

Funktionelle Expression und Analyse von K^+ -Kanälen
aus Säugern in *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Sarah Schwarzer

aus

Waldbröl

Bonn 2006

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Referent: PD. Dr. J. Ludwig

2. Referent: Prof. Dr. M. Höfer

Tag der Promotion:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Membranproteine	1
1.2 Ionen-Kanäle	1
1.3 K ⁺ -Kanäle	2
1.3.1 Einteilung von K ⁺ -Kanälen anhand der Membrantopologie	2
1.3.2 Funktionelle Klassen von K ⁺ -Kanälen	5
1.3.3 Inaktivierungsmechnismen verschiedener K ⁺ -Kanal Familien	11
1.3.4 Zusätzliche Untereinheiten von K ⁺ -Kanälen	12
1.3.5 K ⁺ -Kanäle und ihre medizinische Bedeutung	13
1.3.6 Nomenklatur von K ⁺ -Kanälen	16
1.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Modellorganismus	17
1.4.1 K ⁺ -Transport in <i>S. cerevisiae</i>	17
1.4.2 Expression von heterologen K ⁺ -Transportern und -Kanälen in <i>S. cerevisiae</i>	18
1.5 Ziele der Arbeit	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Organismen	20
2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	20
2.1.2 <i>S. cerevisiae</i> Stämme	20
2.2 Chemikalien und Nährmedien	26
2.3 Anzucht von Bakterienzellen	29
2.3.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> XL1-Blue-Zellen	30
2.3.2 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> XL1-Blue Zellen	31
2.4 Anzucht von Hefezellen	32
2.4.1 Anfertigen von Hefezellen-Glycerinkulturen	32
2.4.2 Herstellen einer Hefezellen-Vorkultur	32

2.4.3	Herstellung und Lagerung kompetenter <i>S. cerevisiae</i> Zellen	33
2.4.4	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> Stämmen	33
2.4.5	Waschen von Hefezellen	34
2.4.6	Bestimmung der Zelldichte	35
2.4.7	„Plasmid recovery“	35
2.5	Lichtmikroskopie	35
2.5.1	Mikroskopie von Zellen aus einer Flüssigkultur	35
2.5.2	Mikroskopie von Zellen aus einer Festkultur	35
2.5.3	Fluoreszenzmikroskopie	36
2.6	Präparation von Nukleinsäuren	36
2.6.1	Plasmid-Minipräparation aus Bakterien durch alkalische Lyse	36
2.6.2	Plasmid-Minipräparation aus Bakterien mit dem NucleoSpin® Plasmid Set von Macherey und Nagel	37
2.6.3	Präparation genomischer DNA aus Hefe / Hefe Plasmid-Präparation	37
2.6.4	Präparation von RNA aus Hefe	37
2.6.5	Quantifizierung von Nukleinsäuren	38
2.6.6	Phenol-Chloroform-Extraktion	39
2.6.7	Ethanol-fällung von DNA	39
2.7	Modifikation und Analysen von Nukleinsäuren	39
2.7.1	Verdau mit Restriktionsendonukleasen	39
2.7.2	DNA-Sequenzierung	40
2.7.3	Glätten von überstehenden Enden an DNA-Fragmenten	40
2.7.4	Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten	41
2.7.5	Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten	41
2.7.6	Hitzeinaktivierung von Enzymen	41
2.7.7	Ligation von DNA	42
2.7.8	DNA-Gelelektrophorese	42
2.7.9	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	42
2.7.10	Visualisierung von RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese	43
2.7.11	„Northern Blot“	43
2.7.12	Hybridisierung eines „Northern Blots“	44

2.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
2.8.1	Standard Polymerase-Kettenreaktion	44
2.8.2	<i>in vitro</i> Mutagenese zum gezielten Austausch einzelner Nukleotide	45
2.8.3	PCR zur Fusion zweier DNA-Fragmente	47
2.8.4	PCR zur Herstellung einer DNA-Sonde	49
2.8.5	Klonierung von PCR-Produkten	49
2.8.6	Bakterien-Kolonie-PCR	49
2.8.7	Hefe-Kolonie-PCR	49
2.9	Physiologische Tests mit Hefezellen	50
2.9.1	Wachstumstest auf Festmedium	50
2.9.2	Messung der Vermehrung von Hefezellen in Mikrotiterplatten	50
2.9.3	Auswertung	51
3	Ergebnisse	52
3.1	Expression von homomeren K ⁺ -Kanälen in Hefe	52
3.1.1	Herstellung der <i>rEAG1Δ190</i> und <i>rEAG1Δ190/yEGFP</i> exprimierenden Hefestämme	53
3.1.2	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von <i>rEAG1/yEGFP</i> bzw. <i>rEAG1Δ190/yEGFP</i> exprimierenden Hefestämmen	53
3.1.3	Untersuchung von <i>rEAG1</i> und <i>rEAG1Δ190</i> exprimierenden <i>S. cerevisiae</i> Stämmen	53
3.1.4	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von <i>rEAG1Δ190</i> -Mutanten in Hefe	55
3.2	Untersuchung von heteromeren K ⁺ -Kanälen durch Expression der α-Untereinheiten <i>hKCNQ2</i> und <i>hKCNQ3</i> in <i>S. cerevisiae</i>	58
3.2.1	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der <i>hKCNQ2</i> und/oder <i>hKCNQ3</i> exprimierenden Stämme	58
3.2.2	Untersuchung der Expression von <i>hKCNQ2</i> und <i>hKCNQ3</i> in <i>S. cerevisiae</i>	59
3.3	Untersuchung von heteromeren aus α- und β-Untereinheiten zusammengesetzten K ⁺ -Kanälen: Expression von <i>hKCNQ1</i> und <i>hKCNQ3</i> in <i>S. cerevisiae</i>	61

3.3.1	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von <i>hKCNQ1</i> und <i>hKCNE3</i> einzeln bzw. zusammen exprimierenden Hefestämmen	61
3.3.2	Identifizierung eines ER-Retentionssignals	62
3.3.3	Untersuchung der Expression von <i>hKCNQ1</i> und <i>hKCNE3</i> in <i>S. cerevisiae</i>	64
3.3.4	Untersuchung des Wachstums von <i>hKCNQ1</i> - und/oder <i>hKCNE3</i> exprimierenden <i>S. cerevisiae</i> Stämmen	65
3.4	Expression klinisch relevanter <i>Kir2.1</i> -Mutanten in <i>S. cerevisiae</i>	67
3.4.1	Untersuchung der zellulären Lokalisation von <i>yEGFP/mKir2.1</i> -Varianten in Hefe	67
3.4.2	Wachstumstests mit <i>yEGFP/mKir2.1</i> bzw. mutiertes <i>yEGFP/mKir2.1</i> exprimierenden Hefestämmen	68
3.4.3	Koexpression von <i>mKir2.1</i> unter Kontrolle von P_{CUP1} und <i>mKir2.1</i> (-Mutanten) unter Kontrolle von P_{GAL1}	71
3.4.4	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der <i>mRFP/mKir2.1</i> unter Kontrolle von P_{CUP1} und (mutiertes) <i>yEGFP/mKir2.1</i> unter Kontrolle von P_{MET25} koexprimierenden Stämme	75
3.4.5	Untersuchung des Wachstums von <i>mRFP/mKir2.1</i> unter Kontrolle von P_{CUP1} und (mutiertes) <i>yEGFP/mKir2.1</i> unter Kontrolle von P_{MET25} koexprimierenden Stämmen	77
3.5	Expression von <i>rKir3.2</i> und verschiedenen <i>rKir3.2</i> -Mutanten in <i>S. cerevisiae</i>	80
3.5.1	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der <i>yEGFP/rKir3.2</i> bzw. mutiertes <i>yEGFP/rKir3.2</i> exprimierenden Hefestämme	80
3.5.2	Wachstum von <i>yEGFP/rKir3.2</i> bzw. <i>yEGFP/rKir3.2</i> -Mutanten exprimierenden Hefestämmen	81
3.5.3	Untersuchung des Einflusses von monovalenten Kationen	83
3.5.4	Untersuchungen zur Ursache des verbesserten Wachstums von <i>rKir3.2</i> bzw. <i>rKir3.2 [S177T]</i> exprimierenden Stämmen in Medium mit 10 mM KCl durch NaCl Zugabe	85
3.5.5	Pharmakologische Untersuchungen	87
4	Diskussion	90

4.1	Lokalisationsanalysen	90
4.2	Die Funktionalität von K ⁺ -Kanälen aus Säugern in Hefe	98
5	Zusammenfassung	113
6	Literaturverzeichnis	115
7	Anhang	135
7.1	Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.	135
7.2	Verwendete Plasmide	137
7.2.1	Auflistung auf die im Rahmen dieser Arbeit zurückgegriffenen Plasmide .	137
7.2.2	Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmide . . .	138
7.3	Herstellung der Plasmide	141
7.3.1	Herstellung der Plasmide zur Expression von <i>rEAG1</i> bzw. <i>rEAG1Δ190</i> (-Varianten)	141
7.3.2	Herstellung der Plasmide zur Expression von <i>hKCNQ1</i> , <i>hKCNQ2</i> , <i>hKCNQ3</i> und <i>hKCNE3</i>	145
7.3.3	Herstellung der Plasmide zur Expression von <i>mKir2.1</i> (-Mutanten)	164
7.3.4	Herstellung der Plasmide zur Expression von <i>rKir3.2</i> (-Mutanten)	176

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung tetramerer K ⁺ -Kanäle	3
1.2	Schematische Darstellung der Membrantopologie unterschiedlicher K ⁺ -Kanal α -Untereinheiten	4
1.3	G-Protein aktivierte einwärts-gleichrichtende K ⁺ -Kanäle (Kir3.2)	7
1.4	Schematische Darstellung einer spannungsabhängigen α -Untereinheit und einer assoziierten β -Untereinheit	11
1.5	Schematische Darstellung der K ⁺ -Translokationssysteme in Hefe	18
2.1	Schematische Darstellung der <i>in vitro</i> Mutagenese zum Austausch einzelner Nukleotide in einem bekannten DNA-Fragment	47
2.2	Schematische Darstellung der Fusion zweier DNA-Fragmente	48
3.1	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von <i>rEAG1/yEGFP</i> bzw. <i>rEAG1Δ190/yEGFP</i> exprimierenden Hefezellen	54
3.2	Wachstum von <i>yEGFP</i> , <i>rEAG1/yEGFP</i> bzw. <i>rEAG1Δ190/yEGFP</i> exprimierenden Hefestämmen	56
3.3	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Hefestämme PLY246 [pYEX-rEAG1 Δ 190 FS/yEGFP] bzw. PLY246 [pYEX-rEAG1 Δ 190 RQ/yEGFP]	57
3.4	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der zellulären Lokalisation von hKCNQ2/yEGFP bzw. hKCNQ3/yEGFP in Hefe	59
3.5	Untersuchung der Transkription von <i>hKCNQ2</i> und <i>hKCNQ3</i>	60
3.6	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Hefestämme PLY246 [pYEX-hKCNQ1/yEGFP] und PLY246 [pYEX-hKCNQ3/yEGFP]	62
3.7	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung <i>hKCNQ1/yEGFP</i> und <i>hKCNQ3/yEGFP</i> exprimierender Hefestämme	63
3.8	Fluoreszenzmikroskopische Analyse von <i>yEGFP/hKCNQ3</i> -Varianten exprimierender Hefezellen	63
3.9	Untersuchung der Transkription von <i>hKCNQ1</i> und <i>hKCNQ3</i>	64
3.10	Wachstum von <i>hKCNQ1</i> und/oder <i>hKCNQ3</i> exprimierenden Hefestämmen	66
3.11	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der <i>yEGFP/mKir2.1</i> und mutiertes <i>yEGFP/ mKir2.1</i> exprimierenden Hefestämme	68

3.12 Schematische Darstellung von <i>sig/mRFP/HDEL</i>	69
3.13 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Lokalisation von GFP/mKir2.1 in Hefezellen	69
3.14 Wachstum von <i>yEGFP</i> , <i>yEGFP/mKir2.1</i> bzw. <i>yEGFP/mKir2.1 [R67W]</i> exprimie- renden Hefestämmen	69
3.15 Vergleich der maximalen Wachstumsraten <i>yEGFP/mKir2.1</i> bzw. <i>yEGFP/mKir2.1-</i> Mutanten exprimierender Stämme bei unterschiedlichen KCl-Konzentrationen . .	70
3.16 Regulation von P_{GAL1} durch Galaktose	72
3.17 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>mRFP/mKir2.1</i> unter Kontrolle von P_{CUP1} und mutiertes <i>yEGFP/mKir2.1</i> unter Kontrolle von P_{GAL1} koexprimieren- den Hefezellen	72
3.18 Wachstum von Hefestämmen, die <i>mRFP/mKir2.1</i> unter Kontrolle von P_{CUP1} und <i>yEGFP/mKir2.1</i> -Mutanten unter Kontrolle von P_{MET25} koexprimieren	74
3.19 Einfluss von Galaktose auf das Wachstum von Hefestämmen	75
3.20 Untersuchung der Aktivität von P_{MET25}	76
3.21 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>mRFP/mKir2.1</i> unter Kontrolle von P_{CUP1} und mutiertes <i>yEGFP/mKir2.1</i> unter Kontrolle von P_{MET25} koexprimie- renden Hefezellen	77
3.22 Untersuchung des Wachstums von <i>mKir2.1</i> unter Kontrolle von P_{CUP1} und (mu- tiertes) <i>mKir2.1</i> unter Kontrolle von P_{MET25} koexprimierenden Stämmen	79
3.23 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der <i>yEGFP/rKir3.2</i> bzw. mutiertes <i>yEGFP/ rKir3.2</i> exprimierenden Hefezellen	81
3.24 Wachstum von <i>yEGFP/rKir3.2</i> bzw. mutiertes <i>yEGFP/rKir3.2</i> exprimierenden Hefestämmen	82
3.25 Wachstum von <i>yEGFP/rKir3.2 [S177W]</i> und <i>yEGFP/rKir3.2 [V188G]</i> exprimie- renden Hefestämmen	83
3.26 Wachstum von <i>yEGFP/rKir3.2 [S177W]</i> bzw. <i>-[V188G]</i> exprimierenden Stäm- men in Medien mit 10 mM KCl und unterschiedlichen LiCl-Konzentrationen . . .	84
3.27 Wachstumstest von <i>yEGFP/rKir3.2 [S177W]</i> bzw. <i>-[V188G]</i> exprimierenden Stäm- men in Medien mit 10 mM KCl mit 0 bzw. 290 mM NaCl	85

3.28 Untersuchung des Einflusses von Cholinchlorid und Natriumchlorid auf das Wachstum von <i>yEGFP/Kir3.2</i> bzw. <i>yEGFP/rKir3.2 [S177T]</i> exprimierenden Stämmen	86
3.29 Einfluss von Ba ²⁺ auf das Wachstum von <i>rKir3.2</i> (-Mutanten) exprimierenden Hefestämmen	88
3.30 Wachstum von <i>rKir3.2</i> (-Mutanten) exprimierenden Hefestämmen in Medium mit 20 mM KCl ohne und mit 100 mM NaCl und unterschiedlichen Hygromycin B Konzentrationen	89
4.1 ER-Verteilung in <i>S. cerevisiae</i>	93
4.2 Aminosäuresequenz von hKCNE3	95
4.3 Schematische Darstellung einer Kir3.2-Untereinheit	109
7.1 Konstruktion von pYEX-rEAG1Δ190/yEGFP	141
7.2 Konstruktion von pYEX-rEAG1Δ190	142
7.3 Konstruktion von rEAG1Δ190 [F714S, F717S]/yEGFP	143
7.4 Konstruktion von rEAG1Δ190 [R711Q, R712Q, R716Q, R718Q]/yEGFP	144
7.5 Konstruktion von pYEX-hKCNQ2	145
7.6 Konstruktion von pYEX-hKCNQ2/yEGFP	146
7.7 Konstruktion von p77X-hKCNQ2	147
7.8 Konstruktion von p77X-hKCNQ2/yEGFP	148
7.9 Konstruktion von pYEX-hKCNQ3	149
7.10 Konstruktion von pYEX-hKCNQ3/yEGFP	150
7.11 Konstruktion von p77X-hKCNQ3	151
7.12 Konstruktion von p77X-hKCNQ3/yEGFP	152
7.13 Konstruktion von pYEX-hKCNQ1	153
7.14 Konstruktion von pYEX-hKCNQ1/yEGFP-Δ <i>Bg/II</i>	154
7.15 Konstruktion von pYEX-hKCNQ1/yEGFP	155
7.16 Konstruktion von p77X-hKCNQ1	156
7.17 Konstruktion von p77X-hKCNQ1/yEGFP	157
7.18 Konstruktion von pYEX-hKCNE3	158
7.19 Konstruktion von pYEX-hKCNE3/yEGFP	159
7.20 Konstruktion von p77X-hKCNE3	160

7.21 Konstruktion von pYEX-yEGFP/hKCNE3	161
7.22 Konstruktion von pYEX-yEGFP/hKCNE3 [R81A, R83A]	162
7.23 Konstruktion von pYEX-yEGFP/hKCNE3 Δ C	163
7.24 Konstruktion von p77x-(His)-sig/mRFP/HDEL	164
7.25 Konstruktion von pY-P _{GAL1} -yEGFP-C1	165
7.26 Konstruktion von pYEX-yEGFP/mKir2.1	166
7.27 Konstruktion von pYEX-yEGFP/mKir2.1 [R67W]	168
7.28 Konstruktion von pY-P _{GAL1} -yEGFP/mKir2.1	169
7.29 Konstruktion von pY-P _{GAL1} -yEGFP/mKir2.1 [R67W]	170
7.30 Konstruktion von pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1	171
7.31 Konstruktion von p77trp	172
7.32 Konstruktion von pY-P _{MET25} -yEGFP-C1	173
7.33 Konstruktion von pY-P _{MET25} -yEGFP/mKir2.1	174
7.34 Konstruktion von pY-P _{MET25} -yEGFP/mKir2.1 [R67W]	175
7.35 Konstruktion von pYEX-rKir3.2	176
7.36 Konstruktion von pYEX-yEGFP/rKir3.2	177
7.37 Konstruktion von pYEX-rKir3.2 [G156S]	179
7.38 Konstruktion von pYEX-yEGFP/rKir3.2 [G156S]	180

Abkürzungen und Synonyme

Abb.	Abbildung
ABC	ATP-Binde-Cassetten
abs.	absolut
amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cfu	colony forming units
d. h.	das heißt
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribunucleinacid
dATP	Desoxyadenintri-phosphat
dCTP	Desoxycytosintri-phosphat
dGTP	Desoxyguanintri-phosphat
dNTP	Desoxynucleotidtri-phosphat
dTTP	Desoxythymintri-phosphat
dUTP	Desoxyuridintri-phosphat
ϵ	Extinktionskoeffizient
EC ₅₀	„median effective concentration“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
g	„gravity“ ($g=9,81 \text{ ms}^{-2}$)
GFP	„Green Fluorescent Protein,“
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HIS	Histidin

KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LEU	Leucin
M	molar
MET	Methionin
min	Minute(n)
NaAc	Natriumacetat
nm	Nanometer
OD _x	Optische Dichte bei x nm bei 1 cm Schichtdicke
pA	pro Analysis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, „polymerase chain reaction“
PEG	Polyethylenglycol
pH	potentia Hydrogenii bei RT
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (22°C)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
s. o.	siehe oben
s. S.	siehe Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
tet	Tetracyclin
TM	Transmembrandomäne(n)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

TRP	Tryptophan
u	Einheit der Enzymaktivität, „unit(s)“
URA	Uracil
UV	ultraviolett
WT	Wildtyp
(w/v)	„weight per volume“
yEGFP	„yeast enhanced“ GFP
z. B.	zum Beispiel

Innerhalb der Sequenzen wurden Nukleotide durch den Anfangsbuchstaben der Basen dargestellt. Die Abkürzungen der Aminosäuren im Einbuchstaben- und Dreibuchstabencode erfolgten nach der IUPAC-Nomenklatur.

Weiterhin wurden die üblichen Abkürzungen der Basis- sowie der abgeleiteten Einheiten des „Système Internationale“ mit den Kurzzeichen zur Bezeichnung von Vielfachen und Bruchteilen verwendet.

1 Einleitung

1.1 Membranproteine

Zellen und intrazelluläre Kompartimente sind von ihrer Umgebung durch biologische Membranen abgegrenzt. Diese Membranen bestehen aus einer Doppelschicht aus Phospho- und anderen Lipiden, an die Membranproteine assoziiert oder in die Membranproteine eingelagert sind (Übersicht bei [Alberts et al., 1995](#)). Aufgrund dieser Lipiddoppelschicht sind biologische Membranen undurchlässig für die meisten (hydrophilen) Moleküle, so auch für Ionen.

1.2 Ionen-Kanäle

Biologische Zellen erhalten einen Konzentrationsgradienten für anorganische Ionen zwischen dem intra- und dem extrazellulären Raum aufrecht. Im Allgemeinen liegt eine höhere K^+ -Konzentration im Cytoplasma als im extrazellulären Raum vor, typische Werte für Wirbeltier Neuronen sind z. B. 140 mM K^+ intrazellulär und 4 mM K^+ extrazellulär (Übersicht bei [Lodish et al., 1996](#)). Die Na^+ - oder auch Cl^- -Konzentration ist dagegen extrazellulär höher (Übersicht bei [Hille, 1992](#)).

Na^+ -, Cl^- - und K^+ -Kanäle bilden eine wässrige Pore, welche Ionen die Diffusion durch die hydrophobe Membran ermöglicht. Dies geschieht immer entlang des elektrochemischen Gradienten, der sich aus der Membranspannung und dem Konzentrationsgradienten zusammensetzt. Somit ist auch eine Diffusion von Ionen gegen den Konzentrationsgradienten möglich (Übersicht bei [Gutman et al., 2003](#)). Durch sogenannte Selektivitätsfilter werden Kanäle spezifisch für bestimmte Ionen. Die jeweiligen Ionen fließen mit einer Geschwindigkeit von 10^6 bis 10^8 Molekülen pro Sekunde ([Cooper and Jan, 1999](#)) durch die Membran.

Ein wichtiges Funktionsmerkmal von Ionen-Kanälen ist ihre Regulierbarkeit. Die Regulierung kann z. B. durch „second messenger“, Protein-Protein-Interaktionen, Phosphorylierung oder durch Änderung der Membranspannung erfolgen. So können Kanäle zwischen geschlossenen, offenen und inaktiven Konformationen wechseln, und kontrollierte Ionenflüsse durch die Membran vermitteln ([Cooper and Jan, 1999](#)).

1.3 K⁺-Kanäle

Die Gruppe der K⁺-Kanäle bildet die heterogenste und größte Gruppe innerhalb der Ionenkanäle (Sanguinetti and Spector, 1997; Shieh *et al.*, 2000). Sie sind nicht nur in allen prokaryontischen und eukaryontischen Organismen vertreten (Huang *et al.*, 1997), sondern spielen auch bei den unterschiedlichsten physiologischen Vorgängen eine wichtige Rolle, wie z. B. bei der Aufrechterhaltung des Membranpotentials oder der Hormonsekretion (Ashcroft and Gribble, 1999). In erregbaren Zellen sind ihre Funktionen u. a. die Regulation der Erregbarkeit, die Repolarisation des Aktionspotentials sowie die Bestimmung seiner Form und Frequenz (Hille, 2001; Pongs, 1992; Strong *et al.*, 1993; Chandy and Gutman, 1995; Isomoto *et al.*, 1997). Das Öffnen von K⁺-Kanälen kann durch viele sehr unterschiedliche Faktoren ausgelöst werden, wie Änderung der Membranspannung, Änderung der intrazellulären Konzentration bestimmter Ionen (Ca²⁺), durch kleine organische Moleküle (ATP, cAMP) oder Proteine (G-Protein Untereinheiten) (Roosild *et al.*, 2004).

