

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I Großhadern

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. G. Steinbeck

Expression der L-Typ Kalziumkanal  $\beta$ 3a-Untereinheit und einer trunzierten  
Isoform der  $\beta$ 3a-Untereinheit in humanem Myokard

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Joachim Hesel  
aus Hildesheim  
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. P. Boekstegers

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. O. Garaschuk  
Priv. Doz. Dr. G. Längst

Mitbetreuung durch den  
Promovierten Mitarbeiter: Dr. R. Hullin

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2005

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. med. Roger Hullin für die Betreuung und freundschaftliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit aussprechen.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. med. P. Boekstegers für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Unterstützung und die guten Arbeitsbedingungen.

Weiterhin danke ich Frau Judith Arcifa für ihre Unterstützung bei den Arbeiten in unserem Labor

In Liebe und Dankbarkeit  
meiner Frau Daniela  
gewidmet

---

## Inhaltsverzeichnis

---

1.	<b>Zusammenfassung</b>	7
2.	<b>Einleitung</b>	8
2.1	Die Funktion des kardialen L-Typ Kalziumkanals	8
2.2	Die Struktur des kardialen L-Typ Kalziumkanals	9
2.3	Die $\alpha 1$ -Untereinheit	10
2.3.1	Expression und Charakterisierung der $\alpha 1$ -Untereinheiten	11
2.3.2	Die Struktur der $\alpha 1$ -Untereinheit der L-Typ Kalziumkanäle	12
2.3.3	Die Expression der $\alpha 1$ -Untereinheit im Herzen	12
2.4	Die $\alpha 2/\delta$ -Untereinheit	13
2.5	Die $\beta$ -Untereinheit	13
2.6	Durch die $\beta$ -Untereinheit vermittelte elektrophysiologische Eigenschaften des kardialen L-Typ Kalziumkanals	15
2.6.1	Aktivierung des Kalziumeinwärtsstroms durch die $\beta$ -Untereinheit	15
2.6.1.1	Inaktivierung des Kalziumeinwärtsstroms durch die $\beta$ -Untereinheit	15
2.6.2	Regulation des Kalziumeinwärtsstroms durch verschiedene $\beta$ -Untereinheiten	16
2.6.3	Neurohumorale Modulation des Kalziumeinwärtsstroms und die $\beta$ -Untereinheit	16
3.	<b>Material und Methoden</b>	18
3.1	Klonierung der $\beta 3$ -Untereinheit	18
3.1.1	Präparation des Myokardgewebes	18
3.1.2	Präparation der mRNA mit Trizol-Fertigreagenz ( Fa. Gibco )	19
3.1.3	Präparation der mRNA über Poly(A)-Quick-Säulen ( Fa. Stratagene )	20
3.1.4	Reverse Transkription von mRNA	21
3.1.5	Die PCR-Klonierung der Zielfragmente	22
3.1.6	Elektroelution	23
3.1.7	Primer zur PCR-Klonierung	24
3.1.8	Subklonierung der amplifizierten cDNA-Fragmente	26
3.1.9	Subklonierung und Transformation	26
3.1.10	Ligierung der cDNA in Plasmidvektoren	27
3.1.11	Transformation der Plasmidvektoren in Bakterien	28
3.1.12	cDNA-Mini- und Midipräparation	28

3.2	Sequenzierung der cDNS der $\beta$ 3-Untereinheit	31
3.2.1	Sequenzierungsprotokoll	32
3.2.2	Expressionsanalyse durch Northern-Blotting	33
3.3.1	Gelelektrophoretische Separation der mRNA	36
3.3.2	Diffusions-Blotting	37
3.3.3	Herstellung der antisense-RNS-Sonden	38
3.3.4	Hybridisierungsreaktion	40
3.4	Verhältnis der mRNA Expression der $\beta$ 3a / $\beta$ 3trunzierten Untereinheit	42
3.5	Geräteliste	42
4.	<b>Ergebnisse</b>	44
4.1	Nachweis der Genexpression der $\beta$ 3-Untereinheit spannungsabhängiger Kalziumkanäle aus humanem linksventrikulärem Myokard	44
4.1.1	Klonierung und Sequenzierung der humanen kardialen $\beta$ 3-Untereinheit	44
4.2	Untersuchung posttranslationaler Modifizierungsstellen: Potentielle Phosphorylierungsstellen	47
4.2.1	Proteinkinase C	47
4.2.2	Caseinkinase II	48
4.2.3	cAMP abhängige Proteinkinase	48
4.3	Vergleich der Aminosäuresequenz der humanen kardialen $\beta$ 3-Untereinheit (CaB3) mit einer humanen embryonalen $\beta$ 3-Untereinheit (H $\beta$ 3), zwei humaner kardialer $\beta$ 1-Untereinheiten (H $\beta$ 1b/H $\beta$ 1a) und einer kardialen $\beta$ 2-Untereinheit (CaB2b) des Kaninchens	48
4.4	Klonierung von Spleißvarianten der $\beta$ 3-Untereinheit	52
4.5	Ergebnisse der Northern-Blot-Untersuchungen	56
5.	<b>Diskussion</b>	58
6.	<b>Literatur</b>	62

## 1. Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist der spannungsaktivierte Kalziumkanal in der Zellmembran menschlicher myokardialer Zellen.

Der spannungsaktivierte Kalziumkanal steht am Anfang des Kontraktions-Relaxations-Zyklus der menschlichen Herzmuskelzellen. Durch Depolarisation der Zellmembran kommt es zu einer Konformationsänderung des Kalziumkanals, Kalziumionen treten in das Zellinnere ein, wo sie über Zwischenschritte die Kontraktion auslösen.

Der strukturelle Aufbau des kardialen Kalziumkanals besteht aus 3 Proteinbausteinen: Der  $\alpha$ 1-Untereinheit, der  $\beta$ -Untereinheit und der  $\alpha$ 2 /  $\delta$ -Untereinheit.

Bislang ist bekannt, daß folgende Kalziumkanal-Untereinheiten im menschlichen Myokard exprimiert werden: 2 verschiedene Genprodukte der  $\alpha$ 1-Untereinheit ( $\alpha$ 1c,  $\alpha$ 1D), 2 Genprodukte der  $\alpha$ 2 $\delta$ -Untereinheit ( $\alpha$ 2 $\delta$ -1,  $\alpha$ 2 $\delta$ -2) und 2 Genprodukte der  $\beta$ -Untereinheit ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2).

Aus vorangegangenen Untersuchungen ist bekannt, daß in verschiedenen Geweben verschiedene Kombinationen dieser Untereinheiten miteinander funktionsfähige Kalziumkanäle bilden, deren elektrophysiologische Eigenschaften sich unterscheiden.

In der vorliegenden Arbeit gelang nun erstmals die Klonierung der  $\beta$ 3-Untereinheit des spannungsaktivierten Kalziumkanals und einer trunzierten Spleißvariante auch in menschlichem Herzmuskelgewebe. Während die full length  $\beta$ 3-Untereinheit aus 484 Aminosäuren besteht, führt eine Änderung des Leserahmens durch Herausspleißen des 20 Nukleotide langen Exons 6 zu einem frühzeitigen Kettenabbruch nach 165 Aminosäuren. Bei ischämischer Kardiomyopathie verändert sich das Genexpressions-Verhältnis der beiden Isoformen der  $\beta$ 3-Untereinheit zueinander ( von 83 / 17 % hin zu 51 / 49 % ). Da dieses verkürzte Protein noch die Interaktionsseite mit der  $\alpha$ 1-Untereinheit besitzt, kann dieses verkürzte Protein möglicherweise funktionsfähig sein.

In den Northern-Blot Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine auf mRNA-Ebene relevante Expression kodierender Transkripte für die  $\beta$ 3-Untereinheit nachgewiesen werden kann. Auffällig waren unterschiedlich große Transkripte in den verschiedenen Regionen des Herzens einerseits und bei Vergleich zwischen normalem Myokard und terminal insuffizientem Myokard andererseits. In PCR Untersuchungen konnten wir nachweisen, daß diese unterschiedlich großen Transkripte als Folge eines alternativen Spleißens ausserhalb der kodierenden Region für die  $\beta$ 3-Untereinheit entstehen.

Die vorgestellten Ergebnisse werden Grundlage sein für weitergehende funktionelle Untersuchungen, welche die pathophysiologische Relevanz der  $\beta$ 3-Untereinheit im humanem Myokard zu klären haben.

## 2. Einleitung

### 2.1 Die Funktion des kardialen L-Typ Kalziumkanals:

Kalziumionen sind entscheidend für die Kontraktion des Herzens. Obwohl der genaue Mechanismus und die Rolle der Kalziumionen während der Kontraktion und Relaxation des Herzens noch nicht endgültig geklärt sind, existiert doch eine allgemein anerkannte Hypothese über die Initialisierung und den Ablauf der Kontraktion/Relaxation auf zellulärer Ebene.

Eine entscheidende Rolle für die Einleitung einer Kontraktion nimmt dabei der sarkolemmale L-Typ Kalziumkanal ein.

Wenn die elektrische Erregung die einzelnen Kardiomyozyten erreicht, kommt es zur Depolarisation der sarkolemmalen Membranspannung von ca. -80 mV auf ca. +20 mV. Dies bewirkt eine Konformationsänderung des spannungsabhängigen L-Typ Kalziumkanals, so daß in der Folge Kalziumionen von extrazellulär in das Zellinnere gelangen können. Die Repolarisation der Zellmembran führt wieder zum Schluß der ionenleitenden Pore des L-Typ Kalziumkanals ( 1, 2, 3 ).

Die einströmenden Kalziumionen binden an einen spezifischen Kalzium-Rezeptor des sarkoplasmatischen Retikulums ( auch Ryanodin-Rezeptor genannt, weil dieser durch Ryanodin blockiert wird ) und dies induziert die Freisetzung großer Mengen von Kalziumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, wodurch die Kalziumkonzentration in den Kardiomyozyten etwa um das etwa 10fache von 0,1  $\mu\text{M}$  auf 1  $\mu\text{M}$  ansteigt. Dieser Vorgang wird als Kalzium induzierte Kalziumfreisetzung bezeichnet ( 3 ).

Die anatomische Nähe der Ryanodin-Rezeptoren des sarkoplasmatischen Retikulums ( SR ) zu den L-Typ Kalziumkanälen des Sarkolemmms einerseits, die relativ hohe Dichte von Ryanodin-Rezeptoren im Vergleich zu der Anzahl der L-Typ Kalziumkanäle andererseits, läßt den Schluß zu, daß ein einziger L-Typ Kalziumkanal mit mehreren Ryanodin-Rezeptoren in Wechselwirkung tritt.

Vermittelt wird diese Wechselwirkung in der Herzmuskelzelle durch das Entstehen transienter Mikrodomänen hoher intrazellulärer Kalziumionenkonzentration auf der zytosolischen Seite eines L-Typ Kalziumkanals, welche den Trigger zur Freisetzung von Kalziumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum über den Ryanodinrezeptor darstellen ( 4 ).

Die Ryanodinrezeptoren wiederum reagieren koordiniert auf Aktivierung, wodurch das initiale Signal amplifiziert wird.

Dies verdeutlicht die wichtige Rolle des L-Typ Kalziumkanals für die Einleitung des Erregungs-Kontraktions-Zyklus.

Die aus dem SR freigesetzten Kalziumionen binden an das Troponin C, welches wiederum über Bindung an Troponin I die Reposition des Tropomyosins bewirkt und somit die Interaktion zwischen den kontraktile Filamenten Aktin und Myosin ermöglicht. Dadurch wird die Kontraktion eingeleitet, die andauert, solange die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht ist und genügend Energieäquivalente vorhanden sind.



Die diastolische Relaxation wird durch schnelles Absinken der intrazellulären Kalziumionenkonzentration eingeleitet. Dafür ist hauptsächlich die ATP-verbrauchende Kalziumpumpe des Sarkoplasmatischen Retikulums ( SERCA IIa = Sarcoendoplasmatic reticulum Ca ATPase ) verantwortlich: Diese befördert die Kalziumionen wieder ins Innere des Sarkoplasmatischen Retikulums, wo sie an Proteine, vor allem an kardiales Kalsequestrin, gebunden werden.

Eine wesentlich geringere Menge von Kalziumionen verläßt das Zytosol über den Na/ Ca-Austauscher und die ATP-verbrauchende Kalziumpumpe des Sarkolemms ( 10, 11, 12).

In Folge des Absinkens der intrazellulären Kalziumkonzentration lösen sich die Kalziumionen vom Troponin C, die Bindung an das Troponin I wird gelöst und das Tropomyosin ändert seine Konformation, wodurch die Interaktion zwischen den kontraktile Filamenten beendet wird ( 5, 6, 7, 8, 9 ).

## 2.2 Die Struktur des kardialen L-Typ Kalziumkanals:

Der kardiale L-Typ Kalziumkanal besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten: Der zentralen ionenleitenden Pore  $\alpha_1$ , welche auch die Bindungsstellen für die Kalziumantagonisten trägt, der intrazellulär gelegenen regulatorischen  $\beta$ -Untereinheit und der extrazellulär gelegenen  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit.

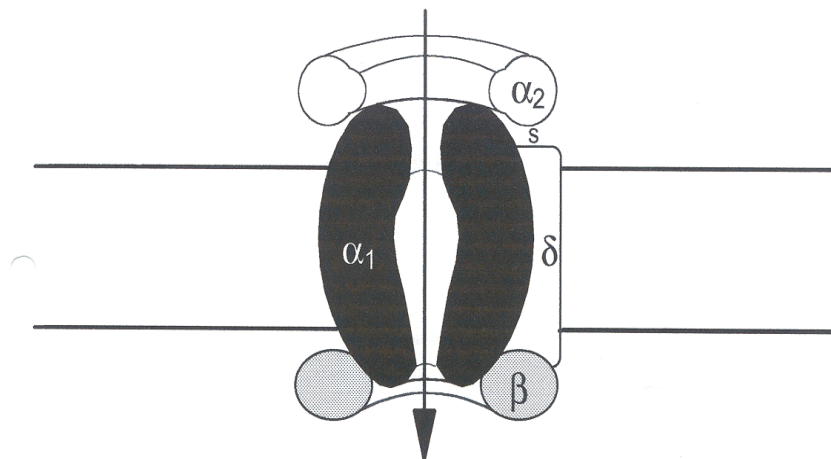


Abbildung 1 : Struktur des kardialen L-Typ Kalziumkanals

### 2.3 Die $\alpha 1$ -Untereinheit:

Bisher wurden für die  $\alpha 1$ -Untereinheit zehn verschiedene Gene isoliert und kloniert, die nach einem Konsensus von 1994 ( 25 ) und der Klonierung dreier weiterer  $\alpha 1$ -Untereinheiten 1998 ( 13, 14, 94 ), in drei verschiedenen Familien zusammengefasst werden.

Alle verschiedenen  $\alpha 1$ -Untereinheiten bilden die zentrale ionenleitende Pore in spannungsabhängigen Kalziumkanälen. Nach den elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften lassen sich fünf Typen von Kalziumkanälen unterscheiden: L-, N-, P-, Q- und T-Typ Kalziumkanäle ( 15, 16, 17 ).

Die am Herzmuskel für den spannungsinduzierten Kalziumstrom verantwortlichen Kalziumkanäle beinhalten die  $\alpha 1c$ -Untereinheit als zentrale ionenleitende Pore. Sie gehören zur großen Gruppe der L-Typ Kalziumkanäle, die als zentrale Pore entweder eine  $\alpha 1c$ -,  $\alpha 1d$ -,  $\alpha 1f$ -oder  $\alpha 1s$ -Untereinheiten beinhalten und sich durch folgende Eigenschaften auszeichnen: Sie können durch Kalzium-Antagonisten wie Dihydropyridine und/oder Phenylalkylamine blockiert werden und besitzen eine Ionenleitfähigkeit von 20-25 pS.

L-Typ Kalziumkanäle werden in verschiedenen Geweben exprimiert: im Skelettmuskel ( 26 ), im Herzen ( 27 ), in der glatten Muskulatur, im Lungengewebe, im Gehirn, in der Retina und in endokrinen Geweben ( 28, 29, 30, 95 ).

Wie oben erwähnt existieren andere Familien von Kalziumkanälen, die andere  $\alpha 1$ -Untereinheiten exprimieren und eine andere Gewebsverteilung aufweisen.

Dies sind die N-Typ Kalziumkanäle, die bevorzugt in neuronalen Zellen exprimiert werden, die P-/ Q-Typ Kalziumkanäle, die bevorzugt in Purkinje-Zellen des Kleinhirns vorkommen, die R-Typ Kalziumkanäle, für die keine blockierenden Substanzen existieren und die ebenfalls bevorzugt in neuronalem Gewebe vorkommen und die T-Typ Kalziumkanäle, die in neuronalen Zellen, neuroendokrinen Zellen und im Vorhofmyokard exprimiert werden, wo sie wahrscheinlich für die Schrittmacherfunktion verantwortlich sind ( 18 ).

Die L-Typ, N-Typ, P/ Q-Typ und R-Typ Kalziumkanäle werden als HVA-Kanäle ( high voltage activated ) bezeichnet, da sie erst durch große Depolarisationsschritte von Ruhepotentialen von -80 mV auf -30-40 mV aktiviert werden.

Die T-Typ Kalziumkanäle sind dagegen durch geringere Depolarisationsschritte aktivierbar, werden aber sehr viel schneller als die anderen Kalziumkanäle wieder inaktiviert ( 13, 14 ).

### 2.3.1 Expression und Charakterisierung der $\alpha 1$ -Untereinheiten:

<b><math>\alpha 1</math>-Untereinheit</b>	<b>Expression</b>	<b>Kanaltyp</b>	<b>Blockierende Substanz</b>
$\alpha 1_A$	Menschliches Herz ( 19 ), Hirngewebe des Kaninchens ( 19 ), Hirngewebe der Ratte ( 85 )	P/ Q-Typ	$\omega$ -CTx-MVIIC, $\omega$ -agaIVA
$\alpha 1_B$	Hirngewebe des Menschen ( 20 ), der Ratte ( 86 ), des Kaninchens ( 87 )	N-Typ	$\omega$ -CTx-GVIA
$\alpha 1_C$	Menschliches Herz ( 30 ), Kaninchenherz ( 88 ), Kaninchenlunge ( 89 ), Aorta der Ratte ( 90 ), Hirngewebe der Maus ( 91 )	L-Typ	Dihydropyridine
$\alpha 1_D$	Menschliches Herz ( 22, 23, 81 ), Hirngewebe des Menschen ( 21 ), der Ratte ( 92 ), Pankreas des Menschen ( 49 )	L-Typ	Dihydropyridine
$\alpha 1_E$	Hirngewebe des Menschen ( 24 ), der Ratte ( 93 ), des Kaninchens ( 94 )	R-Typ	Keine blockierende Substanz bekannt
$\alpha 1_F$	Retina des Menschen ( 95 )	L-Typ	Dihydropyridine
$\alpha 1_S$	Skelettmuskulatur des Kaninchens, ( 80 ) Dysgenetisches Skelettmuskelgewebe der Maus ( 88 )	L-Typ	Dihydropyridine, Phenylalkylamine
$\alpha 1_G$	Herzmuskelgewebe des Menschen, Hirngewebe der Ratte ( 13 )	T-Typ	Keine blockierende Substanz bekannt
$\alpha 1_H$	Herzmuskelgewebe, Niere und Leber des Menschen ( 14 )	T-Typ	Keine blockierende Substanz bekannt

### 2.3.2 Die Struktur der $\alpha 1$ -Untereinheit der L-Typ Kalziumkanäle:

Die  $\alpha 1_C$ ,  $\alpha 1_D$ ,  $\alpha 1_F$  und  $\alpha 1_S$ -Untereinheiten der L-Typ Kalziumkanäle bestehen aus je vier zueinander homologen Repeats, die durch intra-/ extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind und die in ihrer Gesamtheit die ionenleitende Pore bilden. Jedes Repeat besteht aus jeweils 6 transmembranären  $\alpha$ -helikalen Segmenten ( S1-S6 ). Das S-4 Segment eines jeden Repeats trägt positive Ladungen und bildet möglicherweise als amphophiles Segment den Spannungssensor des Kanals ( 32 ).

Den verschiedenen Abschnitten der  $\alpha 1$ -Untereinheit können bestimmte Funktionen zugeordnet werden:

1. Die zytoplasmatisch gelegene Schleife zwischen Repeat 1 und 2 ist wesentlich für die Wechselwirkung zwischen der  $\alpha 1$ -, der  $\beta$ -Untereinheit und GTP-bindenden Proteinen ( 33, 34 ).
2. Die zytoplasmatisch gelegene Schleife zwischen Repeat 2 und 3 ist wesentlich an der elektomechanischen Kopplung beteiligt. In Herzmuskelzellen wird durch spannungsaktivierten Kalziumioneneinstrom durch L-Typ Kalziumkanäle die Freisetzung von Kalziumionen aus dem SR getriggert und in der Folge die Kontraktion eingeleitet. In Skelettmuskel-Zellen wird die Freisetzung von Kalziumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum durch eine spannungsinduzierte Konformationsänderung der L-Typ Kalziumkanäle getriggert ( 35 ).
3. Die Bindungsstellen für die Kalziumantagonisten der Dihydropyridin-Gruppe liegen intrazellulär, angrenzend an die Transmembranhelix von Repeat 4 Segment S6. Für die Kalziumantagonisten der Phenylalkylaminogruppe liegen die Bindungsstellen an den transmembranären Helices von Repeat 3, Segment S6 und Repeat 4, Segment S6 ( 36, 37 ).

### 2.3.3 Die Expression der $\alpha 1$ -Untereinheit im Herzen:

Die im humanen Myokard überwiegend exprimierte  $\alpha 1$ -Untereinheit ist die  $\alpha 1_C$ -Untereinheit. Die  $\alpha 1_C$ -Untereinheit wird von einem Gen auf dem Chromosom 12p13 kodiert ( 29, 30 ). Durch alternatives Spleißen der Primärtranskripte und posttranslationale Modifikationen können verschiedene Varianten des  $\alpha 1_C$ -Proteins entstehen, die gewebsspezifisch als Genprodukte  $\alpha 1_C$ -a im Herzen, als  $\alpha 1_C$ -b in glatter Muskulatur und als  $\alpha 1_C$ -c im Gehirn vorkommen ( 28, 38 ).

Die humane kardiale  $\alpha 1_C$ -Untereinheit wurde kloniert und in Expressionsversuchen untersucht ( 30 ).

Zusätzlich konnten im humanen Myokard mRNS-Transkripte detektiert werden für die  $\alpha 1_A$ -Untereinheit, die Bestandteil hauptsächlich neuronal vorkommender P-/ Q-Typ Kalziumkanäle ist und für die  $\alpha 1_D$ -Untereinheit, die Bestandteil ebenfalls hauptsächlich neuronal vorkommender R-Typ Kalziumkanäle ist ( 19,81 ).

Obwohl überwiegend die  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit in humanen Kardiomyozyten exprimiert wird, konnte auch die  $\alpha_{1D}$ -Untereinheit sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene in Kardiomyozyten nachgewiesen werden ( 22, 23 ).

#### **2.4 Die $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit:**

Die  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals besteht aus der stark glykosylierten, extrazellulär gelegenen  $\alpha_2$ -Untereinheit und der membranär gelegenen  $\delta$ -Untereinheit. Die beiden Untereinheiten sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden und werden von einem gemeinsamen Gen kodiert, dessen primäres Translationsprodukt durch Proteolyse in die beiden Sub-Untereinheiten gespalten wird ( 58 ).

Während für die  $\alpha_1$ - und die  $\beta$ -Untereinheiten mehrere kodierende Gene nachgewiesen wurden, war für die  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit nur ein Gen bekannt ( 28, 45, 59 ). Bislang wurden 5 Spleißvarianten des  $\alpha_2/\delta-1$  Gens nachgewiesen, deren funktionelle Bedeutung noch unbekannt ist ( 60, 61 ).

Im Rattenherzen und im menschlichen Myokard konnten mittlerweile 2 weitere, die  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit kodierende Gene  $\alpha_2/\delta-2$  und  $\alpha_2/\delta-3$  nachgewiesen werden ( 102, 107 ).

In homologen Koexpressionsuntersuchungen kardialer L-Typ Kalziumkanaluntereinheiten zeigte sich, daß die Aktivierungskinetik des Kalziumeinwärtsstroms bei gemeinsamer Expression der  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit beschleunigt wird ( 45, 62 ).

Bei Koexpression der  $\alpha_1$ -,  $\beta$ - und  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheiten normalisiert sich außerdem die Bindungsaffinität für Dihydropyridine, die ohne die  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit 5-10 fach niedriger ist ( 63 ).

Diese Ergebnisse sprechen für eine konstitutionelle Bedeutung der  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit für die funktionelle Formation der Kanäle an der sarkolemmalen Oberfläche.

#### **2.5 Die $\beta$ -Untereinheit:**

Die  $\beta$ -Untereinheit ist ein hydrophiles Protein, daß auf der zytoplasmatischen Seite des Sarkolemmes gelegen ist ( 39 ). Die Sekundärstruktur der  $\beta$ -Untereinheiten zeigt vier 27-42 Aminosäuren lange  $\alpha$ -helikale Regionen ( Domäne 1-4 ).

Hydrophobe Aminosäurereste zwischen den Domänen 2, 3 und 4 entsprechen sogenannten " Heptad Repeats ". So werden fixierte Wiederholungen hydrophober Aminosäurereste genannt, über die zytoskelettale Proteine miteinander in Wechselwirkung treten ( 32 ) und die wahrscheinlich zur "Verankerung" des L-Typ Kalziumkanals im Zytoskeletton dienen.

Außerdem kommen Regionen vor, die reich an den Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) sind und deshalb als "PEST"-Regionen bezeichnet werden. Diese Regionen sind besonders sensibel gegenüber Proteaseabbau, woraus sich auch die relativ kurze biologische Halbwertszeit der  $\beta$ -Untereinheit von 55 Stunden erklären kann ( 103 ).

Alle bislang klonierten  $\beta$ -Untereinheiten unterscheiden sich wesentlich am Amino- und am Carboxyterminus, hingegen findet sich im zentralen Teil eine hohe Homologie vor allem auf Aminosäureebene.

Der zentrale Teil wird durch ein alternativ gespleißtes Segment in 2 Bereiche hoher Homologie geteilt ( 51 ). Im zweiten Bereich hoher Homologie wurde eine Domäne von 34 Aminosäureresten identifiziert, die in Koexpressionsversuchen mit der  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2/\delta$ -Untereinheit einen Kalzium-Einwärtsstrom in *Xenopus laevis* stimuliert ( 52, 53 ). Diese Domäne von 34 Aminosäureresten wird auch B-Interaction Domain ( BID ) genannt. Die 34 Aminosäurereste entsprechen nahezu dem gesamten gemeinsamen Exon aller  $\beta$ -Untereinheiten, das auf die zentrale Spleißregion folgt ( 43 ).

