoBRL, Eggenstein) zugegeben. Die Schale wurde für exakt drei Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die enzymatische Aktivität wurde durch Zugabe von 7 ml frischem RPMI-Medium unterbunden und die Zellen blasenfrei resuspendiert. Durch eine fünfminütige Zentrifugation mit 60 x g bei RT wurden die Zellen pelletiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde in 2 ml frischem RPMI-Medium resuspendiert, weitere 18 ml Medium zugegeben und kurz gemischt. 5-7 ml der Zellsuspension wurden in eine neue, sterile Petrischale überführt und diese zurück in den Brutschrank gebracht.

Zellpräparation für Sekretionsmessungen. INS-1-Zellen wurden nach dem Auftauen zunächst drei Wochen in Kultur gehalten, bevor sie für Sekretionsmessungen verwendet wurden. Dazu wurden in eine 24-Loch-Kulturplatte („multi-well plate“, Nunc, GibcoBRL/ Life Technology, Eggenstein) 250.000 Zellen pro Vertiefung plattiert. Um unnötige Arbeitsschritte zu vermeiden, wurde die Präparation parallel mit der Zellpassagierung durchgeführt. Nach Trypsinierung, Zentrifugation und Resuspension in final 20 ml frischem angereichertem RPMI-Medium wurden drei Tropfen der Zellsuspension auf eine saubere Thoma-Zählkammer pipettiert und nach einigen Minuten die Zellenzahl im Gitterquadrat bestimmt. Mit einer Seitenlänge des Quadrates von 1mm und einer Tiefe von 0,1 mm ergibt sich ein Zählvolumen von 0,1 mm³ bzw. 0,1 µl Medium. Durch geeignete Verdünnung wurde eine

Zellsuspensionsdichte von 250.000 Zellen/ ml eingestellt, je 1 ml in die Vertiefungen pipetiert und für drei Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.1.2.4 Expression rekombinanter Ca_v2.3d-cDNS in HEK293-Zellen

Die Kultivierung und transiente Transfektion von HEK 293-Zellen wurde von Dr. Pereverzev in Zusammenarbeit mit Prof. Klöckner etabliert¹²⁰:

Die Zellen wurden als Monolayer in Kultur gehalten (siehe 2.1.2.1) und bei geeigneter Zelldichte mit Hilfe der Calciumphosphat-Technik Methode (Mammalian transfection Kit; Stratagene, La Jolla, USA) transfiziert. Dazu wurden Vektoren des Typs pcDNA3 (Invitrogen, Groningen, Niederlande) verwendet, dessen Neomycin-Resistenzgen die Selektion der Zellen durch Zugabe von Geneticin zum Medium ermöglicht. Das Transfektionsgemisch enthielt daneben einen weiteren Vektor des Typs pEGFPC1 (Clontech, Heidelberg), der die cDNS des GFP-Proteins und ebenfalls das Neomycin-Resistenzgen trägt. Nach Inkubation für ein bis zwei Tage wurden bei der anschließenden elektrophysiologischen Untersuchung die Zellen dann gemäß ihrer Fluoreszenz ausgewählt.

2.1.3 Fremdpräparationen

Gesamt-RNS einer Körnerzellenprimärkultur aus dem Kleinhirn von Ratten (Tag (P)7 nach Geburt) wurde freundlicherweise von Prof. Pietrobon (Universität zu Padua, Italien) zur Verfügung gestellt⁵⁴.

2.1.4 Verwendete Mauslinien

Zur *in vivo*-Charakterisierung des Ca_v2.3-Proteins wurden Langerhans'sche Inseln aus folgenden Mausstämmen der hauseigenen Tierhaltung isoliert:

- C57Bl/6, Alter: 11-25 Wochen
- FVB/N, Alter: 5 Wochen
- $\alpha 1E$ (-/-), Alter: 11-25 Wochen

Im Rahmen der Untersuchungen konnte auf die zeitgleich in unserer Arbeitsgruppe von Dr. Pereverzev und Dipl.-Biol. Gissel erstellte Ca_v2.3-defiziente Mauslinie $\alpha 1E$ (-/-) zurückgegriffen werden¹⁰⁴. Die *in vivo*-Geninaktivierung wurde unter Verwendung des Cre/loxP-Systems¹⁰⁵ durchgeführt, welches im Institut für Genetik, Lehrstuhl Prof. Rajewski, entwickelt wurde.

Die erzeugte Mauslinie $\alpha 1E$ (-/-) weist keine pränatale Letalität oder einen auffälligen pathogenen Phänotyp auf und besitzt fertile Individuen. Die Wurfgrößen unterscheiden sich nicht von denen der entsprechenden Kontrolltiere und auch während der ersten 6-8 Wochen kann keine veränderte Physiologie der Nachkommen entdeckt werden. Ab diesem Zeitpunkt (Geschlechtsreife) jedoch zeigen die Ca_v2.3-defizienten Tiere und dabei besonders die Weibchen eine stärkere Gewichtszunahme als C57BL/6- bzw. Ca_v2.3(fl/fl)-Nachkommen¹⁰⁴.

Alle Mäuse wurden bei konstanten Temperaturen (22°C-23°C), Helligkeit zwischen 7:00 und 19:00 Uhr und freiem Zugang zu Wasser und Nahrung gehalten. Letztere bestand aus einer handelsüblichen Diät (Altromin, Lage) und enthielt 22,5% Protein-, 5% Fett- und 4,5% Ballaststoffanteile.

2.2 Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer und Lösungen

Im folgenden ist die Zusammensetzung im Text nicht näher beschriebener Puffer und Lösungen angegeben. Soweit nicht anders erwähnt, wurden die Feinchemikalien von Merck Eurolab, Darmstadt bezogen.

DEPC-H₂O: H₂O (MilliQ, Millipore, Molsheim) mit 0,01%(v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC; Amresco, Solon, USA) versetzen, die Lösung über Nacht unterm Abzug aufbewahren und am nächsten Tag autoklavieren

Hanks-Puffer: 137 mM NaCl (Roth, Karlsruhe)

5 mM KCl

2,7 mM CaCl₂ x 2 H₂O

0,8 mM MgSO₄ x 7 H₂O

4,2 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O

4,4 mM KH₂PO₄

4,2 mM NaHCO₃

1 mM HEPES (freie Säure; Sigma, Deisenhofen), pH 7,25

KRB: 20 ml „mixed salts“ (s.u.)

16 ml „NaCl-NaHCO₃“ (s.u.)

1 ml 1 M HEPES (Sigma, Deisenhofen)

63 ml H₂O tridest, pH 7,4

+ 0,5% BSA (Kat.Nr. A-2153; Sigma, Deisenhofen)

„mixed salts“: 605 mM NaCl

24 mM KCl

5 mM CaCl₂

3,5 mM KH₂PO₄

6 mM MgSO₄

„NaCl-NaHCO₃“: 91 mM NaCl

31 mM NaHCO₃

LB: 10 g Bacto-Trypton (Difco, Hamburg)

5 g Bacto-yeast-extract (Difco, Hamburg)

10 g NaCl

PBS: 136 mM NaCl

3,67 mM KCl

9 mM Na₂HPO₄

	1,7 mM KHPO ₄ , pH 7,4
PBST:	PBS (s.o.) + 0,1 % Tween-20
SOB:	20 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-yeast-extract 0,5 g NaCl
SOC:	SOB (s.o.) + 20 mM Glukose (Sigma, Deisenhofen)
SSC (20x):	3 M NaCl 0,3 M Natrium-acetat
TBE:	50 mM Tris-Borsäure, pH 7,4 (Sigma, Deisenhofen) 1 mM EDTA (Sigma, Deisenhofen)
TE:	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 0,1 mM EDTA
TENS:	TE-Puffer + 150 mM NaOH 0,75%(w/v) SDS (Sigma, Deisenhofen)

2.3 Oligodesoxynukleotide

Oligodesoxynukleotide wurden entweder von Eurogentec (Seraing, Belgien), GibcoBRL (Karlsruhe) oder dem Institut für Genetik, Universität zu Köln bezogen.

2.3.1 Oligonukleotide für die Expressionsanalyse

Die verwendeten Oligonukleotidpaare der RT-PCR-Analyse sind jeweils in Sense- (+) oder Antisense- (-) Orientierung in 5'→3'-Richtung als Vorwärts (V) oder Revers (R)-Oligonukleotid angegeben und numeriert. Die Accession Nummer in GenBank (NCBI, Bethesda, USA) und die Sequenzposition auf dem betreffenden Gen sind in Klammern dargestellt (Tabelle 2).

Im Falle der Ca_v2.3-Untereinheit (Tabelle 3) wurden die Oligonukleotidprimer flankierend zu variablen Bereichen der publizierten Sequenzen angepasst und nicht entsprechend der Synthesesoftware (siehe 3.1.6.1) entworfen.

2.3.2 Oligonukleotide für die Struktur-Funktionsanalyse

Zur Generierung des Antisense-Fragments (siehe 4.2), der Punktmutationen (siehe 3.1.5.6) sowie zur Chimärenkonstruktion und cDNS-Deletion von α1E-Varianten, die in der Modulationsanalyse (siehe 4.5) untersucht wurden, wurden PCR-Synthesen durch *Pwo*-Polymerasen mit Enzym-katalysierter Fehlerkorrektur (siehe 3.1.6.3) verwendet. Die dabei eingesetzten Oligonukleotide sind in Tabelle 4 dargestellt.

Gen	+/-	Maus	Größe /bp	Ratte	Größe /bp
Ca _v 1.2	V R	1243 (L01776: nt 3456 - 3476) 5'-TCA GCC CAA AAG GAG GAG GAA-3' 1242 (nt 3848 - 3829) 5'-GTG GCA CTG CAG GCG GAA CC-3'	393	3252 (M67515: nt 2843- 2860) 5'-CCC CCG GCC CCT GTC TGA-3' 3249 nt 3311 - 3292) 5'-CCC CTT GGC CCT GTT GAT GG-3'	469
Ca _v 1.3	V R	763 5'-AAA ATT GCC AGA AAA GAA AG-3' 762 5'-CTG GCT TCG GGC ATG GG-3'	266	763 (M57682: nt 2849 - 2868) 5'-AAA ATT GCC AGA AAA GAA AG-3' 762 (nt 3114 - 3098) 5'-CTG GCT TCG GGC ATG GG-3'	266
Ca _v 2.1	V R	761 (U76716: nt 3040 - 3056) 5'-GGT CCC GCC TTG GCC AC-3' 760 (nt 3374 - nt 3358) 5'-CTG TAG GGC GGC ATG GG-3'	335	761 (M64737: nt 3184 - 3200) 5'-GGT CCC GCC TTG GCC AC-3' 760 (nt 3518 - nt 3502) 5'-CTG TAG GGC GGC ATG GG-3'	335
Ca _v 2.2	V R	759 (U04999: nt 3280 - 3296) 5'-CGG ATG GGC AGT CAG CC-3' 758 (nt 3467 - nt 3451) 5'-CTG TAG GGA ACG ATG GG-3'	188	759 (M92905: nt 3190 - 3206) 5'-CGG ATG GGC AGT CAG CC-3' 758 (nt 3377 - 3361) 5'-CTG TAG GGA ACG ATG GG-3'	188
HPRT	V R	9799(J00423: nt 576 – 594) 5'-GCT GGT GAA AAG GAC CTC T-3' 9798(J00423: nt 824 – 805)	249	9799 (M63983: nt 587 – 605) 5'-GCT GGT GAA AAG GAC CTC T-3' 3251 (nt 832 – 813) 5'-CAC AGG ACT AGA ACG TCT GC-3'	246

Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten Analyse-Oligonukleotidpaare.

Region	+/-	Maus	Größe /bp	Ratte	Größe /bp
Amino-terminus	V R	3419 (L29346: nt 610 - 629) 5'- GCT TCG GGG AGG CGG TGG TC-3' 3417 (nt 963 - 943) 5'-TGG GGG TCT TGT CAT CCT CAG-3'	354	3420 (L15453: nt 44 - 67) 5'-TGG AGC GAT TCA TAC CTG TTC TTC-3' 3418 (nt 315 - 296) 5'-GCG GCC AAT CGA TGA GTT TC-3'	272
Carboxy-terminus	V R	524 (L29346: nt 6396- 6416) 5'-CTG AGT GGT CGG AGT GGA TAC-3' 525 (nt 6764 - 6744) 5'-AGA GAG GAG GTG CTT TCG TTC-3'	369	524 (L15453: nt 5835 - 5855) 5'-CTG AGT GGT CGG AGT GGA TAC-3' 3250 (nt 6203 - 6183) 5'-AGA GAG GAG ATG CTT TCG TTC-3'	369
II-III-Schleife	V R	- -		3643 (L15453: nt 2246-2263) 5'- GGA GGT CAG CCC GAT GTC- 3' 3642 (L15453: nt 2665-2648) 5'-GGG CTC CTC TGG TTG TCC-3'	420, 399, 363

Tabelle 3: Sequenzen Ca_v2.3-spezifischer Analyse-Oligonukleotidpaare.

Name	Matrize	+/-	Position des 5`-Nukleotids und Sequenz
a1e-asf	Ca _v 2.3	V	nt182 5`-GCA GAG GGC GAC <u>TAT</u> GGC TTT GTA-3` ¹
a1e-asr	Ca _v 2.3	R	nt 1292 5`-CAA AAG GAG CCG GAC GGA GG-3`
2692 (532)	Ca _v 2.3	V	nt1387 5`-AAA GGC TTC TGC GCA TCG CGA T-3`
2693 (533)	Ca _v 2.3	R	nt 1890 5`-TAA ACC TGC CTC CAA ATA ACT GC-3`
2778 (542)	Ca _v 2.3	V	nt 219 5`-GGA GAA GAT AAC ATT GTC AGG AAA T-3
2779 (543)	Ca _v 2.3	R	nt 1417 5`-ATG TGG CGA ATG GCG ATG C-3`
3161 (548)	Ca _v 2.1	R	nt 1761 5`-AAC TGA GTA CAG TCC AGT AGA A-3`
3162 (550)	Ca _v 2.3	V	nt 1234 5`-GAA GGG CAG CCA TCA AGA GG-3`
3163 (551)	Ca _v 2.3	R	nt 1266 5`-CCT CTG TCC GGC CCC TCT T-3`
3164 (549)	Ca _v 2.3	R	nt 1266 5`-CCT CTG TCC GGC TCC TCT T-3`
3165 (552)	Ca _v 2.1	V	nt 1279 5`-GGA ACT GGT TGT ACT TCA TCC-3`
50272511 (NC-Link)	Ca _v 2.3	R	nt 113 5`-GGA TCG ATG GCC GCC TGC CCC GAG GCC GG-3` ²
607742 (HN-Kozak)	Ca _v 2.3	V	nt 150 5`- TTA AGC TTA ATT AAA CCT CAG GAT GGC TTT GTA CAA CCC C-3` ³
T7- Standard	pcDNA3	V	nt 863 5`-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3`

Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten Synthese-Oligonukleotidpaare.

(1) Das unterstrichene ATG-Trinukleotid entspricht dem Startcodon der cDNS.

(2) Die ersten beiden Guanin-Nukleotide wurden eingeführt, um den nachträglichen Verdau mit *Cla* I (ATCGAT) zu ermöglichen, dann beginnt die Ca_v2.3-spezifische Sequenz mit nt 113.

(3) Am 5`-Ende dienen die beiden Thymidin-Nukleotide wieder zur Optimierung der nachfolgenden *HinD* III-Erkennungssequenz (AAGCTT); dann folgen 14 Basen einer Minimal-Kozak-Sequenz (AAT-TAAACCTCAGG), bevor die Sequenz mit dem Startcodon ATG (nt 150) Ca_v2.3-spezifisch wird.

2.4 Vektoren

- pcDNA3 (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

modifiziert: pcDNA3.1+ Ca_v2.3d_{hum} (freundlicherweise von Dr. Pereverzev zur Verfügung gestellt)

- pcAGGS (freundlicherweise von Prof. Okabe, Osaka, Japan zur Verfügung gestellt)

modifiziert: pcAGGS + α -Aktin-Promotor + GFP (freundlicherweise von Dr. Kolossov, Institut für Neurophysiologie der Universität zu Köln zur Verfügung gestellt)

- pGemZf3- (Stratagene, Heidelberg)

modifiziert: pGemZf3- + Ca_v2.3d_{hum} (freundlicherweise von Dr. Schneider zur Verfügung gestellt)

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Arbeiten

3.1.1 Genetische Transformation von *E. coli*

3.1.1.1 Verwendete Bakterienstämme

Als Wirtszellen für Experimente mit rekombinanter DNS wurden folgende kommerziell erhältlichen *E. coli*-Stämme verwendet:

XL1-Blue strain: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB laqI^q* T Δ M15 Tn10 (Tet^r)] (Stratagene, Heidelberg)

XL2-Blue strain: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB laqI^q* T Δ M15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r] (Stratagene, Heidelberg)

DH5 α F': *supE44 Δ lacU169 (Φ 80 *lacZ* Δ M15) hsdR17 *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1**

Durch Vorbehandlung mit Schwermetallsalzen nach Hanahan¹⁰⁶ wurde die Transformations-effizienz der erhaltenen „kompetenten“ Zellen erhöht.

3.1.1.2 Genetische Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut, je 50 μ l in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß pipettiert und mit 10-100 ng Plasmid-DNS bzw. 1-3 μ l eines Ligationsmixes (siehe 3.1.5.3) durch Pipettieren gemischt. Nach Inkubation von 30 min auf Eis, währenddessen Plasmid-DNS und *E. coli*-Zellwand ein lockeres Aggregat bilden, wurde der Transformationsansatz exakt 1 min im Wasserbad auf 42°C erhitzt und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Durch Zugabe von 1 ml SOC-Medium (siehe 2.3) unter der sterilen Werkbank und Inkubation bei 37°C mit 250 Upm für 1 h auf einem Inkubator-Schüttler (Incubator shaker G25; New Brunswick Scientific Co., Edison, USA) wurden die überlebenden Bakterien vermehrt. Anschließend wurden die Zellen mit 2700 x g für 5 min bei RT pelletiert, 950 μ l des Überstandes verworfen und das Bakterienpellet in den restlichen 50 μ l resuspendiert. Dieser Ansatz wurde

auf LB-Agarplatten, die Ampicillin (Serva, Heidelberg) in einer finalen Konzentration von 100 µg/ml enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die transformierten Zellen wurden während des nächtlichen Wachstums anhand der plasmidkodierten Ampicillin-Resistenz selektioniert.

3.1.2 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

3.1.2.1 Isolierung genomischer DNS aus kultivierten Zellen

In Kultur gehaltene INS-1-Zellen wurden in einer sterilen Petrischale (Ø 6 cm) bis zur Konfluenz gezüchtet (2-5 Mio. Zellen). Das Medium wurde abgesaugt und einmal mit warmen PBS gewaschen. Zur Lyse wurden 3 ml Digestion buffer + 0,05%(w/v) Proteinase K (Roche biochemicals, Mannheim) zugegeben, die Zellen durch gleichmäßiges Verteilen mit der Pipettenspitze lysiert, die viskose Lösung in zwei 500 µl-Aliquots aufgetrennt und in zwei pptubes überführt.

Digestion buffer (pH 8,0):

100 mM NaCl

10 mM Tris-HCl

25 mM EDTA

0,5%(w/v) SDS

Der Verdau wurde über Nacht bei 50°C auf dem Schüttler fortgesetzt.

Das Zellhomogenat wurde mit 3 ml Tris-gepuffertem Phenol (pH 7,9; Roth, Karlsruhe) versetzt und bei RT unter leichtem Schütteln für 30 min extrahiert. Nach Zugabe von 500 µl Chloroform (Amresco, Solon, USA) wurde zur Phasenseparation mit 2000 x g für 10 min zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit frischem Phenol/Chloroform (1:1) und Wiederholung der Inkubation- und Zentrifugationsschritte solange extrahiert, bis die Interphase klar blieb. Nach Zugabe von 1/4 Vol. 10 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen Ethanol p.a. wurde durch Schütteln für 20 min die Präzipitation der genomischen DNS eingeleitet. Nach einer Zentrifugation mit 2000 x g für 15 min, Verdampfen des Überstandes und Waschen des Pellets mit 70%(v/v) Ethanol wurde die präzipitierte DNS für 30 min bis 1 h bei RT luftgetrocknet. Zum Auflösen der DNS wurden 100 µl TE-Puffer zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde mit einer abgeschnittenen gelben Pipettenspitze, um Scherungskräfte zu minimieren, kurz homogenisiert und abschließend 1 µl zur photometrischen Konzentrationsbestimmung bei 260 nm entnommen.

3.1.2.2 Isolierung von Gesamt-RNS aus Rattengewebe und ES-Zellen-Aggregaten

Gesamt-RNS aus dem Hirngewebe adulter Ratten bzw. kultivierten BLC6-Zell-Aggregaten wurde nach der Methode von Chomczynski und Sacchi¹⁰⁷ isoliert. Dabei treten im sauren

Milieu einer phenolhaltigen Emulsion die RNS bevorzugt in die wässrige und die weniger azide DNS sowie die durch das chaotrope Guanidiniumthiozyanat denaturierten Proteine eher in die organische Phase über. Im folgenden wird das Protokoll zur Präparation aus Organewebe beschrieben; die Präparation von Gesamt-RNS aus kultivierten BLC6-Zell-Aggregaten wurde entsprechend angewendet, allerdings ohne die Homogenisation im flüssigem Stickstoff.

Frisch getöteten Ratten wurden auf Eis die Gehirne entnommen und im Tiefkühlschrank bei -80°C gelagert. Die Gewebe wurden unter flüssigem Stickstoff im Mörser zu einem feinen Pulver zermahlen, von dem etwa 1 g Feuchtgewicht in 15 ml Lysepuffer A überführt wurden.

Lysepuffer A (pH 7,0):

4,23 M Guanidiniumthiozyanat (Amresco, Solon, USA)

50 mM Kaliumphosphat^{iv}

10 mM EDTA

1%(v/v) β -Mercaptoethanol (Amresco, Solon, USA)

0,5%(v/v) Natrium-N-Laurylsarcosin

0,1%(v/v) Anti-foam (Sigma, Deisenhofen)

Mit Hilfe eines Ultra-Turrax (JKA-Labortechnik, Fisher Scientific, Düsseldorf) wurde die Suspension eine Minute lang homogenisiert und anschließend durch eine Zentrifugation mit $2750 \times g$ für 10 min bei 4°C von unlöslichen Rückständen befreit.

Zum löslichen Überstand wurden 0,1 Vol. 2 M Natriumacetat, pH 4,0, 1 Vol. saures wasser-gesättigtes Phenol (Amresco, Solon, USA) und 0,4 Vol. Chloroform gegeben. Der Ansatz wurde gründlich gemischt und für 15 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation mit $2500 \times g$ für 20 min bei 4°C wurde die organische Phase verworfen, der wässrige Überstand in ein neues Plastikgefäß überführt und mit 0,5 Vol. saurem, wasser-gesättigtem Phenol und 0,5 Vol. Chloroform versetzt, gevortext, für 15 min auf Eis inkubiert und unter den gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Diese Extraktionen wurden solange wiederholt, bis die Zwischenphase nach der Zentrifugation klar blieb.

Die Präzipitation der gereinigten RNS erfolgte mit 1 Vol. Isopropanol über Nacht bei -20°C . Am nächsten Tag wurde die Lösung mit $2500 \times g$ für 20 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig dekantiert und das Pellet mit 2 ml eiskaltem, auf -20°C vorgekühltem 70%(v/v) Ethanol gewaschen. Nach 10 minütiger Zentrifugation mit $2500 \times g$ bei 4°C wurde der Überstand verworfen und der Waschschrift noch einmal wiederholt. Der Rückstand wurde in 2 ml Wasser gelöst, zweimal mit 1 Vol. Phenol/Chloroform (1:1 Vol., pH 6,5-7 durch Zugabe von Tris-HCl eingestellt) und einmal mit 1 Vol. Chloroform extrahiert. Es folgte eine erneute Präzipitation der RNS in final 70% Ethanol über Nacht bei 4°C . Am nächsten Tag wurde der Überstand nach einer Zentrifugation mit $2500 \times g$ für 20 min bei 4°C dekantiert

^{iv} 1M „Kaliumphosphat“ wurde hergestellt aus 61,5 %(v/v) 1 M K_2HPO_4 und 38,5 %(v/v) 1 M KH_2PO_4 .

und der Niederschlag noch zweimal mit kaltem 70%(v/v) Ethanol nachgewaschen. Das feuchte Pellet wurde mit Hilfe einer Speedvac-Zentrifuge (Maxi dry plus™) im Vakuum getrocknet und in DEPC-behandeltem Wasser (siehe 2.3) aufgenommen

Jede RNS-Charge wurde spektrophotometrisch quantifiziert (siehe 3.1.4.1; Verdünnungen zwischen 0,5 –3 µg GesamtRNS/ µl H₂O-DEPC) und durch eine denaturierende Gelelektrophorese (siehe 3.1.3.2) bzw. eine RT-PCR mit Housekeeper-Oligonukleotiden (siehe 3.1.6) auf ihre Qualität hin überprüft.

3.1.2.3 Isolierung von Gesamt-RNS aus kultivierten Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNS aus kultivierten Zellen wurde auch mit Hilfe des HighPure RNS Isolation Kit™ (Roche molecular biochemicals, Mannheim) durchgeführt. Dabei werden in Gegenwart eines chaotropen Salzes Nukleinsäuren spezifisch an Glasvlies-Oberflächen gebunden. Durch eine DNase I-Verdauungsreaktion direkt auf dem Glasvlies werden Reste kontaminierender DNS abgebaut. Durch sukzessives Waschen mit sinkender Ionenstärke und steigendem Ethanolgehalt werden unerwünschte Zellbestandteile, Nukleotide und Kontaminationen entfernt, während die Nukleinsäuren am Silikagel gebunden bleiben. Nach der finalen Zugabe von reinem, DEPC-behandeltem Wasser wird die RNS von der Matrix eluiert. In Kultur gehaltene Zelllinien wurden in einer sterilen Petrischale (Ø 9 cm) bis zur Konfluenz angezogen (5-10 Mio. Zellen). Das Medium wurde verworfen und zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Durch Zugabe von 400 µl PBS und 800 µl Lysepuffer und gleichmäßigem Verteilen mit der Pipettenspitze wurden die Zellen lysiert.

Lysepuffer (pH 6,6):

4,5 M Guanidiniumchlorid
50 mM Tris-HCl
10%(w/v) Triton X-100

Das erhaltene, zähflüssige Lysat wurde einige Male durch Pipettieren in einer 1 ml Pipette homogenisiert, bevor es auf die Glasvliese zweier High Pure-Filter-Gefäße gegeben wurde. Nach einer kurzen Zentrifugation mit 10800 x g für 1 min wurde der Durchlauf verworfen und pro Gefäß 100 µl DNase I-Lsg. (enthält 180 U DNase I, 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl und 10 mM MnCl₂, pH 7,0) pipettiert. Es wurde 15 min bei RT inkubiert, dann 500 µl Waschpuffer I hinzugegeben, mit 10800 x g/ 1 min zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die Prozedur wurde mit 500 µl Waschpuffer II wiederholt.

Waschpuffer I:

5 M Guanidiniumchlorid
20 mM Tris-HCl
37,5%(v/v) Ethanol

Waschpuffer II:

20 mM NaCl
2 mM Tris-HCl
80%(v/v) Ethanol

Nach Zugabe von 200 µl Waschpuffer II mit 10800 x g/ 3 min zentrifugiert, um verbliebene Pufferreste aus dem Glasvlies zu entfernen. Die gebundene Gesamt-RNS wurde in 50 µl DEPC-behandeltem Wasser eluiert.

Jede RNS-Charge wurde spektrophotometrisch quantifiziert und durch eine vergleichende RT-PCR (siehe 3.1.6) auf ihre Integrität hin überprüft.

3.1.2.4 Analytische Plasmid-DNS-Isolierung aus *E. coli*

Die analytische Plasmid-DNS-Isolierung erfolgte nach detergenten, alkalischer Lyse¹⁰⁸ der Bakterien. 200 µl einer Übernachtskultur von *E. coli* wurden mit 200 µl TENS-Puffer (siehe 2.3) versetzt, vorsichtig geschwenkt und für 10 min bei RT inkubiert.

Nach Ansäuerung der Suspension durch Zugabe von 150 µl 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und vorsichtigem Schwenken wurde für weitere 20 min bei 4°C inkubiert, so dass die ausgefällten Proteine und überschüssiges SDS sedimentierten. Diese unlöslichen Bestandteile wurden durch eine Zentrifugation mit 10800 x g/ 15 min bei 4°C abgetrennt. 450 µl des Überstandes wurden zu 1 ml absolutem Ethanol pipettiert und die Plasmid-DNS während 2 h bei -20°C oder 30 min bei -80°C ausgefällt. Nach Zentrifugation mit 10800 x g für 30 min bei 4°C wurde der Überstand dekantiert, mit 300 µl 70%(v/v) Ethanol gewaschen und das Pellet anschließend bei 30°C getrocknet. Plasmid-DNS sowie koprizipitierte RNS wurden in 20 µl Wasser aufgenommen, Identität und Reinheit durch Restriktionsanalyse (siehe 3.1.5.1) mit gleichzeitigem RNase A-Verdau (final 40 µg/ml; Qiagen, Hilden) und nachfolgender Agarsegelelektrophorese (siehe 3.1.3.1) überprüft.

3.1.2.5 Präparative Plasmid-DNS-Isolierung aus *E. coli*

Präparative Plasmidisolierungen aus 50-200 ml *E. coli*-LB-Medium erfolgten nach alkalischer Lyse der Bakterien und saurer Ausfällung von Proteinen und Zelldebris unter Verwendung von Anionentauschersäulen auf Kieselgel-Basis (Qiagen-Plasmid Midi bzw. Maxi Kit™; Qiagen, Hilden). Die Trennung von RNS und verbleibenden Zellrückständen erfolgt auf der Anionentauschersäule durch mehrfaches Waschen mit geringerer Ionenstärke, bevor die Plasmid-DNS zuletzt in einem Milieu hoher Ionenstärke eluiert wird.

Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation mit 6000 x g für 15 min bei 4°C pelletiert und der Niederschlag in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Die Zellen wurden in 10 ml Puffer P2 5 min bei RT aufgeschlossen und die alkalische Lösung durch Zugabe von 10 ml Puffer P3 für 20 min auf Eis neutralisiert; Zusammensetzung der Puffer:

<u>P1 (pH 8.0):</u>	<u>P2:</u>	<u>P3 (pH 5.5):</u>
50 mM Tris-HCl	200 mM NaOH	3 M Kaliumacetat
10 mM EDTA	1%(w/v) SDS	
100 mg/l RNase I		

Nach einer Zentrifugation mit 26000 x g für 30 min bei 4°C wurde der Überstand sofort entnommen und durch sterilen Verbandmull auf eine Qiagen-Midi-tip Säule gegeben. Während der Zentrifugation wurde die Säule zunächst mit 4 ml Puffer QBT äquilibriert. Der Überstand wurde auf das Qiagen-Midi-tip aufgetragen und die Säule mit zweimal 30 ml Puffer QC gewaschen. Die Plasmid-DNS wurde mit Puffer QF eluiert und das Eluat mit 0,7 Volumen Isopropanol bei RT für 30 min präzipitiert und mit 15000 x g für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Zusammensetzung der Puffer:

<u>QBT (pH 7,0):</u>	<u>QC (pH 8,5):</u>	<u>QF (pH 8,5):</u>
750 mM NaCl	1 M NaCl	1,25 M NaCl
50 mM MOPS	50 mM Tris-HCl	50 mM Tris-HCl
15%(v/v) Ethanol	15%(v/v) Ethanol	15%(v/v) Ethanol
0,15%(v/v) Triton X-100		

Nach Waschen mit 10 ml 70%(v/v) Ethanol und Trocknen bei 30 °C wurde in 100-200 µl Wasser aufgenommen. Die Identität und Reinheit des Plasmids wurde durch Restriktionsanalyse (siehe 3.1.5.1) und Agarosegelelektrophorese (siehe 3.1.3.1) überprüft und die Konzentration der Plasmid-DNS bei 260 nm spektrophotometrisch bestimmt.

3.1.2.6 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gelen (siehe 3.1.3.1) erfolgte unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit™ (Qiagen, Hilden) mit Hilfe der Silikagel-Technologie (siehe 3.1.2.3) durch selektive Adsorption von DNS an Silikat in Gegenwart von chaotropen Salzen. Die Zusammensetzung der Puffer ist aus patentrechtlichen Gründen nicht bekannt.

DNS-haltige Banden wurden nach elektrophoretischer Auftrennung in Agarose-Gelen aus dem Gel herausgeschnitten. Zu je 100 mg Gel wurden 300 µl Puffer QG gegeben und bei 50°C 10 -20 min inkubiert, bis das Gelstück völlig aufgelöst war. Nach Zugabe von 100 µl Isopropanol pro 100 mg Gel wurde die Mischung auf eine QIAquick Spin-Säule gegeben. Durch Zentrifugation mit 10800 x g für 2 min, Dekantierung des Durchlaufs und Zugabe von 750 µl Puffer PE und Inkubation für 5 min, erneute Zentrifugation mit 10800 x g/ 5 min und Verwerfen des Durchlaufs wurde die gebundene DNS von Agarose-, Puffer- und Farbstoffresten gereinigt. Nach Zugabe von 30-50 µl H₂O auf die Säulenmatrix wurde zwei Minuten gewartet, bevor durch eine finale Zentrifugation mit 10800 x g für 3 min die Nukleinsäure eluiert wurde.

3.1.2.7 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Lösungen

DNS-Fragmente, die durch enzymatische Reaktionen erzeugt oder modifiziert wurden (Restriktionsverdau, Ligation, RT-PCR o.ä.) wurden mit Hilfe des QIAquick PCR purification

Kit™ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Es stellt eine modifizierte Variante des QIAquick Gel Extraction Kit™ (Qiagen, Hilden) dar und basiert auf demselben Prinzip (siehe 3.1.2.6). Die Zusammensetzung der Puffer ist aus patentrechtlichen Gründen nicht bekannt.

Zu der zu extrahierenden Lösung wurde das dreifache Volumen Puffer PB gegeben, kurz gevortext und die Mischung auf eine QIAquick Spin-Säule überführt. Die weiteren Wasch- und Elutionsschritte entsprachen denen, die in 3.1.2.6 beschrieben wurden.

3.1.3 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Aufgrund ihrer negativen Überschlußladung wandern Nukleinsäuren im elektrischen Feld zur Anode. Da die chemischen Unterschiede zwischen Nukleinsäuren eher gering sind, hängt die Wanderungsgeschwindigkeit in einem Gelsieb in erster Linie von der Molekülgröße ab, so dass kleinere Moleküle schneller durch das Gel wandern. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid zwischen die Basen der Nukleinsäuren und nachfolgendem Elektronentransfer erscheint der entstandene Komplex nach Anregung mit UV-Licht im sichtbaren Bereich als rot-orange leuchtende Bande, ohne dass sich das Laufverhalten ändert.

3.1.3.1 DNS-Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNS-Fragmente erfolgte in 0,7-2,5%(w/v)-igen Agarosegelen. Die dazu benötigte Menge Agarose (Roth, Karlsruhe bzw. Seakem, Rockland, USA) wurde im Gelpuffer 0,5xTBE suspendiert und durch kurzzeitiges Erhitzen in der Mikrowelle (für 50 ml: 3 min 33 sek bei 360 Watt) gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 70°C wurde Ethidiumbromid (Roche molecular biochemicals, Mannheim) in der finalen Konzentration 0,1 µg/ml hinzugefügt und die Lösung in eine vorbereitete Gelhalterung gegossen.

0,1-1 µg der zu untersuchenden DNS-Fragmente wurden in folgender Lösung angesetzt (bei größeren Mengen entsprechende Vielfache):

Agarosegel-Auftragungsmix:

1 µl Puffer H™10x (Amersham, Braunschweig)

2 µl Dye E 190™ (Amresco, Solon; USA)

10 µl H₂O

Nach dem Erkalten des Gels erfolgte die elektrophoretische Trennung bei RT in einer horizontalen Kammer zwischen 17 Volt (über Nacht) und 120 Volt. Fluoreszierende DNS-Banden konnten durch Auflegen auf einen UV-Strahler (Herolab™ UV-T 28M) mit Hilfe einer Videokamera (UVP) photographiert werden.

3.1.3.2 Denaturierende RNS-Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Ribonukleinsäuren erfolgte in 1,2%(w/v)-igen Agarosegelen unter denaturierenden Bedingungen, um die gegenüber DNS-Molekülen weitaus stabileren RNS-

Sekundärstrukturen, die zu einem größenunabhängigen Laufverhalten führen, zu eliminieren. Der Gelpuffer wurde folgendermaßen angesetzt:

RNS-Gelpuffer (ad 50 ml):

10 ml 37%(v/v) Formaldehyd (Sigma, Deisenhofen)

5 ml MOPS10x-Laufpuffer, pH 7,0

35 ml DEPC-behandeltes H₂O

12 µl eines Denaturierungspuffers wurden zu ca. 2 µg Gesamt-RNS und 1 µl Ethidiumbromid (Stammlösung 5 mg/ml) gegeben und für 5 min auf 65°C erhitzt. Da Ethidiumbromid wesentlich schlechter in Einzelstrang-Nukleinsäuren interkaliert, wurde der Farbstoff direkt zur Probe hinzugegeben. Der Denaturierungspuffer war folgendermaßen zusammengesetzt:

Denaturierungspuffer (ad 90 µl):

60 µl Formamid (Roth, Karlsruhe)

20 µl Formaldehyd (Sigma, Deisenhofen)

10 µl MOPS10x-Laufpuffer

Die Probe wurde für 10 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 3 µl des Auftragepuffers wurde das Gemisch in einer horizontalen Gelkammer bei 60–90 Volt elektrophoretisch getrennt. Zusammensetzung des Auftragepuffers:

Auftragepuffer:

50 mM HEPES, pH 7,0 (Roth, Karlsruhe)

10% Ficoll (Amersham pharmacia biotech, Freiburg)

0,25% Bromphenolblau (Amersham pharmacia biotech, Freiburg)

Die Integrität und damit die Qualität der isolierten RNS wurde anhand der diskreten ribosomalen Banden für die 18 S- und 28 S-rRNS abgeschätzt, die im Idealfall ein Intensitätsverhältnis von 2:1 zugunsten der oberen Bande aufweisen.

3.1.3.3 Größenstandards

Zur Größenermittlung der elektrophoretisch aufgetrennten DNS-Fragmente wurden parallel auf allen Gelen die folgenden Größenstandards aufgetragen und getrennt:

Zur Ermittlung größerer Fragmente wurde eine 1 kb-Leiter™ (Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein) verwendet, deren Banden jeweils 1-12 Wiederholungen eines 1018 bp-DNS-Fragmentes¹⁰⁹ enthalten.

Zur Ermittlung kleiner Fragmente wurde der Molekulargewichtsmarker 100 bp-ladder™ (Pharmacia, Freiburg) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Restriktionsverdau zweier Plasmide, wodurch Fragmente mit einem Vielfachen von 100 bp Länge entstehen sowie ein Hauptprodukt von 792 bp. Der Größenstandard wurde dann folgendermaßen angesetzt:

100 bp-Leiter™.

1 Vol. 100 bp-ladder™-Stammlsg (1 µg/µl)

1 Vol. Puffer H™10x (Amersham, Braunschweig)

1,5 Vol. Dye E 190™ (Amresco, Solon; USA)

6,5 Vol. H₂O

3.1.4 Detektion und Identifizierung von Nukleinsäuren

3.1.4.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Eine Nukleinsäurealiquot wurde 1:100 in H₂O verdünnt und die Absorption der Probe gegen das Lösungsmittel bei 260 nm bzw. 280 nm Wellenlänge (OD₂₆₀ bzw. OD₂₈₀) am Pharmacia LKB UltrospeclIII-Photometer bestimmt (Amersham pharmacia biotech, Freiburg). Die Konzentration der Probe wurde aus der Absorption bei 260 nm berechnet:

$c \text{ in g/l} = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung} \times \text{Faktor}$ (50 für Plasmide, 40 für RNS, 20 für Oligonukleotide)¹¹⁰. Der Quotient aus OD₂₆₀/OD₂₈₀ ist ein Maß für die Verunreinigung der Probe durch Proteinkontaminationen; Werte zwischen 1,6 und 1,8 (DNS) bzw. 1,7 und 2,0 (RNS) wurden als reine Proben angesehen.

3.1.4.2 Southern-Blotting

Zur autoradiographischen Identifizierung von DNS-Fragmenten wird in der Methode nach Southern^{111,110} gelelektrophoretisch aufgetrennte DNS auf eine Nylon- oder Nitrozellulosemembran transferiert und fixiert. Inkubation der Membran mit einer radioaktiv markierten mobilen Nukleinsäure führt bei Komplementarität zur Hybridisierung dieser Sonde mit der gesuchten Sequenz. Die Exposition auf einem Röntgenfilm erlaubt dann die Bestimmung, ob und in welcher Größe die gesuchte DNS-Sequenz im untersuchten DNS-Gemisch vorhanden ist.

Genomische DNS wurde nach erfolgter Isolation (siehe 3.1.2.1) und Verdau mit Restriktionsenzymen (siehe 3.1.5.1) gelelektrophoretisch in einem 5 mm dünnen 0.7 % (w/v) igen Agarosegel in 0,5xTBE-Laufpuffer über Nacht bei 17-25 Volt aufgetrennt. Das Gel wurde im UV-Licht neben einem angelegten Lineal mit fluoreszierenden Ziffern photographiert und die Positionen der 2-, 3- und 4-kb-Banden der 1 kb-Leiter (GibcoBRL, Life Technologies, Eggenstein) dabei am Gel-Seitenrand mit Hilfe eines Skalpell markiert. Das Gel wurde dann für 15 min bei RT auf dem Schüttler in einem Puffer (enthält 0,25 M HCl und 1 M NaCl) zur Depurination inkubiert und die DNS anschließend für 30 min im Transferpuffer (enthält 0,4 M NaOH, 1 M NaCl) denaturiert.

Die Übertragung der DNS auf eine Hybond-N+™-Nylonmembran (Amersham pharmacia biotech, Freiburg) erfolgte als alkalisch-denaturierender Kapillartransfer. Membran und Whatman3M-Papier (Whatman, Fisher scientific, Schwerte) wurden auf Gelgröße zurechtgeschnit-

ten und in Transferpuffer eingeweicht. In eine 18 x 30 cm-Schale, die mit 400 ml Transferpuffer gefüllt wurde, wurde ein Gelschlitten gelegt, auf dem zwei Whatman3M-Papierbrücken den Kontakt zum Transferpuffer gewährleisten. Auf diese Brücke wurden zwei feuchte Whatman3M-Papierstücke und dann das Agarosegel mit der Oberseite nach unten platziert. Auf das Gel wurde die angefeuchtete Nylonmembran gelegt, wobei ein Rahmen aus Plastikfolie die seitliche Begrenzung darstellte, um einen Kontakt zwischen Gel und höhergelegenen Papierschichten zu verhindern. Mit Hilfe eines geeigneten Stabes wurden etwaige Luft einschüsse aus dem Stapel herausgerollt. Auf die Membran wurden zuerst drei angefeuchtete und dann drei trockene Whatman3M-Papierstücke gelegt und auf diese gewöhnliches Laborpapier bis zu einer Höhe von etwa 5 cm. Das ganze System wurde mit Plastikfolie zum Schutz vor Austrocknung umhüllt und über Nacht bei RT aufbewahrt. Am nächsten Morgen wurden die Gelmarkierungen auf die Membran übertragen, diese dann durch Inkubation auf PBS-getränktem Whatman3M-Papier neutralisiert und für 2 h bei 80°C im Wärmeschrank gebacken, um die transferierte DNS an die Membran zu binden. Auf die gleiche Weise wurde ein kleines Membranstück (2 x 5 cm) behandelt, welches in den folgenden Schritten als Negativkontrolle verwendet wurde. Das extrahierte Gel wurde für 30 min in PBS und Ethidiumbromid (final 0,1 µg/ml) inkubiert, um im UV-Licht den erfolgten Kapillartransfer anhand etwaiger zurückgebliebener DNS zu überprüfen.

Nach der Fixierung erfolgte die „Church“-Hybridisierung mit der Radiosonde. Dazu wurden die Nylonmembranen für 4 h im Hybridisierungspuffer bei 65°C prähybridisiert. Der Prähybridisierungspuffer enthielt:

Prähybridisierungspuffer (pH 7,15):

0,5 M „Natriumphosphat“^v

1 µmol EDTA

7 %(w/v) SDS

1 %(w/v) BSA

1 %(v/v) Heringssperma-DNS-Lsg. (Sigma, Deisenhofen)

Heringssperma-DNS wurde in TE-Puffer mit einer finalen Konzentration von 20 mg/ml gelöst, einige Stunden aufgeköcht, mit einer Kanüle gesichert und bei -20°C gelagert. Vor Zugabe zum Prähybridisierungspuffer wurde sie noch einmal für 1 h bei 95°C gekocht.

Zur Hybridisierung wurde die radioaktiv markierte Sonde (siehe 3.1.5.5) 5 min bei 95°C denaturiert, anschließend für 10 min auf Eis gekühlt und zum Hybridisierungspuffer gegeben, der die gleiche Zusammensetzung wie der Prähybridisierungspuffer aufwies. Für 8 x 15 cm große Nylonmembranen wurden 20 ml Hybridisierungspuffer in einer 10 x 20 cm Plastikbox verwendet, die über Nacht auf einem Schüttler bei 65°C inkubiert wurde. Für größere Membranen wurde die Hybridisierung über Nacht bei 65°C in 7 ml Puffer durchgeführt, die in Fla-

^v äquimolar aus 1 M Na₂HPO₄ und 1 M NaH₂PO₄ hergestellt

schen im Drehofen (Hybaid, Middlesex, GB) rotiert wurden. Am nächsten Morgen wurde die ungebundene Radiosonde von den Membranen zunächst mit 50 ml vorgewärmter Hybridisierungslösung abgewaschen und anschließend mit verschiedenen Waschlösungen absteigender Ionenstärke inkubiert. Die folgenden Lösungen wurden dabei jeweils für 20 min bei 65°C verwendet:

5 x SSC, 0,1% SDS

2 x SSC, 0,1% SDS

0,5 x SSC, 0,1% SDS

0,2 x SSC, 0,1% SDS

War die Negativkontrolle nach den angegebenen Durchläufen noch nicht strahlungsfrei, wurde mit 0,2 x SSC-Lösung solange nachgewaschen, bis der Geiger-Müller-Zähler (Berthold LB 122, Pforzheim) keine erhöhte Strahlung mehr detektierte. Zu diesem Zeitpunkt wies die DNS-beschichtete Membran eine Strahlungsintensität zwischen 0,5-1,5 Bq/ cm² auf. Beide Membranstücke wurden in Plastikfolie geschweißt und in einer Röntgenkassette mit einem Röntgenfilm (Biomax™; Kodak) bei -80°C für 2-5 Tage inkubiert. Die Entwicklung des Autoradiogramms erfolgte mit Hilfe eines Agfa Curix 60-Entwicklers (Agfa, Leverkusen).

3.1.4.3. Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden vom ZMMK-Servicelabor Institut für Biochemie der medizinischen Einrichtungen, Universität Köln auf einem ABI Prism™ 377 DNS Sequencer (Perkin Elmer/ Applied Biosystems) mit Hilfe des Taq FS dyedesoxy-terminator cyclesequenzierungs Kit (Perkin Elmer, Weiterstedt) durchgeführt.

3.1.5 Modifikation von Nukleinsäuren

3.1.5.1 Spaltung von DNS mit DNS-Restriktionsendonukleasen

Für die Spaltung von DNS wurden käufliche Restriktionsendonukleasen und die dazugehörigen Reaktionspuffer eingesetzt. Die Reaktionen wurden nach den Angaben der Hersteller durchgeführt.

Analytischer Verdau. Es wurden 0,3-1 µg Plasmid-DNS in einem Volumen von 10 µl 90 min bei 37°C gespalten. Die eingesetzte Enzymmenge betrug 2-5 U pro µg eingesetzter DNS.

Präparativer Verdau. Es wurden 10-40 µg Plasmid-DNS in einem Volumen gespalten, in dem die zugesetzte Enzymlösung 10% nicht überstieg. Der Verdau wurde in Gegenwart von 1-2 U pro µg eingesetzter Plasmid-DNS über einen Zeitraum von mindestens 8 h durchgeführt.