K⁺-Kanäle sind homo- oder heteromere Proteine aus porenbildenden α -Untereinheiten und teilweise β -Untereinheiten. β -Untereinheiten liegen entweder cytoplasmatisch oder transmembranal vor. Ein vollständiger K⁺-Kanal enthält vier „Porendomänen“. Enthält eine α -Untereinheit eine Porendomäne, ist der vollständige K⁺-Kanal ein Tetramer aus α -Untereinheiten (Abb. 1.1) (Doyle *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2003b), enthält die α -Untereinheit zwei Porendomänen, handelt es sich bei dem K⁺-Kanal um ein Dimer aus α -Untereinheiten (Kim, 2003).

1.3.1 Einteilung von K⁺-Kanälen anhand der Membrantopologie

α -Untereinheiten der K⁺-Kanäle sind strukturell sehr unterschiedlich aufgebaut. Sie können zwei, vier, sechs, sieben oder acht Transmembran (TM) Domänen haben (Abb. 1.2). Allen ist gemein, dass sie wie erwähnt mindestens eine Porendomäne haben. C-terminal der Porenhelix befindet sich ein hochkonservierter Sequenzabschnitt (Selektivitätsfilter), der dafür sorgt, dass nur K⁺-Ionen den Kanal passieren können. Bei K⁺-Kanälen mit zwei Transmembrandomänen (zwei TM-Kanäle) befindet sich die Porendomäne zwischen den beiden Transmembrandomänen „M1“ und „M2“.

Haben die Untereinheiten sechs Transmembrandomänen („S1“ - „S6“), so liegt die Pore zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne. Diese Gruppe lässt sich weiter unter-

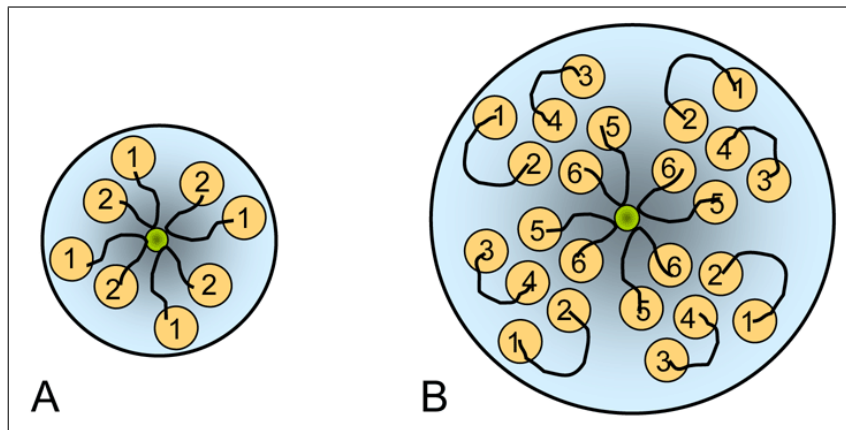


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung tetramerer K⁺-Kanäle. In **A** ist die extrazelluläre Aufsicht auf einen K⁺-Kanal bestehend aus vier α -Untereinheiten mit je zwei Transmembrandomänen dargestellt. In **B** ist die extrazelluläre Aufsicht auf einen K⁺-Kanal bestehend aus vier α -Untereinheiten mit je sechs Transmembrandomänen dargestellt. Gelbe Kreise symbolisieren die Transmembrandomänen. Die jeweiligen Nummern bezeichnen die Transmembrandomäne, schwarze Striche symbolisieren die extrazellulären Bereiche zwischen den Transmembrandomänen. Der zentrale grüne Kreis stellt die Pore dar (nach [Varshney and Mathew, 2004](#)).

teilen. Bei den spannungsabhängigen K⁺-Kanälen ist die vierte Transmembrandomäne („S4“) positiv geladen und fungiert als Spannungssensor (Abb. 1.2 B). Andernfalls handelt es sich um nicht-spannungsabhängige Ca²⁺-aktivierte K⁺-Kanäle mit geringer oder mittlerer Leitfähigkeit (Abb. 1.2 C) ([Köhler et al., 1996](#); [Ishii et al., 1997](#); [Joiner et al., 1997](#)).

Zu den K⁺-Kanälen mit sieben Transmembrandomänen gehören die Kanäle mit großer Leitfähigkeit, welche als einzige Gruppe der K⁺-Kanäle eine ungerade Anzahl an Transmembrandomänen pro α -Untereinheit haben. Im Gegensatz zu den bei K⁺-Kanälen ansonsten immer cytoplasmatisch lokalisierten N-Terminus befindet sich hier der N-Terminus extrazellulär. Die Porendomäne liegt zwischen der sechsten und siebten Transmembrandomäne (Abb. 1.2 D) ([Moss and Magleby, 2001](#)).

Die Doppelporen-K⁺-Kanäle haben entweder vier oder acht Transmembrandomänen und enthalten pro α -Untereinheit zwei Porendomänen. Doppelporen-K⁺-Kanäle mit vier Transmembrandomänen sind aus Pflanzen und Vertebraten bekannt ([Gurney et al., 2003](#)) (Abb. 1.2 E), mit acht Transmembrandomänen (Abb. 1.2 F) bisher ausschließlich aus Hefe (z. B. *S. cerevisiae*) ([Ketchum et al., 1995](#); [Zhou et al., 1995](#); [Reid et al., 1996](#); [Lesage et al., 1996](#)). Haben die Doppelporen-Kaliumkanäle vier Transmembrandomänen, befindet sich eine Porendomäne zwischen der ersten und zweiten, die andere zwischen der dritten und vierten

Transmembrandomäne. Diese Kanäle sind wahrscheinlich durch Genduplikation aus zwei TM-Kanaluntereinheiten entstanden (Nichols and Lopatin, 1997). Die Untereinheit des in Hefe vorkommenden K^+ -Kanals (TOK1, acht Transmembrandomänen) gleicht einer *shaker* ähnlichen Untereinheit mit sechs Transmembrandomänen und einer Untereinheit eines einwärts-gerichtenden K^+ -Kanals (Saldana *et al.*, 2002). Die Porendomänen liegen dementsprechend zwischen der fünften und sechsten und der siebten und achten Transmembrandomäne.

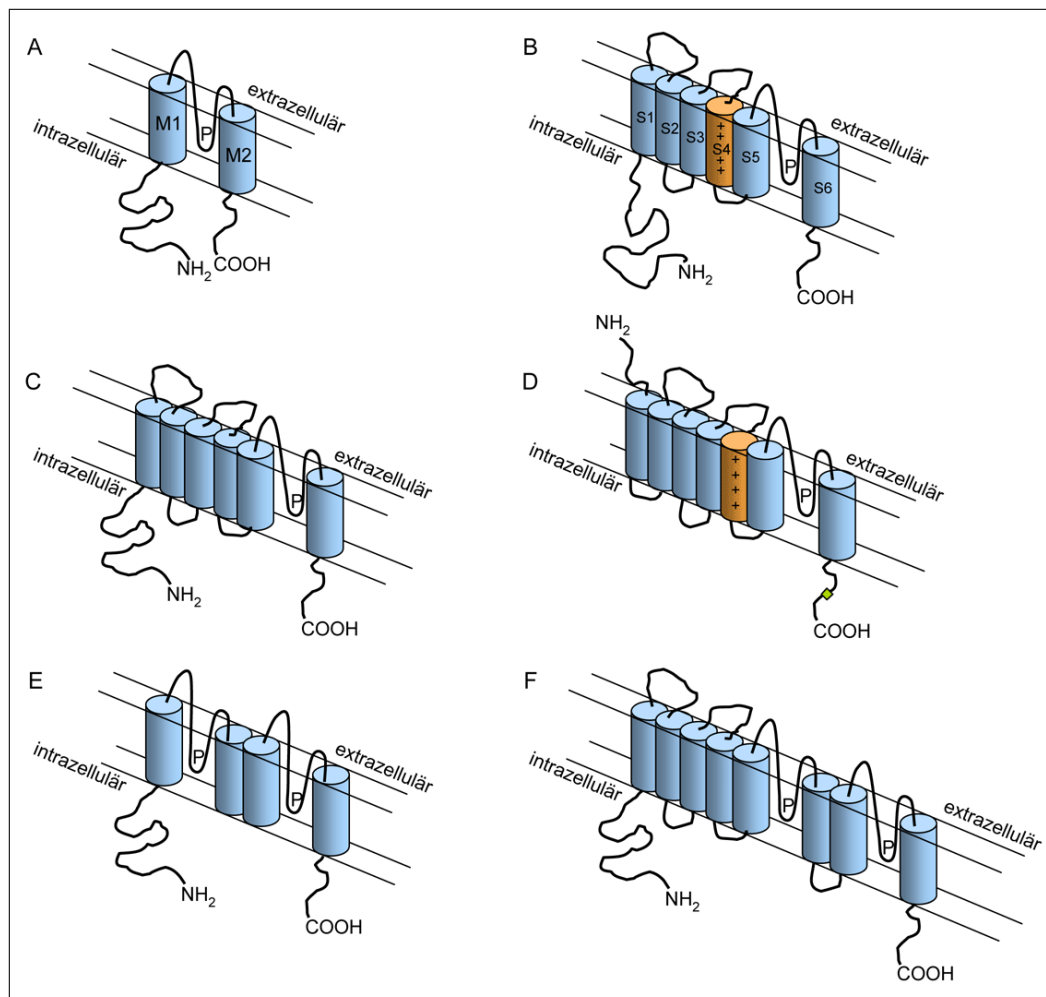


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Membrantopologie unterschiedlicher K^+ -Kanal α -Untereinheiten. „P“ bezeichnet den Bereich der Porendomäne und des Selektivitätsfilters. **A** zwei Transmembrandomänen K^+ -Kanäle (einwärts-gerichtende K^+ -Kanäle), **B** sechs Transmembrandomänen K^+ -Kanäle (spannungsabhängige K^+ -Kanäle), **C** sechs Transmembrandomänen K^+ -Kanäle (Calcium-aktivierte K^+ -Kanäle mit schwacher bzw. mittlerer Leitfähigkeit), **D** sieben Transmembrandomänen K^+ -Kanäle (Calcium-aktivierte K^+ -Kanäle mit großer Leitfähigkeit), grünes Quadrat: Calcium-Bindestelle **E** Doppelporen- K^+ -Kanäle mit vier Transmembrandomänen, **F** Doppelporen- K^+ -Kanäle mit acht Transmembrandomänen.

1.3.2 Funktionelle Klassen von K⁺-Kanälen

Eine Einteilung von K⁺-Kanälen kann auch anhand von funktionellen Kriterien vollzogen werden. Man unterscheidet zwischen einwärts-gleichrichtenden, auswärts-gleichrichtenden, Calcium-aktivierten und „Sicker“ K⁺-Kanälen („leak-channels“).

1.3.2.1 Einwärts-gleichrichtende K⁺-Kanäle

Einwärts-gleichrichtende K⁺-Kanäle (Kir-Kanäle) spielen eine Rolle bei der Regulation der Erregbarkeit, Aufrechterhaltung des Ruhepotentials und Regulation der Herzfrequenz in Säugetier-Zellen (Doupnik *et al.*, 1995; Jan and Jan, 1997b). Kir-Kanäle kommen in erregbaren und nicht-erregbaren Zellen, wie z. B. Neuronen, Muskeln und Endothelzellen vor. Eine α -Untereinheit eines einwärts-gleichrichtenden K⁺-Kanals besteht aus zwei Transmembrandomänen (Abb. 1.2 A). Sowohl der N- als auch der C-Terminus sind cytoplasmatisch lokalisiert. Anhand der Sequenzhomologie untereinander wurden die einwärts-gleichrichtenden K⁺-Kanäle in sieben Unterfamilien, Kir1.x bis Kir7.x unterteilt (Doupnik *et al.*, 1995; Reimann and Ashcroft, 1999).

Die einwärts-gleichrichtenden K⁺-Kanäle ermöglichen bei hyperpolarisierter Plasmamembran einen Einstrom von K⁺, da in diesem Fall ein sonst die Pore blockierendes positiv geladenes Molekül (Spermin, Spermidin, Mg²⁺) den Kanal verlässt (Ficker *et al.*, 1994; Lopatin *et al.*, 1994; Fakler *et al.*, 1995; Matsuda, 1991a,b). Zusätzlich zu Polyaminen und Mg²⁺ wird die Öffnung von Kir-Kanälen (abhängig von der jeweiligen Unterfamilie) noch durch intrazelluläre Protonen, G-Proteine oder ATP gesteuert (nach Oliver *et al.*, 2000). So sind Mitglieder der Unterfamilien Kir1.x und Kir4.x sensitiv gegenüber pH-Änderungen, wobei eine hohe Protonenkonzentration zum Schließen des Kanals führt (Schulte *et al.*, 1999).

Bei Prokaryonten gibt es zu den Kir-Kanälen strukturell ähnliche K⁺-Kanäle: KcsA wurde aus *Streptomyces lividans* isoliert und als erster K⁺-Kanal 1998 von Doyle *et al.* (1998) kristallographisch analysiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei stark einwärts-gleichrichtende K⁺-Kanäle (Kir2.1 und Kir3.2) untersucht. Im Folgenden werden die jeweiligen Unterfamilien genauer beschrieben.

Die Unterfamilie Kir2.x hat vier Mitglieder, Kir2.1 bis Kir2.4 (Gutman *et al.*, 2003; Kubo *et al.*, 2005). Kir2.x Kanäle werden im Herz, im Nervensystem, in der Niere und in Muskeln exprimiert

(Kubo *et al.*, 1993a; Nichols and Lopatin, 1997). Es wird angenommen, dass Kir2.1-Kanäle essentiell für die Bildung des einwärts-gleichrichtenden Stroms im Herzen (I_{K1}) sind, der zu einer Repolarisierung in der Endphase des Aktionspotentials führt und eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Ruhepotentials spielt (Miake *et al.*, 2003).

Die Kir3.x-Unterfamilie besteht bisher ebenfalls aus vier Mitgliedern (Dascal *et al.*, 1993; Kubo *et al.*, 1993b; Lesage *et al.*, 1995). Kir3.x Kanäle kommen im Herz, im Gehirn und in endokrinen Geweben vor (Kubo *et al.*, 1993b; Karschin *et al.*, 1994; Ferrer *et al.*, 1995). Diese Kanäle sind durch G-Proteine aktivierte einwärts-gleichrichtende K^+ -Kanäle und werden deshalb auch GIRK-Kanäle genannt. Sie besitzen sowohl am N- als auch am C-Terminus cytoplasmatische Domänen, welche mit β/γ -Dimeren von G-Proteinen interagieren. Bei Bindung eines G-Protein β/γ -Dimers öffnet der Kir3.x Kanal, d. h. die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals wird erhöht (Abb. 1.3) (Logothetis *et al.*, 1987, 1988; Roosild *et al.*, 2004). Mäuse, denen das *Kir3.2*-Gen fehlt, sind anfällig für Krampfanfälle (Signorini *et al.*, 1997). 1973 wurde die „weaver“ Maus beschrieben, bei der im Gehirn Neuronen absterben, wodurch es zu Störungen der Gleichgewichtsregulation und der Bewegungskoordination kommt (Rakic and Sidman, 1973; Sotelo and Changeux, 1974). Diese Defekte beruhen auf einer Mutation des *Kir3.2*-Gens, durch die ein Glycin₁₅₆ ein Serin wird ([G156S]) (Patil *et al.*, 1995), die zu einem Verlust der K^+ -Selektivität führt und so zu einem unkontrollierten Na^+ -Einstrom (Kofuji *et al.*, 1996; Slesinger *et al.*, 1996; Signorini *et al.*, 1997).

Einzelne Mutationen des *Kir3.2*-Gens sind bekannt (z. B. [S177T], [S177W] und [V188G]), bei denen die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals auch ohne Bindung des G-Protein β/γ -Dimers erhöht ist (Yi *et al.*, 2001; Bichet *et al.*, 2004). Dabei führt die Mutation [S177W] zusätzlich zu reduzierter K^+ -Selektivität (Bichet *et al.*, 2004).

1.3.2.2 Auswärts-gleichrichtende K^+ -Kanäle (Spannungsabhängige K^+ -Kanäle)

Kv-Kanäle sind auswärts-gleichrichtende, spannungsabhängige K^+ -Kanäle. Sie öffnen bei Depolarisation der Plasmamembran (Verringerung des Membranpotentials) (Übersicht bei Yellen, 2002). Die Öffnung führt zu einem K^+ -Ausstrom. Eine α -Untereinheit eines typischen spannungsabhängigen K^+ -Kanals (Abb. 1.2 B) besteht aus sechs Transmembran-Domänen („S1“ -

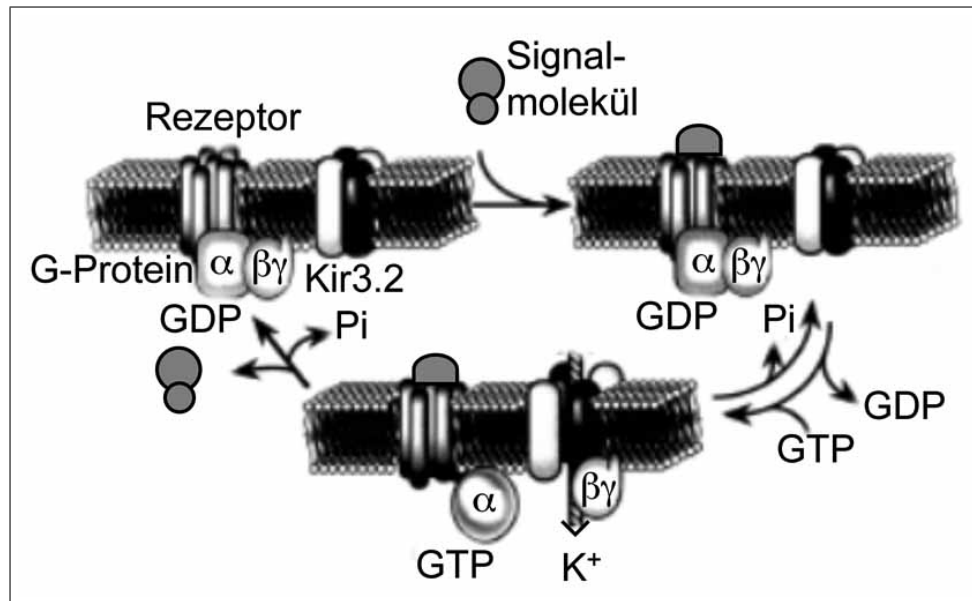


Abbildung 1.3: G-Protein aktivierte einwärts-gleichrichtende K^+ -Kanäle (Kir3.2). Dargestellt ist in diesem Schema, wie sich das trimere G-Protein, welches an einen GPC-Rezeptor (G-Protein gekoppelter Rezeptor) gebunden ist, bei Bindung eines Signalmoleküls an den Rezeptor verhält. GTP bindet an die α -Untereinheit des G-Proteins, das β/γ -Dimer löst sich, bindet an Kir3.2, erhöht dadurch die Offenwahrscheinlichkeit des K^+ -Kanals und bindet nach der Hydrolyse von GTP zu GDP wieder an die α -Untereinheit des G-Proteins. Als trimeres G-Protein ist es wieder an den GPC-Rezeptor gebunden (nach Yamada *et al.*, 1998).

„S6“). Die vierte Transmembran-Domäne („S4“) ist das spannungsmessende Element. Die Aminosäuresequenz von „S4“ enthält mindestens vier Arginine im Abstand von drei Aminosäuren. Zwischen diesen Argininen befinden sich jeweils zwei hydrophobe Aminosäurereste (Papazian *et al.*, 1991). Eine Änderung des Membranpotentials hat zur Folge, dass sich die Ausrichtung des S4-Segments im elektrischen Feld über der Membran verändert. Dadurch wird auch die Position von S5 leicht verändert und die Pore öffnet bzw. schließt sich (Jiang *et al.*, 2003a,b).

shaker ähnliche Kv-Kanäle

Als erster K^+ -Kanal wurde 1987 der *shaker*-Kanal aus *Drosophila melanogaster* kloniert (Kamb *et al.*, 1987; Baumann *et al.*, 1988) und der Kv1.x-Familie zugeordnet. Eigenschaften der Kv-Kanäle werden unter anderem durch assoziierte, cytoplasmatische, nicht porenbildende β -Untereinheiten verändert. Vertreter der Kv1.x - Kv4.x haben eine Tetramerisations-Domäne 1 (T1) am cytoplasmatischen N-Terminus (Abb. 1.4). Die Tetramerisations-Domäne spielt eine wichtige Rolle bei der Zusammenlagerung der einzelnen α -Untereinheiten (Kreusch

et al., 1998; Gulbis *et al.*, 2000). Außerdem kann diese Domäne Interaktionen mit zusätzlichen assoziierten, cytoplasmatischen β -Untereinheiten oder anderen Proteinen eingehen (Gulbis *et al.*, 2000).

KCNQ-Kanäle

Kanäle der KCNQ-Familie kommen vor allem in neuronalem Gewebe vor (Jentsch, 2000). KCNQ1 (KvLQT1) wurde von Wang *et al.* (1996) erstmals kloniert und ist stark im Herzen exprimiert. Desweiteren wurde KCNQ1 beim Menschen in folgenden Geweben identifiziert: Herz, Pankreas, Niere, Lunge, Uterus und Innenohr (Chouabe *et al.*, 1997). Weitere Mitglieder dieser Familie sind KCNQ2 und KCNQ3, welche in *Xenopus*-Oocyten allein exprimiert homomere Kanäle bilden (Biervert *et al.*, 1998). Bei Koexpression lagern sie sich aber auch zu heteromeren Kanälen zusammen (Wang *et al.*, 1998; Cooper *et al.*, 2000). Aus KCNQ2 und/oder KCNQ3 bestehende Kanäle aktivieren langsam bei Depolarisation. Weitere Mitglieder sind KCNQ4 (Kubisch *et al.*, 1999) und KCNQ5 (Schroeder *et al.*, 2000a). Als einziges Mitglied dieser Familie lagern sich KCNQ1 α -Untereinheiten nicht mit anderen α -Untereinheiten der KCNQ-Familie zusammen (Jentsch, 2000). Für das Zusammenlagern der α -Untereinheiten zu einem Tetramer ist, im Gegensatz zu den *shaker* ähnlichen K^+ -Kanälen, wahrscheinlich eine konservierte Domäne im C-Terminus involviert (Schmitt *et al.*, 2000). Alle Mitglieder der KCNQ-Familie werden durch Assoziation mit transmembranalen β -Untereinheiten aus der KCNE-Familie moduliert. Die KCNQ1 α -Untereinheit kann sich mit den modulierenden β -Untereinheiten KCNE1 (MinK), KCNE2 (MiRP1) oder auch KCNE3 (MiRP2) (Tinel *et al.*, 2000a,b) zusammenlagern. Der aus KCNQ1- und KCNE1-Untereinheiten bestehende Kanal vermittelt einen langsamen, repolarisierenden K^+ -Auswärtsstrom (I_{Ks}) (Barhanin *et al.*, 1996; Sanguinetti *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997; Sesti and Goldstein, 1998; Yang *et al.*, 1998). Der aus KCNQ1- und KCNE3-Untereinheiten bestehender Kanal ist durch cAMP aktivierbar und vermittelt als konstitutiv offener Kanal einen nicht spannungsabhängigen Strom (Schroeder *et al.*, 2000b).