Diese hoch konservierte Region bindet an ein ebenfalls hoch konserviertes Bindungsmotiv der  $\alpha 1$ -Untereinheit in der zytoplasmatisch gelegenen Schleife zwischen Repeat 1 und Repeat 2 ( 33 ). Die Bindung der beiden Untereinheiten wurde genauer untersucht und erwies sich als pharmakologisch sehr stabil. Dennoch ist die Bindungskinetik, mit der die verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten mit der  $\alpha 1$ -Untereinheit assoziieren, unterschiedlich stark trotz dieser gemeinsamen Bindungsstelle. Dies spricht für Interaktionen, welche zusätzlich zwischen anderen Proteinbereichen der  $\beta$ -Untereinheit und der  $\alpha 1$ -Untereinheit vermittelt werden. Dies konnte durch die Konstruktion von Chimären aus 2  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ), deren Aminoterminus gegeneinander ausgetauscht wurde, nachgewiesen werden: so wiesen Chimären mit einem ausgetauschten Aminoterminus vice versa ausgetauschte elektrophysiologische Eigenschaften bei Koexpression mit der  $\alpha 1_A$ -Untereinheit auf ( 82 ).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Bindung zwischen der  $\beta$ -Untereinheit und der  $\alpha 1$ -Untereinheit über die AID-Region durch weitere Proteininteraktionen moduliert wird, welche spezifische Eigenschaften des Kalziumeinwärtsstroms vermitteln und so möglicherweise gewebsspezifische Eigenschaften des Kalziumeinwärtsstroms bewirken.

In Koexpressionsuntersuchungen der  $\beta$ -Untereinheiten mit  $\alpha$ -Untereinheiten ist eine starke Zunahme der Dihydropyridinbindungsstellen an der Zelloberfläche zu beobachten ( 57, 67 ). Möglicherweise ist die  $\beta$ -Untereinheit zur korrekten Orientierung in der Zellmembran nötig ( 18 ). Dafür spricht auch - wie oben erwähnt - das Vorhandensein von Heptad-Regionen, welche wahrscheinlich den L-Typ Kalziumkanal in der richtigen sarkolemmalen Orientierung im Zytoskeletton verankern.

Ein weiterer Hinweis auf die pathophysiologische Relevanz der  $\beta$ -Untereinheit ist die bei diastolischer Herzinsuffizienz quantitativ verminderte Expression der  $\beta$ -Untereinheit um 74% auf mRNA-Ebene und um 80% auf Proteinebene ( 97 ).

Bisher wurden 4 verschiedene Gene für diese akzessorische Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals identifiziert, die für die Untereinheiten  $\beta 1$ - $\beta 4$  kodieren:

1. Die  $\beta 1_A$ -Untereinheit wurde erstmals aus dem Skelettmuskel des Kaninchens kloniert ( 40 ). Spleißvarianten werden im Gehirn als  $\beta 1_B$  ( 33 ) und  $\beta 1_C$  ( 41 ) exprimiert. Ähnliche Spleißvarianten wurden im humanen Myokard gefunden ( 42 ). Das humane  $\beta 1$ -Gen konnte kloniert werden ( 43 ) und ist auf dem Chromosom 17 lokalisiert ( 44 ).

2. Die  $\beta 2$ -Untereinheit wurde erstmals aus einer cDNS-Bibliothek des Kaninchen-Herzens kloniert. Bisher wurden zwei Spleißvarianten aus dem Herzmuskel des Kaninchens (  $\beta 2a$ ,  $2b$  ) und eine Dritte aus dem Kaninchen-Hirn  $\beta 2c$  ( 45 ) sowie eine weitere  $\beta 2a$  aus dem Rattenherzen ( 46 ) kloniert. Ihre Expression wurde auch für das fetale menschliche Gehirn (  $\beta 2e$  ( 47 ) ) nachgewiesen.

Die  $\beta 2$ -Untereinheit wird auch im humanem Myokard exprimiert: In gereinigten Kalziumkanälen aus humanem Myokard, die über radioaktiv markierte Dihydropyridine markiert und danach isoliert wurden, konnte mit  $\beta 2$ -spezifischen Antikörpern ein 82 kDa großes Protein identifiziert werden ( 103 ).

Allerdings konnten durch diesen Antikörper nur bis zu 25% der radioaktiv markierten L-Typ Kalziumkanäle präzipitiert werden, so daß die Existenz weiterer  $\beta$ -Untereinheiten angenommen werden muß. Auch auf mRNA-Ebene konnte die Existenz einer  $\beta 2$ -Untereinheit nachgewiesen werden ( 101 ).

3. Die  $\beta 3$ -Untereinheit wird in vielen Zellen exprimiert, überwiegend jedoch im Gehirn, in glatten Muskelzellen und sekretorischen Zellen. Ihr Vorkommen wurde beim Menschen, im Kaninchen und der Ratte nachgewiesen ( 42, 45, 48, 49 ).

Mit einem  $\beta 3$ -spezifischen Antikörper wurde in humanem Myokard eine 55 kDa-Bande nachgewiesen ( 103 ).

4. Die  $\beta 4$ -Untereinheit wird überwiegend neuronal exprimiert und konnte aus dem Gehirn der Ratte kloniert werden ( 48 ). Darüberhinaus wird die  $\beta 4$ -Untereinheit in der Niere exprimiert ( 50 ).

## **2.6. Durch die $\beta$ -Untereinheit vermittelte elektrophysiologische Eigenschaften des kardialen L-Typ Kalziumkanals**

### **2.6.1 Aktivierung des Kalziumeinwärtsstroms durch die $\beta$ -Untereinheit:**

In Koexpressionsuntersuchungen der verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten mit den  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2/\delta$ -Untereinheiten konnte gezeigt werden, daß alle  $\beta$ -Untereinheiten die Aktivierungskinetik des Kalziumeinwärtsstroms beschleunigen und die Öffnungswahrscheinlichkeit der L-Typ Kalziumkanäle zu negativeren Membranpotentialen hin verschieben ( 45, 54, 55 ).

### **2.6.2 Inaktivierung des Kalziumeinwärtsstroms durch die $\beta$ -Untereinheit:**

In Koexpressionsuntersuchungen der verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten mit den  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2/\delta$ -Untereinheiten konnte gezeigt werden, daß sie alle die Inaktivierungskinetik der L-Typ Kalziumkanäle beschleunigen, allerdings unterschiedlich stark ( 56 ). Wesentlich scheint dabei der Aminoterminus zu sein: so wird eine stärkere Beschleunigung der Inaktivierungskinetik durch die  $\beta 1b$ - als durch die  $\beta 2a$ -Untereinheit bei gleicher Wirkung der Untereinheiten auf die Aktivierungskinetik erreicht ( 57 ).

Bei Koexpression der skelettmuskulären  $\beta 1a$ -Untereinheit mit der glattmuskulären  $\alpha 1c$ -b-Untereinheit in CHO ( Chinese hamster ovary-cells ) war die Inaktivierungskinetik des Kalziumeinwärtsstroms beschleunigt im Vergleich zur Koexpression der glattmuskulären  $\beta 3$ -Untereinheit mit der glattmuskulären  $\alpha 1c$ -b-Untereinheit in CHO ( 72 ).

### **2.6.3. Regulation des Kalziumeinwärtsstroms durch verschiedene $\beta$ -Untereinheiten:**

Wie bereits beschrieben führt die Aktivierung des L-Typ Kalziumkanals im kardialen und glatten Muskelgewebe zum Durchtritt von Kalziumionen von extrazellulär nach intrazellulär. Koexpressionsuntersuchungen der kardialen  $\alpha 1$ -Untereinheit mit verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten zeigen eine unterschiedliche Beeinflussung der Aktivierung und Inaktivierung des Kalziumeinwärtsstroms durch die verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten ( 45, 51 ).

In einer Arbeit wurden die vier bisher klonierten  $\beta$ -Untereinheiten zusammen mit der auch im menschlichen Herzen nachgewiesenen  $\alpha 1A$ -Untereinheit in *Xenopus* Oocyten exprimiert ( 19 ). Wie erwartet, war der spannungsinduzierte Kalziumioneneinstrom bei der Koexpression der  $\alpha 1A$ -Untereinheiten mit allen verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten gegenüber der alleinigen Expression der  $\alpha 1A$ -Untereinheit deutlich in der Amplitude vergrößert. Bei der Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik zeigten sich dagegen signifikante Unterschiede:

Die Koexpression der  $\alpha 1A$ -Untereinheit mit der  $\beta 1$ -,  $\beta 3$ - und der  $\beta 4$ -Untereinheit führte zu einer Beschleunigung der Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik und zu einer Verschiebung der Aktivierungsschwelle um 20-25 mV in Richtung Hyperpolarisation. Die Koexpression der  $\alpha 1A$ -Untereinheit mit der  $\beta 2$ -Untereinheit führte dagegen zu einer Verlangsamung der Aktivierungs- und insbesondere der Inaktivierungskinetik, ohne die Aktivierungsschwelle zu verschieben ( 96 ).

Da bisher drei  $\alpha 1$ -Untereinheiten im menschlichen Herz nachgewiesen wurden (  $\alpha 1c$  ( 30 ),  $\alpha 1A$  ( 19 ),  $\alpha 1D$  ( 22, 23, 81 )) ist es künftig von besonderem Interesse, ob eine zellspezifische (kardiomyozytäre, neuronale und glattmuskuläre) Expression besteht, nachdem die  $\beta 1$ -Untereinheit ( 42 ), die  $\beta 2$ -Untereinheit ( 101 ) und in der vorliegenden Arbeit auch der Expressions-Nachweis der  $\beta 3$ -Untereinheit gelang.

### **2.6.4 Neurohumorale Modulation des Kalziumeinwärtsstroms und die $\beta$ -Untereinheit:**

In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, daß die  $\beta$ -Untereinheit an der Vermittlung der Regulation der kardialen Kalziumkanäle durch Proteinphosphorylierung und/ oder GTP-bindene Proteine beteiligt ist.

So vergrößert Isoproterenol über  $\beta$ -adrenerge Stimulation den Kalziumeinwärtsstrom um das 3-7fache entweder durch cAMP-vermittelte Phosphorylierung ( 74, 75 ) oder durch direkte Wirkung der aktivierten  $\alpha$ -Untereinheit des trimeren GTP-bindenden Proteins Gs auf die  $\alpha 1$ -Untereinheit ( 76 ). Möglich ist auch eine Kombination beider Regulationsmechanismen ( 83 ). Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß die cAMP-abhängige Proteinkinase die  $\beta 1$ -Untereinheit ( 40 ) und die  $\beta 2$ -Untereinheit ( 78 ) phosphoryliert. Die  $\beta 3$ -Untereinheit wird entsprechend den Sequenzdaten nicht phosphoryliert, da diese keine Konsensussequenz für



die cAMP-abhängige Phosphorylierung zeigen ( 45 ). Entsprechend wird im glattmuskulären Trachealmuskel des Kaninchens  $\beta$ -adrenerge Stimulation des Kalziumeinwärtsstroms über ein GTP-bindendes Protein vermittelt und nicht über Proteinphosphorylierung ( 77 ). Daher sind in verschiedenen Geweben verschiedene Regulationsmechanismen des Kalzium-Einwärtsstroms vermittelt durch unterschiedliche  $\beta$ -Untereinheiten wahrscheinlich.

Darüberhinaus konnte bei neuronalen Kalziumkanälen gezeigt werden, daß die Bindung inhibierender G-Protein-Untereinheiten (  $\beta/\gamma$  ) und die Bindung der  $\beta$ -Untereinheit an die  $\alpha 1$ -Untereinheit an überlappenden Regionen erfolgt und sich wechselseitig beeinflußt ( 34 ). Es kann daher gemutmaßt werden, daß die  $\beta$ -Untereinheit so die Inhibierung des Kalziumeinwärtsstroms durch inhibierende G-Protein-Untereinheiten verhindern kann ( 53, 79 ).

Ähnliche Ergebnisse sind aufgrund der Sequenzhomologie auch für die kardialen L-Typ-Kalziumkanäle zu erwarten.

### **3. Material und Methoden**

#### **Klonierung und Sequenzierung der $\beta$ 3-Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals aus humanem Myokard**

Alle Zellen eines Organismus enthalten in ihren Zellkernen ihre gesamte genetische Information. Wenn diese in der DNS gespeicherten Informationen zur Synthese von Zellbestandteilen in Form von Proteinen abgerufen werden, dann geschieht dies durch die Transkription, wobei anhand der DNS-Matrize ein RNS-Strang entsteht. Durch post-transkriptionales Spleissen entsteht aus der RNS ein mRNA-Strang, der die kodierende Information über die Zusammensetzung des Proteins aus dem Zellkern zum Ort der Proteinsynthese, den Ribosomen im endoplasmatischen Retikulum transportiert. Dort dient der mRNA-Strang als Matrize zur Synthese des Proteins. Dieser Vorgang wird als Translation bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurden die mRNA-Transkripte der  $\beta$ 3 Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals aus humanem linksventrikulärem Myokard isoliert (siehe 3.1), die kodierende Sequenz wurde analysiert (siehe 3.2) und die Gewebsexpression auf mRNA-Ebene charakterisiert (siehe 3.3).

#### **3.1 Klonierung der $\beta$ 3-Untereinheit:**

Die Isolierung der mRNA geschah in folgenden Schritten:

- 3.1.1. Präparation des Gewebes
  - 3.1.2. Isolation der mRNA aus dem gewonnenem Gewebe
  - 3.1.3. Transkription der mRNA in cDNS durch die reverse Transkription
  - 3.1.4. In vitro Amplifizierung der  $\beta$ 3-Untereinheit kodierenden cDNS mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR).
  - 3.1.5. Subklonierung der über PCR amplifizierten cDNS in Plasmidvektoren und Transformation in geeignete E. coli-Stämme
  - 3.1.6. Präparation der so weiter amplifizierten cDNS aus den vermehrten E. coli Stämmen.
- 3.2 Sequenzierung des eingebauten PCR klonierten DNS-Fragments.

Alle Klonierungsversuche erfolgten unter Einhaltung der S-1 Bestimmungen des deutschen Gentechnologie-Rechts. Die entsprechenden Genehmigungen liegen vor.

##### **3.1.1. Präparation des Myokardgewebes:**

Das zur mRNA-Präparation verwendete Myokardgewebe stammt von gesunden Spenderherzen, welche aufgrund operationstechnischer Umstände oder Gewichts-Mismatch zwischen Spender und Empfänger nicht als Transplantat verwendet werden konnten. Aus solchen Herzen wurden 10 – 20 g Myokardproben präpariert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Myokardgewebe von Patienten, die an ischämischer oder dilatativer Kardiomyopathie litten, stammt von explantierten, terminal insuffizienten Herzen, welche bei Herztransplantationen entnommen wurden. Die Entnahme und Verwendung der entnommenen Herzen für wissenschaftliche Untersuchungen erfolgte entsprechend der Genehmigung durch die Ethikkommission der LMU-München, Klinikum Großhadern.

### 3.1.2. Präparation der mRNS

Zur Präparation der gesamten RNS aus dem Myokardgewebe wurde das Isolierungsverfahren mit Trizol-Fertigreagens der Firma Gibco BRL Life Technologies verwendet. Es basiert auf der Guanidin-Thiozyanat-Methode nach Chirgwin et al ( 98 ) und besteht aus einer Kombination der Guanidin-Thiozyanat-Methode mit einer Phenol-Chloroform-Extraktion. Die Trizol-Reagenz ist eine monophasische Lösung von Phenol und Guanidinium-Thiozyanat. Beide Substanzen verhindern während der Homogenisation der Gewebeproben den Abbau der RNS durch die ubiquitär vorhandenen RNAsen. Dies wird erreicht vor allem durch die Ausfällung der RNAsen.

Der erste Schritt der mRNS Präparation besteht in der Homogenisation der Gewebeproben. Die Gewebeproben werden zunächst gewogen und in gefrorenem Zustand zwischen zwei Lagen eines Tuchs durch Hammerschläge zerkleinert. Danach wird das Gewebe mittels einer Messermühle ( Warring Blendor ) noch weiter pulverisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Metallbecher mit einem Volumen von 120 ml verwendet, die Messer haben eine Spannweite von 35mm. Die Geräteteile, welche direkt mit dem Gewebe in Kontakt kommen werden vorher für 2 Stunden bei 225°C sterilisiert. Die Homogenisierung wird in Gegenwart von flüssigem Stickstoff durchgeführt.

Das homogenisierte Gewebe wird dann in ein eisgekühltes steriles Becherglas überführt, danach erfolgt die sofortige Zugabe von 4°C kalter Trizol-Reagenz in einem Verhältnis von 1 ml Reagenz / 100 mg Gewebe.

Dieses Gemisch wird nun fraktionsweise in den Glaszylinder eines Glas-Teflon-Homogenisator überführt. Zum Gewebeaufschluß wird der Teflonstößel mit Hilfe einer Tischbohrmaschine mit 400U/min rotiert und wiederholt in den Glaszylinder eingeführt, bis das Gemisch zu einer homogenen Masse zerrieben ist.

Daraufhin wird das Gemisch in Zellulosenitrat-Röhrchen transferiert, die zuvor mit 10/9 Guanidinium/Isouthiozyanatlösung gespült wurden. Es folgt die Zentrifugation bei 9400 U/min bei 4°C für 5 min in einer Beckmann-Ultrazentrifuge ( SW-27 Rotor). Der Überstand wird mit einer Pasteur-Pipette abgenommen. Er enthält die Gesamt-RNS, die Phenol-Phase enthält die weiteren Zellbestandteile wie Membran und Proteine.

Nun wird Chloroform in einem Volumen von 20% zu der eingesetzten Trizol-Menge hinzugegeben, um das GTC und andere lipophile Substanzen aus der Lösung auszuwaschen. Dies geschieht durch 15 sekündiges kräftiges Rütteln und anschließende Inkubation bei Raumtemperatur. Nun wird wieder für 15 Minuten bei 9400 U/min und 4°C zentrifugiert.

Dann wird das verbliebene Volumen mit dem 2,5 fachen Volumen absolutem Ethanol versetzt, die RNS wird über 15 Minuten bei Raumtemperatur ausgefällt und anschließend durch Zentrifugation wie oben beschrieben abgetrennt. Der Ethanol-Überstand wird

dekantiert und das RNS-Pellet bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Danach wird die so präparierte Gesamt-RNS in 500 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> aufgenommen.

Um die auf diese Art und Weise gewonnene Menge an RNS quantifizieren zu können, wird eine Verdünnung von 1:50 hergestellt und deren UV-Absorption bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen. Der Absorptionskoeffizient für RNS bei 260 nm liegt bei 0.04 µg/l pro 1 OD und ermöglicht die Berechnung der Konzentration der RNS-Lösung. Der Quotient OD 280 nm/ OD 260 nm dient zur Reinheitsbeurteilung: wenn der Quotient OD 280 nm/ OD 260 nm über dem Wert von 1,8 liegt, ist eine gute Reinheit der RNS-Lösung erzielt. Dies traf auf alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Proben zu.

### 3.1.3 Präparation der mRNS über Poly(A)-Quick-Säulen

Dieses Verfahren bietet die Möglichkeit der Isolierung von mRNS aus präparierter Gesamt-RNS. Die Schwierigkeit bei der mRNS-Isolierung ist, daß der Anteil der mRNS an der Gesamt-RNS Menge einer Zelle nur ca. 0,01 – 0,1% ausmacht.

Das Prinzip dieses Verfahrens basiert auf der Struktur der mRNS, die als posttranskriptionelle Modifikation am 3'-Ende polyadenyliert ist und so einen "Schwanz" ( poly A-tail ) von 20-250 Adenyl-Resten aufweist.

Prinzip der Affinitätschromatographie ist die Bindung polyadenylierter mRNA an Cellulose-Säulenmatrix, die chemisch gebundene oligo-dT-Reste trägt. Durch die Bindung der Poly-Adenyl-3'-Enden der mRNS an die oligo-dT-Reste der Cellulose-Säulen wird die mRNS aus dem Gesamt-RNS-Gemisch selektiv zurückgehalten. Zur Elution werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Cellulose-Säulen und den mRNS-Molekülen mittels eines 65°C warmen salzfreien EDTA-Elutionspuffers gelöst.

Für die Vorbereitung des Säulenmaterials, zum Waschen der Säule, für die Elution und zur Aufbewahrung der Säule werden folgende Pufferlösungen benötigt:

- High-salt-Puffer ( 10 mM Tris-HCL pH 7.5, 1 mM EDTA, 0,5 M NaCl )
- Low-salt-Puffer ( 10 mM Tris-HCL pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl )
- Elutionspuffer ( 10 mM Tris-HCL pH 7.5, 1mM EDTA )
- 10x Sample-Puffer ( 10 mM Tris-HCL pH 7.5, 1 mM EDTA, 5 M NaCl )
- Storage-Puffer (10 mM Tris-HCL pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub> )

Die Poly ( A )-Quick-mRNS-Präparation beginnt mit der Vorbereitung der Chromatographie-Säulen. Die Plastikröhrchen mit der Suspension der Oligo-dT-Cellulose im Storage-Puffer wird senkrecht aufgestellt, damit die Cellulose sedimentieren kann. Gleichzeitig wird der Elutionspuffer bei 65°C prä-inkubiert. Mit einer 10ml-Spritze wird der Storage-Puffer mit einer Geschwindigkeit von ca. einem Tropfen / 2 sec. durch Luftdruck aus der Säule gepresst. Danach wird die Säule mit 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> gespült. Anschließend werden 200µl High-salt-

Puffer auf die Säule aufgetragen und ebenfalls durch Luftdruck mit einer Geschwindigkeit von ca. einem Tropfen alle 2 sec. aus der Säule gepresst.

Nun kann die mRNA-Separation beginnen. Es werden pro Versuch 500 µg Gesamt-RNS auf die Säule in einem Gesamt-Probenvolumen von 250µl aufgetragen. Zum Probevolumen pipettiert man 30µl 10x Sample-Puffer und 20µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>, so daß sich ein Gesamtvolumen von 300µl ergibt. Zur Lösung unspezifischer Wasserstoffbrücken innerhalb eines RNS-Moleküls oder zwischen verschiedenen RNS-Molekülen wird diese Lösung für 5min. bei 65°C inkubiert.

Danach werden die 300 µl Probenmischung auf die Säule aufgetragen und wieder durch die aufgesetzte 10ml Spritze langsam durch die Säule gepresst. Der Durchlauf dieses Vorgangs wird in einem Eppendorf-Cup aufgefangen und insgesamt zweimal auf die Säule aufgetragen.

Unspezifisch an die Säule gebundene RNS-Moleküle werden nun durch Waschen der Säule mit 2x je 200µl High-salt-Puffer mit einer Geschwindigkeit von 1 Tropfen pro sec. und anschließend durch 3maliges Waschen mit salzärmeren Low-salt-Puffer bei gleicher Geschwindigkeit entfernt.

Dann kann die mRNA eluiert werden. Dies geschieht in 4 Durchgängen mit je 200 µl 65°C warmen Elutionspuffer, wobei die Eluate vereinigt werden.

Der Erfolg der mRNA-Separation aus der Gesamt-RNS wird durch den Vergleich der UV-Absorptionen bei 260nm und 280nm bestimmt. Es werden Verdünnungen von 1:15 und 1:50 hergestellt und das OD 260/280-Verhältnis bestimmt, das >1,8 liegen sollte. Die Bestimmung der mRNA-Menge erfolgt wie oben beschrieben.

Nach der Elution wird die Säule gereinigt: 1 ml Elutionspuffer ( 65°C ) und 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> werden durch die Säule gepresst. Zur Aufbewahrung wird 1 ml Storage-Puffer auf die Säule pipettiert und darin das oligo-dT-Material suspendiert.

### **3.1.4 Reverse Transkription von mRNA:**

Um die aus dem Myokard isolierte mRNA in cDNA umzuschreiben, wird das Superscript Präamplifikationssystem der Firma Gibco BRL Life Technologies verwendet. Die in diesem Reaktionskit enthaltene reverse Transkriptase ist eine gentechnisch veränderte Variante der Moloney murine leukemia virus reversen Transkriptase.

Zur Initialisierung der reversen Transkription benötigt diese Transkriptase doppelsträngige Nukleinsäurebereiche: Diese werden durch Hybridisierung mit Oligonukleotiden, sogenannten Primern, gebildet. In dieser Arbeit wurden entweder oligo-dT-Primer oder "Random Hexamer Primer" verwendet, die aus einer Mischung von Oligonukleotiden mit einer Länge von 6 Basen bestehen, wobei alle statistisch möglichen Basenabfolgen als Oligonukleotide in dieser Mischung enthalten sind. Durch diese Zusammensetzung erreicht man eine Wahrscheinlichkeit der Komplementarität der eingesetzten Primer zu der eingesetzten mRNA von etwa einer Bindungsstelle eines "Random Hexamer Primers" alle 100 Basen an der mRNA.

Diese Stellen dienen dann der reversen Transkriptase als Ausgangspunkt zur cDNS-Synthese.

Der Vorgang beginnt mit dem Anlagern der Primer, dem sogenannten Annealing. Es werden 13 µl des Eluats (entsprechend 1 µg mRNA) aus der mRNA-Separation mit 1 µl random hexamer Primer ( 0.5 ng/µl ) versetzt und 10 Minuten bei 70°C inkubiert, um unspezifische komplementäre Basenpaarungen der mRNA aufzubrechen. Danach wird die Probe 1 min auf Eis gestellt und kurz bei 4°C im Impulsmodus bis 14000 U/min abzentrifugiert.

Zur reversen Transkription vereinigt man 2 µl 10x Synthese-Puffer ( 20mM Tris HCL pH 8.4, 50mM KCl, 25mg MgCl<sub>2</sub> ), 1 µl 10mM dNTP-Mix, 2 µl 0.1 M DTT und 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase ( 200 U/µl ) in einer Reaktion.

Die Cups werden für 10 min bei Raumtemperatur und anschließend für 50 min bei 42°C (optimale Reaktionstemperatur der reversen Transkriptase) inkubiert. Die hierbei ablaufende cDNS-Synthese wird durch eine Inkubation für 10 min bei 70°C beendet. Nach einminütiger Lagerung auf Eis wird wiederum im Impulsmodus kurz abzentrifugiert.

Um die eingesetzte mRNA abzubauen, wird 1 µl RNase H zupipettiert und die Cups werden 20 Minuten lang bei 37°C inkubiert zum vollständigen Verdau des mRNA-Anteiles des DNS/mRNA-Hybridstranges. Anschließend werden die Cups, die nunmehr nur noch die einsträngige cDNS enthalten, bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

### **3.1.5. PCR-Klonierung der Zielfragmente:**

Die PCR-Klonierung wird eingesetzt, um die Anzahl der cDNS-Moleküle zu erhöhen, die die kodierende Sequenz der β3-Untereinheit enthalten. Bei dieser Methode ist unbedingt darauf zu achten, daß DNS-Verunreinigungen des Versuchsansatzes vermieden werden.