Präparativer Verdau genomischer DNS. Dabei wurde zunächst ein Teil der verwendeten Enzymmenge unter gründlichem Mischen zur Plasmidlösung pipettiert, 2 h bei der angegebenen Temperatur verdaut, dann die übrige Enzymlösung durch sorgfältiges Mischen hinzu-

gegeben und über Nacht inkubiert. Die Zugabe von Spermidin (final 4%; Sigma, Deisenhofen) zum Reaktionsgemisch führte zu einer entscheidenden Verbesserung, insofern der Verdau in Gegenwart von Hochsalzpuffern durchgeführt wurde.

3.1.5.2 Generierung stumpfer Plasmid-DNS-Enden

Kohäsive DNS-Enden (terminale einzelsträngige Nukleotidüberhänge, „sticky ends“) wurden durch das Klenow-Enzym, der großen Untereinheit der DNS-Polymerase I aus *E. coli*, aufgefüllt, so dass die entsprechenden stumpfen Enden ohne terminale Überhänge („blunt ends“) miteinander ligiert werden konnten. Dazu wurden 2 µg der entsprechenden DNS mit 50 µmol eines dNTP-Gemisches (Roche biochemicals, Mannheim), 5 U des Klenow-Enzyms (USB, Cleveland, USA) im mitgelieferten Reaktionspuffer (67 mM Kaliumacetat, 6,6 mM MgCl₂, 1 mM 2-Mercaptoethanol, pH 7,4) in final 20 µl für 15 min bei 30°C inkubiert. Durch die Zugabe von 25 mmol EDTA und Erhitzen auf 75°C für 15 min wurde die Reaktion abgestoppt, die DNS-Fragmente durch das QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt (siehe 3.1.2.7).

Klenow-Puffer (pH 7,4):

67 mM K-Acetat

6,6 mM MgCl₂

1 mM 2-Mercaptoethanol

3.1.5.3 Dephosphorylierung von DNS

Vor Ligationen mit „blunt end“-Fragmenten (stumpfe DNS-Enden) und im Falle von Ligationen von Produkten, die nur mit einem Restriktionsenzym behandelt worden waren (mit oder ohne terminale Überhänge) wurden die 5`-Phosphatgruppen der linearisierten Plasmide entfernt, um eine intramolekulare Selbstligation zu verhindern. Zu 10 - 20 pmol der Plasmid-DNS wurden 0,05 Units CIAP-Enzym (calf intestinal alkaline phosphatase; Promega, Mannheim), 5 µl CIAP10x-Reaktionspuffer (Promega, Mannheim) in einem finalen Reaktionsvolumen von 50 µl gegeben, 15 min bei 37° und anschließend 15 min bei 56°C inkubiert.

CIAP10x-Reaktionspuffer (pH 9,3):

0,5 M Tris-HCl

10 mM MgCl₂

1 mM ZnCl₂

10 mM Spermidin

Nach Zugabe von weiteren 0,05 Units der Phosphatase wurden die Inkubationsschritte wiederholt. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 75°C für 45 min abgestoppt und die dephosphorylierte DNS mit Hilfe des QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt (siehe 3.1.2.7).

3.1.5.4 Ligation von DNS

Zur Insertion eines DNS-Fragmentes in ein zuvor linearisiertes Plasmid wurde die DNS-Ligase des Bakteriophagen T4 (Roche Biochemicals, Mannheim) verwendet. Dazu wurden 15 fmol der Vektor-DNS mit 75 fmol des einzubringenden DNS-Fragmentes bzw. in einigen Fällen die dreifache Menge an Vektor- und Fremd-DNS eingesetzt. Die DNS wurde in einem Volumen von 10 µl mit 2 U T4 DNS-Ligase und einem laborinternen Puffer über Nacht bei 16°C inkubiert. 2-4 µl des Reaktionsgemisches wurden direkt zur Transformation von kompetenten *E. coli*-Bakterien eingesetzt. Der Ligationspuffer enthielt folgende Komponenten:

Ligationspuffer (pH 7.6):

250 mM Tris-HCl

50 mM MgCl₂

25%(w/v) PEG 6000 (Merck Eurolab, Darmstadt)

100 µM ATP (Sigma, Deisenhofen)

2,5 µM DTT (Amresco, Solon, USA)

3.1.5.5 Radioaktive Markierung

Die Synthese der radioaktiven Sonde, welche im Southern Blot zum Nachweis komplementärer DNS-Sequenzen verwendet wurde, erfolgte mit Hilfe des Ladderman™ Labeling Kit (Takara, Shiga; Japan). Die Zusammensetzung des verwendeten Puffers ist aus patentrechtlichen Gründen nicht bekannt. 60-80 fmol der zu markierenden DNS wurden mit 2 µl eines Oligonukleotidgemisches („random primed“ Nonamer; Takara, Shiga) in einem finalen Volumen von 5 µl bei 95°C für 5 min gekocht und für 10 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 10 µmol eines dNTP-Gemisches (Takara, Shiga), der entsprechenden Menge an mitgelieferten Reaktionspuffers, 2,5 µl frisch markiertem [α -³²P]dCTP (1,85 MBq, 50 µCi; Amersham pharmacia biotech, Freiburg) und 2 U *Bca I*-Polymerase in final 25 µl wurde der Reaktionsansatz für 2-4 h bei 50 °C inkubiert. Durch Zugabe von 50 mmol EDTA wurde die Reaktion abgestoppt. Nichtinkorporierte Radionukleotide wurden durch eine Ethanolpräzipitation entfernt. Die Einbauraten wurden mit Hilfe des Szintillators (QC 4000 XER; Bioscan Inc., Washington, USA) bestimmt; es wurden nur solche Sonden im nachfolgenden Hybridisierungsschritt (siehe 3.1.4.2) verwendet, die mindestens 50% der eingesetzten Radioaktivität (0,42 pM) inkorporiert hatten.

3.1.5.6 In vitro-Punktmutagenese

Der Austausch einzelner Nukleotide in Plasmid-DNS wurde durch die Verwendung synthetisierter Oligonukleotide ermöglicht, in denen die geplanten Mutationen vorgegeben waren. Die Einführung der Punktmutationen beruhte auf der Methode der überlappenden PCR.

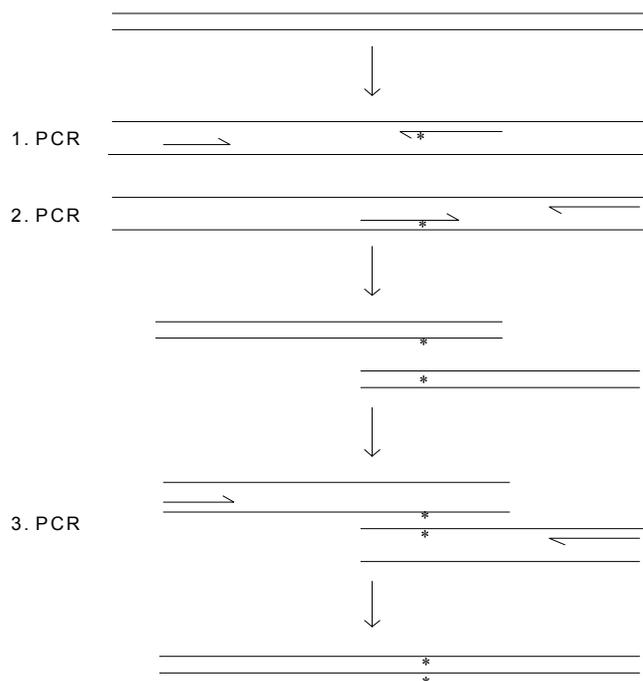


Abbildung 4: Methode der überlappenden PCR zur Einführung von Punktmutationen.

Als Gegenprimer zu zwei flankierenden Oligonukleotiden, welche die Länge des Produktes determinieren, wurden zwei Oligonukleotide synthetisiert, die die komplementäre Mutation tragen. Die Amplifikationen der jeweiligen Paare in der 1. und 2. PCR lieferten in beiden Fällen cDNS-Fragmente, die überlappende Sequenzen aufwiesen und die Mutation auf einem der beiden Tochterstränge, aber in verschiedenen Orientierungen besaßen (Abbildung 4). Wurden anschließend beide Amplifikationsprodukte in der 3. PCR als Matrizen für die flankierenden Oligonukleotide eingesetzt, konnte nur ein Produkt exponentiell amplifiziert werden, welches die gesamte Distanz zwischen dem Primerpaaren überspannt. Da die mutierten Tochterstränge zueinander komplementär sind, werden sie als Produktduplex aufgefüllt; die Mutation war in dieser cDNS dann auf beiden Strängen vorhanden.

Die Methode ist relativ einfach und schnell; durch geeignete Primerwahl kann die neusynthetisierte Sequenz möglichst kurz gehalten werden, um zu viele Fehlpaarungen zu vermeiden. Außerdem wurden *Pwo/Taq*-Polymerasen-Mischung mit eingebauter 3`-5`-Exonukleaseaktivität verwendet (siehe 3.1.6.3), die das Risiko eines falschen Nukleotideinbaus weiter minimieren.

3.1.5.7 Reverse Transkription

Reverse Transkriptasen, die zur Grundausstattung von Retroviren gehören, sind DNS-Polymerasen, die RNS in DNS umschreiben. Wie alle Polymerasen benötigen sie kurze Oligonukleotidprimer als 5`-Startpunkt der cDNS-Strangsynthese, welche sich an komplementä-

re RNS-Sequenzen anlagern. Das folgende Standardprotokoll wurde mit sog. „random primern“ (Roche molecular biochemicals, Mannheim), einem Hexamer-Oligonukleotidgemisch mit wahllosen Sequenzabfolgen durchgeführt.

Für alle folgenden Schritte wurden zur Vermeidung einer Aerosolbildung nur gestopfte Pipettenspitzen (Biozym, Hess. Oldendorf) verwendet. Die reverse Transkription wurde mit einem Reaktionsvolumen von 10 µl auf die nachfolgende PCR-Reaktion abgestimmt. Im Ansatz waren enthalten:

RT-Ansatz:

2 µl RT5x-Puffer (GibcoBRL, Karlsruhe)

1 µl DTT (100 mM; GibcoBRL, Karlsruhe)

1 µl dNTP-Mix (je 10 mM; Roche biochemicals, Mannheim)

100 µM random primer (Roche biochemicals, Mannheim)

10 U RNAsin™ (Promega, Mannheim)

100 U M-MLV-RTase (Moloney-mouse leukemia virus-RTase; GibcoBRL, Karlsruhe)

2 µl DEPC-behandeltes H₂O

RNAsin™ ist ein Ribonukleaseinhibitor-Protein, welches einen möglichen RNS-Abbau durch RNAsen verhindert; Zusammensetzung des RT5x-Puffers:

RT5x-Puffers (pH 8,3) :

250 mM Tris-HCl

150 mM KCl

30 mM MgCl₂

50 mM Dithiothreitol

5,25 µl dieses Ansatzes wurden zur RNS-Lösung gegeben und mit DEPC-behandeltem H₂O MilliQ auf 10 µl aufgefüllt. Die Proben wurden bei 37°C für 60-90 min inkubiert und danach bei -20°C gelagert. Eine kurzfristige Erwärmung auf 95°C für 2 min war vorteilhaft, aber nicht zwingend notwendig.

3.1.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Allgemein. Die Polymerase-Ketten-Reaktion besteht aus einer gewöhnlichen enzymatischen DNS-Replikation ohne zelluläre Kontrollfaktoren. Das Amplifikationspotential wird durch zwei Modifikationen entscheidend erhöht: Durch die Verwendung hitzestabiler DNS-Polymerasen aus Archaeobakterien¹¹² (z.B. *Taq*-DNS-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) muss das Enzym nicht regeneriert werden, so dass im automatisierten Prozess die DNS-Replikation mehrfach wiederholt werden kann. Anstatt einem Oligonukleotid („Primer“) (wie z.B. bei der reversen Transkription) werden zwei verwendet, die jeweils zu einem der beiden Doppelstränge komplementär sind und gemeinsam den zu amplifizierenden Bereich einrahmen.

Somit können bei jeder Replikation aus einer doppelsträngigen DNS zwei neue Tochterstränge entstehen, was in einer exponentiellen Amplifikation resultiert.

Oligonukleotiddesign. Zur selektiven und sensitiven Detektion von Transkripten wurden auf Grundlage der klonierten cDNS-Sequenzen mit Hilfe des Programms „Oligo™4.0“ (E. Rychlik) Oligonukleotidprimer bestimmt. Anschließend erfolgte ein Sequenzvergleich mit Hilfe von „BLASTA“ des Wisconsin Sequence Analysis Package (Genetics Computer Group, Madison, USA) bzw. des National Institute of Health (Bethesda, USA), um die Sequenzspezifität der Primer für die Zielsequenz zu gewährleisten. Als DNS-Datenbanken wurden GenEMBL (Heidelberg) und GenBank (NCBI Indiana, USA) durchmustert.

Interne Kontrollen. Interne PCR-Kontrollen ermöglichen einen groben Vergleich der zu amplifizierenden Nukleinsäuremenge und –qualität. Sie sind vor allem dann sinnvoll, wenn als Ausgangsmaterial RNS (wie in der RT-PCR) verschiedener Präparationen verwendet wird, da spektroskopisch nicht eindeutig zwischen undegradierter und degradierter RNS unterschieden werden kann.

Als interner Standard wurde die Amplifikation eines 249 bp-Produktes der Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase-(HPRT)-cDNS verwendet. Dieses Enzym des Purinkatabolismus wird in allen Zellen in relativ geringer Zahl konstitutiv exprimiert, so dass die transkribierte cDNS ein Maß für die Menge an intakter Gesamt-RNS darstellt. Bei einer Kontamination der Gesamt-RNS durch genomische DNS amplifizieren die Primer einen entsprechenden HPRT-Genabschnitt mit einer Länge von 1100 bp, so dass auch solche Verunreinigungen erkannt werden können, die im RNS-Gel unentdeckt bleiben.

3.1.6.1 Analytische PCR-Amplifikation

Zum analytischen Nachweis von cDNS-Fragmenten wurde das folgende, auf die Taq-Polymerase der Firma Promega optimierte Standardprotokoll durchgeführt.

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle Vorsichtsmaßnahmen, die für RNS-Techniken gelten, auch bei der Polymerase-Ketten-Reaktion angewandt. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Ein 50 µl-Ansatz enthielt folgende Komponenten:

<u>Taq-Reaktionsansatz (pH 9,0):</u>	<u>Taq10x-Puffer (pH 9,0):</u>
4µl Taq10x-Puffer (Promega, Mannheim)	500 mM KCl
2 µl MgCl ₂ (25 mM; Promega, Mannheim)	100 mM Tris-HCl
1,25 µl Vorwärts-Oligonuk. (10 µM, siehe 2.4)	1%(v/v) Triton X-100
1,25 µl Revers-Oligonuk. (10 µM, siehe 2.4)	
1,25 U Taq-Polymerase (Promega, Mannheim)	
31,25 µl DEPC-behandeltes H ₂ O	

Zum Ansatz wurden alternativ 1 oder 10 µl des RT-Ansatzes (siehe 3.2.4) gegeben. Bezüglich der RT-PCR hat sich dabei die Verwendung von 1 µl als vorteilhaft hinsichtlich Sensitivität und Spezifität erwiesen.

Zyklusparameter:

Initiale Denaturierungsphase (94°C, 2 min)

Denaturierung (94°C, 30 sek)

Annealing (T_M , 30 sek)

Extension (72°C, 1 min)

Wiederholung der Schritte 2 bis 4 (insgesamt 35 Zyklen)

Abschließende Extension (72°C, 15 min)

Nach Überschichtung des Ansatzes mit einem Tropfen Paraffinöl (Fluka, Deisenhofen), um eine Kondensation des Wassers im oberen Teil des Reaktionsgefäßes zu verhindern, werden die Ansätze in dünnwandigen PCR-Gefäßen (Perkin-Elmer, Weiterstedt) direkt aus dem Eis in den auf 94 °C vorgeheizten Biometra Trio-Thermoblock (Biometra, Göttingen) überführt.

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Produkte bei –20°C oder auch RT gelagert; 5-10 µl wurden per Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

3.1.6.2 Präparative PCR-Amplifikation

Zur präparativen Synthese von cDNS-Fragmenten für die Struktur-Funktionsanalyse wurde das Expand™ High Fidelity PCR Kit (Roche biochemicals, Mannheim) eingesetzt. Hier wird eine Enzymmischung aus der Taq- und der Pwo-Polymerase verwendet. Da letztere eine 3`-5`-Exonukleaseaktivität besitzt, erhöht sich die Sequenzgenauigkeit der amplifizierten Produkte um das 3-fache. Die Zusammensetzung des Puffers ist aus patentrechtlichen Gründen nicht bekannt.

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes:

Reaktionsansatz High Fidelity™:

5 µl ExpandHF10x-Puffer

600 µM MgCl₂

200 µM jedes dNTPs

je 250 nM der Oligonukleotidprimer

2,5 U der Enzymmischung

ad 50 µl mit DEPC-behandeltem H₂O

100 ng der Matrizen-DNS wurden zum Reaktionsansatz gegeben; die PCR wurde mit den Standardzyklusparametern für 25-30 Zyklen durchgeführt und anschließend vollständig gelelektrophoretisch aufgetrennt.

3.1.6.3 Einzelzell-RT-PCR

Allgemein. Die Detektion von Nukleinsäuren einer einzigen Zelle erfordert ein hohes Maß an Sensitivität und Spezifität: Säugetierzellen enthalten im allgemeinen in Abhängigkeit vom Gewebetyp etwa 10 - 20 pg Gesamt-RNS bzw. 0,2 - 1 pg mRNS¹¹⁰. Setzt man den Anteil an Ca_v2.3-mRNS mit 0,1%(w/w) an, was sicherlich zu hoch ist, so erhält man unter Berücksichtigung eines Molekulargewichtes von 26,4·10⁵ g/ mol Ca_v2.3-Transkripten eine durchschnittliche Anzahl von 228 Molekülen Ca_v2.3-RNS pro Zelle. Mit Hilfe der von B. Lambolez etablierten Einzelzell-RT-PCR-Variante¹¹³ können Transkriptmengen dieser Größenordnung detektiert und visualisiert werden. Bei dieser Methode wird mit Hilfe einer Patch clamp-Meßelektrode der zytosolische Inhalt einer Zelle ausgesaugt und die darin enthaltene RNS nach der reversen Transkription durch eine PCR-Reaktion amplifiziert. Die dabei gestellten Anforderungen an die Reinheit der Reagenzien sind hoch. Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, zumindest für den Zeitraum der Versuchsdurchführung die verwendeten Geräte und Materialien vom allgemeinen Laborgebrauch zu separieren. Im wesentlichen können vier Problembereiche die Durchführung erschweren:

1. Aufgrund der Amplifikation durch 70-90 Zyklen können unspezifische Amplifikationsprodukte mit den gewünschten cDNS-Fragmenten konkurrieren.
2. Die Zahl der Oligonukleotidprimer, die für eine Einzelzell-RT-PCR geeignet sind, ist begrenzt. Die Primer müssen ein Höchstmaß an Spezifität und Sensitivität aufweisen, einerseits, um die Bindung an nicht-komplementäre Sequenzen zu verhindern und andererseits, um im Reaktionsvolumen von 50 µl die wenigen DNS-Matrizen wirkungsvoll zu amplifizieren. Daher zielt die Erhöhung der Zyklenzahl im wesentlichen darauf, die Zahl der korrekten Primer-Matrizen-Hybridisierungen zu erhöhen.
3. Interaktionen mit der Gefäßwand, Luftblasen und unzureichendes Mischen können die Menge an verfügbarer Nukleinsäure weiter verringern.
4. Das Experiment bedarf zahlreicher zusätzlicher Negativkontrollen, um eine induzierte zelluläre Gen-Transkription von einer zufällig erfolgten zu unterscheiden. Dazu zählen z.B. Proben aus dem Medium oder von benachbarten, aber nicht untersuchten Zellen.

Durchführung. Nach vorheriger elektrophysiologischer Messung wurde unter Verwendung eines Spitzenwiderstandes von 2-5 MΩ das Zytoplasma in die Messelektrode aufgesaugt, während die Zellschrumpfung durch ein Mikroskop kontrolliert wurde. Die sterile Elektrodenpipette, die noch die elektrophysiologische Messlösung enthielt, wurde auf einer sterilen Einmal-Spritze befestigt und die Pipettenspitze schnell in ein auf -20°C vorgekühltes Plastikgefäß überführt. In diesem war der komplette RT-Ansatz bereits vorgelegt. Die Pipette wurde leicht an den Boden gedrückt, so dass die Spitze brach; dann wurde mit Hilfe der Einmal-Spritze die Lösung hinausgedrückt, ohne dass Luftblasen in den RT-Ansatz gelangten. Durch leichtes Klopfen wurde gemischt, kurz in einer Mikrozentrifuge mit 1500 x g

Durch leichtes Klopfen wurde gemischt, kurz in einer Mikrozentrifuge mit 1500 x g zentrifugiert und der Reaktionsansatz zur reversen Transkription bei 37°C inkubiert. Nach der RT-Inkubation wurden die Proben bis zur Amplifikation bei –80°C gelagert.

Die nachfolgende PCR-Reaktion wurde mit dem Standardprotokoll (siehe 3.3.2) durchgeführt. Die Zyklenzahl variierte i.a. zwischen 40 (bei transfizierten Zellen oder häufig transkribierten cDNS) und bis zu 70 Zyklen (für seltene Nukleinsäuren wie Ca_v2.3-cDNS). Höhere Zyklenzahlen wurden vermieden. Da die Taq-Polymerase im Standardprotokoll nach 35 Zyklen weitgehend inaktiv ist, wurde bei höheren Zyklenzahlen durch Aliquotierung von 5-10 µl des Reaktionsgemisches zu einem frischen Reaktionsansatz eine zweite Amplifikationsrunde nachgeschaltet.

3.2 Proteinbiochemische Arbeiten

3.2.1 Extraktion von Proteinen

Während zur präparativen Proteinisolation von Ca_v2.3-Proteinen aus Zelllinien eine Mikrosomenpräparation durchgeführt wurde (siehe 3.3.1.1), erfolgte die Bestimmung des Proteingehaltes verschiedener INS-1-Zellklone durch schnelle und einfache Proteinextraktionen. Dabei wurden die in der Literatur beschriebenen Protokolle der jeweiligen INS-1-Zellinkubation zur Insulinbestimmung angepasst.

3.2.1.1 Mikrosomenpräparation

Mikrosomen sind geschlossene Vesikel, die sich bei der Homogenisierung von Zellen durch Selbstversiegelung von Membranfragmenten des endoplasmatischen Retikulums bilden.

Auf 4°C vorgekühltes PBS wurde mit verschiedenen Proteaseinhibitoren versetzt (finale Konzentrationsangaben):

Proteaseinhibitoren-Mischung:

200 mM PMSF (Gibco BRL/ Life Technologies, Eggenstein))

500 mM 1,10-Phenanthrolin (Serva, Heidelberg)

300 mM 2-Iodacetamid (Merck Eurolab, Darmstadt)

400 mM Benzamidin (Sigma, Deisenhofen)

1 mM Pepstatin A (Bachem, Heidelberg)

1 mg/ml Leupeptin (Bachem, Heidelberg)

Zunächst wurde der hypotonische Mikrosomenpuffer auf 4°C vorgekühlt.

Mikrosomenpuffer (pH 7,5):

50 mM Tris

1 mM EDTA

Proteaseinhibitoren (s.o.)

Die folgende Präparation wurde ausschließlich im Kühlraum bei 4°C durchgeführt.

Konfluente INS-1-Zellen wurden vom Medium befreit und einmal mit 5 ml und anschließend mit 2 ml PBS + Inhibitoren pro 9 cm-Kulturschale gewaschen. Durch mehrmaliges Pipettieren wurde der Zellrasen jeweils in 5 ml PBS + Inhibitoren resuspendiert, die Kulturschalen abschließend noch einmal mit 5 ml PBS + Inhibitoren durchgewaschen und alle Resuspensionen in einem 50 ml PP-Röhrchen aufgefangen. Nach Zentrifugation mit 450 x g/ 5 min bei 4°C wurde das Zellpellet vom Überstand befreit und in 25 ml Mikrosomenpuffer + Inhibitoren resuspendiert. Die Lösung wurde für 20 min auf Eis inkubiert und dann erneut bei 4°C mit 450 x g/ 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt, das Sediment in 2 ml Mikrosomenpuffer + Inhibitoren resuspendiert und als Kontrollaliquot auf -80°C tiefgefroren.

Die Sedimentation der mikrosomalen Bestandteile erfolgte während der anschließenden Ultrazentrifugation in der Beckman L-60 Ultrazentrifuge (Beckman, München; Rotor VTi 50.2) mit 50000 x g/ 40 min im Vakuum. Das Pellet wurde in 200 µl Mikrosomenpuffer + Inhibitoren resuspendiert, der Überstand in Form zweier Kontrollaliquots auf -80°C tiefgefroren. Da die Resuspension v.a. der INS-1-Zellklone erhebliche Zeit und Mühen in Anspruch nahm, wurde in späteren Präparationen auf einen manuellen Eppendorf-Homogenisator (JKA-Labortechnik, Fisher Scientific, Düsseldorf) zurückgegriffen, zumal hierdurch auch die Homogenität der Mikrosomensuspension wesentlich verbessert werden konnte. Abschließend wurden Ultrazentrifugenröhrchen und Homogenisator mit 50 µl Mikrosomenpuffer + Inhibitoren durchgespült, die Lösungen vereinigt und á 15 µl aliquotiert. Zwei Aliquots wurden zur nachfolgenden Proteinbestimmung (BCA-Methode, siehe 3.3.2.1) verwendet und der Rest bei -80°C eingefroren.

3.2.1.2 Proteinextraktion mit hypotonischen Zellaufschluss

Bei dieser Extraktion führt die Verwendung eines hypotonischen Lysepuffers zum Platzen der behandelten Zellen, so dass die zytosolischen Proteine in Lösung gelangen. Die Extraktion wurde dem Arbeitsprotokoll des Versuchsaufbau zur induzierten Insulinsekretion (siehe 3.4.2) angepasst.

Die erste Inkubation der INS-1-Zellklone, die zur Proteinbestimmung vorgesehen waren, wurde in 500 µl KRB-Puffer ohne BSA, die zweite Inkubation in 500 µl Mikrosomenpuffer + Inhibitoren (siehe 3.3.1.1) durchgeführt. Nach Entnahme des Überstandes wurde dieser mit 65 x g/ 5 min bei 4°C zentrifugiert, 300 µl des Überstandes entnommen und bis zur Quantifizierung bei -80°C eingefroren. Zur Analyse durch den Bradford-Assay wurden 30 µl eingesetzt, bei Durchführung der BCA-Methode 50-100 µl.

3.2.1.3 Proteinextraktion mit Glyzerin

Die folgende Proteinextraktion durch eine Glyzerinsolubilisierung von Damm¹¹⁴ wurde dem Arbeitsprotokoll der induzierten Insulinsekretion (siehe 3.4.2) angepaßt. Aufgrund der Anwesenheit von Dithiothreitol (DTT) im Lysepuffer wurde für die Proteinquantifizierung ein Bradford-Assay durchgeführt (siehe 3.3.2.2).

Die erste Inkubation der INS-1-Zellklone, die zur Proteinbestimmung vorgesehen waren, wurde in 500 µl KRB-Puffer ohne BSA durchgeführt, die zweite in 500 µl PBS, pH 7,4. Bei der Entnahme der Überstände wurde der Zellrasen mit einer blauen Pipettenspitze abgekratzt und anschließend mit 65 x g/ 5min bei 4°C pelletiert. Nach Dekantierung des Überstandes wurden 100 µl Damm-Puffer hinzugegeben. Dieser war folgendermaßen zusammengesetzt:

Damm-Puffer (pH 7,9):

20 mM HEPES

400 mM KCl

2 mM DTT (GibcoBRL, Karlsruhe)

20%(v/v) Glyzerin (Roth, Karlsruhe)

Das Gemisch wurde für 20 sek gevortext und dann bis zur Quantifizierung auf –80°C eingefroren. Dann wurden die Proben auf Eis angetaut, mit 10800 x g/ 5 min bei 4°C zentrifugiert und zur Analyse 30 µl des Überstandes im Bradford-Assay eingesetzt.

3.2.2. Quantifizierung von Proteinen

3.2.2.1 BCA-Methode

Diese Methode der Proteinbestimmung basiert auf der Lowry-Methode¹¹⁵, der wiederum die Molybdänblau-Reaktion zugrunde liegt. Der Vorteil gegenüber der Lowry-Methode, die erhöhte Toleranz gegenüber einer Vielzahl von Detergenzien, wird durch die Verwendung von Bicinchoninsäure erzielt.

Reagenz A:

1%(w/v) Dinatrium-BCA

2%(w/v) Natriumcarbonat

0,16%(w/v) Natriumtartrat

0,4%(w/v) Natriumhydroxid

0,95%(w/v) Natriumhydrogencarbonat

Reagenz B:

4%(w/v) CuSO₄

Die Reagenzien wurden von der Firma Pierce (Pierce, Rockford, USA) bezogen; die fertige BCA-Lösung besteht aus 50 Teilen Reagenz A und 1 Teil Reagenz B und wurde täglich frisch angesetzt.

Zu 50 µl Probe wurde 1 ml der frischen BCA-Lösung gegeben und gemischt. Die Proben wurden anschließend 30 min bei 56°C inkubiert und nach Abkühlen auf RT (etwa 40 min)

wurde die Extinktion bei 562 nm gegen Wasser als Referenzwert am Pharmacia LKB UltrospecIII-Photometer (Amersham pharmacia biotech, Freiburg) gemessen.

Als Standard wurde eine BSA-Eichkurve mit 0-0,1 mg/ml BSA (New england biolabs, Schwalbach) verwendet.

3.2.2.2 Bradford-Assay

Im Bradford-Assay¹¹⁶ wird die bei der Bindung des Farbstoffs Coomassie-Brillantblau G-250 an Proteine auftretende Veränderung im Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 zu 595 nm zur einfachen und schnellen Bestimmung von Proteinen genutzt. Die Sensitivität dieser Methode ist mit der von Lowry vergleichbar; allerdings besitzt es den Vorteil der Unempfindlichkeit des Bradford-Reagenzes gegenüber Reduktionsmitteln wie dem Dithiothreitol im Damm-Puffer (siehe 3.3.1.3.).

Das Bradford-Reagenz enthielt folgende Bestandteile:

Bradford-Reagenz:

0,01%(w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250 (Serva, Heidelberg)

5%(v/v) Ethanol

20%(v/v) konz. Phosphorsäure

Die Lösung wurde filtriert und lichtgeschützt bei RT aufbewahrt.

In einer 96-Mikrotiterplatte wurden in jede Vertiefung 150 µl H₂O MilliQ und 30 µl der jeweiligen zu untersuchenden Proben vorgelegt, dann mittels einer Multipette jeweils 75 µl Bradford-Reagenz hinzugegeben und nach 5 min lichtgeschützter Inkubation bei RT gegen H₂O MilliQ als Referenzwert im µQuant-Titerplatten-Leser (Bio-Tek, Winooski, USA) die jeweiligen Extinktionen bei 595 nm bestimmt. Als Standard wurde eine BSA-Eichkurve mit 0-0,1 mg/ml BSA (New england biolabs, Schwalbach) verwendet.

3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Ca_v2.3-Proteinen

Zur Auftrennung des aus der Mikrosomenpräparation erhaltenen Proteingemisches wurde eine diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Disk-PAGE)¹¹⁷ durchgeführt. Durch Zugabe des Detergens SDS und dessen Anlagerung an die Proteine entstehen negativ geladene Molekülkomplexe, die im elektrischen Feld zur Anode wandern und deren Wanderungsgeschwindigkeit in logarithmischer Abhängigkeit umgekehrt proportional von der Proteingröße abhängt. Im Gegensatz zur kontinuierlichen Gelelektrophorese (siehe 3.1.3) werden bei der Disk-PAGE zwei Gele unterschiedlicher Zusammensetzung und pH-Wert übereinander gegossen (Sammelgel und Trenngel), die in der vertikalen Gelelektrophorese die Fokussierung der Proteinbanden verbessern. Die im folgenden angegebenen Zusammensetzungen wurden dem Laufverhalten der 240 kDa großen Ca_v2.3-Untereinheit angepaßt.

Die zur Elektrophorese benötigten Glasplatten (Vorder- und Hinterplatte) wurden gereinigt; durch Einfügen einer Gummidichtung und Fixierung mit Klemmen wurde eine vertikale Ge-lapparat erstellt. Zur Herstellung des Trenngels wurden folgende Substanzen verwendet:

6,5%(w/v)-iges Trenngel (pH 8,7):

3,23 ml 30%(w/v) Acrylamid (29% Acrylamid, 1% Bisacrylamid; Amresco, Solon, USA)

3,75 ml 1,5 M Tris-HCl

150 µl SDS 10%(w/v)

7,8 ml H₂O tridest.

5 µl TEMED (Amresco, Solon, USA)

50 µl einer 10%(w/v) Ammoniumpersulfatlösung (Biomol, Hamburg)

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von TEMED und Ammoniumpersulfat eingeleitet. Zur Luftabdichtung wurde mit 3 ml Wasser-gesättigtem Butanol überschichtet. Die Polymerisation erfolgte in der Regel innerhalb einer Stunde. Anschließend wurde das Sammelgel nach demselben Prinzip wie das Trenngel hergestellt.

4,5%(w/v)-iges Sammelgel (pH 6,3):

1,5 ml 30%(w/v) Acrylamid (29% Acrylamid, 1% Bisacrylamid)

2,5 ml 0,5 M Tris-HCl

100 µl SDS 10%(w/v)

5,7 ml H₂O tridest.

20 µl TEMED

60 µl 10 %(w/v) Ammoniumpersulfat

Während diese Mischung entgast wurde, wurde das Butanol vom polymerisierten Trenngel abgossen, die Geloberfläche mit Elektrophoresepuffer gewaschen und der benetzte Bereich mit Whatman3M-Papier (Fisher Scientific, Schwerte) sorgfältig getrocknet. Dann wurde durch Zugabe von TEMED und Ammoniumpersulfat die Sammelgel-Polymerisation gestartet, das Polymerisat auf das Trenngel gegossen und der Kamm aufgesteckt.

Nach etwa 30 min wurden Klammer und Gummidichtung entfernt, der Gel-Platten-Sandwich in eine vertikale Elektrophoresekammer (Biorad, München) eingesteckt und der Kamm nach Zugabe des Elektrophoresepuffers herausgenommen. Der Puffer war folgendermaßen zusammengesetzt:

Elektrophoresepuffer:

25 mM Tris

192 mM Glyzin (Biomol, Hamburg)

0,1 %(w/v) SDS

Während der Polymerisation des Sammelgels wurden die Mikrosomen schonend aufgetaut. Aufgrund der Temperaturempfindlichkeit der zuvor bei -80°C gelagerten Mikrosomen wur-

den die Proben nicht wiederverwendet. Das finale Auftragungsvolumen von 15 µl, welches neben den Mikrosomen und H₂O MilliQ den Denaturierungspuffer enthielt, wurde mit Hilfe einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen eingefüllt und die Elektrophorese mit einer Stromstärke von 15 mA für 30 min durchgeführt. Als zugegebener Größenstandard wurde SDS-6H (29-205 kDa; Sigma, Deisenhofen) verwendet. Der Denaturierungspuffer enthielt folgende Komponenten:

Denaturierungspuffer:

- 10%(v/v) Glyzerin
- 3%(v/v) 2-Mercaptoethanol
- 3%(w/v) SDS
- 0,3%(w/v) Bromphenolblau

Mit Beginn der Elektrophorese wurde die Gelkühlung auf 4°C eingestellt. Nachdem die Bromphenolblau-Front das Trenngel erreicht hatte, wurde die Stromstärke auf 30 mA erhöht. Nach Auslaufen der Farbstofffront (etwa 2 h) wurde noch 30 min abgewartet, um den Eintritt der hochmolekularen Kanalproteine in das Trenngel zu gewährleisten.

3.2.4 Elektrotransfer von Ca_v2.3-Proteinen auf PVDF-Membranen

Der Transfer der im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteinbanden auf eine PVDF-Membran erfolgte durch das sog. Naß-Tank-Verfahren, um einen möglichst schonenden Transfer der hochmolekularen Ca_v2.3-Proteine zu erzielen.

Eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Nylonmembran (Millipore, Bedford, USA) wurde auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und sukzessiv in Methanol für 15 sek, H₂O MilliQ für 2 min und Transferpuffer für 15 min präinkubiert.

Transferpuffer:

- 25 mM Tris
- 192 mM Glyzin
- 10%(v/v) Methanol
- 0,01%(w/v) SDS

Das Polyacrylamidgel wurde vorsichtig auf ein angefeuchtetes Whatman3M-Papier überführt, mit der Nylonmembran bedeckt und auf diese eine weitere Lage Whatman3M-Papier befestigt. Der Stapel wurde zurechtgeschnitten, mit einer sterilen Pipette Luftblasen herausgerollt und zwischen die puffergetränkten Schwämme eines Naßblotschlittens eingespannt. Der Sandwich wurde in die Naßblotkammer (Mini Trans-Blot cell; Biorad, München) eingesteckt, wobei das Gel zur Kathodenseite gerichtet war. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 4°C und einer Stromdichte von $\approx 2 \text{ mA/ cm}^2$. Am nächsten Morgen wurde die Membran für eine Stunde auf dem Schüttler bei RT blockiert. Die Blockierlösung enthielt PBST (PBS + 0,1%(v/v) Tween-20 (Merck, Darmstadt)) und 5% Magermilchpulver (Heirler, Supermarkt).

Die blockierte PVDF-Membran wurde im Anschluss ohne Zwischenlagerung mit den entsprechenden Antikörpern und Inkubationsprotokollen weiterbehandelt.

3.2.5 Detektion und Identifizierung von Ca_v2.3-Proteinen

In unserer Arbeitsgruppe wurden von Dipl. Biol. Steffi Olyschläger zwei Antikörper anti- α 1Ecom und anti- α 1Ed in Kaninchen gegen verschiedene, aus der humanen Ca_v2.3-cDNS abgeleiteten und synthetisierten Peptide gewonnen. Abbildung 5 beschreibt die Lokalisation des anti- α 1Ed-Epitops in schematischer Form.

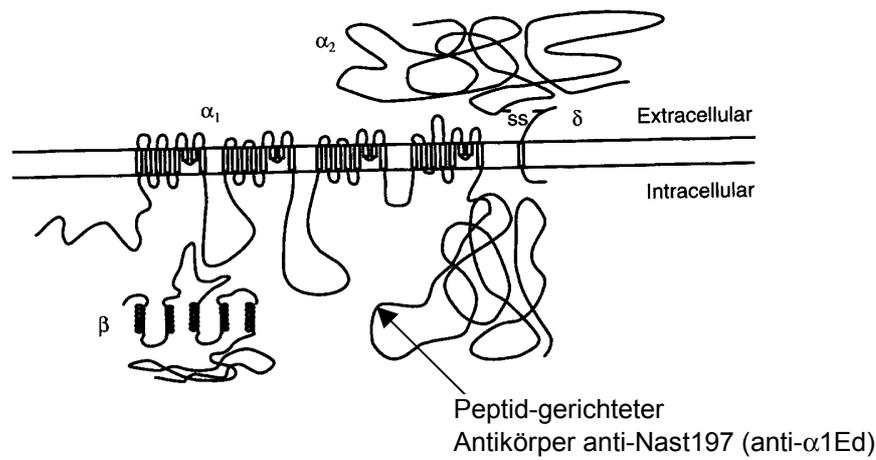


Abbildung 5: Epitoperkennung eines Ca_v2.3-spezifischen Antikörpers.

Das Peptid GIYLPSTQEHAG (AS 1981-1993 im alternativ gespleißten Bereich des Carboxyterminus von Ca_v2.3d) wurde aus der menschlichen Sequenz¹¹⁸ abgeleitet und über die Festphasenmethode¹¹⁹ synthetisiert.

Die nach der Immunisierung von Kaninchen erhaltenen Seren wurden per Immunoblot von Mikrosomen aus stabil mit humaner Ca_v2,3 transfizierten HEK293-Zelllinien auf ihre Verwendbarkeit hin getestet¹²⁰. Mit Hilfe dieser beiden Antikörper wurden die aus den Mikrosomenpräparationen gewonnenen und in der PAGE aufgetrennten Proteingemische auf das Vorhandensein des Ca_v2.3-Proteins hin untersucht.

Die blockierte PVDF-Membran wurde zunächst 3 x 10 min in PBST + 2%(w/v) BSA (Fraktion V, Biomol, Hamburg) gewaschen. Daran schloss sich die Inkubation mit dem Primärantikörper (anti- α 1Ecom bzw. anti- α 1Espec) in einer Verdünnung 1:500 an. Neben PBST + 2%(w/v) BSA enthielt die Antikörperlösung 0,05%(w/v) Natriumazid, wodurch die Verdünnungen bei zwischenzeitlicher Lagerung bei 4°C bis zu fünfmal wiederverwendet werden konnten. In der Regel wurde 2 h bei RT inkubiert, allerdings wurde die Sensitivität bei einer Primärinkubation über Nacht bei 4°C verbessert. Die jeweils verwendeten Inkubationszeiten sind bei der Beschreibung der Experimente aufgeführt.

Anschließend wurde dreimal mit PBST + 2%(w/v) BSA gewaschen, und es folgte die Sekundärinkubation für 1 h bei RT. Dazu wurde der aus Esel gewonnene und an die Meerettich-Peroxidase gekoppelte anti-rabbit-I_g (Amersham pharmacia biotech, Freiburg) in einer Verdünnung 1:10000 in PBST + 2%(w/v) BSA verwendet. Diese Lösung wurde immer frisch angesetzt, enthielt kein Natriumazid, um die nachfolgende Peroxidase-Detektion nicht zu stören und wurde nach Gebrauch verworfen.

Zuletzt erfolgte nach 3 x 10 min Waschen in PBST ohne BSA die Chemolumineszenz-Detektion mittels des ECL western blot detection Systems (Amersham pharmacia biotech, Freiburg). Hierbei wird die H₂O₂-vermittelte Oxidation von Luminol, einem substituierten zyklischem Diazylhydrazid durch die Antikörper-gekoppelte Meerettich-Peroxidase ausgenutzt, welches neben der Entstehung von N₂ auch eine detektierbare Lichtemission (Maximum bei 482 nm) zur Folge hat. Die Membran wurde dazu kurz abgetropft und für eine Minute in einer Mischung aus Lösung 1 und Lösung 2 (Zusammensetzung aus patentrechtlichen Gründen nicht bekannt) inkubiert. Nach erneutem Abtropfen wurde die Membran in Frischhaltefolie eingepackt und auf dem Hyperfilm ECL (Amersham pharmacia biotech, Freiburg) für verschiedene Zeiträume bei RT exponiert.

3.3 Radioimmunoassay (Insulinnachweis)

Allgemein. Zur quantitativen Insulinbestimmung wurde in dieser Arbeit ein radioimmunologischer Nachweis von Insulin in Lösung (hier bezeichnet als: Radioimmunoassay, RIA) durchgeführt. Das Prinzip besteht in einer Kompetition des zu bestimmenden Insulins um den spezifischen Antikörper mit einer konstanten Menge zugeführten ¹²⁵I-Insulins. Die Menge des radioaktiven Antigens und die des Antikörpers ist in allen Testansätzen gleich. Wird nicht markiertes Insulin zugefügt, so können die Antikörper nur entsprechend weniger ¹²⁵I-Insulin binden. Daraus ergibt sich eine umgekehrte Proportionalität zwischen zugeführtem Antigen und der im Immunokomplex gebundenen Menge des markierten Antigens. Durch eine Trennung des Antigen-Antikörperkomplexes von löslichem, nicht am Antikörper gebundenem Insulin und Bestimmung des Anteils an ¹²⁵I-Insulin kann aus einer entsprechenden Eichkurve dann die zugeführte Insulinmenge exakt bestimmt werden.

Die Separation des löslichen, nicht an Antikörper gebundenen Insulins vom Insulin-Antikörperkomplex erfolgte durch Adsorption an ein Molekularsieb¹²¹, welches aus dextranschichteter Aktivkohle und Kälberserum hergestellt wurde.

Durchführung. Alle Pipettierungen wurden nach Möglichkeit mit einer Multipette (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt; wo dies nicht möglich war, wurde für jede Pipettierung eine neue Spitze benutzt, um Volumenungenauigkeiten aufgrund verbleibender Lösungsreste an der Spitzenaußenseite oder unvollständigem Pipettenausstoß zu unterbinden.

Alle insulinhaltigen Lösungen wurden in final 100 µl Glyzinpuffer + 0,25%(w/v) BSA verdünnt und diese in Teströhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert. Von jeder Insulinbestimmung wurden je zwei Teströhrchen bestückt. Mit einer Multipette wurden zunächst 100 µl Antiserum auf jedes Teströhrchen verteilt. Dieses enthielt eine 1:15-Verdünnung des in 1 ml aufgenommenen lyophilisierten Ratteninsulin-Antikörpers (Lot ARI-02 [15T], Linco Research; bezogen über: Biotrend, Köln), welcher in Meerschweinchen generiert wird. Dann wurden je 222 Bq des Tracers ¹²⁵Iod-Insulin (Stammlsg. 74 kBq/ ml; Dreieich, Freiburg bzw. Diasorin, Düsseldorf) pro Teströhrchen zugegeben und für mindestens 12 h bei RT inkubiert.

Für die Eichkurve wurden Leer-, Referenz- und Maximumwerte sowie eine Verdünnungsreihe aus Ratteninsulin (Novo Nordisk, Dänemark)-Stammlösung mit 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 und 0,125 ng Insulin/ml Glyzinpuffer + 0,25%(w/v) BSA in dreifacher Ausführung angesetzt

Tabelle 5; Auswertung und Erläuterung, siehe 3.3.1.2).

Nr.	¹²⁵Iod-Insulin / µl	Antiserum / µl	Standard / µl(ng Ins.)	Probe / µl	Codes
1-3	300	-	-	-	TOTAL
4-6	300	-	-	200 G.p./BSA	REFER
7-9	300	100	-	100 G.p./BSA	BLANK
10-12	300	100	100 (0,125)	-	STD
13-15	300	100	100 (0,25)	-	STD
16-18	300	100	100 (0,5)	-	STD
19-21	300	100	100 (1)	-	STD
22-24	300	100	100 (2)	-	STD
25-27	300	100	100 (4)	-	STD
28-30	300	100	100 (8)	-	STD
Ab 31	300	100	-	100	RESP

Tabelle 5: Pipettierungsschema der Eichkurve.

Am nächsten Morgen wurden 6 g Norit A-Aktivkohle (Cat.Nr. 26,001-0; Sigma, Deisenhofen) und 0,5 g Dextran FP 70 (MG 65000-73000, Cat.Nr. 18667; Serva, Heidelberg) für 20 min in 200 ml Glyzinpuffer ohne BSA eingerührt (oder entsprechende Mengen). Dann wurde 1/3 Vol. Serum (Newborn calf serum; GibcoBRL, Karlsruhe) zugefügt und für 15 min gerührt. 400 µl dieser Suspension wurden in jedes Teströhrchen pipettiert. Dies führte zur Adsorption von löslichem, nicht an Antikörper gebundenem Insulin durch die dextranbeschichtete Aktivkohle, welche durch eine Zentrifugation mit 2800 x g für 10 min bei 4°C pelletiert wurde. Die Überstände wurden aspiriert und die Kohlepräzipitate im Gamma-counter LKB Wallac (Wallac, Turku, Finnland) vermessen.

Standardisierung. Die ermittelten Werte eines einminütigen Zählvorgangs des Gamma-counters wurden mit der Software MultiCalc™ (Wallac, Turku, Finnland) ausgewertet.

Für die Eichkurve wurden aus den Dreifachwerten zunächst Mittelwerte gebildet; Einzelwerte mit einer Abweichung $\geq 20\%$ vom Mittelwert wurden nicht berücksichtigt.

Zur Standardisierung wurden drei Konstanten festgelegt (siehe Tabelle 5):

code TOTAL: totale (maximale) Aktivität

code REFER: Aktivität im Kohlepräzipitat ohne zugefügtes Antiserum

codeBLANK: unspezifische (minimale) Aktivität im Kohlepräzipitat ohne zugefügtes Insulin

Für die lineare Y-Achse wurde eine Transformation der Aktivitäts-Meßwerte (AMW) in den Ausdruck B/B_{\max} durchgeführt, der sich wie folgt definiert:

$$B/B_{\max} = (\text{AMW} - \text{BLANK}) / (\text{REFER} - \text{BLANK})$$

Für die X-Achse wurde eine logarithmische Transformation der Konzentration gewählt, wie sie sich aus der Verwendung der Standards ergibt.