EAG-Kanäle

Die EAG-Kanälen verdanken ihren Namen der entsprechenden Mutante in *Drosophila melanogaster*, deren Beine zittern, wenn sie Diethylether-Dämpfen ausgesetzt ist. Diese erinnern an Go-go Tänzerinnen, daher der Name ether-á-go-go (Warmke *et al.*, 1991). Die EAG- K^+ -Kanäle

lassen sich in drei Unterfamilien gliedern: eag, eag-verwandte Gene (erg, „eag related gen“) und eag-ähnliche (elk, „eag like K channel“) K^+ -Kanäle (Warmke and Ganetzky, 1994; Ganetzky *et al.*, 1999). Das Zusammenlagern der α -Untereinheiten dieser Familie erfolgt, wie auch bei den K^+ -Kanälen der KCNQ-Familie, über den C-Terminus. In rEAG identifizierten Ludwig *et al.* (1997) eine „carboxy-terminal assembly domain“ (CAD), die beim Zusammenlagern der α -Untereinheiten wichtig ist.

ERG spielt eine wichtige Rolle bei der Repolarisation des elektrischen Impuls des Herzschlags und somit bei der Regulation der Herzfrequenz. Medizinisch wird diese Phase als QT-Intervall bezeichnet und beschreibt die Zeit zwischen Depolarisation und Repolarisation, also die Dauer des ventrikulären Aktionspotentials und der ventrikulären Aktivierungszeit (Dumaine and Antzelevitch, 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit EAG1 aus der Ratte (rEAG1) (Ludwig *et al.*, 1994) gearbeitet.

TOK1-Kanal

In *S. cerevisiae* wurde ein spannungsabhängiger, auswärts-gleichrichtender Doppelporen- K^+ -Kanal (TOK1) identifiziert, dessen α -Untereinheit aus acht Transmembrandomänen besteht (Ketchum *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1995; Lesage *et al.*, 1996; Reid *et al.*, 1996). Wahrscheinlich ist die α -Untereinheit von TOK1 durch „Rearrangement“ aus der α -Untereinheit eines K^+ -Kanals mit zwei Transmembrandomänen und der α -Untereinheit eines K^+ -Kanals mit sechs Transmembrandomänen entstanden (Reid *et al.*, 1996). Der Kanal öffnet abhängig von der Membranspannung (bei Depolarisation). Die Aktivität wird auch durch die externe K^+ -Konzentration beeinflusst (Loukin *et al.*, 1997; Vergani *et al.*, 1997; Fairman *et al.*, 1999). Die physiologische Rolle von TOK1 ist noch nicht bekannt.

1.3.2.3 Die Familie der Calcium-aktivierten K^+ -Kanäle

Die Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanäle gliedern sich in zwei Gruppen (Abb. 1.2 C, D). Zum einen in die Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanäle mit geringer (SK) (Köhler *et al.*, 1996) oder mittlerer (IK) Leitfähigkeit (Ishii *et al.*, 1997; Joiner *et al.*, 1997) und mit sechs Transmembrandomänen. Zum anderen in die Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanäle mit hoher Leitfähigkeit (BK) und sieben Transmembrando-

mänen. An K^+ -Kanäle mit geringer oder mittlerer Leitfähigkeit ist konstitutiv Calmodulin an eine C-terminale Region gebunden. Durch Bindung von Ca^{2+} an das Calmodulin wird der Kanal aktiviert (Xia *et al.*, 1998; Fanger *et al.*, 1999; Schumacher *et al.*, 2001). Diese K^+ -Kanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Ca^{2+} -abhängigen Signaltransduktion sowohl in elektrisch erregbaren als auch in nicht erregbaren Zellen. Bei den SK- und IK-Kanälen sind in der vierten Transmembrandomäne kaum positiv geladene Aminosäuren vorhanden, sie sind dementsprechend nicht spannungsabhängig. Im Gegensatz zu diesen Kanälen werden die Calcium-aktivierten K^+ -Kanäle mit hoher Leitfähigkeit (BK) nicht nur durch Ca^{2+} aktiviert, sondern sind auch spannungsabhängig (Vergara *et al.*, 1998; Moss and Magleby, 2001; Vogalis *et al.*, 2003). Calcium bindet bei den BK-Kanälen direkt an die Bindungsstellen im cytoplasmatischen C-terminalen Bereich und verschiebt die Aktivierungsspannung der Kanäle zu negativen Werten (Schreiber and Salkoff, 1997; Shi *et al.*, 2002).

1.3.2.4 „Sicker“ („leak“) K^+ -Kanäle

Die „Sicker“ K^+ -Kanäle sind nur wenig oder gar nicht spannungsabhängig. Ihre Funktion ist unter anderem die Aufrechterhaltung des Membranpotentials. Ein funktioneller Kanal wird von einem Dimer aus α -Untereinheiten mit vier Transmembrandomänen und zwei Porendomänen gebildet (Kim, 2003). Diese Familie wird in sechs Gruppen unterteilt: TWIK („Tandem of P domains in Weak Inward rectifier K^+ channels“), TREK („TWIK-RElated K^+ channel“) / TRAAK („TWIK Related Arachidonic Acid (AA)-stimulated K^+ channel“), TASK („TWIK-related Acid-Sensitive K^+ channel“), THIK („TWIK related Halothane Inhibited K^+ channel“), TALK („TWIK related ALkaline-activated K^+ channel“) und TRESK („TWIK RElated Spinal cord K^+ channel“) (Lesage and Lazdunski, 2000; Rajan *et al.*, 2001; Kim, 2003). Sie wurden in neuronalen und kardialen Geweben unterschiedlicher Spezies identifiziert (Lesage *et al.*, 1996; Fink *et al.*, 1996a, 1998; Lesage and Lazdunski, 1998; Lesage *et al.*, 2000). Die verschiedenen „Sicker“ K^+ -Kanäle werden unterschiedlich reguliert, z. B. reagiert TWIK1 auf Veränderungen des cytoplasmatischen pH-Werts (Lesage *et al.*, 1996), während TASK1 durch Veränderungen des extrazellulären pH-Werts moduliert wird (Duprat *et al.*, 1997).

1.3.3 Inaktivierungsmechanismen verschiedener K^+ -Kanal Familien

Bei vielen spannungsabhängigen K^+ -Kanälen ist das Phänomen der Inaktivierung zu beobachten (Hoshi *et al.*, 1991). Dabei zeichnet sich die Familie der *shaker* ähnlichen-Kanäle durch die sogenannte „N-Typ-Inaktivierung“ aus. Am distalen Aminoterminus befindet sich eine bewegliche, globuläre, positiv geladene Domäne. Diese Domäne verschließt die offene Pore intrazellulär indem sie mit Aminosäureresten des inneren Porenbereichs interagiert („ball and chain“-Prinzip) (Hoshi *et al.*, 1990; Zagotta *et al.*, 1990). Eine solche globuläre Domäne kann sich auch an einer assoziierten $Kv\beta$ -Untereinheit befinden (Abb. 1.4). Interessanterweise wurde beim $Kv1.6$ Kanal eine „NIP“-Domäne („N-typ-inactivation-prevention-Domain“) entdeckt, die wiederum verhindert, dass ein heteromerer Kanal durch inaktivierende Untereinheiten inhibiert werden kann (Roeper *et al.*, 1998).

Einige KCNQ- und *eag*-Kanäle sowie einige *shaker* ähnliche-Kanäle können auch durch „C-Typ-Inaktivierung“ inaktiviert werden (Überblick bei Rasmusson *et al.* (1998)). Dieses Phänomen kommt durch eine noch nicht vollständig verstandene Bewegung einer C-terminal gelegenen konservierten Domäne zustande, durch die der externe Bereich der Pore verschlossen wird (Ogielska *et al.*, 1995; Panyi *et al.*, 1995).

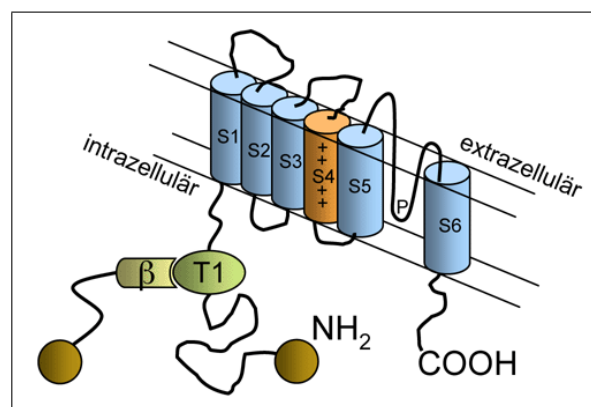


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung einer spannungsabhängigen α -Untereinheit und einer assoziierten β -Untereinheit. In diesem Beispiel ist eine α -Untereinheit der Kv -Kanäle mit der Tetramerisations-Domäne 1 (T1) und der globulären N-terminalen Domäne (brauner Kreis) dargestellt. Desweiteren ist eine cytoplasmatische $Kv\beta$ -Untereinheit (β) dargestellt, die ebenfalls eine globuläre Domäne enthalten kann (verändert nach Sewing *et al.* (1996) und Yu *et al.* (1996)).

1.3.4 Zusätzliche Untereinheiten von K⁺-Kanälen

Zusätzliche Untereinheiten von K⁺-Kanälen (β -Untereinheiten) können cytoplasmatische, aber auch in die Membran integrierte Proteine sein. Diese β -Untereinheiten können modulierende, stabilisierende oder Chaperon-ähnliche Funktionen haben (Nagaya and Papazian, 1997; Felix, 2000).

1.3.4.1 Cytoplasmatische β -Untereinheiten

Intrazelluläre, cytoplasmatische β -Untereinheiten assoziieren z.B. mit *shaker* (Kv1.x) und *shaker* ähnlichen-K⁺-Kanälen (*shab* (Kv2.x), *shaw* (Kv3.x), *shal* (Kv4.x), Kv5.x).

Eine bekannte Familie der cytoplasmatischen β -Untereinheiten ist die Kv β -Familie. Die hydrophilen Kv β -Untereinheiten assoziieren mit α -Untereinheiten der Kv1-, zum Teil auch der Kv4-Familie, und können den K⁺-Strom sowohl hoch- als auch herunterregulieren (Xu and Li, 1998). Es lagern sich vier Kv β -Untereinheiten mit vier α -Untereinheiten zusammen (McCrossan and Abbott, 2004). Die Kv β -Untereinheiten assoziieren mit der Tetramerisations-Domäne (T1) der α -Untereinheiten (Abb. 1.4) (Sewing *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1996; Gulbis *et al.*, 2000).

Der Einfluss der Kv β -Untereinheiten auf die Inaktivierung von K⁺-Kanälen wurde z. B. bei Kv β 1.1 und Kv β 1.2 gezeigt. Die „N-Region“ von Kv β 1.1 inaktiviert wahrscheinlich ähnlich dem „ball and chain“-Model den Kanal, indem sie die Pore von der intrazellulären Seite aus blockiert (Rettig *et al.*, 1994). Die „N-region“ von Kv β 1.2 stimuliert die C-Typ-Inaktivierung der α -Untereinheit (Morales *et al.*, 1996). Andere Kv β -Untereinheiten unterstützen das Zusammenlagern der α -Untereinheiten und/oder bewirken eine verstärkte Lokalisation der Kanäle an der Zelloberfläche (Fink *et al.*, 1996b; Shi *et al.*, 1996).

Weitere cytoplasmatische Untereinheiten, die an K⁺-Kanäle binden, sind z. B. KChIPs („K⁺-Channel Interacting Proteins“). Diese Proteine binden an Kv4-Kanäle und verstärken dadurch die Oberflächenexpression in Säugetier-Zelllinien (An *et al.*, 2000). Nach Kim *et al.* (2004) lagern sich vier Kv4 α -Untereinheiten mit vier KChIPs zusammen. Desweiteren binden Proteine an Kv-Kanäle (Kv1.x, Kv2.x, Kv4.x), welche Chaperon-ähnliche Funktionen übernehmen. KChAP („K⁺-Channel Associated Protein“) kann sowohl an den N-Terminus von Kv α -Untereinheiten als auch an den C-Terminus einiger Kv β -Untereinheiten binden (Wible *et al.*, 1998; Kuryshev *et al.*, 2000, 2001).

Auch als β -Untereinheit aufgefasst wird das Protein Epsin, das beispielsweise an den EAG1-Kanal bindet, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit, dass der Kanal sich bei einem Potential nahe dem Ruhepotentials öffnet, verringert (Piros *et al.*, 1999).

1.3.4.2 Transmembranale β -Untereinheiten

Proteine der KCNE-Familie sind Beispiele für transmembranale β -Untereinheiten. Diese sind kleine integrale Membranproteine, die nur eine Transmembrandomäne besitzen. KCNE1 wurde erstmals 1988 bzw. 1990 aus der Niere bzw. aus dem Herzen der Ratte kloniert (Takumi *et al.*, 1988; Folander *et al.*, 1990). Die Bindung von KCNE-Proteinen an α -Untereinheiten der KCNQ- oder EAG-Familie beeinflusst die Eigenschaften des Kanäle. Wie diese Zusammenlagerung genau abläuft ist noch ungeklärt. Wahrscheinlich assoziiert das C-terminale Ende der β -Untereinheit mit der Porenregion des durch die α -Untereinheiten gebildeten Kanals. Dadurch kann die Leitfähigkeit, die Ionenselektivität, die Kinetik oder die Pharmakologie beeinflusst werden (Busch *et al.*, 1997; Romey *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998). Über die Anzahl der gebundenen KCNE β -Untereinheiten herrscht noch Unklarheit. Nach Barhanin *et al.* (1996) assoziieren an vier α -Untereinheiten vier KCNE β -Untereinheiten. In den letzten Jahren scheint sich aber die These durchzusetzen, dass zwei KCNE β -Untereinheiten an vier α -Untereinheiten binden (Sesti and Goldstein, 1998; Chen *et al.*, 2003).

Auch ABC-Transporter können als K^+ -Kanal β -Untereinheiten fungieren. Der Sulfonylharnstoff-Rezeptor (SUR) interagiert mit Kir6.x K^+ -Kanälen. Die Domäne, mit der die Bindung zwischen SUR und Kir6.x vermittelt wird, ist noch nicht bekannt. SUR und Kir6.x bilden einen ATP-sensitiven K^+ -Kanal-Komplex, der eine wichtige Rolle bei der Insulinausschüttung in den β -Zellen des Pankreas spielt (Ashcroft and Gribble, 1999). Die Bindung erfolgt in einer 1:1 Stöchiometrie von SUR und Kir6.x (Clement *et al.*, 1997).

1.3.5 K^+ -Kanäle und ihre medizinische Bedeutung

Mittlerweile ist bekannt, dass Mutationen in einzelnen K^+ -Kanal-Genen zu schwerwiegenden Krankheiten führen können. Beispiele für durch Mutationen einzelner K^+ -Kanal-Gene verursachten Erkrankungen sind Herzrhythmusstörungen, Epilepsie, Taubheit oder auch Hypoglykämie (Übersicht bei Shieh *et al.*, 2000).

Herzrhythmusstörungen (z. B. das Long-QT-Syndrom) können aufgrund von verschiedenen Mutationen in K^+ -Kanal-Genen auftreten. Beim Long-QT-Syndrom ist der Ablauf des Aktionspotentials im Herzen gestört. Es kommt zu einer abnormalen Verlängerung der ventrikulären Repolarisation. Es gibt verschiedene Formen des erblichen Long-QT-Syndroms. Es gibt das häufiger auftretende autosomal dominante Romano-Ward-Syndrom (RWS), das sich in sechs Varianten unterteilen lässt (LQT1 - LQT6). Mutationen des *KCNQ1*-Gens (LQT1) (Wang *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997; Neyroud *et al.*, 1997; Chouabe *et al.*, 1997) sind neben *hERG*-Mutationen (LQT2) die häufigsten Ursachen dieser Herzrhythmusstörungen (Splawski *et al.*, 2000). LQT3 wird durch Mutationen in einem Na^+ -Kanal kodierenden Gen *SCN5A* verursacht, LQT4 wird auf Mutationen des Chromosoms 4q25-27, LQT5 auf mutiertes *KCNE1* und LQT6 auf mutiertes *KCNE2* (Shieh *et al.*, 2000). Desweiteren ist das weitaus seltener vorkommende autosomal rezessiv auftretende Jervell und Lange-Nielson Syndrom (JLNS) beschrieben. Diese Erkrankung ist außer durch die bereits beschriebenen Herzrhythmusstörungen durch kongenitale Taubheit charakterisiert (Neyroud *et al.*, 1997; Schulze-Bahr *et al.*, 1997a). Das JLNS-Syndrom ist auf bestimmte Mutationen im *KCNQ1*- (Neyroud *et al.*, 1997) oder *KCNE1*-Gen zurückzuführen (Schulze-Bahr *et al.*, 1997b).

Auch Mutationen in den Genen anderer Mitglieder der *KCNQ*-Familie können Krankheiten verursachen. So verursachen bestimmte Mutationen im *KCNQ2*- oder *KCNQ3*-Gen eine bestimmte Form der Epilepsie. Diese selten vorkommende, autosomal dominante, erbliche Form der Epilepsie, BFNC („benign neonatal familial convulsions“) (Biervert *et al.*, 1998; Schroeder *et al.*, 1998; del Giudice *et al.*, 2000), führt zu plötzlich auftretenden kräftigen Krämpfen in den ersten Tagen der Kindheit. Das Krankheitsbild verschwindet jedoch nach einigen Wochen oder Monaten (Biervert *et al.*, 1998; del Giudice *et al.*, 2000).

Mutationen des *KCNQ4*-Gens aber auch des *KCNQ1*-Gens können eine autosomal dominant vererbte Form der Taubheit zur Folge haben (Kubisch *et al.*, 1999; Kharkovets *et al.*, 2000).

Auch mutierte Gene von einwärts-gleichrichtenden Kanälen führen zu Krankheiten. Ein durch Mutation eines Kir-Kanals hervorgerufenes Krankheitsbild ist das Andersen-Syndrom (Andersen-Tawil-Syndrom) (Donaldson *et al.*, 2003). Ursache für dieses Krankheitsbild sind bestimmte Mutationen des *Kir2.1*-Gens (Plaster *et al.*, 2001; Ai *et al.*, 2002; Andelfinger *et al.*, 2002; Tristani-Firouzi *et al.*, 2002; Donaldson *et al.*, 2003; Hosaka *et al.*, 2003). Die auftretenden Symptome lassen sich in drei Kategorien, Herzrhythmusstörungen, periodisch auftretende Pa-

resen und Dysmorphien, einteilen ([Andersen et al., 1971](#); [Tawil et al., 1994](#)), wodurch sehr unterschiedliche Krankheitsbilder entstehen. Da verschiedenen Kombinationen von Symptomen auftreten können, ist die Diagnose des Andersen-Syndroms schwer. So sind beispielsweise Dysmorphien unterschiedlich stark oder gar nicht vorhanden ([Tawil et al., 1994](#)). Mutationen des *Kir2.1*-Gens haben als einziges mutiertes K^+ -Kanal-Gen sowohl Auswirkungen auf Skelettmuskeln als auch Herzmuskeln ([Tristani-Firouzi et al., 2002](#)). Das Andersen-Syndrom spiegelt die unterschiedlichen Lokalisationen und damit verbundenen Funktionen des Kir2.1-Kanals wieder. Die vom Andersen-Syndrom verursachten Herzrhythmusstörungen werden auch als LQT7 bezeichnet ([Tristani-Firouzi et al., 2002](#)).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige der klinisch relevanten Mutationen ([R67W], [D71V], [S136F] und [G144S]) des *Kir2.1*-Gens genauer untersucht. Die Kir2.1 [D71V] Mutation war eine der ersten identifizierten Mutationen, die in vom Andersen-Syndrom betroffenen Familien gefunden wurde. Die Kir2.1 Mutationen [D71V], [S136F] und [G144S] wurden in [Plaster et al. \(2001\)](#) beschrieben. Die Kir2.1 Mutation [R67W] wurde von [Andelfinger et al. \(2002\)](#) identifiziert. Die Auswirkungen dieser Mutation sind geschlechtsspezifisch. Weibliche Betroffene leiden verstärkt unter ventriculären Arrhythmien, männliche Betroffene unter periodisch auftretenden Paresen ([Andelfinger et al., 2002](#)).

Mutationen eines weiteren einwärts-gerichteten K^+ -Kanals, Kir1.1, können bestimmte Formen von Nierenfunktionsstörungen (Bartter's-Syndrom) verursachen ([Simon et al., 1996](#); [Abraham et al., 1999](#)).

K^+ -Kanäle sind aber nicht nur aufgrund der durch Mutationen von K^+ -Kanal-Genen verursachten Krankheiten medizinisch interessant, sondern auch aufgrund ihrer Reaktionen mit verschiedenen Medikamenten, was zu ungewollten Nebenwirkungen führen kann. So ist das erworbene LQT-Syndrom, das auf einer spezifischen Hemmung der für die Repolarisation des Herz Aktionspotentials zuständigen K^+ -Kanäle zurückzuführen ist, wesentlich häufiger verbreitet als das durch mutierte Kanäle verursachte. Beispielsweise inhibiert das Antihistamin Terfenadin hERG, und verursacht so eine Verlängerung des QT-Intervalls ([Roy et al., 1996](#)).

1.3.6 Nomenklatur von K⁺-Kanälen

Wie erwähnt bilden K⁺-Kanäle eine sehr heterogene Familie, deren Mitglieder sich sowohl in Topologie als auch in Funktion stark unterscheiden. Viele Pharmakologen teilten bisher die K⁺-Kanäle anhand ihrer Aktivierungsmechanismen ein (Übersicht bei [Jenkinson, 2006](#)). Andere orientierten sich an der Membrantopologie, also der Anzahl an Transmembrandomänen. Erst in der letzten Zeit wurde von der „International Union of Pharmacology LIII“ eine einheitliche Nomenklatur definiert ([Goldstein et al., 2005](#); [Gutman et al., 2005](#); [Kubo et al., 2005](#); [Wei et al., 2005](#)). Nachteil dieser Nomenklatur ist jedoch die unterschiedliche Bezeichnung für Proteine und für die sie kodierenden Gene.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden K⁺-Kanäle aus verschiedenen Familien untersucht. Um die Übersichtlichkeit zu wahren wurde hier jeweils eine einheitliche Bezeichnung für Gen und Protein gewählt. In Tabelle 1.1 sind die in dieser Arbeit behandelten K⁺-Kanäle und deren Bezeichnungen aufgelistet. Ist das Gen gemeint, wird kursive Schrift verwendet. Da bei Varianten des Gens (Mutation, Deletion) der Einfluss der Änderung auf das Protein und nicht das Gen untersucht wurde, wurden die betroffenen Gene ebenfalls mit der Aminosäureänderung gekennzeichnet, z. B: steht *mKir2.1[R67W]* für das mKir2.1kodierende Gen, bei dem eine Mutation an der Position 65 zum Austausch von Arginin zu Tryptophan führt.