Um Verunreinigungen zu vermeiden, wird die PCR ( Polymerase Chain Reaction ) unter einem Abzug mit Laminarflow durchgeführt. Die verwendeten Reagenzien werden in einem separaten Raum gelagert und alle verwendeten Geräte werden nach jedem Gebrauch mit 0.07 mM Na-Hypochlorit-Lösung gereinigt.

Für die PCR werden folgende Reagenzien verwendet:

Reaktionspuffer "PCR-Mix" ( 20mM Tris HCl pH 8.4, 50mM KCl, 1.4mM MgCl<sub>2</sub> )

dNTP-Mix ( 10mM dATP, 10mM dTTP, 10mM dCTP, 10mM dGTP )

Reaktionsspezifische Oligonukleotidprimer, die zum 5' oder 3' Ende der zu amplifizierenden cDNS-Sequenz komplementär sind

Die aus der mRNA revers transkribierte first strand cDNS

Rekombinante DNS-abhängige Taq-Polymerase ( 2.5 U/Ansatz, gentechnologisch aus dem *Thermus aquaticus* Gen YT 1 in *E.Coli* hergestellt ). Das Temperaturoptimum dieses Enzyms liegt bei 72°C und selbst Temperaturen von bis zu 94°C werden kurzfristig toleriert.

Nach dem Zusammenpipettieren des Reaktionsansatzes in ein Eppendorf-Cup werden 2 Tropfen Mineralöl auf den Reaktionsansatz gegeben, um Verdunstung der Reaktionslösung bei den hohen Temperaturen der folgenden Reaktionsschritte zu vermeiden.

Ein zweiter Reaktionsansatz ohne cDNS dient zur Kontrolle der Kontamination des Versuchs mit DNS.

Die PCR-Reaktion läuft in den Schritten

1. des Erhitzens zum Denaturieren der DNS,
2. dem Anlagern der Primer ( Annealing )
3. der DNS-Synthese

im Omnigene Temperature Cycler ( Firma Hybaid ) nach einem, je nach Versuchsansatz programmierten Zyklus-Programm ab.

Nach Ablauf des Programms pipettiert man das Mineralöl von dem Versuchsansatz ab, letzte Reste werden mittels zweimaliger Chloroform-Extraktion entfernt. Hierzu pipettiert man 100µl Chloroform in das Eppendorf-Cup, rüttelt für 30sec, zentrifugiert 5min lang bei 14000 U/min und nimmt anschließend äußerst behutsam den Chloroform-haltigen Überstand ab. Dieser Reinigungsvorgang wird zweimal durchgeführt. Es folgt die Präzipitation der DNS mit 100%igem Ethanol ( 2,5fache Menge des Überstands ) und 5M NaCl ( 0,1fache Menge des Überstands ), welches man zu der DNS in das Eppendorf-Cup pipettiert und dieses für 15min bei -80°C lagert.

Anschließend wird die ausgefällte cDNS durch Zentrifugation bei 4°C und 14000 U/min pelletiert. Es folgt ein Waschvorgang, um die für die Fällung zugegebenen Salze zu entfernen. Dazu werden 750 µl 70%iger auf -20°C gekühltes Ethanol in das Eppendorf-Cup mit der cDNS pipettiert und bei 4°C und 14000 U/min für 5min zentrifugiert. Nach Dekantieren des Ethanols werden die Eppendorf-Cups mit den DNS-Pellets in der Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 12µl 1 x Dye ( 50 mg Bromphenolblau, 20 ml H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>, 25 ml Glycerol, 5 ml 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ) gelöst.

In einer Elektrophorese mit einem 6%igen Polyacrylamidgel werden die PCR-Produkte nach Molekulargewicht separiert und nach Färbung des Gels mit Ethidiumbromid unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 312nm auf dem UV-Tisch sichtbar gemacht.

Mittels eines parallel auf das Gel aufgetragenden Markers wird die Größe der Bande mit dem cDNS-Zielfragment identifiziert und zur Weiterverarbeitung mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten.

### **3.1.6 Elektroelution:**

Die cDNS-Zielfragmente werden durch Elektroelution aus den ausgeschnittenen Gelstücken isoliert. Dazu wird folgendermaßen vorgegangen: die Gelstücke, die die Ziel-cDNS enthalten, werden in einen auf einer Seite offenen Dialyseschlauch ( ca.3x5 cm, Porengröße 0.6 µm ) überführt, in den anschließend 300 µl 1x TBE-Puffer ( 0,1 M HCl-Borat, 20 mM EDTA pH 8,0 ) pipettiert werden. Man streicht den Dialyseschlauch luftblasenfrei aus und klammert anschließend die noch offene Seite zu.

Der Dialyseschlauch wird jetzt in eine Elektroelutionskammer aus Plexiglas gelegt ( 10x10 cm, 5 cm Höhe ) in der an den Enden zweier gegenüberliegender Seiten jeweils ein Draht in 2 mm Höhe über die gesamte Breite gespannt sind. Die Kammer wird mit 1x TBE-Puffer gefüllt, so daß der Dialyseschlauch vollständig mit dem Puffer bedeckt ist. Die Kammer steht in einer mit Eis gefüllten Edelstahlwanne, um eine Übererwärmung des 1x TBE-Puffers während der Elektroelution zu vermeiden. Ein Aufschwimmen der Kammer während der Elektroelution in dem Eiswasser wird verhindert, indem ein Gewicht ( ca. 1 kg ) auf den Deckel der Kammer gestellt wird.

Die Drähte der Kammer werden an eine Stromquelle angeschlossen und bei 141 mA erfolgt die Elution der cDNS-Zielfragmente aus den Gelstücken. Nach 1,5 Stunden entnimmt man den Dialyseschlauch und legt ihn auf den UV-Tisch, um bei einer Wellenlänge von 312 nm zu kontrollieren, ob die mit Ethidiumbromid gefärbten cDNA-Fragmente vollständig aus dem Gelstück eluiert wurden. Ist dies geschehen, wird der Dialyseschlauch auf einer Seite geöffnet und das Dialysat vorsichtig abpipettiert und in ein Eppendorf-Cup überführt. Mit 100 µl 1x TBE wird der Dialyseschlauch gespült und diese Fraktion wird zu den 300 µl Dialysat pipettiert.

Es folgt die Zentrifugation bei 14000 U/ min, 4°C über 5 Minuten, um eventuell mitpipettierte Gelstücke abzutrennen. Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Cup überführt und das Volumen bestimmt.

Zur Präzipitation der cDNS gibt man das 2,5fache des bestimmten Volumens an eisgekühltem 100%igem Ethanol und das 0,1fache vom Volumen an 5 M NaCl hinzu, wobei zuerst das Ethanol zugegeben wird, dessen Menge sich nach dem errechneten Volumen des Dialysats zuzüglich des 5 M NaCl richtet.

Die Präzipitation erfolgt bei -80°C über 20 Minuten. Die DNS wird danach bei 14000 U/min, 4°C über 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und nach Waschen mit 750 µl 70%igem eisgekühltem Ethanol wird erneut zentrifugiert ( 14000 U/ min, 4°C, 5 min. ). Der Überstand wird wieder dekantiert und die pelletierte cDNA wird in der Speed-Vac vakuumgetrocknet und schließlich in H<sub>2</sub>O<sub>DNS</sub> zu einer Konzentration von 100 fM/ µl aufgenommen.

Die gelösten, durch die PCR-Methode amplifizierten cDNS-Fragmente werden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

### **3.1.7 Primer zur PCR-Klonierung:**

Anhand der 1996 von Murakami et al ( 84 ) veröffentlichten Gensequenz der β3-Untereinheit des humanen L-Typ Kalziumkanals aus der cDNS-Bibliothek menschlichen Schilddrüsen-Karzinom-Zellgewebes wählten wir die Oligonukleotidprimer (siehe Ergebnisteil) aus. Die verwendeten Primer sind so gewählt, daß sie zu Abschnitten der Gensequenz komplementär sind. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotidprimer

wurden nach unseren Vorgaben von der Fa. MWG Biotech synthetisiert und haben eine Länge von 18 - 24 Basen, in Abhängigkeit von der Nukleotidzusammensetzung der Primer. Ziel war es, Primer mit einer Schmelztemperatur (Annealing-Temperatur) von < 50°C zu erhalten.



Sense-Primer sind identisch zur 5'-3'-kodierenden Sequenz, Antisense-Primer sind komplementär zur 3'-5'-kodierenden Sequenz.

Folgende Primer wurden für die PCR-Amplifikation eingesetzt ( Positionsangaben bezogen auf veröffentlichte β3-Sequenz Murakami et al. ( 85 )):

RH 18:

5'---CTG GAG GAG GAC CGG GA(AG)---3'

Position 97 - 114, Sense-Primer

RH 19:

5'---A(AG)(AC) GC(CT) TTC TGC ATC AT(AG) TC---3'

Position 597 - 580, Antisense-Primer

RH 22:

5'---GAA GGC CAG CAG ATC TGG---3'

Position 399 - 416, Sense-Primer

RH 25:

5'---GGC TGC AGG AGG CTG TCA GTA GCT---3'

Position 1470-1447, Antisense-Primer

RH 28:

5'---CCA TGT ATG ACG ACT CCT AC---3'

Position -1-18, Sense-Primer

RH 29:

5'---TGG CCC TTT CGA GCT GCT G---3'

Position 166-148, Antisense-Primer

RH 44:

5'---GCG GCT AGT GAA AGA GGG CG---3'

Position 318-337, Sense-Primer

RH 45:

5'---TGG TTG ATG GTG TCA GCG TCC---3'

Position 827-807, Antisense-Primer

RH 46:

5'---TGT ATG ACG ACT CCT ACG TGC---3'

Position 2-22, Sense-Primer

RH47:

5'---TCG GTT GCC AAT GTC ACT C---3'

Position 450-432, Antisense-Primer

RH 48:  
5'---GCA GCT AGT AGT GTT GGA CG---3'  
Position 792-811, Sense-Primer

In den PCR-Versuchen wurden folgende Oligonukleotidprimerpaarungen verwendet:

RH 28 / RH 29  
RH 18 / RH 19  
RH 22 / RH 25  
RH 44 / RH 45  
RH 46 / RH 47  
RH 48 / RH 25

### **3.1.8. Subklonierung der amplifizierten cDNS-Fragmente:**

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Klonierungsstrategie war wie folgt:

Vom aminoterminalen Ende der kodierenden Sequenz der  $\beta$ 3-Untereinheit ausgehend amplifizierten wir diese in mehreren PCR-Versuchen mit folgenden Primerpaarungen: RH 28 - RH 29, RH 18 - RH 19, RH 22 - RH 25, RH 44 – RH 45, RH 46 – RH 47, RH 48 – RH 25. Diese Strategie wurde gewählt, da dadurch Amplifikationsprodukte entstehen, welche in unserem Labor nach Subklonierung sequenziert werden konnten. Des Weiteren können eventuell vorhandene Spleissvarianten des  $\beta$ 3-Gens durch alternative Expression von Exons identifiziert werden, da Isoformen unter Umständen nur gering unterscheidlich gross sind (so zum Beispiel ist das Exon 6 nur 20 Nukleotide gross).

Die Primer wurden so gewählt, dass in den Primern Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen enthalten sind. Dadurch können die Fragmente am amino- und karboxyterminalen Ende geschnitten werden, um sie einerseits in Plasmide klonieren zu können für die Sequenzierung ( zum Beispiel pUC 18 ) oder dann zur full-length Sequenz zusammengesetzt werden können.

### **3.1.9 Subklonierung und Transformation:**

Die durch die PCR-Methode gewonnenen cDNS-Fragmente der  $\beta$ 3-Untereinheit wurden in die spezielle Plasmide eingebaut ( zum Beispiel pUC 18 oder pSP 72 ) und in diesen Vektoren in Laborbakterienstämme transformiert und amplifiziert, um eine größere Menge der cDNS für die Sequenzierung zu erhalten.

Plasmide sind ringförmige DNS-Moleküle, die durch Bakteriophagen in Bakterien eingeschleust werden können. Sie liegen im Bakterienplasma in ringförmiger Struktur vor und besitzen eigene Startpunkte der Replikation.

Es gibt eine Vielzahl gentechnologisch veränderter Plasmide, die in bestimmten Bereichen ihrer ringförmigen DNS sogenannte "multiple cloning sites" enthalten, welche mehrere bekannte Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen besitzen. In diese Bereiche können

nach der Durchtrennung der doppelsträngigen Plasmid-DNS mit Restriktionsendonukleasen doppelsträngige DNS-Moleküle eingefügt werden, die man zuvor mit den gleichen Restriktionsendonukleasen aus einem DNS-Strang herausgeschnitten hat.

Dabei erleichtert eine Besonderheit der meisten Restriktionsendonukleasen das spätere Zusammenführen zweier, mit dem gleichen Enzym behandelten DNS-Stränge: die Durchtrennung der Einzelstränge erfolgt in palindromen Sequenzbereichen, wobei die Trennungsstellen am kodierenden und nicht-kodierenden Strang um einige Nukleotide verschoben sind. So entstehen sogenannte sticky ends, d.h. die Ränder der durchtrennten DNS weisen überhängende Enden eines Strangs auf, die sich mit DNS-Molekülen (z.B. klonierte cDNS) vereinigen lassen, die durch das gleiche Enzym durchtrennt wurden und somit komplementäre überhängende Enden aufweisen ( z.B. der Plasmid-DNS ).

Das Einfügen eines DNS-Strangs in ein Plasmid wird als Subklonierung bezeichnet. Mit dem jetzt wieder ringförmigen Plasmid als Träger ( Vektor ) werden so gezielt bestimmte DNS-Moleküle in Bakterien transformiert und durch exponentielle Vermehrung in der Bakterienzelle und der Bakterienzellen selbst amplifiziert.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmidvektoren pUC 18 ( Fa. Prayer) und pSP 72 ( Fa. Promega ) beinhalten dabei den Vorteil einer relaxierten Replikationskontrolle, was bedeutet, daß sie unabhängig von der Replikation des Wirts-Genoms vervielfältigt werden und so eine Menge von ca.  $10^{3-4}$  Klonierungsvektoren / Bakterium in den angelegten Kulturen vorhanden ist.

Durch die anschließende Präparation und Isolierung der eingesetzten cDNS erhält man so eine so eine große Menge Ziel-cDNS enthaltende Plasmid zur weiteren Bearbeitung.

### **3.1.10 Ligierung der cDNS in Plasmidvektoren:**

Die zuvor mit den beschriebenen Primerpaarungen durch die PCR-Methode amplifizierten und mittels spezieller Restriktionsendonukleasen geschnittenen cDNS-Fragmente wurden in die Plasmidvektoren kloniert, die mit den gleichen Restriktionsendonukleasen im Bereich der multiple cloning site geschnitten wurden

Die Plasmid-Vektoren werden für die Ligierung mit Restriktionsendonukleasen an den sogenannten multiple cloning sites geöffnet, d.h. die zirkuläre doppelsträngige Plasmid-DNS wird durchtrennt und die, mit den gleichen Restriktionsendonukleasen aus den PCR-Klonierungs-Produkten gewonnene cDNS, kann jetzt in das Plasmid ligiert werden. Da komplementäre Enden des gleichen Moleküls aus thermodynamischen Gründen a.e. mit sich selbst religieren, werden diese durch die bakterielle Phosphatase entfernt, die 3'-Phosphat-Reste abgebaut.

Hierfür werden 2 µg Plasmid-DNS in 93 µl H<sub>2</sub>O mit 5µl 1 M Tris-Puffer pH 8 und 2 µl bakterielle alkalische Phosphatase ( 75 U/µl ) gemischt und bei 65°C für 2h inkubiert. Anschließend wird nach einer Phenol/Chloroform Extraktion ( 1:1 ) die Plasmid-DNS mit 100%igem Ethanol und 5M NaCl aus dem wässrigem Überstand der Extraktion präzipitiert und die Plasmid-DNS mit 70%igem Ethanol ausgewaschen. Nach einer Vacuumtrocknung wird die Plasmid-DNS in H<sub>2</sub>O aufgenommen und 2 µl der gelösten Plasmid-DNS ( 25 fM/µl ) werden mit 4 µl 5x Ligase-Puffer ( 250 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM ATP,

5 mM DTT, 25% ( w/v) PEG 8000 ), 13  $\mu$ l des geschnittenen PCR-Produktes ( 10 fM/ $\mu$ l ) und 1  $\mu$ l T4-DNS-Ligase in ein Eppendorf-Cup pipettiert und bei 14°C über Nacht inkubiert.

### **3.1.11 Transformation der Plasmidvektoren in Bakterien:**

Wir verwendeten die Epicurian Coli XL1-Blue MRF kompetenten Zellen ( Fa. Stratagene ), die nach einem modifizierten Protokoll von Hanahan et al. ( 99 ) für die Aufnahme von DNS-Plasmiden vorbereitet wurden.

Die in Aliquots von 150  $\mu$ l bei -80°C aufbewahrten Bakterienzellsuspensionen werden auf Eis aufgetaut und mit 150  $\mu$ l einer Mischung bestehend aus 20  $\mu$ l Ligierung, 115  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, und 15  $\mu$ l 10 x CM-Puffer ( 100 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 400 mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O ) versetzt und durch vorsichtiges Auf-und Abpipettieren gemischt.

Man beläßt die Mischung 12 min lang auf Eis, inkubiert 4 min bei 25°C, stellt die Mischung wieder für 6 min auf Eis und inkubiert dann nochmals für 10 min bei 25°C.

Anschließend verdünnt man den Ansatz mit 1500  $\mu$ l LB-Nährmedium und überführt die Gesamtmenge ein steriles 10 ml Röhrchen und inkubiert 60 min bei 37°C und 125 U/min auf einem beheiztem Rütteltisch.

Nun werden je 150  $\mu$ l der Suspension auf Agarplatten ( mit Ampicillin-Zusatz als Selektionsmarker bei Ampicillin-Resistenz des transfizierten Plasmids) ausplattiert und im Brutschrank über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Rest der Suspension wird 10 min lang bei Raumtemperatur mit 3500 U/min zentrifugiert, der Überstand wird dekantiert, das Bakterien-Pellet am Boden des Röhrchens in 150  $\mu$ l LB-Medium unter langsamen Rütteln auf dem Tischrüttler gelöst und diese im Vergleich zur ersten Ausplattierung ca. 10 x höher konzentrierte Suspension wird nun ebenfalls auf Agarplatten ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Morgen erfolgt die Auswertung durch Auszählung der Bakterienkulturen auf den Agarplatten. Nun werden die Bakterienkulturen entweder sofort weiterverarbeitet oder können für einige Wochen im Kühlraum bei 4°C gelagert werden.

### **3.1.12 DNS-Mini- und Midipräparation:**

Für die DNS-Präparation wurden in dieser Arbeit zwei Methoden angewendet, die sich in der Menge der präparierten DNS unterscheiden.

Bei der sogenannten DNS-Minipräparation können pro Ansatz ca. 10-20  $\mu$ g DNS gewonnen werden. Hierzu beimpft man je 7 ml autoklaviertes LB-Medium ( LB= Luria-Broth ) ( 10 g Bacto Trypton, 5 g Bacto Yeast, 5 g NaCl, 1 g Glucose, 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>demineralisiert</sub> ) mit 100  $\mu$ g Ampicillin / ml in Reagenzgläsern mit Schraubdeckeln mit einzelnen Bakterienklonen von den Agarplatten der Transformation, indem man vorsichtig mit autoklavierten Zahnstochern Teile der Bakterienplaques von der Agarplatte in das LB-Medium gibt.

Die folgende Inkubation erfolgt bei 37°C und 225 U/min auf dem beheiztem Rütteltisch für etwa 16 Stunden.

Vor der Weiterverarbeitung der Bakterienkulturen beimpft man wiederum ampicillinhaltige Agarplatten mit je einem Tropfen aus den Kulturen, inkubiert bei 37°C für mindestens 8 Stunden im Brutschrank und lagert die Platten bei 4°C im Kühlraum und hat so jederzeit die Möglichkeit der Wiederholung der folgenden Präparation mit dem gleichen Bakterienklon.

Die 16 Stunden lang inkubierten Bakterienkulturen werden in sterile Plastikröhrchen gegeben und in der Tischzentrifuge 10 min. lang mit 3500 U/min zentrifugiert, anschließend wird der Überstand dekantiert und die Bakterienpellets in 100 µl eisgekühlten GET-Puffers ( 50 mM Glukose, 10 mM EDTA pH 8, 25 mM TrisHCl pH 8 ) unter vorsichtigem Rütteln resuspendiert und in sterile Eppendorf-Cups überführt.

Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden 200 µl eisgekühlter frisch hergestellter 2N NaOH und 1%iger SDS-Lösung hinzugegeben, um die Bakterienzellwände zu lysieren. Man schwenkt nach Zugabe der Lösungen den Ständer mit den Eppendorf-Cups 5 mal und gibt die Cups danach 5 min lang auf Eis.

Es folgt die Präzipitation der chromosomalen DNS durch Zugabe von 150 µl eisgekühlter 3 M KOAc und anschließendes starkes Rütteln auf dem Tischrüttler für 10 Sekunden. Danach gibt man die Eppendorf-Cups wieder für 5 min auf Eis und zentrifugiert dann in der Tischzentrifuge bei 4°C, 14000 U/min 10 min lang. Der Überstand wird in neue Eppendorf-Cups überführt und nochmals 5 min bei 4°C und 14000 U/min zentrifugiert, um anschließend durch Zugabe von 5 µl RNaseA die noch vorhandene RNS in den Ansätzen zu verdauen. Dies geschieht während einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C.

Es schließt sich eine Phenol/Chloroform- und eine Chloroform-Extraktion an, um eventuell noch vorhandene Proteine und Lipide sowie die RNaseA zu entfernen. Der nächste Schritt dient der Präzipitation der gelösten DNS; dazu gibt man das 2.5 fache des Volumens an eisgekühltem 100%igem Ethanol hinzu und fällt die DNS während 20 minütiger Aufbewahrung der Eppendorf-Cups bei -80°C aus.

Bei der anschließenden Zentrifugation ( 14000 U/min, 4°C, 10 min ) lagert sich die DNS am Boden der Cups in Form eines Pellets ab, das nach Dekantieren des Überstands und Waschen durch Zugabe von 750 µl 70%igen eisgekühlten Ethanol, nochmaliges Zentrifugieren ( 14000 U/min, 4°C, 5 min ) und Dekantieren des Ethanol, in der Vakuumzentrifuge getrocknet wird.

Nun wird das DNS-Pellet in 18.8 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Um kontrollieren zu können, ob die gewonnene DNS die Fragmente enthält, die in den Bakterienkulturen amplifiziert werden sollten, werden 2 µl der DNS-Lösung mit Restriktionsendonukleasen und entsprechenden Puffern versetzt, deren Schnittstellen in den Zielfragmenten bekannt sind und damit auch die Länge der DNS-Stücke, die nach dieser enzymatischen Zerschneidung entstehen. Durch gelelektrophoretische Auftrennung werden diese durch Vergleich mit einem DNS-Marker anhand ihrer Länge identifiziert.

Hat man so überprüft, ob die klonierte DNS in den restlichen 16.8 µl der Lösung enthalten sind, wird diese bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Die zweite Methode zur DNS-Präparation ist die Midipräparation, für die in der vorliegenden Arbeit der Qiagen Midi-Prep Kit verwendet wurde, dessen Anwendung eine Gewinnung von bis zu 1000 µg DNS pro Ansatz ermöglicht.

Bakterienklone, bei denen in einer zuvor durchgeführten Mini-Präparation nachgewiesen werden konnte, daß sie die transformierten Plasmidvektoren mit den DNS-Zielfragmenten enthalten, werden zum weiteren Wachstum in 2 Reagenzgläser mit je 7 ml LB- mit Ampicillin ( siehe oben ) auf dem beheizten Rütteltisch bei 37°C und 225 U/min 16 Stunden lang inkubiert.

Nach dieser Präinkubation gibt man die Kulturen in 500 ml LB-Medium mit Ampicillin und läßt sich die Bakterien weiter bei 37°C, 225 U/min auf dem beheizten Rütteltisch vermehren, bis der Ansatz bei 600 nm Wellenlänge eine optische Dichte von 1.0 bis 1.5 aufweist.

Anschließend werden die 500 ml Bakteriensuspension in zwei Zentrifugenflaschen für die Sorvall-Zentrifuge aufgeteilt und bei 4°C, 6000 U/min 15 min lang zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und das Bakterienpellet am Boden der Zentrifugenflaschen wird auf Eis mit 10 ml P1-Puffer ( 100 µg/ml RNase A, 50 mM Tris HCl, 10 mM EDTA pH 8.0 ) vorsichtig resuspendiert.

Man gibt dann die 10 ml Bakteriensuspensionen in zwei TI-60 Ultrazentrifugen-Röhrchen, fügt je 5 ml P2-Lysepuffer ( 200 mM NaOH, 1% SDS ) hinzu und mischt durch 5 maliges "top-bottom" Drehen. Während der anschließenden 5 minütigen Inkubation werden die Bakterienzellwände lysiert und nach Zugabe von je 5 ml P3 Neutralisationspuffer und abermaligem wiederholten "top-bottom" Drehen wird während einer 20 minütigen Lagerung auf Eis die DNS ausgefällt.

Nach Austarierung der 2 Röhrchen gegeneinander zentrifugiert man in der Ultrazentrifuge die Bakteriensuspension bei 4°C, 35000 U/min 30 min lang und reinigt die DNS weiter, indem der Überstand der Ultrazentrifugation über eine Qiagen-Midiprep Säule gegeben wird, die vorher mit 10 ml QBT-Äquibrierungspuffer ( 750 mM NaCl, 50 mM MOPS ( Morpholino-Propansulfonsäure ), 15% Ethanol pH 7.0, 0.15% Triton X-100 aktiviert wurde.

Die im Überstand enthaltene DNS wird an Bestandteile der Säule gebunden und kann nach Waschung der Säule mit insgesamt 60 ml QC-Puffer ( 1M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol pH 8.5 ) mit 15 ml QF-Puffer ( 1.25 M NaCl, 50 mM Tris HCl, 15% Ethanol pH 8.5 ) aus der Säule eluiert werden.

Das Eluat wird in einem sterilen 30 ml Corex-Röhrchen aufgefangen. Die Präzipitation der DNS erfolgt durch Zugabe von 10.5 ml Isopropanol 100% ( ca. 0.7 V / V ) und Lagerung bei 4°C über Nacht.