Die Anpassung der Eichkurve an die Messwerte der Standardverdünnungen wurde durch ein Polynom 3. Ordnung („smoothed spline“) eingerichtet, welches Knoten an jeder Standardkonzentration besitzt und durch iterative Verfahren den Standard-AMW angepaßt wurde. Ein Beispiel für eine derartig standardisierte Eichkurve ist in Abbildung 6 dargestellt.

3.4 Insulinsekretionsmessungen

3.4.1 Stimulation der Insulinsekretion in INS-1-Zellen

In eine 24-Loch-Kulturschale (Renner, Dannstadt) wurden pro Vertiefung 250000 Wildtyp- oder stabil transfizierte INS-1-Zellen plattiert und für drei Tage bei 37°C und 5%(v/v) CO₂ in entsprechendem Medium (siehe 2.1.2.1) kultiviert^{122,123}. Aufgrund der Tatsache, dass INS-1-Zellen relativ fest an der Plastikunterfläche haften, war es möglich, nicht benötigte Überstände abzusaugen.

Aus 20 von 24 Vertiefungen wurde das Medium daher über eine Wasserstrahlpumpe abgesaugt, zweimal mit KRB-Puffer + 0,5%(w/v) BSA gewaschen und anschließend in je 500 µl KRB-Puffer + 0,5% BSA(w/v) für 30 min bei 37°C und 5%(v/v) CO₂ inkubiert. Die verbleibenden vier Löcher wurden entsprechend mit KRB-Puffer ohne BSA-Zusatz gewaschen und inkubiert; sie dienten später zur Proteinbestimmung (siehe dazu 3.3.1.2 bzw. 3.3.1.3).

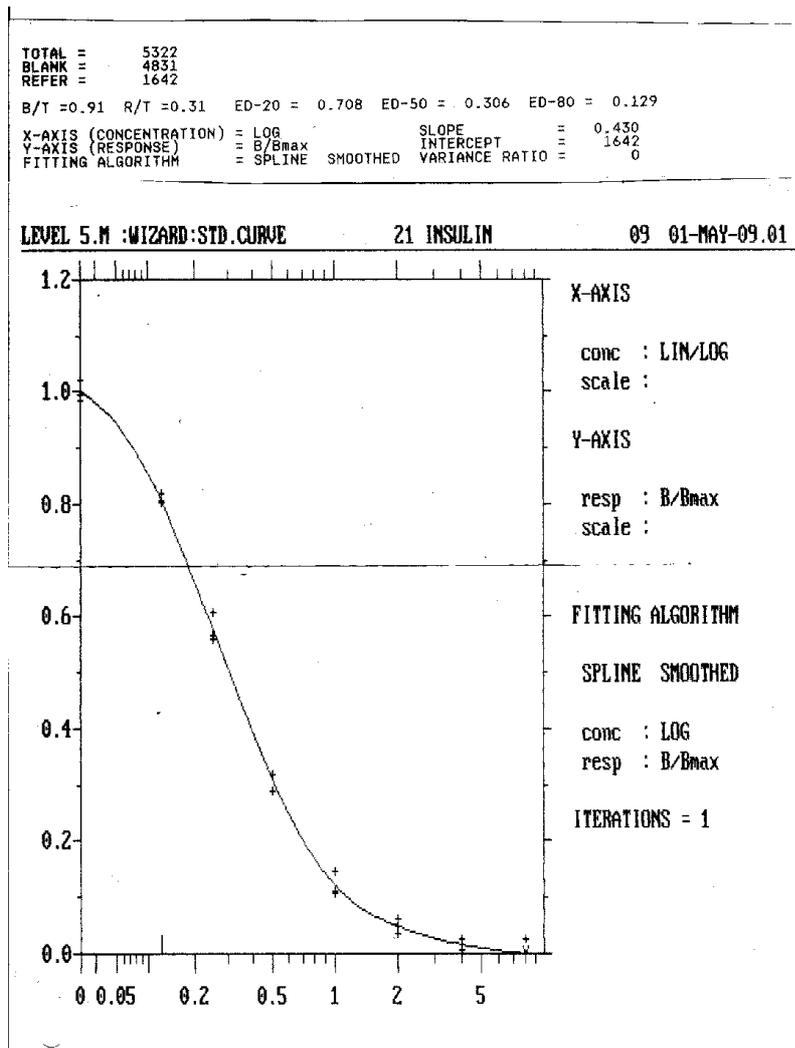


Abbildung 6: Standardisierte Eichkurve der MultiCalc™-Transformationen.

Danach erfolgt die zweite Inkubation in 500 µl KRB-Puffer + 0,5%(w/v) BSA, dem die jeweiligen Testsubstanzen zugegeben wurden, für 30 min bei 37°C und 5%(v/v) CO₂. Im Anschluss daran wurde der jeweilige Überstand vollständig entnommen und mit 60 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. 300 µl wurden in ein neues Eppendorfgesäß überführt und auf -20°C eingefroren. In die Vertiefungen wurden jeweils 500 µl saurer Ethanol (70%(v/v) Ethanol absolut, 150 mM HCl) pipettiert, um über Nacht bei 4°C das zelluläre Insulin neben anderem aus den INS-1-Zellen zu extrahieren.

Am nächsten Tag wurde zunächst 0,2 M Glyzinpuffer, pH 8,8 mit 0,25%(w/v) BSA (Kat. Nr. A2153; Sigma, Deisenhofen) frisch angesetzt. Der saure Ethanol in den Vertiefungen wurde 1:1000 in Glyzinpuffer + 0,25%(w/v) BSA verdünnt. Je nach Zellklon wurde der Überstand 0,5-8:100 und die saure Ethanol-Verdünnung 10-60:100 mit 0,2 M Glyzinpuffer + 0,25%(w/v) BSA verdünnt.

Auf der Grundlage der Bestimmung des zellulären Insulins mittels Immuntechniken wurde die Normalisierung der Messwerte durchgeführt: Da Insulinkonzentrationen aus Überständen

verschiedener Inkubationen an sich nicht vergleichbar sind, wurde zur Normalisierung das Verhältnis aus sezerniertem Insulin zu zellulär gespeichertem Insulin gebildet (siehe 3.4) und als prozentualer Anteil beschrieben.

3.4.2 Stimulation der Insulinsekretion in isolierten Langerhans'schen Inseln

Langerhans'sche Inseln der Maus wurden gemäß 2.1.2.2 isoliert. Die Inseln wurden mit einer Pipette in eine beschichtete Glasplatte überführt, in der auf 37°C temperierter KRB-Puffer + 0,5% BSA(w/v) + 2 mM Glukose vorgelegt worden war und in diesem für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden je nach Versuchsanordnung jeweils fünf bzw. sechs Inseln in ein Eppendorfgefäß überführt und in 500 µl temperiertem KRB-Puffer + 0,5% BSA(w/v) und verschiedene Konzentrationen von Glukose und SNX-482 für 30 min bei 37°C inkubiert. Dabei wurden die Inseln hinsichtlich ihrer Unversehrtheit, aber nicht größenabhängig selektioniert.

Nach der Inkubation wurden die Eppendorfgefäße für 5 min auf Eis gelagert, für 3 min in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge (Eppendorf, Hamburg) bei 100 x g sedimentiert und der jeweilige Überstand möglichst vollständig abgehoben. Dann wurde jeweils 500 µl saurer Ethanol zu Exteraktion über Nacht (siehe 3.4.1) dazugegeben.

3.4.3 SNX-Denaturierung

Zur Hitze- und Säuredenaturierung wurden 193 mM des Peptidtoxins mit Tris-HCl auf pH 3 angesäuert und für 30 min auf 50°C erhitzt.

4 Ergebnisse

4.1 Gewebespezifische mRNS-Expression von Ca_v2.3-Spleißvarianten in kultivierten Zellsystemen sowie neuronalen und nicht-neuronalen Geweben

Das porenbildende Ca_v2.3-Protein des R-Typ-Calciumkanals war in unterschiedlichen Spleißvarianten in mehreren Laboratorien kloniert worden. Die menschliche Ca_v2.3d-Spleißvariante wies als einzige im Carboxyterminus eine 129 bp lange Insertion auf (daneben existieren weitere variable Sequenzbereiche in der Region zwischen Domäne II und III sowie im Aminoternus). Es war jedoch bisher keine Expressionsanalyse durchgeführt worden. Daher erfolgte zunächst eine Bestimmung der Ca_v2.3-Transkripte in verschiedenen Geweben und *in vitro*-Zellsystemen.

Ausgehend von den in der Literatur bereits beschriebenen Gewebeverteilungen wurden Neurone in kultivierten Zellsystemen sowie neuronale, später auch nicht-neuronale Gewebe und Zelllinien mit charakterisierten physiologischen Aktivitäten mittels RT-PCR auf eine Expressi-

on des Ca_v2.3-Transkripts hin überprüft. Zusätzlich erfolgte in einigen Fällen auch die Amplifikation von Transkripten anderer Ca_v-Untereinheiten, um Expressionsmuster von VGCCs verschiedener Zell- und Gewebetypen miteinander zu vergleichen.

4.1.1 Nachweis von Ca_v2.3 -Spleißvarianten in kultivierten ES-Zellen-Aggregaten

Die Differenzierung kultivierter embryonaler Stammzellen in Multizell-Aggregate führt zur Bildung komplexer *in vitro*-Modellsysteme mit unterschiedlichen Zelltypen. Mit Hilfe der reversen Transkription und der Polymerasen-Kettenreaktion sollte in den *in vitro* differenzierten embryonalen Stammzell-Aggregaten BLC6 und D3 die Transkript-Expression der Ca_v-Untereinheiten von HVA-VGCCs im Verlauf der Differenzierung verfolgt werden.

Die beiden embryonalen Stammzellkulturen D3/Aat17 und BLC6 der Maus wurden unter den jeweiligen Kulturbedingungen im „hängenden Tropfen“-Verfahren aggregiert und nach vier (BLC6) bzw. sechs (D3/Aat17) Tagen auf Kulturschalen plattiert (siehe 2.1.2). Nach vier (BLC6) bzw. 11 Tagen (D3/Aat17) wurden sie in einer Standard-PCR mit primerspezifischen Annealing-Temperaturen untersucht (siehe 2.3). Als Positivkontrolle wurde parallel cDNS aus Maushirn verwendet, als interner Standard diente die Amplifikation der HPRT-cDNS (siehe 3.1.6).

In Abbildung 7 sind die erhaltenen Amplifikationsprodukte in einer gelelektrophoretischen Auftrennung der cDNS von fünf (BLC6) bzw. zwei hochspannungsaktivierten Ca_v-Untereinheiten (D3/Aat17) dargestellt. Die dazu verwendeten Untereinheit-spezifischen Oligonukleotidpaare sind in 2.3, Tabelle 2 aufgeführt.

Alle untersuchten Ca_v-Untereinheiten konnten in BLC6-mRNS, die vier Tage nach Plattierung der Kultur präpariert wurde, nachgewiesen werden.

Während in BLC6-mRNS durch das Oligonukleotidpaar 524/525 (siehe 2.3) vornehmlich ein längeres Produkt von 498 bp detektiert wurde, ist eine kürzere Variante von 369 bp im Maushirn dominant. Die Differenz von 129 bp entspricht der Insertion III, die in Abbildung 9A schematisch dargestellt ist. Diese längere Ca_v2.3-mRNS wird auch in *in vitro* differenzierten embryonalen Stammzellen des D3/Aat17-Klons, die eine Kardiomyozyten-ähnliche Differenzierung eingehen, und in der Insulinoma-Zelllinie β-TC3 der Maus exprimiert. In den undifferenzierten ES-Zellen konnte dagegen nur ein unspezifisches cDNS-Fragment ribosomalen Ursprungs mit 210 bp amplifiziert werden. Zum Vergleich wurden auch Ca_v1.2-spezifische Oligonukleotide eingesetzt (siehe Abb. 6B Spur 1-4), um cDNS-Fragmente der ionenleitenden Untereinheit des kardialen L-Typ-VGCCs als Indikator-Transkript nachzuweisen.

Die Analyse konnte damit zeigen, dass es sich bei Insertion III nicht um ein Klonierungsartefakt, sondern um eine exprimierte Spleißvariation handelt.

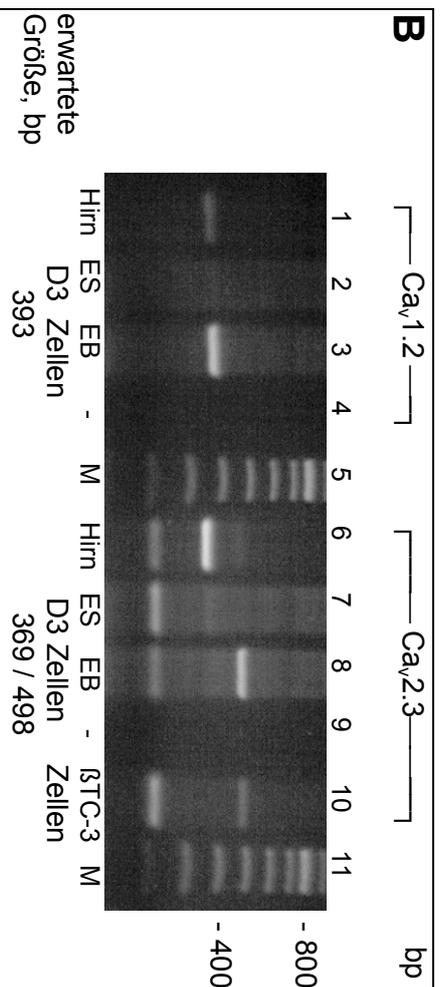
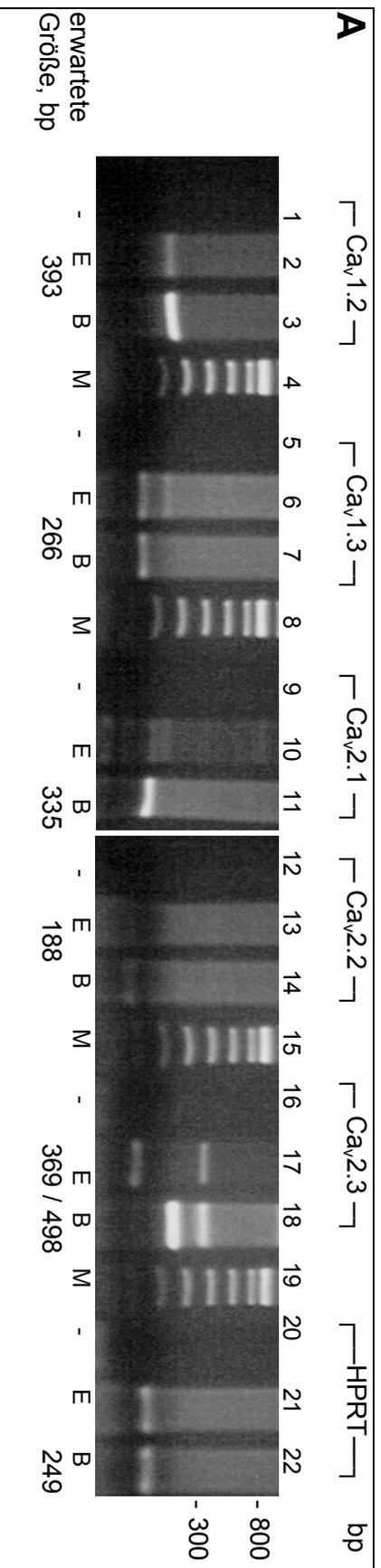


Abbildung 7: PCR-Amplifikation von Ca_v -cDN5-Fragmenten aus *in vitro* differenzierten embryonalen Stammzellen.

Als Marker wurde eine 100 bp-Leiter verwendet (Spur 4, 8, 15, 19 in (A), Spur 5 und 11 in (B)). Die erwarteten Größen der cDN5-Fragmente sind unterhalb der Diagramme angegeben. **(A)** Amplifikation aus differenzierten BLC6-ES-Zellen mit Untereinheit-spezifischen Oligonukleotidpaaren. Jeweils aufgetragen: PCR-Produkte der Negativkontrolle ohne cDN5 (-), BLC6-cDN5 (E) und Mausshirn-cDN5 (B); im Falle der HPRT-Amplifikation enthält die Negativkontrolle BLC6-GesamtRNS. **(B)** Amplifikation aus differenzierten D3/Aat17-ES-Zellen mit $Ca_v1.2$ - bzw. $Ca_v2.3$ -spezifischen Primern; für Spur 1 und 6 wurde Mausshirn-cDN5, für Spur 4 und 9 die Negativkontrollen ohne RNS verwendet; in Spur 2 und 7 bzw. in Spur 3 und 8 wurde cDN5 aus D3/Aat17-ES-Zellen-Kultur vor der Plattierung bzw. elf Tage nach Plattierung verwendet. Spur 10 enthält als zusätzliche Positivkontrolle die Amplifikationsprodukte der Insulinoma-Zelllinie β-Tc3.

4.1.2 Nachweis von Ca_v2.3 in einzelnen Neuronen kultivierter ES-Zellen-Aggregate mittels Einzelzell-RT-PCR

Distinkte Neurone, die durch Zugabe von 100 nM Retinolsäure zum Kulturmedium nach einigen Tagen im differenzierenden BLC 6-ES-Zell-Aggregat auf einer Ein-Zell-Schicht von Gliazellen radial nach außen wachsen, wurden im zeitlichen Verlauf ihrer Ausdifferenzierung als apolar, bipolar oder multipolar morphologisch identifiziert.

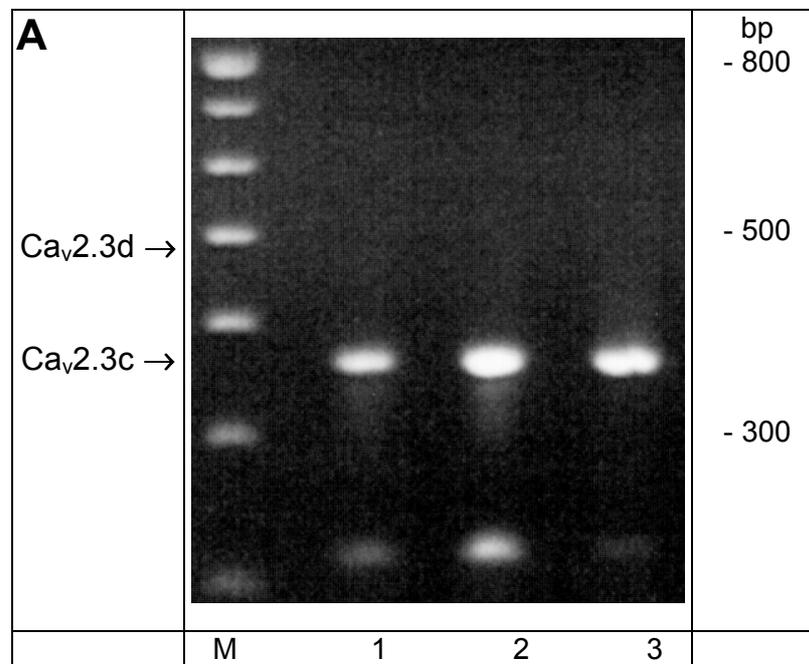
Für die pharmakologische Analyse wurden nur solche Neurone ausgewählt, die einen schnell aktivierenden und inaktivierenden Tetrodotoxin-empfindlichen Natrium-Einwärtsstrom besaßen. Dann erfolgte die Charakterisierung der VGCC-Population anhand der Barium-Einwärtsströme in der Ganzzellkonfiguration (siehe Abbildung 37). Die Sensitivität der Bariumströme gegenüber dem L-Typ-Antagonisten (\pm)-Isradipin, dem N-Typ-Blocker ω -Conotoxin-GV1a und dem P/Q-Typ-Antagonisten ω -Agatoxin-IVa deutet auf eine Expression der entsprechenden VGCCs hin. Dies steht in Einklang mit den PCR-Amplifikationen der ionenleitenden Untereinheiten (Abbildung 7A). Nach Applikation der Antagonisten verblieb ein Reststrom, der von $7,33 \pm 1,15$ % in apolaren Zellen auf $13,5 \pm 3,2$ % in multipolaren Zellen anstieg (Abbildung 37B).

Mittels Einzelzell-RT-PCR (siehe 3.3.4) wurde im direkten Anschluss ermittelt, ob Ca_v2.3-Transkripte im untersuchten Neuron exprimiert werden. Dazu wurde der zytoplasmatische Inhalt der untersuchten Zelle in die Patch-Pipette aufgesogen und in einem vorgelegten Prämix mit dem Ca_v2.3-spezifischen Oligonukleotidpaar 524/525 amplifiziert. In Abbildung 8A sind drei repräsentative gelelektrophoretische Auftrennungen der nach Durchführung von 2 x 35 Zyklen erhaltenen PCR-Produkte dargestellt.

Dabei zeigte sich überraschend, dass im Gegensatz zur Amplifikation von cDNS-Fragmenten aus RNS-Extraktionen vollständiger BLC6-Aggregate in den distinkten Neuronen die carboxyterminal kürzere Spleißvariante, aber nicht die in Abbildung 7A dominante längere Variante exprimiert wird. Um auszuschließen, dass dieser Effekt nur zeitlich vorübergehender Natur war, wurden Neurone aus BLC6-Aggregaten verschiedener Altersstufen untersucht. In Abbildung 8B sind die Resultate der durchgeführten Einzelzell-RT-PCRs tabellarisch nach dem Alter der untersuchten BLC6-Aggregate angeordnet.

In 35 Einzelzell-Untersuchungen wurde dreizehnmal die kürzere Variante amplifiziert, die längere dagegen nur einmal; zweimal erfolgte die Detektion beider Fragmente. Die PCR-Produkte der Tage 7 und 11 wurden zweimal subkloniert und sequenziert, die dabei erhaltenen Sequenzen entsprachen den publizierten Ca_v2.3-Sequenzen der Maus⁶³. Zusätzlich

konnte in einem „Southern Blot“-Experiment gezeigt werden, dass eine ^{32}P -markierte Radio-sonde, die aus dem 498 bp-PCR-Produkt erzeugt worden war, mit den entsprechenden cDNS-Fragmenten gelelektrophoretisch aufgetrennter Einzelzell-RT-PCR-Produkte hybridisierte.



B	Zeit nach Plattierung (4 Tage in hängenden Tropfen)	Anzahl der Experimente	Zahl der Experimente mit		
			lange Ca _v 2.3	kurze Ca _v 2.3	beide
	3	7	0	2	0
	7	3	0	1 *	0
	9	5	0	2	0
	10	5	0	4	0
	11	7	1 *	3 ^{*,a)}	2 *
	15	5	0	1	0
	16	3	0	0	0
		35	1	13	2

Abbildung 8: Einzelzell-RT-PCR aus Neuronen in *in vitro* differenzierten BLC6-ES-Zellen.

(A) Gelelektrophoretische Auftrennung dreier repräsentativer Einzelzell-RT-PCR-Produkte nach 2 x 35 Zyklen. Spur M enthält die 100 bp-Leiter; Negativkontrollen (siehe 3.3.4) sind hier nicht dargestellt. Die PCR-Produkte in Spur 1 und 2 mit einer Länge von etwa 220 bp sind Unspezifitäten ribosomalen Ursprungs. **(B)** Tabellarische Übersicht über die Ergebnisse der Einzelzell-RT-PCRs in Abhängigkeit vom Alter der BLC6-ES-Zell-Aggregate. Die Amplifikation in 2 x 35 Zyklen erfolgte mit dem Ca_v2.3-spezifischen Oligonukleotidpaar 524/525.

* = Southern Blot durchgeführt (siehe Text)

^{a)} = subkloniert und sequenziert

Die Tatsache, dass in den weitaus meisten Fällen der durch Einzelzell-RT-PCR untersuchten Neuronen das kürzere Ca_v2.3-Fragment nachgewiesen wurde, lässt vermuten, dass die längere Spleißvariante in anderen Zelltypen als den hier identifizierten Neuronen exprimiert wird. Die Verwendung der BLC 6-ES-Zellaggregate als Modellsysteme wurde aufgrund dieser uneinheitlichen Verteilung wieder aufgegeben.

4.1.3 Nachweis von Ca_v2.3 in Körnerzellen-Primärkulturen und neuronalen Geweben der Ratte

Einen Ausgangspunkt für die Expressionsuntersuchungen von Ca_v2.3-cDNS in Körnerzellen-Primärkulturen der Ratte bildeten die Arbeiten von Tottene⁵⁴ und Randall^{124,125}, die unabhängig voneinander die Existenz von R-Typ-VGCCs funktionell in kultivierten zerebellären Körnerzellen nachwiesen.

In der erstgenannten Arbeit wurden mit G2 und G3 gleich zwei verschiedene R-Typ-Ströme postuliert, ohne dass deren molekulare Struktur ermittelt werden konnte. Daher wurden im folgenden vier wichtige Bereiche, in denen Ca_v2.3-Variationen durch Vergleich der klonierten Sequenzen identifiziert worden sind, auf ihre Expression in einer Primärkultur zerebellärer Körnerzellen der Ratte hin untersucht.

Abbildung 9A veranschaulicht schematisch die aus der Literatur bekannten Ca_v2.3-Varianten, welche aus verschiedenen Spezies kloniert wurden; in Abbildung 9B und 9C sind die entsprechenden Ca_v2.3-Spleißvariationen sowie weitere mögliche cDNS-Strukturen, die bislang noch nicht entdeckt wurden, dargestellt.

Die abgeleitete Primärsequenz der aus Rattenhirn klonierten Ca_v2.3-cDNS⁵⁶ enthält ein 147 bp kürzeres 5'-Ende als die klonierten Maus⁶³-, Kaninchen¹²⁶- bzw. Mensch¹¹⁸-Sequenzen. In der großen zytoplasmatischen Schleife zwischen Domäne II und III befinden sich, durch etwa 270 bp getrennt, zwei kurze Insertionen I und II; bislang konnte noch kein Ca_v2.3-Fragment kloniert werden, welches keine der beiden Insertionen trägt. Insertion III befindet sich am 3'-Ende der cDNS und konnte bislang nur im humanen Ca_v2.3d-Klon nachgewiesen werden.

Für die nachfolgende RT-PCR-Analyse wurden Kortex und Zerebellum von drei Wistarr Ratten sowie eine 6-8 Tage alte Primärkultur zerebellärer Körnerzellen (siehe 2.1.3) verwendet.

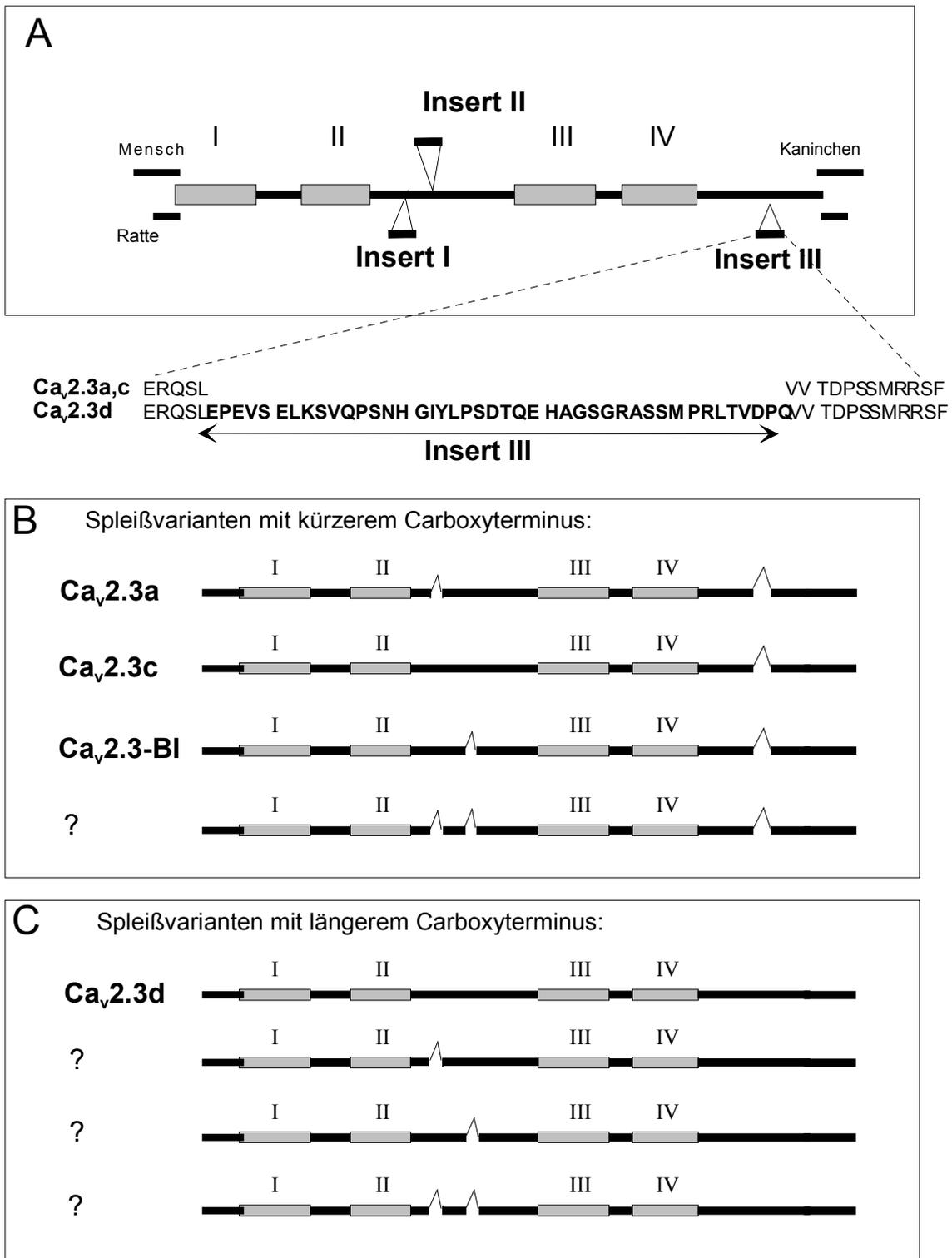


Abbildung 9: Schematische Darstellung der klonierten Ca_v2.3-cDNAs.

(A) Zusammenfassung der strukturellen Unterschiede, die für die jeweiligen klonierten cDNAs berichtet wurden und Aminosäuresequenz der Insertion III. (B) Spleißvariantenkombinationen von Ca_v2.3-cDNAs mit kürzerem Carboxyterminus. Die cDNAs-Varianten wurden durch einen kleinen Buchstaben indiziert. Ca_v2.3b wurde aus historischen Gründen bislang nicht zugeordnet; auch die ältere BI-Nomenklatur wurde noch nicht angepasst. Ein Fragezeichen symbolisiert, dass die entsprechende Struktur noch nicht entdeckt wurde. (C) Spleißvariantenkombinationen von Ca_v2.3-cDNAs mit längerem Carboxyterminus.

Neben anderen porenbildenden Untereinheiten von hochspannungsaktivierten VGCCs (hier nicht gezeigt) wurden Amplifikationen von Ca_v2.3-cDNS-Fragmenten durchgeführt.

Bei Verwendung des Oligonukleotidpaares 3418/3420, welches gemäß der publizierten Ca_v2.3-Sequenz der Ratte entworfen wurde, erhält man nicht das gewünschte Produkt bei 272 bp, wohingegen ein entsprechend für das menschliche 5'-Ende des Ca_v2.3-Gens synthetisiertes Oligonukleotidpaar 3417/3419 auf Rattenhirn die korrekte Bande bei 354 bp liefert (Abbildung 10A). Auch in weiteren Experimenten konnte das Ratten-spezifische 5'-Ende bislang niemals amplifiziert werden.

Für die Region zwischen Domäne II und III wurde ein Oligonukleotidpaar 3642/3643 verwendet, welches flankierend zu den Insertionen I und II hybridisiert. Damit konnten aus zerebellären Körnerzellen drei von vier möglichen Spleißvarianten detektiert werden (Abbildung 10B): Das PCR-Produkt mit einer Länge von 420 bp wurde von einer Ca_v2.3-cDNS amplifiziert, welche beide Insertionen trägt; das 399 bp-Produkt enthielt nur Insertion I, das 363 bp-Produkt nur Insertion II. Im Rahmen der durchgeführten Experimente konnte kein cDNS-Fragment ohne diese Insertionen detektiert werden. Während in den kultivierten Körnerzellen alle drei Produkte mit etwa gleicher Intensität im 2,5%igen Agarosegel erschienen, ist in der Zerebellum-Präparation die Spleißvariante ohne Insertion I dominant. In der kortikalen Präparation wurde die cDNS, welche beide Insertionen besitzt, als einziges Produkt amplifiziert.

Auch für die 3'-Region konnte ein gewebespezifisches Expressionsmuster ermittelt werden (Abbildung 10C): Während die kortikale Präparation ausschließlich die kürzere Variante lieferte (in Analogie zu 4.1.2), ist das längere cDNS-Fragment im Zerebellum dominant vertreten. In kultivierten Körnerzellen wurden beide Varianten amplifiziert; demnach werden mindestens zwei verschiedene Ca_v2.3-cDNS exprimiert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die in 4.1.1 postulierte gewebespezifische Expression von Insertion III im Ratten-ZNS bestätigt und durch das Expressionsmuster von Insertion I ergänzt werden konnte. Bezüglich Insertion II konnten dagegen keine Variationen registriert werden. Die Existenz unterschiedlicher Ca_v2.3-cDNS in zerebellären Körnerzellen könnte die Grundlage der beobachteten, verschiedenen R-Typ-Ca²⁺-Kanäle G2 und G3 darstellen; allerdings wären auch andere, bisher nicht berücksichtigte bzw. identifizierte Sequenzvariationen der Ca_v2.3-cDNS oder bestimmte Untereinheiten-Kombinationen denkbar. Die Tatsache, dass in den kultivierten Körnerzellen gewebespezifische Ca_v2.3-cDNS-Varianten koexprimieren, kann eine Folge der Kultivierung und einer möglichen Dedifferenzierung *in vitro* darstellen. Von einer weiteren Verwendung für eine Funktionsanalyse wurde daher Abstand genommen.

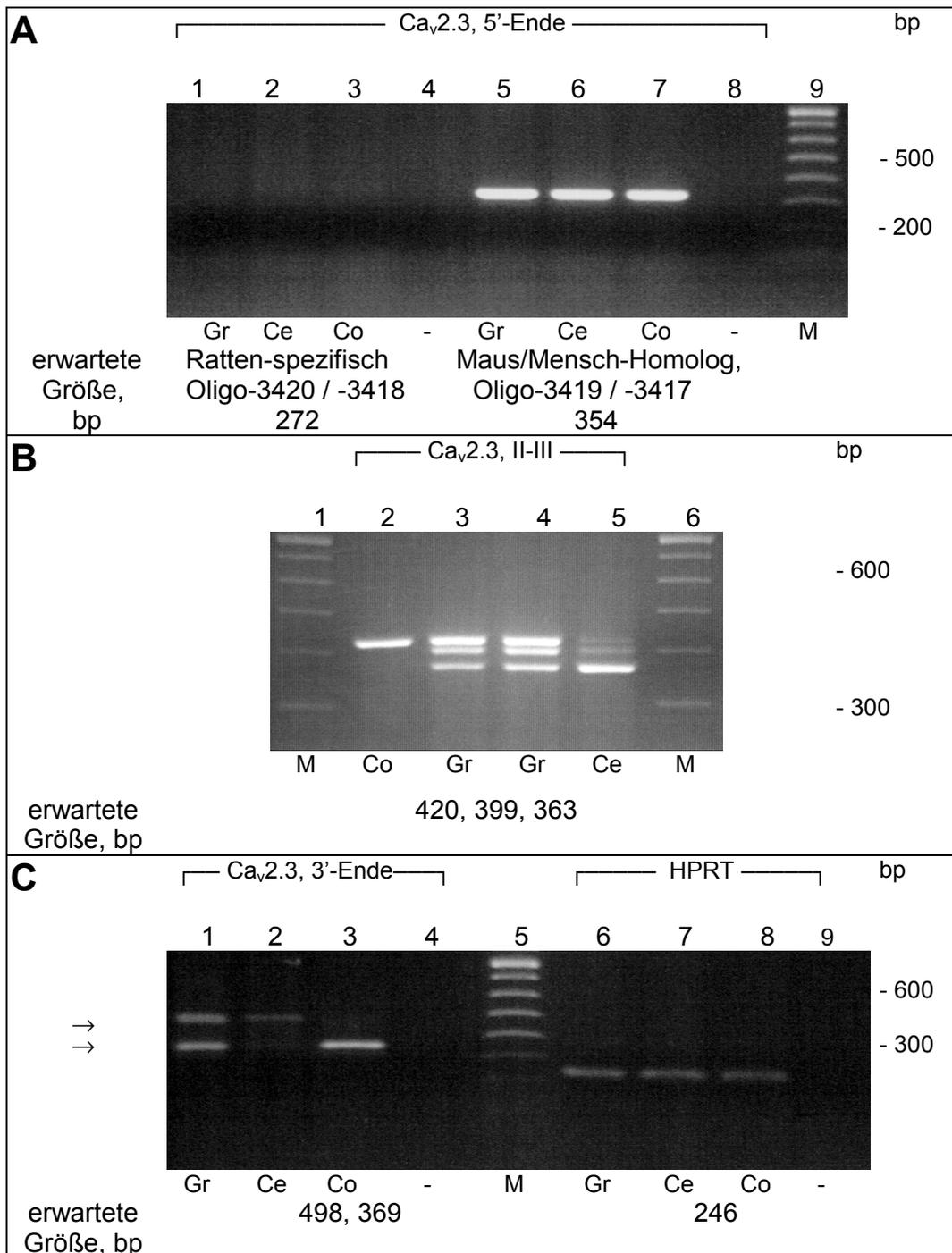


Abbildung 10: PCR-Amplifikation von Ca_v2.3-cDNS-Fragmenten aus Kortex, Zerebellum und Körnerzellen-Primärkulturen der Ratte.

Die Sequenzen und Hybridisierungspositionen der Oligonukleotide sind in 2.3, Tabelle 4 dargestellt. RNS aus folgenden Geweben wurde verwendet: Körnerzell-Primärkultur⁵⁴ (Gr), Zerebellum (Ce) und Kortex (Co). Als Marker (M) wurde die 100bp-Leiter verwendet; die abgebildeten Negativkontrollen (-) enthalten keine RNS. Die erwarteten Produktgrößen sind unterhalb der Diagramme angegeben. **(A)** Produkte der Amplifikation des 5'-Endes der Ca_v2.3-cDNS mit den Ratten-spezifischen Oligonukleotiden 3418 und 3420 (Spur 1-4) bzw. mit den Maus/Mensch-spezifischen Oligonukleotiden 3417 und 3419 (Spur 5-8). **(B)** Amplifikationsprodukte des Oligonukleotidpaares 3642/3643 aus der zytoplasmatischen Schleife zwischen Domäne II und III. Zwei verschiedene RNS-Aliquots von Körnerzellen wurden parallel amplifiziert (Spur 3 und 4). **(C)** Amplifikationsprodukte aus der 3'-Region der Ca_v2.3-cDNS mit Oligonukleotidpaar 524/3250, welche die Ca_v2.3d-spezifische Insertion III flankieren (Spur 1-4); Spur 6-9 enthalten die cDNS-Fragmente der HPRT-Amplifikation mit den Oligonukleotiden 3251/9799.

4.1.4 Nachweis spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle in ausgewählten Zelllinien

Im weiteren Verlauf wurde bei der Suche nach einem Modellsystem auf Zelllinien neuronalen Ursprungs und auf Insulinoma-Zelllinien zurückgegriffen, da die mit der Klonierung der Ca_v2.3-cDNS aus Maus verbundene RNS-Analyse mittels Northern Blot außer einer starken Expression in neuronalen Geweben auch schwache Signale in Milz, Herz, Retina und Pankreas⁶³ aufwies. Daneben wurden auch andere Ca_v-Transkripte von HVA-VGCCs (mit Ausnahme der skelettmuskulären Ca_v1.1- sowie der Retinaspezifischen Ca_v1.4-Untereinheit) amplifiziert. Die detektierten cDNS-Fragmente sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Zelllinien	Zelltyp	Spezies	Ca _v				
			1.2	1.3	2.1	2.2	2.3
βTC-3	Insulinoma	Maus	+	+	-	+	+ ^{III}
RIN-a2	Insulinoma	Ratte	+	+	+	+	-
INS-1	Insulinoma	Ratte	+	+	+	±	+ ^{III}
AtT-20	Hypophyse	Maus	+	+	+	+	-
AtT-20ph^I	Hypophyse	Maus	+	+	+	+	+ ^{III}
GH₃	Hypophyse	Ratte	+	+	-	+	-
NS20Y	Neuroblastom	Maus	+	-	+	+	-
NG108	Hybridom ^{II}	Maus/ Ratte	+	-	+	+	-
N1E-115	Neuroblastom	Maus	+	-	+	-	-

Tabelle 6: RT-PCR-Analyse von Ca_v-Transkripten in Zelllinien.

Zelllinien von Maus und Ratte wurden unter Standardbedingungen kultiviert (siehe 2.1.2), die jeweilige RNS isoliert und mittels RT-PCR (Oligonukleotidpaare, siehe 2.4.1) auf die Expression der VGCC-Transkripte untersucht; (+) = detektiert, (-) = nicht detektiert

^I AtT-20-Zellklon, der von Dr. Philipson, Chicago zur Verfügung gestellt wurde.

^{II} Hybridom, welches durch Fusion von Neuroblastom (Maus)- und Glioma (Ratte)-Zelllinien erzeugt wurde.

^{III} Amplifikation mittels Spezies-spezifischen Oligonukleotidpaaren, welche Insertion III flankieren, resultierten jeweils in einem cDNS-Fragment, welches diese Insertion besaß.

In drei Zelllinien konnten Ca_v2.3-Transkripte amplifiziert werden; während die Expression in der Insulinoma-Zelllinie INS-1 deutlich nachgewiesen wurde, waren die Ca_v2.3-Amplifikationsprodukte der hypophysären Zelllinie AtT20 sowie der Insulinoma-Zelllinie βTC-3 nur schwach detektierbar.

4.1.5 Nachweis spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle in der Insulinoma-Zelllinie INS-1 und in Langerhans'schen Inseln der Ratte

Die Zelllinie INS-1 wurde auf ihre Verwendung als Modellsystem näher untersucht und ihre VGCC-Populationen mit denen von Langerhans'schen Inseln aus Ratte und Maus vergli-

chen. Die Inseln wurden durch duktale Injektion von Kollagenase und anschließender mechanischer Scherung und Separation von parakrinem Gewebe der Bauchspeicheldrüse gereinigt und isoliert (siehe 2.1.1.2), so dass RNS bzw. Mikrosomen präpariert werden konnten.

4.1.5.1 cDNS-Analyse

Die Spleißvariantenstruktur der exprimierten $Ca_v2.3$ -cDNS als auch die Anwesenheit anderer Ca_v -Untereinheiten aus HVA-VGCCs wurde parallel in RNS-Präparationen aus INS-1-Zellen bzw. Langerhans'schen Inseln der Ratte mittels RT-PCR bestimmt. Die gelelektrophoretische Auftrennung (Abbildung 11A) verdeutlicht, dass alle untersuchten Ca_v -Transkripte aus Langerhans'schen Inseln und INS-1-Zellen amplifiziert werden konnten. Die geringe Intensität des $Ca_v2.2$ -Produktes lässt eine funktionelle Expression fraglich erscheinen; spätere Untersuchungen (siehe 4.2.1 bzw. 5.2.1) ergaben, dass der Beitrag zum Calciumeinstrom in die Zelle 1-2% nicht übersteigt (Prof. Dr. Klöckner, persönliche Mitteilung).

In Abbildung 11B sind die Amplifikationsprodukte alternativ gespleißter Regionen der $Ca_v2.3$ -cDNS aufgetragen. Das $Ca_v2.3$ -Transkript wird sowohl in pankreatischen Inseln als auch in der Insulinoma-Zelllinie bezüglich der detektierten Spleißvariante einheitlich exprimiert: Es besitzt das Maus/Mensch-spezifische 5'-Ende sowie die Insertionen II und III, aber nicht Insertion I und ähnelt daher der dominanten Struktur im Cerebellum. Im Unterschied zum Kleinhirn wurden in dieser Analyse keine anderen Amplifikationsprodukte in der betreffenden Region zwischen Domäne II und III detektiert.

Diese erstmalig definierte Spleißvariante wurde als $Ca_v2.3e$ bezeichnet. Eine cDNS dieser Art konnte bislang nicht kloniert oder explizit nachgewiesen werden. Neben der $Ca_v2.3c$ -cDNS, die im Kortex dominiert, ist dies die einzige $Ca_v2.3$ -cDNS, deren gewebespezifische Expression damit zweifelsfrei nachgewiesen wurde. Dagegen handelt es sich bei $Ca_v2.3a$ und $Ca_v2.3d$ wahrscheinlich um Klonierungsartefakte.

Die Vermutung, es handle sich hierbei möglicherweise um eine peripher exprimierte (neuro-) endokrine $Ca_v2.3$ -Variante konnte im weiteren Verlauf von Mitgliedern der Arbeitsgruppe bestätigt werden (siehe 5.1).

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde die INS-1-Zelllinie für die weiterführende Funktionsanalyse ausgewählt.

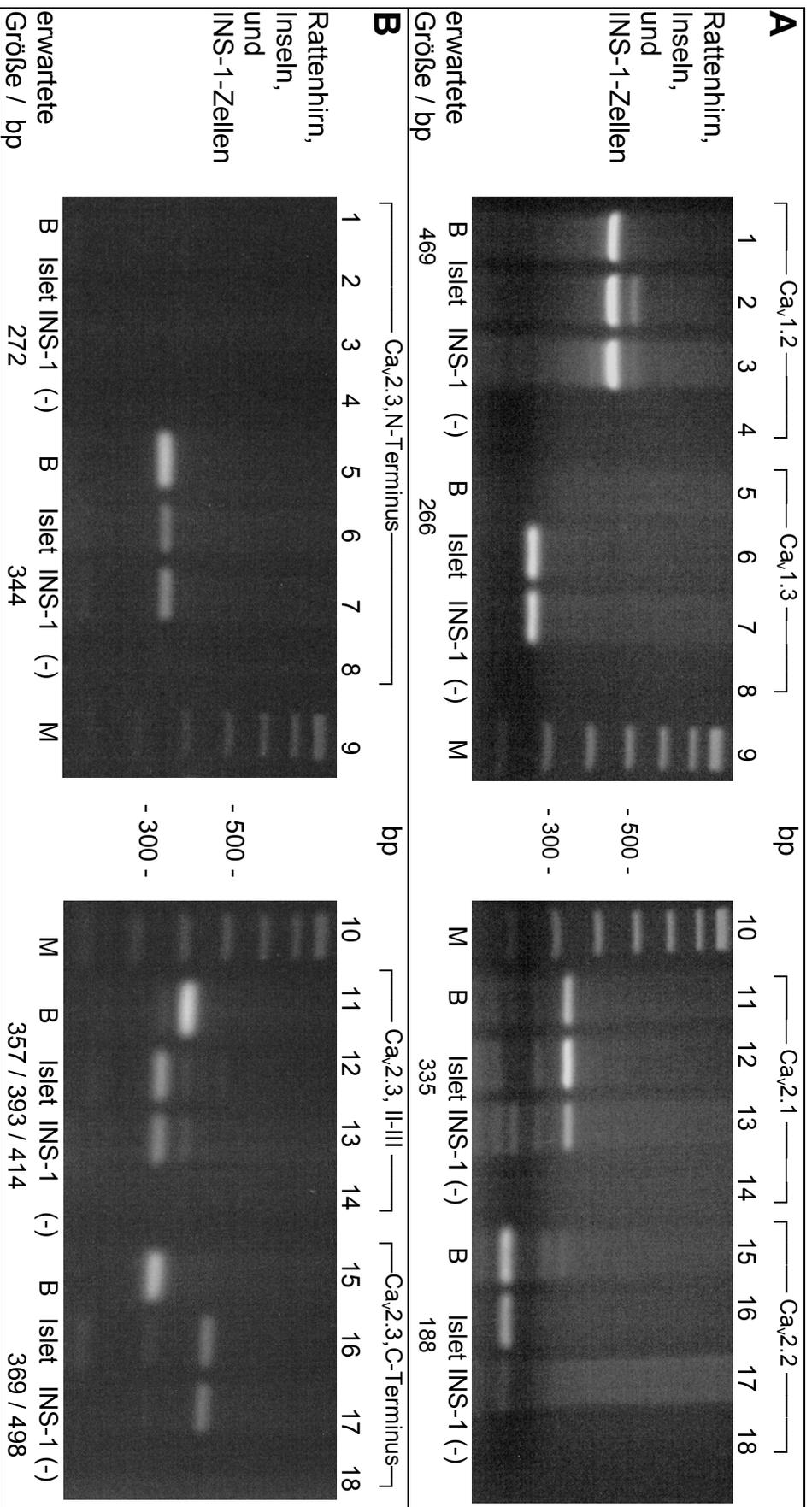


Abbildung 11: PCR-Amplifikation von Ca_v-cDNF-Fragmenten aus Langerhans'schen Inseln, INS-1-Zellen und Gesamthirn.
 Für jedes Oligonukleotidpaar wurden die Amplifikationsprodukte in der Reihenfolge Maushirn (B), Langerhans'schen Inseln (Islet), INS-1-Zelllinie (INS-1) und Negativkontrolle ohne RNS (-) aufgetragen; als Marker (M) wurde die 100bp-Leiter verwendet. Die erwarteten Produktgrößen sind unterhalb der Diagramme angegeben. Die HPRT-Amplifikation ist nicht dargestellt. (A) Amplifikation von Ca_v.1.2 (Spur 1-4), Ca_v.1.3 (Spur 5-8), Ca_v.2.1 (Spur 11-14) und Ca_v.2.2 (Spur 15-18) mit spezifischen Oligonukleotidpaaren (s. 2.3.1). An anderer Stelle konnte aus Rattenhirn durch die Ca_v.1.3-spezifischen Oligonukleotide ein cDNF-Produkt mit 266 bp amplifiziert werden. (B) Amplifikation der variablen Regionen des Amino- (N) und Carboxy (C-Term.)-Terminus sowie der zytoplasmatischen Schleife zwischen Domäne II und III (II-III) der Ca_v.3-cDNF.