Tabelle 1.1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten K⁺-Kanäle und ihre Bezeichnungen. Aufgelistet sind die offiziellen Gennamen, die entsprechenden Kanalnamen und die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bezeichnungen.

in der Arbeit verwendete Bezeichnung	offizieller Gencode	offizieller Kanalname (Synonym)
Kir2.1	<i>KCNJ2</i>	Kir2.1 (IRK1)
Kir3.2	<i>KCNJ6</i>	Kir3.2 (GIRK2)
KCNQ1	<i>KCNQ1</i>	Kv7.1 (KVLQT1)
KCNQ2	<i>KCNQ2</i>	Kv7.2 (KLQT2)
KCNQ3	<i>KCNQ3</i>	Kv7.3
EAG1	<i>KCNH1</i>	Kv10.1 (eag1)

1.4 *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus

Die Hefe *S. cerevisiae* ist ein klassischer eukaryontischer Modellorganismus. 1996 wurde das Genom von *S. cerevisiae* als erstes eukaryontisches Genom sequenziert (Goffeau *et al.*, 1996). Die ca. $1,2 \times 10^7$ bp verteilen sich auf 16 Chromosomen. Diese enthalten ca. 6000 proteinkodierende Gene (Goffeau *et al.*, 1996). Da *S. cerevisiae* ein eukaryontischer Organismus ist, können von Hefe viele post-translationale Prozesse wie z. B. Disulfid-Brücken-Bildung, Signalpeptid-Erkennung bzw. -Abspaltung, N-Glykosylierungen oder O-Glykosylierungen, die für die Funktion vieler eukaryontischer Proteine notwendig sind, durchgeführt werden. Hefen können sowohl als haploide Organismen als auch als diploide Organismen leben und sich vermehren. Das Arbeiten mit haploiden Hefen ermöglicht es, schnell Mutanten herzustellen und diese phänotypisch zu analysieren. Die kurze Verdopplungszeit (ca. 90 min) ermöglicht ein zeitsparendes Arbeiten, die hohe Effizienz homologer Rekombination ist von großem Vorteil für das gezielte Einfügen eines Fremdgens (Übersicht bei Lottspeich and Zorbas, 1998).

1.4.1 K^+ -Transport in *S. cerevisiae*

S. cerevisiae besitzt zwei homologe, in der Plasmamembran lokalisierte K^+ -Transporter, Trk1 und Trk2. Dabei handelt es sich um hoch affine K^+ -Transporter (Ramos *et al.*, 1985; Gaber *et al.*, 1988). Trk2 ist im Gegensatz zu Trk1 nur schwach exprimiert (Ko *et al.*, 1990; Ramos *et al.*, 1994; Vidal *et al.*, 1995). Beide Transporter vermitteln einen Kotransport von entweder zwei K^+ -Ionen oder einem K^+ -Ion und einem weiteren anderen monovalenten Kation (H^+ , Na^+ , Cs^+ und Rb^+), wobei die Bindungsaffinität für K^+ -Ionen am größten ist (Haro and Rodriguez-Navarro, 2002). Der in *S. cerevisiae* gefundene K^+ -Kanal Tok1p ist ein auswärtsgerichteter spannungsabhängiger Doppelporen-Kanal (Ketchum *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1995; Lesage *et al.*, 1996; Reid *et al.*, 1996).

In *S. cerevisiae* gibt es noch mindestens ein weiteres Protein, den „non-selective cation channel“ (NSC1), der sowohl Einstrom als auch Ausstrom von K^+ und anderen Kationen vermitteln kann, das entsprechende Gen ist noch nicht identifiziert worden (Bihler *et al.*, 1998, 2002).

Ein *S. cerevisiae* Stamm, in dem die endogenen K^+ -Translokationssysteme (Trk1, Trk2, Tok1) deletiert sind, ist kaum in der Lage in Medium mit niedriger KCl-Konzentration zu wachsen.

1.4.2 Expression von heterologen K^+ -Transportern und -Kanälen in *S. cerevisiae*

Eine Vielzahl von Studien zeigten, dass die funktionelle Expression von pflanzlichen (Anderson *et al.*, 1994; Sentenac *et al.*, 1992; Schachtmann *et al.*, 1992) als auch tierischen einwärts- gleichrichtenden K^+ -Kanälen (Tang *et al.*, 1995; Zaks-Makhina *et al.*, 2004) in K^+ -Aufnahme defekten *S. cerevisiae* Stämmen möglich ist und zur Komplementation des Wachstumsdefekt in Medium mit niedriger KCl-Konzentration führt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Hefestamm PLY246, bei dem Trk1, Trk2 und Tok1 deletiert sind, verwendet (Bertl *et al.*, 2003) (Abb. 1.5).

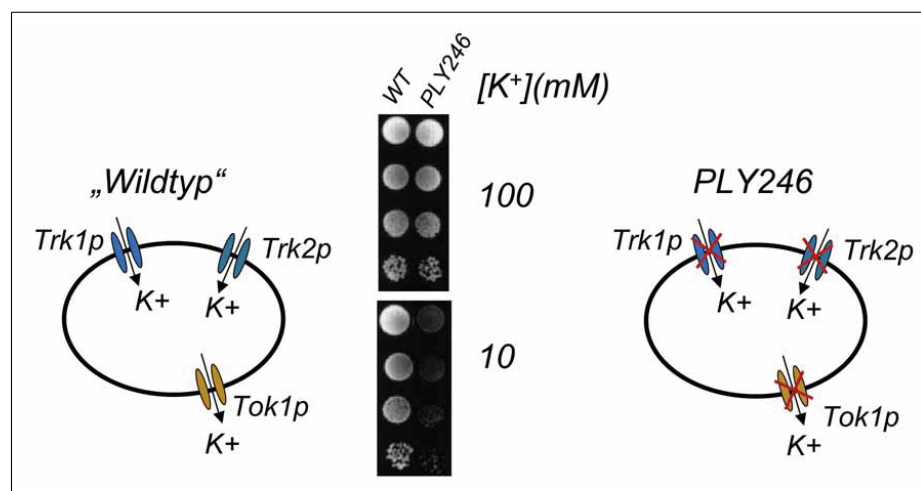


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der K^+ -Translokationssysteme in Hefe. Links ist schematisch eine „Wildtyp“ Hefezelle (PLY232) mit den K^+ -Translokationssystemem Trk1, Trk2 und Tok1 dargestellt, rechts dagegen eine Zelle des Stammes PLY246, dem diese Systeme fehlen. In der Mitte ist das Wachstum der beiden Stämme auf Medium mit 10 mM und 100 mM KCl gegenübergestellt. Zellen des „Wildtyps“ können auch auf Medium mit 10 mM KCl wachsen, PLY246 Zellen dagegen kaum (Bertl *et al.*, 2003).

1.4.2.1 Schwierigkeiten bei der heterologen Expression in Hefe

Eine erfolgreiche heterologe Expression in Hefe setzt voraus, dass sämtliche notwendigen Chaperone und weitere Helferproteine der Hefe das „fremde“ Protein korrekt falten, glykosylieren und transportieren. Prinz *et al.* (2003) berichten, dass bei Expression des humanen Transferrin-Rezeptors in *S. cerevisiae* Schwierigkeiten beim intrazellulären Transport zur Plasmamembran auftraten. Ein Großteil des Proteins war in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert. Ähnliches berichten Villalba *et al.* (1992). Sie exprimierten eine pflanzliche Plasmamembran H^+ -ATPase in *S. cerevisiae*. Das Protein lag zwar funktionell in Hefe vor, aber

auch in diesem Fall war ein Großteil im ER lokalisiert. [Kasahara and Kasahara \(1996\)](#) berichten von der heterologen Expression des Glukose-Transporters Glut1 aus der Ratte in *S. cerevisiae*. Die Proteine waren nur zu einem sehr geringen Anteil in der Plasmamembran lokalisiert, hauptsächlich befanden sie sich in intrazellulären Strukturen, bei denen es sich wahrscheinlich ebenfalls um das ER handelte. Über ähnliche Akkumulationen von Membranproteinen, H⁺-ATPase aus *Nicotiana plumbaginifolia* ([de Kerchove d'Exaerde et al., 1995](#)), H⁺-ATPase (AHA2) aus *Arabidopsis thaliana* ([Regenberg et al., 1995](#)), Glut4 aus *Rattus norvegicus* ([Kasahara and Kasahara, 1997](#)) im ER wurde berichtet.

1.5 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit sich *S. cerevisiae* als System eignet, in dem verschiedene K⁺-Kanal-Gene aus Säugern exprimiert und die Genprodukte analysiert werden können. Es sollten Gene exprimiert werden, die (i) für einen bisher noch nicht in *S. cerevisiae* exprimierten Kir-Kanal kodieren, (ii) die klinisch relevante Mutanten des *Kir2.1*-Gens enthalten. (iii) Es sollte untersucht werden, ob sich auch durch die Präsenz auswärts-gleichrichtender K⁺-Kanäle in *S. cerevisiae* ein Phänotyp durch Wachstumstests feststellen lässt. (iv) Es sollten auch heteromere K⁺-Kanal codierende Gene in *S. cerevisiae* (ko-)exprimiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen

2.1.1 *Escherichia coli*

Tabelle 2.1: Genotyp und Herkunft des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stammes.

Name	Genotyp	Herkunft
XL1-Blue	RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'roABlac ^q ZDM15 TN10(tet ^r)]	Stratagene (La Jolla, USA)

2.1.2 *S. cerevisiae* Stämme

2.1.2.1 Hefestämme, auf die im Rahmen dieser Arbeit zurückgegriffen wurde

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten, nicht selber hergestellten Hefestämme.

Tabelle 2.2: Auflistung auf die in dieser Arbeit zurückgegriffenen *S. cerevisiae* Stämme. Aufgelistet wurde der jeweilige verwendete Name des Stammes, die Beschreibung des Genotyps und die Herkunft der Stämme. PLY232, PLY240 und PLY246 sind isogene *MATa* Derivate von JRY379.

Name	Genotyp	Herkunft
JRY379	<i>MATa his3Δ200 leu2-3, 112 trp1Δ901 ura3-52 suc2Δ9</i>	Reid et al. 1996
PLY232	<i>MATa his3Δ200 leu2-3, 112 trp1Δ901 ura3-52 suc2Δ9</i>	Martinez and Ljungdahl 2003
PLY240	<i>MATa his3Δ200 leu2-3, 112 trp1Δ901 ura3-52 suc2Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::lox-kanMX-lox</i>	Martinez and Ljungdahl 2003
PLY246	<i>MATa his3Δ200 leu2-3, 112 trp1Δ901 ura3-52 suc2Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::lox-kanMX-lox tok1Δ1::HIS3</i>	Martinez and Ljungdahl 2003
PLY246 [pYEX-GFP/mKir2.1]	<i>MATa his3Δ200 leu2-3, 112 trp1Δ901 ura3-52 suc2Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::lox-kanMX-lox tok1Δ1::HIS3 [pYEX-GFP/mKir2.1]</i>	J. Ludwig

2.1.2.2 Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Hefestämme

Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Hefestämme, den Genotyp und das zu verwendende Selektionsmedium.

Tabelle 2.3: Auflistung der hergestellten Hefestämme. In dieser Tabelle sind die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Hefestämme, ihre Namen, ihr Genotyp und das zu verwendende Nährmedium aufgelistet.

Name	Genotyp	Selektionsmedium
PLY246 [pYEX-rKir3.2]	PLY246 Genotyp + [pYEX-rKir3.2]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2]	PLY246 Genotyp + [pYEX-yEGFP/rKir3.2]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-rKir3.2 [G156S]]	PLY246 Genotyp + pYEX-rKir3.2 [G156S]]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-rKir3.2 [S177T]]	PLY246 Genotyp + [pYEX-rKir3.2 [S177T]]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-rKir3.2 [S177W]]	PLY246 Genotyp + [pYEX-rKir3.2 [S177W]]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-rKir3.2 [V188G]]	PLY246 Genotyp + [pYEX-rKir3.2 [V188G]]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [G156S]]	PLY246 Genotyp + [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [G156S]]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [S177T]]	PLY246 Genotyp + [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [S177T]]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [S177W]]	PLY246 Genotyp + [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [S177W]]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [V188G]]	PLY246 Genotyp + [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [V188G]]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-yEGFP]	PLY246 Genotyp + [pYEX-yEGFP]	SDAP Δ Ura, Δ Leu

Name	Genotyp	Selektionsmedium
PLY246 [pYEX-rEAG1 Δ 190/yEGFP]	PLY246 Genotyp + [pYEX-rEAG1 Δ 190/yEGFP]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-rEAG1 Δ 190]	PLY246 Genotyp + [pYEX-rEAG1 Δ 190]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-yEGFP/mKir2.1]	PLY246 Genotyp + [pYEX-yEGFP/mKir2.1]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-yEGFP/mKir2.1[R67W]]	PLY246 Genotyp + [pYEX-yEGFP/mKir2.1[R67W]]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-yEGFP/mKir2.1[D71V]]	PLY246 Genotyp + [pYEX-yEGFP/mKir2.1[D71V]]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-yEGFP/mKir2.1[S136F]]	PLY246 Genotyp + [pYEX-yEGFP/mKir2.1[S136F]]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-yEGFP/mKir2.1[G144S]]	PLY246 Genotyp + [pYEX-yEGFP/mKir2.1[G144S]]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-P _{GAL1} -yEGFP/mKir2.1]	PLY246 Genotyp + [pYEX-P _{GAL1} -yEGFP/mKir2.1]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-P _{GAL1} -yEGFP/mKir2.1[R67W]]	PLY246 Genotyp + [pYEX-P _{GAL1} -yEGFP/mKir2.1[R67W]]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-P _{GAL1} -yEGFP/mKir2.1[D71V]]	PLY246 Genotyp + [pYEX-P _{GAL1} -yEGFP/mKir2.1[D71V]]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-P _{GAL1} -yEGFP/mKir2.1[S136F]]	PLY246 Genotyp + [pYEX-P _{GAL1} -yEGFP/mKir2.1[S136F]]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-P _{GAL1} -yEGFP/mKir2.1[G144S]]	PLY246 Genotyp + [pYEX-P _{GAL1} -yEGFP/mKir2.1[G144S]]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246T	<i>MATa his3Δ200 leu2-3, 112 trp1Δ901 ura3-52 suc2Δ9trk1Δ51 trk2Δ50::lox-kanMX-lox tok1Δ1::TRP1</i>	SDAP

Name	Genotyp	Selektionsmedium
PLY246T [pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1]	PLY246T Genotyp [pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1]	SDAP Δ His
PLY246T [pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1] [pYEX- P_{GAL1} -yEGFP/mKir2.1]	PLY246T Genotyp [pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1] [pYEX- P_{GAL1} -yEGFP/mKir2.1]	SDAP Δ His, Δ Ura, Δ Leu
PLY246T [pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1] [pYEX- P_{GAL1} -yEGFP/mKir2.1[R67W]]	PLY246T Genotyp [pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1] [pYEX- P_{GAL1} -yEGFP/mKir2.1[R67W]]	SDAP Δ His, Δ Ura, Δ Leu
PLY246T [pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1] [pYEX- P_{GAL1} -yEGFP/mKir2.1[D71V]]	PLY246T Genotyp [pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1] [pYEX- P_{GAL1} -yEGFP/mKir2.1[D71V]]	SDAP Δ His, Δ Ura, Δ Leu
PLY246T [pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1] [pYEX- P_{GAL1} -yEGFP/mKir2.1[S136F]]	PLY246T Genotyp [pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1] [pYEX- P_{GAL1} -yEGFP/mKir2.1[S136F]]	SDAP Δ His, Δ Ura, Δ Leu
PLY246T [pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1] [pYEX- P_{GAL1} -yEGFP/mKir2.1[G144S]]	PLY246T Genotyp [pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1] [pYEX- P_{GAL1} -yEGFP/mKir2.1[G144S]]	SDAP Δ His, Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-rEAG1 Δ 190/yEGFP]	PLY246 Genotyp + [pYEX-rEAG1 Δ 190/yEGFP]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 tok1::sig/mRFP/HDEL [pYEX-GFP/mKir2.1]	<i>MATa his3Δ200 leu2-3, 112</i> <i>trp1Δ901 ura3-52 suc2Δ9 trk1</i> <i>Δ51 trk2Δ50::lox-kanMX-lox</i> tok1 Δ 1::sig/mRFP/HDEL [pYEX-GFP/mKir2.1]	SDAP Δ Ura
PLY246 [pYEX- P_{MET25} -yEGFP]	PLY246 Genotyp + [pYEX- P_{MET25} -yEGFP]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246T [pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1] [pYEX- P_{MET25} -yEGFP/mKir2.1]	PLY246T Genotyp + [pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1] [pYEX- P_{MET25} -yEGFP/mKir2.1]	SDAP Δ His, Δ Ura, Δ Leu

Name	Genotyp	Selektionsmedium
	P_{MET25} -yEGFP/mKir2.1]	
PLY246T [pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1] [pYEX- P_{MET25} -yEGFP/mKir2.1[R67W]]	PLY246T Genotyp + [pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1] [pYEX- P_{MET25} -yEGFP/mKir2.1[R67W]]	SDAP Δ His, Δ Ura, Δ Leu
PLY246T [pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1] [pYEX- P_{MET25} -yEGFP/mKir2.1[D71V]]	PLY246T Genotyp + [pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1] [pYEX- P_{MET25} -yEGFP/mKir2.1[D71V]]	SDAP Δ His, Δ Ura, Δ Leu
PLY246T [pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1] [pYEX- P_{MET25} -yEGFP/mKir2.1[S136F]]	PLY246T Genotyp + [pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1] [pYEX- P_{MET25} -yEGFP/mKir2.1[S136F]]	SDAP Δ His, Δ Ura, Δ Leu
PLY246T [pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1] [pYEX- P_{MET25} -yEGFP/mKir2.1[G144S]]	PLY246T Genotyp + [pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1] [pYEX- P_{MET25} -yEGFP/mKir2.1[G144S]]	SDAP Δ His, Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-hKCNE3]	PLY246 Genotyp + [pYEX-hKCNE3]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-hKCNE3/yEGFP]	PLY246 Genotyp + [pYEX-hKCNE3/yEGFP]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-yEGFP/hKCNE3]	PLY246 Genotyp + [pYEX-yEGFP/hKCNE3]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-yEGFP/hKCNE3 ASA]	PLY246 Genotyp + [pYEX-yEGFP/hKCNE3 ASA]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-yEGFP/hKCNE3 Δ C]	PLY246 Genotyp + [pYEX-yEGFP/hKCNE3 Δ C]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 [pYEX-hKCNQ1/yEGFP]	PLY246 Genotyp + [pYEX-hKCNQ1/yEGFP]	SDAP Δ Ura, Δ Leu
PLY246 tok::hKCNQ1	<i>MATa his3Δ200 leu2-3, 112 trp1Δ90 ura3-52 suc2Δ9</i>	SDAP

Name	Genotyp	Selektionsmedium
	<i>trk1</i> Δ51 <i>trk2</i> Δ50::lox-kanMX-lox <i>tok1</i> Δ1::hKCNQ1	
PLY246 tok::hKCNQ1/GFP	<i>MATa his3</i> Δ200 <i>leu2-3, 112 trp1</i> Δ90 <i>ura3-52 suc2</i> Δ9 <i>trk1</i> Δ51 <i>trk2</i> Δ50::lox-kanMX-lox <i>tok1</i> Δ1::hKCNQ1/GFP	SDAP
PLY246 tok::hKCNE3	<i>MATa his3</i> Δ200 <i>leu2-3, 112 trp1</i> Δ90 <i>ura3-52 suc2</i> Δ9 <i>trk1</i> Δ51 <i>trk2</i> Δ50::lox-kanMX-lox <i>tok1</i> Δ1::hKCNE3	SDAP
PLY246 tok::hKCNQ1 [pYEX-hKCNE3	<i>MATa his3</i> Δ200 <i>leu2-3, 112 trp1</i> Δ90 <i>ura3-52 suc2</i> Δ9 <i>trk1</i> Δ51 <i>trk2</i> Δ50::lox-kanMX-lox <i>tok1</i> Δ1::hKCNQ1 [pYEX-hKCNE3]	SDAP ΔUra
PLY246 tok::hKCNQ1 [pYEX-hKCNE3/GFP	<i>MATa his3</i> Δ200 <i>leu2-3, 112 trp1</i> Δ90 <i>ura3-52 suc2</i> Δ9 <i>trk1</i> Δ51 <i>trk2</i> Δ50::lox-kanMX-lox <i>tok1</i> Δ1::hKCNQ1 [pYEX-hKCNE3/GFP]	SDAP ΔUra
PLY246 tok::hKCNE3 [pYEX-hKCNQ1/GFP	<i>MATa his3</i> Δ200 <i>leu2-3, 112 trp1</i> Δ90 <i>ura3-52 suc2</i> Δ9 <i>trk1</i> Δ51 <i>trk2</i> Δ50::lox-kanMX-lox <i>tok1</i> Δ1::hKCNE3 [pYEX-hKCNQ1/GFP]	SDAP ΔUra
PLY246 [pYEX-hKCNQ2/yEGFP]	PLY246 Genotyp + [pYEX-hKCNQ2/yEGFP]	SDAP ΔUra, ΔLeu
PLY246 [pYEX-hKCNQ3/yEGFP]	PLY246 Genotyp + [pYEX-	SDAP ΔUra,

Name	Genotyp	Selektionsmedium
	hKCNQ3/yEGFP]	ΔLeu
PLY246 tok::hKCNQ3	<i>MATa his3Δ200 leu2-3, 112</i> <i>trp1Δ90 ura3-52 suc2Δ9</i> <i>trk1Δ51 trk2Δ50::lox-kanMX-</i> <i>lox tok1Δ1::hKCNQ3</i>	
PLY246 tok::hKCNQ3 [pYEX-hKCNQ2/GFP	<i>MATa his3Δ200 leu2-3, 112</i> <i>trp1Δ90 ura3-52 suc2Δ9</i> <i>trk1Δ51 trk2Δ50::lox-kanMX-lox</i> <i>tok1Δ1::hKCNQ3 [pYEX-</i> <i>hKCNQ2/GFP]</i>	SDAP ΔUra

2.2 Chemikalien und Nährmedien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Nährmedien wurden, wenn nicht explizit erwähnt, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), VWR (Darmstadt) und Labomedic (Bonn) verwendet und entsprechen mindestens dem Reinheitsgrad pro Analysis (pA). Für die molekularbiologischen Arbeiten verwendeten Restriktionsendonukleasen, Polymerasen, Kinasen und Ligasen wurden von den Firmen Fermentas, St. Leon-Rot bzw. Roche, Mannheim bezogen. Nukleinsäure-modifizierende Enzyme wurden von der Firma Fermentas, St. Leon-Rot verwendet.

Für die Durchführung der „Northern Blots“ und deren nicht-radioaktive Hybridisierung wurden Materialien der Firma Roche, Mannheim verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Medien, Puffer und Lösungen 20 min bei 121°C und 1 bar autoklaviert .

Tabelle 2.4: Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Puffer, Lösungen und Supplemente. Aufgelistet sind die verwendeten Puffer, Lösungen und Supplemente und ihre jeweilige Zusammensetzung.