Am nächsten Morgen wird die ausgefallene DNS in der Sorvall-Zentrifuge bei 4°C, 11000 U/min, 30 min abzentrifugiert und nach Dekantieren des Überstands mit 15 ml eisgekühlten 70%igen Ethanol gewaschen und nach nochmaliger Zentrifugation in der Sorvall-Zentrifuge bei 4°C, 11000 U/min für 5 min wird das DNS-Pellet an der Luft getrocknet und zuletzt in 500 µl 1xTE Puffer pH 7.4 aufgenommen.

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgt im Photometer bei 260 nm und 280 nm Lichtwellenlänge mit den Verdünnungsstufen 1:15 und 1:25 (wie oben beschrieben).

Bis zur weiteren Verarbeitung kann die gelöste DNS bei -20°C gelagert werden.

### **3.2 Sequenzierung der cDNS der $\beta$ 3-Untereinheit:**

Die durch die Minipräparation und die Midipräparation gewonnene DNS enthält Teile der cDNS der  $\beta$ 3 Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals.

Die cDNS ist in die ringförmige, doppelsträngige DNS bestimmter Plasmidvektoren wie z.B. pUC 18 eingebaut an bestimmten dafür vorgesehenen Stellen, den sogenannten multiple cloning sites. An den Enden der Multiple Cloning Sites befinden sich bestimmte Sequenzen, die als Bindungsstellen für „Sequenzierungs-Primer“ dienen ( bei pUC 18 z.B. pUC Forward und pUC Reverse ).

Die in der vorliegenden Arbeit zur Sequenzierung angewandte Kettenabbruch-Methode wurde erstmals 1977 von Sanger ( 100 ) beschrieben.

Nach der Denaturierung der doppelsträngigen DNS durch Alkalizugabe, Erhitzen auf 65°C und anschließend stufenweiser Abkühlung, kommt es zur Anlagerung der spezifischen Sequenzierungs-Primer ( hier pUC Forward / Reverse ) an die nunmehr in Einzelsträngen vorliegende DNS. Dieser Schritt wird als Hybridisierungsreaktion bezeichnet.

Die durch die Bindung der Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige DNS entstandenen doppelsträngigen Bereiche dienen als Startpunkte der Synthese eines radioaktiv markierten cDNS Strangs durch die DNS-Polymerase in 4 Reaktionsansätzen. Diese unterscheiden sich dadurch, daß in jedem Ansatz neben dem mit <sup>35</sup>S radioaktiv markierten Deoxynukleotiden dATP sowie dTTP, dGTP und dCTP (= dNTPs = 2' Deoxy-Nukleosid-5'-Triphosphate ), jeweils ein Dideoxy-Nukleotid (= ddNTPs = 2',3'-Dideoxy-Nukleosid-5'-Triphosphate ) im Verhältnis von 1 : 10 vorhanden ist.

Werden diese ddNTPs durch die T7-DNA-Polymerase in den wachsenden DNA-Strang eingebaut, kommt es zum Abbruch der Kettenverlängerung, da die 3.-Hydroxylgruppe des Ribosylrests zur Verbindung mit dem nächsten dNTP fehlt. Da der Kettenabbruch statistisch an jeder Einbaustelle des in den vorliegenden 4 Ansätzen enthaltenen ddNTPs mehrfach geschieht, liegen in den Ansätzen nach einer gewissen Reaktionszeit viele unterschiedlich lange DNS-Stränge vor, die mit einem je nach Ansatz unterschiedlichen ddNTP enden.

Werden die Ansätze nun in nebeneinander liegenden Kammern auf ein Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt, kann man die unterschiedlich langen DNS-Fragmente jedes Ansatzes unterscheiden und im Vergleich mit den parallel aufgetragenen DNS-Fragmenten der 3 anderen Ansätze die DNS-Sequenz in Form eines Leiterdiagramms vom Gel, bzw. vom Röntgenfilm ablesen.

### 3.2.1 Sequenzierungsprotokoll:

In der vorliegenden Arbeit wurde der Sequenzierungskit der Fa. USB/Amersham verwendet, der folgende Bestandteile enthält:

- 5x Sequenase-Puffer ( 200 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM NaCl )
- 0,1 M Dithiothreitol-Lösung
- 5xdGTP Labeling-Mix ( 7,5 μM dGTP, 7,5 μM dCTP, 7,5 μM dTTP, 7,5 μM dATP )
- ddG Termination-Mix ( 80 μM dGTP, 80 μM dATP, 80 μM dCTP, 80 μM dTTP, 8 μM ddGTP, 50 mM NaCl )
- ddA Termination-Mix ( 80 μM dGTP, 80 μM dATP, 80 μM dCTP, 80 μM dTTP, 8 μM ddATP, 50 mM NaCl )
- ddG Termination-Mix ( 80 μM dGTP, 80 μM dATP, 80 μM dCTP, 80 μM dTTP, 8 μM ddCTP, 50 mM NaCl )
- ddT Termination-Mix ( 80 μM dGTP, 80 μM dATP, 80 μM dCTP, 80 μM dTTP, 8 μM ddTTP, 50 mM NaCl )
- Stop-Solution ( 95% Formamid, 20 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylen-Cyaleen FF )
- Sequenase Version 2,0 T7 DNS-Polymerase

Außerdem werden <sup>35</sup>S-α-dATP ( Fa. Dupont ), H<sub>2</sub>O ( bei 121°C, 15 min. autoklaviert ) und 1xTE Puffer pH 7,4 ( 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8,0 ) zur Verdünnung der Sequenase verwendet.

Die Oligonukleotidprimer für die Sequenzierungsreaktion werden anhand der Plasmidvektoren ausgewählt, in die das jeweilige Fragment der cDNS kloniert wurde, das sequenziert werden soll. Für den pUC 18 Vektor sind dies die Primer pUC Forward und pUC Reverse, für den pSP 72 Vektor die Primer T7 und SP6. Die Primer sind in einer Konzentration von 5 pmol/μl gelöst.

Der erste Arbeitsschritt der Sequenzierung ist die Herstellung einzelsträngiger DNS-Templates aus der doppelsträngigen Plasmid DNS aus der Minipräparation nach einem Reinigungsschritt.

Dem folgt die Denaturierung der doppelsträngigen DNS in Einzelsträngige durch Alkalisierung.

Dazu gibt man zu 16,8 μl DNA-Lösung ( aus der Minipräparation, siehe oben ) 3,2 μl 5 M NaCl-Lösung und 20 μl 13%ige PEG 8000-Lösung und mischt diesen Ansatz durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren und beläßt ihn für 60 min auf Eis zur Präzipitation der DNS.



Während der folgenden Zentrifugation bei 4°C, 14000 U/min, 10 min bildet sich ein DNS-Pellet am Boden des Eppendorf-Cups.

Der Überstand wird vorsichtig und möglichst vollständig abpipettiert. Anschließend wird 750 µl eisgekühltes 70%iges Ethanol auf das DNS-Pellet gegeben und nochmals zentrifugiert ( 4°C, 14000 U/min, 10 min ), was der weiteren Reinigung dient.

Der Überstand wird dekantiert und die DNS im Vakuumtrockner durch Verdunstung von Flüssigkeitsrückständen befreit. Die gereinigte DNS wird nun in 20 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

Die Sequenzierung erfolgt gleichzeitig in zwei getrennten Ansätzen für die Sense- und die Antisense Sequenz der in das Plasmid klonierten cDNS. In jedem Ansatz wird einer der beiden, zum Sense- oder Antisensestrang der Plasmid-DNS komplementären Primer eingesetzt. Die Denaturierung der DNS erfolgt nach Aufteilung der Template-Lösung in zwei Aliquots zu je 10 µl. Zu jedem Aliquot werden 50 µl frisch hergestellte 0,4 N Natronlauge und 40 µl H<sub>2</sub>O gegeben, wodurch unter alkalischer Wirkung die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden DNS-Strängen gelöst werden und so die DNS zu je zwei Einzelsträngen denaturiert wird. Nach der Inkubation über 5 min bei 25°C folgt die Präzipitation der Einzelstränge durch anschließende Zugabe von 330 µl, 100%igem eisgekühlten Ethanol und 10 µl 3 M NaOAc pH 5,07 pro Ansatz bei -80°C.

Danach werden die präzipitierten Einzelstränge durch 15 minütiges Zentrifugieren bei 4°C mit 14000 U/ min pelletiert. Der Überstand wird dekantiert und das DNS-Pellet wird durch Zugabe von 750 µl 75%igen, eisgekühlten Ethanol und anschließende Zentrifugation ( 4°C, 14000 U/min, 5 min ) gewaschen und getrocknet.

Zur Sequenzierung wird die DNS in je 6 µl H<sub>2</sub>O<sub>DNS</sub> gelöst und pro Ansatz werden 2 µl Sequenase-Puffer und 2 µl Primer hinzugegeben. Die Anlagerung der Oligonukleotidprimer an die einsträngige DNS, das sogenannte Annealing erfolgt durch Erhitzen des Ansatzes in 65°C warmen Wasser und nachfolgendes Abkühlen des Reaktionsansatzes auf 37°C über 30 min, gefolgt von 5 Minuten bei 25°C.

Vor dem Start der Sequenzierungsreaktion stellt man die Eppendorf-Cups noch ca. 2 Minuten lang auf Eis.

Zur Sequenzierung werden zu den 10 µl Template-DNS mit angelagerten Oligonukleotidprimern 1 µl 0,1 M Dithiothreitol ( DTT ), 2 µl Labeling-Mix ( 5x Labeling-Mix 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnt ), 1 µl <sup>35</sup>S-α-dATP und 1,5 µl Sequenase 2.0 ( 1:6 mit TE-Puffer pH 7,4 verdünnt ) in das Eppendorf-Cup pipettiert. Um bei beiden Ansätzen einen zeitgleichen Ablauf der Reaktion zu erreichen, pipettiert man die einzelnen Substanzen an die Wand des Eppendorf-Cups, wo sie durch Adhäsionskräfte in Tropfenform haften, bis zum Reaktionsstart die Vermischung durch kurzes Abzentrifugieren erfolgt.

Die beiden Ansätze werden für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert und während dieser Zeit werden die Einzelstränge durch die DNS-Polymerase, ausgehend von den angelagerten Oligonukleotidprimern unter Einbau der <sup>35</sup>S-α-dATP in die wachsenden DNS-Stränge komplementär ergänzt.

Inzwischen bereitet man die Kettenabbruchreaktion vor. Für jede der beiden, in den zwei Eppendorf-Cups ablaufenden DNS-Polymerisierungsreaktionen, werden in 4 Eppendorf-Cups je 2,5 µl Termination-Mix-ddGTP, bzw.-ddATP,-ddTTP oder -ddCTP pipettiert und auf 37°C vorgewärmt.

Im zeitlichen Abstand von je 30 sec. werden aus den beiden Reaktionsansätzen je 3,5 µl in die 4 Eppendorf-Cups mit den unterschiedlichen Termination-Mixes gegeben.

Jeder der 8 Ansätze inkubiert nun 15 min lang im Heizblock und während dieser Zeit setzen sich in den 8 Reaktionsansätzen die DNS-Kettenverlängerungen fort, bis ein Dideoxynukleotid eingebaut wird. So entstehen in jedem einzelnen Ansatz viele DNS-Stränge, die unterschiedlich lang sind.

Nach genau 15 Minuten werden in der gleichen Reihenfolge wie zuvor der Termination-Mix, in jedes Eppendorf-Cup 4 µl Stop-Solution zupipettiert, die die Polymerisation stoppt. Nach der Zugabe der Stop-Solution werden die Eppendorf-Cups sofort auf Eis gestellt.

Jetzt werden die Reaktionsprodukte durch vertikale Gelelektrophorese im Gelstand Phero-var ( Fa. Biotec Fischer ) aufgetrennt.

Zuerst wird das Gel gegossen. Das Sequenzigel wird in einem Glaskolben angesetzt und beinhaltet folgende Bestandteile: 8 ml Sequagel-Konzentrat ( 25% Acrylamid/ Bisacrylamid 19:1, 8,3 M Harnstoff ), 28 ml Sequagel-Verdüner ( H<sub>2</sub>O, 8,3M Harnstoff ) und 4 ml Sequagel-Puffer ( 10x TBE-Puffer ( 1 M Tris-Borat, 20 mM EDTA pH 8,3 ), 8,3 M Harnstoff ).

Die Polymerisation wird durch Zugabe von 35 µl TEMED ( Tetraethylethylendiamin ) und 80 µl APS ( Ammoniumpersulfat 10% ) gestartet. Das noch flüssige Gel wird zwischen zwei 20x40 cm große Glasplatten gegossen, wobei eine Platte an einer kurzen Seite im Abstand von einem Zentimeter vom Rand zwei Zentimeter tief ausgeschnitten ist. Die langen Seiten werden durch Plastik-Spacer auf einem Abstand von 0,5 mm gehalten und die Ränder bis auf die Oberseite mit dem einseitigen Ausschnitt mit Klebeband abgedichtet, um ein Ausfließen des Gels zu verhindern. Während des Gießens ist streng darauf zu achten, daß keine Luftblasen zwischen den Glasplatten die Kontinuität des Gels unterbrechen. Das luftblasenfreie Gießen gelingt am besten, wenn die Glasplatten zuvor möglichst von jeglichen Verschmutzungen und Staubkörnern befreit wurden und der Gießvorgang ohne Abreißen des Gelfilms zwischen den Gasplatten geschieht.

Nach dem Gießvorgang wird ein planer Spacer an der Oberseite so eingelegt und festgeklammert, daß er einige Millimeter in das Gel hineinreicht. Die Polymerisation dauert ca. eine Stunde.

Nach der Polymerisation entfernt man den planen Spacer an der Oberseite und das Klebeband von den langen Seiten und der Unterseite und stellt das Gel aufrecht in den Gellaufstand, wo es so fixiert wird, daß oben und unten ein direkter Kontakt zu den Pufferreservoirien besteht mit der ausgeschnittenen Platte dem oberen Reservoir zugewandt. Die Pufferreservoirie werden mit 1x TBE ( siehe oben ) gefüllt.

Auf der Vorderseite der Glasplatten wird eine ca. 2mm dicke Metallplatte von 15x35 cm festgeklammert, die eine möglichst gleichmäßige Temperaturverteilung innerhalb des Gels während des Gellaufs ermöglichen soll und somit eine möglichst homogene Laufgeschwindigkeit der DNS-Banden unabhängig vom Auftragungsort erzielen soll ( mittig aufgetragene Banden durchlaufen das Gel meist schneller als am Rand aufgetragene Banden gleicher Länge und Ladung, aufgrund der höheren Temperatur und damit niedrigeren Viskosität im mittleren Gelbereich = Hängematteneffekt ).

An der Oberseite wird ein Shark-tooth-Kamm von der ausgeschnittenen Seite her zwischen die Glasplatten eingeschoben, bis die Zähne 1-2 mm tief in das Gel hineinreichen und Taschen von 3 mm Breite bildet.

Vor dem Auftragen der Ansätze und der gelelektrophoretischen Auftrennung werden die Proben bei 90°C 3 Minuten im Heizblock inkubiert, um neugebildete unspezifische Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen oder innerhalb der DNS-Moleküle zu lösen. Danach stellt man die Cups mit den Sequenzierungsansätzen noch für 5 Minuten auf Eis, zentrifugiert im Impulsmodus kurz ab und pipettiert 4 µl aus jedem Ansatz in eine Geltasche, die zuvor ca. 5x mit 1x TBE mittels einer Spritze mit aufgesetzter Kanüle gespült wurde. Als Reihenfolge der Ansätze wurde in der vorliegenden Arbeit nach den, in den Ansätzen enthaltenen Dideoxynukleotiden, die Abfolge G-A-T-C gewählt.

Die elektrophoretische Trennung der DNA-Banden erfolgt bei 25 W, entsprechend 1700-1800 V. Um einen möglichst langen Abschnitt der sequenzierten DNS lesen zu können, erfolgt in freigebliebende Geltaschen ein zweiter und ggf. dritter Probenauftrag ( nochmals in der gleichen Reihenfolge Auftrag von je 4 µl der Ansätze, wenn die Xylencyanolfront des Markers 50-60% des Gels durchlaufen hat ) .

Die elektrophoretische Trennung wird beendet, wenn die Bromphenolblaufront der zweiten / dritten Aufträge den Unterrand des Gels erreicht hat.

Jetzt wird das Gel aus dem Ständer genommen und waagrecht hingelegt, um die Spacer vorsichtig entfernen zu können und anschließend die Glasplatten durch Anheben der oberen Platte mit einem dünnen Spatel äußerst vorsichtig zu trennen. Dabei ist darauf zu achten , daß das hauchdünne Gel an einer der beiden Platten haften bleibt und nicht verzogen wird.

Auf das Gel wird ein auf Gelgröße zurechtgeschnittenes 3M-Whatman Filterpapier gelegt und vorsichtig festgedrückt. Danach haftet das Gel am Filterpapier und kann von der Glasplatte genommen werden. Nach ca. 80 min Trocknung im Geltrockner bei 80°C legt man das immer noch auf dem Filterpapier haftende Gel im Dunkelraum unter Rotlicht in eine Autoradiographiekassette und direkt auf das Gel einen unbelichteten Röntgen-Film um diesen über einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden zu belichten.

Nach der Entwicklung des Films kann man die Sequenz der DNS in Form einen Leiterdiagramms ablesen.

### **3.3. Expressionsanalyse durch Northern-Blotting:**

Das Northern Blotting dient der spezifischen mRNA-Expressionsanalyse in Geweben und Zellkulturen. Das Verfahren basiert auf der Hybridisierung der isolierten, gelelektrophoretisch aufgetrennten mRNA mit spezifischen radioaktiv markierten Sonden. Die in der vorliegenden Arbeit zur Isolierung der mRNA aus Myokardgewebe angewendeten Methoden wurden bereits beschrieben.

### 3.3.1 Gelelektrophoretische Separation der mRNS:

Die aus den Geweben oder Zellkulturen gewonnene gesamte mRNS wird gelelektrophoretisch aufgetrennt. Durch Vergleich mit einem RNS-Standard-Marker, der auf einer separaten Bahn parallel im Gel mitläuft und mehrere RNS-Fragmente bekannter Länge enthält, kann eine Aussage über die Größe der Hybridisierungssignale gemacht werden.

Man beginnt mit der Vorbereitung des Laufpuffers, in der vorliegenden Arbeit wurde ein 10 mM Natriumphosphat-Puffer verwendet. Dazu werden 3,9 ml 1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung und 6,1 ml 0,5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösung mit 990 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  gemischt.

Gleichzeitig können im gleichen Arbeitsschritt die Waschlösungen verschiedener Salzkonzentrationen ( siehe unten, Waschen des Northern Blots ) hergestellt werden. Alle beschriebenen Lösungen und das Wasser zum Arbeiten mit RNS (  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  ) werden bei  $121^\circ\text{C}$  15 Minuten lang autoklaviert.

Für das Agarose-Gel werden 1 g Agarose in einen hitzesterilen Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 0,78 ml 1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung, 1,22 ml 0,5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösung und 198 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  gemischt. Zum Lösen der Agarose stellt man den Erlenmeyerkolben in die Mikrowelle und erhitzt den Inhalt bei 230 W, wobei der Kolben etwa alle 2-3 Minuten zum Schwenken herausgenommen wird. Nach vollständiger Lösung der Agarose wird der Kolben in ein  $50^\circ\text{C}$  warmes Wasserbad gestellt, um den Inhalt abzukühlen. Ist der Temperaturengleich erreicht, gibt man 20  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid hinzu und gießt das noch flüssige Gel in die horizontale Gelkammer Phero-Sub 2 150x140 mm ( Fa. Biotec Fischer ), die zuvor mit 70%igem  $\text{Ethanol}_{\text{RNS}}$  gespült wurde, um eventuell vorhandene Ribonukleasen zu denaturieren.

Nach dem Gießen setzt man in das flüssige Gel einen Gelkamm, dessen Zinken beim Aushärten des Gels Taschen von 2x3 mm und 8 mm Tiefe freihalten. Das Aushärten des Agarose-Gels dauert etwa zwei Stunden. Danach werden die seitlichen Begrenzungen und der Gelkamm entfernt und der Laufpuffer in die Gelapparatur eingefüllt, bis sein Spiegel etwa 3 mm über dem waagerechten Gel steht.

Die mRNS wird vor dem Probenauftrag durch Glyoxal denaturiert. Das Glyoxal bindet kovalent an die Guanosin-Reste der mRNS und verhindert so die Ausbildung unerwünschter intra- und intermolekularer Bindungen, die die gelelektrophoretische Auftrennung stören. Die dabei verwendete 40%ige Glyoxal-Lösung muß vor Gebrauch mehrmals mit speziellen Ionenaustauscherharzen im Verhältnis 2:5 inkubiert werden, um einen neutralen pH-Wert der Glyoxallösung zu erreichen.

Für den Ansatz werden 100  $\mu\text{l}$  der entionisierten 40%igen Glyoxallösung, 300  $\mu\text{l}$  Dimethylsulfoxid ( DMSO ), 19  $\mu\text{l}$  0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 26  $\mu\text{l}$  0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  zu einer Denaturierungs-Lösung zusammenpipettiert. 30  $\mu\text{l}$  dieser Lösung und 10  $\mu\text{l}$  der mRNS-Lösung ( entsprechend 10  $\mu\text{g}$  mRNS ) werden in einem Eppendorf-Cup vereinigt und bei  $50^\circ\text{C}$  60 min inkubiert.

Danach werden 2  $\mu\text{l}$  RNS-Dye ( Bromphenolblau,  $\text{H}_2\text{O}$ , Glycerol, 0,1 M  $\text{NaPO}_4$ -Puffer ) zupipettiert und nach kurzem Rütteln und Abzentrifugation im Impulsmodus, werden die Ansätze in die Geltaschen eingebracht. In eine der Geltaschen wird ein denaturierter RNS-Marker ( Invitrogen<sup>®</sup> RNS-Ladder 0.24-9.49 kb ) pipettiert.

Vor dem Start der Gelelektrophorese wird über ein Schlauchsystem eine Verbindung von kathodischem zu anodischem Pufferreservoir hergestellt, um durch Rezirkulation des Puffers eine Elektrolytverschiebung während der langen Gellaufzeit zu verhindern.

Die Elektrophorese wird bei 20 mA und 380 mV durchgeführt.

Zur genauen Auswertung des Northern-Blots werden die Abstände der Banden des Markers zur Geltasche genau ausgemessen und anhand dieser Meßergebnisse wird eine Eichkurve erstellt, in der die Fragmentlänge gegen die Laufstrecke aufgetragen wird. Nach dem Ausmessen der Laufstrecken der mRNA-Banden, die nach der Hybridisierung mit den radioaktiv markierten RNS-Sonden als Ziel-mRNA ausgemacht werden, kann deren Länge an der Eichkurve bestimmt werden.

### **3.3.2 Diffusions-Blotting:**

Das Verfahren des Diffusions-Blottings wird eingesetzt, um die glyoxylierte mRNA nach der Gelelektrophorese aus dem Agarose-Gel auf eine Nylonmembran zu transferieren, die dann für die Hybridisierung mit den radioaktiv markierten RNS-Sonden verwendet wird.

Nachdem man Randbereiche des Agarose-Gels, die keine mRNA-Banden enthalten, mit einem sterilen Skalpell abgetrennt hat, schneidet man ein 3 MM Whatman-Filterpapier und eine Nylon-Hybridisierungsmembran ( Fa. Hybond ) auf die Maße des Gels zurecht. Zur späteren Orientierung markiert man das Gel an der Seite der Auftragung mit einer Einkerbung.

Zur Durchführung des Diffusionsblottings wird eine rechteckige, hitzesterilisierte Glasplatte ( 25 x 15 cm ) quer auf die Ränder einer Edelstahlwanne ( 30 x 20 cm ) gelegt.

Auf die Glasplatte kommt doppellagig ein 3 MM Whatman-Filterpapier, dessen Ränder in die Edelstahlwanne hängen, die mit 1000 ml 20x SSC-Puffer ( 175,3 g Natriumchlorid, 88,2 g Natriumcitrat, H<sub>2</sub>O<sub>RNS</sub> ad 1000 ml ) gefüllt ist. Das Filterpapier befeuchtet man mit der Pufferlösung, entfernt Luftblasen zwischen dem Papier und der Glasplatte durch mehrfaches Rollen einer sterilen 10 ml Einmalpipette und legt das Agarose-Gel darauf.

Anschließend werden Nylonmembran, dann das zurechtgeschnittene 3 MM Whatman-Filterpapier ebenfalls luftblasenfrei auf das Gel aufgelegt. Mit doppellagiger Frischhaltefolie werden die Ränder des Filterpapiers abgedeckt und auf die freie Oberfläche legt man mehrere Papierservietten, die abschließend mit einem Gewicht von 1 kg unter gleichmäßiger Druckverteilung beschwert werden.

Die Saugkräfte der Papierservietten bewirken einen kapillären Sog, der die gerichtete Diffusion der mRNA aus dem Gel auf die Nylonmembran zur Folge hat. Nach etwa 20 Stunden ist die Diffusion nahezu vollständig erfolgt, wobei innerhalb dieser Zeit die Papierservietten mehrmals ausgetauscht werden, um den kapillären Sog aufrecht zu halten.

Die Nylonmembran wird entnommen und in einen gefalteten Umschlag aus 3 MM-Whatman-Filterpapier gelegt.

Da die mRNA der Nylonmembran nach dem Diffusions-Blotting nur anhaftet, wird eine dauerhafte Fixierung unter Einwirkung von UV-Licht durchgeführt ( UV-Cross-Linking, Stratagene® ).

Unter UV-Licht der Wellenlänge von 312 nm wird das Agarose-Gel überprüft, um zu prüfen, ob die mRNA in toto aus dem Gel auf die Nylon-Membran diffundiert ist.

Bis zur weiteren Bearbeitung wird die Nylonmembran mit den fest anhaftenden mRNA-Banden in Plastikfolie gelegt, die anschließend zu einem luftdichten Beutel verschweißt wird.

### 3.3.3 Herstellung der antisense-RNS-Sonden:

Zur Synthese der radioaktiv markierten Sonden wurde die 480bp Amplifikationsbande ( entsprechend der  $\beta 3$ -Untereinheit kodierenden Sequenz ) in den Plasmidvektor pSP 72 kloniert. Der Vorbereitung zur in vitro RNS-Synthese dienen folgende Reaktionsschritte:

Die doppelsträngige Plasmid-DNS wird hinter der in sense-Richtung klonierten cDNS durch Zugabe von Restriktionsendonukleasen linearisiert. Dazu werden zu 20  $\mu$ l pSP 72 mit klonierter cDNS ( ca. 1  $\mu$ g/ $\mu$ l ), 3  $\mu$ l Restriktionsendonuklease Pst I ( 10 U/  $\mu$ l ), 5  $\mu$ l Reaktions-Puffer 2 ( 50 mM Tris HCl pH 8,0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, ( Fa. Gibco )) in ein Eppendorf-Cup pipettiert. Der Ansatz wird bei 37°C eine Stunde lang inkubiert und nach Zugabe eines Farbstoffs gelelektrophoretisch in einem 1 %igem Agarosegel aufgetrennt.