4.1.5.2 Protein-Analyse

Zur Detektion des $Ca_v2.3$ -Proteins wurden die polyklonalen Antikörper anti- $\alpha1E_d$ und anti-Nast- $\alpha1E$ -com eingesetzt (siehe 3.2.5). Dazu wurden routinemäßig Mikrosomen nach hypotonischen Zellaufschluss präpariert¹²⁷ (siehe 3.1.1.1) und anschließend durch eine Disk-PAGE und einem Immunoblot auf die Expression von $Ca_v2.3$ -Protein hin untersucht wurden. Auf diese Weise konnte das Protein mit hoher Sensitivität aus Großhirn-, Kleinhirn- und Nieren-Mikrosomen verschiedener Spezies mit einer Länge von 246 kDa detektiert werden^{120,128,129}. So wurde die Kanaluntereinheit in 10 μg mikrosomalen Proteins aus Großhirn-Präparationen nachgewiesen, was einer Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber kommerziell erhältlichen $Ca_v2.3$ -Antikörpern um das Drei¹³⁰- bzw. Zehn⁶⁶-fache bezüglich der Menge an eingesetztem mikrosomalen Protein entspricht.

Für die Detektion in Langerhans'schen Inseln der Ratte bzw. der Insulinoma-Zelllinie INS-1 wurden 20 μg (entspricht 750 Inseln) bzw. 14,6 μg mikrosomalen Proteins aufgetragen und mit anti- $\alpha1E_d$ inkubiert (Abbildung 12). Als Positivkontrolle wurde 2 μg mikrosomales Protein, welches aus der stabil mit $Ca_v2.3d$ transfizierten Zelllinie HEK293-2C6 (siehe 2.1.2.1) isoliert worden war, verwendet; als Negativkontrolle dienten 2 μg untransfizierte HEK293-Zellen¹²⁰.

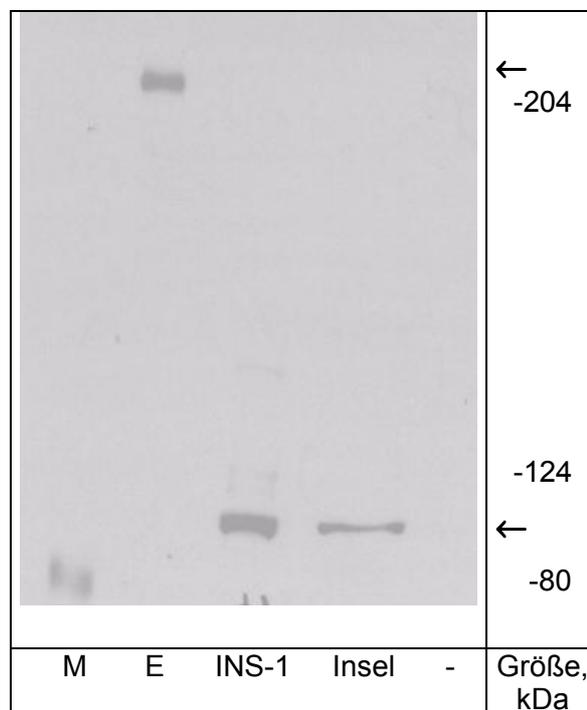


Abbildung 12: Immundetektion mikrosomalen Proteins aus Langerhans'schen Inseln der Ratte und INS-1-Zellen.

Aufgetragen sind mikrosomale Präparationen von stabil mit $Ca_v2.3d$ transfizierten HEK293-2C6-Zellen (E, 2 μg , Spur 2), untransfizierten HEK-293-Zellen (-, 2 μg , Spur 3), INS-1-Zellen (INS-1, 14,6 μg , Spur 4) und Langerhans'schen Inseln der Ratte (Insel, 20 μg , Spur 5). Die Immundetektion erfolgte mit anti- $\alpha1E_d$. In Spur 1 ist der Protein-Marker (SDS-6H, BioRad, Hercules, USA) aufgetragen.

Ein $\text{Ca}_v2.3\text{e}$ -Protein in einer der Positivkontrolle vergleichbaren Größe konnte weder in Langerhans'schen Inseln noch in INS-1-Zellen detektiert werden. Dagegen wurde ein Protein-Fragment mit einer Größe von etwa 100 kDa angefärbt.

Auch in späteren Versuchen, bei denen bis zu 100 μg mikrosomales Protein aus INS-1-Zellen bzw. Mikrosomenpräparationen aus 500 Langerhans'sche Inseln der Maus aufgetragen wurden, konnte das 240 kDa-Fragment nicht zweifelsfrei detektiert werden. Die Untersuchung von mikrosomalen INS-1-Proteinen, welche zuvor durch Ultraschall¹³¹ bzw. mechanische Scherung (modifiziert, nach: Flockerzi¹³²) homogenisiert wurden, erbrachte ebenfalls keinen Nachweis des $\text{Ca}_v2.3$ -Proteins in einer der Positivkontrolle entsprechenden Größe; eine Detektion des Proteins in Trichloressigsäure-Extrakten¹³³ von membranären INS-1-Proteinen schlug ebenfalls fehl.

Da im Gegensatz zur RT-PCR auch bei Verwendung der zehnfachen Menge an mikrosomalen Proteinen aus insulinhaltigen Zellen im Vergleich mit Großhirn-Präparationen kein $\text{Ca}_v2.3$ -Protein nachgewiesen werden konnte, wurde mittels Präadsorption des Antigens überprüft, ob es sich bei dem detektierten 100 kDa-Fragment um ein proteolysiertes $\text{Ca}_v2.3$ -Polypeptid handelt. Dazu wurden anti- $\alpha 1\text{Ed}$ -Seren mit verschiedenen Konzentrationen des Peptids GIYLPSTQEHAG (siehe 3.2.5) über Nacht bei 4°C inkubiert, bevor am nächsten Tag die Immunodetektion erfolgte.

Mit Hilfe der Peptid-Verdünnungsreihe konnte ermittelt werden, dass die Affinität von anti- $\alpha 1\text{Ed}$ bezüglich der 240 kDa-Bande aus HEK293-2C6 bzw. des 100 kDa-Fragments aus INS-1-Zellen in etwa gleich ist (Abbildung 13): Bei Konzentrationen über 0,3 – 0,1 nM verhindert das Peptid die Bindung des Antikörpers an die Membran-fixierten Antigene, unterhalb dieser Schwelle werden beide Fragmente angefärbt. Aufgrund der unterschiedlichen aufgetragenen Mengen erscheint die 100 kDa-Bande bei höheren Peptid-Konzentrationen.

Hinzu kam die Beobachtung, dass bei Verwendung von EDTA/ EGTA-Konzentrationen von 20 mM im Homogenisationspuffer Proteinfragmente in der Immundetektion identifiziert wurden, die größer als 100 kDa und durch Antigen-Präadsorption (1 nM) verdrängbar waren (hier nicht gezeigt). Daher wurde vermutet, dass das $\text{Ca}_v2.3\text{e}$ -Protein möglicherweise durch eine Ca^{2+} -abhängige Protease, die nicht in neuronalem, aber endokrinem bzw. Insulin-sezernierenden Zellen auftritt, verdaut wird. Als mögliche Kandidaten wurden die Protein Konvertasen (protein convertases, PC) ermittelt, eine Proteasenfamilie, die in Hormon-sezernierenden Zellen für die proteolytische Prozessierung des Hormons im Vesikel verantwortlich ist. In Anlehnung an die Literatur^{134,135} wurde daher das Oligopeptid PC-Inhibitor mit der Sequenz LLRVKR synthetisiert

und in einer Konzentration von 40 μM final zum Homogenisationspuffer hinzugegeben. Dieses Peptid inhibiert die proteolytische Aktivität von PC 1 und 2, die in Insulin-sezernierenden Zellen exprimiert werden.

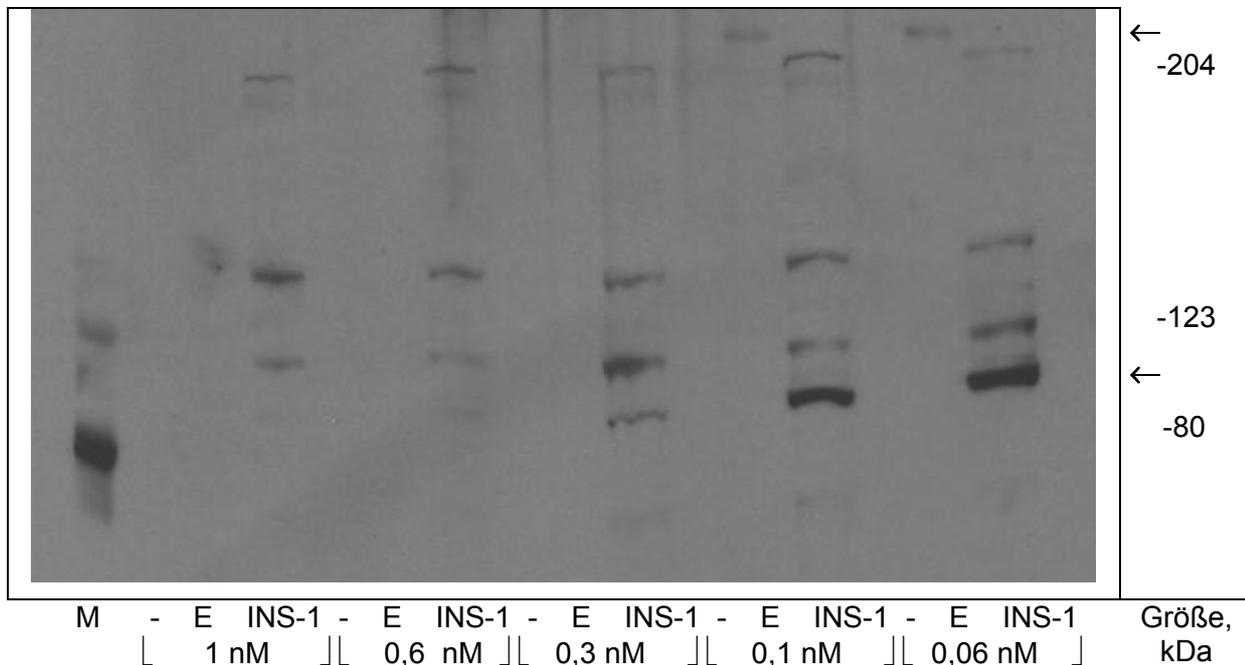


Abbildung 13: Immundetektion von $\text{Ca}_v2.3\text{e}$ -Proteinen in HEK293-2C6 bzw. INS-1-Zellen nach vorheriger Antikörper-Adsorption durch das Peptid GIYLPSTQEHAG.

Aufgetragen wurden jeweils drei Mikrosomenpräparationen (von links: HEK293-2C6 (E, 1 μg), HEK293 (-, 1 μg), INS-1 (INS-1, 20 μg) als Immundetektionen mit präadsorbiertem anti-Nast197. Die jeweiligen Konzentrationen des Peptids Nast197 sind unterhalb der Triplets dargestellt. Der Marker (SDS-6DH, BioRad, Hercules, USA) ist in Spur 1 aufgetragen.

Die Verwendung des Peptids führte jedoch nicht zu einer Detektion des $\text{Ca}_v2.3\text{e}$ -Proteins in der nativen Größe in INS-1-Zellen (hier nicht gezeigt).

Der Expression des $\text{Ca}_v2.3\text{e}$ -Proteins in INS-1-Zellen bzw. Langerhans'schen Inseln konnte daher nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Dies könnte auf eine sehr geringe Expressionsdichte zurückgeführt werden, die nur mittels RT-PCR detektiert werden kann. Eine gewebespezifische Proteolyse des $\text{Ca}_v2.3\text{e}$ -Proteins kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass in der Literatur bislang noch von keinem VGCC-Protein eine erfolgreiche Extraktion aus endokrinem Gewebe berichtet worden ist.

4.2 Pharmakologische Funktionsanalyse des $\text{Ca}_v2.3\text{e}$ -Proteins in INS-1-Zellen

Die Zelllinie INS-1 aus Ratte hat sich in letzter Zeit zu einem anerkannten Modellsystem der Insulinforschung^{136,137} entwickelt. Sie wurde 1992 im Institut von Prof. Claes Wolheim etabliert¹³⁸ und besitzt gegenüber den meisten anderen Insulinoma-Zelllinien den Vorteil, dass sie als Reaktion auf Glukosezugabe im physiologischen Konzentrationsbereich in einer den nativen β -

Zellen der Langerhans'schen Inseln vergleichbaren Weise Insulin sezerniert. Darüber hinaus ist, wie in 4.1.3 erwähnt, das Expressionsmuster der Ca_v -Untereinheiten von VGCCs in INS-1-Zellen und Langerhans'schen Inseln identisch.

In diesem Modellsystem wurde nun versucht, durch Sekretionsmessungen Aufschluss über die unbekannt funktionelle Bedeutung dieses Proteins zu erhalten.

Ausgehend von jeweils 250 000 Zellen pro Messwert wurde nach dreitägiger Kultivierung der Zellen die Insulinsekretion durch die in 3.4 beschriebenen Protokolle aktiviert; die Ermittlung des sezernierten Insulins, welches anhand des zellulären Gesamtproteins der Zelle normiert wurde, erfolgte mit Hilfe eines Radioimmunoassays (siehe 3.3). Für die folgenden Experimente wurden saturierende Sekretionsaktivierungen mit 15 mM Glukose verwendet.

4.2.1 Die SNX-482-vermittelte Sekretionsinhibition

Zur selektiven Inhibition von $\text{Ca}_v2.3$ -haltigen Ca^{2+} -Kanälen konnte das Peptidtoxin SNX-482 verwendet werden, welches freundlicherweise von der Fa. Elan Pharmaceuticals, Menlo Park, USA zur Verfügung gestellt wurde. Das Peptidtoxin wurde aus dem Gift der Tarantelart *Hysteroocrates gigas* isoliert und resynthetisiert. Neben der Hemmung von rekombinanten $\text{Ca}_v2.3$ -Proteinen in HEK293-Zellen ($\text{IC}_{50} = 10\text{-}48 \text{ nM}$)^{139,140} konnte keine spezifische Interaktion mit anderen VGCCs registriert werden. In seiner chemischen Struktur ähnelt das Polypeptid der Gruppe der δ -, κ - und ω -Conotoxine, die aus dem Gift der Meeresschnecken isoliert wurden (Abbildung 38A).

In einer eigenen elektrophysiologischen Charakterisierung (Abbildung 38B-E), die von Prof. Dr. Klöckner, Institut für vegetative Physiologie der Universität Köln durchgeführt wurde, inhibierte SNX-482 in einer Konzentration von 100 nM den $\text{Ca}_v2.3$ -induzierten Ba^{2+} -Einwärtsstrom in stabil mit humaner $\text{Ca}_v2.3d$ -cDNS transfizierten HEK293-Zellen (HEK- $\text{Ca}_v2.3d$). Die Hemmung war schnell, partiell reversibel und unvollständig: Während nach Zugabe von 20 nM Toxin mehr als 50% des Ba^{2+} -Stroms inhibiert wurden, sank die Stromdichte nach Applikation von 100 nM SNX-482 um 87% (Abbildung 38B). 100 nM Toxin hemmten weiterhin mit gleicher Empfindlichkeit transient exprimierte $\text{Ca}_v2.3e$ -cDNS in HEK293-Zellen.

Auch die Koexpression der $\beta 3$ - bzw. der $\beta 3$ - und $\alpha 2\delta 2$ -Untereinheiten in $\text{Ca}_v2.3d$ -exprimierenden HEK293-Zellen führte nicht zu einer Änderung der Empfindlichkeit des Barium-Einwärtsstroms gegenüber SNX-482 (Abbildung 38E). Obwohl die native Untereinheitenkombination des R-Typ-Kanals in INS-1-Zellen unbekannt ist (es wird eine Koexpression mit der $\beta 3$ -Untereinheit vermutet (Prof T. Schneider, persönliche Mitteilung)) konnte aufgrund dieser Experimente vermutet werden, dass der Ca^{2+} -Kanal *in vivo* entsprechend der ionenleitenden Untereinheit $\text{Ca}_v2.3e$ gehemmt werden würde.

Zur Ermittlung des Einflusses von SNX-482 auf die durch 15 mM Glukose induzierte Insulinsekretion in INS-1-Zellen wurde zunächst eine Dosis-Wirkungskurve mit Konzentrationen zwischen 0 und 200 nM SNX-482 durchgeführt. 200 nM Toxin wurden verwendet, da 100 nM, wie in Abbildung 38B dargestellt, den $Ca_v2.3e$ -vermittelten Strom nicht vollständig hemmten. Von höheren Dosen wurde jedoch abgesehen, um nicht in den Bereich einer unspezifischen Interaktion mit anderen VGCCs¹³⁹ zu gelangen.

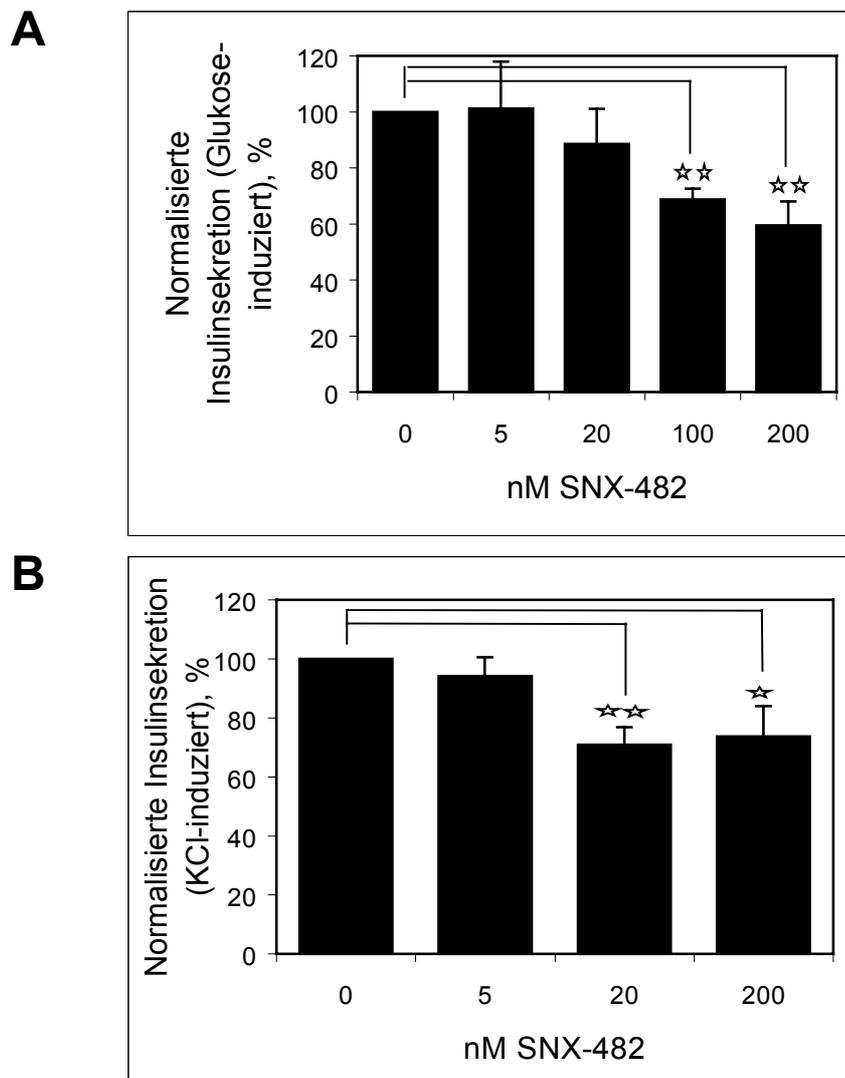


Abbildung 14: Dosis-Wirkungskurve der SNX-482 vermittelten Hemmung der Glukose- bzw. KCl-induzierten Insulinsekretion in der Insulinoma-Zelllinie INS-1.

Die verwendeten Toxin-Konzentrationen sind unterhalb des Diagramms angegeben. Im Einzelexperiment wurde die SNX-482 vermittelte Hemmung mit der Stimulation ohne Toxin-Zugabe (0 nM) normiert; daher besitzt dieser Wert keinen Fehler. Die Insulinsekretionen sind, jeweils normiert mit dem zellulären Insulingehalt, als Mittelwert \pm mittlerer Standardfehler dargestellt. **(A)** Durch 15 mM Glukose induzierte Insulinsekretion in Gegenwart steigender Konzentrationen von SNX-482. Dem dargestellten Säulendiagramm liegen 5 Einzelexperimente zugrunde, in denen 2 (0 nM) bzw. 4 Messwerte registriert wurden. **(B)** Durch 25 mM KCl induzierte Insulinsekretion in Gegenwart steigender Konzentrationen von SNX-482. Dem dargestellten Säulendiagramm liegen 4 Einzelexperimente zugrunde, in denen 2 (0 nM) bzw. 4 Messwerte registriert wurden.

Wie Abbildung 14A verdeutlicht, führte die Zugabe von SNX-482 in Abhängigkeit von der Konzentration zu einer Reduktion der Insulinsekretion. In Gegenwart von 200 nM Toxin wurde die Insulinfreisetzung in fünf unabhängigen Experimenten auf $60\% \pm 8$ ($p < 0,001$) gegenüber der Inkubation ohne SNX-482 reduziert. Die Reduktion in Gegenwart von 100 nM und 200 nM Toxin ist signifikant; im weiteren Verlauf der Experimente wurden nur noch diese Konzentrationen verwendet.

Um auszuschließen, dass der Effekt auf unspezifische Interaktionen des Peptids bzw. des Lösungsmittels zurückzuführen war, wurden 193 nM eines hitze- und säuredenaturierten SNX-482-Toxins (siehe 3.4.3) in der Zellinkubation eingesetzt, was zu keiner signifikanten Reduktion führte ($107\% \pm 11\%$, $n = 4$).

Auch Depolarisations-induzierende Substanzen stimulieren die Insulinsekretion in INS-1-Zellen. Durch die Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration verändert sich das elektrochemische Potential gemäß der Nernst-Goldstein-Gleichung, was eine Verschiebung des Membranpotentials zu positiveren Werten zur Folge hat. Die Zugabe von 25 mM – 30 mM KCl zum Krebs-Ringer-Puffer ist ausreichend, um nachfolgend VGCCs zu aktivieren¹⁴¹.

Daher wurde in einem weiteren Experiment der SNX-482-Einfluss auf eine Kaliumchlorid-induzierte Insulinsekretion durch Zugabe von 25 mM KCl in einer Dosis-Wirkungskurve untersucht (Abbildung 14B). Auch in diesem Fall führte die Applikation des Peptidtoxins zur Reduktion der Insulinfreisetzung. 200 nM Toxin reduzierten in vier Einzelexperimenten die KCl-induzierte Sekretion signifikant auf $74\% \pm 10$ ($p = 0,06$) gegenüber der Inkubation ohne Peptid.

Aus der inhibitorischen Wirkung des Peptidtoxins SNX-482 auf die Glukose- bzw. KCl-induzierte Insulinsekretion lässt sich schlussfolgern, dass SNX-482-sensitive Kanäle und dabei vermutlich $Ca_v2.3e$ -haltige Ca^{2+} -Kanäle an der Sekretionsregulation in INS-1-Zellen beteiligt sind.

4.2.2 Effekt der Kultivierungsdauer auf die SNX-482-Inhibition

Mit zunehmenden Alter der kultivierten INS-1-Zellen d.h. mit zunehmender Passagierungszahl nahm das Ausmaß der SNX-482-vermittelten Sekretionsreduktion ab. In Abbildung 15 ist der Verlust der SNX-482-Sensitivität bei Verwendung von 200 nM Peptidtoxin dargestellt.

Obwohl die Kultivierungsbedingungen nicht geändert wurden, konnte nur in den ersten Experimenten ein signifikanter Effekt des Toxins auf die Insulinsekretion beobachtet werden. In den letzten vier Experimenten wurde schließlich keine SNX-482-vermittelte Inhibition mehr registriert. Daher wurden keine molekularen Analysen der INS-1-Zellen mit hoher Passagenzahl durchgeführt, sondern statt dessen ein neues Zell-Aliquot aufgetaut und nach der üblichen Ver-

weildauer von drei Wochen in Kultur (siehe 3.1.2) für weitere Sekretionsmessungen verwendet. In diesem Fall konnten die ursprünglich ermittelten Reduktionswerte bei Verwendung von 200 nM SNX-482 reproduziert werden.

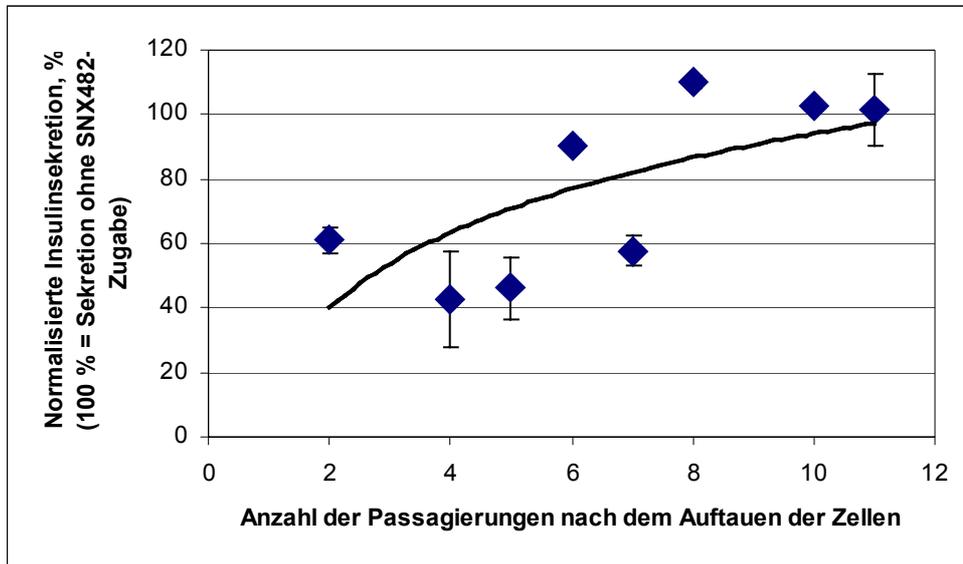


Abbildung 15: Abhängigkeit des SNX-482-Effektes von der Kultivierungsdauer in INS-1-Zellen.

Dargestellt ist der Einfluss der Passagenzahl nach dem Auftauen eines INS-1-Zellquots auf die Hemmung der Glukose-induzierten Insulinsekretion durch 200 nM Peptidtoxin. Die acht Einzelexperimente wurden in einem Zeitraum von 3 Monaten durchgeführt. Jedes Experiment repräsentiert mindestens 3 Einzelwerte, die jeweils mit dem zellulären Insulingehalt normiert wurden; die erhaltenen Reduktionswerte wurden bezüglich der Glukose-vermittelten Stimulation ohne Toxin-Zugabe normalisiert.

4.2.3 Vergleich der inhibitorischen Effekte von L-Typ-, P-Typ- und R-Typ- Ca^{2+} -Antagonisten

Aufgrund der Beobachtung, dass SNX-482 die Stimulus-induzierte Insulinsekretion nur partiell hemmt, musste geschlossen werden, dass auch andere VGCC an der Sekretion beteiligt sind. Aus der Literatur war bekannt, dass sowohl in Insulinoma-Zelllinien¹⁴² als auch in β -Zellen aus Langerhans'schen Inseln^{143,144} L- sowie P/Q-Typ-VGCCs an der Ca^{2+} -aktivierten Insulinsekretion beteiligt sind. Tatsächlich scheinen beide Kanaltypen für die meisten Stimulus-Sekretionskopplungen in endokrinen Systemen verantwortlich zu sein (siehe 1.2.1). Aufgrund der Daten aus der RT-PCR-Analyse und Angaben aus der Literatur¹⁴⁵ konnte eine Beteiligung verschiedener hochspannungsaktivierter VGCCs an der Glukose-induzierten Insulinsekretion in INS-1-Zellen vermutet werden. Daher wurde der Einfluss der SNX-482-vermittelten Hemmung in der Insulinoma-Zelllinie mit den Effekten bekannter Ca^{2+} -Kanalblocker verglichen (*toxytyping*). Die Zugabe der Antagonisten erfolgte sowohl einzeln als auch zusammen.

Jeder Antagonist verursachte eine signifikante Reduktion der Insulinsekretion im Vergleich zur Kontrolle ohne Hemmstoff (Abbildung 16).

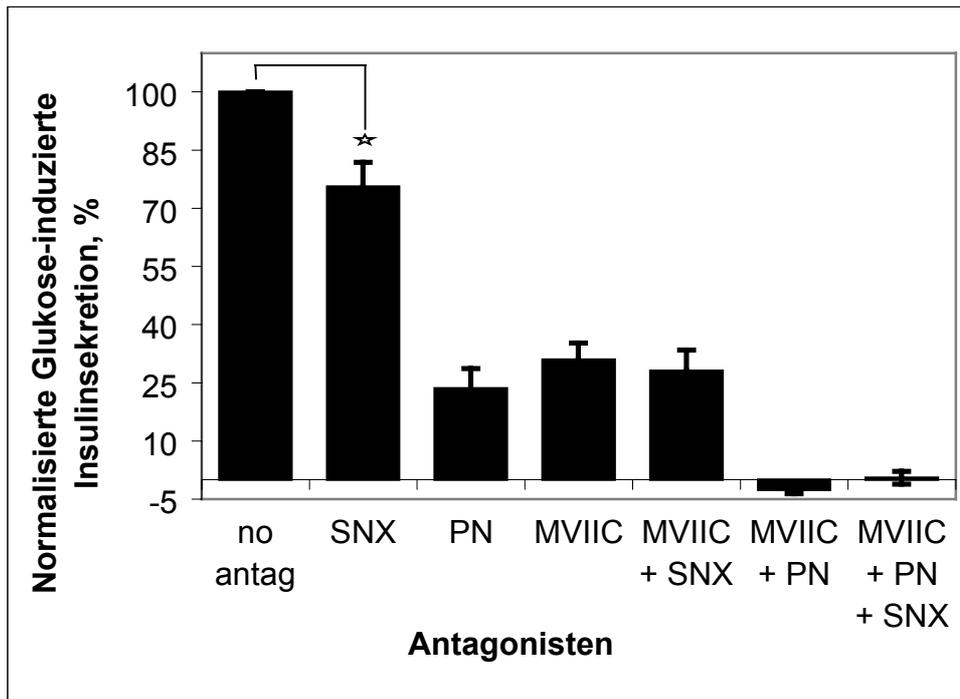


Abbildung 16: Einfluss verschiedener Ca^{2+} -Kanalantagonisten auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion in INS-1-Zellen.

Dargestellt sind Mittelwert \pm mittlerer Fehler aus mindestens 3 Experimenten mit je 2 (ohne Antagonist) bzw. 4 Einzelmessungen, jeweils normiert mit dem zellulären Insulingehalt; die erhaltenen Reduktionswerte wurden auf die Glukose-vermittelten Stimulation ohne Antagonisten-Zugabe bezogen (100%). Verwendete Substanzen: kein Antagonist (no antag); 100 nM SNX-482 (SNX); 2 μM (\pm)-Isradipin (PN); 0,5 μM ω -Conotoxin-MV11c (MVIIC), sowie verschiedene Kombinationen der Toxine.

Die Zugabe von 2 μM des L-Typ-Antagonisten PN-200/110 ((\pm)- Isradipin) führte zu einer Hemmung auf $23,5\% \pm 9$ ($n=3$) des Ausgangswertes. Auch die Applikation von 0,5 μM ω -Conotoxin-MV11c, einer Substanz, welche sowohl N-Typ- als auch P/Q-Typ- Ca^{2+} -Kanäle blockiert, reduzierte die Insulinsekretion auf $31\% \pm 8$ ($n=3$) gegenüber der Positivkontrolle. 3 μM des N-Typ-spezifischen ω -Conotoxin-MV11a (SNX-111) ($n=2$) verursachten keine signifikante Änderung der Insulinsekretion (hier nicht dargestellt), so daß der beobachtete Effekt der ω -Conotoxin-MV11c-Hemmung offenbar zum weitaus größten Teil in der Hemmung der P/Q-Typ- Ca^{2+} -Kanäle besteht. Die Bedeutung der VGCCs für die Insulinsekretion der INS-1-Zelle wird durch die Tatsache verdeutlicht, daß die gleichzeitige Zugabe von P- und L-Typ-Antagonisten die Insulinsekretion vollständig unterdrückt.

Während die Verwendung von 100 nM SNX-482 die Insulinsekretion auf $76\% \pm 8$ ($n=4$) reduzierte, führte die Kombination von ω -Conotoxin-MV11c und SNX-482 mit $28,1\% \pm 11$ ($n=4$) zu einer im Vergleich mit der alleinigen Verwendung von ω -Conotoxin-MV11c nicht signifikant erniedrigten Insulinsekretion. Die fehlende Additivität ist wesentlich ausgeprägter als bei der gleichzeitigen Verwendung von ω -Conotoxin-MV11c und (\pm)- Isradipin mit oder ohne SNX-482.

Zugabe aller drei Antagonisten bzw. von ω -Conotoxin-MVIIc und PN-200/110 führte zur vollständigen Inhibition der Glukose-induzierten Sekretion in INS-1-Zellen.

In einem abschließenden Experiment wurde die Reduktion des Ba^{2+} -Ioneneinwärtsstroms in INS-1-Zellen nach Applikation der im *toxy-typing* verwendeten Hemmsubstanzen bestimmt, um den Beitrag der VGCCs an der Glukose-induzierten Insulinsekretion mit den jeweiligen Ladungsträger-Durchtrittsstömen zu korrelieren. Diese elektrophysiologische Charakterisierung wurde von Prof. Klöckner durchgeführt.

Applikation von 2 μ M (\pm)-Isradipin reduzierte den Ba^{2+} -Einwärtsstrom von $87,4 \pm 13$ pA/pF (n=11) auf $67,4 \pm 10$ pA/pF (n=11). Die Zugabe von 2 μ M (\pm)-Isradipin und 0,5 μ M ω -Conotoxin-MVIIc verringerte den Ba^{2+} -Durchtrittsstrom von $50,8 \pm 2,6$ pA/pF (n=5) auf $11,3 \pm 0,9$ pA/pF (n=11). Daraus errechnet sich der relative Anteil beider Komponenten am Ba^{2+} -Einstrom zu $23 \pm 16\%$ (L-Typ) bzw. $55 \pm 16\%$ (P/Q-Typ) und der resistente Strom zu $22 \pm 2\%$.

Die anschließende Reststromanalyse wurde zur Bestimmung des SNX-482-sensitiven Anteils immer in Gegenwart der beiden N- und P/Q- bzw. L-Typ-Antagonisten durchgeführt (Abbildung 39). In neun Experimenten reduzierten 100 nM SNX-482 den Reststrom von $-12,6 \pm 1,2$ pA/pF auf $-7,6 \pm 0,5$ pA/pF, was einem relativen Anteil von $8 \pm 2\%$ am gesamt- Ba^{2+} -Einwärtsstrom entspricht. Die dargestellte Strom-Spannungskurve vor Zugabe des Peptidtoxins („control“, Abbildung 39B) mit einem maximalen Ba^{2+} -Einwärtsstrom bei einem Testpotential von +5 mV repräsentiert den hochspannungsaktivierten Reststrom in INS-1-Zellen. Die Applikation von 100 nM SNX-482 führte neben einer Verringerung der Ba^{2+} -Leitfähigkeit zu einer Verschiebung des Spitzenstroms zu positiveren Potentialen hin („SNX-482“). Die Differenz der bei den jeweiligen Testpotentialen registrierten Ströme, die damit dem SNX-482-empfindlichen Anteil am Reststrom entspricht, wurde berechnet („difference“) und besitzt einen zu negativeren Potentialen bei etwa 0 mV verschobenen Maximaleinstrom. Auch im Vergleich zur Strom-Spannungskurve der SNX-482-Hemmung in HEK-Ca_v2.3d (Abbildung 38C) liegt der Spitzen-Einwärtsstrom bei negativeren Testpotentialen. Somit kann angenommen werden, dass die SNX-482-sensitive Ionenstromkomponente bei negativeren Testpotentialen aktiviert wird als der verbleibende Toxin-unempfindliche resistente Stromanteil. Dies könnte bedeuten, dass SNX-482 durch unterschiedliche Bindungsaffinitäten zwischen distinkten, verschiedenen R-Typ-Kanälen differenziert. Eine ähnliche Schlussfolgerung wurde von Tottene et al.,2000⁶⁸ bei der Analyse resistenter Ionenstromkomponenten in zerebellären Körnerzell-Primärkulturen vorgenommen (siehe 1.1.4).

In Gegenwart von SNX-111 (einem synthetischen Analogon des selektiven N-Typ-Antagonisten ω -Conotoxin-MVIIa) konnte keine signifikante Reduktion des SNX-482-unempfindlichen Ba^{2+} -

Einstroms beobachtet werden (Abbildung 39D), was darauf schließen lässt, dass der Anteil an exprimierten N-Typ-Kanälen unterhalb der Nachweisgrenze liegt (siehe auch 4.1.3).

4.3 Funktionsanalyse des Ca_v2.3e-Proteins in INS-1-Zellen nach stabiler Überexpression von Ca_v2.3-Antisense-RNS

Durch die beschriebene pharmakologische Analyse konnte die Beteiligung des SNX-482-sensitiven Ca_v2.3e-Ca²⁺-Kanals an der Glukose- bzw. Kaliumchlorid-induzierten Insulinsekretion wahrscheinlich gemacht werden. Mit Hilfe der Antisense-Technologie sollten im folgenden längerfristige Änderungen in INS-1-Zellen induziert werden. Dabei stellte sich die Frage, ob eine Reduktion des zellulären Ca_v2.3e-Proteins die Insulinsekretion der Zellen verändern würde.

Zu diesem Zweck wurden INS-1-Zellen mit einem Vektorkonstrukt stabil transfiziert, welches zur Überexpression eines Ca_v2.3-Antisense-Fragmentes führte, und im Anschluss einer Funktionsanalyse unterzogen.

4.3.1 Konstruktion des Vektors

Die Strategie, nach der die Antisense-Fragmente synthetisiert und in den Transfektionsvektor kloniert wurden, ist in Abbildung 17 dargestellt:

Für die Überexpression wurde der 5'-Bereich der aus Ratte klonierten Ca_v2.3-cDNS (Accessionnr. L15453, GenBank, Bethesda, USA) inklusive des Start-Basentriplets ausgewählt (Abbildung 17B). Das Fragment beginnt mit der Kozak-Sequenz und dem ATG-Startcodon und kodiert den gesamten Aminoterminus und die Transmembrandomäne I sowie die ersten sieben Aminosäuren der zytoplasmatischen Schleife zwischen Domäne I und II. Mit einer Gesamtlänge von 1129 bp umfasst es den Nukleotidbereich von Position nt182 bis nt1311; das cDNS-Fragment wurde durch eine Amplifikation mit Hilfe der Oligonukleotide a1e-asf (nt182-nt205) und a1e-asr (nt1292-1311) (siehe 2.4) aus Rattenhirn-cDNS synthetisiert.

Die beschriebene Region wurde mit strukturverwandten Sequenzen anderer Ca_v-Untereinheiten verglichen (Abbildung 17B). Die hohe Homologie zu Ca_v2.1, der ionenbildenden Pore des in INS-1-Zellen prominent exprimierten P/Q-Typ-Kanals, sowie in geringerem Maße auch zu Ca_v1.2 (L-Typ), könnte eine unspezifische Interaktion des Antisense-Fragmentes mit anderen Ca_v-RNS-Molekülen zur Folge haben. Daher wurde die Expression von P/Q- bzw. L-Typ-VGCCs mit Hilfe selektiver Blocker im elektrophysiologischen Experiment überprüft (s.u.).

Als Vektor wurde das Plasmid pCAGGS/GFP verwendet (freundlicherweise von Dr. Kolossov, Institut für Neurophysiologie, Universität Köln, zur Verfügung gestellt), welches eine hohe Transfektionseffizienz gegenüber kultivierten Säugetierzellen aufweist. Die Struktur ist in Abbildung 17A dargestellt. Der Einbau des Antisense-Fragmentes erfolgte mit Hilfe der flankie-

renden *EcoR I*-Schnittstellen durch Substitution der GFP-cDNS (GFP = „green fluorescent protein“). Dazu wurden terminale *EcoR I*-Erkennungssequenzen an das 5`- (a1E-asf) bzw. 3`-Ende (a1E-asr) der zur Generierung des Antisense-Fragmentes verwendeten Oligonukleotide synthetisiert. Nach dem Verdau mit *EcoR I* konnte das Amplifikationsprodukt daher in den entsprechend behandelten und anschließend dephosphorylierten Vektor ligiert werden.

Um zwischen der Antisense-Repression und unspezifischen Effekten aufgrund der Vektortransfektion und anschließender Transkription zu differenzieren, wurde neben dem Antisense-Vektor und dem ursprünglichem pCAGGS/GFP-Vektor auch das Insertionsprodukt in umgekehrter Orientierung („Sense“-Produkt) in den anschließenden Zelltransfektionen eingesetzt.

Alle synthetisierten Plasmide wurden abschließend über die Insertionsbereiche kontrollsequenziert.

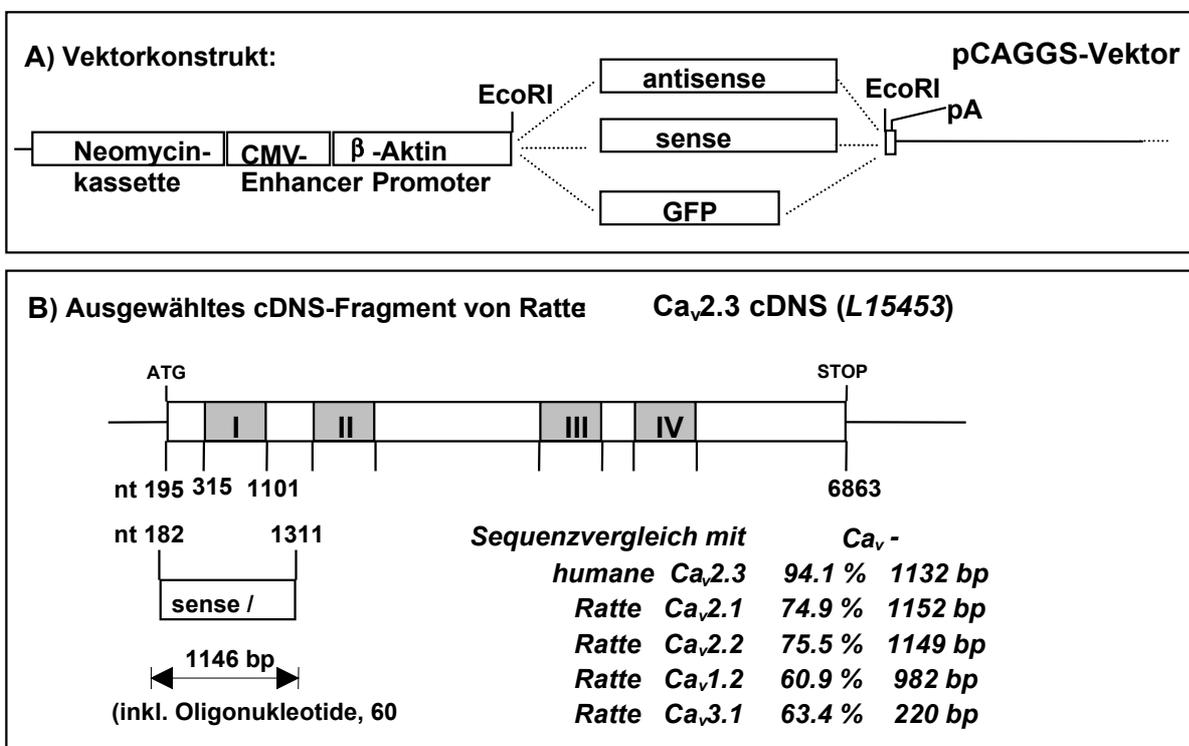


Abbildung 17: Rekombinante Synthese des $Ca_v2.3$ -Antisense-cDNS-Fragmentes.

(A) Verwendete Vektorkonstrukte (B) Komplementärbereich auf der Ratten- $Ca_v2.3$ -Primärsequenz und Identitätsvergleich des $Ca_v2.3$ -Antisense-cDNS-Fragmentes mit anderen Ca_v -Untereinheiten

4.3.2 Nachweis der genomischen Vektorinkorporation

INS-1-Zellen wurden mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode (Mammalian transfection Kit; Stratagene, La Jolla, USA) mit den drei Vektoren transfiziert und die Zellklone aufgrund ihrer Neomycin-Resistenz auf Einzel-Zell-Niveau selektioniert.

INS-1-Zellen, die stabil mit pCAGGS/GFP transfiziert worden waren, wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich größtmöglicher Fluoreszenzintensität selektioniert. Diese Arbei-

ten wurden von Dr. A. Pereverzev im Institut für Neurophysiologie der Universität zu Köln durchgeführt.

Aus 230 mit Sense- und Antisense-Vektoren transfizierten INS-1-Zellklonen wurde die jeweilige genomische DNS extrahiert und diese auf die Anwesenheit der funktionsfähigen Expressionskassette durchmustert. Dazu wurde die DNS durch einen Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Sal I* und *HinD III* fragmentiert. Neben einem größeren Fragment, welches das Vektorgerüst sowie die Ampicillin- und Neomycin-Resistenzgene besitzt, entsteht ein kürzeres Produkt von 3,3 kb Länge, welches alle zur Transkription notwendigen Elemente beinhaltet; bei der folgenden Analyse wurden nur solche Klone ausgewählt, die eine vollständige Inkorporation dieses kürzeren Vektorabschnittes enthielten. Die genomischen DNS-Fragmente wurden im Rahmen einer Southern Blot-Analyse mit einer radioaktiv markierten Sonde (siehe 3.1.5.5), welche der inserierten Ca_v2.3-Sequenz entsprach, hybridisiert.