Bezeichnung	Definition
Wasser	demineralisiertes, gereinigtes Wasser (Milli Q) wurde autoklaviert

Bezeichnung	Definition
Denaturierungspuffer	12,5 μ l MOPS-Puffer (10 x); 22,6 μ l Formaldehyd (37% (w/v)); 64,5 μ l Formamid (deionisiert)
„Drop-out-Mix“	100 mg Arginin; 100 mg Asparagin; 100 mg Glutaminsäure; 20 mg Histidin; 40 mg Leucin; 150 mg Lysin; 100 mg Methionin; 250 mg Phenylalanin; 500 mg Serin; 500 mg Threonin; 500 mg Tryptophan; 150 mg Tyrosin; 20 mg Uracil; 300 mg Valin
Ladepuffer	250 μ l Formamid (deionisiert); 83 μ l Formaldehyd (37% (w/v)); 50 μ l MOPS-Puffer (10 x); 0,01% (w/v) Bromphenolblau
LETS-Puffer	100 mM LiCl; 10mM EDTA, 10 mM Tris-HCl; 0,02% SDS in Wasser gelöst; pH 7,0 mit NaOH eingestellt
Lithiumacetat/Glycerin Puffer (5 ml)	0,5 ml TE-Puffer II [10 fache Konzentration]; 0,5 ml 1 M Lithiumacetat; 0,5 ml 99% Glycerin; 3,5 ml Wasser
Lithiumacetat-Puffer (5 ml)	0,5 ml TE-Puffer II [10 fache Konzentration]; 0,5 ml 1 M Lithiumacetat; 4 ml Wasser
Lösung 1	50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA in Wasser gelöst; pH 8,0 mit NaOH eingestellt
Lösung 2	0,2 M NaOH; 1% SDS in Wasser gelöst
Lösung 3	3 M Kaliumacetat in Wasser gelöst; pH 4,8 mit KOH eingestellt
Mg ²⁺	10,1 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O; 12,3 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O in H ₂ O; sterilfiltriert (Porengröße \varnothing 0,22 μ m); gelagert bei RT
MOPS-Puffer (10 x)	200 mM Morpholinpropansulfonsäure; 50 mM Essigsäure; 10 mM EDTA in Wasser gelöst; pH 7,0 mit NaOH eingestellt
P/C	Phenol (pH > 7,4)/Chloroform im Verhältnis 1:1
P/C (sauer)	Phenol (pH > 4,5 - 5)/Chloroform im Verhältnis 1:1
P/C (sauer) + 1% SDS	P/C (sauer) + 1/25 Teil 25% SDS; 20 sec kräftig gemischt; 30 sec bei RT und 15000 g zentrifugiert
PEG-Lösung	in Wasser gelöstes 50% Polyethylenglycol (PEG) 4000; autoklaviert
Probenpuffer (6 x)	10 mM Tris-HCl (pH 7,6); 60% Glycerin; 0,03% Bromphenolblau; 0,03% Xylen-Cyanol; 60 mM EDTA

Bezeichnung	Definition
säuregewaschene Glasperlen	Glasperlen (0,425 - 0,6 mm, Sigma, Taufkirchen) wurden 1 h in konzentrierter Salpetersäure (HNO ₃) gerührt. Anschließend wurde so lange das Wasser zum waschen gewechselt, bis ein neutraler pH wieder erreicht war. Dann wurden die Glasperlen bei 60°C getrocknet.
Spurenelemente (100 x)	2 mM MgSO ₄ ; 200 µM CaCl ₂ ; 13 µM FeNaEDTA; 8 µM H ₃ B ₃ O ₃ ; 0,25 µM; CuSO ₄ ; 0,6 µM KJ; 2,7 µM MnSO ₄ ; 1 µM Na ₂ MoO ₄ ; 1 µM ZnSO ₄ ; 0,5 µM CoCl ₂ ; 0,5 µM NiCl ₂
SSC (10 x)	1,5 M NaCl; 150 mM Zitronensäure gelöst in Wasser; pH 7,0 mit NaOH eingestellt
0,5% x SSC + 1% SDS	75 mM NaCl; 75 µM Zitronensäure; 1% SDS in Wasser gelöst; pH 7,0 mit NaOH eingestellt
TAE-Puffer	0,44 M Tris-Acetat; 1 mM EDTA in demineralisiertem Wasser gelöst; pH 7,0 mit NaOH eingestellt
TB-Puffer	10 mM Pipes; 15 mM CaCl ₂ ; 250 mM KCl in H ₂ O; pH 6,7 mit KOH eingestellt; 55 mM MnCl ₂ ; sterilfiltriert (Porengröße Ø 0,22 µm); gelagert bei 4 °C
TE-Puffer I	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 7,5 mit NaOH eingestellt
TE-Puffer II	10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA; pH 7,5 mit NaOH eingestellt
TSN-Lösung	2% TritonX-100; 1% SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA in Wasser gelöst; pH 8 mit NaOH eingestellt
Vitaminlösung	2 µg/l Biotin; 400 µg/l Ca-Pantothenat; 2 µg/l Folsäure; 2000 µg/l Inositol; 400 µg/l Niacin; p-Aminobenzoessäure 200 µg/l; Pyridoxinhydrochlorid 400 µg/l; Thiaminhydrochlorid 400 µg/l

Tabelle 2.5: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Nährmedien. Aufgelistet wurde der jeweilige Name und die entsprechende Zusammensetzung und Herstellung der Medien.

Bezeichnung	Definition
LB (Luria Bertani)-Medium (1 l)	25 g Luria Broth Base (Gibco) in H ₂ O; autoklaviert; bei einer Temperatur von ca. 40°C ggf. 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin oder 15 µg/ml Tetracyclin hinzugefügt.
SDAP-Medium (1 l)	1,725 g L-Arginin; 0,58 g „Drop-out-Mix“; 1 ml MgSO ₄ ; 1 ml 0,2 M CaCl ₂ und 10 ml Spurenelemente (100 x) in H ₂ O aufgenommen; pH 5,9 mit ortho-Phosphorsäure eingestellt; Lösung autoklaviert; bei einer Temperatur von ca. 40°C 10 ml Vitaminlösung; 50 ml 40% Glucose und ggf. KCl oder weitere Salze oder Zuckeralkohole hinzugegeben.
SOB-Medium (1 l)	20 g Casein-Hydrolysat oder Bacto-Trypton; 5 g Hefeextrakt; 0,5 g NaCl; 0,2 g KCl wurden in H ₂ O gelöst; pH 7,0 mit NaOH eingestellt; Lösung autoklaviert
YPD-Medium (1 l)	20 g Pepton; 10 g Hefeextrakt wurde in H ₂ O aufgenommen; pH 5,9 mit NaOH eingestellt; Lösung autoklaviert; nach dem Abkühlen wurde 40% Glucose und ggf. KCl hinzugegeben

Wurde SDAP-Medium ohne Methionin, Histidin, Uracil oder Leucin benötigt, wurden diese Substanzen im „Drop-out-Mix“ nicht hinzugegeben.

Zur Herstellung von SDAP-Festmedium wurde den in Tabelle 2.5 aufgeführten Nährmedium vor dem Autoklavieren 20 g/l Agar-Agar hochrein zugegeben. Zur Herstellung von YPD-Festmedien wurden den in Tabelle 2.5 aufgeführten Nährmedium vor dem Autoklavieren 20 g/l Agar zugegeben. Nach dem Autoklavieren wurden je 20 ml Medium in Petrischalen (∅ 9 cm) gegossen, wo das Medium aushärtete.

2.3 Anzucht von Bakterienzellen

Die im Folgenden nicht einzeln aufgeführten molekularbiologischen Methoden und Techniken wurden gemäß Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Die Anzucht von Bakterienkulturen erfolgte

te immer unter sterilen Bedingung. Es wurden sterile Zahnstocher verwendet, um von einem Agarmedium Bakterienzellen abzunehmen und in LB-Flüssigmedium zu überimpfen.

2.3.1 Herstellung kompetenter *E. coli* XL1-Blue-Zellen

(modifiziert nach Inoue *et al.*, 1990)

E. coli XL1-Blue-Zellen wurden auf eine LB_{tet}-Agar-Platte (Tab. 2.5) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Je 2 x 125 ml SOB-Medium wurden mit 1,25 ml einer Mg²⁺ versetzt und mit je sechs Kolonien inokuliert. Die Zellen wurden bei 22°C auf einem Schüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,6 angezogen. In einem 1 l Erlenmeyerkolben mit Schikane dauerte dies 32 h - 34 h. Die Kulturen wurden dann auf sterile, vorgekühlte 50 ml Gefäße verteilt und zehn Minuten auf Eis gestellt. Dann folgte ein zehnmütiger Zentrifugationsschritt bei 2500 g und 4°C. Nachdem die Überstände verworfen wurden, wurden die Pellets in je 20 ml eiskaltem TB-Puffer (Tab. 2.4) vorsichtig resuspendiert und anschließend weitere zehn Minuten auf Eis belassen. Nun folgte wieder ein zehnmütiger Zentrifugationsschritt bei 2500 g und 4°C. Nachdem der Überstand erneut verworfen wurde, wurden die Pellets in je 5 ml eiskaltem TB-Puffer vorsichtig resuspendiert, anschließend wurden die Zellsuspensionen in einem Gefäß vereinigt und 1,5 ml DMSO wurde zugegeben. Die Zellen wurden nun zu je 200 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert, zehn Minuten auf Eis inkubiert und sofort danach in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.3.1.1 Bestimmung der Transformationseffizienz und der Reinheit kompetenter Bakterienzellen

Je 80 µl kompetente Zellen wurden mit 10 pg und 1 pg pUC18 DNA (EMBL #L09136) transformiert (2.3.2.1). Die Kolonien einer jeden Platte wurden nun gezählt und daraus dann die Transformationseffizienz als cfu/µg pUC18 DNA bestimmt. Eine Transformationseffizienz von 5-10 x 10⁷ (cfu/µg) wurde im Anschluß an das vereinfachte Transformationsprotokoll (2.3.2.1 Vereinfachtes Protokoll) erreicht.

Die Reinheit der kompetenten Bakterienzellen wurde kontrolliert indem die restlichen 40 µl Zellen direkt auf LB_{amp}-Agar-Platten (Tab. 2.5) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert wurden.

2.3.2 Transformation kompetenter *E. coli* XL1-Blue Zellen

2.3.2.1 Allgemeines Protokoll:

Die kompetenten Zellen (2.3.1) wurden so aufgetaut, dass sie nur eben flüssig waren, aber nicht über 0°C erwärmt wurden. Die Zellen wurden anschließend auf Eis ein- bis zweimal langsam auf- und abpipettiert. 10-100 ng DNA wurden durch mehrmaliges auf- und abpipettieren auf Eis mit den kompetenten Zellen vermischt. Das Volumen der eingesetzten DNA Lösung entsprach dem Verhältnis 1/10. Anschließend wurde der Ansatz 20 bis 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach folgte ein Hitzeschock bei 42°C für zwei Minuten und eine fünfminütige Inkubation auf Eis, bevor 500 µl LB-Flüssigmedium (Tab. 2.5) ohne Antibiotika zugegeben wurde. Dieser Ansatz wurde 1 h bei 37°C geschüttelt (200 rpm, Inkubationsschüttler, Infors, Bottmingen, Schweiz). Nun wurde der gesamte Ansatz auf vorgewärmten LB-Antibiotika-Platten (Tab. 2.5) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Vereinfachtes Protokoll:

Das vereinfachte Protokoll wurde verwendet, wenn eine Transformation mit Vektoren, die eine Ampicillin-Resistenz vermitteln, durchgeführt wurde. Dabei wurde auf die oben beschriebene einstündige Inkubation verzichtet und der Ansatz direkt auf LB_{amp}-Agar-Platten (Tab. 2.5) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.2.2 Retransformation:

Dieses Protokoll wurde nur für Retransformationen von *E. coli* Zellen mit Vektoren verwendet, die eine Ampicillin-Resistenz vermitteln. Es wurden 0,01 bis 1 µg Plasmid DNA in ein auf Eis stehendes 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Es wurde das 5fache Volumen der DNA-Lösung an vorsichtig aufgetauten, kompetenten *E. coli* Zellen (2.3.1) in das Reaktionsgefäß pipettiert. Nachdem dieser Ansatz kurz gemischt wurde, fand eine zwei- bis fünfminütige Inkubation auf Eis statt, danach wurde der Ansatz eine Minute im Wasserbad auf 42°C erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz auf LB_{amp}-Agar-Platten (Tab. 2.5) ausgestrichen oder direkt in 3 ml LB-Flüssigmedium (Tab. 2.5) angeimpft, und über Nacht bei 37°C im Brutschrank oder im Inkubationsschüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz) inkubiert.

2.3.2.3 Anzucht von Bakterien

Für eine Plasmidminipräparation wurde am vorhergehenden Abend eine einzelne Bakterienkolonie mit einem sterilen Zahnstocher von der Platte in 3 ml LB-Flüssigmedium (Tab. 2.5) mit dem jeweiligen Antibiotika angeimpft. Die Zellen wurden bei 37°C unter permanentem Schütteln (Inkubationsschüttler, Infors, Bottmingen, Schweiz) mit 200 rpm inkubiert.

2.3.2.4 Bestimmung der Zelldichte:

Die optische Dichte einer *E. coli*-Kultur wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Dabei entsprach eine optische Dichte von 1 bei 600 nm einer Zelldichte von 8×10^8 Zellen/ml.

2.4 Anzucht von Hefezellen

2.4.1 Anfertigen von Hefezellen-Glycerinkulturen

Aus einer 1,5 ml Hefezellen-Vorkultur wurde eine Probe entnommen, welche lichtmikroskopisch untersucht wurde. Waren die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase und war der Anteil toter oder verklumpter Zellen im Sichtfeld kleiner 10%, wurden 700 μ l in ein 1,5 ml Schraubdeckel-Reagiergefäß gefüllt. Dazu wurden 300 μ l steriles Glycerin (87% in H₂O) pipetiert.

Von den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Hefestämme wurden Glycerinkulturen angefertigt, um die Lagerung über einen längeren Zeitraum gewährleisten zu können.

2.4.2 Herstellen einer Hefezellen-Vorkultur

Vorkulturen wurden entweder aus (a) Glycerinkulturen oder (b) Agarplatten angeimpft.

(a) Eine Hefezellen-Glycerinkultur wurde aufgetaut. Diese wurde zum Animpfen in einem Reagenzglas mit 3 ml YPD (Tab. 2.5) oder entsprechendes SDAP-Medium (Tab. 2.5) verwendet. Die OD₆₀₀ beim Animpfen sollte 0,1 bis 0,5 betragen. Diese Suspension wurde anschließend für 15 h bei 28°C und 210 rpm auf einem Schüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz) inkubiert.

(b) Wurde von einer Agarplatte angeimpft, wurden Zellen einer Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher dieser Platte entnommen und damit 3 ml YPD oder entsprechendes SDAP-Medium

(Tab. 2.5) im Reagenzglas beimpft. Inkubiert wurde diese Suspension anschließend für 15 h bei 28°C und 240 rpm auf einem Schüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz).

2.4.3 Herstellung und Lagerung kompetenter *S. cerevisiae* Zellen

Der entsprechende Hefestamm wurde über Nacht in 50 ml SDAP-Medium (Tab. 2.5) angezogen. Befand sich die Kultur in der logarithmischen Phase (OD_{600} 0,5 - 1) und war auch bei der lichtmikroskopischen Untersuchung erkennbar, dass die meisten Zellen knospend vorlagen, wurde die Kultur in ein steriles Röhrchen umgefüllt und fünf Minuten bei 1500 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml TE-Puffer I resuspendiert, und nochmals fünf Minuten bei 1500 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 5 ml Lithiumacetat-Puffer resuspendiert und die Zellen eine Stunde bei 28°C auf dem Schüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz) bei 210 rpm inkubiert. Es folgte ein fünfminütiger Zentrifugationsschritt bei 1500 g. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 5 ml Lithiumacetat/Glycerin-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde zu je 100 μ l in sterile Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C bis zu sechs Monaten gelagert.

2.4.4 Transformation von *S. cerevisiae* Stämmen

Es wurde entweder eine Transformation mit sich episomal replizierender plasmidaler DNA zur Expression von Fremdgenen durchgeführt oder aber eine Transformation zur Integration von Fremdgenen in das Hefegenom.

2.4.4.1 Transformation mit einem sich episomal replizierenden Plasmid

Transformiert wurden in diesem Fall ringförmige Plasmide, von denen aus auch die Expression des gewünschten Gens erfolgen sollte. Selektiert wurde nach erfolgter Transformation auf auxotrophe Marker.

2.4.4.2 Transformation zur chromosomalen Expression in den *Tok1*- oder *Trk1*-Locus von *S. cerevisiae*

Transformiert wurden in diesem Fall DNA-Konstrukte, die mit Hilfe von homologer Rekombination in den *Tok1*- oder *Trk1*-Lokus verschiedener Hefestämme integriert werden sollten. Die

homologe Rekombination erfolgte über Sequenzen, die der 5'- bzw. 3'-nicht kodierenden Region des *Tok1*- bzw. *Trk1*-Gens entsprachen. Um dies zu ermöglichen wurde das gewünschte Fremdgen in ein Plasmid (p77x bzw. p77trk (7.2)) eingebracht, das die entsprechende Sequenz des *Tok1*- bzw. *Trk1*-Gens, separiert durch singuläre Schnittstellen, enthielt. Somit lag in dem Plasmid das zu inserierende Gen vor dem 5'-kodierenden Bereich, dann folgte die Linearisierungsmöglichkeit und darauf der 3'-kodierende Bereich. Wurde nun mit Hilfe einer möglichen Restriktionsendonuklease (2.7.1) zwischen dem 5'- und 3'-kodierenden Bereich linearisiert, lag die DNA auf einem Strang vor. Die darauf vorliegende Reihenfolge war dann 5'-kodierende Region - das zu inserierende Gen - 3'-kodierende Region. Die DNA wurde mittels der Phenol-Chloroform-Extraktion (2.6.6) gereinigt und mittels Ethanol-Fällung (2.6.7) gefällt. Diese DNA wurde anschließend zur Transformation verwendet.

2.4.4.3 Transformation von kompetenten Hefezellen

(nach Bröker, 1993; Zhao *et al.*, 1993)

Die kompetenten Hefezellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Es wurden 1 μg DNA (in 1 - 10 μl H_2O , oder einem geeigneten Puffer), 5 μl absoluter Ethanol und 2 μl denaturierte Heringssperma-DNA zu den aufgetauten Hefezellen gegeben. Nun folgten fünf Minuten Inkubation bei RT und anschließend die Zugabe von 250 μl PEG-Lösung. Eine weitere Inkubation von einer Stunde fand bei 28°C auf dem Schüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz) bei 210 rpm statt. Dem folgte ein Hitzeschock über 15 Minuten im Wasserbad bei 46°C. Nach ca. fünf Minuten Abkühlen bei RT wurde der Ansatz auf entsprechenden SDAP-Platten (Tab. 2.5) ausplattiert und zwei bis vier Tage bei 28°C inkubiert bis Kolonien sichtbar waren.

Heringssperma-DNA: 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Heringssperma-DNA (Typ XIV) wurde zehn Minuten bei 98°C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Wurde es bei 4°C gelagert, wurde die DNA nicht jedesmal erhitzt.

2.4.5 Waschen von Hefezellen

Aus einer Hefe-Vorkultur wurden 50 - 500 μl Hefezellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Die Suspension wurde 15 sec bei 10000 g zentrifugiert und der Überstand verwor-

fen. Die Zellen wurden in 1 ml autoklaviertem demineralisiertem H₂O resuspendiert. Erneut wurde für 15 sec bei 10000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde ein zweites Mal wiederholt, anschließend wurden die Zellen in SDAP-Medium (Tab. 2.5) aufgenommen.

2.4.6 Bestimmung der Zelldichte

Die optische Dichte einer *S. cerevisiae*-Kultur wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Eine OD₆₀₀ entsprach 1,2 x 10⁷ Zellen/ml.

2.4.7 „Plasmid recovery“

Um im Anschluß an eine Transformation zur episomalen Expression das eingebrachte Plasmid wieder analysieren zu können, wurden die Plasmide wieder isoliert und vervielfältigt. Dafür wurden zuerst die Gesamt-Nukleinsäuren (inklusive der Plasmide) der Hefezellen isoliert (2.6.3). Ca. 1 µg dieser DNA wurde zur Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen (2.3.1) verwendet. Das in den Bakterienzellen amplifizierte Plasmid wurde anschließend präpariert (2.6.1) und mit Hilfe der Restriktionsspaltung (2.7.1) und Gelelektrophorese (2.7.8) analysiert.

2.5 Lichtmikroskopie

2.5.1 Mikroskopie von Zellen aus einer Flüssigkultur

4 µl der zu untersuchenden Kultur wurden auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas (18 x 18 mm) abgedeckt. Die Probe wurde mit einem Lichtmikroskop BH-2 (Olympus, Hamburg) untersucht.

2.5.2 Mikroskopie von Zellen aus einer Festkultur

In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 20 µl Wasser vorgelegt, mit einem sterilen Zahnstocher wurden Zellen einer Kolonie von einer Agar-Platte entfernt und in das mit Wasser gefüllte Reaktionsgefäß überführt. 4 µl dieses Gemisches wurden nun auf einen Objektträger überführt, mit einem Objektglas (18 x 18 mm) abgedeckt und mit einem Lichtmikroskop BH-2 (Olympus, Hamburg) untersucht.

2.5.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die zu untersuchende Hefezellen-Kultur wurde gewaschen (2.4.5), 4 μ l der gewaschenen Kultur wurden auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Objektglas (18 mm x 18 mm) bedeckt. Mikroskopische Bilder wurden mit dem Zeiss, Jena, Axioplan Mikroskop und dem Zeiss, Jena, Plan Neofluar 100 x Objektiv gemacht. Die Anregungsquelle war eine 50 W Hg Dampfstrahl-Lampe. Zur Visualisierung der GFP-Fluoreszenz wurden ein Anregungsfilter mit dem Bandpass 450 nm - 490 nm und ein Emissionsfilter mit dem Bandpass 515 nm - 565 nm benutzt. Zur Visualisierung der RFP-Fluoreszenz wurde ein Anregungsfilter mit dem Bandpass 555 nm - 570 nm und ein Emissionsfilter mit dem Bandpass 580 nm - 625 nm verwendet. Die Bilder wurden mit einer CCD Kamera (CF8/1 DXC, Kappa, Gleichen) aufgenommen.

2.6 Präparation von Nukleinsäuren

2.6.1 Plasmid-Minipräparation aus Bakterien durch alkalische Lyse

(modifiziert nach [Birnboim and Doly, 1979](#))

Eine Bakterienkolonie wurde in 3 ml LB-Flüssigmedium mit entsprechendem Antibiotika (Tab. 2.5) über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz) bei 200 rpm angezogen. 1,5 ml der Bakterienkultur wurden bei ca. 10000 g und RT 30 Sekunden abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 50 μ l Lösung 1 resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 60 μ l Lösung 2, nach vorsichtigem Mischen folgte eine zweiminütige Inkubation bei RT. Anschließend wurden 70 μ l der Lösung 3 hinzugegeben, erneut vorsichtig gemischt und fünf Minuten bei ca. 15000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Nukleinsäuren durch die Zugabe von 500 μ l absolutem Ethanol gefällt. Zentrifugiert wurde zwei Minuten bei 15000 g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 500 μ l 70% Ethanol gewaschen und anschließend in 20 μ l Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

2.6.2 Plasmid-Minipräparation aus Bakterien mit dem NucleoSpin® Plasmid Set von Macherey und Nagel

Um reine DNA für Sequenzierungsreaktionen zu erhalten, wurde das NucleoSpinRPlasmid Set oder für eine Midipräparation das NucleoBon®PC100 Set von Macherey und Nagel, Düren entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

2.6.3 Präparation genomischer DNA aus Hefe / Hefe Plasmid-Präparation

(modifiziert nach [Hoffman and Winston, 1987](#))

Über Nacht wurde die entsprechende Hefekultur in 3 ml Medium bei 28°C auf einem Schüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. War eine Zelldichte von mehr als 10^7 Zellen/ml erreicht, wurden 2 x 1,5 ml in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei ca. 10000 g für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett verworfen und das Pellet in 20 µl gereinigtem Wasser resuspendiert. Es wurden 200 µl TSN-Lösung, 200 µl P/C und 0,3 g säuregewaschene Glasperlen hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung zwei bis drei Minuten kräftig gemischt („gevortext“) und fünf Minuten bei RT und 10000 g zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu diesem Überstand wurde erneut 200 µl P/C hinzugegeben, kräftig gemischt und fünf Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Wieder wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Optional wurde ein RNase-Verdau eingeschoben: Nach der Zugabe von 5 µl RNaseA (10 mg/ml in Wasser) erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C. Eine Phenol-Chloroform Extration (2.6.6) mit anschließender Fällung (2.6.7) wurde durchgeführt, bevor das Pellet in 50 µl Wasser oder TE-Puffer aufgenommen wurde.