Danach wird das linearisierte Plasmid mit der kodierenden cDNS-Sequenz aus dem Gel herausgeschnitten, elektroeluiert und in einer Konzentration von 1  $\mu$ g/ $\mu$ l aufgenommen.

Da das Restriktionsenzym Pst I die Plasmid-DNS am 3'-Ende so schneidet, daß ein 3'-überhängender Oligonukleotidrest entsteht, muß dieser überhängende Oligonukleotidrest durch die DNS-Polymerase des Bakteriophagen T 4, deren besondere Eigenschaft in einer 3'-5' exonukleolytischen Aktivität ohne 5'-3' Exonuklease-Aktivität liegt, entfernt werden.

Dazu werden 4  $\mu$ l der vorher gewonnenen DNS ( 1  $\mu$ g/ $\mu$ l ), 2  $\mu$ l 10x TE-Puffer ( 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA ), 2  $\mu$ l 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ l 2 mM dNTP-Mix ( 2  $\mu$ l dNTP-Mix + 8  $\mu$ l H<sub>2</sub>O ), 2  $\mu$ l T4-DNS-Polymerase ( 5 U/  $\mu$ l ) und 9  $\mu$ l H<sub>2</sub>O in ein Eppendorf-Cup pipettiert. Der Ansatz wird 15 Minuten bei 12°C, 10 Minuten bei 75°C und 5 Minuten auf Eis inkubiert, um anschließend nach Zugabe von 80  $\mu$ l H<sub>2</sub>O mit 100  $\mu$ l Phenol/ Chloroform extrahiert zu werden.

Die obere, wässrige Phase enthält die DNS, die nach vorsichtigem Abpipettieren in einem neuen Eppendorf-Cup durch Zugabe von 100%igem eisgekühlten Ethanol und 3 M NaOAc pH 7,0 präzipitiert und nach Abzentrifugation und Vakuumtrocknung in 4  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> aufgenommen wird. Die DNS liegt jetzt linearisiert und ohne überhängende Enden vor.

Vor der RNS-Synthese werden jetzt noch vorhandene Proteinverunreinigungen durch die Wirkung der Proteinase K abgebaut. Dazu werden 4  $\mu$ l RNS-Lösung mit 156  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> verdünnt und 20  $\mu$ l 10x Proteinase K-Puffer ( 500 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8,0, 100 mM TrisHCl pH 8,0 ), 10  $\mu$ l 10% SDS-Lösung und 10  $\mu$ l Proteinase K ( 20 U/  $\mu$ l ) werden hinzupipettiert.

Der Ansatz wird bei 37°C eine Stunde lang inkubiert, um dann durch anschließende Phenol/Chloroform-Extraktion die gereinigte DNS mit der wässrigen Oberphase abpipettieren zu können. Es folgen die Präzipitation, ein Waschschriff mit 70%igem eisgekühltem Ethanol<sub>RNS</sub> und nach Zentrifugation die Vakuumtrocknung. Das DNS-Pellet wird in 2,6 µl H<sub>2</sub>O<sub>RNS</sub> gelöst und jetzt kann die linearisierte, an den Enden vollständig überlappende und gereinigte DNS zur in vitro RNS-Synthese eingesetzt werden.

Zur in vitro Synthese radioaktiv markierter RNS-Sonden für die Northern-Blots werden 2 µl 5x optimierter Transkriptionspuffer ( 400 mM Tris-HCl pH 7,5, 60 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Spermidin-HCl, 50 mM NaCl, bovines Serumalbumin 2 mg/ ml ), 1 µl 100 mM Dithiothreitol ( DTT ), 0,25 µl plazentarer RNase Inhibitor ( 20 U/µl ), 1,5 µl NTP-Mix ( 5 mM rATP, rGTP, rUTP ), 5,8 µl <sup>32</sup>P-α-rCTP, 0,2 pmol in vitro Transkript und 0,7 µl T7-RNS-Polymerase ( 10 U/µl ) bei Raumtemperatur in ein Eppendorf-Cup pipettiert, da bei tieferen Temperaturen das Spermidin mit der DNS im Transkriptionspuffer ausfällt.

Der Ansatz wird bei 37°C eine Stunde lang inkubiert und nach kurzem Abzentrifugieren im Impulsmodus gibt man 0,5 µl Vanadyl-Ribosyl-Komplex ( zur Inhibierung der Ribonukleasen ) und 1 µl RNase freie DNase ( Degradation der eingesetzten DNS ) in das Eppendorf-Cup, um für weitere 15 Minuten bei 37°C zu inkubieren. Der Ansatz wird mit 37 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt und nun folgt eine Phenol/Chloroform-Extraktion zur Reinigung der radioaktiv markierten RNS-Sonden von Proteinresten.

In der wässrigen Oberphase sind nach diesem Schritt die gereinigten radioaktiv markierten RNS-Sonden.

Zur Separation der RNS-Sonden von den nicht eingebauten radioaktiven Nukleotiden wurde in der vorliegenden Arbeit das Verfahren der Gelausschlußchromatographie mit NICK-Columns ( Fa. Pharmacia ) angewendet. Die Säulen enthalten Sephadex G 50, ein modifiziertes Polysaccharid. Die RNS-Sonden mit einer Länge > 20 Basen wandern nicht in die Poren des Sephadex G 50 ein, während die Nukleotide zunächst zurückgehalten werden. Die Elution erfolgt durch einen Elutionspuffer.

Zur Lagerung sind die Säulen mit einem Puffer gefüllt, der dekantiert wird. Die Säulen werden aufrecht in einem Stativ befestigt und zweimal durch Spülung mit je 5 ml 1x TE-Puffer<sub>RNS</sub> bei Raumtemperatur äquilibriert. Jetzt wird die Oberphase der Phenol/ Chloroform-Extraktion mit den darin enthaltenen RNS-Sonden und den Mononukleotiden zentral auf die Säule aufgetragen und durch Ablassen von 2 Tropfen läuft der Ansatz in die Säule ein. Zur Elution der RNS-Sonden werden nacheinander 5x 400 µl 1x TE-Puffer auf die Säule aufgetragen, wobei jedesmal das Eluat gesondert in einem Eppendorf-Cup aufgefangen wird.

Um beurteilen zu können, in welchen Konzentrationen RNS-Sonden in den einzelnen Eluaten vorliegen, wird aus jedem der 5 Eluate 1 µl entnommen und die Strahlung wird in einem β-Counter ( Betaszint BF 5000 ) bestimmt. Bei einem primären Ausschlußvolumen von 500 µl finden sich die RNS-Sonden im 2. Eppendorfgefäß.

### 3.3.4 Hybridisierungsreaktion:

Durch die spezifische Bindung der zuvor hergestellten  $^{32}\text{P}$ -markierten Gensonden an die, aus dem myokardialen Gewebe präparierten mRNS ist ein qualitativer und eingeschränkt auch quantitativer Nachweis der Expression eines bestimmten Gens möglich.

Bei der Bindungsreaktion entstehen doppelsträngige RNS-RNS Hybride durch komplementäre Basenpaarbindung zwischen den RNS-Sonden und der Ziel-mRNS. Die Methode der antisense-RNS Sonden wurde gewählt, da diese gegenüber DNS-Hybridisierungs-Sonden spezifischer ist.

Allerdings entstehen auch unspezifische Bindungen der RNS-Sonden mit anderen mRNS-Molekülen, die weniger stabil sind und daher nach der Hybridisierung durch Waschschriffe mit Lösungen abnehmender Salzkonzentrationen unter ansteigender Temperatur zur Lösung der Wasserstoff-Brücken gelöst werden müssen.

Zuerst erfolgt die zweimalige Prähybridisierung mit 2 ml Prähybridisierungslösung pro 100 cm<sup>2</sup> Nylonfilterfläche zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen der Membran. Die Lösung enthält folgende Bestandteile:

- 5x PE-Lösung: 25 ml 1 M Tris pH 7,5, 0,5 g 0,5% ( w./ w.) Na-Pyrophosphat, 5 g 5% SDS, 1 g 1% Polyvinylpyrrolidon ( PVP ) 40000, 1 g 1% Ficoll, 5 ml 0,5 M EDTA werden auf 65°C erhitzt, auf 37°C abgekühlt, 20 ml 5% bovines Serumalbumin ( BSA ) ( 1 g/ 20 ml ) zugefügt, wieder Erhitzen auf 65°C für 15 min und zum Schluß Abkühlung auf Raumtemperatur und Filtration.
- 25xSSC-Puffer: 219,13 g NaCl, 110,25 g Na-Citrat, H<sub>2</sub>O<sub>RNS</sub> ad 1000 ml
- 100% Formamid
- Lachssperma 10 mg/ ml
- H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>

Diese Bestandteile werden in ein Polyethylen-Röhrchen pipettiert, 10 Minuten lang bei 100°C inkubiert und 5 Minuten auf Eis abgekühlt.

Die Nylonmembran mit den, durch das Diffusionsblotting übertragenden mRNS-Banden wurde in eine Plastikfolie eingeschweißt. Dabei verschweißt man die Folie so, daß zwei Kammern vorliegen, die über eine kleine Öffnung in Verbindung stehen.

Die Folie wird jetzt auf der Seite mit der leeren Kammer an einer Ecke aufgeschnitten, um die Prähybridisierungslösung einzupipettieren und sie durch die kleine Öffnung luftblasenfrei in die Kammer mit der Nylonmembran laufen zu lassen.

Danach werden die aufgeschnittene Ecke und die Öffnung zwischen den Kammern verschweißt und die Nylonmembran mit der Prähybridisierungslösung eine Stunde lang bei 65°C inkubiert.



Die Prähybridisierungslösung wird anschließend verworfen und der gleiche Vorgang wird mit frischer Prähybridisierungslösung wiederholt, allerdings erfolgt die Inkubation jetzt eine Stunde bei 42°C.

Jetzt folgt die Hybridisierungsreaktion mit Hybridisierungslösung und den radioaktiv markierten Gen-Sonden, die mit einer Aktivität von  $2,5 \times 10^6$  cpm/ ml Hybridisierungslösung eingesetzt werden.

Die Hybridisierungslösung hat folgende Bestandteile:

- 1 x PE
- 5 x xSSC ( 25 x SSC-Puffer 1 : 5 mit H<sub>2</sub>O<sub>RNS</sub> verdünnt
- 50% Formamid
- 150 µg Lachssperma ( 10 mg / ml )
- H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>

Die Bestandteile werden in ein Polyethylenröhrchen pipettiert, bei 100°C 10 Minuten lang inkubiert und anschließend für 5 Minuten auf Eis gestellt.

Zeitgleich werden die antisense Gen-Sonden bei 65°C 5 min lang inkubiert und anschließend ebenfalls für 5 Minuten auf Eis gestellt.

Die beiden Lösungen werden vereinigt und anschließend sofort in die Kammer der Plastikfolie einpipettiert, die die Nylonmembran mit der geblotteten mRNA enthält. Die Kammer wird danach wieder luftblasenfrei verschweißt und die Hybridisierungsreaktion läuft bei 42°C über 20 Stunden ab.

Nach dieser Zeit erfolgen die Wasch-Schritte, um nicht spezifisch-gebundene Sonden zu entfernen.

Zum Abwaschen der unspezifisch gebundenen Radioaktivität werden folgende Lösungen benötigt:

- 2 x SSC ( 1 : 10 Verdünnung einer 20 x SSC-Stammlösung ), 0,1% SDS ( Na-Dodecylsulfat )
- 0,2 x SSC ( 1 : 100 Verdünnung einer 20 x SSC-Stammlösung ), 0,1% SDS

Die Folie mit der eingeschweißten Nylonmembran wird aufgeschnitten und mit einer hitzesterilen Pinzette in eine ebenfalls hitzesterilisierte Edelstahlwanne gelegt, die hinter einer Plexiglasscheibe ( zur Abschirmung der radioaktiven Strahlung ) auf einer Motorwippe steht. In die Wanne wird die 2 x SSC, 0,1% SDS-Lösung gefüllt, so daß der Flüssigkeitsspiegel etwa 1 cm über der Nylonmembran steht und anschließend wird 5 Minuten lang geschwenkt.

Nach dem Dekantieren der Lösung folgt eine Wiederholung mit frischer Lösung gleicher Konzentration.

Danach verwendet man die 0,2% x SSC, 0,1% SDS-Lösung für die nächsten Waschschritte, die 10 Minuten bei Raumtemperatur, dann mit 50°C warmer, neuer Lösung über 15 Minuten und über 10 Minuten durchgeführt werden.

Ist schließlich über der Nylonmembran die Radioaktivität auf den Wert von 50-100 counts per second gesunken, wird die Nylonmembran getrocknet und in der Dunkelkammer in eine Autoradiographiekassette gelegt mit Verstärkungsfolien und Röntgenfilm gelegt.

Die Belichtung erfolgt über initial 2-4 Stunden unter Kühlung auf -70°C, um durch Stabilisierung der Silberatome und -Ionen bei dieser Temperatur eine höhere Randschärfe der Hybridisierungsbanden zu erhalten.

Nach der Entwicklung des Röntgenfilms wird das Vorkommen von Hybridisierungsbanden analysiert und mittels densitometrischer Messungen auch die Stärke der Hybridisierungssignale.

### **3.4. Verhältnis der mRNA Expression der $\beta 3a$ / $\beta 3$ trunzierten Untereinheit**

Das Verhältnis der in humanen Myokardproben wurde durch RT-PCR untersucht, welche mit 40 Zyklen mit 94, 48 und 72°C zu je 30 Sekunden durchgeführt wurde. Verwendet wurde der sense-Primer RH 44 und der antisense-primer RH 45. In die jeweilige RT-PCR Reaktion wurden 0.1  $\mu$ g revers-transkribierte mRNA eingesetzt, welche aus nicht-insuffizientem und insuffizientem humanen Myokard isoliert wurden. Die Amplifikationsprodukte wurden auf 5% Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch getrennt. Die densitometrische Analyse der Amplifikationsprodukte wurde mit Hilfe der Programms Quantity One® der Firma Biorad, welches ein Edge-Detektions-Software enthält, auf dem Video-Dokumentations-System Gel-Doc 2000™ durchgeführt.

### **3.5 Geräteliste:**

- Colora Tiefkühlschrank UF 85-300 S ( -80°C )
- Polystar Tischschweißgerät Typ 242, Fa. Bachhofer / Reutlingen
- Hettich Zentrifuge EBA 12 Universal 16 R mit Kühlaggregat, Rotor 1614 24fach
- IKA-Vibro-Fix VF2 Vortexer, Fa. IKA / Staufen
- Haake C1 Wasserbad mit Thermostat, Fa. Haake / Karlsruhe
- Certomat R Tisch-Rundschüttler, Fa. Braun / Melsungen
- Desatronic Stromquelle 3000 / 200, Fa. Desaga / Heidelberg

- GDS 100 Gel Trocknungssystem, Fa. Bachhofer / Reutlingen
- Abimed Pipetten P 20, 200, 1000, Fa. Gilson / Villiers-le-Bel / F.
- Abimed Microman Bio M 10, Fa. Gilson / Villiers-le-Bel / F.
- Memmert BM 400 Brutschrank, Fa. Memmert / Schwabach
- TEC 5067 Microwellenherd 700 Watt
- Liebherr Kühlkombination -4°C / -20°C, Fa. Liebherr
- Omnigene Temperaturcycler, Fa. Hybaid / Middlesex / GB.
- Barnsted Nanopure UV Deionisationssystem Model Nr. 7332, Fa. Barnsted
- Gel-Doc 2000, Bio Rad
- Quantity One<sup>®</sup>, Bio Rad

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Nachweis der Genexpression der $\beta$ 3-Untereinheit spannungsabhängiger Kalziumkanäle aus humanem linksventrikulärem Myokard:

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis der Genexpression die der  $\beta$ 3-Untereinheit spannungsabhängiger Kalziumkanäle aus humanem Myokard, deren Klonierung und Sequenzierung.

Zum Beginn dieser Arbeit war nur die Genexpression der  $\beta$ 1-Untereinheit im humanen Myokard bekannt ( 42 ).

#### 4.1.1 Klonierung und Sequenzierung der humanen kardialen $\beta$ 3-Untereinheit:

Von mRNS-Präparationen aus normalem, humanen linksventrikulären Myokard wurden cDNS-Bibliotheken hergestellt wie unter Material und Methoden beschrieben.

Aliquots dieser cDNS-Bibliotheken wurden zusammen mit degenerierten Oligonukleotidprimern ( RH 18/ RH 19, siehe Seite 24 ) in einer PCR eingesetzt, die entstandenen Amplifikationsprodukte wurden auf einem 5%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Diese PCR wurde mit degenerierten Primern durchgeführt, welche an Sequenzabschnitte hybridisieren, die eine hohe Homologie zwischen der  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- und der  $\beta$ 3-Untereinheit aufweisen. Durch dieses methodische Vorgehen entstehen, bei Vorhandensein von entsprechender kodierender mRNS, für die jeweiligen  $\beta$ -Untereinheiten korrespondierende Amplifikationsprodukte.

Tatsächlich wurden durch die PCR mit den degenerierten Oligonukleotidprimern mehrere Amplifikationsprodukte erzeugt.

Alle Amplifikationsprodukte wurden elektroeluiert, subkloniert und durch Sequenzierung analysiert wie in Material & Methoden beschrieben.

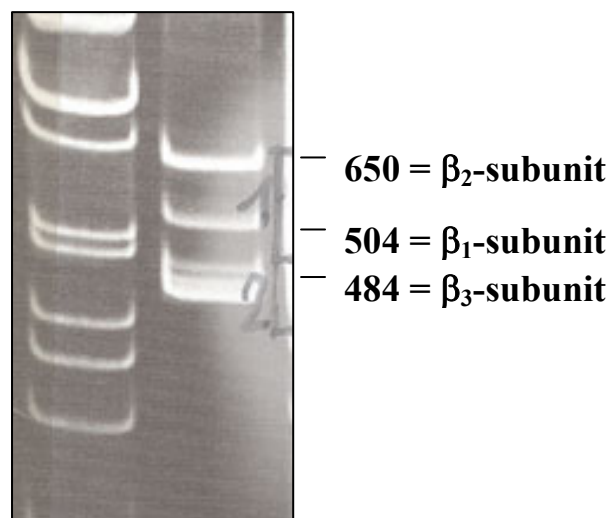


Abbildung 2 : Gelelektrophorese der PCR-Amplifikationsprodukte aus normalem humanem linksventrikulären Myokard ( Primer RH 18/ RH19 ). Linke Spalte: DNA-Marker (Invitrogen)

In der Sequenzanalyse zeigte sich das 504 bp Amplifikationsprodukt als Sequenz-identisch mit der  $\beta$ 1-Untereinheit kloniert aus dem menschlichen Zerebrum ( entsprechend Position 210-680 ). Das 650 bp Fragment zeigte sich als Sequenz-identisch mit der humanen  $\beta$ 2-Untereinheit ( entsprechend Position 210-755 ).

Das 484 bp Fragment schließlich konnte als identisch identifiziert werden zu den bekannten  $\beta$ 3-Untereinheit Sequenzen, wie aus einer humanen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie ( 84 ) und einer humanen fetalen cDNS-Bibliothek ( 70 ) kloniert.

Die Amplifikationsbanden bei 460bp wurden subkloniert und sequenziert, konnten aber keiner Sequenz der  $\beta$ -Untereinheit zugeordnet werden.

Die PCR-Klonierung dieses Fragmentes der  $\beta$ 3-Untereinheit war Ausgangspunkt für die Klonierung der gesamten kodierenden Sequenz. Diese wurde wie in Material und Methoden beschrieben mit verschiedenen Primer-Paarungen durchgeführt, um Spleiss-In oder Spleiss-Out Isoformen der  $\beta$ 3-Untereinheit auf dem Boden der bekannten Sequenz der  $\beta$ 3-Untereinheit zu identifizieren.

Im Einzelnen wurden folgende spezifische Oligonukleotidprimer basierend auf der veröffentlichten Sequenz von Murakami et al ( 84 ) ausgewählt: RH 46, RH 47, RH 44, RH 45, RH 48, RH 25 (siehe unten Abb. 3). Die Oligonukleotid-Primerpositionen wurden dabei so gewählt, daß in den Primern Schnittstellen für Restriktionsenzyme entweder enthalten waren beziehungsweise am 5'-Ende angehängt (zur später leichteren Klonierung der gesamten kodierenden Sequenz). Für Klonierungszwecke wurde in RH 25 durch Mutation im nicht kodierenden Bereich eine Pst I Schnittstelle erzeugt.

Die durch die PCR-Methode amplifizierten 3 cDNS Fragmente der humanen kardialen  $\beta$ 3-Untereinheit wurden amplifiziert, dann ligiert, präpariert und nach der Dideoxy-Methode sequenziert.

Die Full-length-Message der aus linksventrikulärem Myokardgewebe klonierten humanen kardialen  $\beta$ -3 Untereinheit besitzt einen offenen Leserahmen von 1452 Nukleotiden und kodiert ein Protein von 484 Aminosäuren.

### **Basensequenz der $\beta$ 3-Untereinheit mit Spleißvariante und verwendeten Primern**

ATG TAT GAC GAC TCC TAC GTG CCC GGG TTT GAG GAC TCG GAG GCG GGT TCA GCC GAC TCC 60  
(TG TAT GAC GAC TCC TAC GTG C)  
RH 46, Sense-Primer

TAC ACC AGC CGC CCA TCT CTG GAC TCA GAC GTC TCC CTG GAG GAG GAC CGG GAG AGT GCC 120

CGG CGT GAA GTA GAG AGC CAG GCT CAG CAG CAG CTC GAA AGG GCC AAG CAC AAA CCT GTG 180

GCA TTT GCG GTG AGG ACC AAT GTC AGC TAC TGT GGC GTA CTG GAT GAG GAG TGC CCA GTC 240

CAG GGC TCT GGA GTC AAC TTT GAG GCC AAA GAT TTT CTG CAC ATT AAA GAG AAG TAC AGC 300

AAT GAC TGG TGG ATG GGG CGG CTA GTG AAA GAG GGC GGG GAC ATC GCC TTC ATC CCC AGC 360  
(G CGG CTA GTG AAA GAG GGC G)  
RH 44, SensePrimer

CCC CAG CGC CTG GAG AGC ATC CGG CTC AAA CAG GAG CAG AAG GCC AGG AGA TCT GGG AAC	420
CCT TCC AGC CTG AGT GAC ATT GGC AAC CGA CGC TCC CCT CCG CCA TCT CTA GCC AAG CAG (C TCA CTG TAA CCG TTG GCT)	480
RH 47, Antisense-Primer	Spleißvariante
AAG CAA AAG CAG GCG GAA CAT GTT CCC CCA TAT GAC GTG GTG CCC TCC ATG CGG CCT GTG XX XXX XXX XXX	540
Spleißvariante	
GTG CTG GTG GGA CCC TCT CTG AAA GGT TAT GAG GTC ACA GAC ATG ATG CAG AAG GCT CTC	600
TTC GAC TTC CTC AAA CAC AGA TTT GAT GGC AGG ATC TCC ATC ACC CGA GTC ACA GCG GAC	660
CTC TCC CTG GCA AAG CGA TCT GTG CTC AAC AAT CCG GGC AAG AGG ACC ATC ATT GAG CGC	720
TCC TCT GCC CGC TCC AGC ATT GCG GAA GTG CAG AGT GAG ATC GAG CGC ATA TTT GAG CTG	780
GCC AAA TCC CTG CAG CTA GTA GTG TTG GAC GCT GAC ACC ATC AAC CAC CCA GCA CAG CTG (C CTG CGA CTG TGG TAG TTG GT)	840
RH 45, Antisense-Primer	
(G CAG CTA GTA GTG TTG GAC C)	RH 48, Sense-Primer
GCC AAG ACC TCG CTG GCC CCC ATC ATC GTC TTT GTC AAA GTG TCC TCA CCA AAG GTA CTC	900
CAG CGT CTC ATT CGC TCC CGG GGG AAG TCA CAG ATG AAG CAC CTG ACC GTA CAG ATG ATG	960
GCA TAT GAT AAG CTG GTT CAG TGC CCA CCG GAG TCA TTT GAT GTG ATT CTG GAT GAG AAC	1020
CAG CTG GAG GAT GCC TGT GAG CAC CTG GCT GAG TAC CTG GAG GTT TAC TGG CGG GCC ACG	1080
CAC CAC CCA GCC CCT GGC CCC GGA CTT CTG GGT CCT CCC AGT GCC ATC CCC GGA CTT CAG	1140
AAC CAG CAG CTG CTG GGG GAG CGT GGC GAG GAG CAC TCC CCC CTT GAG CGG GAC AGC TTG	1200
ATG CCC TCT GAT GAG GCC AGC GAG AGC TCC CGC CAA GCC TGG ACA GGA TCT TCA CAG CGT	1260
AGC TCC CGC CAC CTG GAG GAG GAC TAT GCA GAT GCC TAC CAG GAC CTG TAC CAG CCT CAC	1320
CGC CAA CAC ACC TCG GGG CTG CCT AGT GCT AAC GGG CAT GAC CCC CAA GAC CGG CTT CTA	1380
GCC CAG GAC TCA GAG CAC AAC CAC AGT GAC CGG AAC TGG CAG CGC AAC CGG CCT TGG CCC	1440
AAG GAT AGC TAC (TCG ATG ACT GTC GGA GGA CGT CGG)	1452
RH 25, Antisense-Primer	

Abbildung 3 : Basensequenz der humanen  $\beta$ 3a-Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals mit Darstellung der Speißvariante und den in dieser Arbeit zur Sequenzierung verwendeten Primern

Da das klonierte Protein Sequenz-identisch mit der publizierten Sequenz der  $\beta$ 3a-Untereinheit in humanen Schilddrüsen-Karzinom-Zellen ist, wird an dieser Stelle auf Hydropathazitäts-Analysen zur Aussage über mögliche  $\beta$ -Faltblattstrukturen oder Coils verzichtet.

## **4.2 Untersuchung posttranslationaler Modifizierungsstellen: Potentielle Phosphorylierungsstellen**

Aus bisherigen Untersuchungen ist bekannt, daß die Ionenleitungseigenschaften des L-Typ Kalziumkanals sowohl im Skelettmuskelgewebe ( 64 ) als auch im Herzmuskelgewebe ( 65 ) durch Phosphorylierung beeinflußt werden.