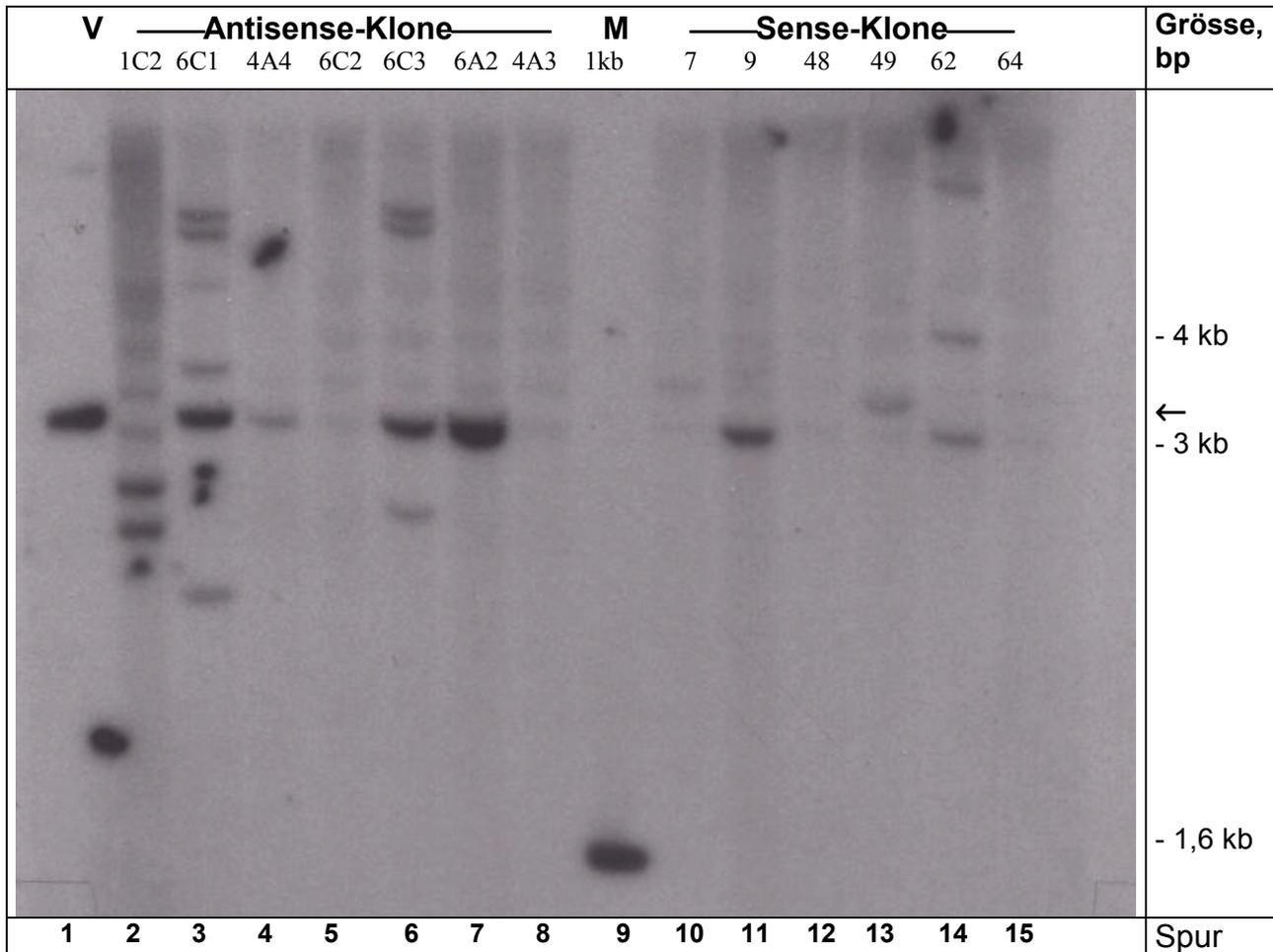


Abbildung 18: Durchmusterung genomischer DNS stabil transfizierter INS-1-Zellen.

Dargestellt ist ein Autoradiogramm der *Sal I* / *HinD III*-Restriktionen genomischer Präparationen nach Hybridisierung gemäß 3.1.4.2. Abkürzungen: V = 100 pg verdauter pCAGGS-Sense-Ca_v2.3-Vektor, M = 1-kb-Leiter (GibcoBRL). Der Größenmarker ist auf der rechten Seite aufgetragen; die durchgezogene Linie in der Abbildung repräsentiert die Größe der erwarteten DNS-Bande (3,3 kb).

Abbildung 18 zeigt ein repräsentatives Autoradiogramm nach drei Tagen Exposition auf einem Röntgenfilm bei -80°C . Bei vollständiger Inkorporation des entsprechenden Vektorabschnitts wird ein 3,3 kb großes Restriktionsfragment erwartet. Markiert werden Fragmente mit unterschiedlichen Intensitäten, was in erster Näherung proportional von der Zahl der inkorporierten Vektoren abhängt. Darüber hinaus wird deutlich, dass die Sonde in einigen Fällen mit anderen DNS-Fragmenten hybridisierte.

4.3.3 Überexpression von Sense- und Antisense-RNS der $\text{Ca}_v2.3$ -Untereinheit

Neben einer Amplifikation mit den zur Generierung des $\text{Ca}_v2.3$ -Antisense-cDNS-Fragmentes synthetisierten Oligonukleotiden $\alpha 1e\text{-asf}$ und $\alpha 1e\text{-asr}$ (Abbildung 17) wurden HPRT-Fragmente (siehe 3.1.6.1) mit den Oligonukleotiden 9799 und 3251 (siehe 2.4.1) synthetisiert, um die Amplifikationen der Kassetten-cDNS semi-quantitativ miteinander zu korrelieren.

In Abbildung 19 wird die unterschiedliche Expression der Antisense-/Sense-cDNS-Fragmente in den INS-1-Zellklonen deutlich: Neben Zellklonen mit hoher Kassettenexpression (z. B. as66, as84, as90) existieren auch Zellklone ohne detektierte cDNS. Die in Abbildung 19B simultan durchgeführte HPRT-Amplifikation bestätigt die Verwendung äquivalenter Mengen an cDNS. Die unterschiedliche Kassettenexpression beruht im wesentlichen auf den jeweiligen Einbauplätzen und -orten des Transfektionsvektors im INS-1-Genom.

Die Quantifizierung der $\text{Ca}_v2.3$ -Repression durch Vergleich der entsprechenden Proteinmengen in der Immundetektion konnte nicht durchgeführt werden, da in INS-1-Zellen das Protein unterhalb der Nachweisgrenze exprimiert wird (siehe 4.1.5.2). Auf Immunopräzipitationen der ausgewählten Zellklone wurde verzichtet, da die einzusetzenden Mengen des im Hause hergestellten Antikörpers erheblich wären. Außerdem wäre im Falle einer zellspezifischen Proteolyse (siehe 4.1.4.2) des $\text{Ca}_v2.3$ -Proteins die Möglichkeit einer Normierung per se nicht gegeben.

Daher wurden im folgenden die Zellklone gemäß einer möglichst starken Antisense-Kassettenexpression ausgewählt und in Form von funktionellen Studien mit Kontrollzellen wie Wildtyp-Zellen bzw. Sense- oder GFP-Kassetten-transfizierten Zellen verglichen.

4.3.4 Charakterisierung der stabil transfizierten INS-1-Zellklone

Durch das Klonieren können die Eigenschaften der stabil transfizierten Zelllinien gegenüber den Ausgangszellen („Wildtyp“) stark differieren. Daher wurden zunächst zelluläre Parameter wie die Morphologie, der Insulingehalt, die basale Insulinsekretion und die Ba^{2+} -Einwärtsströme verschiedener transfizierter INS-1-Zellklone mit dem Wildtyp verglichen. Ausgehend von jeweils 250 000 Zellen pro Kulturschalenvertiefung wurden nach dreitägiger Kultivierung die zellulären Parameter bestimmt.

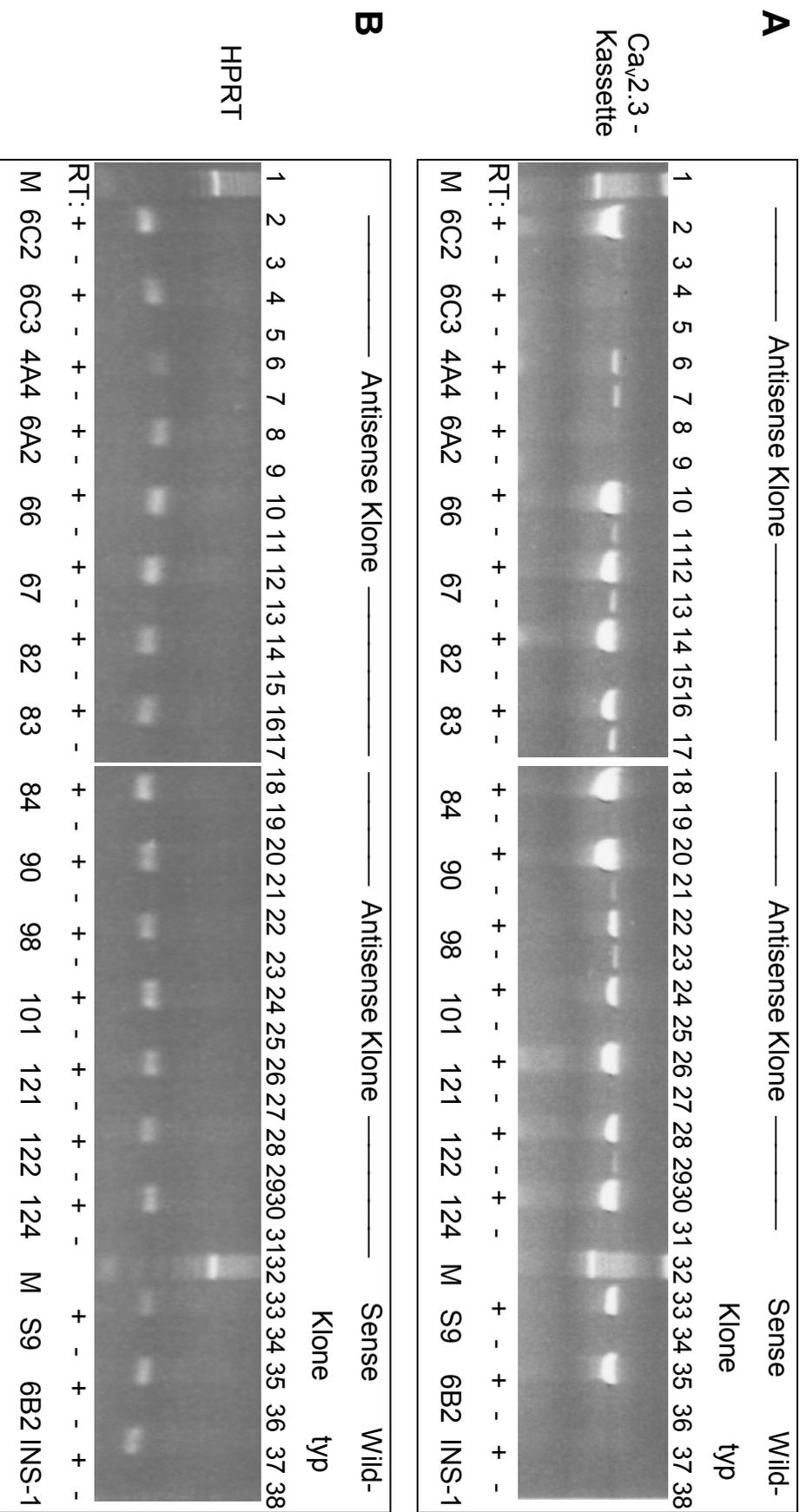


Abbildung 19: RT-PCR-Analyse der Expression der Antisense- und Sense-Kassette in stabil transfizierten INS-1-Zellen.

(A) Darstellung der Amplifikationsprodukte mit den Oligonukleotiden a1E-asf und a1E-asr. Die fehlende Amplifikation der Kassette in Wildtypzellen bestätigt die Spezifität des verwendeten Oligonukleotidpaares. Die Amplifikation von cDNS-Fragmenten aus Ansätzen, denen nur RNS zugesetzt wurde, ist auf eine Chargen-abhängige Unspezifität der verwendeten Taq-Polymerase zurückzuführen. (B) Amplifikationsprodukte mit den HPRT-spezifischen Oligonukleotiden 3251 und 9799. M = 1kb-Leiter; RT: reverse Transkription der Zellkion-RNS durchgeführt (+) oder RNS direkt in PCR eingesetzt (-).

Die erzeugten stabil transfizierten Zellklone unterschieden sich morphologisch nicht von Wildtyp-Zellen. Allerdings wurden im Falle der transfizierten Zellklone mit Ausnahme von S9 weniger Protein pro Kulturschalenvertiefung ermittelt. Während der Zellvermehrung konnte beobachtet werden, dass die Antisense-Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen und dem Sense-Klon S9 langsamer proliferierten. Andererseits wurden mit dem Sense-Klon S6B2 und dem GFP-Klon GFP3D1 auch zwei Kontrollklone mit einem reduzierten Proteingehalt pro Vertiefung einer 24-Loch-Kulturschale (siehe 3.4.1) erhalten.

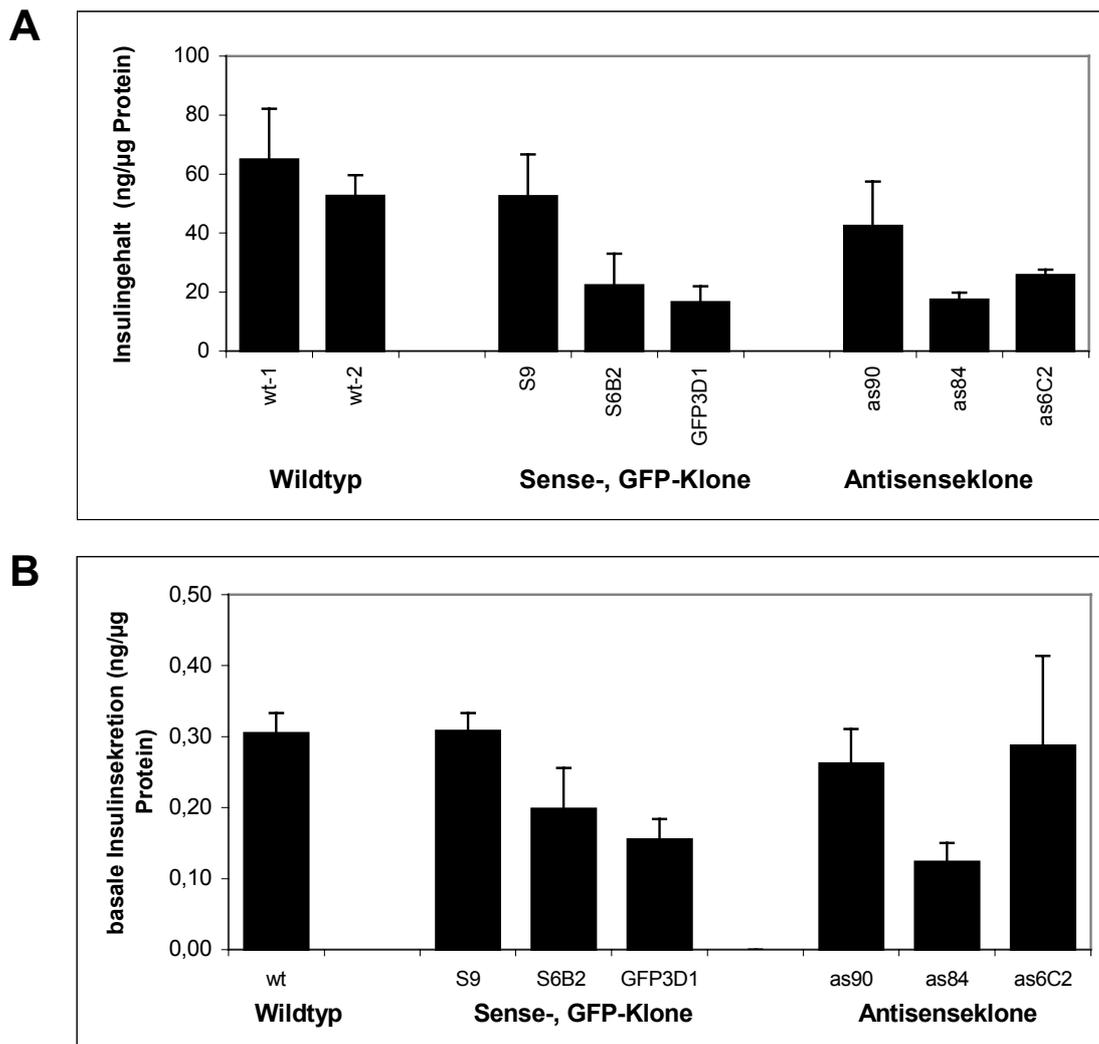


Abbildung 20: Vergleich des Insulingehaltes und der basalen Insulinsekretion in Sense-, Antisense-, GFP- und Kontroll-INS-1-Zellklonen.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm dem mittleren Fehler aus 3-6 unabhängigen Experimenten.

(A) Vergleich des proteinnormierten Insulingehaltes. Zelluläres Protein bzw. der Gesamtgehalt an Insulin wurden wie beschrieben isoliert (siehe 3.2.1). **(B)** Vergleich der basalen Sekretion. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde der Relativwert „basale Sekretion“ mit dem jeweiligen, proteinnormierten Mittelwert des Insulingehaltes multipliziert, so dass die dargestellten Werte der basalen Sekretion pro Proteingehalt entsprechen.

Unabhängig vom verwendeten Vektorkonstrukt ist der zelluläre Insulingehalt mit Ausnahme von S9 und as6C2 in allen stabil transfizierten Zellen erniedrigt (Abbildung 20A). Diese Reduktion muss auf die Zellklonierung und nicht auf die Überexpression der Antisense-Kassette zurückgeführt werden. Da die durchschnittlichen Insulin-Sekretionsraten während der Inkubationsexperimente mit nur 1-3 % des Gesamtgehaltes auch in den stabil transfizierten Zelllinien nicht zu einer Verarmung an zellulärem Insulin führen dürften, wurden die ausgewählten INS1-Zellklone für die folgenden Sekretionsmessungen verwendet. Das Konzept der Normierung des sezernierten Hormons durch den zellulären Gesamtgehalt (siehe 4.2) wurde dabei beibehalten.

Die zelluläre Insulinfreisetzung in Glukose-freiem Krebs-Ringer-Puffer wurde als „basale“ Sekretion definiert. Sie repräsentiert zelluläre Effekte wie spontane Depolarisationen der INS-1-Zelle und Messartefakte wie tote, abgelöste oder beschädigte Zellen.

In den stabil transfizierten INS-1-Klonen wurden keine höheren Basalsekretionen im Vergleich zum Wildtyp ermittelt (Abbildung 20B), was darauf hindeutet, dass die Inkubationsprozedur den Zellklonen nicht mehr Schaden zufügt als den Wildtypzellen. Vergleicht man Abbildung 20A und B, wird deutlich, dass die Zellklone mit geringerem Insulingehalt auch eine erniedrigte basale Sekretion aufweisen. Im weiteren Verlauf der INS-1-Experimente wurde daher neben dem zellulären Insulingehalt auch die basale Sekretion als Normierung der verschiedenen Zellklone verwendet. Auf dieser Grundlage wurden die erhaltenen Stimulationswerte als Vielfaches der basalen Sekretion berechnet.

In einer elektrophysiologischen Analyse von Prof. Klöckner wurden die Barium-Einwärtsströme verschiedener Klone miteinander verglichen. Durch Zugabe der selektiven VGCC-Blocker 0,5 μM ω -Conotoxin-MVIIc (hemmt P/Q- und N-Typ-Ströme) bzw. 2 μM (\pm)-Isradipin (L-Typ-Antagonist) auf die Ba^{2+} -Einwärtsströme von Wildtyp-, Sense- und Antisense-INS-1-Zellen wurde ermittelt, ob die entsprechenden HVA-Calciumkanäle durch die Überexpression der Vektorkassette ebenfalls unspezifisch reprimiert wurden.

Die Antagonistenzugabe verursachte keine signifikanten Änderungen der Ba^{2+} -Einwärtsströme in stabil transfizierten INS-1-Zellen gegenüber Wildtyp-Kontrollzellen (Abbildung 40). Die Spitzeneinwärtsströme des Antisense-Klons as84 sowie des Sense-Klons S9 wiesen im Vergleich zum Wildtyp geringfügig erniedrigte Amplituden auf (Abbildung 40A). In Gegenwart von 0,5 μM ω -Conotoxin-MVIIc reduzierte sich der Einwärtsstrom für Wildtyp, S9- und as84-Zellen, ohne dass zwischen den einzelnen Klonen signifikante Unterschiede auftraten.

4.3.5 Die Stimulus-induzierte Insulinsekretion in transfizierten INS-1-Zellen

In Analogie zu 4.2.1.2 wurden sowohl 15 mM Glukose bzw. 25 mM KCl mit und ohne Zugabe von 100 nM SNX-482 für die Analyse der Antisense-Zellklone eingesetzt. Als Kontrollzellen wurden dabei sowohl Wildtyp- wie Sense- und GFP-transfizierte Zellen verwendet.

Eine vergleichende Darstellung der Sekretionswerte nach Induktion durch 15 mM Glukose bzw. 15 mM Glukose und 100 nM SNX-482 ist in Abbildung 21A angegeben. Durch eine Signifikanzanalyse mit Hilfe des ANOVA-Tests konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit 15 mM Glukose nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Insulinsekretion im Vergleich zur Basalsekretion für die Antisense-Klone as90 ($p = 0,16$) und as6C2 ($p = 0,51$) führt. Auch im Falle von as84 ($p = 0,003$) ist die Exozytose im Vergleich mit Wildtyp- ($p = 4,1 \cdot 10^{-5}$) und Sense-Zellen deutlich gehemmt.

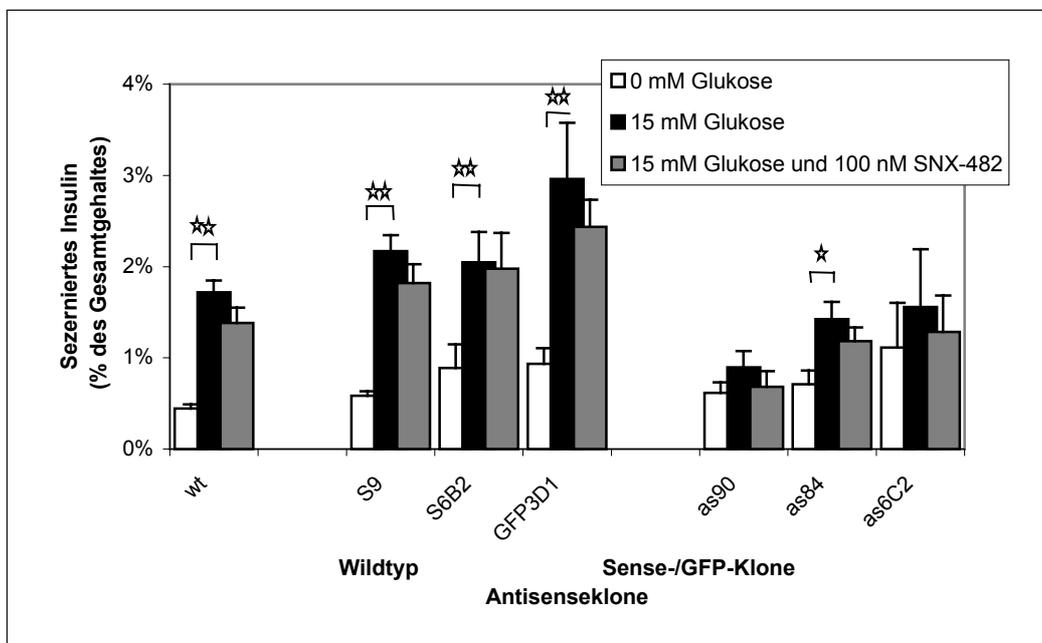


Abbildung 21: Vergleich der Glukose-induzierten Insulinsekretion in Wildtyp und transfizierten INS-1-Zellen.

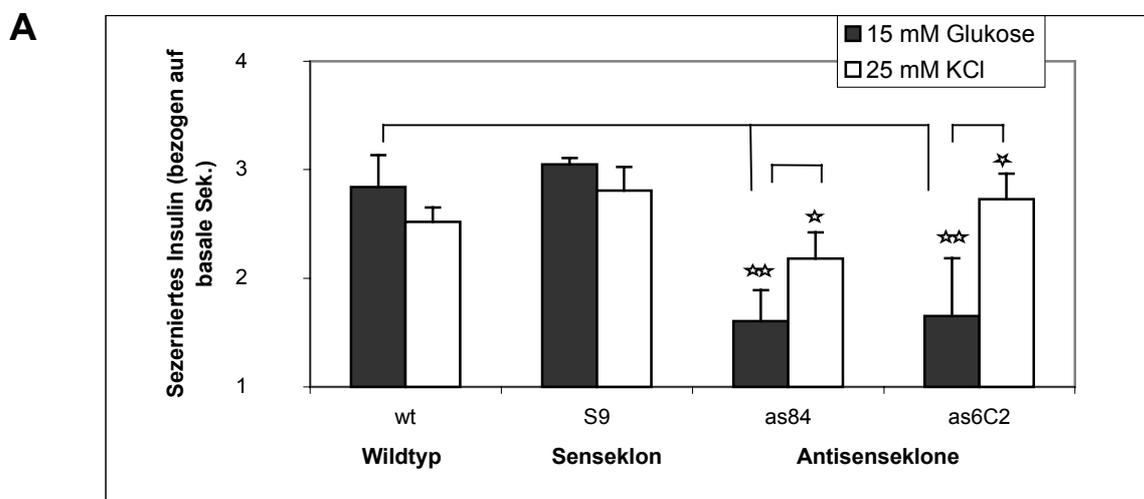
Säulendiagramm für die ermittelten Prozentualwerte (in Bezug zum zellulären Insulin-Gesamtgehalt). Dargestellt sind Mittelwerte \pm mittlere Fehler aus 3 Experimenten mit 4–8 Einzelmessungen. Für jedes Experiment wurden nicht mehr als drei verschiedene Zellklone und der Wildtyp gleichzeitig prozessiert; Sense- und Antisense-Klone waren dabei wahllos gemischt.

Die Zugabe von 100 nM SNX-482 führt nicht zu einer signifikanten Erniedrigung der Glukose-induzierten Insulinsekretion, obwohl die Mittelwerte der Inkubationen mit SNX-482 für alle Zellklone und den Wildtyp niedriger liegen als bei alleiniger Inkubation mit 15 mM Glukose. Dies mag an der geringen Anzahl der Experimente liegen (jeweils $n = 3$).

Die dargestellten Absolutwerte von basaler und stimulierter Sekretion differieren innerhalb der Senseklone und im Vergleich mit den Wildtyp deutlich, was nicht zuletzt eine Folge der notwendigen Normierung mit dem zellulären Insulingehalt ist. Um zu einer vereinheitlichten Darstellung zu gelangen, wurden daher im folgenden Stimulus-induzierte Insulinsekretionen als Vielfaches der basalen Sekretion angegeben, wodurch der zelluläre Gehalt rechnerisch eliminiert worden ist. Für die folgenden Analysen wurden neben Wildtyp-Zellen der Senseklon S9 sowie die Antisenseklone as6C2 und as84 verwendet.

Applikation von 15 mM Glukose bzw. 25 mM KCl erhöhte die Sekretionsrate in ähnlichem Maße um das $2,84 \pm 0,29$ - bzw. $2,52 \pm 0,13$ -fache der Basalsekretion. Dies entspricht den Daten, die aus der Literatur bekannt waren¹⁴⁶.

Vergleicht man Glukose- und KCl- vermittelte Hormonsekretion (Abbildung 22A), so lässt sich feststellen, dass bei Stimulation mit KCl im Falle der Antisense-Klone keine Reduktion der Insulinsekretion auftritt. Vielmehr sind die KCl-induzierten Insulinfreisetzungen im Mittel höher als die Glukose-stimulierten und im Vergleich mit Wildtyp- und S9-Zellen nicht signifikant verschieden (Abbildung 22B). Dagegen bestehen im Falle der Glukose-Induktion signifikante Unterschiede zwischen Antisense- und Kontrollzellen.



B

	as84	as6C2	S9
wt, 15 mM Glukose	0,03	0,06	0,51
wt, 25 mM KCl	0,19	0,37	0,26

Abbildung 22: Vergleich von Glukose- und KCl-induzierter Insulinsekretion in Wildtyp- sowie transfizierten INS-1-Zellen.

(A) Säulendiagramm in der Darstellung des Vielfachen der jeweiligen basalen Sekretion. Dargestellt sind Mittelwert \pm mittlerer Fehler aus 3 (15 mM Glukose) bzw. 6 (25 mM KCl) Experimenten mit 4-8 Einzelmessungen. (B) Signifikanzanalyse mittels ANOVA. Berechnet wurden p-Werte des Vergleichs der Insulinsekretion von Wildtypzellen mit den verwendeten INS-1-Zellklonen (obere Zeile) für die Stimulation mit Glukose („wt, 15 mM Glukose“) und KCl („wt, 25 mM KCl“).

Offenbar ist in diesen Zellen die Glukose-spezifische Signalkaskade durch die Repression des Ca_v2.3e-Proteins gestört, während die Depolarisations-stimulierte Sekretion im wesentlichen unverändert bleibt.

4.4 Analyse der Glukose-stimulierten Insulinsekretion von isolierten Langerhans'schen Inseln der Maus

Um die in 4.2. und 4.3 erhaltenen Resultate auf *in vivo*-Verhältnisse zu übertragen, wurden Langerhans'sche Inseln der Maus isoliert und ihr Sekretionsverhalten auf eine Glukose-Stimulation hin untersucht.

4.4.1 Die SNX-vermittelte Sekretionsinhibition

Zur SNX-482-Analyse wurden Langerhans'sche Inseln aus fünf Wochen alten FVB/N-Mäuse präpariert (siehe 2.1.1.2). Je sechs Inseln wurden gemäß 3.4.2 mit 20 mM Glukose stimuliert. Der SNX-482-Effekt wurde durch Zugabe von 100 nM des Peptidtoxins untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt.

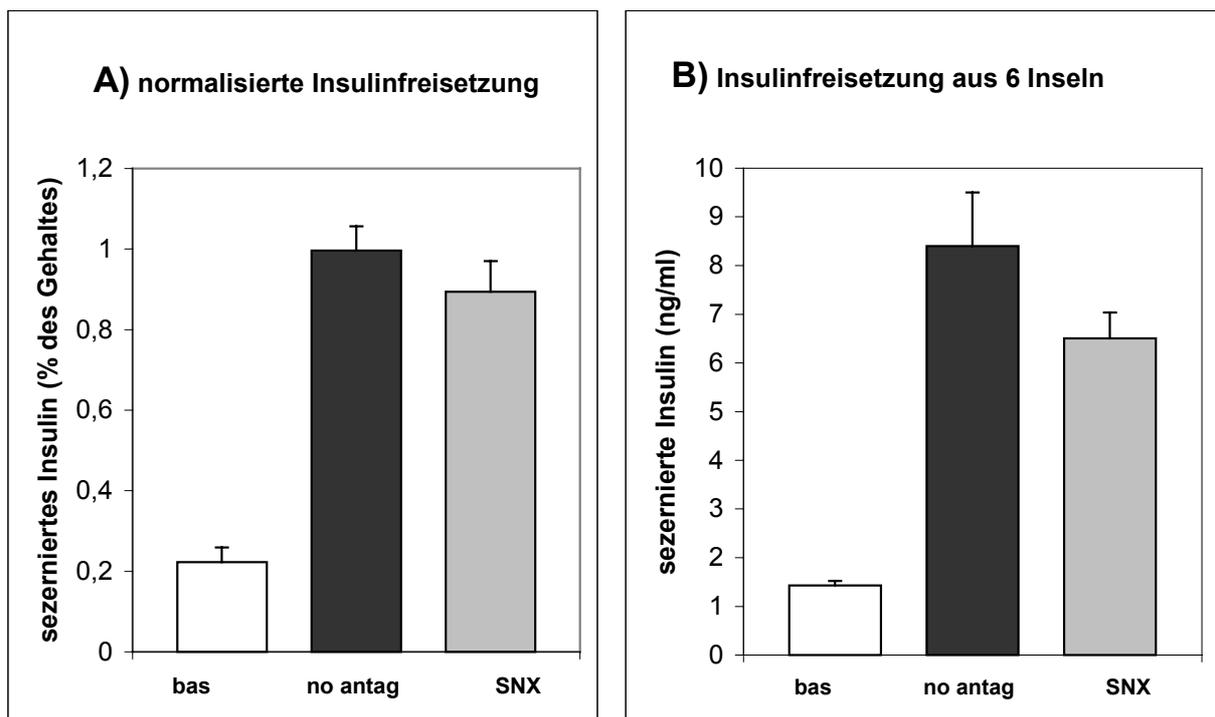


Abbildung 23: Reduktion der Glukose-induzierten Insulinsekretion durch 100 nM SNX in Langerhans'schen Inseln.

Langerhans'sche Inseln wurden aus fünf Wochen alten FVB/N-Mäusen isoliert. Sezerniertes Insulin in Gegenwart von 2 mM Glukose wurde als Basalwert definiert (bas). Demgegenüber wurde die Sekretion durch 20 mM Glukose mit 100 nM SNX-482 (SNX) oder ohne den Antagonisten (no antag) stimuliert. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm mittlerer Fehler aus mind. 3 unabhängigen Experimenten. **(A)** Darstellung des sezernierten Insulins als prozentualer Anteil des zellulären Insulins (zelluläres Insulin = 100%). **(B)** Darstellung des sezernierten Insulins in der ermittelten Hormonkonzentration des extrazellulären Mediums.

20 mM Glukose erhöhte die Insulinsekretion der Langerhans'schen Inseln um das 4,5-fache gegenüber dem Basalwert. In Gegenwart von 100 nM SNX-482 erfolgte eine partielle Hemmung der Insulinsekretion, da die Stimulation von $100\% \pm 6\%$ ($n=4$) auf $89 \pm 8\%$ ($n=6$) sank. Obwohl dieses Ergebnis eine entsprechende Rolle des $\text{Ca}_v2.3\text{e}$ -Proteins in Langerhans'schen Inseln der Maus wie in der Insulinoma-Zelllinie INS-1 aus Ratte suggeriert, war der beobachtete Effekt im Gegensatz zur INS-1-Zelllinie nicht signifikant.

4.4.2 Vergleich der Glukose-stimulierten Insulinsekretion von Langerhans'schen Inseln aus C57Bl/6- bzw. $\alpha1E(-/-)$ - Mäusen

Wie in 4.3 beschrieben, führte die Verwendung eines Antisense-Ansatzes in INS-1-Zellen zu einer verstärkten Repression der Glukose-stimulierten Insulinsekretion gegenüber der pharmakologischen Inhibition durch SNX-482. Für die entsprechende Untersuchung *in vivo* konnten mit der Verwendung der $\text{Ca}_v2.3$ -defizienten Mauslinie $\alpha1E(-/-)$ Langerhans'sche Inseln verwendet werden, in denen das Protein vollständig eliminiert worden war.

$\text{Ca}_v2.3$ -defiziente Mäuse und Vergleichstiere der Mauslinie C57Bl/6 wurden bei artgerechter Haltung *ad libitum* (d.h. unter ungehindertem Zugang zu Futter und Wasser) ernährt (siehe 2.1.1). Je sechs Weibchen im Alter von zehn bis elf Wochen wurden für die nachfolgende Analyse verwendet. Je eine $\text{Ca}_v2.3$ -defiziente Maus und ein Vergleichstier wurden im Abstand von 15 min getötet und das Sekretionsverhalten der isolierten Langerhans'schen Inseln in einer statischen Ein-Punktmessung untersucht (siehe 3.4.2.1).

Die Abwesenheit des $\text{Ca}_v2.3$ -Proteins führte zum Verlust der Glukose-induzierbaren Insulinsekretion in der defizienten Mauslinie (Abbildung 24).

In fünf unabhängigen Experimenten konnte die Insulinsekretion der Kontrolltiere nach Zugabe von 20 mM Glukose im Mittel auf das $1,9 \pm 0,1$ -fache des basalen Wertes (in Gegenwart von 2 mM Glukose) stimuliert werden. Bei Verwendung von 7 mM Glukose konnte eine nicht-signifikante Erhöhung der Insulinfreisetzung registriert werden. Demgegenüber führte weder die Verwendung von 7 noch von 20 mM Glukose mit dem $1,0 \pm 0,2$ - bzw. $1,1 \pm 0,1$ -fachen der basalen Sekretion zu einer gesteigerten Aktivität der Langerhans'schen Inseln, welche aus $\alpha1E(-/-)$ -Tieren isoliert worden waren.

Dieser Effekt ist nicht auf einen geänderten Insulingehalt zurückzuführen, da ein Vergleich der zellulären Insulingesamtgehalte von Wildtyp- und $\text{Ca}_v2.3$ -defizienten Mäusen keinen Unterschied ergab (Abbildung 25B). Durch Auszählung der Langerhans'schen Inseln in Schnittpräparaten nach Anfärbung mit Insulin-Antikörper konnte weiterhin ermittelt werden, dass weder Zahl (Abbildung 25A, Prof. Schneider, pers. Mitteilung) noch Verteilung der Langerhans'schen Inseln im intakten Organ zwischen beiden Mauslinien signifikant differieren.

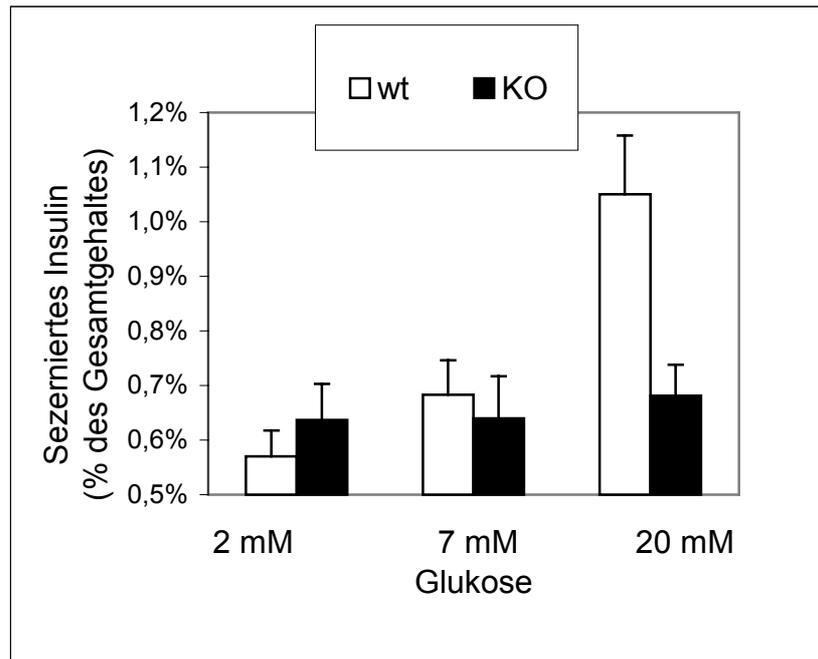


Abbildung 24: Vergleich der Glukose-stimulierten Insulinsekretion isolierter Langerhans'scher Inseln aus $\alpha 1E(-/-)$ - und C57Bl/6-Mäusen.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm mittlere Fehler aus 5 Experimenten mit 4 -10 Einzelmessungen. Jede Einzelmessung repräsentiert fünf zuvor isolierte Langerhans'sche Inseln, die nicht gröÙenselektioniert wurden; daher wurden die ermittelten Insulinkonzentrationen anschließend mit dem zellulären Insulingehalt normiert.

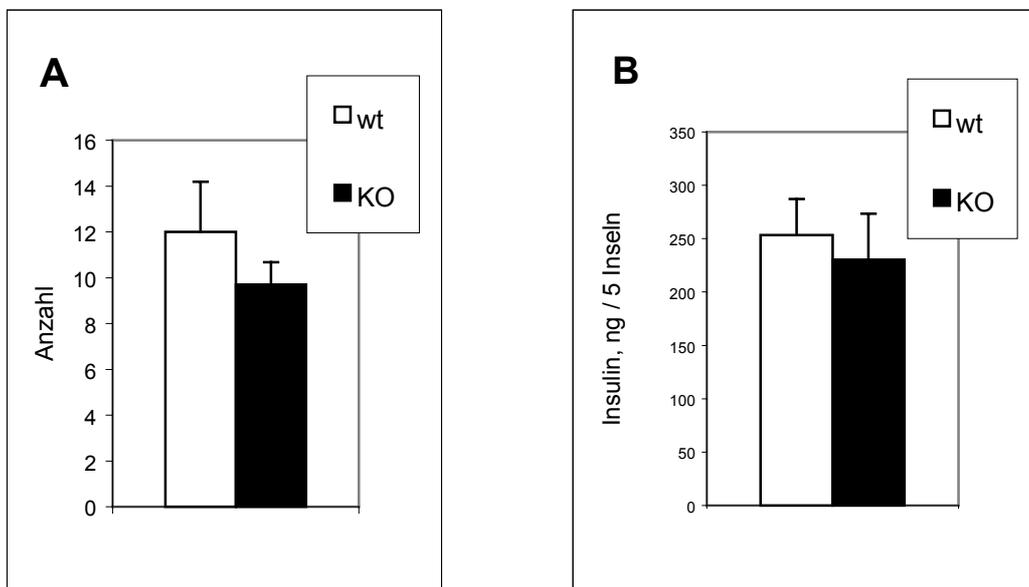


Abbildung 25: Vergleich von Zahl und Insulingehalt Langerhans'scher Inseln von C57Bl/6- bzw. $\alpha 1E(-/-)$ -Mäusen.

(A) Auszählung Langerhans'scher Inseln in Pankreas-Schnittpräparaten von C57Bl/6- bzw. $\alpha 1E(-/-)$ -Mäusen (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Schneider vom Institut für Neurophysiologie der Universität zu Köln). (B) Vergleich der Gesamt-Insulingehalte von Langerhans'schen Inseln, welche aus C57Bl/6- bzw. $\alpha 1E(-/-)$ -Mäusen isoliert wurden.

4.5 Untersuchungen zur Modulation des Ca_v2.3-Proteins im heterologen Expressionssystem und in stabil transfizierten INS-1-Zellen

Neben der Funktionsanalyse wurde auch die Modulation der Ca_v2.3-Untereinheit untersucht. Die zytoplasmatischen Abschnitte spannungsgesteuerter Calciumkanäle stellen Angriffspunkte modulatorisch wirksamer Proteine aus den Bereichen der Signaltransduktion und Calcium-Homöostase dar.

G βγ-Untereinheiten binden an Bereiche der zytoplasmatischen Region zwischen Domäne I und II von Ca_v2.1, Ca_v2.2 und Ca_v2.3^{147,87,148} sowie im Falle von Ca_v2.2 und Ca_v2.3 im Aminoterminus⁷⁷. Darüber hinaus ist für Ca_v2.3 auch eine Interaktion der βγ-Dimere mit einer Region im Carboxyterminus berichtet worden¹⁷. Alle Interaktionen führen zu einer Inhibition von Ba²⁺-Einwärtsströmen im heterologen Expressionssystem.

Stimulation von Protein Kinase C durch 100 nM Phorbol-12-myristat,13-acetat (PMA) erhöht den Ba²⁺-Ionendurchtritt für Ca_v2.2 und Ca_v2.3, jedoch nicht für Ca_v2.1, wie durch transiente Expression in *Xenopus laevis*-Oocyten gezeigt werden konnte⁸⁴. Die Autoren vermuteten eine Phosphorylierung von Serin- oder Threoninresten in der zytoplasmatischen Region zwischen Domäne I und II, welche die Anwesenheit einer VGCC-β-Untereinheit benötigt.

In TSA201-Zellen konnte die PMA-vermittelte Stimulation von Ca_v2.2 durch eine G-Protein-induzierte Inhibition aufgehoben werden¹⁴⁹. Diese Integration von Signaltransduktionswegen, der auf molekularer Ebene eine Interaktion von G Proteinen und Proteinkinase C in sich überlappenden Domänen entspricht, wird in der Literatur als „Crosstalk“ bezeichnet. Wenig später wurden zwei Erkennungssequenzen in dem Bereich zwischen Domäne I und II als Interaktionsstellen ermittelt⁸⁶.

Durch *in vitro*-Untersuchungen heterolog in HEK293-Zellen exprimierter Ca_v2.3d-Mutanten wurde zunächst untersucht, welche Domänen *in vivo* bei der Somatostatin-vermittelten G-Protein-Inhibition sowie der durch Protein Kinase C induzierten Stimulation von Bedeutung sind. Alle elektrophysiologischen Untersuchungen wurden von Prof. Klöckner, Köln, und die dafür notwendigen Transfektionen von Dr. Pereverzev, Köln durchgeführt.

4.5.1 Eigenschaften der Modulation von Ca_v2.3d-induzierten Ba²⁺-Strömen durch Phorbol-ester bzw. Somatostatin in HEK293-Zellen

Durch transiente Expression der Ca_v2.3d-Untereinheit in HEK293-Zellen wurde zunächst gezeigt, dass auch diese Isoform durch Phorbol-ester stimulierbar (Abbildung 41C) und durch Somatostatin inhibierbar (Abbildung 41A und B) ist. Zur Protein Kinase C-Stimulation wurde in allen folgenden Experimenten unter Verwendung von 15 mM Barium als Ladungsträger 100 nM des Phorbol-esters Phorbol-di-butyrat (PDBu) eingesetzt; eine Abgrenzung von PKC-unabhängigen Effekten erfolgte durch den inaktiven Phorbol-ester 100 nM 4α-PDBu¹⁵⁰. Durch

Zugabe von 1 μM Somatostatin zur Badlösung wurde die partielle Hemmung des Ba^{2+} -Einwärtsstroms induziert.

Im Gegensatz zur $\text{Ca}_v2.2$ -Untereinheit konnte für das $\text{Ca}_v2.3\text{d}$ -Protein kein „Crosstalk-Effekt“ nachgewiesen werden. Nach vorheriger Stimulation des Ba^{2+} -Einwärtsstrom durch 100 nM Phorbol ester inhibierten 1 μM Somatostatin diesen Strom im gleichem Ausmaß wie im Experiment ohne vorherige Phorbol ester-Stimulation (Abbildung 42). Dies könnte bedeuten, dass die durch die pharmakologischen Substanzen induzierten Effekte nicht an identischen Bindungsplätzen des $\text{Ca}_v2.3\text{d}$ -Proteins stattfinden. Daher wurde im folgenden untersucht, welche Regionen des Kanalbildners an den Interaktionen mit den Signalmolekülen beteiligt sind.

4.5.2 Synthesestrategie

Zunächst wurden Nukleinsäurebasen der $\text{Ca}_v2.3\text{d}$ -cDNS mutiert, deren komplementäre Aminosäurereste aussichtsreiche Kandidaten für eine Phosphorylierung durch Protein Kinase C darstellen. Die cDNS war zuvor in den Transfektionsvektor pcDNA3 (siehe 2.4) gebracht worden¹²⁰. Im Anschluss wurden dann systematisch Regionen, von denen in der Literatur eine Interaktion berichtet worden war, geändert (Abbildung 26).

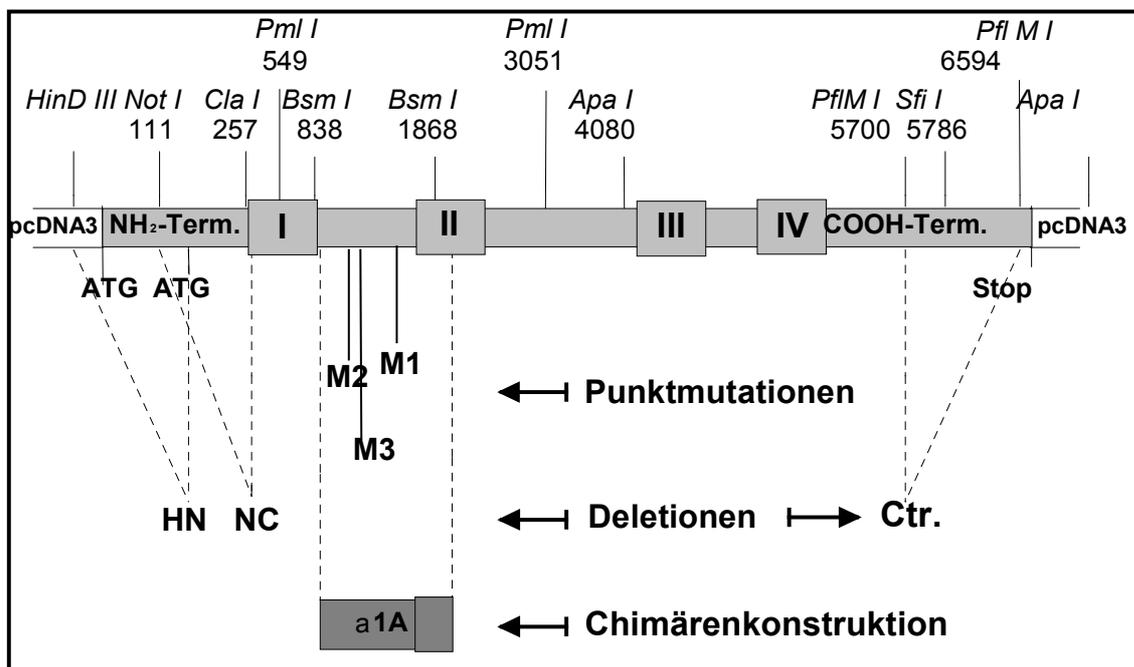


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Modifikationen von pcDNA3- $\text{Ca}_v2.3\text{d}$.