2.6.4 Präparation von RNA aus Hefe

20 ml einer Hefekultur wurde über Nacht auf einem Schüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz) bei 210 rpm auf eine OD_{600} von ca. 1 angezogen. Die Hefekultur wurde in ein steriles, 50 ml Schraubdeckelgefäß mit eiskaltem gereinigtem Wasser überführt und bis zu 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend fand ein fünfminütiger Zentrifugationsschritt bei 1500 g und 4°C statt. Das Pellet wurde mit 1 ml eiskaltem Wasser resuspendiert und diese Suspension nun in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Wieder erfolgte eine Zentrifugation bei 1500 g und 4°C. Der

Überstand wurde nun verworfen, das Pellet in 0,5 ml LETS-Puffer resuspendiert und anschließend 0,5 g säuregewaschene Glasperlen und 0,5 ml P/C (sauer) + 1% SDS hinzugegeben. Es wurde zwei Minuten lang in Intervallen von zehn Sekunden kräftig gemischt, der Ansatz wurde zwischendurch immer wieder auf Eis gekühlt. Das Lysat wurde zehn Minuten bei 12000 g und 4°C abzentrifugiert, der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt indem bereits 0,5 ml P/C vorgelegt worden war. Nach einminütigem kräftigen Schütteln folgten zehn Minuten Zentrifugation bei 12000 g und 4°C. Der Überstand wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1/20 Volumen 40% KAc und dem 2,5 - 3 fachen Volumen absoluten Ethanol versetzt. Der Ansatz wurde 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 30 Minuten bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde abschließend mit 70% Ethanol gewaschen und danach in 100 µl RNase-freiem-Wasser aufgenommen.

2.6.5 Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.6.5.1 Optische Quantifizierung mittels Agarosegelelektrophorese

Eine bestimmte Menge der Nukleinsäurenlösung wurde mittels Agarosegelelektrophorese (2.7.8) aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Parallel wurden 500 ng λ -DNA mit *HindIII* und *EcoRI* geschnitten aufgetragen. Die Fluoreszenzintensität der Bande der zu quantifizierenden DNA wurde nach der Dokumentation des Gels (2.7.8) dem entsprechenden Fragment der λ -DNA zugeordnet und so die Konzentration abgeschätzt.

2.6.5.2 Quantifizierung mittels der optischen Dichte

Mittels der optischen Dichte konnte sowohl die Nukleinsäure-Lösung quantifiziert werden als auch eine Aussage über die Reinheit der Lösung gemacht werden. Die zu untersuchende Nukleinsäure-Lösung wurde entsprechend mit Wasser verdünnt. Mit einem UV-Spektralphotometer (Shimadzu, Duisburg) wurde die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Bei einer Schichtdicke von 1 cm wurde anhand folgender Näherungsformeln die Konzentration errechnet.

doppelsträngige DNA: $c = OD_{260nm} \times 50 \mu\text{g/ml}$

einzelsträngige DNA: $c = OD_{260nm} \times 33 \mu\text{g/ml}$
und Oligonukleotide

RNA: $c = OD_{260nm} \times 40 \mu\text{g/ml}$

Die Reinheit wurde abgeschätzt, indem der Quotient aus OD_{260nm} und OD_{280nm} ermittelt wurde. Eine DNA-Lösung mit einem Quotient von 1,8 und eine RNA-Lösung mit einem Quotient von 2 wurde für weitere Versuche als hinreichend rein angesehen.

2.6.6 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Nukleinsäure-Lösung wurde mit Wasser auf $100 \mu\text{l}$ aufgefüllt und dann mit $100 \mu\text{l}$ P/C (sauer) versetzt. Nun wurde 30 Sekunden kräftig gemischt und dann fünf Minuten bei ca. 10000 g und RT zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.6.7 Ethanolfällung von DNA

Die wässrige DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8 und das insgesamt dreifache Volumen mit absoluten Ethanol versetzt. Nach 15 minütigem inkubieren auf Eis folgte eine Zentrifugation über 20 Minuten bei 4°C und ca. 20000 g . Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit $500 \mu\text{l}$ 70% Ethanol gewaschen und nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Pellet in $10 \mu\text{l}$ Wasser oder einem geeigneten Puffer aufgenommen.

2.7 Modifikation und Analysen von Nukleinsäuren

2.7.1 Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonuklasen sind Enzyme, die DNA an definierten Stellen spalten. Ein typischer Restriktionsansatz sah wie folgt aus: $1 \mu\text{g}$ DNA; 1/10 des Gesamtvolumens Restriktionspuffer (verwendet wurde der vom Hersteller zur ausgewählten Restriktionsendonuklease empfohlene Restriktionspuffer); 1 u Enzym. Meist wurde die doppelte Menge der berechneten benötigten

Enzymmenge eingesetzt, um trotz inhibierender Kontaminaten komplett geschnittenen DNA zu erhalten. Handelte es sich um DNA, die mittels der Minipräparation, wie unter 2.6.1 beschrieben, gewonnen wurde, wurde dem Restriktionsansatz RNaseA zu einer Endkonzentration von 0,14 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hinzugegeben. Der Ansatz wurde 60 min bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Die DNA wurde mit Hilfe der Gelelektrophorese (2.7.8) aufgetrennt.

Die Aktivität (1 u) wird definiert als die Enzymmenge, die benötigt wird um, 1 μg eines Kontroll-DNA (üblicherweise λ -DNA, manchmal Adenovirus 2) in einem Volumen von 50 μl bei optimaler Temperatur in einer Stunde vollständig zu schneiden.

Die benötigte Enzymmenge ist demnach von der Anzahl der Schnittstellen pro Nukleotid des „Templates“ abhängig. Mit folgender Gleichung wurden die eingesetzten Enzymmengen bestimmt:

$$u = \left(\frac{\text{Länge der Kontroll-DNA}}{\text{Länge des „Templates“}} \right) \cdot \left(\frac{1}{\text{Anzahl der Schnittstellen der Kontroll-DNA}} \right)$$

2.7.2 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Firma geneart GmbH, Regensburg, durchgeführt. Vorbereitet wurde die DNA, indem sie mit Hilfe des NucleoSpinRPlasmid Sets von Macherey-Nagel, Düren, aus Bakterien isoliert wurde (2.6.1). Die für die Sequenzierreaktion nötigen Oligonukleotide (Invitrogen, Karlsruhe) wurden mit der DNA versendet. Ein typischer Ansatz sah wie folgt aus: ca. 300 ng DNA; 0,5 μl Primer (100 pmol) ad 8 μl Wasser wurden in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und versendet.

2.7.3 Glätten von überstehenden Enden an DNA-Fragmenten

Sollten 5'-Überhänge von DNA-Fragmenten aufgefüllt werden, wurde die 5' - 3' Polymeraseaktivität des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I genutzt. Der Ansatz sah wie folgt aus: die zu modifizierende DNA; 1/10 des Gesamtvolumens Klenow-Puffer (oder der zuletzt verwendete Restriktionspuffer), dNTPs (finale Konzentration 0,1 mM); 1 u Klenow-Fragment der Polymerase I. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend zehn Minuten bei 70°C hitzeinaktiviert (2.7.6).

Sollten 3'-Überhänge von DNA-Fragmenten abgedaut werden, wurde die 3' - 5' Exonucleaseaktivität der T4 DNA-Polymerase verwendet. Der Ansatz sah wie folgt aus: die zu modifizierende DNA; 1/10 Volumen T4 DNA-Polymerase Puffer (oder der zuletzt verwendete Restriktionspuffer), dNTPs (finale Konzentration 0,1 mM); 1 u T4-DNA-Polymerase. Der Ansatz wurde zehn Minuten bei RT inkubiert. Das Enzym wurde anschließend zehn Minuten bei 75°C hitzeinaktiviert (2.7.6).

2.7.4 Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten

Zu der DNA mit 1 - 10 pmol DNA-Termini wurde 1 u „Shrimp Alkaline Phosphatase“ und der „Shrimp Alkaline Phosphatase“-Puffer (oder der zuletzt verwendete Restriktionspuffer) dem Ansatz zugegeben. Ein Ansatz sah z. B. wie folgt aus: 10 µl DNA-Lösung; 5 µl Reaktionspuffer; 34 µl Wasser und 1 µl „Shrimp Alkaline Phosphatase“. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert und die Phosphatase danach für 15 Minuten bei 65°C hitzeinaktiviert (2.7.6).

2.7.5 Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten

Sollte γ -Phosphat von ATP auf die 5'-OH-Gruppen von DNA-Fragmenten übertragen werden, wurde T4-Polynukleotid-Kinase verwendet. DNA mit 1 - 20 pmol 5'-Enden wurde mit 20 pmol ATP, 1 u T4-Polynukleotid-Kinase und dem mitgelieferten Puffer versetzt. Ein Ansatz enthielt typischerweise 10 µl DNA-Lösung; 2 µl Reaktionspuffer; 1,3 µl 10 mM ATP; 5,7 µl Wasser und 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend zehn Minuten bei 70°C hitzeinaktiviert (2.7.6).

2.7.6 Hitzeinaktivierung von Enzymen

Enzyme wurden inaktiviert, indem der jeweilige Ansatz im Wasserbad oder Heizblock erhitzt wurde. Die Inaktivierungstemperatur und -zeit wurden gemäß den Angaben der Hersteller der Enzyme gewählt. Das Reaktionsgefäß wurde mehrmals kurz zentrifugiert, damit die kondensierte Flüssigkeit vom Deckel des Reaktionsgefäß wieder mit der restlichen Flüssigkeit vereint werden konnte. Nur so konnte eine vollständige und gleichmäßige Inaktivierung der Enzyme erreicht werden.

2.7.7 Ligation von DNA

DNA-Fragmente können mit Hilfe der T4-DNA-Ligase ligiert werden. Die eingesetzten DNA-Fragmente wurden in einem molaren Verhältnis von 1/10 (Vektor-DNA/Insert-DNA) eingesetzt. Die in diesem Verhältnis vorliegenden DNA-Fragmente (10 - 50 ng) wurden mit 2 - 4 μ l T4-DNA-Ligase, dem mitgeliefertem Ligationspuffer und gereinigtem Wasser versetzt. Parallel wurde ein Negativkontroll-Ansatz angesetzt, indem die eingesetzten Insertionsfragment-DNA durch TAE-Puffer (Tab. 2.4) ersetzt wurde. Auf diese Weise wurde die Religationsrate der Vektor-DNA bestimmt. Inkubiert wurde der Ligationsansatz für ca. eine Stunde bei RT. Mit bis zu 10 μ l eines solchen Ligationsansatzes wurden 100 μ l kompetente *E. coli* Zellen (2.3.1) transformiert (2.3.2.1). Der restliche Ansatz wurde zur weiteren Ligation der DNA über Nacht auf 4°C gestellt und ggf. am nächsten Tag transformiert.

2.7.8 DNA-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Analyse von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden TAE Agarosegele von 0,6 - 1,5% hergestellt. Zur Visualisierung der DNA wurde dem Gel Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 1 μ g/ml zugegeben. Zu der DNA-Lösung wurde 1/6 des Volumens Ladepuffer gegeben. Die Elektrophorese wurde mit konstanter Feldstärke (8 - 10 V/cm) durchgeführt. Als Längensstandard wurde GeneRulerTM 1 kb DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) oder λ -DNA geschnitten mit *Hind*III und *Eco*RI (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Dokumentiert wurde die DNA-Auftrennung mit UV-Durchlicht (308 nm) auf dem UV-Transilluminator (Rothaar und Schroeder).

TAE-Agarosegel: 0,6% bis 1,5% Agarose in TAE-Puffer gelöst wurden erhitzt. Vor dem Gießen des TAE-Agars in den Gelträger und nachdem der TAE-Puffer auf ca. 65°C abgekühlt war, wurde diesem 1 μ g/ml Ethidiumbromid zugesetzt.

2.7.9 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Nachdem DNA-Fragmente mit Hilfe der Gelelektrophorese (2.7.8) der Größe nach aufgetrennt wurden, wurde das Gel auf drei übereinanderliegenden Glasplatten möglichst kurz mit UV-Licht

bestrahlt (UV-Transilluminator, Rothhaar und Schroeder). Während der UV-Belichtung wurde die DNA mit einem Ethanol gereinigtem Skalpell ausgeschnitten und in ein mit silanisierter Glaswolle (Supelco, Bellefonte, USA) gestopftes, durchstochenes 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieses Reaktionsgefäß wurde nun in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und zehn Minuten bei 10000 g und 4°C zentrifugiert. In dem größeren Gefäß aufgefangene DNA wurde nun entweder direkt in einen Ligationsansatz (2.7.7) eingesetzt oder es folgte eine Ethanol-Präzipitation (2.6.7).

2.7.10 Visualisierung von RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung von RNA wurden denaturierende Agarosegele verwendet. Zur Herstellung von 45 ml eines 0,75%igem Agarosegels wurden 0,375 g Agarose in 39,15 ml Wasser aufgekocht und anschließend auf ca. 60°C abgekühlt. Dann wurden 1,35 ml 37% Formaldehyd und 4,5 ml Laufpuffer hinzugegeben und das Gel gegossen. Zur Denaturierung der Proben wurden 15 µg der RNA mit 19,4 µl Denaturierungspuffer mit Wasser auf ein Endvolumen von 25 µl gebracht. Anschließend wurde der Ansatz fünf Minuten bei 65°C inkubiert und dann zügig auf Eis gestellt, weitere 5 µl Ladepuffer wurden zu der Probe gegeben und dann auf dem Gel aufgetragen.

Zur Visualisierung der RNA wurde Ethidiumbromid (1 µg/ml) zugegeben.

2.7.11 „Northern Blot“

Diese Methode dient dem Transfer von RNA aus einem Agarosegel auf eine Membran.

Das RNA-Gel (2.7.10) wurde nach dem Lauf zehn Minuten in 10 x SSC-Lösung gewaschen.

Zum Transfer auf eine Membran wurde ein bidirektionaler Blot verwendet. Dazu wurde ein 5 cm hoher Stapel aus saugfähigem Papier aufgebaut. Darauf wurden 5 Whatman 3MM Papiere (mit 10 x SSC-Lsg. getränkt) gelegt und darauf eine geladene mit Wasser benetzte Membran (Roche, Mannheim). Das Gel wurde luftblasenfrei aufgelegt und die Ränder mit „Parafilm M“ (Brand, Wertheim) bedeckt. Auf das Gel wurde luftblasenfrei eine geladene, mit Wasser benetzte Membran (Roche, Mannheim) gelegt, auf welche 5 Whatman 3MM Papiere (mit 10 x SSC-Lösung getränkt) gelegt wurden. Darauf folgten 5 cm saugfähiges Papier. Der ganze Stapel wurde mit zwei aufeinanderliegenden Glasplatten abgedeckt.

Nach ca. vier Stunden wurde der Blot vorsichtig abgebaut. Die RNA wurde mit dem "Bio-LinkR! BLX-254" von Vilber Lourmat, Frankreich und einer Energie von 60 Joule/cm² auf den beiden Membranen fixiert. Anschließend wurde sie für 5 Minuten in 0,5% x SSC +1% SDS geschwenkt.

2.7.12 Hybridisierung eines „Northern Blots“

Die nicht radioaktive Hybridisierung eines „Northern Blots“ wurde mit Hilfe des „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ Roche, Mannheim nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Sonde wurde mittels PCR (2.8.4) hergestellt. Denaturiert wurde die Sonde 10 Minuten bei 98°C, anschließend wurde sie direkt auf Eis gestellt.

2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion kann *in vitro* DNA vervielfältigt werden.

2.8.1 Standard Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR dient der Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnittes. Ein 50 µl Standard-PCR-Ansatz wurde in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Er bestand aus Matrizen-DNA (0,1 - 0,5 µg genomische *S. cerevisiae* DNA oder 100 - 500 ng Plasmid-DNA); 5 µl 10 x *Taq*-Puffer (Fermentas, St. Leon-Rot); 3 µl MgCl₂ (25 mM); 0,2 µl dNTPs (10 mM); 0,25 µl Vorwärts-Primer (100 pmol); 0,25 µl Rückwärts-Primer (100 pmol) und 0,25 u *Taq* DNA-Polymerase (5u/µl) (Fermentas, St. Leon-Rot) und auf ein Gesamtvolumen von 50 µl mit Wasser aufgefüllt.

Wurde das PCR-Produkt anschließend verwendet um das amplifizierte Gen in *S. cerevisiae* zu exprimieren oder für andere Versuche, bei denen eine sehr geringe Fehlerrate entscheidend war, wurde statt der *Taq* DNA-Polymerase die *Pwo* DNA-Polymerase (Peqlab, Erlangen) und der dazugehörige Puffer verwendet.

Wurde Matrizen-DNA eingesetzt, die zuvor eluiert (2.7.9) wurde und somit TAE enthielt, wurde dem Ansatz pro µl Eluat 1 pmol MgCl₂ zur Bindung des EDTA hinzugegeben.

Für die PCR-Reaktionen wurde der Mastercycler personal oder Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg) verwendet.

Ein Standard PCR-Programm sah wie folgt aus:

initiale Denaturierung:	3 Minuten	94°C
PCR-Zyklus:	x 15 - 20	
Denaturierung:	20 Sekunden	94°C
Anlagerungstemperatur:	50 Sekunden	entsprechend der Primersequenz
Elongation:	Amplifikat/1000+0,15 = Zeit in Minuten	72°C
finale Elongation:	3 Minuten	72°C

Anlagerungstemperatur

Die Anlagerungstemperatur ist abhängig von der Sequenz der Oligonukleotide. Zur Berechnung der optimalen Anlagerungstemperatur wurde folgende Gleichung verwendet:

$$T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T) - 3$$

Kontrolliert wurde das Amplifikat gelelektrophoretisch. Wenn mit einer wie oben beschriebenen PCR keine Amplifikation erreicht wurde, wurde die optimale Anlagerungstemperatur mit Hilfe einer Gradienten-PCR ermittelt. Dazu wurde ein doppelter PCR-Reaktionsansatz (100 μ l) auf sieben 0,2 ml Reaktionsgefäße à 16 μ l verteilt. Mit dem Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg) konnten parallel verschiedenen Anlagerungstemperaturen getestet werden.

2.8.2 *in vitro* Mutagenese zum gezielten Austausch einzelner Nukleotide

(Übersicht bei [Lottspeich and Zorbas, 1998](#))

Ziel einer *in vitro* Mutagenese ist die Deletion oder Substitution eines bzw. mehrerer Nukleotide in einer DNA-Sequenz, oder auch die Insertion eines bzw. mehrerer Nukleotide in eine DNA-Sequenz. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *in vitro* Mutagenese verwendet (Abb. 2.1), um gezielt einzelne Nukleotide einer Sequenz zu verändern. Dafür wurde wie folgt vorgegangen. Es wurde mit zueinander komplementären Mutageneseprimern (1A_A (PCR 1A „Mutagenese-Antisense-Primer,“) bzw. 1B_S (PCR 1B „Mutagenese-Sense-Primer,“)) und einem zum 5'-Ende des zu amplifizierenden Fragments komplementären (PCR 1A „Sense“-Primer (1AS)) und zum 3'-Ende des zu amplifizierenden Fragments komplementären Primer (PCR 1B „Antisense“-Primer (1BA)) gearbeitet. Im ersten Schritt fand PCR 1A mit dem Primerpaar 1AS und 1A_A

und PCR 1B mit dem Primerpaar 1B_S und 1BA statt. PCR 1A amplifizierte dabei einen Bereich zwischen dem 5' Ende des zu amplifizierenden Fragments bis einige Nukleotide hinter der zu verändernden Stelle. PCR 1B startete die Amplifikation einige Nukleotide vor der zu mutierenden Stelle und lief bis zum 3' Ende des zu amplifizierenden Fragments. Diese beiden PCRs (PCR 1A und PCR 1B) wurden wie unter 2.8.1 beschrieben angesetzt und durchgeführt. Als nächstes wurden die Amplifikate von PCR 1A und PCR 1B eluiert (2.7.9). Im folgenden Schritt lagerten sich die beiden Fragmente an den überlappenden Stellen aneinander und wurden entsprechend aufgefüllt. Auf diese Weise wurde die Matrizen-DNA für PCR 2 generiert. In der direkt folgenden PCR 2 wurden die jeweils äußeren 5' und 3' Primer (1AS und 1BA) verwendet, so dass das gesamte Fragment amplifiziert werden konnte. Ein typischer Ansatz für die „Vorbereitungs-PCR“ und die PCR 2 sah folgendermaßen aus: 10 μ Eluat der PCR 1A; 10 μ Eluat der PCR 1B; 5 μ l 10 x *Pwo*-Puffer (Peqlab, Erlangen); 3,8 μ l $MgCl_2$ (25 mM); 0,2 μ l dNTPs (10 mM); und 0,5 u *Pwo* DNA-Polymerase (5u/ μ l) (Peqlab, Erlangen) und auf ein Gesamtvolumen von 50 μ l mit Wasser aufgefüllt.

Die Primer (0,25 μ l 1AS (100 pmol); 0,25 μ l 1BA (100 pmol)) werden direkt in den Ansatz der „Vorbereitungs-PCR“ gegeben, wenn diese beendet ist.

Programm der „Vorbereitungs-PCR“ und PCR2:

„Vorbereitungs-PCR“	x 2:	
initiale Denaturierung:	5 Minuten	94°C
Anlagerungstemperatur:	5 Minuten	37°C
Elongation:	5 Minuten	72°C
Primerzugabe	1 Minute	94°C
PCR-Zyklus:	x 15 - 20:	
Denaturierung:	20 Sekunden	94°C
Anlagerungstemperatur:	50 Sekunden	entsprechend der Primersequenz
Elongation:	Amplifikat/1000 = Zeit in Minuten	72°C
finale Elongation:	3 Minuten	72°C

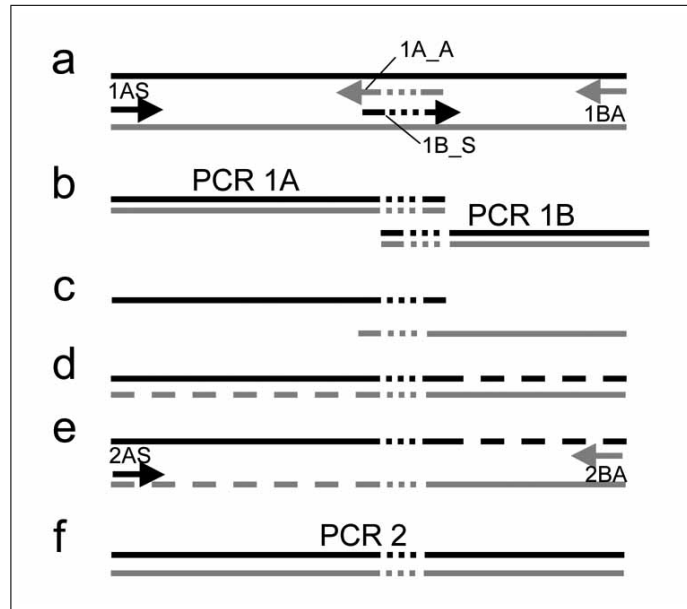


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der *in vitro* Mutagenese zum Austausch einzelner Nucleotide in einem bekannten DNA-Fragment]. In **a** sind die Matrizen-DNA (5' - 3'-Strang in schwarz, 3' - 5'-Strang in grau) und die verwendeten Primer dargestellt. 1A_A ist der Mutagenese „Antisense“-Primer, 1B_S der Mutagenese „Sense“-Primer, die gepunkteten Bereiche stellen die veränderten Nucleotide dar. **b** zeigt die mit PCR 1A mit dem Primerpaar 1AS und 1A_A und die mit PCR1B mit dem Primerpaar 1B_S und 1BA erhaltenen doppelsträngigen Fragmente. **c** stellt die denaturierten Amplifikate der PCR 1A und PCR 1B dar. In **d** ist das Aneinanderlagern der einzelsträngigen Fragmente und das entsprechende Auffüllen (gestrichelte Linie), was in der „Vorbereitungs-PCR“ geschieht, dargestellt. **e** zeigt die Matrizen-DNA der PCR 2 und die verwendeten Primer 1AS und 1BA. In **f** ist das doppelsträngige Amplifikat der PCR 2 dargestellt.