Es konnte gezeigt werden, daß die  $\beta$ -Untereinheit ein Substrat unterschiedlicher Proteinkinasen darstellt. Phosphorylierung als posttranslationale Modifizierung konnte für die  $\beta$ -Untereinheit nachgewiesen werden. ( 40, 66, 67 ).

Wir untersuchten die Aminosäuresequenz der humanen kardialen  $\beta$ 3-Untereinheit auf mögliche Phosphorylierungsstellen.

### **4.2.1 Proteinkinase C:**

Für dieses intrazelluläre Enzym wurde die Consensus-Sequenz ( S; T )-X-( R, K ) nach Woodget et al ( 68 ) zugrunde gelegt. Dabei handelt es sich um eine Sequenzfolge aus 4 Aminosäuren, wobei an Position 1 ein Serin- oder Threoninrest steht, an Position 2 ein beliebiger Aminosäurerest und an Position 3 und 4 zwei basische Aminosäuren ( in der Regel Arginin und/ oder Lysin ). Die Phosphorylierung erfolgt am Serin- bzw. Threonin-Rest.

In der humanen kardialen  $\beta$ 3-Untereinheit sind 10 mögliche Phosphorylierungsstellen durch die Proteinkinase C vorhanden. Diese Positionen sind:

T 22, S 39, S 126, S 143, S 176, S 186, S 242, S 296, S 409, S 418, T 421

### **4.2.2 Caseinkinase II:**

Für dieses intrazelluläre Enzym wurde die Consensus-Sequenz ( S, T )-X-X-( D, E ) nach Kennely und Krebs ( 69 ) zugrunde gelegt. Bei der Caseinkinase II werden im Vergleich zur Proteinkinase C die Serin- und Threoninreste phosphoryliert, wenn an dritter Position nach diesem Aminosäurerest eine saure Aminosäure, in der Regel Asparaginsäure oder Glutaminsäure, lokalisiert ist.

In der humanen kardialen  $\beta$ 3-Untereinheit sind 6 mögliche Phosphorylierungsstellen durch die Caseinkinase II vorhanden. Diese Positionen sind:

S 32, S 143, S236, S 246, S 252, S 393

### 4.2.3 cAMP-abhängige Proteinkinase:

Die Consensus-Sequenz für dieses Enzym lauten nach Kennelly und Krebs ( 69 )  
 R-R/ K-X-S/ T, R-X-X-S/ T und R-X-S/ T. Für die  $\beta$ 1-Untereinheit aus Skelett-  
 muskulatur sind 2 solcher Phosphorylierungsstellen bekannt.

In der humanen kardialen  $\beta$ 3-Untereinheit sind solche Sequenzkombinationen nicht  
 vorhanden, so daß keine Phosphorylierung des Proteins durch die cAMP-abhängige  
 Proteinkinase erfolgt.

### 4.3 Vergleich der Aminosäuresequenz der humanen kardialen $\beta$ 3-Untereinheit ( CaB3 ) mit einer humanen embryonalen $\beta$ 3-Untereinheit ( Hb3 ) ( 45 ), zwei humaner kardialer $\beta$ 1-Untereinheiten ( Hb1b/ Hb1a ) ( 42 ) und einer kardialen $\beta$ 2-Untereinheit ( CaB2 ) des Kaninchens ( 45 ):

CaB3	M	Y	D	D	S	Y	V	P	G	F	E	D	S	E	A																									
Hb3	M	Y	D	D	S	Y	L	P	G	F	E	D	S	E	A																									
Hb1b	M	V	Q	K	T	S	M	S	R	G	P	Y	P	P	S	Q	E	I	P	M	E	V	F	D	P	S	P	Q	G	K	Y	S	K	R	K	G	R	F	K	
Hb1a	M	V	Q	K	T	S	M	S	R	G	P	Y	P	P	S	Q	E	I	P	M	E	V	F	D	P	S	P	Q	G	K	Y	S	K	R	K	G	R	F	K	
CaB2b	M	N	Q	A	S	G	L	D	L	L	K	I	S	Y															G	K	G	A	R	R	K	N	R	F	K	

CaB3						M	Y	D	D	S	Y	V	P	G	F	E	D	S	E	A	G	S	A	D	S	Y	T	S	R	P	S	L	D	S	D	V	S	L	
Hb3						M	Y	D	D	S	Y	V	P	G	F	E	D	S	E	A	G	S	A	D	S	Y	T	S	R	P	S	L	D	S	D	V	S	L	
Hb1b	R	S	D	G	S	T				S	S	D	T	T	S	N	S	F	V	R	Q	G	S	A	E	S	Y	T	S	R	P	S		D	S	D	V	S	L
Hb1a	R	S	D	G	S	T				S	S	D	T	T	S	N	S	F	V	R	Q	G	S	A	E	S	Y	T	S	R	P	S		D	S	D	V	S	L
CaB2b	G	S	D	G	S	T	G	S	T	S	S	D	T	T	S	N	S	F	V	R	Q	G	S	A	D	S	Y	T	S	R	P	S		D	S	D	V	S	L

CaB3	E	E	D	R	E	S	A		P	R	E	V	E	S	Q	A	Q	Q	Q	L	E	R	A	K	H	K	P	V	A	F	A	V	R	T	N	V	S	Y	C
Hb3	E	E	D	R	E	S	A		P	R	E	V	E	S	Q	A	Q	Q	Q	L	E	R	A	K	H	K	P	E	A	F	A	V	R	T	N	V	S	Y	C
Hb1b	E	E	D	R	E		A	L	R	K	E	A	E	R	Q	A	L	A	Q	L	E	K	A	K	T	K	P	V	A	F	A	V	R	T	N	V	G	Y	N
Hb1a	E	E	D	R	E		A	L	R	K	E	A	E	R	Q	A	L	A	Q	L	E	K	A	K	T	K	P	V	A	F	A	V	R	T	N	V	G	Y	N
CaB2b	E	E	D	R	E		A	V	R	R	E	A	E	R	Q	A	Q	A	Q	L	E	K	A	K	T	K	P	V	A	F	A	V	R	T	N	V	S	Y	S

CaB3	G	V	L		D	E	E	C	P	V	Q	G	S	G	V	N		F	E	A	K	D	F	L	H	I	K	E	K	Y	S	N	D	W	W	I	G	R	L
Hb3	G	V	L		D	E	E	C	P	V	Q	G	S	G	V	N		F	E	A	K	D	F	L	H	I	K	E	K	Y	S	N	D	W	W	I	G	R	L
Hb1b	P	S	P	G	D	E	V		P	V	Q	G	V	A	A	I	T	F	E	P	K	D	F	L	H	I	K	E	K	Y	N	N	D	W	W	I	G	R	L
Hb1a	P	S	P	G	D	E	V		P	V	Q	G	V	A	A	I	T	F	E	P	K	D	F	L	H	I	K	E	K	Y	N	N	D	W	W	I	G	R	L
CaB2b	A	A	H	E	D	D	V		P	V	P	G	M	A		I	S	F	E	A	K	D	F	L	H	V	K	E	K	F	N	N	D	W	W	I	G	R	L

CaB3	V	K	E	G	G	D	I	A	F	I	P	S	P	Q	R	L	E	S	I	R	L	K	Q		E	Q	K	A	R	R							S		
Hb3	V	K	E	G	G	D	I	A	F	I	P	S	P	Q	R	L	E	S	I	R	L	K	Q		E	Q	K	A	R	R							S		
Hb1b	V	K	E	G	C	E	V	G	F	I	P	S	P	V	K	L	D	S	L	R	L	L	Q		E	Q	K		L	R	Q	N	R	L	G	S	S	K	S
Hb1a	V	K	E	G	C	E	V	G	F	I	P	S	P	V	K	L	D	S	L	R	L	L	Q		E	Q	K		L	R	Q	N	R	L	G	S	S	K	S
CaB2b	V	K	E	G	C	E	I	G	F	I	P	S	P	V	K	N	E	N	M	R	L		Q	H	E	Q	R	A	K		Q	G	K	F	Y	S	S	K	S

CaB3	G		N	P		S	S	L	S	D	I	G	N			R	R	S	P	P	P																			
Hb3	G		N	P		S	S	L	S	D	I	G	N			R	R	S	P	P	P																			
Hb1b	G	D	N	S	S	S	L	G	D	V	V	T	G	T	R	R	R	P	T	P	P	A																		
Hb1a	G	D	N	S	S	S	L	G	D	V	V	T	G	T	R	R	R	P	T	P	P	A	S	G	N	E	M	T	N	L	A	F	E	L	D	P	L	E	L	
CaB2b	G	G	N	S	S	S	L	G	D	I	V	P	S	S	R	K	S	T	P	P	S	S	A	I	D	I	D	A	T	G	L	D	A	E	E	N	D	I		





CaB3	A	D	T	I	N	H	P	A	Q	L	A	K	T	S	L	A	P	I	I	V	F	V	K	V	S	S	P	K	V	L	Q	R	L	I	R	S	R	G	K
Hb3	A	D	T	I	N	H	P	A	Q	L	A	K	T	S	L	A	P	I	I	V	F	V	K	V	S	S	P	K	V	L	Q	R	L	I	R	S	R	G	K
Hb1b	A	D	T	I	N	H	P	A	Q	L	S	K	T	S	L	A	P	I	I	V	Y	I	K	I	T	S	P	K	V	L	Q	R	L	I	K	S	R	G	K
Hb1a	A	D	T	I	N	H	P	A	Q	L	S	K	T	S	L	A	P	I	I	V	Y	I	K	I	T	S	P	K	V	L	Q	R	L	I	K	S	R	G	K
CaB2b	A	D	T	I	N	H	P	A	Q	L	S	K	T	S	L	A	P	I	V	V	Y	V	K	I	S	S	P	K	V	L	Q	R	L	I	K	S	R	G	K

CaB3	S	Q	M	K	H	L	T	V	Q	M	M	A	Y	D	K	L	V	Q	C	P	P	E	S	F	D	V	I	L	D	E	N	Q	L	E	D	A	C	E	H
Hb3	S	Q	M	K	H	L	T	V	Q		M	A	Y	D	K	L	V	Q	C	P	P	E	S	F	D	V	I	L	D	E	N	Q	L	E	D	A	C	E	L
Hb1b	S	Q	S	K	H	L	N	V	Q		A	A	S	E	K	L	A	Q	C	P	P	E	M	F	D	I	I	L	D	E	N	Q	L	E	D	A	C	E	H
Hb1a	S	Q	S	K	H	L	N	V	Q		A	A	S	E	K	L	A	Q	C	P	P	E	M	F	D	I	I	L	D	E	N	Q	L	E	D	A	C	E	H
CaB2b	S	Q	A	K	H	L	N	V	Q	M	V	A	A	D	K	L	A	Q	C	P	P	E	L	F	D	V	I	L	D	E	N	Q	L	E	D	A	C	E	H

CaB3	L	A	E	Y	L	E	V	Y	W	R	A	T	H	H	P	A	P	G	P	G	L	L	G	P	P	S	A	I	P	G	L	Q	N	Q	Q	L	L	G	E
Hb3	L	A	E	Y	L	E	V	Y	W	R	A	T	H	H	P	A	P	G	P	G	I	L	G	P	P	S	A	I	P	G	L	Q	N	Q	Q	I	L	G	E
Hb1b	L	A	E	Y	L	E	A	Y	W	K	A	T	H	P	P	S	S	T	P	P	N	P	L	L	N	R	T	M	A	T	A	A	L	R	R	S	P	A	P
Hb1a	L	A	E	Y	L	E	A	Y	W	K	A	T	H	P	P	S	S	T	P	P	N	P	L	L	N	R	T	M	A	T	A	A	L	R	R	S	P	A	P
CaB2b	L	A	D	Y	L	E	A	Y	W	K	A	T	H	P	P	S	S	N	L	P	N	P	L	L	S	R	T	L	A	T	S	A	L	P	V	S	P	T	L

CaB3	R	G	E	E	H	S	P	L	E	R	D	S	L	M	P	S	D	E	A	S	E	S	S	R	Q	A	W	T	G	S	S	Q	R	S	S	R	H	L	E
Hb3	R	G	E	E	H	S	P	L	E	R	D	S	L	M	P	S	D	E	A	S	E	S	S	R	Q	A	W	T	G	S	S	Q	R	T	S	R	H	L	E
Hb1b	V	S	N	L	Q	G	P	Y	L	A	S	G	D	Q	P	L	E	R	A	T	G	E	H	A	S	M	H	E	Y	P	G	E	L	G	Q	P	P	G	L
Hb1a	V	S	N	L	Q	V	Q	V	L	T	S	L	R	R	N	L	G	F	W	G	G	L	E	S	S	Q	R	G	S	V	V	P	Q	E	Q	E	H	A	M
CaB2b	A	S	N	S	Q	G	S	Q	G	D	Q	R	T	D	R	S	A	P	A	R	S	A	S	Q	A	E	E	E	P	C	L	E	P	A	K	K	S	Q	H

CaB3	E	D	Y	A	D	A	Y	Q	D	L	Y	Q	P	H	R	Q	H	T	S	G	L	P	S	A	N	G	H	D	P	Q	D	R	L	L	A	Q	D	S	E	
Hb3	E	D	Y	A	D	A	Y	Q	D	L	Y	Q	P	H	R	Q	H	T	S	G	L	P	S	A	N	G	H	D	P	Q	D	R	L	L	A	Q	D	S	E	
Hb1b	Y	P	S	S	H	P	P	G	R	A	G	T	L	R	A	L	S	R	Q	D	T	F	D	A	D	T	P	G	S	R	N	S	A	Y	T	E	L	G	D	
Hb1a																																								
CaB2b	R	S	S	S	S	A	P	H	H	N	H	R	S	G	T	S	R	G	L	S	R	Q	E	T	F	D	S	E	T	Q	E	S	R	D	S	A	Y	V	E	

CaB3	H	N	H	S	D	R	N	W	Q	R	N	R	P	W	P	K	D	S	Y																					
Hb3	H	N	H	S	D	R	N	W	Q	R	N	R	P	W	P	K	D	S	Y																					
Hb1b	S	C	V	D	M	E	T	P	S	E	G	P	G	L	G	D	P	A	G	G	A	P	A	R	Q	G	S	W	E	D	E	E	E	D	Y	E	E	E	L	
Hb1a																																								
CaB2b	S	H	E	H	V	D	H	Y	A	P	H	R	D	H	N	H	R	D	E	T	H	R	S	S	D	H	R	H	R	E	T	R	H	R	S	R	D	M	D	

CaB3																																									
Hb3																																									
Hb1b	T	D	N	R	N	R	G	R	N	K	A	R	Y	W	P	Ee	G	G	A	P	V	L	G	R	N	K	N	E	L	E	G								W		
Hb1a																																									
CaB2b	R	E	Q	D	H	N	E	C	N	K	Q	R	S	R	H	K	S	K	D	R	Y	C	D	K	D	G	E	V	I	S	K	K	R	N	E	A	G	E	W		

CaB3																																								
Hb3																																								
Hb1b	G	R	G	V	Y	I	R																																	
Hb1a																																								
CaB2b	N	R	D	V	Y	I	R	Q																																

Die Aminosäuren wurden im "Ein-Buchstaben-Code" (Single Letter Code nach IUPAC-IUB, 1984) abgekürzt:

- |                |         |              |         |
|----------------|---------|--------------|---------|
| Alanin         | A (Ala) | Leucin       | L (Leu) |
| Arginin        | R (Arg) | Lysin        | K (Lys) |
| Asparagin      | N (Asn) | Methionin    | M (Met) |
| Asparaginsäure | D (Asp) | Phenylalanin | F (Phe) |
| Cystein        | C (Cys) | Prolin       | P (Pro) |
| Glutamin       | Q (Gln) | Serin        | S (Ser) |
| Glutaminsäure  | E (Glu) | Threonin     | T (Thr) |
| Glycin         | G (Gly) | Tryptophan   | W (Trp) |
| Histidin       | H (His) | Tyrosin      | Y (Tyr) |
| Isoleucin      | I (Ile) | Valin        | V (Val) |

Aus dem Aminosäuresequenz-Vergleich wird deutlich, dass die  $\beta$ 1-, die  $\beta$ 2- und die  $\beta$ 3-Untereinheit durch drei verschiedene Gene kodiert werden. Die Homologie der  $\beta$ 3-Untereinheit zur  $\beta$ 1-Untereinheit beträgt auf Aminosäure-Ebene 66,6%, zur  $\beta$ 2-Untereinheit entsprechend 64,9%.

Abschnitte hoher Homologie zwischen allen verglichenen Untereinheiten bestehen von Position 16 der CaB3 bis Position 155 und von Position 166 der CaB3 bis Position 370. Diese Beobachtung deckt sich mit früheren Untersuchungen, die in allen bisher identifizierten  $\beta$ -Untereinheiten des L-Typ Kalziumkanals 2 hochkonservierte Domänen nachwiesen, die den beiden oben angeführten Bereichen in der CaB3 entsprechen. Für die erste Domäne besteht zwischen allen  $\beta$ -Untereinheiten eine Sequenzhomologie auf Aminosäure-Ebene von 65% und für die zweite Domäne von 78%.

Die Aminosäuresequenzen der  $\alpha$ 1-Untereinheit und der  $\beta$ -Untereinheit, über die beide miteinander in Wechselwirkung treten, sind bekannt ( 33, 52 ). In der Aminosäuresequenz der H $\beta$ 1b-Untereinheit ist dieser Bereich von Position 215-240 lokalisiert und somit zu Beginn der zweiten hoch konservierten Domäne. In der Aminosäuresequenz der  $\beta$ 3-Untereinheit reicht dieser Bereich von Position 165-185, wobei 2 Deletionen und 3 Aminosäurewechsel den Unterschied zwischen den Untereinheiten ausmachen; dennoch besteht eine Sequenzhomologie von 80%.

Am aminoterminalen Ende der Sequenzen besteht eine hohe Homologie jeweils zwischen den beiden  $\beta$ 3-Untereinheiten und den beiden  $\beta$ 1-Spleiss-Varianten, zwischen den verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten sind die Sequenzen hier allerdings völlig unterschiedlich. Die  $\beta$ 3-Untereinheit besitzt wie alle anderen  $\beta$ -Untereinheiten keine hydrophoben Bereiche, hingegen 4  $\alpha$ -helikale Bereiche, die über hydrophile Bereiche miteinander verbunden sind. 3 dieser  $\alpha$ -helikalen Bereiche besitzen Abschnitte von jeweils 8 Aminosäuren, die fast immer mit Leucin oder Isoleucin starten und enden und negativ geladene Aminosäuren beeinhalteten. In der Sequenz der CaB3 sind dies folgende Bereiche:

Pos.33-40 LEEDRESA, Pos.247-254 IAEVQSEI, Pos.341-349 QLEDACEH

Die genaue Funktion dieser Regionen ist unbekannt, es ist jedoch postuliert worden, dass entsprechende Sequenzabschnitte eine Rolle bei der Bindung divalenter Ionen spielen ( 40 ).

Die CaB3- und die H $\beta$ 3-Untereinheiten sind mit 484 bzw. 482 Aminosäuren die kleinsten der bisher identifizierten  $\beta$ -Untereinheiten. Die H $\beta$ 1a besteht aus 522, die H $\beta$ 1b aus 596 und die CaB2 aus 632 Aminosäuren.

Die CaB3 und die H $\beta$ 3 unterscheiden sich durch 2 Einzeldelationen der H $\beta$ 3 an Position 32 und Position 318, sowie durch den Austausch einzelner Aminosäuren an den Positionen 7, 60, 348 und 421. Die Aminosäuresequenz der kardialen  $\beta$ 3-Untereinheit ist identisch mit der GenBank-Sequenz der  $\beta$ 3a-Spleissvariante ( GenBank X\_76555 ), so dass die Unterschiede zur Sequenz, welche aus humanem embryonalen Gewebe kloniert wurde, unklar bleiben.

Aus den Klonierungsarbeiten von Murakami et al. ( 84 ) sind zwei Spleissvarianten der humanen  $\beta$ 3-Untereinheit bekannt, welche sich in den karboxyterminalen Sequenzen unterscheiden. Im menschlichen Herz konnte durch PCR-Klonierung nur die  $\beta$ 3a-Isoform

identifiziert werden, da spezifische Oligonukleotid-Primer gerichtet komplementär zu der  $\beta 3b$ -Isoform kein Amplifikations-Produkt ergaben.

Interessanterweise, konnte durch die oben aufgeführte Klonierungs-Strategie eine Isoform der  $\beta 3$ -Untereinheit identifiziert werden, welche durch alternatives In-und Out-Spleissen des Exons 6 entsteht. Das Exon 6 besteht aus 20 Nukleotiden, so dass bei der Deletions-Variante eine Verschiebung des Leserahmens resultiert, welcher zu einem frühzeitigen Abbruch der Translation an Position 495 führt ( siehe Abb. 4 ). Bei Mäusen wurde die gleiche Deletions-Variante beschrieben ( Murakami et al. ), so dass es sich offensichtlich um eine physiologisch auftretende Spleiss-Variante handelt und nicht um einen Klonierungs-Artefakt.

#### **4.4 Klonierung von Spleißvarianten der $\beta 3$ -Untereinheit:**

Wie oben beschrieben wurde bei der PCR-Klonierung des mittleren Fragmentes der  $\beta 3$ -Untereinheit eine Spleißvariante identifiziert, welche eine Deletion eines 20bp-Fragmentes beinhaltet.

Tatsächlich entspricht diese 20 bp Deletion dem Exon 6, wie in der Analyse der genomischen Struktur der  $\beta 3$ -Untereinheit beschrieben. Ist diese 20 bp Deletion in der Sequenz enthalten, führt dies zu einer Verschiebung des Leserahmens, wodurch ein innerhalb des Leserahmens auftretendes Stop-Codon entsteht, welches die Bildung eines verkürzten Proteins ( entsprechend einer " truncated form " ) bei Translationsstop an Position 495 zur Folge hat. Die Bedeutung dieses verkürzten Proteins ist unklar, jedoch enthält dieses verkürzte  $\beta 3$ -Protein noch die aminoternale Interaktionsstelle für die  $\alpha 1$ -Untereinheit. Möglicherweise können künftige elektrophysiologische Koexpressionsexperimente dieser verkürzten Form gemeinsam mit einer  $\alpha 1c$ - /  $\alpha 2/\delta$ -Untereinheit weitere Aufschlüsse ergeben.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die trunzierte  $\beta 3$ -Untereinheit auch in anderen Myokardanteilen exprimiert wird. Dazu wurden PCR-Experimente mit Oligonukleotidprimern RH 44/ RH 45 ( siehe Material und Methoden ) mit cDNS Bibliotheken hergestellt aus linksventrikulärem, rechtsventrikulärem und rechtsatrialem Gewebe durchgeführt.

Die Amplifikationsprodukte wurden auf einem 5%igem Page-Gel aufgetrennt.

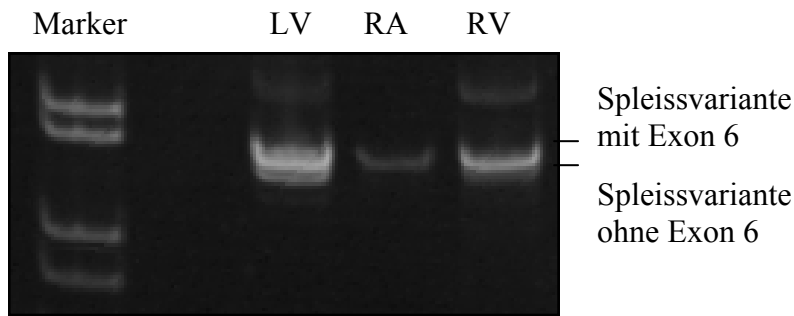


Abbildung 4: Gelelektrophorese der PCR-Amplifikationsprodukte aus normalem humanem linksventrikulärem Myokard ( LV ), normalem humanem rechtsatrialem Myokard ( RA ) und normalem humanem rechtsventrikulärem Myokard ( RV ), ( Primer RH 44/ RH45 ). Linke Spalte: DNA-Marker

Wie auf dem Gel zu erkennen, wird die Deletionsmutante in linksventrikulärem, rechtsventrikulärem und rechtsatrialem Gewebe gesunder Herzen exprimiert.

In weiteren Untersuchungen wurde der Frage nachgegangen, ob sich das Verhältnis der beiden Spleiss-Varianten verändert bei Vergleich zwischen gesundem und insuffizientem Myokard. Bei diesem Experiment entspricht Primer 1 = RH 44 und Primer 2 = RH 45.

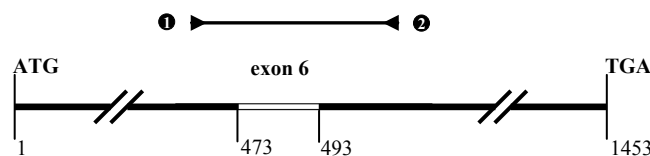


Abbildung 5 : Schematische Darstellung der Basensequenz der humanen  $\beta$ 3a-Untereinheit des spannungsaktivierten L-Typ Kalziumkanals mit Spleißvariante des Exon 6

Dazu wurden Myokardproben von gesundem linksventrikulärem Myokard (n=7) und insuffizientem ischämischen Myokard (n=7) untersucht. Beispielhaft ist hier ein Experiment mit jeweils n=3 Proben von gesundem LV und n=3 Proben von ischämischen Myokard dargestellt.

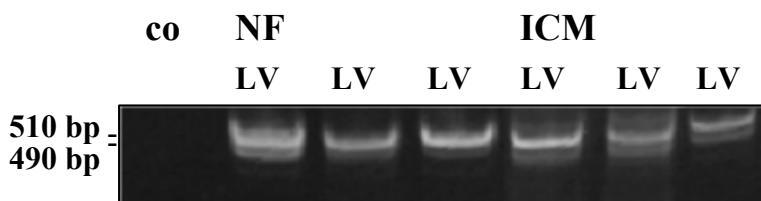


Abbildung 6: 5% PAGE-Elektrophorese der PCR-Amplifikationsprodukte aus nicht insuffizientem humanen linksventrikulärem Myokard ( NF; n=3 ) und humanem insuffizientem linksventrikulärem Myokard bei ischämischer Kardiomyopathie ( ICM; n=3 ). Amplifikationsprodukte entstehen bei Amplifikation mit den Primern RH 44/ RH45 ). Co= Leerwert.

Das Verhältnis ändert sich von full-length Form / trunzierter Form im gesunden Myokard von 83 / 17 % zu 51 / 49 % im insuffizienten ischämischen Myokard ( $p=0.02$ ). Ziel dieser Untersuchung war eine relative Expressionsänderung der beiden Isoformen zueinander zu identifizieren. Daher wurde die für eine quantitative Untersuchung erforderliche Normalisierung auf einen allgemeinen Expressionsmarker wie zum Beispiel kardiales Kalsequestrin nicht durchgeführt.