Die Darstellung ist nicht maßstabsgerecht. $\text{Ca}_v2.3\text{d}$ -cDNS (Nr. L27745 GenBank, Bethesda, USA) ist hellgrau unterlegt, Vektorsequenzen sind durch offene Abschnitte gekennzeichnet. Die homologe $\text{Ca}_v2.1$ -cDNS-Sequenz (Nr. X99897, GenBank, Bethesda, USA), die bei der Chimärenkonstruktionen den entsprechenden Abschnitt der $\text{Ca}_v2.3\text{d}$ -Sequenz ersetzt, ist dunkelgrau schattiert. Die verwendeten Restriktionsschnittstellen sind hervorgehoben. Die Bezeichnung der durchgeführten Modifikationen ist in den präparierten Vektoren als Indizes beibehalten. Die Klonierungsstrategie wurde so angelegt, dass die vorgenommenen Modifikationen der $\text{Ca}_v2.3\text{d}$ -cDNS sowohl einzeln als auch sukzessiv erzeugt werden konnten.

4.5.3 Punktmutationen

Im Ca_v2.2-Protein führte die Mutation der Aminosäurereste Serin425 und Threonin422 zum Verlust der PMA-Empfindlichkeit⁸⁶. In Analogie zu dieser Beweisführung wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die entsprechenden Bindungsstellen im Ca_v2.3d-Molekül gleichermaßen zu inaktivieren. Die PKC-Erkennungssequenz [R,K X S,T X R,K] konnte in Ca_v2.3 an Position Ser468 identifiziert werden (siehe Abbildung 27). Daher wurde die Aminosäure Ser468 punktmuiert.

	G E F A K E R E R V E N R R A F L K L R	Consensus
1	G E F A K E R E R V E N R R A F M K L R	Ca _v 2.3hum
1	G E F A K E R E R V E N R R A F L K L R	Ca _v 2.2mus
1	G E F A K E R E R V E N R R A F L K L R	Ca _v 2.1hum
	R Q Q Q I E R E L N G Y X E W I X K A E	Consensus
21	R Q Q Q I E R E L N G Y R A W I D K A E	Ca _v 2.3hum
21	R Q Q Q I E R E L N G Y L E W I F K A E	Ca _v 2.2mus
21	R Q Q Q I E R E L N G Y M E W I S K A E	Ca _v 2.1hum
	E V M L A E E X K N A E X X S P L D V L	Consensus
41	E V M L A E E N K N A G - T S A L E V L	Ca _v 2.3hum
41	E V M L A E E D K N A E E K S P L D V L	Ca _v 2.2mus
41	E V I L A E D E T D G E Q R H P F D A L	Ca _v 2.1hum
	R R A T I K K S R T D L X X X E E X E D	Consensus
60	R R A T I K R S R T E A M T R D S S D E	Ca _v 2.3hum
61	K R A A T K K S R N D L I H A E E G E D	Ca _v 2.2mus
61	R R T T I K K S K T D L L N P E E A E D	Ca _v 2.1hum
	X X V D I X S V G S P F A R A S I K S A	Consensus
80	H C V D I S S V G T P L A R A S I K S A	Ca _v 2.3hum
81	R F V D L C A V G S P F A R A S L K S G	Ca _v 2.2mus
81	Q L A D I A S V G S P F A R A S I K S A	Ca _v 2.1hum
	K X E X S S Y F R X K E R X X R F X I R	Consensus
100	K V D G V S Y F R H K E R L L R I S I R	Ca _v 2.3hum
101	K T E S S S Y F R R K E K M F R F F I R	Ca _v 2.2mus
101	K L E N S T F F H K K E R R M R F Y I R	Ca _v 2.1hum
	R M V K X	Consensus
120	H M V K S Q	Ca _v 2.3hum
121	R M V K A Q	Ca _v 2.2mus
121	R M V K T Q	Ca _v 2.1hum

Abbildung 27: Sequenzvergleich von Ca_v2.1, Ca_v2.2 und Ca_v2.3 für den zytoplasmatischen Bereich zwischen Domäne I und II.

Die Aminosäuren des Bereiches wurden von 1 bis 126 (bzw. 125) durchnummeriert. Position 1 entspricht in den jeweiligen cDNS (GenBank, Bethesda, USA) Gly351 (Ca_v2.3 human, Nr. L27384), Gly357 (Ca_v2.2 der Maus, Nr. U04999) und Gly326 (Ca_v2.1human, Nr. X99897). Die im Text erwähnten putativen PKC-Phosphorylierungsstellen sind durch Rahmen gekennzeichnet.

4.5.3.1 Rekombinante Synthese von pcDNA3- α 1Ed-M1(Ala468)

Für die Mutante pcDNA3- α 1Ed-M1(Ala468), in welcher die Substitution Serin468→Alanin468 vorliegt, wurden die zueinander partiell komplementären Oligonukleotide 2962 und 2779 synthetisiert, deren Sequenzen an der Position nt1404 eine übereinstimmende Basenfehlpaarung T→G einführen (siehe 2.4.2); die Synthese wurde wie in Abbildung 28 dargestellt durchgeführt.

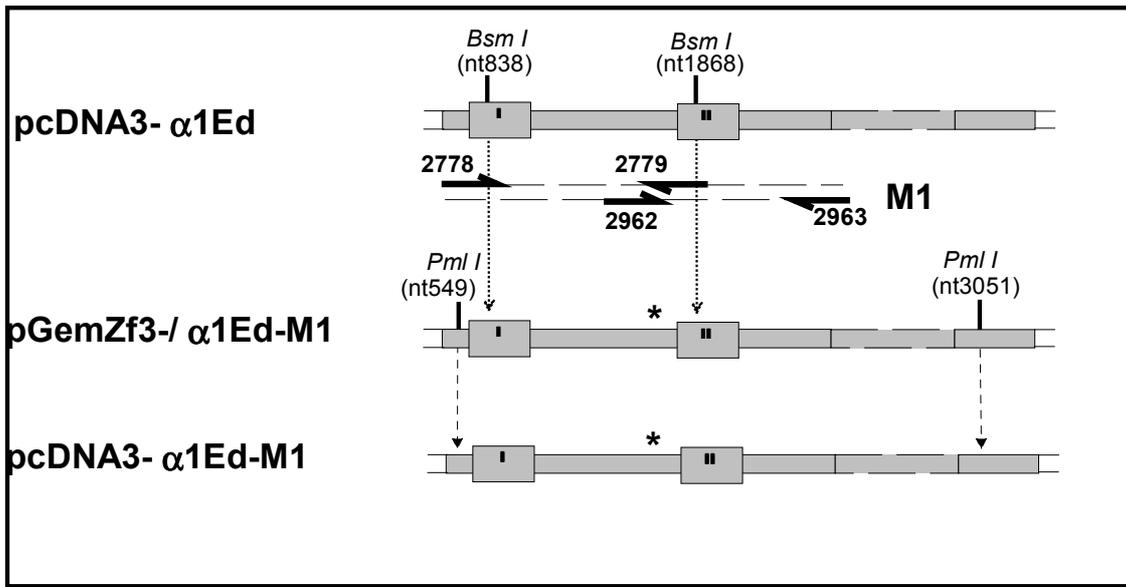


Abbildung 28: Rekombinante Synthese von pcDNA3- α 1Ed-M1(Ala468).

Ca_v2.3d-cDNS cDNS (Nr. L27745 GenBank, Bethesda, USA) ist hellgrau unterlegt (Darstellung nicht maßstabsgerecht), Vektorsequenzen sind durch offene Abschnitte gekennzeichnet. Die Amplifikationen erfolgten mit den Oligonukleotidpaaren 2962/2963 bzw. 2778/2779, gefolgt von der finalen PCR mit 2693/2778, die in einem 1673 bp-Produkt resultierte. Dieses wurde nach Verdau mit *Bsm I* (schneidet bei nt838 bzw. nt1868) in den entsprechend verdauten und dephosphorylierten Vektor pGemZf3-/ α 1Ed überführt. Die Insertion in pcDNA3- α 1Ed wurde mit Hilfe von *Pml I* durchgeführt, welches die cDNS an den Positionen nt549 und nt3051 schneidet. Auf diese Weise konnte ein 2502 bp großes Produkt aus pGemZf3-/ α 1Ed isoliert und in den entsprechend verdauten und dephosphorylierten Vektor pcDNA3- α 1Ed ligiert werden.

pcDNA3- α 1Ed-M1(Ala468) wies nach transients Transfektion in HEK 293-Zellen keine im Vergleich zu pcDNA3- α 1Ed verringerte Phorbol ester-Stimulation auf.

4.5.3.1 Rekombinante Synthese von pcDNA3- α 1Ed-M2(Ala414) und -M3(Gly418)

Ein Sequenzvergleich führte zur Identifizierung von Thr414 und Ser418, die in der Region von Ca_v2.3 liegen, in der sich im Ca_v2.2-Protein die durch Proteinkinase C phosphorylierbaren Aminosäuren Thr422 und Ser425 befinden (Abbildung 27).

Die Punktmutante pcDNA3- α 1Ed-M2(Ala414) (Abbildung 29) wurde mit Hilfe der mutagenen Oligonukleotide 3162 und 3164 (siehe 2.4.2) erzeugt. Dabei erfolgte durch die Basenfehlpaarung A→G der Aminosäureaustausch Thr414→Ala414. Auf diese Weise wurde die Amino-

säure Thr414, welche Teil einer putativen PKC-Erkennungssequenz RXTXK ist, punktmuiert.

Im Falle von pcDNA3- α 1Ed-M3(Gly418) zielte das Syntheseprotokoll unter Verwendung der Oligonukleotidkombination 3162 und 3163 (siehe 2.4.2) auf die Substitution von Ser418 durch ein Glyzin.

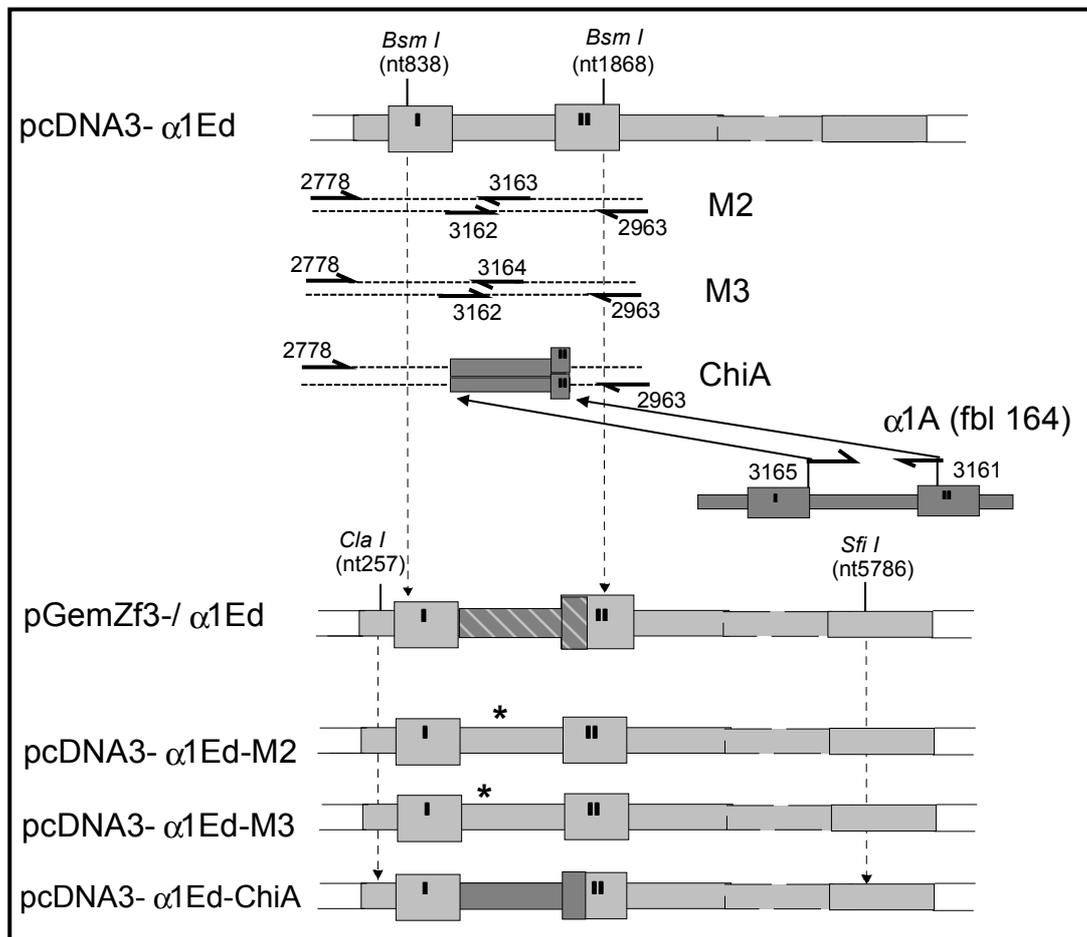


Abbildung 29: Synthese von pcDNA3- α 1Ed-M2(Ala414), pcDNA3- α 1Ed-M3(Gly418) und pcDNA3- α 1Ed-ChiA.

Ca_v2.3d-cDNS (Nr. L27745 GenBank, Bethesda, USA) ist hellgrau unterlegt (Darstellung nicht maßstabsgerecht), Vektorsequenzen sind durch offene Abschnitte gekennzeichnet. Die homologe Ca_v2.1-cDNS-Sequenz (Nr. X99897, GenBank, Bethesda, USA) ist dunkelgrau schattiert. Die Amplifikationen erfolgten mit den Oligonukleotidpaaren 3162/2963 bzw. 2778/3163 für M2(Ala414), 3162/2963 bzw. 2778/3164 für M3(Gly418) gefolgt von der finalen PCR mit 2693/2778, die in einem 1673 bp-Produkt resultierte. Anstelle der mutagenen Oligonukleotide wurde bei der Chimärenkonstruktion jeweils ein 482 bp-Produkt synthetisiert, welches durch Amplifikation des Oligonukleotidpaares 3161/3165 auf dem Ca_v2.1-cDNS-Fragment fbl164 gewonnen wurde. Es umfasste neben der zytoplasmatischen Schleife zwischen Domäne I und II auch 26 Aminosäuren des ersten Transmembransegmentes der zweiten Domäne, IIS1. Das PCR-Produkt wurde für die Amplifikation mit 2778 bzw. 3163 verwendet, wiederum gefolgt von der finalen PCR mit 2963/2778. Nach Verdau mit *Bsm I* (schneidet bei nt838 bzw. nt1868) wurde für alle drei Synthesen das jeweilige 1673 bp-Produkt in den entsprechend verdauten und dephosphorylierten Vektor pGemZf3-/ α 1Ed überführt (Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur ein Zwischenprodukt dargestellt.). Die Insertion in pcDNA3- α 1Ed wurde dann jeweils mit Hilfe von *Cla I* und *Sfi I* (nt257 bzw. nt5786 auf der α 1Ed-cDNS) durchgeführt. Aus pGemZf3-/ α 1Ed wurde das 5,5 kb-Insert isoliert, aufgereinigt und mit dem vorgeschrittenen pcDNA3- α 1Ed ligiert.

Keine der beiden Mutanten wies nach transienter Transfektion in HEK 293-Zellen eine im Vergleich zum Wildtyp verringerte Phorbol ester-induzierte Stimulation auf.

Damit konnte gezeigt werden, dass keine der mutierten Aminosäuren an der Phorbol ester-induzierten Stimulation der Ca_v2.3-Untereinheit beteiligt sind.

4.5.4 Chimärenkonstruktion

Anstelle der Synthese einer Tripelmutante sowie auf die Elimination weiterer Serin- und Threoninreste in der Schleife zwischen Domäne I und II wurde eine neue Strategie verfolgt: Mit dem Einbringen der homologen Region aus dem PKC-insensitiven Ca_v2.1-Protein sollte die Zielregion determiniert werden. Das neu synthetisierte Konstrukt sollte dann auch bezüglich der Somatostatin-vermittelten Hemmung untersucht werden.

Mit Hilfe von Oligonukleotiden wurde von Prof. T. Schneider beim Durchmustern einer fötalen menschlichen Hirn λ- gt10-Bibliothek (Clontech, Heidelberg) ein Klon fbl-164, der den Sequenzabschnitt nt138 – nt1573 der menschlichen Ca_v2.1-cDNS¹⁵¹ kodierte, identifiziert und sequenziert. Klon fbl-164 diente als Matrize für die nachfolgende Synthese-Amplifikation. Dazu wurde eine Strategie übernommen, die von Page et al.¹⁵² entwickelt worden war. Zunächst wurden zwei Oligonukleotide 3165 und 3161 entworfen, die auf fbl-164 ein Produkt von 482 bp amplifizieren. Je 3,5 pmol des aufgereinigten Produktes wurden als Primer zur Amplifikation auf pcDNA3-Ca_v2.3d mit 2778 und 2963 als Gegenprimer verwendet (Abbildung 29). Die weiteren Schritte entsprachen dem Vorgehen zur Erstellung von pcDNA3-α1Ed-M2(Ala418) und -M3(Gly414).

Das Konstrukt besaß nach transienter Transfektion in HEK-293-Zellen eine gegenüber pcDNA3-Ca_v2.3d unveränderte Phorbol ester- und Somatostatin-Empfindlichkeit. Die Region zwischen Domäne I und II schied damit als Interaktionsort für die entsprechenden Signalmoleküle aus.

4.5.5 Deletionen

Die Struktur-Funktionsanalyse wurde im folgenden auf Bereiche, von denen in der Literatur eine Interaktion mit G-Proteinen berichtet worden war, erweitert. Dabei wurden die ausgewählten Regionen auf cDNS-Ebene deletiert.

4.5.5.1 Carboxyterminale Deletion

Qin et al.¹⁷ ermittelten durch Expression von Ca_v2.3d-Trunkationen in *Xenopus laevis*-Oocyten einen Bereich von 38 Aminosäuren im Carboxyterminus, der von nt6108- nt6222 kodiert wird. Elimination dieses Abschnittes führte zum Verlust sowohl der Gβγ- medierten

Inhibition durch Carbachol als auch der Bindung der Hilfsuntereinheit β 2A. Die Region liegt in der Nähe (28 Aminosäuren) der carboxyterminalen Insertion III der humanen $Ca_v2.3d$ -cDNS. Daher wurde beschlossen, den gesamten Bereich inklusive der Insertion zu entfernen (Abbildung 30).

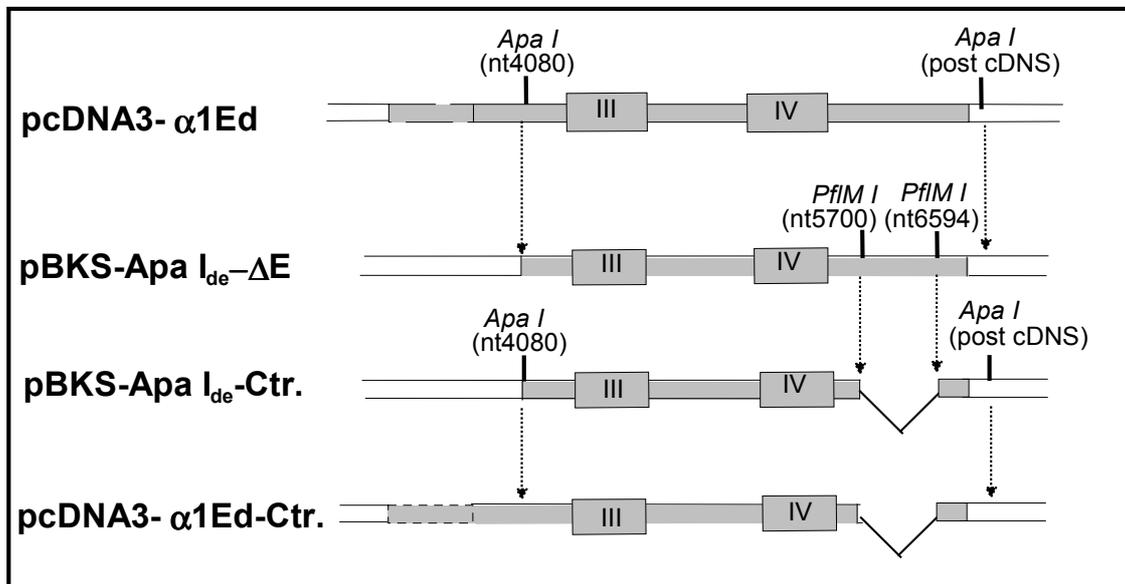


Abbildung 30: Rekombinante Synthese von pcDNA3- α 1Ed-Ctr.

$Ca_v2.3$ -cDNS (Nr. L27745 GenBank, Bethesda, USA) ist hellgrau unterlegt (Darstellung nicht maßstabsgerecht), Vektorsequenzen sind durch offene Abschnitte gekennzeichnet. Deletierte Sequenzabschnitte sind durch dünne, gewinkelte Linien überbrückt. Durch Verdau mit *Apa I* an den Positionen nt4080 sowie im 3'-Bereich der MCS von pcDNA3 hinter der $Ca_v2.3$ -cDNS wurde ein 3 kb-Fragment erhalten, welches in einen entsprechend geschnittenen und dephosphorylierten pBKS-Vektor (siehe 2.5) eingefügt wurde. In diesem Konstrukt wurde mit Hilfe von *PflM I* (schneidet an nt5700 und nt6594) ohne Verlust des Leserahmens ein 894 bp-Produkt entfernt und der Vektor anschließend religiert und kontrollsequenziert. Über *Apa I* wurde ein 2,1 kb-Fragment isoliert, welches in den entsprechend präparierten Vektoren pcDNA3- $Ca_v2.3d$ eingefügt wurde.

Nach abschließender Kontrollsequenzierung wurde das erhaltene Konstrukte transient in HEK-293-Zellen exprimiert. Die Stimulation nach Applikation von 100 nM PDBu entsprach der von pcDNA3- $Ca_v2.3d$ und auch die Zugabe von 1 μ M Somatostatin reproduzierte den inhibitorischen Effekt, der bei Verwendung der $Ca_v2.3$ -cDNS ermittelt worden war.

Auch die Verwendung des Konstruktes pcDNA3- α 1Ed-ChiA-Ctr., in der in einem pcDNA3- α 1Ed-ChiA-Vektor (siehe 4.5.3) die carboxyterminale Deletion erzeugt worden war, führte zu keiner Änderung der Kanalmodulation.

4.5.5.2 Aminoterminaler Deletion

Die Bedeutung des $Ca_v2.3$ -Aminoterminus wurde von Page et al.⁷⁶ beim Vergleich verschiedener klonierter $Ca_v2.3$ -cDNS ermittelt. Danach liegt die $G\beta\gamma$ -Bindungsstelle innerhalb der ersten 50 Aminosäuren der menschlichen cDNS, die in diesem Bereich mit der $Ca_v2.3d$ übereinstimmt. Da die letzte dieser Aminosäuren ein Methionin darstellt (der cDNS-Beginn der

aus Ratte klonierten $Ca_v2.3$ -Variante) wurde der Versuch unternommen, die vorherigen 147 Basen aus dem Kanal zu deletieren.

Zu diesem Zweck wurden zwei Oligonukleotide synthetisiert (siehe 2.4.2):

HN-Kozak enthält eine *Hind III*-Erkennungssequenz, gefolgt von einer Minimal-Kozak-Sequenz¹¹⁸ zur Expressionsunterstützung vor der $Ca_v2.3d$ -analogen Sequenz, die mit dem ATG-Startcodon bei nt150 beginnt. Nach erfolgter Synthese (Abbildung 31) beginnt die exprimierte cDNS ab diesem Triplet.

Das derartig erzeugte PCR-Produkt wurde in das Konstrukt pcDNA3- $\alpha1Ed$ -ChiA-Ctr. eingebaut (siehe 4.5.4.1).

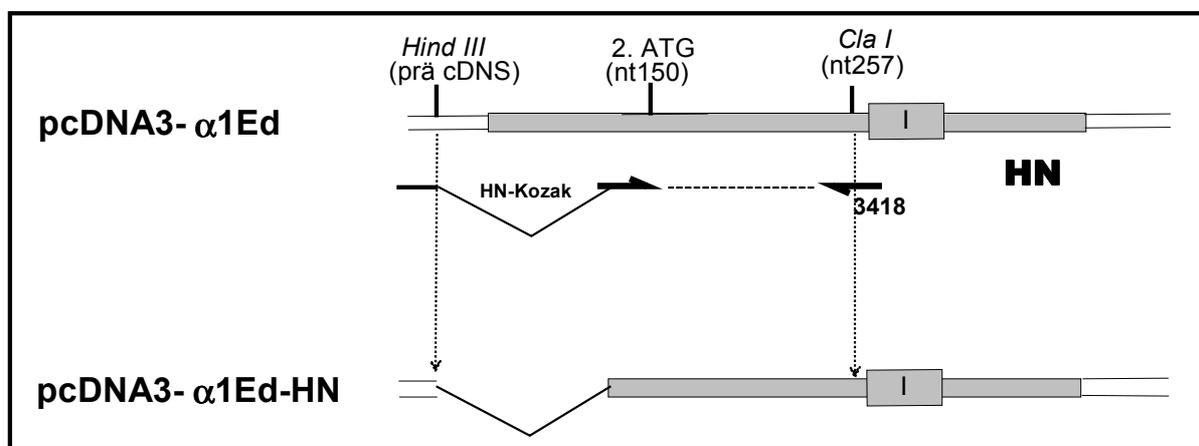


Abbildung 31: Rekombinante Synthese von pcDNA3- $\alpha1Ed$ - Δ HN-ChiA-Ctr.

$Ca_v2.3d$ -cDNS (AccNr. L27745 GenBank, Bethesda, USA) ist hellgrau unterlegt (Darstellung nicht maßstabsgerecht), Vektorsequenzen sind durch offene Abschnitte gekennzeichnet. Deletierte Sequenzbereiche wurden durch dünne, gewinkelte Linien überbrückt. Amplifikation durch HN-Kozak/3418 resultierte in einem 187 bp Produkt, aus dem durch Verdau mit *Cla I* und *Hind III* ein 129 bp-Fragment erhalten wurde. Die Insertion in pcDNA3- $Ca_v2.3d$ wurde mit Hilfe von *Cla I* und *Hind III I* (nt257 bzw. 5' aufwärts in der MCS von pcDNA3) durchgeführt.

Das resultierende Konstrukt pcDNA3- $\alpha1Ed$ - Δ HN-Chi A-Ctr. wurde kontrollsequenziert und konnte transient in HEK 293-Zellen exprimiert werden; die Deletion ließ sich entsprechend pcDNA3- $Ca_v2.3d$ durch 100 nM PDBu stimulieren. Im Rahmen der durchgeführten Analyse konnte daher für die Phorbol-ester-vermittelte PKC-Stimulation nicht der Beweis erbracht werden, dass die $Ca_v2.3d$ -Untereinheit direkt durch die Kinase moduliert d.h. phosphoryliert wird.

Die Einführung der aminoterminalen Deletion führte jedoch zum vollständigen Verlust der Somatostatin-induzierten Inhibition. Daraus wurde geschlossen, dass der Aminoterminus analog zur Beobachtung von Page et al.⁷⁶ von entscheidender Bedeutung ist.

Zusammenfassend kann das Fehlen eines „Crosstalk“-Effektes im Falle der $\text{Ca}_v2.3d$ -Untereinheit (im heterologen Expressionssystem HEK293-Zelle) darauf zurückgeführt werden, dass die beteiligten Signalmoleküle der SST- bzw. PKC-vermittelten Modulation nicht mit identischen Regionen des Kanalproteins interagieren. Für die PKC-Stimulation konnte überhaupt kein entscheidender Bereich ermittelt werden, so dass der molekulare Mechanismus nach wie vor unbekannt bleibt.

4.5.6 Vergleich der Somatostatin-induzierten Inhibition der Insulinsekretion in Wildtyp- und transfizierten INS-1-Zellen

Aufgrund der Daten aus 4.5.5 wurde nun versucht, die Bedeutung der Somatostatin-induzierten Hemmung $\text{Ca}_v2.3$ -haltiger Kanäle in einem komplexeren System zu ermitteln. Dazu wurde wiederum die Insulinoma-Zelllinie INS-1 verwendet, da mit den in 4.3 beschriebenen Antisense-Klonen as84 und as6C2 Zelllinien zur Verfügung standen, in denen das $\text{Ca}_v2.3$ -Protein im Gegensatz zu Wildtyp- und Sense-Zellen reprimiert worden war. Ein Vergleich der SST-Wirkung in diesen Zelltypen auf die Glukose- bzw. KCl-stimulierte Insulinsekretion sollte daher eine mögliche Einbindung des $\text{Ca}_v2.3$ -Proteins in G-Protein-vermittelten Signalwegen untersuchen.

Das Hormon Somatostatin, welches u.a. in den δ -Zellen Langerhans'scher Inseln gebildet wird, inhibiert die Insulinsekretion, wie zuerst in der Hamster-Insulinoma-Zelllinie HIT gezeigt werden konnte¹⁵³. Nach Bindung an einen G-Protein-gekoppelten-Rezeptor und nachfolgender Dissoziation eines G-Proteins der G_i -Familie führen die $G\beta\gamma$ -Dimere in einer direkten Interaktion mit Non-L-Typ-VGCCs zu einer spannungsabhängigen Verringerung der Kanalöffnungswahrscheinlichkeit, wodurch weniger Ca^{2+} pro Zeiteinheit in die Zelle strömt⁹.

Daher wurde im folgenden der Effekt von 100 nM Somatostatin¹²³ auf die Glukose- bzw. KCl-induzierte Insulinsekretion näher untersucht. Die verwendete Konzentration liegt damit wesentlich niedriger als die saturierende Menge, die im heterologen Expressionssystem HEK 293-Zelle eingesetzt wurde. Als Kontrollen dienten dabei sowohl die basale Sekretion als auch die alleinige Zugabe von Somatostatin zum Inkubationspuffer.

Applikation des Hormons SST führte in Wildtyp zur vollständigen, in S9 zur weitgehenden Inhibition der Glukose- bzw. KCl-induzierten Insulinsekretion (Abbildung 32). Demgegenüber zeigen as6C2 und as84 eine deutlich schwächere Antwort: Sowohl im Falle der Glukose-induzierten Exozytose wie auch bei der KCl-Aktivierung konnte die Zugabe von Somatostatin keine signifikante Änderung der ohnehin nur geringen Stimulation hervorrufen.

Interessanterweise führte die alleinige Zugabe von 100 nM SST zu einer Stimulation der Insulinsekretion in den Antisense-Klonen, die in den Kontrollzellen nicht auftritt. Möglicherwei-

se wird in diesen Fällen durch das Fehlen der $Ca_v2.3e$ -haltiger Kanäle ein stimulatorischer Effekt des Hormons in der Insulinoma-Zelllinie INS1 demaskiert.

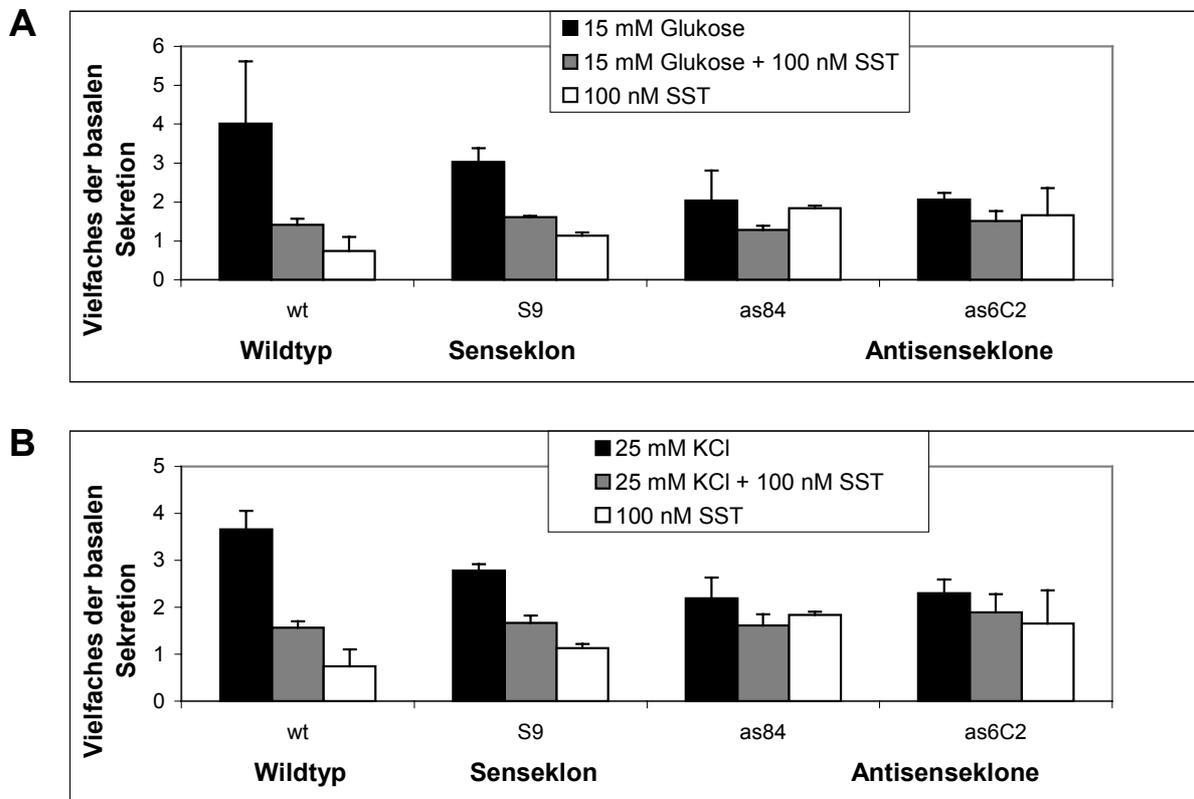


Abbildung 32: Vergleich der Somatostatin-vermittelten Inhibition der Stimulus-induzierten Insulinsekretion in transfizierten INS-1-Zellen.

Säulendiagramme in der Darstellung des Vielfachen der jeweiligen basalen Sekretion. Demgemäss entspricht ein y-Wert = 1 der hier nicht dargestellten jeweiligen basalen Insulinsekretion. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei (100 nM SST) bzw. 4-6 Einzelwerten. **(A)** Somatostatin-Wirkung nach Stimulation mit 15 mM Glukose **(B)** Somatostatin-Wirkung nach Stimulation mit 25 mM KCl.

Die vermutlich G_i -vermittelte, inhibitorische Wirkung von 100 nM Somatostatin auf die stimulierte Insulinsekretion ist nach diesen Experimenten zumindest teilweise auf die Existenz des $Ca_v2.3e$ -Proteins zurückzuführen.

Abschließend konnte damit die zuvor im heterologen Expressionssystem HEK293 nachgewiesene direkte Modulation des $Ca_v2.3$ -Proteins in der Insulinoma-Zelllinie INS-1 bestätigt werden.

5 Diskussion

5.1 Die neue Spleißvariante $Ca_v2.3e$

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die neue Calciumkanal-Spleißvariante $Ca_v2.3e$ identifiziert und charakterisiert. Neben der $Ca_v2.3c$ -cDNS, die 1994 von Williams et al.⁶³ aus Maus kloniert wurde, wurde in der durchgeführten Expressionsanalyse keine weitere Spleißvariante zweifelsfrei detektiert. In Abbildung 34A sind diese beiden Varianten schematisch dargestellt.

Die elektrophysiologischen Eigenschaften der transient in HEK293-Zellen exprimierten Spleißvariante $Ca_v2.3e$ unterscheiden sich nicht von denen anderer untersuchter $Ca_v2.3$ -Varianten (Abbildung 33).

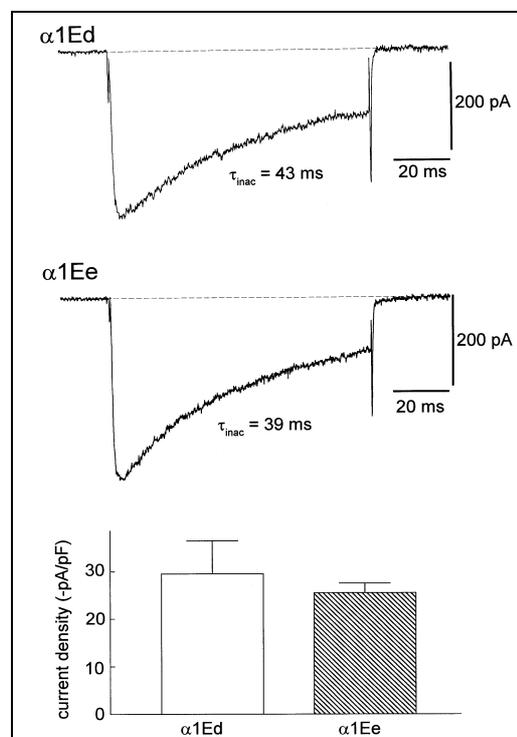


Abbildung 33: Vergleich der Ba^{2+} -Einwärtsströme transient exprimierter $Ca_v2.3d$ - und $Ca_v2.3e$ -Untereinheiten in HEK293-Zellen (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Klöckner, Institut für vegetative Physiologie, Universität zu Köln).

Die Inaktivierungszeitkonstante liegt für $Ca_v2.3e$ mit 39 ms nur geringfügig unter der Zeitkonstante von $Ca_v2.3d$ mit 43 ms. Die Stromdichten beider exprimierter cDNS sind nicht signifikant verschieden. Haltepotential: -70 mV; Testpotential: +10 mV; Ladungsträger, 15 mM Ba^{2+} . Für die Untereinheit $Ca_v2.3$ wurde mit $\alpha 1E$ die alte Nomenklatur verwendet.

Beim Vergleich mit $Ca_v2.1$ ¹⁵⁴ und $Ca_v2.2$ ¹⁵⁵, wo Spleißvarianten zu teilweise erheblichen Änderungen der elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften führten, wird deutlich, dass die dort identifizierten Variationen innerhalb der Transmembrandomänen auftreten.

Im Gegensatz dazu liegen die Unterschiede zwischen $Ca_v2.3c$ und $Ca_v2.3e$ in der zytoplasmatischen Schleife zwischen Domäne II und III (Insertion I) und im Carboxyterminus (Insertion III). Die Bedeutung beider Regionen ist daher wahrscheinlich eher in der Wechselwirkung mit intrazellulären Proteinen zu suchen. Die erstgenannte Region interagiert in anderen Ca_v -Untereinheiten von VGCCs mit Ca^{2+} -abhängigen Effektorproteinen. Der zytoplasmatische Carboxyterminus wiederum reguliert in L-Typ- und P/Q-Typ-VGCCs die Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung durch die Wechselwirkung mit Calmodulin und ist Interaktionsort für inhibitorische $\beta\gamma$ -Untereinheiten heterotrimerer G Proteine und für die β -Hilfsuntereinheit des Ca^{2+} -Kanals.

Das $Ca_v2.3$ -Gen ist in Mensch (1q25-q31) und Maus (MGI: 106217) jeweils auf Chromosom 1 lokalisiert. Der Sequenzvergleich der kodierenden Region von $Ca_v2.3$ mit der Datenbank des menschlichen Genoms führt zur Genstruktur mit insgesamt 48 Exons (Abbildung 35); dagegen ergibt der Vergleich mit den Sequenzen, die von Mittmann S. et al. (2000) in GenBank abgelegt wurden, einen Aufbau aus insgesamt 49 Exons. Die Genstruktur belegt die Hypothese, dass Insertion I und III, aber nicht Insertion II im Rahmen eines „Exon-Skipping“-Prozesses in $Ca_v2.3$ -mRNS eingebaut werden können. Es ist bisher nicht bekannt, welche Faktoren einen gewebe-spezifischen Einbau dieser Insertionen veranlassen oder unterbinden.

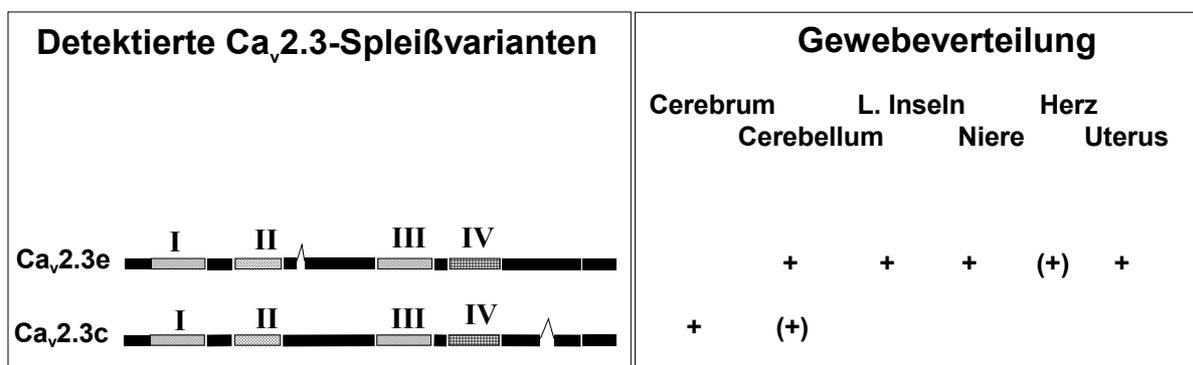


Abbildung 34: Detektierte $Ca_v2.3$ -Spleißvarianten in Rattengeweben.
(A) Schematische Darstellung **(B)** Gewebeverteilung der jeweiligen mRNS¹⁵⁶

Abbildung 34B zählt die Gewebetypen auf, in denen die beiden Spleißvarianten auf mRNS-Ebene eindeutig nachgewiesen werden konnten. Nicht zuletzt die starke Expression von $Ca_v2.3c$ im Großhirn bzw. ZNS führte dazu, dass einige Autoren die Expression von $Ca_v2.3$ immer noch auf neuronale Gewebe beschränken³⁹.

Demgegenüber konnte hier der Nachweis einer distinkten $Ca_v2.3e$ -Spleivariante in peripheren Geweben durchgeführt werden. Zweifelsfrei konnten cDNS-Fragmente in Langerhans'schen Inseln und Uterus (Vajna, Schneider, hier nicht gezeigt) amplifiziert werden.

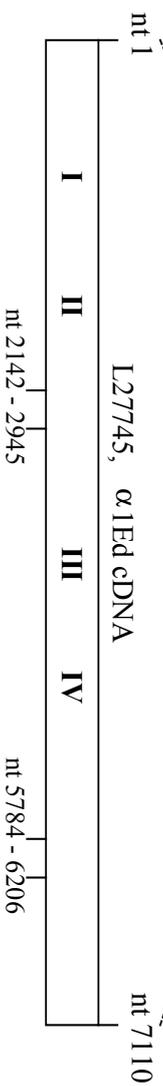
Structure of the human $\alpha 1E$ gene (Ca v2.3) located on chromosome 1

A.

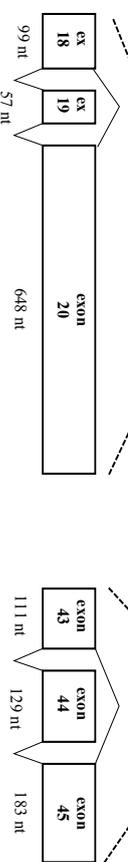


$\alpha 1E$ gene, 359,266 bp
48 exons

B.



C.



D.

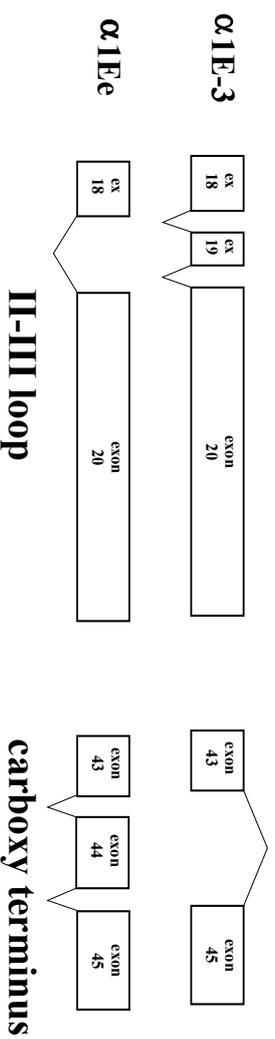


Abbildung 35: Struktur des humanen Ca_v2.3-Gens (CACNA1E) (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Schneider, Institut für Neurophysiologie der Universität zu Köln.)

(A) Bezug der klonierten menschlichen Ca_v2.3d-Sequenz zur sequenzierten genomischen DNS (NCBI). Durch Sequenzvergleich lassen sich insgesamt 48 Exons innerhalb einer etwa 359 kb langen Sequenz (nt 279.953 – nt 646.282) ableiten. (B) Schematische Darstellung der längsten klonierten Ca_v2.3-Spleißvariante, die alle abgeleiteten 48 Exons enthält. (C) Modell zur Erklärung der vorgefundenen Spleißvarianten über Exon-Skipping in 2 Bereichen der abgeleiteten cDNS, dem II-III-Loop und der carboxyterminalen Region. (D) Aufbau der beiden wichtigsten Spleißvarianten Ca_v2.3c (Cerebrum und zerebelläre Molekularschicht) und Ca_v2.3e (Purkinje-Neuronen und endokrine Bereiche). Für die Untereinheit Ca_v2.3 wurde mit $\alpha 1E$ die alte Nomenklatur verwendet.

Immunhistochemisch konnte darüber hinaus in unserer Arbeitsgruppe die Existenz von Ca_v2.3e mit Hilfe des Ca_v2.3e-spezifischen Antikörpers anti-α1Ed in zahlreichen endokrinen Zell- und Gewebetypen wie Antrumzellen sowie Zellen aus Duodenum¹⁵⁷ bzw. Testes¹²⁹ ermittelt werden.

Aufgrund dieses Expressionsmusters ergab sich zwangsläufig die Vermutung, dass das Ca_v2.3e-Protein bzw. der entsprechende R-Typ-VGCC für die physiologische Aktivität endokriner Zellen von Bedeutung sein könnte. Im Gegensatz zur neuronalen Ca_v2.3c-Variante lag die Expression des Proteins in Langerhans'schen Inseln bzw. der Insulinoma-Zelllinie INS-1 unterhalb der Nachweisgrenze des Western-Blotting-Verfahrens. Da spannungsgesteuerten Calciumkanälen als Bestandteil zellulärer Signalkaskaden Verstärkerfunktionen zukommen, sind hohe Expressionsdichten für den funktionellen Beitrag jedoch nicht von entscheidender Bedeutung.

5.2 Funktionelle Bedeutung von Ca_v2.3e in der Insulinsekretion

Zur Ermittlung der funktionellen Bedeutung des Ca_v2.3e-Proteins wurde die Insulinsekretion als Modell eines durch die Erregungs-Sekretionskopplung induzierten und regulierten Vorgangs ausgewählt. Durch Messung der sezernierten Insulinmenge konnte das Endprodukt der intrazellulären Signalkaskaden untersucht werden.

Die durchgeführten Experimente belegen eine funktionelle Beteiligung Ca_v2.3e-haltiger Kanäle an der Glukose-induzierten Insulinsekretion, da im einzelnen gezeigt werden konnte, dass

- das Ca_v2.3-selektive Peptidtoxin SNX-482 die Glukose-induzierte Insulinsekretion in INS-1-Zellen und Langerhans'schen Inseln der Maus reduzierte.
- stabil mit Ca_v2.3-Antisense-RNS transfizierte INS-1-Zellen im Vergleich mit Sense- und untransfizierten INS-1-Zellen erniedrigte Glukose-induzierte Insulinsekretionen aufwiesen.
- in Ca_v2.3-defizienten Mäusen die Glukose-induzierte Insulinsekretion der Langerhans'schen Inseln gegenüber Inselpräparationen aus Kontrollmäusen stark reduziert war.

5.2.1 Der SNX-482-Effekt

Um die Bedeutung des SNX-482-sensitiven Ca²⁺-Kanals für die Insulinsekretion in INS-1-Zellen zu erfassen sind in Tabelle 7 der jeweilige Einfluss selektiver Antagonisten auf den Ba²⁺-Ionenstrom ihren Effekten auf die Sekretionsrate gegenüberstellt.

Mit Ausnahme des N-Typ-Kanals konnten für alle anderen VGCCs Beiträge zur Glukose-vermittelten Insulinsekretion abgeleitet werden. Während dies für P¹⁴⁴- und L¹⁵⁸-Typ-Kanal bereits zuvor gezeigt wurde, ist die Beteiligung Ca_v2.3-haltiger R-Typ-Kanäle in dieser Arbeit erstmalig beschrieben.

Kanaltyp	Ba ²⁺ -Einwärtsstrom (% des Gesamtstromes)	Anteil an der Insulinsekretion (% der Gesamtsekretion)
L-Typ	23 ± 16	76 ± 5
P/Q-Typ	55 ± 16	69 ± 4
R-Typ	22 ± 2	-
(davon SNX-482 sensitiv)	(8 ± 2)	(24 ± 6)
Summe	100 (86,6)	169

Tabelle 7: Vergleich der jeweiligen Anteile von L-, P- und R-Typ-VGCCs am Ba²⁺-Einwärtsstrom bzw. an der Glukose-induzierten Insulinsekretion in INS-1-Zellen.