2.8.3 PCR zur Fusion zweier DNA-Fragmente

Ziel dieser PCR ist die Fusion zweier einzelner DNA-Fragmente (Abb. 2.2). Diese Methode wurde verwendet um beispielsweise *yEGFP* C-terminal an K^+ -Kanal-Gene zu fusionieren.

Die verwendeten „Fusions-Primer“ bestanden aus einem zum amplifizierenden Fragment passenden Teil und zusätzlichen Nucleotiden am C-Terminus, die den ersten Nucleotiden des zu fusionierenden Fragments entsprechen. Diese Primer werden 1A_A (PCR 1A „Fusion-Antisense-Primer,“) bzw. 1B_S (PCR 1B „Fusion-Sense-Primer“) genannt. Im ersten Schritt fand PCR 1A mit dem Primerpaar 1AS (PCR 1A „Sense“-Primer) und 1A_A und PCR 1B mit dem Primerpaar 1B_S und 1BA (PCR 1B „Antisense“-Primer) statt (2.8.1). PCR 1A am-

plifizierte dabei einen Bereich zwischen dem 5' Ende des final N-terminal vorliegenden Fragments inkulsiv den ersten Nukleotiden des final C-terminal fusionierten Fragments (aufgrund der an 1A_A angehängten Nukleotide). PCR 1B amplifizierte die letzten Nukleotide des final N-terminal vorliegenden Fragments und das final C-terminal fusionierte Fragment. Als nächstes wurden die Amplifikate von PCR 1A und PCR 1B eluiert (2.7.9). Im folgenden Schritt („Vorbereitungs-PCR“) lagerten sich die beiden Fragmente an den überlappenden Stellen aneinander und wurden entsprechend aufgefüllt. Die beiden DNA-Fragmente lagen somit fusioniert und verlängert vor und dienten in PCR 2 als Matrizen-DNA. In PCR 2 wurden die Primer 1AS und 1BA verwendet, so dass eine vollständige Amplifikation des nun fusioniert vorliegenden Fragments erfolgen konnte. Es wurden die unter 2.8.2 beschriebene Programme für die „Vorbereitungs-PCR“ als auch für PCR 2 verwendet, der verwendete Ansatz ist ebenfalls unter 2.8.2 beschrieben.



Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Fusion zweier DNA-Fragmente. In **a** ist mit den durchgezogenen Linien das final N-terminal vorliegende Fragment und in gepunktet das final C-terminal fusionierte Fragment (5' - 3'-Strang in schwarz, 3' - 5'-Strang in grau) sowie die verwendeten Primer dargestellt. 1A_A ist der „Fusions-Antisense“-Primer, 1B_S der „Fusions-Sense“-Primer. **b** zeigt die durch PCR 1A mit dem Primerpaar 1AS und 1A_A erhaltenen doppelsträngigen Fragmente sowie die Amplifikate der PCR 1B mit dem Primerpaar 1B_S und 1BA. **c** stellt die denaturierten Amplifikate der PCR 1A und PCR 1B dar. In **d** ist das Aneinanderlagern der einzelsträngigen Fragmente und das entsprechende Auffüllen (gestrichelte Linie), das in der „Vorbereitungs-PCR“ geschieht, dargestellt. **e** zeigt die Matrizen-DNA der PCR 2 und die verwendeten Primer 1AS und 1BA. In **f** ist das doppelsträngige Amplifikat der PCR 2 dargestellt.

2.8.4 PCR zur Herstellung einer DNA-Sonde

In eine Standard-PCR wurde Digoxigenin-11-dUTP (Roche, Mannheim) und ein dNTP-Mix (bestehend aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP Roche, Mannheim) eingesetzt. Eine Markierung erfolgte durch einen zufälligen Einbau des DIG-11-dUTP anstelle von dTTP.

2.8.5 Klonierung von PCR-Produkten

Um die Klonierung von PCR-Produkten zu erleichtern wurden durch entsprechende Modifikationen der verwendeten Primer bestimmte Schnittstellen an das jeweilige Amplifikat angefügt. Nach erfolgter PCR wurde mit dem Ansatz eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.6.6) und eine Ethanol-Präzipitation (2.6.7) durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Restriktionsspaltung mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen. Das geschnittene PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch gereinigt (2.7.8) und eluiert (2.7.9) und mit dem entsprechend vorbereiteten Vektor ligiert (2.7.7). Anschließend folgte die Transformation von *E. coli* Zellen (2.3.2.1) und Selektion auf LB-Agar-Platten mit geeignetem Antibiotika (Tab. 2.5).

2.8.6 Bakterien-Kolonie-PCR

In 0,2 ml Reaktionsgefäße werden jeweils 10 μ l Wasser vorgelegt. Durch Verwendung von sterilen Zahnstochern wurden Zellen einer Bakterienkolonie in das jeweilige Reaktionsgefäß übertragen. Diesem Ansatz wurde Puffer, MgCl₂, dNTPs, Oligonukleotide und *Taq*-Polymerase wie unter 2.8.1 beschrieben zugegeben. Die PCR wurde ebenfalls wie unter 2.8.1 beschrieben durchgeführt.

2.8.7 Hefe-Kolonie-PCR

In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 20 μ l 0,25% SDS in Wasser vorgelegt. Durch Verwendung von sterilen Zahnstochern wurden Zellen einer Hefekolonie in das jeweilige Reaktionsgefäß übertragen. Der Ansatz wurde zehn Sekunden heftig durchmischt („gevortext“) und anschließend drei Minuten im Wasserbad auf 90°C erhitzt. Es folgte ein 30 Sekunden dauernder Zentrifugationsschritt bei 10000 g. Vom Überstand wurde 1 μ l in einen Standard-PCR-Ansatz

(2.8.1) als Matrizen-DNA pipettiert. Zusätzlich wurde dem Ansatz 1% TritonX100 zugegeben. Nun wurde das unter 2.8.1 beschriebene Standard-PCR-Programm gestartet.

2.9 Physiologische Tests mit Hefezellen

2.9.1 Wachstumstest auf Festmedium

Zellen einer Hefe-Vorkultur (2.4.2) wurden gewaschen (2.4.5) und mit Wasser auf eine OD_{600} von 1 eingestellt. Durch sequentielle 1/10 Verdünnungen wurden aus diesem Ansatz Hefesuspensionen einer OD_{600} von 0,1; 0,01 und 0,001 hergestellt. Jeweils 3 μ l der jeweiligen Verdünnung wurden auf eine SDAP-Platte (Tab. 2.5) aufgetüpfelt. Die Platten wurden für mehrere Tage bei 28°C inkubiert. Zur Analyse des Wachstums wurden die Platten jeden Tag photographiert.

2.9.2 Messung der Vermehrung von Hefezellen in Mikrotiterplatten

Wachstumskurven von Hefekulturen wurden über einen definierten Zeitraum bestimmt. Verwendet wurden 96-„well“ Mikrotiterplatten, die in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Spectra-Fluoro-Plus, Tecan, Crailsheim) gemessen wurden. Aus Glycerinkulturen wurden Vorkulturen (2.4.2) angeimpft und drei Tage auf einem Schüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz) bei 28°C und 210 rpm inkubiert. Dann wurden 300 μ l der jeweiligen Kulturen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, gewaschen (2.4.5) und die Hefesuspension auf eine OD_{600} von 4 eingestellt. In die Vertiefungen einer 96-„well“ Mikrotiterplatte wurde das jeweilige Medium vorgelegt. Anschließend wurden jeweils 5 μ l der Hefesuspension pipettiert. Für jede zu untersuchende Bedingung wurden zwei bis drei Vertiefungen identisch befüllt. Als Kontrolle dienten Vertiefungen, in die nur Medium und keine Hefezellen pipettiert wurden. Die Platte wurde mit einem klaren Deckel verschlossen und mit „Parafilm-M“ (Brand, Wertheim) abgedichtet. In einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Spectra-Fluoro-Plus, Tecan, Crailsheim) unter Verwendung der Amphis-Software und Magellan (beide Tecan, Crailsheim) wurden die Platten bei 28°C für bis zu 24 h inkubiert. Dabei wurde in Intervallen von 15 Minuten die OD_{600} , Fluoreszenz (485/535) und Fluoreszenz (485/595) gemessen. Zwischen den jeweiligen Messungen wurden die Platten geschüttelt. Die erhaltenen Daten wurden anschließend in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft) exportiert und dort ausgewertet.

2.9.3 Auswertung

Die Wachstumskurven wurden mit dem „R“ Script „grofit“ (Prof. Dr. M. Kschischo) an verschiedene Wachstumsmodelle angepasst und anhand des optimalen Modells ausgewertet. Die so erhaltene maximale Wachstumsrate (μ_{max}) in 1/sec wurde für die Darstellung der Ergebnisse verwendet.

Zusätzlich wurde in einigen Fällen noch mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel das Integral unter der Wachstumskurve (W_{int}) in OD*sec über einen definiertem Zeitraum (15 h) durch folgende Gleichung bestimmt.

$$W_{int} = \sum_{i=1}^m OD_i - m \cdot \sum_{j=1}^6 OD_j \quad (2.1)$$

OD_i hier steht für die gemessene optische Dichte $i=1$ bis m stellt die Anzahl der Messungen während der Testzeit dar.

Die relative Wachstumsänderung $\%W_{\frac{+M}{-M}}$ wurde berechnet, indem folgende Formeln angewendet wurden:

$$\begin{aligned} W_{\frac{10-M}{100-M}} &= \frac{W_{10-M}}{W_{100-M}} \\ W_{\frac{10+M}{100+M}} &= \frac{W_{10+M}}{W_{100+M}} \\ \%W_{\frac{+M}{-M}} &= \left(\frac{W_{\frac{10-M}{100-M}}}{W_{\frac{10+M}{100+M}}} - 1 \right) \cdot 100 \end{aligned} \quad (2.2)$$

Dabei steht W für die maximale Wachstumsrate, 10/100 für die jeweilige Kaliumkonzentration in mM im Medium und $+M$ bzw. $-M$ für Methionin bzw. für kein Methionin im Medium.

3 Ergebnisse

Viele schwerwiegende Krankheiten sind auf Mutationen in K^+ -Kanal-Genen zurückzuführen. Darunter fallen verschiedene Formen von Herzrhythmusstörungen (LQT-Syndrome) wie zum Beispiel das Romano-Ward-Syndrom (RWS) oder das Jervell und Lange-Nielson Syndrom (JLNS), welche autosomal dominant bzw. autosomal rezessiv vererbt werden. Desweiteren ist bekannt, dass Nebenwirkungen einiger Medikamente auf die Beeinflussung der Funktionalität von K^+ -Kanälen zurückzuführen sind. Dieser Effekt kann ebenfalls schwerwiegende Folgen haben. Deswegen ist ein Testsystem für die verschiedenen Familien der K^+ -Kanäle sinnvoll, welches es ermöglicht einfach und schnell ganze „small molecule libraries“ zu „screenen“. Auf diese Weise könnten K^+ -Kanäle unkompliziert pharmakologisch untersucht werden und unerwünschte Nebenwirkungen verschiedenster Substanzen direkt erkannt werden.

Die Gene der zu analysierenden K^+ -Kanäle wurden entweder chromosomal oder episomal in Hefe exprimiert. Die hierfür notwendigen Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels der im Detail unter 2.3.2 beschriebenen Standardmethoden hergestellt. Die hergestellten Plasmide sind in Tabelle 7.2 aufgelistet, eine detaillierte Beschreibung der Konstruktionen findet sich in Abschnitt 7.3. Hefestämmen wurden mittels der unter 2.4.4 beschriebenen Methode transformiert, aufgelistet sind sie in Tabelle 2.1.2.1. Das Gen *GFP* („green fluorescent protein“) aus *Aequorea victoria* (Ward and Bokman, 1982; Prasher *et al.*, 1992; Kain *et al.*, 1995; Niedenthal *et al.*, 1996) bzw. die Variante „yeast enhanced GFP“ (*yEGFP*) (Cormack *et al.*, 1997) wurde mit den jeweiligen K^+ -Kanal-Untereinheiten fusioniert, um eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der Lokalisation des entsprechenden Fusionsproteins zu ermöglichen.

3.1 Expression von homomeren K^+ -Kanälen in Hefe

Als homomerer K^+ -Kanal sollte in Hefe der rEAG1-Kanal untersucht werden. rEAG1 ist ein K^+ -Kanal, der zu der großen Gruppe der Auswärts-Gleichrichter gehört. Bisher gab es in Hefe keine definierten Bedingungen für phänotypische Untersuchungen von auswärts-gleichrichtenden K^+ -Kanälen. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher geeignete Bedingungen für Untersuchungen an rEAG1 zu definieren.

Aus früheren Untersuchungen (Terlau *et al.*, 1997) ist bekannt, dass eine Deletion der Aminosäuren 2 bis 190 von rEAG1 zur Folge hat, dass der Kanal bereits bei einer im Vergleich

zum Wildtyp geringer depolarisierten, also stärker hyperpolarisierten, Membran öffnet. Diese *rEAG1*-Deletionmutante sollte in Hefe exprimiert werden, um K^+ -Kanäle bestehend aus *rEAG1* α -Untereinheiten untersuchen zu können.

3.1.1 Herstellung der *rEAG1* Δ 190 und *rEAG1* Δ 190/*yEGFP* exprimierenden Hefestämme

Die Konstruktion der für die Herstellung von *rEAG1* Δ 190 und *rEAG1* Δ 190/*yEGFP* exprimierenden Hefestämme notwendigen Plasmide ist unter 7.3.1 dargestellt. Nach Bestätigung der Korrektheit dieser Plasmide durch Kontrollrestriktionen, wurde PLY246 (siehe 2.1.2.1) mit diesen Plasmiden nach der unter 2.4.4 beschriebenen Methode transformiert. Die Beschreibung der Konstruktion aller weiteren hergestellten Plasmide ist ebenfalls unter 7.3 detailliert dargestellt.

3.1.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *rEAG1*/*yEGFP* bzw. *rEAG1* Δ 190/*yEGFP* exprimierenden Hefestämmen

Die Hefestämme PLY246 [pYEX-*rEAG1*/*yEGFP*] und PLY246 [pYEX-*rEAG1* Δ 190/*yEGFP*] wurden mit Hilfe der unter 2.5.3 beschriebenen Mikroskopietechniken und Apparaturen fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

In Abbildung 3.1 ist die Verteilung der Fluoreszenz von *rEAG1*/*yEGFP* bzw. von *rEAG1* Δ 190/*yEGFP* exprimierenden Hefezellen dargestellt. Bei beiden Stämmen lag eine ähnliche Verteilung der entsprechenden Fusionsproteine vor. Deutlich zu sehen ist eine intensive Fluoreszenz am Rand der Hefezellen; dies weist auf eine Lokalisierung der Proteine in der Plasmamembran hin.

3.1.3 Untersuchung von *rEAG1* und *rEAG1* Δ 190 exprimierenden *S. cerevisiae* Stämmen

Nachdem durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchung gezeigt wurde, dass *rEAG1*/*yEGFP* und *rEAG1* Δ 190/*yEGFP* sehr wahrscheinlich in der Plasmamembran lokalisiert waren, wurden Wachstumstests durchgeführt. Dafür wurde ein Hefestamm (PLY246) verwendet, bei dem die der Hefe eigenen K^+ -Translokationssysteme deletiert sind und dem somit ein Wachstum in

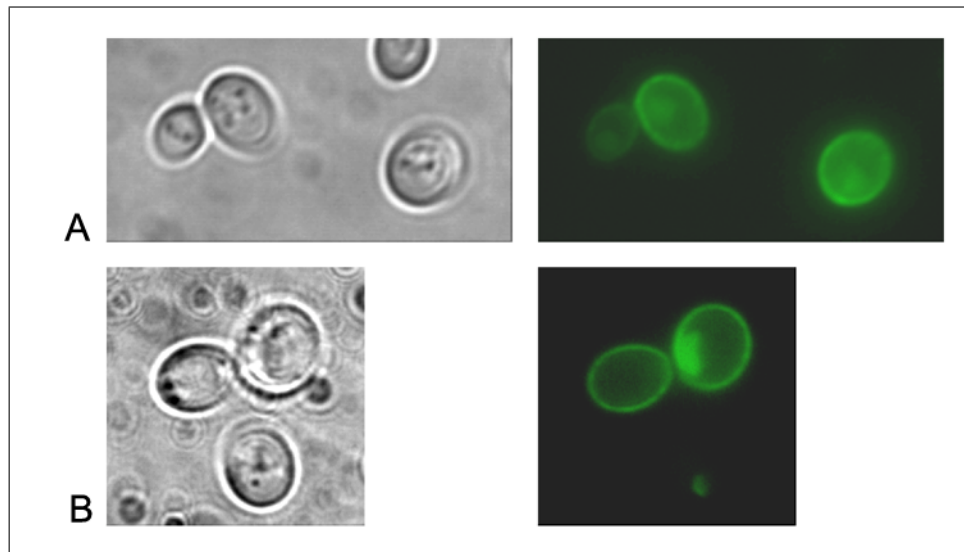


Abbildung 3.1: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *rEAG1/yEGFP* bzw. *rEAG1Δ190/yEGFP* exprimierenden Hefezellen. A: PLY246 [pYEX-*rEAG1/yEGFP*] B: PLY246 [pYEX-*rEAG1Δ190/yEGFP*]. Jeweils links sind die Durchlichtaufnahmen, rechts die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zu sehen (Anregungsfilter: 450 - 490 nm, Emissionsfilter: 515 - 565 nm).

Medium mit 10 mM KCl nicht mehr möglich ist. Mit Hilfe der unter [2.9.2](#) beschriebenen Wachstumstests wurde durch Verwendung von unterschiedlichen Konzentrationen an KCl (10 mM und 100 mM KCl) untersucht, inwieweit *rEAG1* und *rEAG1Δ190* exprimierende PLY246 Stämme den Wachstumsnachteil des PLY246-Stammes in Medium mit 10 mM KCl kompensieren können.

Das Wachstum der beiden Hefestämme PLY246 [pYEX-*rEAG1/yEGFP*] und PLY246 [pYEX-*rEAG1Δ190/yEGFP*] und der Kontrolle PLY246 [pYEX-*yEGFP*] wurde verglichen. In [Abbildung 3.2](#) sind die Ergebnisse der Wachstumstests der *yEGFP*, *rEAG1/yEGFP* bzw. *rEAG1Δ190/yEGFP* exprimierenden *S. cerevisiae* Stämme dargestellt; ausgewertet wurde wie unter [2.9.3](#) beschrieben. In [Abbildung 3.2 A](#) wurde die maximale Wachstumsrate (μ_{max} in 1/sec) aufgetragen, in [Abbildung 3.2 B](#) das Integral unter der Wachstumskurve (W_{int} in OD*sec). Die Wachstumsraten der drei Stämme in Medium mit 10 mM KCl unterschieden sich nicht. Die Integrale unter der Wachstumskurve zeigte dagegen Unterschiede. PLY246 [pYEX-*rEAG1Δ190/yEGFP*] zeigte das beste W_{int} , gefolgt von PLY246 [pYEX-*rEAG1/yEGFP*]. Das kleinste W_{int} hatte PLY246 [pYEX-*yEGFP*]. Diese unterschiedlichen Ergebnisse (in Abhängigkeit von der Auswertungsmethode) zeigten, dass durch die Präsenz von *rEAG1Δ190* zwar nicht

die maximale Wachstumsgeschwindigkeit erhöht werden konnte, aber dass die Zellen eine höhere OD erreichten, das heißt insgesamt ein besseres Wachstum aufwiesen. Dieselben Tests wurden mit Stämmen, die *rEAG1* bzw. *rEAG1Δ190* ohne yEGFP-Fusion exprimierten, durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse waren denen ohne GFP-Fusion sehr ähnlich. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde mit den Stämmen, welche die Fusionskonstrukte exprimierten, weitergearbeitet. Diese Stämme konnten fluoreszenzmikroskopisch unkompliziert auf Lokalisation und Expressionsniveau des yEGFP-Fusionsproteins kontrolliert werden.

3.1.4 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *rEAG1Δ190*-Mutanten in Hefe

Das bessere Wachstum des *rEAG1Δ190* exprimierenden Stammes sollte weiter untersucht werden.

Der EAG1-Kanal wird durch intrazelluläres Calcium inhibiert, indem dieses über Calmodulin an EAG bindet. Diese Inhibierung könnte ein Grund für den nur relativ geringen Wachstumsvorteil sein. Calmodulin bindet an eine C-terminale Domäne der EAG-Untereinheiten (Schönherr *et al.*, 2000) und inhibiert die Aktivierung von EAG-Kanälen halbmaximal bei Ca^{2+} -Konzentrationen von 100 nM (Stansfeld *et al.*, 1996). Diese mögliche Inhibierung sollte verhindert werden, indem *rEAG1Δ190/yEGFP*-Mutationen hergestellt wurden, in denen die potentiellen Calmodulin-Bindestellen mutiert waren, um so die Calcium-Sensitivität zu reduzieren.