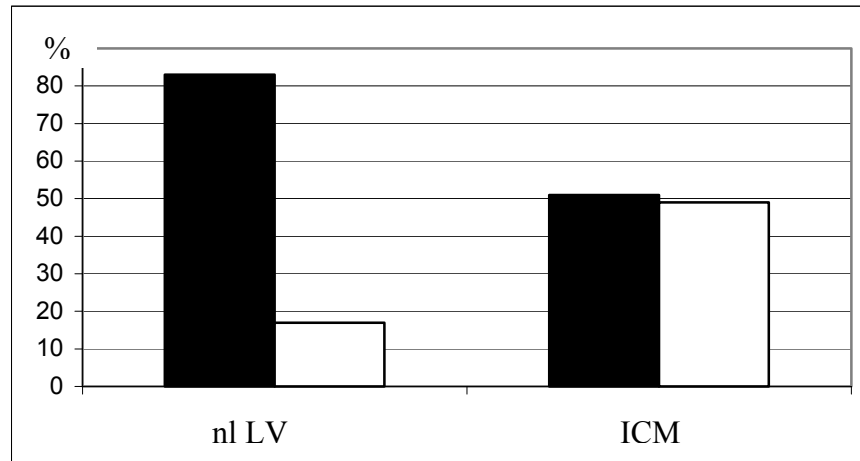
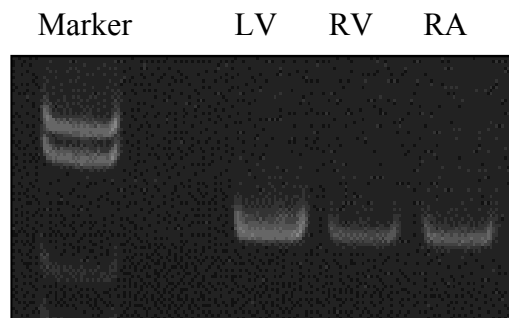


Abbildung 7 : Darstellung der prozentuellen Verhältnisse der full-length ( schwarz ) zur trunzierten ( weiss ) Isoform der  $\beta_3a$ -Untereinheit des spannungsaktivierten L-Typ Kalziumkanals in normalem humanem linksventrikulärem Myokard ( nl LV;  $n=3$  ) und in humanem linksventrikulärem Myokard bei ischämischer Kardiomyopathie ( ICM;  $n=5$  ).

Nachdem diese Spleißform charakterisiert wurde, wurde in weiteren PCR-Experimenten mit spezifischen Oligonukleotidprimern ( RH 46 / RH 47 ) nach Spleißvarianten im aminoterminalen Bereich gesucht.

In einer PCR mit cDNS von linksventrikulärem, rechtsventrikulärem und rechtsatrialem Gewebe gesunder Herzen wurden mit Oligonukleotidprimern RH 46 und RH 47 keine Spleißvarianten im aminoterminalen Sequenzbereich entdeckt. In allen untersuchten Geweben wurde homogen eine 449 bp-Bande amplifiziert.

Abbildung 8: 5% PAGE Gelelektrophorese der PCR-Amplifikationsprodukte aus normalem humanem linksventrikulärem Myokard ( LV ), normalem humanem rechtsventrikulärem Myokard ( RV ) und normalem humanem rechtsatrialem Myokard ( RA ) ( Primer RH 46/ RH47 ). Linke Spalte: DNA-Marker



Zur Suche nach möglichen Spleißvarianten im karboxyterminalen Anteil der  $\beta$ 3-Untereinheit wurden die Oligonukleotidprimer RH 48 und RH 25 verwendet. Untersucht wurde wiederum cDNS präpariert aus linksventrikulärem, rechtsventrikulärem und rechtsatrialem Gewebe gesunder Herzen.

Während in den Geweben aus normalen Spenderherzen und in den Geweben aus Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie eine 678 bp Bande amplifiziert werden konnte, fand sich kein spezifisches Amplifikationsprodukt in dem linksventrikulären, rechtsventrikulären und rechtsatrialen Gewebe bei ischämischer Kardiomyopathie.

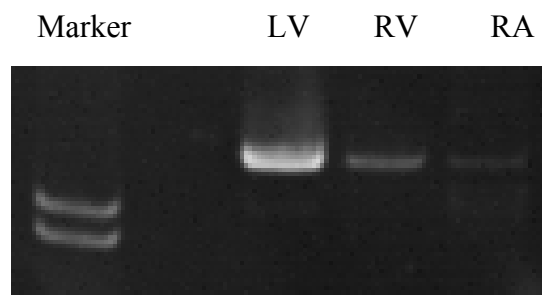


Abbildung 9: 5% PAGE Gelelektrophorese der Amplifikationsprodukte aus normalem humanem linksventrikulärem Myokard ( LV ), normalem humanem rechtsventrikulärem Myokard ( RV ) und normalem humanem rechtsatrialem Myokard ( RA ) ( Primer RH 48/ RH25 ). Linke Spalte: DNA-Marker

Murakami et al. ( 84 ) hatten 2 verschiedene karboxyterminale Spleißformen der humanen  $\beta$ 3-Untereinheiten in humanen Schilddrüsen-Karzinom-Zellen identifizieren können. Um eine mögliche Expression dieser  $\beta$ 3b –Untereinheit nachzuweisen, wurde eine PCR durchgeführt mit der Kombination RH 48 und RH 37, welcher komplementär zum karboxyterminalen Ende der  $\beta$ 3-b Untereinheit ist. Untersucht wurde linksventrikuläres, rechtsventrikuläres und rechtsatriales Gewebe bei ischämischer Kardiomyopathie. In diesem Experiment konnten keine spezifischen Amplifikationsprodukte nachgewiesen werden.

#### 4.5 Ergebnisse der Northern-Blot-Untersuchungen:

In der Northern-Blot-Analysen wurde die Expression der  $\beta_3$ -Untereinheit auf mRNA-Ebene direkt untersucht.

Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit die mRNA aus rechtsatrialem, rechtsventrikulärem und linksventrikulärem Myokardgewebe gesunder Spenderherzen und explantierten terminal insuffizienten Herzen ischämischer Genese gewonnen.

Die wie oben in Material und Methoden ( 3.8 ) beschriebenen durchgeführten Northern-Blots wurden mit einer radioaktiv markierten antisense-RNS-Sonde durchgeführt, welche dem Sequenzabschnitt 97-601 entspricht. Die Hybridisierung wurde unter stringenten Bedingungen durchgeführt, damit keine „ähnlichen“ Transkripte erkannt werden ( Material und Methoden 3.8.5 ).

Nach der Hybridisierung wurden die hybridisierten Northern-Blots einem Röntgenfilm für 10 Tage bei  $-80^{\circ}\text{C}$  exponiert.

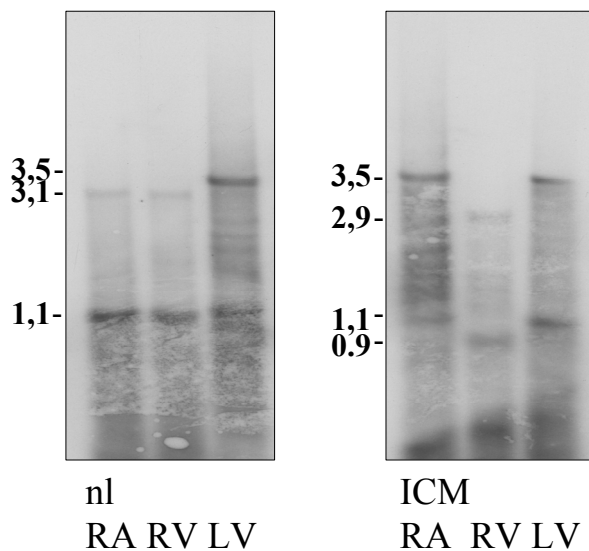


Abbildung 10 : Northern-Blot mit einer radioaktiv markierten antisense-RNS-Sonde ( Sequenzabschnitt 97-601 der humanen  $\beta_3$ a-Untereinheit des spannungsaktivierten L-Typ-Kalziumkanals ). Auf der rechten Seite die Ergebnisse mit normalem humanen rechtsatrialem Myokard ( RA ), normalem humanen rechtsventrikulärem Myokard ( RV ) und normalem humanen linksventrikulärem Myokard ( LV ). Auf der linken Seite die Ergebnisse mit entsprechendem humanem Myokard bei ischämischer Kardiomyopathie.

Die radioaktiv markierte Sonde detektierte im Myokard des rechten Vorhofs und rechten Ventrikels Transkripte von 3,2 kb und im linksventrikulären Myokardgewebe Herzgesunder Transkripte von einer Größe von 3,5 kb.

Bei ischämischer Kardiomyopathie detektierte die Sonde Transkripte mit einer Größe von 3,5 kb im rechtsatrialen rechtsatrialen und linksventrikulären Gewebe. Hingegen wurden Transkripte von 2,9 kb im rechtsventrikulären Gewebe ischämischer Kardiomyopathie- Herzen entdeckt.

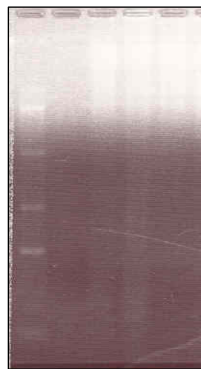


Transkripte von 3,5 kb wurden mit einer anderen doppelsträngigen Sonde auch in anderen humanen Geweben detektiert ( 70 ), was die Spezifität der erhaltenen Hybridisierungssignale nahelegt. Zudem ist auf Nukleotid-Ebene die  $\beta$ 3-Untereinheit zu 73% homolog zur  $\beta$ 1-Untereinheit und zu 64,8% homolog zur  $\beta$ 2-Untereinheit. Durch die stringenten Bedingungen der Hybridisierung mit anschliessenden Waschschrinen sind spezifische Hybridisierungssignale wahrscheinlich.

In allen untersuchten Geweben wurden durch die antisense-Probe Transkripte von einer Grösse von 1,1 kb detektiert mit Ausnahme in der mRNA präpariert aus rechtsventrikulärem ischämischem Myokard, in welcher ein Hybridisierungssignal von 0,9 kb gefunden wurde.

Beispielhaft wird hier das 1% Agarose-Gel dargestellt, welches die gelelektrophoretische Auftrennung der mRNA eines nicht verwendeten Spenderherzens zeigt.

Dieses zeigt verschmierte Spuren in allen Taschen, welche aus den unterschiedlich grossen mRNA Molekülen entstehen. Diese verschmierten Spuren zeigen gleichzeitig, dass keine ribosomale rRNA in der Präparation vorhanden ist, welche unspezifisch antisense Sonden binden könnten.



M RA RV LV

Abbildung 11: Ethidiumbromid gefärbtes 1% Agarose Gel mit mRNA aus normalem humanem rechtsatrialem Myokard ( RA ), normalem humanem rechtsventrikulärem Myokard ( RV ) und normalem humanem linksventrikulärem Myokard ( LV ) und einem Marker ( M ).

## 5. Diskussion

In der vorgestellten Arbeit wird der Nachweis der Genexpression der  $\beta_3$ a-Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals und einer trunzierten Spleißvariante in humanem Herzmuskel beschrieben. Darüberhinaus wird in dieser Arbeit die regional unterschiedliche Genexpression dieser  $\beta_3$ -Untereinheit im menschlichen Herz auf mRNA-Ebene hinsichtlich der trunzierten Spleißvariante beschrieben und Ergebnisse gezeigt, welche auf eine Änderung des Verhältnisses der Genexpression der beiden Spleiß-Varianten bei Herzinsuffizienz bei ischämisch bedingter Kardiomyopathie hinweisen.

In der vorgelegten Arbeit konnte auf mRNA-Ebene in Northern Blots der Nachweis der Genexpression der  $\beta_3$ -Untereinheit auf mRNA-Ebene im menschlichen Myokard geführt werden. Dieser Nachweis war Collin et al. nicht gelungen, wobei

1. in diesen Untersuchungen keine antisense-Sonden verwendet wurden,
2. des Weiteren war die mRNA Beladung der Northern-Blot Gele geringer als in unseren Untersuchungen,
3. die Autoradiographie-Zeiten kürzer als in unseren Untersuchungen waren, so dass quantitativ geringer exprimierte Transkripte nicht detektiert werden konnten
4. experimentelle Bedingungen gewählt wurden, welche die Detektion spezifischer Signale begünstigen (Wahl der Sonde, stringente Hybridisierungsbedingungen, stringente Waschschrte).

Im Detail kann dieser Widerspruch aufgelöst werden durch Vergleiche der methodischen Unterschiede, welche für die Northern Blot-Untersuchung angewendet wurden. Collin et al. verwendeten für Untersuchungen kommerziell hergestellte Northern Blot-Filter, auf welche 10  $\mu$ g Gesamt-RNS aus den jeweiligen Organen aufgetragen war. In unseren Untersuchungen wurden jeweils 10  $\mu$ g isolierte mRNA aufgetragen. Dadurch ist der Anteil jeder spezifischen mRNA höher. Zudem wurden für unsere Untersuchungen radioaktiv markierte antisense-mRNA- Sonden verwendet, welche unter stringenteren Bedingungen als doppelsträngige DNS-Sonden mit der Ziel-mRNA hybridisiert werden können. Der gelungene Nachweis der mRNA-Expression ist somit am ehesten auf die hier verwendeten, gegenüber Collin et al. modifizierten Versuchsbedingungen und –methoden zurückzuführen.

Hingegen befinden sich unsere Ergebnisse in Übereinstimmung mit Untersuchungen im Kanninchen-Myokard ( 45 ), als auch im Ratten-Myokard ( 51 ), welche eine Genexpression der  $\beta_3$ -Untereinheit hatten nachweisen können.

Unsere Northern-Blot Untersuchungen weisen auf eine quantitativ relevante Expression der  $\beta$ 3-Untereinheit im humanen Myokard hin und sichern die durch die PCR-Experimente nachgewiesene Expression der  $\beta$ 3-Untereinheit ab. Die Northern Blot Untersuchungen wurden durchgeführt, da PCR-Klonierung ist kein sicherer Hinweis auf eine relevante lokale Expression eines Gens, da

1. aufgrund des Amplifikationscharakters der PCR auch eine geringe, nicht relevante Anzahl von kodierenden mRNS-Molekülen detektiert wird,
2. akzidentelle Kontaminationen der cDNS-Bibliothek mit  $\beta$ 3-spezifischen Sequenzen nicht ausgeschlossen werden können.

Dieser Nachweis ist wichtig insbesondere vor dem Hintergrund bedeutsam, dass Haase et al. 1997 auf Protein-Ebene ( 103 ) zeigen konnten, dass mit einem  $\beta$ 3-spezifischen Antikörper aus dem Kaninchen in menschlichem Myokard kein Protein detektiert werden konnte. Die fehlende Detektion einer  $\beta$ 3-Untereinheit durch den verwendeten Antikörper kann einerseits in Zusammenhang mit einer quantitativ geringen Expression auf Protein-Ebene stehen, andererseits einer niedrigen Sensitivität des Antikörpers oder den gewählten experimentellen Bedingungen stehen.

In diesem Zusammenhang zeigen unsere Northern-Blot Experimente, dass die  $\beta$ 3-Untereinheit im humanen Myokard auf mRNS Ebene in relevanter, allerdings eher geringerer Quantität exprimiert wird. Dies kann auch die fehlende Detektion durch den spezifischen Antikörper erklären.

Ein weiterer Hinweis auf eine relevante Expression der  $\beta$ 3-Untereinheit ist die Amplifikation spezifischer  $\beta$ 3 kodierender Sequenzen gemeinsam mit  $\beta$ 2 und  $\beta$ 1 kodierenden Sequenzen ( siehe Abbildung 1 ). Dabei wurden degenerierte Primer in der PCR eingesetzt, welche komplementär zu kodierenden Sequenzen aller 3  $\beta$ -Untereinheiten sind. Obgleich auch hier gilt, daß dieses Experiment kein schlüssiger Beweis für eine relevante Expression der  $\beta$ 3-Untereinheit ist, schlägt die Ko-Amplifikation von unterschiedlichen Genprodukten durch degenerierte Primer in der gleichen Reaktion eine relevante Genexpression vor.

Die kodierende Sequenz der klonierten myokardialen  $\beta$ 3-Untereinheit entspricht der bereits von Flockerzi et al. ( 101 ) klonierten und publizierten  $\beta$ 3a-Sequenz. Unsere Ergebnisse schliessen jedoch eine Expression der  $\beta$ 3b-Untereinheit im humanen Myokard aus, im Gegensatz zu humanem Schilddrüsen-Gewebe.

Wie in Abbildung 6 zu erkennen entsteht bei Amplifikation myokardialer cDNS mit den Oligonukleotid-Primern RH 44 und RH 46 eine Doppelbande von 510 bp und 490 bp. Während die 510 bp-Bande die full length kodierende Sequenz zwischen den beiden

spezifischen Primern darstellt, enthält die kleinere 490 bp Bande eine Deletion von 20bp entsprechend Exon 6 wie in den Sequenzierungs-Experimenten gezeigt werden konnte. Diese Deletion entspricht dem Exon 6 der genomischen Struktur der  $\beta 3$ -Untereinheit ( 105 ) und induziert durch eine Verschiebung des Leserahmens einen frühzeitigen Kettenabbruch der  $\beta 3$ -Untereinheit an Position 495.

Derzeit ist die Bedeutung dieser "truncated form" der  $\beta 3$ -Untereinheit unklar, jedoch finden sich Beispiele für die Expression solcher trunzierter Proteine in der Literatur. So wird beispielsweise im „stunned myocardium“ eine trunzierte Form des Troponins exprimiert, welche in einem transgenen Überexpressions-Modell eine deutlich verminderte myokardiale Pumpfunktion induziert ( 106 ). Andererseits deutet die vermehrte Expression der trunzierten Form bei ischämisch bedingter Kardiomyopathie mit sekundärer Herzinsuffizienz auf einen pathophysiologischen Regulationsmechanismus, der durch funktionelle Untersuchungen weiter abzuklären ist. Denkbar ist, dass durch die fehlende GTP-Bindungsstelle eine veränderte Regulation eines L-Typ Kalziumkanals induziert werden könnte. Dieser Frage haben elektrophysiologische Koexpressions-Experimenten mit der  $\alpha 1c$ - und der  $\alpha 2/\delta$ -Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals zu klären.

In den Northern Blot Untersuchungen wurde wie unter Methoden und Material und im Ergebnisteil beschrieben die regionale mRNS-Expression der  $\beta 3$ -Untereinheit im humanen Myokard untersucht.

Natürlich hat uns die Bedeutung der unterschiedlich großen Transkripte bei Vergleich von rechtsatrialem und –ventrikulären vs. linksventrikulären Gewebe im nicht insuffizienten Herz interessiert. Da dieser Unterschied sowohl durch einen Spleißvorgang innerhalb der kodierenden als auch nicht kodierenden Sequenz erklärt werden kann, wurde in PCR Experimenten dieser Unterschied weiter untersucht. In rechtsatrialer, rechtsventrikulärer und linksventrikulärer cDNS wurden mit den Oligonukleotid-Primer Paaren RH 46 / RH 47, RH 44 / RH 45 sowie RH 48 / RH 25 durchgeführt PCR Experimente durchgeführt ( siehe Abbildungen 8, 4, 9 ). Diese Experimente erbrachten keinen Hinweis auf ein vorliegendes weiteres Spleißen in der kodierenden Region der  $\beta 3$ -Untereinheit, so daß die unterschiedliche Länge der im Northern Blot nachweisbaren Transkripte sehr wahrscheinlich durch ein alternatives Spleißen in der 5' oder 3' -nicht translatierten Region bedingt ist.

Die Bedeutung dieses unterschiedlichen Spleißens ist derzeit unklar; es kann lediglich spekuliert werden, ob durch Spleißen in der 5'- oder 3' -nicht translatierten Region die Stabilität der  $\beta 3$ -Untereinheit kodierenden mRNS beeinflusst wird oder die Effektivität der Translation verändert wird.

Aus unseren Experimenten kann nicht abgeleitet werden, in welchen Zellen des Myokards die Expression der  $\beta 3$ -Untereinheit erfolgt.

Wie in vorausgegangenen Untersuchungen gezeigt, ist die Expression der  $\beta 3$ -Untereinheit ausgeprägt in glattmuskulären und neuronalen Geweben ( 45, 70 ).

Aufgrund des Versuchsaufbaus kann in den Northern Blot Untersuchungen nicht unterschieden werden, ob die Expression der  $\beta 3$ -Untereinheit in den glatten Muskelzellen der Koronargefäße oder in neuronalen Zellen oder in beiden Zelltypen erfolgt. Möglicherweise kann diese Frage in Ko-Expressions-Experimenten elektrophysiologisch geklärt werden durch vergleichende Ko-Expression mit der glattmuskulären  $\alpha 1_{C-b}$ -Untereinheit.

In der vorliegenden Arbeit wurde die  $\beta 3$ -Untereinheit auf potentielle Phosphorylierungsstellen

untersucht. Es fanden sich für die Proteinkinase C 10 mögliche Phosphorylierungsstellen und für die Caseinkinase II 6 mögliche Phosphorylierungsstellen.

Proteinphosphorylierung und Dephosphorylierung ist ein bekannter Regulationsmechanismus und spielt möglicherweise durch die cAMP-abhängige Proteinkinase auch bei der Regulation der Aktivität der  $\alpha 1c$ -Untereinheit eine Rolle ( 109 ). Für die  $\beta 3$ -Untereinheit konnte kein entsprechendes Sequenzmotiv für eine cAMP abhängige Proteinphosphorylierung identifiziert werden, anders als bei der  $\beta 2$ -Untereinheit ( 110 ). Andererseits spielen bei der Regulation der Aktivität des L-Typ Kalziumkanals auch andere Proteinkinasen eine Rolle, so vermindert Phosphorylierung des kleinen GTP-bindenden Proteins GEM die Aktivität des Kalziumkanals ( 111). Des Weiteren sind Effekte der cGMP-abhängigen Regulation des L-Typ Kalziumkanals im glatten Gefäßmuskel bekannt ( 112 ).

Die vorliegenden Daten legen die Vermutung nahe, dass L-Typ Kalziumkanäle in Herzmuskelzellen in Multi-Protein-Komplexen arrangiert sind ( 113 ), vergleichbar den Ryanodin-Rezeptoren und anderen Ionenkanälen ( 114 ).

Die Kenntnis möglicher Proteinphosphorylierungsstellen ist daher relevant, da künftig in biochemisch isolierten Multiproteinkomplexen kardialer Kalziumkanäle mit spezifischen Antikörpern nach dem Vorhandensein der entsprechenden Proteinkinasen gesucht werden kann, weshalb in dieser Arbeit eine entsprechende Analyse durchgeführt wurde.

Dies wird helfen, molekulare Regulationsmechanismen zu identifizieren.