Daten nach Applikation des jeweiligen Inhibitors: 2 µM (±)Isradipin (L-Typ); 0,5 µM ω-Conotoxin MVIIc (P/Q-Typ); 100 nM SNX-482

SNX-482 führte sowohl in Langerhans'schen Inseln der Maus (11% ± 8, nicht-signifikant) als auch in der Insulinoma-Zelllinie INS-1 (24% ± 6 signifikant) zu einer Reduktion der Glukose-induzierten Insulinsekretion. Demgegenüber konnte Prof. Dr. Klöckner in einer Patch clamp-Analyse der Ba²⁺-Einwärtsströme in INS-1-Zellen zeigen, dass nur 8 % des Gesamteinstroms durch SNX-482-sensitive Kanäle erfolgt. Mit der Verwendung von 100 nM SNX-482 könnten daher in der Untersuchung von INS-1-Zelle und Langerhans'schen Inseln der Maus R_a- völlig und R_b-Komponenten (siehe 1.4) größtenteils blockiert werden; vorhandene R_c-Strombildner sind jedoch auf diese Weise nicht inhibierbar.

Es muss betont werden, dass die Werte der Sekretionsanalyse nicht den Regeln der Additivität entsprechen. Eine Erklärung dafür ist eine unspezifische Interaktion der jeweiligen Hemmstoffe mit anderen VGCCs. Wie im Falle der Ba²⁺-Einwärtsstromanalyse dargestellt, entspricht die Summe aus L-, P/Q-, und R-Typ-Anteil jedoch der Additivitätsregel, wenn man berücksichtigt, dass nach Zugabe von 100 nM SNX-482 ein Reststromanteil von etwa 20% verbleibt, der von einer oder mehreren nicht blockierbaren, unbekanntem Kanaltypen gebildet wird.

Es wurde berichtet, dass 200 nM SNX-482 in tsa201-Zellen 25% eines Barium-Einwärtsstroms inhibierten, der durch die rekombinant exprimierte Ca_v1.2-Untereinheit zusammen mit β2A und α2δ-1 vermittelt war¹⁴⁰. Horvath et al.¹⁴³ kamen in ihrer Untersuchung der Expression von VGCCs in INS-1-Zellen zu dem Ergebnis, dass Ca_v1.3 und nicht Ca_v1.2 den weitaus größten Teil an L-Typ-Transkripten ausmacht. Ca_v1.3 ist jedoch SNX-482 insensitiv¹³⁹. Darüber hinaus konnte Prof. Klöckner zeigen, dass der Spitzenstrom der SNX-482-sensitiven Ba²⁺-Stromkomponente in INS-1-Zellen gegenüber rekombinant exprimierten Ca_v2.3-Protein zu negativeren Potentialen verschoben ist (Abbildung 39), wie sie für Ca_v1.2-vermittelte Ionenströme bislang in der Literatur noch nicht beschrieben worden sind.

Eine wahrscheinlichere Erklärung der Nicht-Additivität ergibt sich aus der Tatsache, dass der funktionelle Beitrag von VGCCs an der Insulinsekretion (und anderen endokrinen Prozessen) dualer Natur ist: Zum einen dient der Ca^{2+} -Einstrom durch die Kanäle im Rahmen der SNARE-Hypothese als direktes Signal zur Fusion des Vesikels mit der Plasmamembran, zum anderen führt er zur Depolarisation der Zellmembran, was die Aktivierung weiterer VGCCs verursacht. Beide Vorgänge erhöhen letztendlich die Sekretionsrate. Daher sind die aufgeführten Effekte der einzelnen Kanaltypen auf die Hormonsekretion größer als ihr relativer Anteil am Ba^{2+} -Einwärtsstrom.

Sowohl L-Typ- als auch SNX 482-sensitive Kanäle besitzen nach Tabelle 7 gegenüber P/Q-Typ-VGCCs eine wesentlich höhere Effizienz bei der Kopplung von plasmamembranärer Erregung und Insulinsekretion, ohne dass aufgrund der durchgeführten Messungen direkt bestimmt werden konnte, ob diesem Effekt eine engere Kopplung mit der Vesikelmaschinerie oder eine verstärkte Depolarisations-Aktivierung zugrunde liegt. Eine Erklärung bietet eine kürzlich in dissoziierten Neuronen des Nucleus supraopticus des Rattenhirns durchgeführte elektrophysiologische Analyse¹⁵⁹. Die Autoren dieser Untersuchung ermittelten eine Aktivierung von L^{vi} - und R-Typ-Strömen bei niedrigeren Potentialen gegenüber den ebenfalls vertretenen N- und P/Q-Typ-Strömen. Je früher die jeweiligen Calciumkanäle im Zuge der Aktionspotential-Generierung öffnen, desto größer ist ihr Einfluss auf nachfolgend aktivierte VGCCs. Die hohe Kopplungseffizienz von Kanälen, die durch $\text{Ca}_v1.3$ und $\text{Ca}_v2.3$ gebildet werden, wäre demnach auf die verstärkte Depolarisations-Aktivierung zurückzuführen.

5.2.2 Die Antisense-Repression

Die unzureichende Selektivität des Peptidtoxins SNX-482 für $\text{Ca}_v2.3$ -haltige Calciumkanäle in INS-1-Zellen führte zu dem Versuch, mit Hilfe der Antisense-Technik der tatsächlichen Bedeutung des $\text{Ca}_v2.3$ -Proteins für die Insulinsekretion näher zu kommen.

INS-1-Zellen, die stabil mit einem $\text{Ca}_v2.3$ -Antisense-Konstrukt transfiziert worden waren, wiesen eine im Vergleich mit Kontroll-Sense- bzw. Wildtypzellen signifikant erniedrigte Glukosevermittelte Insulinsekretion auf. Der Effekt war stärker als die transiente pharmakologische Reduktion der Sekretion durch das Peptidtoxin SNX-482. Der Hypothese von Tottene et al., 2000⁶⁸ folgend könnte dies in der zusätzlichen Repression des R_c -Typs begründet sein, der durch die verwendeten Konzentrationen des Peptidtoxins nicht inhibiert wird (siehe 1.1.4). Da in INS-1-Zellen auf mRNA-Ebene jedoch nur eine $\text{Ca}_v2.3$ -Variante (bezüglich der untersuchten Abschnit-

^{vi}Als ionenleitende Untereinheit des L-Typs konnte $\text{Ca}_v1.3$ identifiziert werden. Expression des rekombinanten Proteins (zusammen mit der $\beta 1b$ -Untereinheit) in *Xenopus* Oozyten lieferte einen Ba^{2+} - bzw. Ca^{2+} -Ionenstrom, der gegenüber $\text{Ca}_v1.2$ um etwa 25 mV zu negativeren Potentialen hin verschoben war¹⁶⁸.

te) detektiert werden konnte, bleibt es offen, ob die Kombination verschiedener Hilfsuntereinheiten die Affinität des Peptidtoxins beeinflusst.

Daneben könnte auch eine unspezifische Repression anderer VGCCs durch das Antisense-Konstrukt für die verminderte Insulinsekretion verantwortlich sein. Ohne die Analyse für L- und P/Q-Typ-Kanäle gesondert durchzuführen, konnte jedoch gezeigt werden, dass durch Depolarisation der Plasmamembran mittels 25 mM KCl sowohl in Antisense- wie in Kontrollzellen eine vergleichbare Insulinsekretion induziert wurde. Demnach ist die Zahl der an der regulierten Sekretion partizipierenden VGCC-Moleküle in den Antisense-Klonen nicht wesentlich verändert. Im Gegensatz dazu hemmte in der transienten pharmakologischen Analyse der Insulinsekretion in INS-1-Zellen (siehe 5.2.1) die Zugabe von 100 nM SNX-482 die KCl-vermittelte Insulinsekretion in signifikanter Weise. Diese Diskrepanz könnte durch kompensatorische Prozesse im Laufe der Antisense-Klon-Vermehrung entstanden sein, die auf einer Erhöhung beider oder eines der beiden anderen funktionell beteiligten HVA-Calciumkanäle beruht.

Die Depolarisation, welche durch Zugabe von 25 mM KCl ausgelöst wird, unterdrückt die durch die Antisense-Repression induzierte Reduktion der Glukose-vermittelten Insulinsekretion, obwohl auch letztere sich der elektrischen Erregung der Plasmamembran bedient, um das Signal zur Sekretion zu initiieren. Demnach müsste die Funktion der $Ca_v2.3$ -haltigen Kanäle entsprechend in der Generierung dieser Depolarisation zu suchen sein. Da sie bei niedrigeren Potentialen als L- und P/Q-Typ-Kanäle aktiviert werden, könnten die $Ca_v2.3$ -haltigen Kanäle damit vor den anderen HVA-VGCCs öffnen und das Aktionspotential soweit verstärken, dass nachfolgend L- und P/Q-Typ-VGCCs aktiviert werden, die den exozytotischen Prozess vermitteln.

5.2.3 Die $Ca_v2.3$ -defiziente Mauslinie

Die Eliminierung der Glukose-induzierten Insulinsekretion in $Ca_v2.3$ -defizienten Mäusen ist ein deutlicher Hinweis für den wichtigen Beitrag des Calciumkanals an der Signalkaskade zur Hormonfreisetzung. Der Effekt ist eindeutig und unterliegt in Langerhans'schen Inseln, welche aus zehn bis zwölf Wochen alten Mäusen isoliert wurden, keiner Kompensation innerhalb des Glukose-aktivierten Signalwegs.

Dr. Pereverzev konnte durch Untersuchungen am intakten Organismus eine verminderte Insulinsekretion in $Ca_v2.3$ -defizienten Mäusen als Antwort auf einen erhöhten Blutglukosespiegel ermitteln. So wurde nach intraperitonealer Injektion von D-Glukose (2 mg/g Körpergewicht) die Reaktion der Tiere als Glukose-Toleranz-Test gemessen. Dabei zeigte sich, dass in $Ca_v2.3$ -defizienten Tieren nach 30 Minuten keine nennenswerte Erhöhung der Insulinkonzentration aufgetreten war, wohingegen die Wildtyp-Gruppe auf die Zunahme des Glukosespiegels mit einer Insulinfreisetzung antwortete¹⁰⁴.

In einer neueren Untersuchung konnte Gilon¹⁶⁰ zeigen, dass in β -Zellen der Maus 80% des Ba^{2+} -Einwärtstrom durch L-Typ-Kanäle getragen wird und die übrigen 20% resistent gegenüber P/Q- bzw. N-Typ-Antagonisten sind. Sie könnten demnach durch $Ca_v2.3$ -haltige Kanäle gebildet werden. Dies würde die drastische Reduktion der Glukose-induzierten Insulinsekretion im Vergleich mit den Untersuchungen in der INS-1-Zelllinie, welche aus β -Zellen der Ratte stammt, erklären. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Glukose-induzierte Insulinsekretion der Maus im Vergleich mit den entsprechenden Prozessen in Ratte und Mensch moderat ist: So führt die Applikation von 15-20 mM Glukose nur zu einer Verdopplung der Hormonsekretion im Vergleich zum Basalzustand, wohingegen Langerhans'sche Inseln der Ratte auf das fünf- bis zehnfach des Ausgangswertes stimuliert werden¹⁶¹. Den Unterschied sehen einige Autoren in einer verminderten Expression von Proteinen des intrazellulären IP_3 -Signalwegs, so dass in erster Näherung die Glukose-vermittelte Insulinsekretion in Mäusen auf die Depolarisationsvorgänge an der Plasmamembran zurückgeführt werden muss.

5.2.4 Regulation des $Ca_v2.3$ -Proteins

Die heterologen Expressionsexperimente in HEK293-Zellen führten zu dem Ergebnis, dass die $Ca_v2.3$ -Protein durch Somatostatin direkt inhibiert wird. Verantwortlich dafür ist vor allem ein aminoterminaler Bereich, der in dem Konstrukt pcDNA3- $\alpha 1Ed-\Delta HN$ -Chi A-Ctr deletiert worden war. In diesem Punkt entspricht das Ergebnis den Untersuchungen von Page et al.⁷⁷, die mit der aus Ratte klonierten $Ca_v2.3$ -Untereinheit durchgeführt worden war. In HEK293-Zellen wird die intrazelluläre Signalkaskade nach Bindung von Somatostatin an den SST2-Rezeptor durch $G_{i/o}$ -Proteine vermittelt, welche nachfolgend das $Ca_v2.3$ -Protein inhibiert¹⁶³. Da ein entsprechender Signalweg die Somatostatin-induzierte Inhibition in β -Zellen Langerhans'scher Inseln vermittelt, lag es nahe, in Antisense-INS-1-Zellen den Somatostatin-Effekt zu untersuchen. Das Ergebnis lässt ahnen, dass die $Ca_v2.3$ -Untereinheit ein Angriffspunkt der inhibitorischen Wirkung darstellen könnte. So zeigten die Antisense-Klone eine verminderte Sensitivität gegenüber Somatostatin bezüglich der Glukose- und KCl-stimulierten Insulinsekretion. Dies würde dafür sprechen, dass die membranlaterale Wirkung der $G_{i/o}$ -Proteine in INS-1-Zellen zumindest teilweise durch Inhibition der $Ca_v2.3$ -Untereinheit erfolgt.

Die Stimulation des Calciumkanals durch Proteinkinase C unterliegt einem anderen Mechanismus als die Somatostatin-induzierte Inhibition. Es existiert kein „Crosstalk“ zwischen beiden Signalwegen und die vorliegende Studie konnte auch keine direkte Interaktion mit der $Ca_v2.3$ -Untereinheit feststellen. Es bleibt also fraglich, in welchem Bereich die Interaktion mit PKC stattfindet, bzw. ob nicht ein anderes Protein bei diesem Prozess vermittelt.

5.2.5 Hypothese für eine Beteiligung von $Ca_v2.3$ an der Insulinsekretion

Die vollständige Reduktion der Glukose-induzierten Insulinsekretion in $Ca_v2.3$ -defizienten Mäusen unterstreicht die Bedeutung des Proteins an der Erregungs-Sekretions-Kopplung in β -Zellen Langerhans'scher Inseln. Da über die Interaktion des $Ca_v2.3$ -Proteins mit intrazellulären Signalwegen in β -Zellen nichts bekannt ist, sollte eine Hypothese über eine funktionelle Beteiligung des $Ca_v2.3$ -Proteins an der Glukose-vermittelten Insulinsekretion nur die Vorgänge an der Plasmamembran in Betracht ziehen.

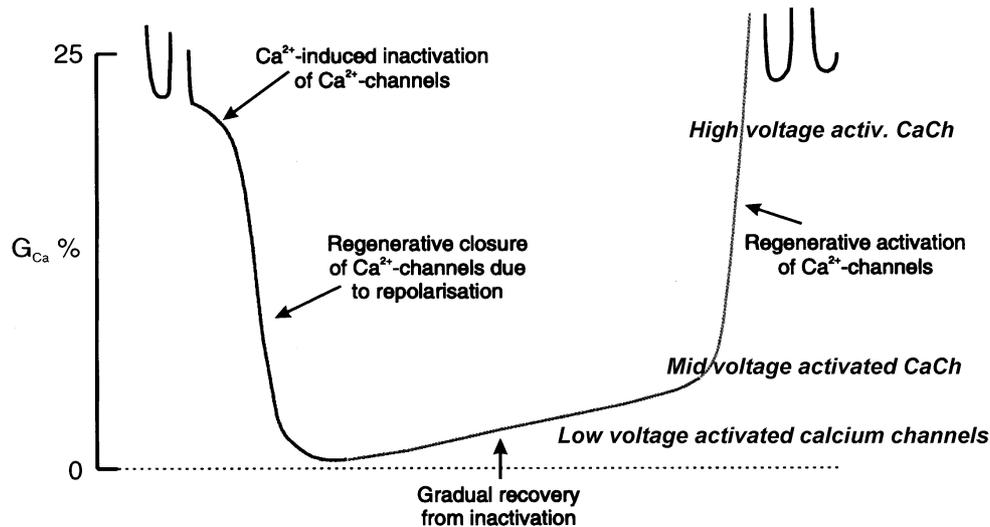


Abbildung 36: Hypothetische sukzessive Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle in der Zwischenphase repetitiver Aktionspotentiale („bursts“) in β -Zellen (modifiziert nach: Gromada, 1998¹⁶²).

Die Darstellung repetitiver Aktionspotentiale der β -Zelle wurde durch den Einschub „mid-voltage-activated calcium channel“ erweitert, welches den R-Typ-Kanal in Form seiner Spannungsaktivierung charakterisiert.

Die elektrische Aktivität der Plasmamembran einer β -Zelle wird durch die Schließung ATP-sensitiver Kaliumkanäle induziert. Als Folge kommt es zu langsamen Depolarisationen, die ein Schwellenpotential von -50 mV überschreitend, die rasche Aktivierung eines Aktionspotentials verursacht (Abbildung 36).

Da die beteiligten Calciumkanäle bei unterschiedlichen Potentialen öffnen, ist es wahrscheinlich, dass sie seriell und nicht parallel aktiviert werden. Im Falle einer solchen sukzessiven Aktivierung könnte dabei neben den T-Typ-Kanälen dem R-Typ-Kanal eine besondere Rolle zukommen. Dies gilt insbesondere, da er im Gegensatz zu den LVA-Kanälen bei Potentialen oberhalb des angegebenen Schwellenpotentials aktiviert wird (siehe 1.2), also für den schnellen Aufstrich des Aktionspotentials im „burst“ (siehe Abbildung 36) verantwortlich wäre. Die finale Fusion und Entleerung der Insulin-haltigen Vesikel erfolgt dann im Zuge der Ca^{2+} -getragenen Aktionspotentiale, der „spikes“, an den hochspannungsaktivierten VGCCs des P/Q- und L-Typs.

6 Anhang

6.1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Quartärstruktur eines VGCCs ¹⁰ .	2
Abbildung 2: G-Protein-Beteiligung an der Rezeptor-vermittelten Regulation von Ionenkanälen.	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Aktivierung bzw. Regulation der Insulinsekretion in β -Zellen Langerhans'scher Inseln.	10
Abbildung 4: Methode der überlappenden PCR zur Einführung von Punktmutationen.	35
Abbildung 5: Epitoperkennung eines Ca _v 2.3-spezifischen Antikörpers.	46
Abbildung 6: Standardisierte Eichkurve der MultiCalc™-Transformationen.	50
Abbildung 7: PCR-Amplifikation von Ca _v -cDNS-Fragmenten aus <i>in vitro</i> differenzierten embryonalen Stammzellen.	53
Abbildung 8: Einzelzell-RT-PCR aus Neuronen in <i>in vitro</i> differenzierten BLC6-ES-Zellen.	55
Abbildung 9: Schematische Darstellung der klonierten Ca _v 2.3-cDNS.	57
Abbildung 10: PCR-Amplifikation von Ca _v 2.3-cDNS-Fragmenten aus Kortex, Zerebellum und Körnerzellen-Primärkulturen der Ratte.	59
Abbildung 11: PCR-Amplifikation von Ca _v -cDNS-Fragmenten aus Langerhans'schen Inseln, INS-1-Zellen und Gesamthirn.	62
Abbildung 12: Immundetektion mikrosomalen Proteins aus Langerhans'schen Inseln der Ratte und INS-1-Zellen.	63
Abbildung 13: Immundetektion von Ca _v 2.3e-Proteinen in HEK293-2C6 bzw. INS-1-Zellen nach vorheriger Antikörper-Adsorption durch das Peptid GIYLPSTQEHAG.	65
Abbildung 14: Dosis-Wirkungskurve der SNX-482 vermittelten Hemmung der Glukose- bzw. KCl-induzierten Insulinsekretion in der Insulinoma-Zelllinie INS-1.	67
Abbildung 15: Abhängigkeit des SNX-482-Effektes von der Kultivierungsdauer in INS-1-Zellen.	69
Abbildung 16: Einfluss verschiedener Ca ²⁺ -Kanalantagonisten auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion in INS-1-Zellen.	70
Abbildung 17: Rekombinante Synthese des Ca _v 2.3-Antisense-cDNS-Fragmentes.	73
Abbildung 18: Durchmusterung der genomischen DNS stabil transfizierter INS-1-Zellen.	74
Abbildung 19: RT-PCR-Analyse der Expression der Antisense- und Sense-Kassette in stabil transfizierten INS-1-Zellen.	76
Abbildung 20: Vergleich des Insulingehaltes und der basalen Insulinsekretion in Sense-, Antisense-, GFP- und Kontroll-INS-1-Zellklonen.	77
Abbildung 21: Vergleich der Glukose-induzierten Insulinsekretion in Wildtyp und transfizierten INS-1-Zellen.	79
Abbildung 22: Vergleich von 15 mM Glukose- und 25 mM KCl-induzierter Insulinsekretion in Wildtyp- sowie transfizierten INS-1-Zellen.	80
Abbildung 23: Reduktion der Glukose-induzierten Insulinsekretion durch 100 nM SNX in Langerhans'schen Inseln.	81
Abbildung 24: Vergleich der Glukose-stimulierten Insulinsekretion isolierter Langerhans'scher Inseln aus $\alpha 1E(-/-)$ - und C57Bl/6-Mäusen nach Zugabe von 7 bzw. 20 mM Glukose.	83
Abbildung 25: Vergleich von Zahl und Insulingehalt Langerhans'scher Inseln von C57Bl/6- bzw. $\alpha 1E(-/-)$ -Mäusen.	83
Abbildung 26: Schematische Darstellung der Modifikationen von pcDNA3-Ca _v 2.3d.	85
Abbildung 27: Sequenzvergleich von Ca _v 2.1, Ca _v 2.2 und Ca _v 2.3 für den zytoplasmatischen Bereich zwischen Domäne I und II.	86
Abbildung 28: Rekombinante Synthese von pcDNA3- $\alpha 1Ed$ -M1(Ala468).	87
Abbildung 29: Synthese von pcDNA3- $\alpha 1Ed$ -M2(Ala414), pcDNA3- $\alpha 1Ed$ -M3(Gly418) und pcDNA3- $\alpha 1Ed$ -ChiA.	88
Abbildung 30: Rekombinante Synthese von pcDNA3- $\alpha 1Ed$ -Ctr.	90
Abbildung 31: Rekombinante Synthese von pcDNA3- $\alpha 1Ed$ - Δ HN-ChiA-Ctr.	91
Abbildung 32: Vergleich der Somatostatin-vermittelten Inhibition der Stimulus-induzierten Insulinsekretion in transfizierten INS-1-Zellen.	93

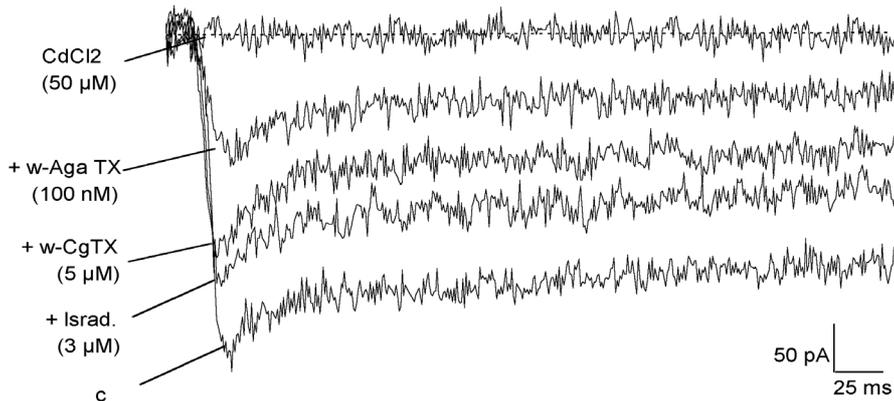
Abbildung 33: Vergleich der Ba ²⁺ -Einwärtsströme transient exprimierter Ca _v 2.3d- und Ca _v 2.3e-Untereinheiten in HEK293-Zellen (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Klöckner, Institut für vegetative Physiologie, Universität zu Köln).	94
Abbildung 34: Detektierte Ca _v 2.3-Spleißvarianten in Rattengeweben.	95
Abbildung 35: Struktur des humanen Ca _v 2.3-Gens (CACNA1E) (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Schneider, Institut für Neurophysiologie der Universität zu Köln.).	96
Abbildung 36: Hypothetische sukzessive Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle in der Zwischenphase repetitiver Aktionspotentiale („bursts“) in β-Zellen (modifiziert nach: Gromada, 1998 ¹⁶²).	102
Abbildung 37: Identifizierung von VGCCs in einzelnen Neuronen <i>in vitro</i> differenzierter BLC6-ES-Zellen (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Stefan Arnhold, Anatomisches Institut, Univ. zu Köln).	105
Abbildung 38: Einfluß des Peptidtoxins SNX-482 auf die Ba ²⁺ -Ioneneinwärtsströme in transfizierten HEK-293-Zellen (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Klöckner, Institut für vegetative Physiologie, Universität zu Köln).	106
Abbildung 39: Inhibition von Ba ²⁺ -Einwärtsströmen durch SNX-482 in INS-1-Zellen (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Klöckner, Institut für vegetative Physiologie, Universität zu Köln).	107
Abbildung 40: Vergleich der Sensitivität von Wildtyp, Antisense- und Sense-Zellen gegenüber Calciumkanal-Antagonisten (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Klöckner, Institut für vegetative Physiologie, Universität zu Köln.).	108
Abbildung 41: Modulation von Ba ²⁺ -Ioneneinwärtsströmen in transient mit Ca _v 2.3d transfizierten HEK 293-Zellen (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Klöckner, Institut für vegetative Physiologie der Universität zu Köln.).	109
Abbildung 42: Sukzessive Applikation von 100 nM PDBu und 1 µM Somatostatin in transient mit Ca _v 2.3d transfizierten HEK 293-Zellen (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Klöckner, Institut für vegetative Physiologie der Universität zu Köln.).	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die klonierten Ca _v -Untereinheiten (verändert, nach: Ertel, 2000 ¹).	5
Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten Analyse-Oligonukleotidpaare.	20
Tabelle 3: Sequenzen Ca _v 2.3-spezifischer Analyse-Oligonukleotidpaare.	20
Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten Synthese-Oligonukleotidpaare.	21
Tabelle 5: Pipettierungsschema der Eichkurve.	48
Tabelle 6: RT-PCR-Analyse von Ca _v -Transkripten in Zelllinien.	60
Tabelle 7: Vergleich der jeweiligen Anteile von L-, P- und R-Typ-VGCCs am Ba ²⁺ -Einwärtsstrom bzw. an der Glukose-induzierten Insulinsekretion in INS-1-Zellen.	98

6.2 Fremdexperimente

A Barium-Einwärtsströme in isolierten Neuronen (Ganzzellkonfiguration)



Morphologie der Neurone	Morphologie			
	L-Typ	N-Typ	P/Q-Typ	R-Typ
apolare Neurone (n=27)	34,4 ± 3,3 %	35,7 ± 2,7 %	20,8 ± 3,6 %	7,3 ± 1,2 %
bipolare Neurone (n=36)	27,3 ± 2,4 %	29,2 ± 1,5 %	30,3 ± 2,1 %	11,7 ± 1,9 %
multipolare Neurone (n=48)	23,8 ± 2,3 %	26,4 ± 1,3 %	35,2 ± 2,3 %	13,5 ± 3,2 %

Abbildung 37: Identifizierung von VGCCs in einzelnen Neuronen *in vitro* differenzierter BLC6-ES-Zellen (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Stefan Arnhold, Anatomisches Institut, Univ. zu Köln).

(A) Barium-Einwärtsströme in der Ganzzellkonfiguration unter Verwendung von Amphotericin B als perforierendes Agens (3 Tage nach Plattierung); die dargestellten Ströme wurden ohne Blocker (c), bzw. nach sukzessiver Zugabe von 3 µM (±)-Isradipin (israd.), 5 µM ω-Conotoxin-GV1a (ω-CGTX) und 100 nM ω-Agatoxin-IVA (ω-AgaTX) ermittelt. Der verbleibende Strom („resistenter Strom“) wird reversibel durch 50 µM CdCl₂ blockiert (B) Prozentualer Anteil der durch die entsprechenden Hemmsubstanzen bestimmten Kanaltypen am Gesamt-Barium-Einwärtsstrom in morphologisch charakterisierten Neuronen.

A

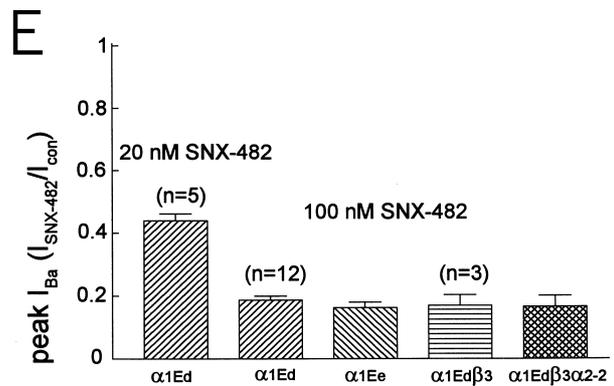
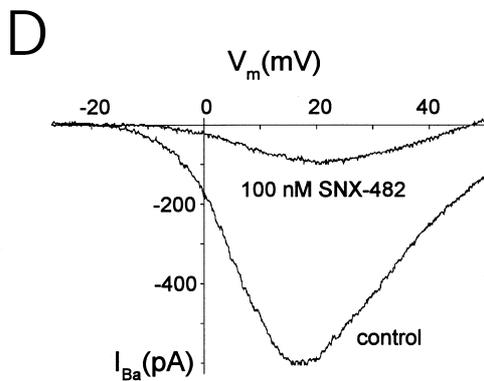
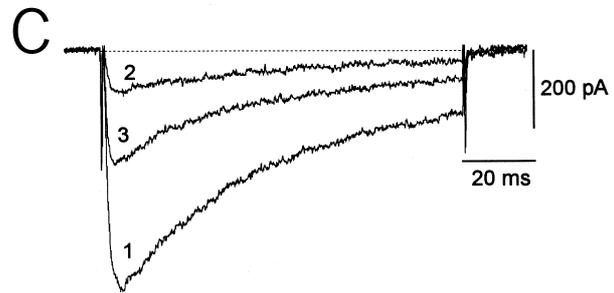
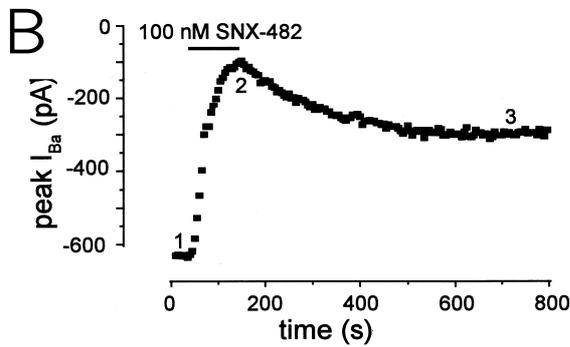
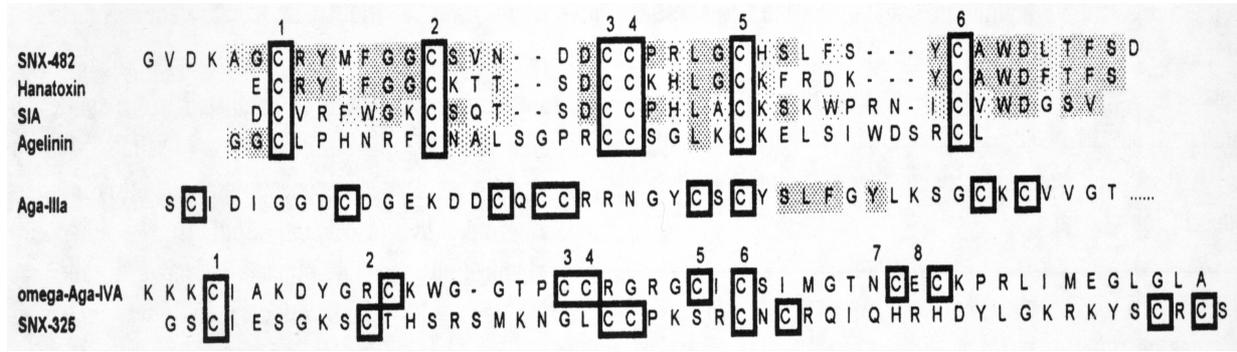


Abbildung 38: Einfluss des Peptidtoxins SNX-482 auf die Ba^{2+} -Ioneneinwärtsströme in transfizierten HEK-293-Zellen (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Klöckner, Institut für vegetative Physiologie, Universität zu Köln).

(A) Aminosäuresequenz des Oligopeptids SNX-482¹³⁹ und Vergleich mit strukturell verwandten Polypeptiden aus Spinnengiften. (B) Zeitlicher Verlauf der Inhibition des maximalen Ba^{2+} -Einwärtsstroms (peak I_{Ba}) in stabil mit $Ca_v2.3d$ -transfizierten HEK293-Zellen (HEK- $Ca_v2.3d$). Der Balken markiert den Zeitraum der Zugabe von 100 nM SNX-482. (C) Drei repräsentative Stromspuren, die zu den in B mit 1, 2 und 3 markierten Zeiten registriert wurden. Haltepotential: -70 mV, Testpotential: +10 mV, Ladungsträger: 15 mM Ba^{2+} , Depolarisationsdauer: 200 ms (D) Strom-Spannungskurve der Ba^{2+} -Einwärtsströme. Die Ströme wurden während einer 200 ms dauernden Spannungsrampe von -90 bis +50 mV vor (control) und nach Zugabe von 100 nM SNX-482 registriert. (E) Vergleich der SNX-482-Empfindlichkeit von Ba^{2+} -Einwärtsströmen der Spleißvarianten $Ca_v2.3d$ und $Ca_v2.3e$ sowie verschiedener $Ca_v2.3d$ -haltiger Heteromere mit den koexprimierten Hilfsuntereinheiten $\beta3$ und $\alpha2-\delta2$ ($\alpha2-2$).

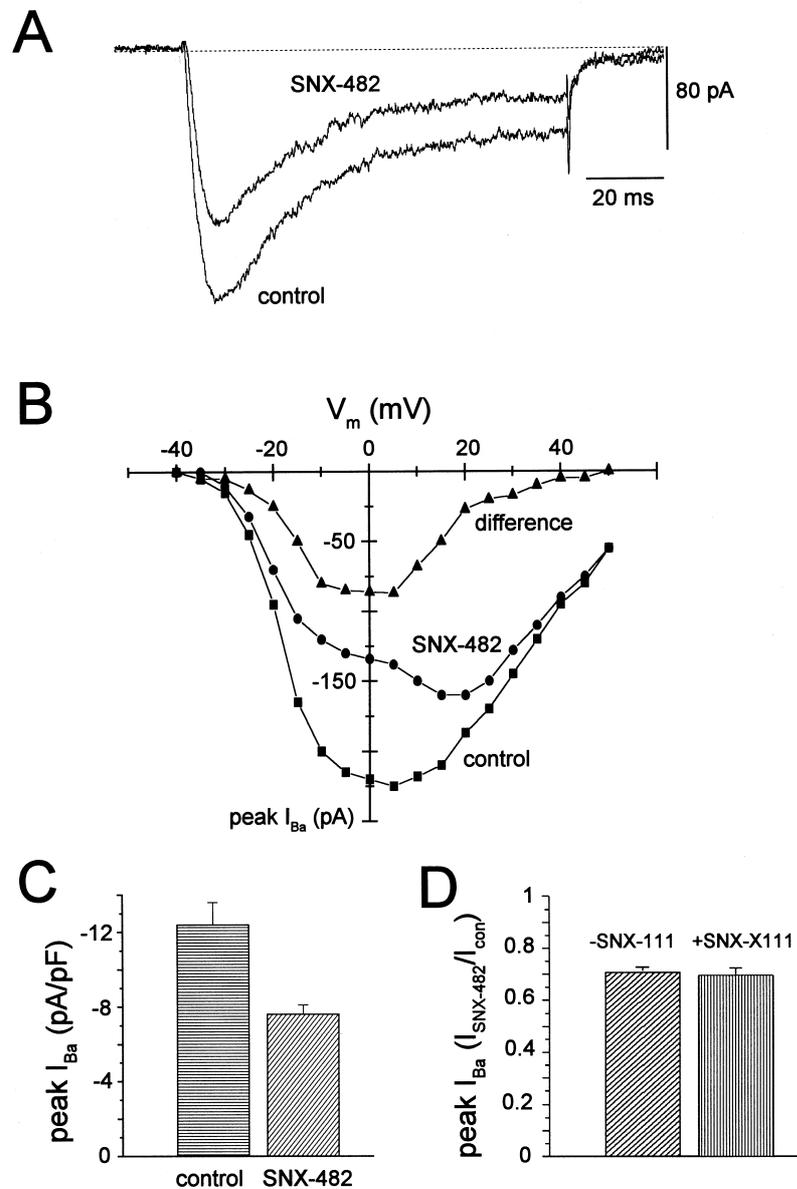


Abbildung 39: Inhibition von Ba^{2+} -Einwärtsströmen durch SNX-482 in INS-1-Zellen (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Klöckner, Institut für vegetative Physiologie, Universität zu Köln).

Alle Messungen wurden in der Ganzzellkonfiguration in Gegenwart von $2 \mu M$ PN200-110 und $0,5 \mu M$ ω -Conotoxin-MVIIc durchgeführt. **(A)** Repräsentative Ba^{2+} -Einwärtsstrom-Messung mit (SNX-482) bzw. ohne (control) 100 nM SNX-482. Haltepotential: -70 mV , Testpotential: $+10 \text{ mV}$, Ladungsträger: $15 \text{ mM } Ba^{2+}$, Depolarisationsdauer: 200 ms **(B)** IV-Kurven in Abwesenheit (control) oder Gegenwart von 100 nM SNX-482 (SNX-482). Die Differenz beider Kurven ist ebenfalls dargestellt (difference). **(C)** Statistik der signifikanten, SNX-482-vermittelten Reduktion des „resistenten“- Ba^{2+} -Einwärtsstroms in INS-1-Zellen von $-12,6 \pm 1,2 \text{ pA/pF}$ auf $-7,6 \pm 0,5 \text{ pA/pF}$ ($n = 9$). **(D)** Statistik der nicht-signifikanten Reduktion des „resistenten“ und SNX-482-unempfindlichen Ba^{2+} -Einwärtsstroms in INS-1-Zellen durch $3 \mu M$ ω -Conotoxin-MVIIa von $70,9 \pm 1,7\%$ ($n = 22$) auf $69,6 \pm 2,6\%$ ($n = 5$).

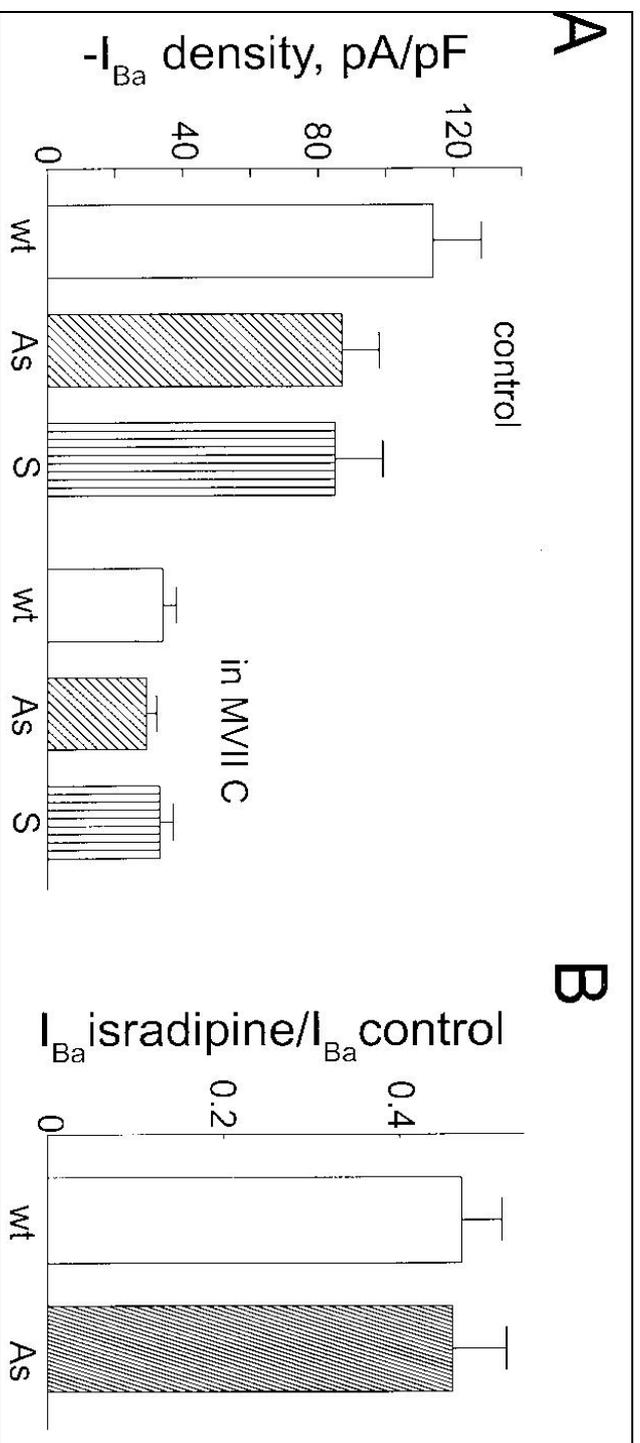


Abbildung 40: Vergleich der Sensitivität von Wildtyp, Antisense- und Sense-Zellen gegenüber Calciumkanal-Antagonisten (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Klöckner, Institut für vegetative Physiologie, Universität zu Köln.). Dargestellt sind Mittelwerte \pm mittlerer Fehler einer Patch clamp-Analyse von Spitzen- Ba^{2+} -Einwärtsströme in der Ganzzellkonfiguration. **(A)** Mittelwerte von Barium-Einwärtsströme vor (linke Seite) und nach Zugabe von $0,5 \mu M$ ω -Conotoxin-MVIIc (rechte Seite). Dabei wurden die Zellen jeweils zunächst für 30 min mit dem Toxin in Kulturmedium präinkubiert, bevor die Messung durchgeführt wurde. **(B)** Vergleich des jeweiligen Ba^{2+} -Einwärtsstrom-Verhältnis nach und vor Zugabe von $2 \mu M$ (\pm)-Isradipin von Wildtyp- und Antisense-Zellen.

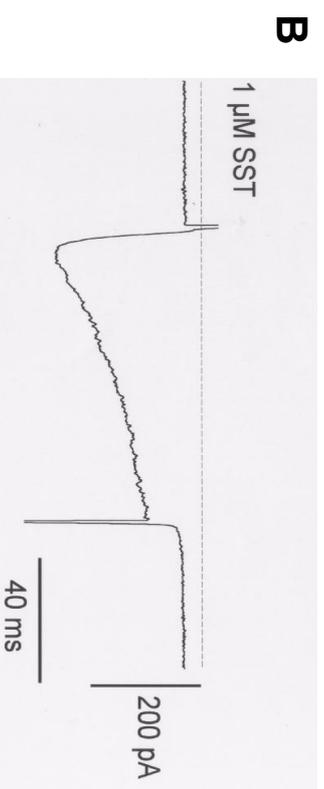
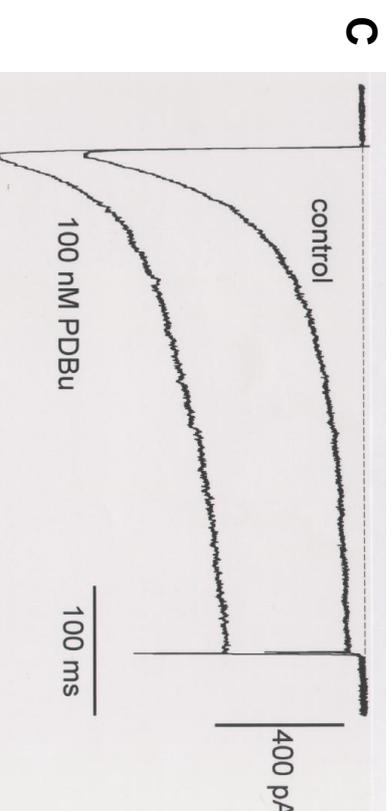
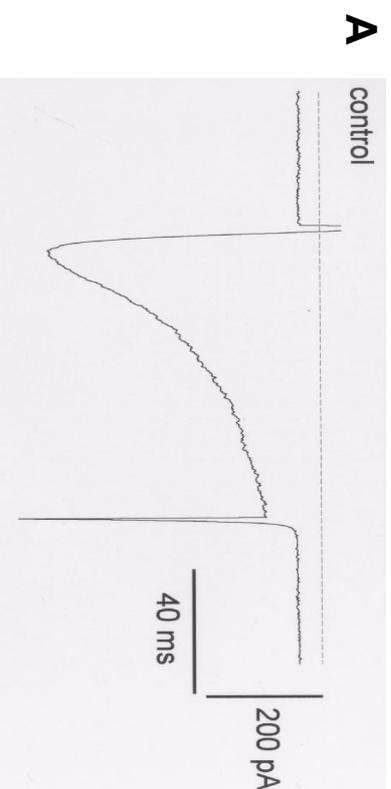


Abbildung 41: Modulation von Ba^{2+} -Ioneneinwärtsströmen in transient mit $Ca_v2.3d$ transfizierten HEK 293-Zellen (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Klöckner, Institut für vegetative Physiologie der Universität zu Köln.). (A) Ba^{2+} -Einwärtsstrom vor (control) und (B) nach Zugabe von 1 μ M Somatostatin (SST) (C) Ba^{2+} -Einwärtsstrom vor (control) und nach Zugabe von 100 nM PDBu (PDBu); als Negativkontrolle wurde 100 nM 4 α -PDBu verwendet (nicht gezeigt). Ladungsträger: 15 mM Barium

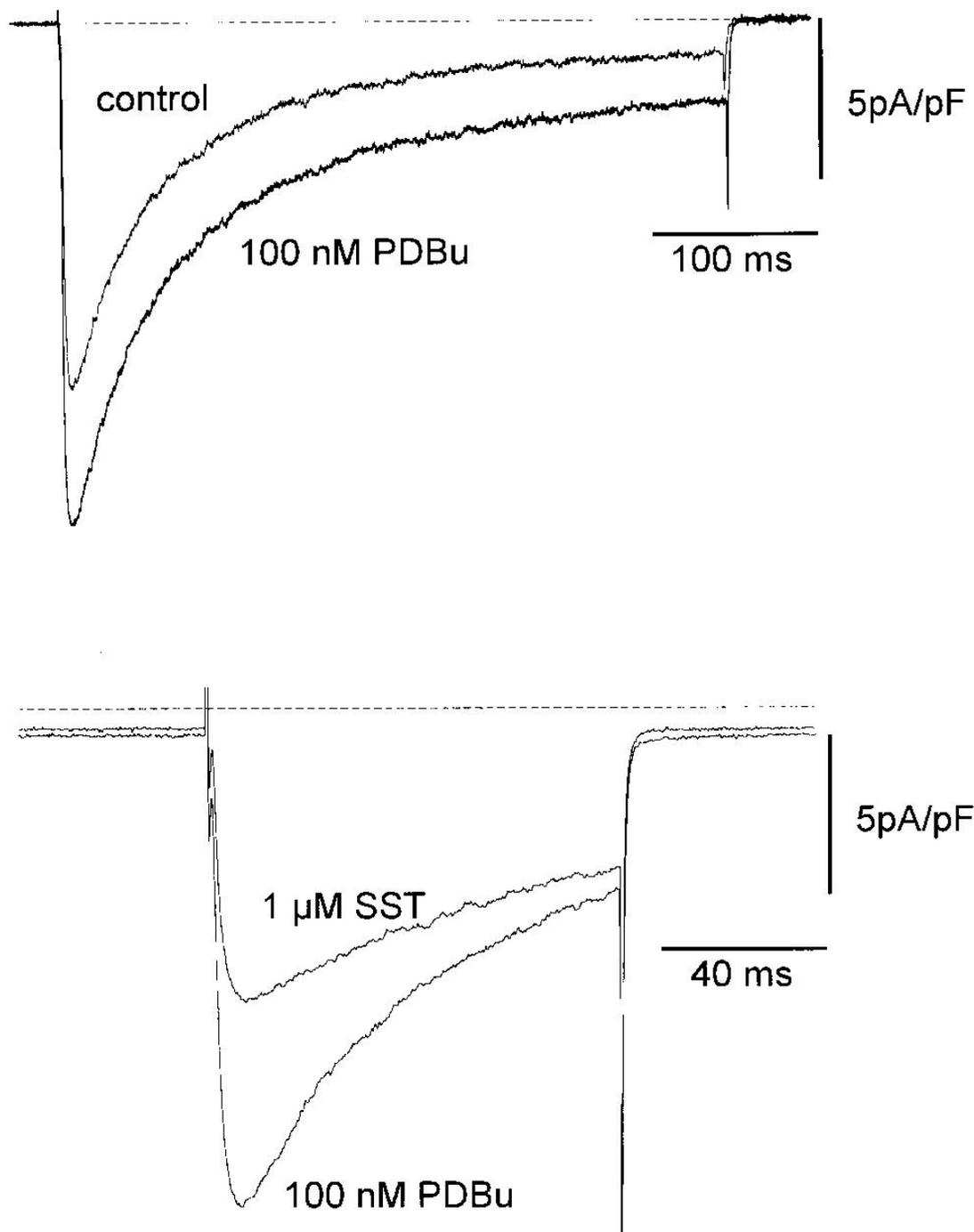


Abbildung 42: Sukzessive Applikation von 100 nM PDBu und 1 μ M Somatostatin in transient mit $\text{Ca}_v2.3d$ transfizierten HEK 293-Zellen (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Klöckner, Institut für vegetative Physiologie der Universität zu Köln.).