## 6. LITERATUR

1. Gibbons W.R., Zygmunt A.C.: Ecitation-contraction coupling in heart.  
In Fozzard H.A. et al. ( eds. ): The heart and cardiovascular system, sec. ed. New York Raven press ( 1992 ), pp. 1249-1279
2. Bouchard R.A., Clark R.B., Giles W.R.: Effects of action potential duration on excitation-contraction coupling coupling in rat ventricular myocytes. Action potential voltage clamp measurements.  
Circ. Res., Vol. 76 ( 1995 ), pp. 790-801
3. Fabiato, A.: Calcium induced calcium release from cardiac sarcoplasmatic reticulum.  
American Journal of Physiology, Vol. 245 (1983), pp. 1-14
4. Lopez-Lopez J.R., Shacklock P.S., Balke C.W., Wier W.G.,: Local calcium transients triggered by single L-type calcium channel currents in cardiac cells.  
Science, Vol. 268 ( 1995 ), pp. 1042-1045
5. Perry S.V.: The regulation of contractile activity in muscle.  
Biochem. Soc. Trans., Vol. 7 ( 1979 ), pp. 593-617
6. Solaro R.J., Wolska B.M., Westfall M.: Regulatory proteins and diastolic relaxation.  
In Lorell B.H. and Grossman W. ( eds. ): Diastolic relaxation of the heart. Boston Kluwer Academic. Publishers, ( 1994 ), pp. 43-53
7. Wolff M.R., McDonald K.S., Moss R.L.: Rate of tension development in cardiac muscle varies with level of activator calcium.  
Circ. Res., Vol. 76 ( 1995 ), pp. 154-160
8. Hancock W.O., Martyn D.A., Huntsman L.L.: Calcium and segment length dependence of isometric force kinetics in intact ferret cardiac muscle.  
Circ. Res., Vol. 73 ( 1993 ), pp. 603-611
9. Brenner B.: Effect of calcium on crossbridge turnover kinetics in skinned rabbit psoas fibers.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. ( 85 ), pp. 3265-3269

10. Arai M., Matsui H., Periasamy M.: Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure.  
Circ. Res., Vol. 74 ( 1994 ), pp. 555-564
11. Luo W., Grupp I.L., Harrer J. et al.: Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation.  
Circ. Res., Vol. 75 ( 1994 ), pp. 401-409
12. Bers D.M., Bassani J.W.M., Bassani R.A.: Competition and redistribution among calcium transport systems in rabbit cardiac myocytes.  
Cardiovasc. Res., Vol. 27 ( 1993 ), pp. 1772-1777
13. Perez-Reyes E., Cribbs L.L., Daud A. et al.: Molecular characterization of a neuronal low voltage activated T-type calcium channel.  
Nature, Vol. 391 ( 1998 ), pp. 896-900
14. Cribbs L.L., Lee J.-H., Yang J. et al.: Cloning and characterization of  $\alpha 1H$  from human heart, a member of the T-type calcium channel gene family.  
Circ. Res., Vol. 83 ( 1998 ), pp. 103-109
15. Flockerzi V., Bosse E., Biel M., Hullin R., Hofmann F.: High voltage activated calcium channels: Molecular composition and function.  
Europ. Heart J., Vol. 12 ( 1991 ), pp. 95-98
16. Tsien R.W., Ellinor P.T., Horne W.: Molecular diversity of voltage dependent calcium channels.  
TiPS, Vol. 12 ( 1991 ), pp. 349-354
17. Hofmann F., Biel M., Flockerzi V.: Molecular basis for calcium channel diversity.  
Ann. Rev. Neurosciences, Vol. 17 ( 1993 ), pp. 399-418
18. Bers D.M., Perez-Reyes E.: Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release.  
Cardiovascular Research, Vol. 42 ( 1999 ), pp. 339-360
19. Mori Y., Friedrich T., Kim M.S., Mikami A., Nakai J., Ruth P., Bosse E., Hofmann F., Flockerzi V., Furuichi T., Mikoshiba K., Imoto K., Tanabe T., Numa S.: Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel  
Nature, Vol. 350 ( 1991 ), pp. 398-402

20. Williams M.E., Brust P.F., Feldman D.H., Patthi S., Simerson S., Maroufi A., McCue A.F., Velicelebi G., Ellis S.B., Harpold M.M.: Structure and functional expression of an omega-conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science*, Vol. 257 ( 1992 ), pp. 389-395
21. Williams M.E., Feldman D.H., McCue A.F., Brenner R., Velicelebi G., Ellis S.B., Harpold M.M.: Structure and functional expression alpha 1, alpha 2 and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron*, Vol. 8 ( 1992 ), pp. 71-84
22. Takimoto K., Nerbonne J.M., Levitan E.S.: Distribution, splicing and glucocorticoid induced expression of cardiac  $\alpha 1C$  and  $\alpha 1D$  voltage gated calcium channel mRNA's. *J. Mol. Cell Card.*, Vol. 29 ( 1997 ), pp. 3035-3042
23. Wyatt C.N., Campbell V., Brodbeck J. et al.: Voltage dependent binding and calcium channel current inhibition by an anti- $\alpha 1D$  subunit antibody in rat dorsal root ganglion neurons and guinea pig myocytes. *J. Phys.*, Vol. 502 ( 1997 ), pp. 307-312
24. Williams M.E., Marubio L.M., Deal C.R., Hans M., Brust P.F., Philipson L.H., Miller R.J., Johnson E.C., Harpold M.M., Ellis S.B.: Structure and functional characterization of neuronal alpha 1E calcium channel subtypes. *J. Biol. Chem.*, Vol. 269 ( 1994 ), pp. 22347-22357
25. Birnbaumer L. et al.: The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, Vol. 13 (1994), pp. 505-506
26. Chaudhari N., Beam K.G.: mRNA for cardiac calcium channel is expressed during development of skeletal muscle. *Dev. Biol.*, Vol. 155 (1993). pp. 507-515
27. Katz A.M.: Calcium channel diversity in the cardiovascular system. *JACC*, Vol. 28 (1996), pp. 522-529
28. Biel M., Hullin R., Freudner S., Singer D., Dascal N. et al.: Tissue-specific expression of high-voltage-activated dihydropyridine-sensitive L-type calcium channels. *Eur. J. Biochem.*, Vol. 200 (1991), pp. 81-88



29. Mikami A., Imoto K., Tanabe T., Niidome T., Mory Y. et al.: Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine sensitive calcium channel. *Nature*, Vol. 340 (1989), pp. 230-233
30. Schultz D., Mikala G., Yatani A., Engle D.B., Iles D.E., Segers B., Sinke R.J., Weghuis D.O., Klockner U., Wakamori M., Wang J.J., Melvin D., Varadi D., Schwatz A.: Cloning, chromosomal location and functional expression of the  $\alpha$ 1-subunit of the L-type voltage-dependent calcium channel from normal human heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 90 (1993), pp. 10494-10498
31. Bean B.P.: Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Ann. Rev. Physiol.*, Vol. 51 (1989), pp. 367-384
32. Flockerzi V., Hofmann F.: Molecular structure of the cardiac calcium channel. N. Sperelakis (Ed.), *Physiology and Pathophysiology of the Heart*, 1995, pp.91-99
33. Pragnell M., De-Waard M., Mori Y., Tanabe T., Snutch T.P., Campbell K.P.: Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmatic linker of the alpha 1-subunit. *Nature*, Vol. 368 (1994), pp. 67-70
34. Zamponi G.W., Bourinet E., Nelson D., Nargeot J., Snutch T.P.: Crosstalk between G-proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha 1-subunit. *Nature*, Vol. 385 (1997), pp. 442-446
35. Tanabe T., Beam K.G., Adams B.A., Niidome T., Numa S.: Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature*, Vol. 346 (1990), pp. 567-569
36. Regulla S., Schneider T., Nastainczyk W., Meyer H.E., Hofmann F.: Identification of the site of interaction of the dihydropyridine channel blockers nitrendipine and azidopine with the calcium channel alpha 1 subunit. *EMBO*, Vol. 10 (1991), pp. 45-49
37. Varadi G., Mori Y., Mikala G., Schwatz A.: Molecular determinants of the Ca channel function and drug action. *Trends Pharmacol. Sci.*, Vol 16, pp. 43-49

38. Snutch T.P., Tomlinson W.J., Leonard J.P., Gilbert M.M.: Distinct calcium channels are generated by alternative splicing and are differentially expressed in the mammalian CNS. *Neuron*, Vol. 7 (1991), pp. 45-57
39. Nishimura S., Takeshima H., Hofmann F., Flockerzi V., Imoto K.: Requirement of the calcium channel beta subunit for functional conformation. *Febs Letters*, Vol. 324 (1993), pp. 283-286
40. Ruth P., Rohrkasten A., Biel M., Bosse E., Regulla S., Meyer H.E., Flockerzi V., Hofmann F.: Primary structure of the beta-subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science*, Vol. 245 (1989), pp. 1115-1118
41. Williams M.E., Feldman D.H., McCue A.F., Brenner R., Velicelibi G., Ellis S.B., Harpold M.M.: Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2 and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron*, Vol. 8 (1992), pp. 71-84
42. Collin T., Wang J.J., Nargeot N., Schwart A.: Molecular cloning of the three isoforms of the L-type voltage dependent calcium channel beta subunit from normal human heart. *Circ. Res.*, Vol. 72 (1993), pp. 1337-1344
43. Powers P.A., Liu S., Hogan K., Gregg R.G.: Skeletal muscle and brain isoforms of a beta-subunit of human voltage-dependent calcium channels are encoded by a single gene. *J. Biol. Chem.*, Vol. 267 (1992), pp. 22967-22972
44. Gregg R.G., Powers P.A., Hogan K.: Assignment of The human gene for the beta-subunit of the voltage-dependent calcium channel ( CACNLB 1 ) to chromosome 17 using somatic cell hybrids and linkage mapping. *Genomics*, Vol. 15 (1993), pp. 185-187
45. Hullin R., Singer-Lahat D., Freichel M., Biel M., Dascal N., Hofmann F., Flockerzi V.: Calcium channel beta subunit heterogeneity: Functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO-J.*, Vol. 11 (1992), pp. 885-890
46. Birnbaumer L.: Cloning and expression of a cardiac/brain beta subunit of the L-type calcium channel. *J. Biol. Chem.*, Vol. 267 (1992), pp. 1792-1797

47. Rosenfeld M.R., Wong E., Dalmau J., Manley G., Posner J.B., Sher E., Furneaux H.M.: Cloning and characterization of a Lambert-Eaton myasthenic syndrome antigen. *Ann. Neur.*, Vol. 33 (1993), pp. 113-120
48. Castellano A., Wei X., Birnbaumer L., Perez-Reyes E.: Cloning and expression of a neuronal calcium channel beta subunit. *J. Biol. Chem.*, Vol. 268 (1993), pp. 12359-12366
49. Seino S., Chien L., Seino M., Blondell O., Takeda J., Johnson J.H., Bell G.I.: Cloning of the alpha 1 subunit of a voltage-dependent calcium channel is expressed in pancreatic beta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 89 (1992), pp. 584-588
50. Yu A.S., Boim M., Hebert S.C., Castellano A., Perez-Reyes E., Lytton J.: Molecular characterization of renal calcium channel beta subunit transcripts. *Am. J. Physiol.*, Vol. 268 (1995), pp. 525-531
51. Perez-Reyes E., Schneider T.: Molecular biology of calcium channels. *Kidney Int.*, Vol. 48 (1995), pp. 1111-1124
52. De Waard M., Pragnell M., Campbell K.P.: Calcium channel regulation by a conserved beta-subunit domain. *Neuron*, Vol. 13 (1994), pp. 495-503
53. De Waard M., Liu H., Walker D., Scott V.E., Gurnett C.A., Campbell K.P.: Direct binding of G-protein beta-gamma complex to voltage dependent calcium channels. *Nature*, Vol 385 (1997), pp. 446-450
54. Lacerda A.E., Kim H.S., Ruth P. et al.: Normalization of current kinetics by interaction between the alpha 1 and beta subunits of the skeletal muscle dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature*, Vol. 325 ( 1991), pp. 527-530
55. Neely A., Olcese R., Wei X., Birnbaumer L., Stefani E.: Potentiation by the beta subunit of the ratio of the ionic current to the charge movement in the cardiac calcium channel. *Science*, Vol. 262 (1993), pp. 575-578

- 56.** Olcese R., Quin N., Schneider T., Neely A., Wei X., Stefani E., Birnbaumer L.: The amino terminus of a calcium channel beta subunit sets rates of channel inactivation independently of the subunits effect on activation.  
Neuron, Vol. 13 (1994), pp. 1433-1438
- 57.** Welling A., Kwan Y.W., Bosse E., Flockerzi V., Hofmann F., Kass R.S.: Subunit-dependent modulation of recombinant L-type calcium channels, molecular basis for dihydropyridine tissue selectivity.  
Circ. Res., Vol. 73 (1993), pp. 974-980
- 58.** DeJongh K.S., Warner C., Catterall W.A.: Subunits of purified calcium channels. Alpha 2 and delta are encoded by the same gene.  
J. Biol. Chem., Vol. 265 (1990), pp. 14738-14741
- 59.** Iles D.E., Lehmann-Horn F., Scherer S.W., Tsui L.C., Olde Weghuis D., Suijkerbuijk R.F., Heytens L., Mikala G., Schwatz A., Ellis F.R., Steward A.D., Deufel T., Wieringa B.: Localization of the gene encoding the alpha2/delta-subunits of the L-type voltage-dependent calcium channel to chromosome 7q and analysis of the segregation of flanking markers in malignant hyperthermia susceptible families.  
Hum. Mol. Gen. Vol. 3 (1994). pp. 969-975
- 60.** Brust P.F., Simerson F., McCue A.F., Deal C.R., Schoonmaker S., Williams M.E., Velicelebi G., Johnson E.C., Harpold M.M., Ellis S.B.: Human neuronal voltage dependent calcium channels. Studies on subunit structure and role in channel assembly.  
Neuropharmacology, Vol. 32 (1993), pp. 1089-1102
- 61.** Kim H.L., Kim H., Lee P., King R.G., Chin H.: Rat brain expresses an alternatively spliced form from the dihydropyridine-sensitive L-type calcium channel alpha2-subunit.  
Proc. Nat. Acad. Sci USA, Vol. 89 (1992), pp. 3251-3255
- 62.** Singer D., Biel M., Lotan I., Flockerzi V., Hofmann F. et al.: The roles of the subunit in the function of the calcium channel.  
Science, Vol. 253 (1991), pp. 1553-1557
- 63.** Wei X.Y., Perez-Reyes E., Lacerda A.E., Schuster G., Brown A.M., Birnbaumer L.: Heterologous regulation of the cardiac calcium channel alpha1 subunit by skeletal muscle beta and gamma subunits. Implications for the structure of cardiac L-type calcium channels.  
J. Biol. Chem., Vol. 266 (1991), pp. 21943-21947

64. Trautwein W., Hescheler J.: Regulation of cardiac L-type calcium current by phosphorylation and G-proteins  
Annu. Rev. Physiol., Vol. 52 (1990), pp. 257-274
65. Lacerda A.E., Rampe D., Brown A.M.: Effects of protein kinase C activators on cardiac Ca channels  
Nature, Vol. 335 (1988), pp. 249-251
66. Pragnell M., Sakamoto J., Jay S.D., Campbell K.P.: Cloning and tissue-specific expression of the brain calcium channel beta-subunit.  
Febs-letters, Vol. 291 ( 1991 ), pp. 253-258
67. Perez-Reyes E., Castellano A., Kim H.S., Bertrand P., Bagstrom E., Lacerda A.E., Wei X.Y., Birnbaumer L.: Cloning and expression of a cardiac/ brain beta-subunit of the L-type calcium channel.  
J. Biol. Chem., Vol. 267 ( 1992 ), pp. 1792-1792
68. Woodget J.R., Gould K.L., Hunter T.: Substrate specificity of protein kinase C. Use of synthetic peptides corresponding to physiological sites as probes for substrate recognition requirements.  
Eur. J. Biochem., Vol. 161 ( 1986 ), pp. 177-184
69. Kennelly P.J., Krebs E.G.: Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases.  
J. Biol. Chem., Vol. 266 ( 1991 ), pp. 15555-15558
70. Collin T., Lory P., Taviaux S., Courtieu C., Guilbault P., Berta P., Nargeot J.: Cloning, chromosomal location and functional expression of the human voltage-dependent calcium-channel beta3-subunit.  
Eur. J. Biochem., Vol. 220 ( 1994 ), pp. 257-262
71. Castellano A., Wei XY., Birnbaumer L., Perez-Reyes E.: Cloning and expression of a third calcium channel beta subunit.  
J. Biol. Chem., Vol. 268 ( 1993 ), pp. 3450-3455
72. Welling A., Bottlender R., Bosse E., Hofmann F.: Stable expression of the calcium channel subunits in somatic cell lines.  
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Vol. 345 ( 1992 ), Suppl.R18, 70

73. Welling A., Donatin K., Bosse E., Flockerzi V., Hofmann F.: The subunit combination of the L-type calcium channel affects the inhibition of devapamil.  
Pflügers Arch., Vol. 422 ( 1993 ), ( Suppl.)
  
74. Hartzell H.C., Fischmeister R.: Direct regulation of cardiac Ca-channels by G-proteins: Neither proven nor necessary?  
Top. Pharm. Sci., Vol. 13 ( 1992 ), pp. 380-385
  
75. Osterrieder W., Brum G., Hescheler J., Trautwein W., Flockerzi V. et al: Injection of subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase into cardiac myocytes modulates Ca-currents.  
Nature, Vol. 298 ( 1982 ), pp. 576-578
  
76. Yatani A., Brown A.M.: Rapid beta-adrenergic modulation of cardiac calcium channel currents by a fast G-protein pathway.  
Science, Vol. 245 ( 1989 ), pp. 71-74
  
77. Welling A., Felbel J., Peper K., Hofmann F.: Hormonal regulation of calcium current in freshly isolated airway smooth muscle cells.  
Am. J. Phys., Vol. 262 ( 1992 ), pp. 351-359
  
78. Haase H., Karczewski P., Beckert R., Krause E.G.: Phosphorylation of the L-type calcium channel beta subunit is involved in beta-adrenergic signal transduction in canine myocardium.  
Febs Letters, Vol. 335 ( 1993 ), pp. 217-222
  
79. Bourinet E., Fournier F., Nargeot J., Charnet P.: Endogenous Xenopus oocyte calcium channels are regulated by protein kinases A and C.  
FEBS Letters, Vol. 299 ( 1992 ), pp. 5-9
  
80. 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, Vol. 328 ( 1987 ), pp. 313-318
  
81. Yanev G.C., Wheeler M.B., Wei X.Y. et al.: Cloning of a novel alpha1-subunit of the voltage dependent calcium channel from the beta-cell.  
Mol. Endocrin., Vol. 6 ( 1992 ), pp. 2143-2152

- 82.** DeWaard M., Witcher D.R., Pragnell M., Liu H., Campbell K.P.: Properties of the  $\alpha 1$ - $\beta$  anchoring site in voltage dependent calcium channels.  
J. Biol. Chem., Vol. 270 ( 1995 ), pp. 12056-12064
- 83.** Cavalie A., Allen T.J.A., Trautwein W.: Role of the GTP-binding protein Gs in the  $\beta$ -adrenergic modulation of cardiac calcium channels.  
Pflügers Arch., Vol. 419 ( 1991 ), pp. 433-443
- 84.** Murakami M., Klugbauer N., Biel M., Hofmann F., Flockerzi V.: The  $\beta 3$ -subunit of human voltage-gated calcium channels.  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., Vol. 349 ( 1994 ), Suppl. R 40
- 85.** Starr T.V., Prystay W., Snutch T.B.: Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum.  
Sci. USA, Vol. 88 ( 1991 ), pp. 5621-5625
- 86.** Dubel S.J., Starr T.V., Hell J., Ahljanian M.K., Enyeart J.J., Catterall W.A., Snutch T.P.:  
Molecular cloning of the  $\alpha 1$ -subunit of an omega-conotoxin sensitiv Ca-channel.  
Acad. Sci. USA, Vol. 89 ( 1992 ), pp. 5058-5062
- 87.** Fujita Y., Mynlieff M., Dirksen R.T., Kim M.S., Niidome T., Nakai J., Friedrich T., Iwabe N., Miyata T., Furuichi T., Furutama D., Mikoshiba K., Beam K.G.: Primary structure and functional expression of the omega-conotoxin sensitiv N-type calcium channel from rabbit brain.  
Neuron, Vol. 10 ( 1993 ), pp. 585-598
- 88.** Chaudhari N.: A single nucleotide deletion in the skeletal muscle-specific calcium channel transcript of muscular dysgenesis mice.  
J. Biol. Chem., Vol. 267 ( 1992 ), pp. 25636-25639
- 89.** Biel M., Ruth P., Bosse E., Hullin R., Stuhmer W., Flockerzi V., Hofmann F.: Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung.  
FEBS Letters, Vol. 269 ( 1990 ), pp. 409-412
- 90.** Koch W.J., Ellinor P.T., Schwartz A.: cDNA cloning of a dihydropyridine-sensitive calcium channel from rat aorta. Evidence for the existence of alternatively spliced forms.  
J. Biol. Chem., Vol. 265 ( 1990 ), pp. 17786-17791

91. Ma W.J., Holz R.W., Uhler M.D.: Expression of a cDNA for a neuronal calcium channel alpha 1 subunit enhances secretion from adrenal chromaffin cells.  
J. Biol. Chem., Vol. 267 ( 1992 ), pp. 22728-22732
92. Hui A., Ellinor P.T., Krizanova O., Wang J.J., Diebold R.J., Schwartz A.: Molecular cloning of multiple subtypes of a novel rat brain isoform of the alpha 1 subunit of the voltage-dependent calcium channel.  
Neuron, Vol. 7 ( 1991 ), pp. 35-44
93. Soong T.W., Stea A., Hodson C.D., Dubel S.J., Vincent S.R., Snutch T.P.: Structure and functional expression of a member of the low voltage activated calcium channel family.  
Science, Vol. 269 ( 1993 ), pp. 1133-1136
94. Niidome T., Kim M.S., Friedrich T., Mori Y.: Molecular cloning and characterization of a novel calcium channel from rabbit brain.  
FEBS Letters, Vol. 308 ( 1992 ), pp. 7-13
95. Bech-Hansen N.T., Naylor M.J., Maybaum T.A. et al: Loss-of-function mutations in a calcium channel  $\alpha$ 1-subunit gene in XP11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness.  
Nature Gen., Vol. 19 ( 1998 ), pp. 264-267
96. Cens T., Mangoni M.E., Nargeot J., Charnet P.: Modulation of the  $\alpha$ 1A Ca channel by  $\beta$  subunits at physiological Ca concentration.  
FEBS Letters, Vol. 391 ( 1996 ), pp. 232-237
97. Hullin R., Asmus F., Ludwig A., Hersel J., Boekstegers P.: Differential regulation of the subunit expression of the cardiac L-type calcium channel subunits in diastolic dysfunction of cardiac allografts.  
Circ., Vol. 2 ( 1999 ), pp. 155-163
98. Chirgwin J.M., Przybyla A.E., Mac Donald R.J., Rutter W.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from source enriched in ribonuclease.  
Biochemistry, Vol. 18 ( 1979 ), pp. 5294-5299
99. Hanahan D.: Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.  
J. Mol. Biol., Vol. 166 ( 1983 ), pp. 557-580



- 100.** Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.: DNA sequencing with chain termination inhibitors.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 74 ( 1977 ), pp. 5463-5467
- 101.** Freise D., Himmerkus N., Schroth G., Trost c., Weissgerber P., Freichel M., Flockerzi V.: Mutations of calcium channel beta subunit genes in mice.  
Biol. Chem., Vol.380 (7-8) (1999), pp. 897-902
- 102.** Klugbauer N., Lacinova L., Marais E., Hobom M., Hofmann F.: Molecular diversity of calcium channel alpha2delta subunit.  
J. Neuroscience, Vol. 19 (2) (1999), pp. 684-91
- 103.** Haase H., Kresse A., Hohaus A., Schulte HD., Maier M., Osterziel KJ., Lange PE, Morano I.: Expression of the calcium channel subunits in the normal and diseased Human myocardium.  
J. Mol. Med., Vol. 74 (2) (1997), pp. 99-104
- 104.** Josephson I.R., Varadi G.: the beta subunit increases Ca currents and gating charge movements of human cardiac L-type Ca channels.  
Biophysical Journal, Vol. 70 ( 1996 ), pp. 1285-1293
- 105.** Yamada Y., Masuda K., Li Q., Ihara Y., Kubota A., Miura T., Nakamura K., Fujii Y., Seino S., Seino Y.: The structures of the human calcium channel alpha 1 Subunit (CACNL1A2) and beta subunit (CACNLB3) genes.  
Genomics, Vol. 27 (2) (1995), pp. 312-319
- 106.** Murphy A.M., Kögler H., Georgakopoulos D., McDonough J.C., Kass D.A., Van Eyk J.E., Morban E.: Transgenic mouse model of stunned myocardium.  
Science USA, Vol. 287 ( 2000 ), pp. 488-491
- 107.** Klugbauer N, Laconova L, Marais E, Hobom M, Hofmann F.: Molecular diversity of the calcium channel  $\alpha 2\delta$  subunit. J Neuroscience Vol. 19(2) (1999), pp.684-691
- 108.** Hullin R., Khan IFY, Wirtz S, Mohacsi P, Varadi G, Schwartz A, Herzig S.: Cardiac L-type calcium channel  $\beta$ -subunits expressed in human heart have differential effects on single channel characteristics. J Biol Chem, Vol. 278(24) (2003), pp 21623-21630
- 109.** Zong X., Schreieck J., Mehrke G., Welling A., Schuster A., Bosse E., Flockerzi V., Hofmann F.: On the regulation of the expressed L-type calcium channel by cAMP-dependent phosphorylation. Pflüger Arch., Vol. 430 (3) (1995), pp. 340-347

- 110.** Haase H., Bartel S., Karczewski P., Morano I., Krause E.G.: In vitro phosphorylation of the cardiac L-type calcium channel beta-subunit in response to catecholamines. *Mol. Cell. Biochem.*, Vol. 163-4 (1996), pp. 99-106
- 111.** Ward Y., Spinelli B., Quon M.J., Chen H., Ikeda S.R., Kelly K.: Phosphorylation of critical serin residues in GEM separates cytoskeletal reorganisation from down-regulation of calcium channel activity. *Mol. And Cell. Biol.*, Vol. 24 (2) (2004), pp. 651-661
- 112.** Sumii K., Imazu M., Yamakido M., Sperelakis N.: Cyclic GMP-dependent protein kinase regulates L-Type calcium current in rat ventricular myocytes. *Heart Vessels, Suppl.12* (1997), pp. 62-65
- 113.** Hulme J.T., Lin T.W., Westenbroek R.E., Scheuer T., Catterall W.A.: Beta-adrenergic regulation requires direct anchoring of PKA to cardiac CaV1.2 channels via a leucine zipper interaction with A-kinase anchoring protein 15 *Proc. Natl. Acad. Scien.*, Vol. 100 (5) (2003), pp. 2819-2824
- 114.** Marx S.: Ion channel macromolecular complexes in the heart. *Mol. Cell Cardiology*, Vol. 35 (1) (2003), pp. 37-44

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

**Name:** Hersel  
**Vorname:** Joachim  
**Geburtsdatum,-ort:** 17.02.1970, Hildesheim  
**Anschrift:** Godehardsplatz 16, 31134 Hildesheim  
**Ehefrau:** Hersel, Daniela, geb. 1976, examinierte OP-Schwester  
**Eltern:** Hersel, Reinhard, geb. 1938, pensionierter Polizeibeamter  
Hersel, Ursula, geb. 1943, Großhandelskauffrau  
**Geschwister:** Vareillas, Stefanie, geb. Hersel, geb. 1966,  
Diplom-Fachübersetzerin

### Schulbildung:

**1976-80:** Grundschule Nordstemmen  
**1980-82:** Orientierungsstufe Nordstemmen  
**1982-89:** Gymnasium Himmelsthür

### Wehrdienst:

**1989-90:** Grundausbildung zum Panzergrenadier und Einsatz als  
Sicherungssoldat im Instandsetzungsbataillon I in Hannover

### Hochschulbildung:

**05/92-05/99:** Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians Universität  
in München  
**04/94:** Ärztliche Vorprüfung ( Note 2,3 )  
**09/95:** Erstes Staatsexamen ( Note 3,0 )  
**04/98:** Zweites Staatsexamen ( Note 1,6 )  
**05/99:** Drittes Staatsexamen ( Note 2,0 )

### Famulaturen:

**1995:** **Unfallchirurgie** in der BG Unfallklinik Murnau bei Prof. V.  
Bühren  
**1996:** **Orthopädie** in der Praxis Dr. Dr. J. Meyer-Holz in Hildesheim  
**1996:** **Plastische- und Handchirurgie** in der BG Unfallklinik Murnau  
bei Dr. A. Schmidt  
**1997:** **Innere Medizin** in der Medizinischen Klinik I des Klinikums  
München/ Großhadern

**Praktisches Jahr:**

- 05/98-07/98:** **Orthopädie** in der Orthopädischen Klinik des Klinikums Großhadern
- 07/98-11/98:** **Innere Medizin** in der Medizinischen Klinik I des Klinikums Großhadern
- 11/98-04/99:** **Herzchirurgie** in der Klinik für Herzchirurgie des Klinikums Großhadern bei Prof. B. Reichart

**Arzt im Praktikum:**

Vom 01.07.1999 bis 31.12.2000 in der **Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie** bei Prof. Dr. Axel Haverich in der Medizinischen Hochschule Hannover

**Weiterbildung:**

Vom 01.01.2001 bis 31.08.2001 in der Klinik für Herzchirurgie im Herzzentrum Leipzig bei Prof. Dr. F.W. Mohr  
Vom 01.09.2001 bis 30.04.2002 in der Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie im St. Bernward Krankenhaus Hildesheim bei Prof. Dr. N. Merkle  
Seit dem 01.05.2002 in der Chirurgischen Klinik I im Städtischen Krankenhaus Hildesheim bei Prof. Dr. med. A. Richter

**Promotionsarbeit:**

„Expression der L-Typ Kalziumkanal  $\beta$ 3a-Untereinheit und einer trunzierten Isoform der  $\beta$ 3a-Untereinheit in humanem Myokard“ bei Herrn Prof. Dr. med. P. Boekstegers, Medizinische Klinik und Poliklinik I des Klinikums Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München

**Publikation:**

Hersel J, Jung S, Mohacsi P, et al: Expression of the L-type calcium channel in human heart failure. Basic Res. Cardiol. ( Germany), 2002, 97 Suppl. 1 pp. 4-10