Dargestellt sind die zeitlichen Verläufe der Ba^{2+} -Einwärtsstromdichten nach Applikation der jeweiligen Substanzen. Oben: Stimulation des Einwärtsstroms durch Zugabe von 100 nM PDBu. Unten: Repression des PDBu-stimulierten Ba^{2+} -Stroms durch Applikation von 1 μ M Somatostatin. Man erkennt, dass die Stimulation des Proteins durch PDBu eine nachfolgende Inhibition von $\text{Ca}_v2.3d$ durch Somatostatin nicht unterbindet. Ladungsträger: 15 mM Barium

6.3 Literaturverzeichnis

1. Ertel,EA, Campbell,KP, Harpold,MM, Hofmann,F, Mori,Y, Perez-Reyes,E, Schwartz,A, Snutch,TP, Tanabe,T, Birnbaumer,L, Tsien,RW, Catterall,WA: Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25:533-535, 2000
2. Deetjen P, Speckmann E-J: Physiologie. München-Wien-Baltimore, Urban & Schwarzenberg, 1994,
3. Hoth,M, Penner,R: Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J.Physiol.(Lond.)* 465:359-386, 1993
4. Gurnett,CA, Campbell,KP: Transmembrane auxiliary subunits of voltage-dependent ion channels. *J.Biol.Chem.* 271:27975-27978, 1996
5. Walker,D, De Waard,M: Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca^{2+} channels: Role in channel function. *Trends Neurosci.* 21:148-154, 1998
6. Tanabe,T, Takeshima,H, Mikami,A, Flockerzi,V, Takahashi,H, Kangawa,K, Kojima,M, Matsuo,H, Hirose,T, Numa,S: Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328:313-318, 1987
7. Noda,M, Shimizu,S, Tanabe,T, Takai,T, Kayano,T, Ikeda,T, Takahashi,H, Nakayama,H, Kanaoka,Y, Minamino,N, et al.: Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312:121-127, 1984
8. Hille,B: Ionic channels of excitable membranes, 3rd edition. *Sinauer Associates Inc.*, 2002
9. Dolphin,AC: Mechanisms of modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *J.Physiol.(Lond.)* 506:3-11, 1998
10. McNaughton,NCL, White,C, Clark,B, Bath,C, Bleakman,D, Randall,AD: Electrophysiological characterisation of the human N-type Ca^{2+} channel III: pH-dependent inhibition by a synthetic macrocyclic polyamine. *Neuropharmacology* 38:19-38, 1999
11. Castellano,A, Perez-Reyes,E: Molecular diversity of Ca^{2+} channel β subunits. *Biochem.Soc.Trans.* 22:483-488, 1994
12. Trimmer,JS: Regulation of ion channel expression by cytoplasmic subunits. *Curr.Opin.Neurobiol.* 8:370-374, 1998
13. Bichet,D, Cornet,V, Geib,S, Carlier,E, Volsen,S, Hoshi,T, Mori,Y, De Waard,M: The I-II loop of the Ca^{2+} channel $\alpha 1$ subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the β subunit. *Neuron* 25:177-190, 2000

14. De Waard,M, Pragnell,M, Campbell,KP: Ca²⁺ channel regulation by a conserved β subunit domain. *Neuron* 13:495-503, 1994
15. De Waard,M, Witcher,DR, Pragnell,M, Liu,H, Campbell,KP: Properties of the α_1 - β anchoring site in voltage-dependent Ca²⁺ channels. *J.Biol.Chem.* 270:12056-12064, 1995
16. Pragnell,M, De Waard,M, Mori,Y, Tanabe,T, Snutch,TP, Campbell,KP: Calcium channel β -subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the α_1 -subunit. *Nature* 368:67-70, 1994
17. Qin,N, Platano,D, Olcese,R, Stefani,E, Birnbaumer,L: Direct interaction of G β gamma with a C-terminal G β gamma-binding domain of the Ca²⁺ channel α_1 subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94:8866-8871, 1997
18. Stephens,GJ, Page,KM, Bogdanov,Y, Dolphin,AC: The alpha1B Ca²⁺ channel amino terminus contributes determinants for beta subunit-mediated voltage-dependent inactivation properties. *J.Physiol* 525 Pt 2:377-390, 2000
19. Walker,D, Bichet,D, Geib,S, Mori,E, Cornet,V, Snutch,TP, Mori,Y, De Waard,M: A new beta subtype-specific interaction in alpha1A subunit controls P/Q-type Ca²⁺ channel activation. *J.Biol.Chem.* 274:12383-12390, 1999
20. Birnbaumer,L, Qin,N, Olcese,R, Tareilus,E, Platano,D, Costantin,J, Stefani,E: Structures and functions of calcium channel beta subunits. *J.Bioenerg.Biomembr.* 30:357-375, 1998
21. Gurnett,CA, De Waard,M, Campbell,KP: Dual function of the voltage-dependent Ca²⁺ channel $\alpha_2\delta$ subunit in current stimulation and subunit interaction. *Neuron* 16:431-440, 1996
22. Hofmann,F, Lacinova,L, Klugbauer,N: Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* 139:33-87, 1999
23. Gurnett,CA, Felix,R, Campbell,KP: Extracellular interaction of the voltage-dependent Ca²⁺ channel $\alpha_2\delta$ and α_1 subunits. *J.Biol.Chem.* 272:18508-18512, 1997
24. DeJongh,KS, Warner,C, Catterall,WA: Subunits of purified calcium channels. α_2 and δ are encoded by the same gene. *J.Biol.Chem.* 265:14738-14741, 1990
25. Felix,R, Gurnett,CA, De Waard,M, Campbell,KP: Dissection of functional domains of the voltage-dependent Ca²⁺ channel $\alpha_2\delta$ subunit. *J.Neurosci.* 17:6884-6891, 1997
26. Hobom,M, Dai,S, Marais,E, Lacinova,L, Hofmann,F, Klugbauer,N: Neuronal distribution and functional characterization of the calcium channel alpha2delta-2 subunit. *Eur.J.Neurosci.* 12:1217-1226, 2000

27. Gao, B., Sekido, Y., Maximov, A., Saad, M., Forgacs, E., Latif, F., Wie, M. H., Lerman, M., Lee, J. H., Perez-Reyes, E., and Bezprozvanny, I., Minna, J. D. Functional properties of a new voltage-dependent calcium channel $\alpha_2\delta$ auxiliary subunit gene (CACNA2D2). *J. Biol. Chem.* 275: 12317-12242, 2000.
28. Bosse, E., Regulla, S., Biel, M., Ruth, P., Meyer, H. E., Flockerzi, V., Hofmann, F.: The cDNA and deduced amino acid sequence of the gamma subunit of the L-type calcium channel from rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett.* 267:153-156, 1990
29. Klugbauer, N., Specht, V., Lacinova, L., Dai, S., Marais, E., Bohn, G., Hofmann, F. A family of calcium channel gamma subunits. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of pharmacology Suppl* 361/4. 2000.
30. Freise, D., Held, B., Wissenbach, U., Pfeifer, A., Trost, C., Himmerkus, N., Schweig, U., Freichel, M., Biel, M., Hofmann, F., Hoth, M., Flockerzi, V.: Absence of the gamma subunit of the skeletal muscle dihydropyridine receptor increases L-type Ca^{2+} currents and alters channel inactivation properties. *J. Biol. Chem.* 275:14476-14481, 2000
31. Triggle, D. J.: The pharmacology of ion channels: with particular reference to voltage-gated Ca^{2+} channels. *Eur. J. Pharmacol.* 375:311-325, 1999
32. Katz, A. M.: Molecular basis of calcium channel blockade. *Am. J. Cardiol.* 69:17E-22E, 1992
33. Seisenberger, C., Welling, A., Pfeifer, A., Klugbauer, N., Hofmann, F.: Disruption of the calcium channel α_1C -Gene by gene targeting show a beating heart later than day 9.5 p.c. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 359:R66, 1999
34. Williams, M. E., Feldman, D. H., McCue, A. F., Brenner, R., Velicelebi, G., Ellis, S. B., Harpold, M. M.: Structure and functional expression of α_1 , α_2 , and β subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* 8:71-84, 1992
35. Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H., Striessnig, J. Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type calcium channels. *Cell* 102, 89-97. 7-7-2000.
36. Strom, T. M., Nyakatura, G., Apfelstedt-Sylla, E., Hellebrand, H., Lorenz, B., Weber, B. H. F., Wutz, K., Gutwillinger, N., Rütger, K., Drescher, B., Sauer, C., Zrenner, E., Meitinger, T., Rosenthal, A., Meindl, A.: An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nature Genet.* 19:260-263, 1998
37. Bech-Hansen, N. T., Naylor, M. J., Maybaum, T. A., Pearce, W. G., Koop, B., Fishman, G. A., Mets, M., Musarella, M. A., Scott, K. M.: Loss-of-function mutations in a calcium-channel α_1 -subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nature Genet.* 19:264-267, 1998
38. Witcher, D. R., De Waard, M., Campbell, K. P.: Characterization of the purified N-type Ca^{2+} channel and the cation sensitivity of omega-conotoxin GVIA binding. *Neuropharmacology* 32:1127-1139, 1993

39. Catterall,WA: Structure and function of neuronal Ca^{2+} channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium* 24:307-323, 1998
40. Schneider,T: Biochemie spannungsabhängiger Calciumkanäle *Habilitation*, 1994
41. Llinas,R, Sugimori,M, Lin,JW, Cherksey,B: Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:1689-1693, 1989
42. Hans,M, Urrutia,A, Deal,C, Brust,PF, Stauderman,K, Ellis,SB, Harpold,MM, Johnson,EC, Williams,ME: Structural elements in domain IV that influence biophysical and pharmacological properties of human α_{1A} -containing high-voltage- activated calcium channels. *Biophys.J.* 76:1384-1400, 1999
43. Rettig,J, Sheng,ZH, Kim,DK, Hodson,CD, Snutch,TP, Catterall,WA: Isoform-specific interaction of the α_{1A} subunits of brain Ca^{2+} channels with the presynaptic proteins syntaxin and SNAP-25. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93:7363-7368, 1996
44. Wu,LG, Westenbroek,RE, Borst,JG, Catterall,WA, Sakmann,B: Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single calyx-type synapses. *J.Neurosci.* 19:726-736, 1999
45. Cooper, EC, Jan, LY: Ion channel genes and human neurological disease: Recent progress, prospects, and challenges. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:4759-4766, 1999
46. Chuang,RSI, Jaffe,H, Cribbs,LL, Perez-Reyes,E, Swartz,KJ: Identification of an inhibitor of T-type calcium channels. *Soc.Neurosci.Abstr.* 24:22, 1998
47. Lee,JH, Gomora,JC, Cribbs,LL, Perez-Reyes,E: Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block alpha1H. *Biophys.J.* 77:3034-3042, 1999
48. Gu,X, Spitzer,NC: Low-Threshold Ca^{2+} Current and Its Role in Spontaneous Elevations of Intracellular Ca^{2+} in Developing *Xenopus* Neurons. *The Journal of Neuroscience* 13:4936-4948, 1993
49. Perez-Reyes,E: Three for T: molecular analysis of the low voltage-activated calcium channel family. *Cell Mol.Life Sci.* 56:660-669, 1999
50. Perez-Reyes,E, Lee,JH, Cribbs,LL: Molecular characterization of two members of the T-type calcium channel family. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 868:131-143, 1999
51. Destexhe,A, Neubig,M, Ulrich,D, Huguenard,J: Dendritic Low-Threshold Calcium Currents in Thalamic Relay Cells. *J.Neurosci.* 18:3574-3588, 1998
52. Kim,D, Song,I, Keum,S, Lee,T, Jeong,M, Kim,S, McEnery,MW, Shin,H: Lack of the Burst Firing of Thalamocortical Relay Neurons and Resistance to Absence Seizures in Mice Lacking alpha(1G) T-Type Ca^{2+} Channels. *Neuron* 31:35-45, 2001

53. Zhang,J-F, Randall,AD, Ellinor,PT, Horne,WA, Sather,WA, Tanabe,T, Schwarz,TL, Tsien,RW: Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca²⁺ channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* 32:1075-1088, 1993
54. Tottene,A, Moretti,A, Pietrobon,D: Functional Diversity of P-Type and R-Type Calcium Channels in Rat Cerebellar Neurons. *J.Neurosci.* 16:6353-6363, 1996
55. De Waard M, Gurnett CA, Campbell KP: Structural and Functional Diversity of Voltage-Activated Calcium Channels. In *Ion Channels 4*. Narahashi T, Ed. New York, Plenum Press, 1996, p. 41-87
56. Soong,TW, Stea,A, Hodson,CD, Dubel,SJ, Vincent,SR, Snutch,TP: Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science* 260:1133-1136, 1993
57. Bourinet,E, Zamponi,GW, Stea,A, Soong,TW, Lewis,BA, Jones,LP, Yue,DT, Snutch,TP: The α_{1E} calcium channel exhibits permeation properties similar to low-voltage-activated calcium channels. *J.Neurosci.* 16:4983-4993, 1996
58. Stephens,GJ, Page,KM, Burley,JR, Berrow,NS, Dolphin,AC: Functional expression at rat brain cloned α_{1E} calcium channels in COS-7 cells. *Pflugers Arch.* 433:523-532, 1997
59. Sabatini,BL, Svoboda,K: Analysis of calcium channels in single spines using optical fluctuation analysis. *Nature* 408:589-593, 2000
60. Kavalali,ET, Zhuo,M, Bito,H, Tsien,RW: Dendritic Ca²⁺ channels characterized by recordings from isolated hippocampal dendritic segments. *Neuron* 18:651-663, 1997
61. Wang,G, Dayanithi,G, Newcomb,R, Lemos,JR: An R-type Ca(2+) current in neurohypophysial terminals preferentially regulates oxytocin secretion. *J.Neurosci.* 19:9235-9241, 1999
62. Albillos,A, Neher,E, Moser,T: R-Type Ca²⁺ channels are coupled to the rapid component of secretion in mouse adrenal slice chromaffin cells. *J.Neurosci.* 20:8323-8330, 2000
63. Williams,ME, Marubio,LM, Deal,CR, Hans,M, Brust,PF, Philipson,LH, Miller,RJ, Johnson,EC, Harpold,MM, Ellis,SB: Structure and functional characterization of neuronal α_{1E} calcium channel subtypes. *J.Biol.Chem.* 269:22347-22357, 1994
64. Piedras-Renteria,ES, Chen,CC, Best,PM: Antisense oligonucleotides against rat brain alpha1E DNA and its atrial homologue decrease T-type calcium current in atrial myocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94:14936-14941, 1997
65. Marubio,LM, Rönfeld,M, Dasgupta,S, Miller,RJ, Philipson,LH: Isoform Expression of the Voltage-Dependent Calcium Channel α_{1E} . *Receptors & Channels* 4:243-251, 1996

66. Saegusa,H, Kurihara,T, Zong,S, Minowa,O, Kazuno,A, Han,W, Matsuda,Y, Yamanaka,H, Osanai,M, Noda,T, Tanabe,T: Altered pain responses in mice lacking alpha 1E subunit of the voltage- dependent Ca²⁺ channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:6132-6137, 2000
67. Kubota,M, Murakoshi,T, Saegusa,H, Kazuno,A, Zong,S, Hu,Q, Noda,T, Tanabe,T: Intact LTP and fear memory but impaired spatial memory in mice lacking Ca(v)2.3 (alpha(1E)) channel. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 282:242-248, 2001
68. Tottene,A, Volsen,S, Pietrobon,D: alpha(1E) subunits form the pore of three cerebellar R-type calcium channels with different pharmacological and permeation properties. *J.Neurosci.* 20:171-178, 2000
69. Sochivko, D., Pereverzev, A., Smyth, N., Gissel, C., Yaari, Y., Schneider, T. and Beck, H. The $\alpha 1E$ Ca²⁺ channel subunits underlies R-type Ca²⁺ currents in hippocampal and cortical pyramidal neurons, *submitted*
70. Pietrobon,D, Hess,P: Novel mechanism of voltage-dependent gating in L-type calcium channels. *Nature* 346:651-655, 1990
71. Haase,H, Bartel,S, Karczewski,P, Morano,I, Krause,EG: *In-vivo* phosphorylation of the cardiac L-type calcium channel beta-subunit in response to catecholamines. *Mol.Cell.Biochem.* 164:99-106, 1996
72. Shistik,E, Ivanina,T, Blumenstein,Y, Dascal,N: Crucial role of N terminus in function of cardiac L-type Ca²⁺ channel and its modulation by protein kinase C. *J.Biol.Chem.* 273:17901-17909, 1998
73. Davare,MA, Avdonin,V, Hall,DD, Peden,EM, Burette,A, Weinberg,RJ, Horne,MC, Hoshi,T, Hell,JW: A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca²⁺ channel Cav1.2. *Science* 293:98-101, 2001
74. Bean,BP: Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* 340:153-156, 1989
75. Wittinghofer,A, Gierschik,P: Highlight: GTP binding proteins: central regulators in cell biology. *Biol.Chem.* 381:355, 2000
76. Page KM, Stephens GJ, Cantí C, Berrow NS, Dolphin AC: Role of Domain I of the $\alpha 1B$ Ca²⁺ Channel Subunit in G Protein Modulation (Abstract). *Biophys.J.* 74, 1998
77. Page,KM, Cantí,C, Stephens,GJ, Berrow,NS, Dolphin,AC: Identification of the amino terminus of neuronal Ca²⁺ channel $\alpha 1$ subunits $\alpha 1B$ and $\alpha 1E$ as an essential determinant of G-protein modulation. *J.Neurosci.* 18:4815-4824, 1998
78. Meir,A, Bell,DC, Stephens,GJ, Page,KM, Dolphin,AC: Calcium channel beta subunit promotes voltage-dependent modulation of alpha 1 B by G beta gamma. *Biophys.J.* 79:731-746, 2000

79. Furukawa,T, Miura,R, Mori,Y, Strobeck,M, Suzuki,K, Ogihara,Y, Asano,T, Morishita,R, Hashii,M, Higashida,H, Yoshii,M, Nukada,T: Differential interactions of the C terminus and the cytoplasmic I-II loop of neuronal Ca²⁺ channels with G-protein α and β gamma subunits - II. Evidence for direct binding. *J.Biol.Chem.* 273:17595-17603, 1998
80. Furukawa,T, Nukada,T, Mori,Y, Wakamori,M, Fujita,Y, Ishida,H, Fukuda,K, Kato,S, Yoshii,M: Differential interactions of the C terminus and the cytoplasmic I-II loop of neuronal Ca²⁺ channels with G-protein α and β gamma subunits - I. Molecular determination. *J.Biol.Chem.* 273:17585-17594, 1998
81. Melliti,K, Meza,U, Fisher,R, Adams,B: Regulators of G protein signaling attenuate the G protein-mediated inhibition of N-type Ca channels. *J.Gen.Physiol.* 113:97-109, 1999
82. Meza,U, Bannister,R, Melliti,K, Adams,B: Biphasic, opposing modulation of cloned neuronal alpha1E Ca channels by distinct signaling pathways coupled to M2 muscarinic acetylcholine receptors. *J.Neurosci.* 19:6806-6817, 1999
83. Swartz,KJ: Modulation of Ca²⁺ channels by protein kinase C in rat central and peripheral neurons: disruption of G protein-mediated inhibition. *Neuron* 11:305-320, 1993
84. Stea,A, Soong,TW, Snutch,TP: Determinants of PKC-Dependent modulation of a family of neuronal calcium channels. *Neuron* 15:929-940, 1995
85. Schuhmann,K, Groschner,K: Protein kinase-C mediates dual modulation of L-type Ca²⁺ channels in human vascular smooth muscle. *FEBS Lett.* 341:208-212, 1994
86. Hamid,J, Nelson,D, Spaetgens,R, Dubel,SJ, Snutch,TP, Zamponi,GW: Identification of an integration center for cross-talk between protein kinase C and G protein modulation of N-type calcium channels. *J.Biol.Chem.* 274:6195-6202, 1999
87. Zamponi,GW, Bourinet,E, Nelson,D, Nargeot,J, Snutch,TP: Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel α 1 subunit. *Nature* 385:442-446, 1997
88. Lang,J: Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur.J.Biochem.* 259:3-17, 1999
89. Juntti-Berggren,L, Larsson,O, Rorsman,P, Ämmälä,C, Bokvist,K, Wåhlander,K, Nicotera,P, Dypbukt,J, Orrenius,S, Hallberg,A, Berggren,P-O: Increased Activity of L-type Ca²⁺ Channels Exposed to Serum from Patients with Type I Diabetes. *Science* 261:86-90, 1993
90. Creutzfeldt,W, Nauck,M: Gut hormones and diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev.* 8:149-177, 1992
91. Ding,WG, Renstrom,E, Rorsman,P, Buschard,K, Gromada,J: Glucagon-like peptide I and glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulate Ca²⁺-induced secretion in rat alpha-cells by a protein kinase A-mediated mechanism. *Diabetes* 46:792-800, 1997

92. Ashcroft,FM, Proks,P, Smith,PA, Åmmälä,C, Bokvist,K, Rorsman,P: Stimulus-secretion coupling in pancreatic β cells. *J.Cell.Biochem.* 55 Suppl.:54-65, 1994
93. Ammala,C, Eliasson,L, Bokvist,K, Larsson,O, Ashcroft,FM, Rorsman,P: Exocytosis elicited by action potentials and voltage-clamp calcium currents in individual mouse pancreatic B-cells. *J.Physiol* 472:665-688, 1993
94. Maechler,P, Kennedy,ED, Sebo,E, Valeva,A, Pozzan,T, Wollheim,CB: Secretagogues modulate the calcium concentration in the endoplasmic reticulum of insulin-secreting cells. Studies in aequorin-expressing intact and permeabilized ins-1 cells. *J.Biol.Chem.* 274:12583-12592, 1999
95. Holz,GG, Leech,CA, Heller,RS, Castonguay,M, Habener,JF: cAMP-dependent mobilization of intracellular Ca^{2+} stores by activation of ryanodine receptors in pancreatic beta-cells. A Ca^{2+} signaling system stimulated by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1- (7-37). *J.Biol.Chem.* 274:14147-14156, 1999
96. Satin,LS: Localized calcium influx in pancreatic beta-cells: its significance for Ca^{2+} -dependent insulin secretion from the islets of Langerhans. *Endocrine.* 13:251-262, 2000
97. Ashcroft, FM, Rorsman, P: Electrophysiology of pancreatic islet cells, in: Scherübl, H, Hescheler, J, : The electrophysiology of neuroendocrine cells. *CRC Press Inc.*, 207-246, 1996
98. Wollheim,CB, Meda,P, Halban,PA: Isolation of pancreatic islets and primary culture of the intact microorgans or of dispersed islet cells. *Methods Enzymol.* 192:188-223, 1990
99. Arnhold,S, Andressen,C, Angelov,DN, Vajna,R, Volsen,SG, Hescheler,J, Addicks,K: Embryonic stem-cell derived neurones express a maturation dependent pattern of voltage-gated calcium channels and calcium-binding proteins. *Int.J.Dev.Neurosci.* 18:201-212, 2000
100. Bain,G, Kitchens,D, Yao,M, Huettner,JE, Gottlieb,DI: Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev.Biol.* 168:342-357, 1995
101. Strubing,C, Rohwedel,J, Ahnert-Hilger,G, Wiedenmann,B, Hescheler,J, Wobus,AM: Development of G protein-mediated Ca^{2+} channel regulation in mouse embryonic stem cell-derived neurons. *Eur.J.Neurosci.* 9:824-832, 1997
102. Doetschman,TC, Eistetter,H, Katz,M, Schmidt,W, Kemler,R: The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J.Embryol.Exp.Morphol.* 87:27-45, 1985
103. Kolossov,E, Fleischmann,BK, Liu,Q, Bloch,W, Viatchenko-Karpinski,S, Manzke,O, Ji,GJ, Bohlen,H, Addicks,K, Hescheler,J: Functional characteristics of ES cell-derived cardiac precursor cells identified by tissue-specific expression of the green fluorescent protein. *J. Cell Biol.* 143:2045-2056, 1998
104. Pereverzev,A, Mikhna,M, Vajna,R, Gissel,C, Weiergräber,M, Henry,M, Hescheler,J, Smyth,N, Schneider,T: Glucose-tolerance, insulin-release and stress-induced hyperglycemia are altered

besides neuronal functions upon disruption of the Ca_v2.3 (α1E) subunit of voltage-gated calcium channels; *Mol. Endocrinology*, in press.

105. Gu,H, Marth,JD, Orban,PC, Mossmann,H, Rajewsky,K: Deletion of a DNA Polymerase β Gene Segment in T Cells using Cell Type-Specific Gene Targeting. *Science* 265:103-106, 1994
106. Hanahan,D: Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J.Mol.Biol.* 166:557-580, 1983
107. Chomczynski,P, Sacchi,N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 162:156-159, 1987
108. Birnboim,HC, Doly,J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523, 1979
109. Hartley,JL, Donelson,JE: Nucleotide sequence of the yeast plasmid. *Nature* 286:860-865, 1980
110. Sambrook J, Russell DW: Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, 2001
111. Southern,E: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* 98:503-517, 1975
112. Saiki,RK, Gelfand,DH, Stoffel,S, Scharf,SJ, Higuchi,R, Horn,GT, Mullis,KB, Erlich,HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491, 1988
113. Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Rossier J: Patch-Clamp Recording and RT-PCR on Single Cells. In *Neuromethods*, Vol. 26: Patch-Clamp Applications and Protocols. Boulton A, Baker G, Walz W, Eds. Totowa, New Jersey, Humana Press Inc., 1995, p. 193-231
114. Damm,K, Thompson,CC, Evans,RM: Protein encoded by v-erbA functions as a thyroid-hormone receptor antagonist. *Nature* 339:593-597, 1989
115. Lowry,OH, Rosebrough,NJ, Farr,L, Randall,RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 1951
116. Bradford,MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72:248-254, 1976
117. Laemmli,UK: Cleavage of structural proteins duuring the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970

118. Schneider,T, Wei,X, Olcese,R, Costantin,JL, Neely,A, Palade,P, Perez-Reyes,E, Qin,N, Zhou,J, Crawford,GD, .: Molecular analysis and functional expression of the human type E neuronal Ca²⁺ channel alpha 1 subunit. *Receptors.Channels* 2:255-270, 1994
119. Merrifield,B: Solid phase synthesis. *Science* 232:241-247, 1986
120. Pereverzev,A, Klockner,U, Henry,M, Grabsch,H, Vajna,R, Olyschlager,S, Viatchenko-Karpinski,S, Schroder,R, Hescheler,J, Schneider,T: Structural diversity of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha1E- subunit. *Eur.J.Neurosci.* 10:916-925, 1998
121. Lacy,PE, Kostianovsky,M: Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16:35-39, 1967
122. Ullrich,S, Abel,K-B, Lehr,S, Greger,R: Effects of glucose, forskolin and tolbutamide on membrane potential and insulin secretion in the insulin-secreting cell line INS-1. *Eur.J.Physiol.* 432:630-636, 1996
123. Abel,K-B, Lehr,S, Ullrich,S: Adrenaline-, not somatostatin-induced hyperpolarization is accompanied by a sustained inhibition of insulin secretion in INS-1 cells. Activation of sulphonylurea K+ATP channels is not involved. *Eur.J.Physiol.* 432:89-96, 1996
124. Randall,A, Tsien,RW: Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel XX currents in rat cerebellar granule neurons. *J.Neurosci.* 15:2995-3012, 1995
125. Randall,AD, Tsien,RW: Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacology* 36:879-893, 1997
126. Niidome,T, Kim,M-S, Friedrich,T, Mori,Y: Molecular cloning and characterization of a novel calcium channel from rabbit brain. *FEBS Lett.* 308:7-13, 1992
127. Wei,XY, Pan,S, Lang,WH, Kim,HY, Schneider,T, Perez-Reyes,E, Birnbaumer,L: Molecular determinants of cardiac Ca²⁺ channel pharmacology - Subunit requirement for the high affinity and allosteric regulation of dihydropyridine binding. *J.Biol.Chem.* 270:27106-27111, 1995
128. Vajna,R, Schramm,M, Pereverzev,A, Arnhold,S, Grabsch,H, Klockner,U, Perez-Reyes,E, Hescheler,J, Schneider,T: New isoform of the neuronal Ca²⁺ channel alpha1E subunit in islets of Langerhans and kidney--distribution of voltage-gated Ca²⁺ channel alpha1 subunits in cell lines and tissues. *Eur.J.Biochem.* 257:274-285, 1998
129. Weiergräber,M, Henry,M, Pereverzev,A, Schramm,M, Grabsch,H, Nastainczyk,W, Perez-Reyes,E, Schneider,T: Detection of α 1E voltage-gated Ca²⁺ channels by peptide-directed antibodies in rat heart and human kidney. *In Vorbereitung*
130. Wilson,SM, Toth,PT, Oh,SB, Gillard,SE, Volsen,S, Ren,D, Philipson,LH, Lee,EC, Fletcher,CF, Tessarollo,L, Copeland,NG, Jenkins,NA, Miller,RJ: The status of voltage-dependent calcium channels in alpha 1E knock-out mice. *J.Neurosci.* 20:8566-8571, 2000

131. Regazzi,R, Ullrich,S, Kahn,RA, Wollheim,CB: Redistribution of ADP-ribosylation factor during stimulation of permeabilized cells with GTP analogues. *Biochem.J.* 275 (Pt 3):639-644, 1991
132. Flockerzi,V, Oeken,HJ, Hofmann,F: Purification of a functional receptor for calcium-channel blockers from rabbit skeletal-muscle microsomes. *Eur.J.Biochem.* 161:217-224, 1986
133. Wang,KK, Posner,A, Hajimohammadreza,I: Total protein extraction from cultured cells for use in electrophoresis and western blotting. *Biotechniques* 20:662-668, 1996
134. Cameron,A, Appel,J, Houghten,RA, Lindberg,I: Polyarginines are potent furin inhibitors. *J.Biol.Chem.* 275:36741-36749, 2000
135. Cameron,A, Fortenberry,Y, Lindberg,I: The SAAS granin exhibits structural and functional homology to 7B2 and contains a highly potent hexapeptide inhibitor of PC1. *FEBS Lett.* 473:135-138, 2000
136. Kennedy,ED, Rizzuto,R, Theler,J-M, Pralong,W-F, Bastianutto,C, Pozzan,T, Wollheim,CB: Glucose-stimulated Insulin Secretion Correlates with Changes in Mitochondrial and Cytosolic Ca²⁺ in Aequorin-expressing INS-1 Cells. *J.Clin.Invest.* 98:2524-2538, 1996
137. Maechler,P, Wollheim,CB: Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature* 402:685-689, 1999
138. Asfari,M, Janjic,D, Med,P, Li,G, Halban,PA, Wollheim,CB: Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130:167-178, 1992
139. Newcomb,R, Szoke,B, Palma,A, Wang,G, Chen,X, Hopkins,W, Cong,R, Miller,J, Urge,L, Tarczy-Hornoch,K, Loo,JA, Dooley,DJ, Nadasdi,L, Tsien,RW, Lemos,J, Miljanich,G: Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hystero-crates gigas*. *Biochemistry* 37:15353-15362, 1998
140. Bourinet,E, Stotz,SC, Spaetgens,RL, Dayanithi,G, Lemos,J, Nargeot,J, Zamponi,GW: Interaction of SNX482 with Domains III and IV Inhibits Activation Gating of alpha(1E) (Ca(V)2.3) Calcium Channels. *Biophys.J.* 81:79-88, 2001
141. Sekine,N, Fasolato,C, Pralong,WF, Theler,J-M, Wollheim,CB: Glucose-Induced Insulin Secretion in INS-1 Cells depends on Factors Present in Fetal Calf Serum and Rat Islet-Conditioned Medium. *Diabetes* 46:1424-1433, 1997
142. Satin,LS, Tavalin,SJ, Kinard,TA, Teague,J: Contribution of L-and non-L-type calcium channels to voltage-gated calcium current and Glucose-Dependent Insulin secretion in HIT-T15 cells. *Endocrinology* 136:4589-4601, 1995
143. Smith,PA, Ashcroft,FM, Fewtrell,CMS: Permeation and gating properties of the L-type calcium channel in mouse pancreatic β cells. *J.Gen.Physiol.* 101:767-797, 1993

144. Ligon,B, Boyd,AE, III, Dunlap,K: Class A calcium channel variants in pancreatic islets and their role in insulin secretion. *J.Biol.Chem.* 273:13905-13911, 1998
145. Horvath,A, Szabadkai,G, Varnai,P, Aranyi,T, Wollheim,CB, Spat,A, Enyedi,P: Voltage dependent calcium channels in adrenal glomerulosa cells and in insulin producing cells. *Cell Calcium* 23:33-42, 1998
146. Frodin,M, Sekine,N, Roche,E, Filloux,C, Prentki,M, Wollheim,CB, Van Obberghen,E: Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen- activated protein kinase in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1. *J.Biol.Chem.* 270:7882-7889, 1995
147. De Waard,M, Liu,H, Walker,D, Scott,VES, Gurnett,CA, Campbell,KP: Direct binding of G-protein β gamma complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature* 385:446-450, 1997
148. Garcia,DE, Li,B, García-Ferreiro,RE, Hernández-Ochoa,EO, Yan,K, Gautam,N, Catterall,WA, Mackie,K, Hille,B: G-Protein β -Subunit Specificity in the Fast Membrane-Delimited Inhibition of Ca^{2+} Channels. *J.Neurosci.* 18:9163-9170, 1998
149. Zamponi,GW, Snutch,TP: Decay of prepulse facilitation of N type calcium channels during G protein inhibition is consistent with binding of a single $G_{\beta\gamma}$ subunit. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95:4035-4039, 1998
150. Doerner,D, Abdel-Latif,M, Rogers,TB, Alger,BE: Protein kinase C-dependent and - independent effects of phorbol esters on hippocampal calcium channel current. *J.Neurosci.* 10:1699-1706, 1990
151. Ophoff,RA, Terwindt,GM, Vergouwe,MN, van Eijk,R, Oefner,PJ, Hoffmann,SMG, Lamerdin,JE, Mhrenweiser,HW, Bulman,DE, Ferrari,M, Haan,J, Lindhout,D, van Ommen,G-JB, Hofker,MH, Ferrai,MD, Frants,RR: Familial Hemiplegic Migraine and Episodic Ataxia Type-2 Are Caused by Mutations in the Ca^{2+} Channel Gene CACNL1A4. *Cell* 87:543-552, 1996
152. Page,KM, Stephens,GJ, Berrow,NS, Dolphin,AC: The intracellular loop between domains I and II of the B- type calcium channel confers aspects of G-protein sensitivity to the E-type calcium channel. *J.Neurosci.* 17:1330-1338, 1997
153. Hsu,WH, Xiang,HD, Rajan,AS, Kunze,DL, Boyd,AE, III: Somatostatin inhibits insulin secretion by a G-protein-mediated decrease in Ca^{2+} entry through voltage-dependent Ca^{2+} channels in the beta cell. *J.Biol.Chem.* 266:837-843, 1991
154. Bourinet,E, Soong,TW, Sutton,K, Slaymaker,S, Mathews,E, Monteil,A, Zamponi,GW, Nargeot,J, Snutch,TP: Splicing of $\alpha 1A$ subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nature Neurosci.* 2:407-415, 1999
155. Pan,JQ, Lipscombe,D: Alternative splicing in the cytoplasmic II-III loop of the N-type Ca channel alpha 1B subunit: functional differences are beta subunit- specific. *J.Neurosci.* 20:4769-4775, 2000

156. Schramm,M, Vajna,R, Pereverzev,A, Tottene,A, Klöckner,U, Pietrobon,D, Hescheler,J, Schneider,T: Isoforms of α 1E voltage-gated calcium channels in rat cerebellar granule cells - Detection of major calcium channel α 1-transcripts by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Neuroscience* 92:565-575, 1999
157. Grabsch,H, Pereverzev,A, Weiergräber,M, Schramm,M, Henry,M, Vajna,R, Beattie,RE, Volzen,SG, Klöckner,U, Hescheler,J, Schneider,T: Immunohistochemical detection of α 1E voltage-gated Ca^{2+} channel isoforms in cerebellum, INS-1 cells, and neuroendocrine cells of the digestive system. *J.Histochem.Cytochem.* 47:in press, 1999
158. Bokvist,K, Eliasson,L, Ammala,C, Renstrom,E, Rorsman,P: Co-localization of L-type Ca^{2+} channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *EMBO J.* 14:50-57, 1995
159. Joux,N, Chevalyre,V, Alonso,G, Boissin-Agasse,L, Moos,FC, Desarmenien,MG, Hussy,N: High voltage-activated Ca^{2+} currents in rat supraoptic neurones: biophysical properties and expression of the various channel alpha1 subunits. *J.Neuroendocrinol.* 13:638-649, 2001
160. Gilon,P, Yakel,J, Gromada,J, Zhu,Y, Henquin,JC, Rorsman,P: G protein-dependent inhibition of L-type Ca^{2+} currents by acetylcholine in mouse pancreatic B-cells. *J.Physiol* 499 (Pt 1):65-76, 1997
161. Zawalich,WS, Zawalich,KC: Regulation of insulin secretion by phospholipase C. *Am.J.Physiol.* 271:E409-E416, 1996
162. Gromada,J, Holst,JJ, Rorsman,P: Cellular regulation of islet hormone secretion by the incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Pflugers Arch.* 435:583-594, 1998
163. Mehrke,G, Pereverzev,A, Grabsch,H, Hescheler,J, Schneider,T: Receptor Mediated Modulation of Recombinant Neuronal Class E Calcium Channels. *FEBS Lett.* 408:261-270, 1997
164. Guy,HR, Seetharamulu,P: Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 83:508-512, 1986
165. Doyle,DA, Cabral,JM, Pfuetzner,RA, Kuo,AL, Gulbis,JM, Cohen,SL, Chait,BT, MacKinnon,R: The structure of the potassium channel: Molecular basis of K^{+} conduction and selectivity. *Science* 280:69-77, 1998
166. Peterson,BZ, DeMaria,CD, Yue,DT: Calmodulin is the Ca^{2+} sensor for Ca^{2+} -dependent inactivation of 1-type calcium channels. *Neuron* 22:549-558, 1999
167. Proks,P, Eliasson,L, Ammala,C, Rorsman,P, Ashcroft,FM: Ca^{2+} - and GTP-dependent exocytosis in mouse pancreatic beta-cells involves both common and distinct steps. *J.Physiol* 496 (Pt 1):255-264, 1996
168. Xu,W, Lipscombe,D: Neuronal $\text{Ca}(\text{V})1.3\alpha(1)$ L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J.Neurosci.* 21:5944-5951, 2001

6.4 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Hescheler für die freundliche und kenntnisreiche Unterstützung meiner Aufgabe herzlichst bedanken. Des weiteren gilt mein Dank besonders dem stellvertretenden Doktorvater Prof. Dr. H.-W. Klein, der mir vorurteilsfrei die vollste Unterstützung zukommen ließ.

Die vorliegende Arbeit ist das Resultat einer Zusammenarbeit mit Dr. Alexej Pereverzev aus meiner Arbeitsgruppe unter der Leitung von Prof. Dr. Toni Schneider und Prof. Dr. Udo Klöckner vom Institut für vegetative Physiologie der Universität Köln und nur dank ihres Arbeitseinsatzes sowie ihrer unermüdlichen Diskussionsbereitschaft entstanden.

Durch Dr. Pereverzev wurden alle Zellkulturarbeiten mit größtmöglicher Reinheit und Qualität unter außerordentlichem Arbeitseinsatz durchgeführt; daneben sind ihm (und Frau Dipl. Biol. Conny Gissel) auch die geninaktivierten Mauslinien zu verdanken.

Alle notwendigen elektrophysiologischen Untersuchungen wurden freundlicherweise von Prof. Klöckner durchgeführt. Seiner Messfertigkeit ist es zu verdanken, dass die schwierige Reststromanalyse in HEK293- und INS-1-Zellen zur größten Zufriedenheit erledigt wurde.

Da Prof. Schneider mich trotz widriger Umstände ohne Zögern in seine Arbeitsgruppe aufnahm, bin ich ihm vor allem anderen zu Dank verpflichtet. Seine stets faire und nachsichtige Führungsweise sowie sein Bestreben, alle verwaltungs- und publikationstechnischen Probleme zu übernehmen, ließen mir die Möglichkeit, meine Zeit ausschließlich der Doktorarbeit zu widmen.

Die technischen Assistentinnen meiner Arbeitsgruppe, Renate Clemens, Susanne Schulze und Dipl. Biol. Margit Henry verdienen meine höchste Anerkennung, nicht nur, weil sie mir bei den arbeitsintensiven Vor- und Nachbereitungen der Experimente unermüdlich zur Seite standen, sondern auch, weil sie meine Anwesenheit im Labor ertragen durften.

Ferner möchte ich PD Dr. Susanne Ullrich und ihrer Arbeitsgruppe für ihre präzise und kenntnisreiche Einführung in Theorie und Praxis der Insulinsekretion danken.

Überhaupt gebührt den Angestellten des Instituts für Neurophysiologie meine Anerkennung, da sie mich bereitwillig in ihrer Mitte aufnahmen und mit Rat und Tat zur Seite standen. An diese Stelle möchte ich Dr. Marina Mikhna, die mir bei den Insulinmessungen zur Seite stand, Anne Helmbold, die alle Sekretariatsaufgaben übernahm sowie Ilona Borsos und Emma Tonn aus der Spülküche besonders erwähnen.

Im Rahmen der Korrekturen dieser Arbeit danke ich Dr. Kathrin Banach für ihren langen Atem und Dipl. Biol. Martin Roesler für seinen Humor.

6.5 Publikationen

Veröffentlichungen im Rahmen der Doktorarbeit

Vajna, R., Schramm, M., Pereverzev, A., Arnhold, S., Grabsch, H., Klöckner, U., Perez-Reyes E., Hescheler, J., Schneider, T. (1998) New Splice Variant of the Neuronal Ca²⁺ Channel α 1E Subunit in Islets of Langerhans and Kidney. Distribution of Voltage-Gated Ca²⁺ Channel α 1 Subunits in Cell Lines and Tissues. *Eur. J. Biochem.* 257, 274-285.

Schramm, M., Vajna, R., Pereverzev, A., Tottene A., Klöckner, U., Pietrobon, D., Hescheler, J., Schneider, T. (1999) Splice variants of α 1E voltage-gated calcium channels in rat cerebellar granule cells. Detection of major calcium channel α 1-transcripts by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Neuroscience*, 92, 565-575.

Grabsch, H., Pereverzev, A., Weiergräber, M., Schramm, M., Henry, M., Vajna, R., Beattie, R., Volsen, S.G., Klöckner, U., Hescheler, J., Schneider T. (1999) Immunohistochemical Detection of α 1E Voltage-gated Ca²⁺ Channel Spleißvariantes in Cerebellum, INS-1 cells, and Neuroendocrine Cells of the Digestive System. *J. Histochem. Cytochem.*, 47, 981-993.

Rolf Vajna, Udo Klöckner, Alexei Pereverzev, Marco Weiergräber, Xia-hua Chen, Norbert Klugbauer, Jürgen Hescheler, George Miljanich, Edward Perez-Reyes, Toni Schneider (2001) Functional coupling between 'R-type' Ca²⁺ channels and insulin secretion in the insulinoma cell line INS-1. *Eur. J. Biochem.*, 268, 1066-1075.

Pereverzev, A., Vajna, R., Hescheler, J., Klöckner, U., Schneider, T., Reduction of insulin secretion in the insulinoma cell line INS-1 by overexpression of an antisense- α 1E cassette; *eingereicht*, 2001.

A. Pereverzev, M. Mikhna, R. Vajna, C. Gissel, M. Weiergräber, M. Henry, J. Hescheler, N. Smyth, T. Schneider. Glucose-tolerance, insulin-release and stress-induced hyperglycemia are altered besides neuronal functions upon disruption of the Ca_v2.3 (α 1E) subunit of voltage-gated calcium channels; *Mol. Endocrinology*, (2002) in press.

Weitere Veröffentlichungen in dieser Zeit

Pereverzev, A., Klöckner, U., Henry, M., Grabsch, H., Vajna, R., Olyschläger, S., Viatchenko-Karpinski, S., Schröder, R., Hescheler, J., Schneider T. (1998) Structural Diversity of Voltage-Dependent Ca²⁺ Channel α_{1E} -Subunit. *Eur. J. Neurosci.*, 10, 916-925.

Marco Weiergräber, Alexei Pereverzev, Rolf Vajna, Margit Henry, Martin Schramm, Wolfgang Nastainczyk, Heike Grabsch und Toni Schneider (2000) Immunodetection of α_{1E} Voltage-gated Ca²⁺ Channel in Chromogranin-positive muscle cells of rat heart, and in distal tubules of human kidney. *J. Histochem. Cytochem.*, 48 (6), 807-819.

Stefan Arnhold, Christian Andressen, Doychin N. Angelov, Rolf Vajna, Stephen G. Volsen, Jürgen Hescheler and Klaus Addicks (2000) Embryonic stem-cell derived neurones express a maturation dependent pattern of voltage-gated calcium channels and calcium-binding proteins. *Int. J. Developmental Neurosci.*, 18 (2-3), 201-212.

Posterabstracts

Schneider, T., A. Pereverzev, L.L. Cribbs, R. Vajna, M. Schramm, A. Tottene, D. Pietrobon, J. Hescheler, U. Klöckner, E. Perez-Reyes (1998)

Voltage-gated Ca²⁺ channels: Why is a E-type not *per se* a T-type and not every G-type a R-type? Comparison of structural and biophysical properties of α_{1E} and α_{1G} . Abstract in: *Pflüger's Arch. / Eur. J. Physiology* 435, R98 (P4-5)

M. Mikhna, C. Gissel, A. Pereverzev, R. Vajna, J. Hescheler, T. Schneider (1999) Tissue specific gene targeting of E-type voltage-gated Ca²⁺ channels using the *loxP/cre*-recombinase system. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Physiologie, Bonn, 14.-17.3.1999. Abstract in: *Pflüger's Arch. / Eur. J. Physiology* 437, R79 (P3-4)

Vajna, R., Weiergräber M., Chen, X.H., Miljanich, G., Henry, M., Hescheler, J., Klöckner U., Pereverzev, A., Schneider T. (1999) Insulin secretion and E-type voltage-gated calcium channels. Meeting of the International Society of Neurochemistry, Berlin, 8.-14.8.99. Abstract in: *J. Neurochemistry* 73, S130C.

6.6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Vajna, Rolf
Geburtsdatum: 03.01.1969
Geburtsort: Köln-Lindenthal
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Thomas Vajna
Elke Vajna geb. Ruschenburg

Schulbildung

Ev. Grundschule Köln-Pesch
Gymnasium Schulstraße Köln-Pesch

Wehrdienst

Okt. 1988-Okt. 1989 Grundwehrdienst bei der Sanitätsausbildungskompanie in Hamburg-Harburg und beim 8. Sanitätsbataillon in Munster/ Niedersachsen

Berufsausbildung

Okt. 1989 Beginn des Chemie-Studiums an der Universität zu Köln
Feb. 1993 Diplom-Chemiker-Vorprüfung
Okt. 1993 Beginn des Biologie-Studiums an der Universität zu Köln
Mai 1995 Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
Juli 1995-Mai 1996 Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. H. Klein, Institut für Biochemie, Universität Köln. Thema: Expression spannungsabhängiger Calciumkanäle in kultivierten embryonalen Stammzellen
Seit Juli 1996 Dissertation im Labor von PD Dr. Schneider, Institut für Neurophysiologie, Uniklinik Köln (Institutsleiter: Prof. Dr. Hescheler) Thema: Identifizierung und funktionelle Charakterisierung einer neuen Spleißvariante des Ca_v2.3 / R-Typ- Calciumkanals

Köln, den 10.10.2001

6.7 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, das ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken und Experimente sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht.

Köln, den 10.10.2001