Hergestellt wurden *rEAG1Δ190*-Mutanten, welche im C-Terminus im Bereich der potentiellen Calmodulin-Bindestelle eine Doppel- ([F714S, F717S] (*rEAG1Δ190 FS/yEGFP*)) bzw. Vierfach-Mutation ([R711Q, R712Q, R716Q, R718Q] (*rEAG1Δ190 RQ/yEGFP*)) haben. Die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von *rEAG1Δ190 FS/yEGFP* und *rEAG1Δ190 RQ/yEGFP* sind in Abbildung 3.3 dargestellt. Weder *rEAG1Δ190 FS/yEGFP* noch *rEAG1Δ190 RQ/yEGFP* schienen in der Plasmamembran lokalisiert zu sein. Daher war kein Wachstumsvorteil in Medium mit 10 mM KCl zu erwarten. Da aber auch nicht auszuschließen war, dass nicht doch einzelne Kanäle in der Plasmamembran lokalisiert sind, wurden Wachstumstests durchgeführt. Dabei konnte jedoch kein Wachstumsvorteil der *rEAG1Δ190 FS/yEGFP* und *rEAG1Δ190 RQ/yEGFP* exprimierenden Stämme gegenüber dem *rEAG1Δ190/yEGFP* exprimierendem Stamm in Medium mit 10 mM KCl festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Somit

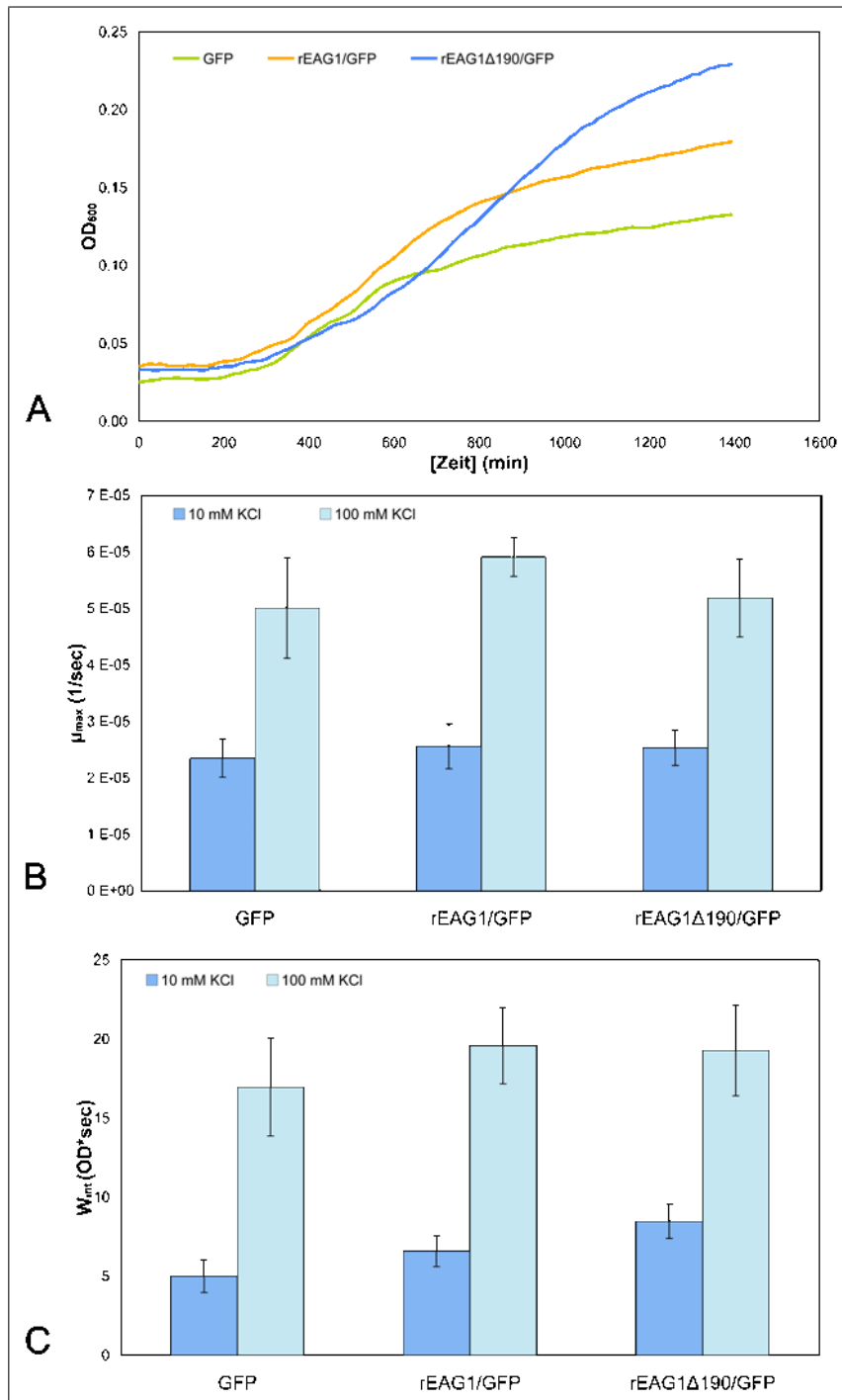


Abbildung 3.2: Wachstum von *yEGFP*, *rEAG1/yEGFP* bzw. *rEAG1Δ190/yEGFP* exprimierenden Hefestämmen. In **A** sind die Wachstumskurven der getesteten Stämme gewachsen in Medium mit 10 mM KCl dargestellt. In **B** sind die maximalen Wachstumsraten (μ_{max} in 1/sec) der getesteten Stämme in 10 bzw. 100 mM KCl enthaltendem Medium gezeigt. In **C** ist entsprechend das Integral unter der Wachstumskurve (W_{int} in OD*sec) dargestellt. Untersucht wurden die Stämme PLY246 [pYEX-yEGFP] (GFP), PLY246 [pYEX-rEAG1/yEGFP] (rEAG1/GFP) und PLY246 [pYEX-rEAG1Δ190/yEGFP] (rEAG1Δ190/GFP). In **B** und **C** ist der Mittelwert von 24 Replikaten aus acht Versuchen dargestellt, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

haben die Calmodulin-Mutanten exprimierenden Stämme keinen weiteren Wachstumsvorteil gegenüber dem *rEAG1Δ190/yEGFP* exprimierendem Stamm in Medium mit 10 mM KCl.

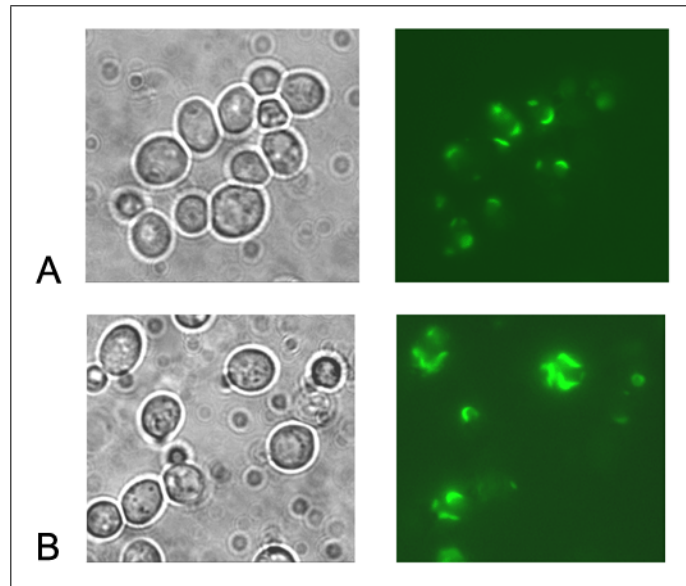


Abbildung 3.3: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Hefestämme PLY246 [pYEX-rEAG1Δ190 FS/yEGFP] bzw. PLY246 [pYEX-rEAG1Δ190 FS/yEGFP]. Die linke Spalte zeigt Durchlichtaufnahmen, in der rechten Spalte sind GFP-Fluoreszenzaufnahmen dargestellt (λ_{Ex} : 450 - 490 nm, λ_{Em} : 515 - 565 nm). **A:** PLY246 [pYEX-rEAG1Δ190 FS/yEGFP] **B:** PLY246 [pYEX-rEAG1Δ190 RQ/yEGFP]

3.2 Untersuchung von heteromeren K⁺-Kanälen durch Expression der α -Untereinheiten *hKCNQ2* und *hKCNQ3* in *S. cerevisiae*

Es sollte ein Hefestamm untersucht werden, der K⁺-Kanalgene, die für einen aus zwei verschiedenen α -Untereinheiten bestehenden heteromeren Kanal kodieren, exprimiert. Es wurde mit den Genen *hKCNQ2* und *hKCNQ3*, die den sogenannten „M-current“ vermittelnden Kanal kodieren (Wang *et al.*, 1998; Cooper *et al.*, 2000; Rogawski, 2000), gearbeitet. Diese beiden Gene sind auch klinisch relevant, da sowohl Mutationen von *hKCNQ2* als auch *hKCNQ3* z. B. zu „benign neonatal familial convulsions“ (BFNC), einer speziellen Form der Epilepsie, führen können (Biervert *et al.*, 1998; Schroeder *et al.*, 1998; del Giudice *et al.*, 2000; Dedek *et al.*, 2001; Castaldo *et al.*, 2002).

3.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der *hKCNQ2* und/oder *hKCNQ3* exprimierenden Stämme

Es wurden Hefestämme hergestellt, die entweder einzeln *hKCNQ2/yEGFP* bzw. *hKCNQ3/yEGFP* oder *hKCNQ3* und *hKCNQ2/yEGFP* zusammen exprimierten. In den Hefestämmen (PLY246 [pYEX-*hKCNQ2*/ yEGFP] und PLY246 [pYEX-*hKCNQ3*/yEGFP]) wurde die Verteilung der *hKCNQ2/yEGFP* bzw. *hKCNQ3/yEGFP* Fluoreszenz untersucht. Es war eine punktförmige Verteilung der Fluoreszenz zu sehen, die sich vor allem bei *hKCNQ2/yEGFP* in der Nähe der Plasmamembran befand (Abb. 3.4 A). In Abbildung 3.4 B ist zu erkennen, dass *hKCNQ3/yEGFP* ebenfalls punktförmig verteilt war, jedoch nicht ausschließlich nahe der Plasmamembran lokalisiert war.

Es wurde ebenfalls untersucht, inwiefern sich die Verteilung der Fluoreszenz von *hKCNQ2/yEGFP* verändert, wenn *hKCNQ2/yEGFP* in einem Stamm exprimiert wurde, der bereits ein in das Hefegenom integriertes *hKCNQ3*-Gen enthielt. Die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung dieses Stammes (PLY246 tok::*hKCNQ3* [pYEX-*hKCNQ2*/yEGFP]) sind in Abbildung 3.4 C gezeigt. Auch in diesem Fall war eine punktförmige Verteilung der Fluoreszenz hauptsächlich in der Nähe der Plasmamembran zu sehen. Wie in Abbildungen 3.4 A und C zu sehen ist, ergibt ein Vergleich der Fluoreszenz zwischen dem *hKCNQ2/yEGFP* allein exprimierenden Stamm und der Fluoreszenz des *hKCNQ3* und *hKCNQ2/yEGFP* exprimierenden Stammes keine deutlichen Unterschiede.

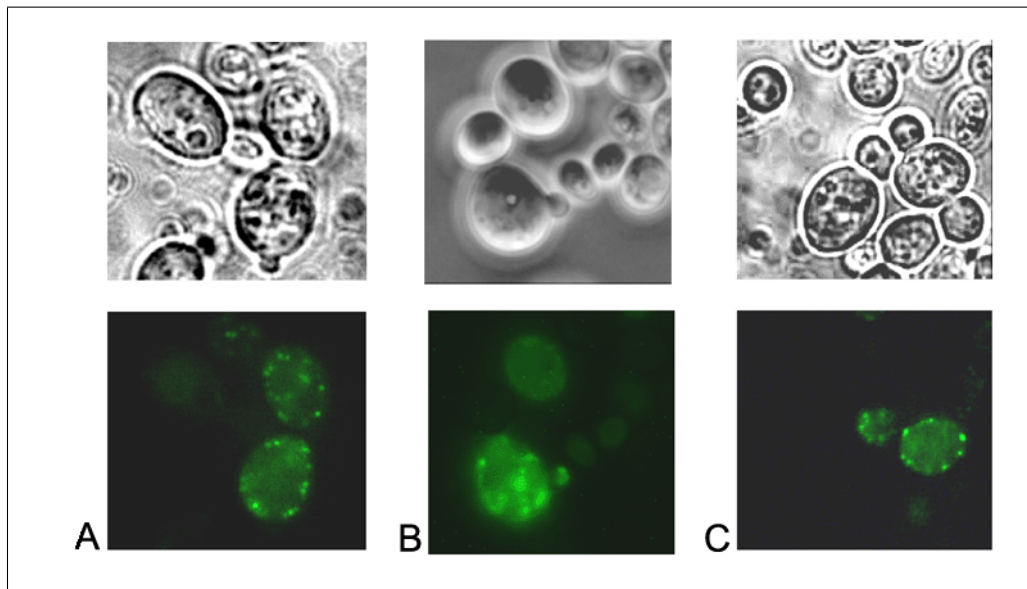


Abbildung 3.4: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der zellulären Lokalisation von hKCNQ2/yEGFP bzw. hKCNQ3/yEGFP in Hefe. A: PLY246 [pYEX-hKCNQ2/yEGFP]; **B:** PLY246 [pYEX-hKCNQ3/yEGFP]; **C:** PLY246 tok::hKCNQ3 [pYEX-hKCNQ2/yEGFP]. Die oberen Bilder zeigen die jeweilige Durchlichtaufnahme. Die unteren Bilder zeigen die GFP-Fluoreszenzaufnahmen (λ_{Ex} : 450 - 490 nm, λ_{Em} : 515 - 565 nm).

3.2.2 Untersuchung der Expression von *hKCNQ2* und *hKCNQ3* in *S. cerevisiae*

Durch „Northern Blot“ Analyse (2.7.11) wurde die Transkription von *hKCNQ2* und *hKCNQ3* in PLY246 [pYEX-hKCNQ2/yEGFP], PLY246[pYEX-yEGFP], PLY246 [pYEX-hKCNQ3/yEGFP], PLY246 tok::hKCNQ3 und PLY246 tok::KCNQ3 [pYEX-hKCNQ2/ yEGFP] untersucht. Es wurde per PCR (2.8.4, verwendetes Primerpaar #31 - #51), ein 818 bp großes Digoxigenin-markiertes Fragment (entspricht 1-813 der *hKCNQ2*-CDS) amplifiziert, welches als Sonde eingesetzt wurde, um *hKCNQ2*-RNA nachzuweisen. Die Transkription von *hKCNQ3* wurde mit einem „Northern Blot“ nachgewiesen, bei dem ein durch PCR amplifiziertes DIG-markiertes 613 bp großes Fragment denaturiert als Sonde verwendet wurde (verwendetes Primerpaar: #38 - #52, entspricht 2015 - 2618 *hKCNQ3*-CDS).

In der RNA der Stämme PLY246 [pYEX-hKCNQ2/yEGFP] und PLY246 tok::KCNQ3 [pYEX-hKCNQ2/yEGFP] konnte mittels der *hKCNQ2* spezifischen Sonde *hKCNQ2*-RNA nachgewiesen werden. In den Spuren, die RNA der Stämme PLY246[pYEX-yEGFP], PLY246 [pYEX-

hKCNQ3/yEGFP] und PLY246 tok::*hKCNQ3* enthielten, wurde kein Hybridisierungssignal festgestellt (Abb. 3.5 A). Wurde dagegen ein Blot mit RNA derselben Stämme mit der *hKCNQ3* spezifischen Sonde hybridisiert, konnte *hKCNQ3*-Transkription in den Stämmen PLY246 tok::*KCNQ3* [pYEX-*hKCNQ2/yEGFP*], PLY246 [pYEX-*hKCNQ3/yEGFP*] und PLY246 tok::*hKCNQ3* nachgewiesen werden (Abb. 3.5 B). Insgesamt wurde somit die Transkription von *hKCNQ2* und *hKCNQ3* in allen mit dem jeweiligen Konstrukt transformierten Stämmen nachgewiesen. Insbesondere wurde gezeigt, dass der Stamm PLY246 tok::*KCNQ3* [pYEX-*hKCNQ2/yEGFP*] sowohl *hKCNQ2* als auch *hKCNQ3* exprimiert.

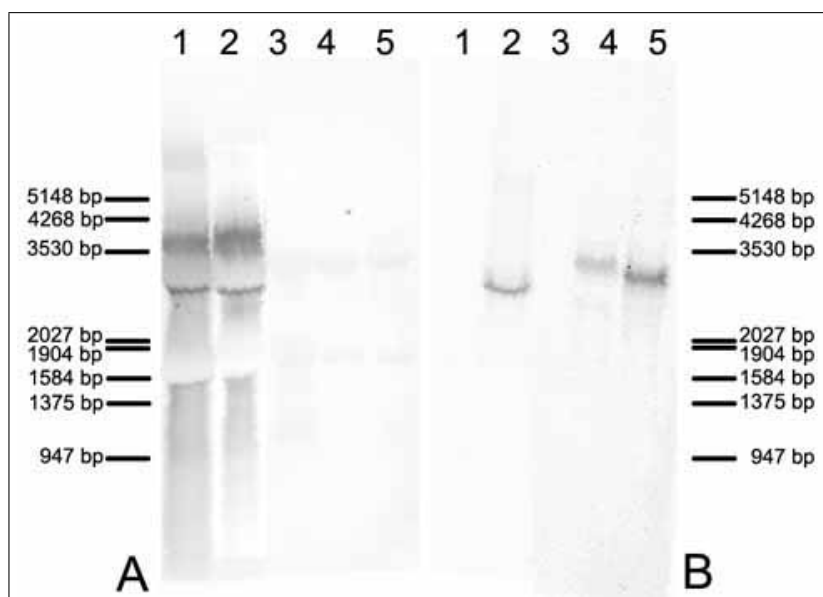


Abbildung 3.5: Untersuchung der Transkription von *hKCNQ2* und *hKCNQ3*. Getestet wurden die Stämme PLY246 [pYEX-*hKCNQ2/yEGFP*] (1), PLY246 tok::*hKCNQ3* [pYEX-*hKCNQ2/yEGFP*] (2), PLY246 [pYEX-*yEGFP*] (3), PLY246 [pYEX-*hKCNQ3/yEGFP*] (4) und PLY246 tok::*hKCNQ3* (5). In **A** ist eine Membran gezeigt, die mit einer *hKCNQ2*-spezifischen Sonde hybridisiert wurde, in **B** ist eine Membran abgebildet, die mit einer *hKCNQ3*-spezifischen Sonde hybridisiert wurde. Die Positionen des Längenmarkers sind durch waagerechte Striche markiert und entsprechend beschriftet.

Diese *hKCNQ2/yEGFP*, *hKCNQ3/yEGFP* als auch *hKCNQ3* und *hKCNQ2/yEGFP* exprimierenden Hefestämme wurden mit Wachstumstest in Medien mit 10 mM und 100 mM KCl untersucht. Keiner der getesteten Stämme zeigte in Medium mit 10 mM KCl einen Wachstumsvorteil gegenüber dem *yEGFP* exprimierendem Stamm (Daten nicht gezeigt).

3.3 Untersuchung von heteromeren aus α - und β -Untereinheiten zusammengesetzten K^+ -Kanälen: Expression von *hKCNQ1* und *hKCNE3* in *S. cerevisiae*

Es sollte ein heteromerer K^+ -Kanal, bestehend aus *hKCNQ1* α -Untereinheiten und *hKCNE3* β -Untereinheiten, in Hefe untersucht werden, da bekannt war, dass ein aus *KCNQ1* und *KCNE3* bestehender heteromerer K^+ -Kanal in *Xenopus*-Oocyten einen konstitutiv offenen Kanal bildet (Schroeder *et al.*, 2000b). Demnach könnten diese Kanäle in Hefezellen K^+ -Aufnahme vermitteln und somit den Wachstumsdefekt von PLY246 in Medium mit 10 mM KCl komplementieren.

3.3.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *hKCNQ1* und *hKCNE3* einzeln bzw. zusammen exprimierenden Hefestämmen

Um die zelluläre Lokalisation der entsprechenden K^+ -Untereinheiten in Hefe zu untersuchen, wurden zunächst Hefestämme konstruiert, welche die Fusionsgene *hKCNQ1/yEGFP* bzw. *hKCNE3/yEGFP* allein exprimierten, und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Der Stamm, welcher *hKCNQ1/yEGFP* exprimierte, zeigte eine vergleichsweise schwache, im Cytoplasma verteilte Fluoreszenz (Abb. 3.6 A). Diese unterschied sich deutlich von der Verteilung der *hKCNE3/yEGFP* Fluoreszenz; hier war eine fluoreszierende ringförmige Struktur in den Hefezellen sichtbar. Zudem war *hKCNE3/yEGFP* Fluoreszenz in einem nicht durchgehenden Bereich nahe der Plasmamembran erkennbar (Abb. 3.6 B).

Als *hKCNQ1* und *hKCNE3* koexprimierende Stämme wurden PLY246 tok::*hKCNQ1* [pYEX-*hKCNE3/yEGFP*] und PLY246 tok::*hKCNE3* [pYEX-*hKCNQ1/yEGFP*] konstruiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Im Stamm PLY246 tok::*hKCNQ1* [pYEX-*hKCNE3/yEGFP*], welcher chromosomal *hKCNQ1* sowie episomal *hKCNE3/yEGFP* exprimierte, war innerhalb der Zelle eine sehr intensiv fluoreszierende Ringstruktur vorhanden. Am äußeren Rand der Zelle war zusätzlich eine schwache, teilweise unterbrochene fluoreszierende Struktur erkennbar (Abb. 3.7 A). Bei dem Stamm PLY246 tok::*hKCNE3* [pYEX-*hKCNQ1/yEGFP*], der chromosomal *hKCNE3* und episomal *hKCNQ1/yEGFP* exprimierte, war eine gleichmäßige cytoplasmatisch verteilte Fluoreszenz erkennbar (Abb. 3.7 B).

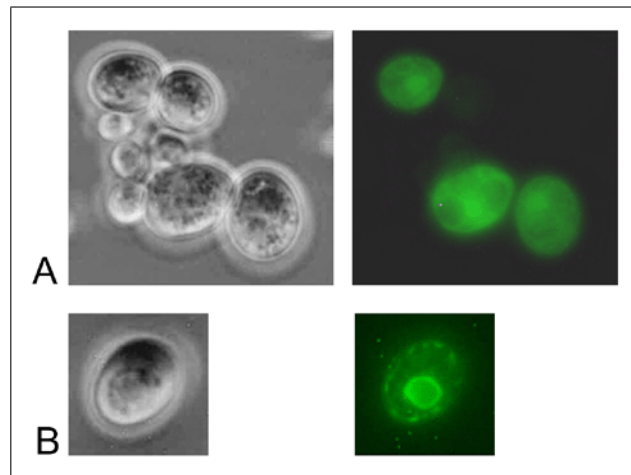


Abbildung 3.6: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Hefestämme PLY246 [pYEX-hKCNE3/yEGFP] und PLY246 [pYEX-hKCNE3/yEGFP]. In **A** ist links die Durchlichtaufnahme und rechts die Fluoreszenzaufnahme von Zellen des Stammes PLY246 [pYEX-hKCNE3/yEGFP] dargestellt. In **B** ist links die Durchlichtaufnahme und rechts die Fluoreszenzaufnahme von Zellen des Stammes PLY246 [pYEX-hKCNE3/yEGFP] dargestellt (λ_{Ex} : 450 - 490 nm, λ_{Em} : 515 - 565 nm).

3.3.2 Identifizierung eines ER-Retentionssignals

Das Fusionsprotein hKCNE3/yEGFP war wahrscheinlich im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Abb. 3.6). Deshalb wurde untersucht, ob hKCNE3 eine Sequenz enthält, die als ER-Retentionssignal in *S. cerevisiae* erkannt werden kann und verhindert, dass das Protein zur Plasmamembran gelangt. Die Suche nach bekannten ER-Retentionssignalen wie z. B. RKR, [HK]DEL oder KKXX ergab, dass sich im C-Terminus innerhalb der hKCNE3 Sequenz unmittelbar „hinter“ der Transmembrandomäne die Aminosäureabfolge RSR befindet. Durch Analyse von *in vitro* hergestellten Mutanten wurde untersucht, ob RSR als ER-Retentionssignal in *S. cerevisiae* fungiert.

Zum einen wurde eine hKCNE3 Doppelmutante [R81A, R83A] hergestellt, zum anderen wurden die Aminosäuren 81 bis 103 von hKCNE3 deletiert. Die hKCNE3 Deletionsvariante wird im folgenden hKCNE3 Δ C genannt, die hKCNE3 Doppelmutante hKCNE3 ASA. Es wurden Hefestämme hergestellt, die hKCNE3 Δ C bzw. hKCNE3 ASA fusioniert mit yEGFP exprimierten. Zunächst wurden die Stämme PLY246 [pYEX-yEGFP/hKCNE3], PLY246 [pYEX-yEGFP/hKCNE3 ASA] und PLY246 [pYEX-yEGFP/hKCNE3 Δ C] fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 3.8). yEGFP/hKCNE3 exprimierende Zellen zeigten eine ähnliche Fluoreszenzverteilung wie hKCNE3/yEGFP. Zwei ringförmig fluoreszierende Strukturen: eine kleine innerhalb der Zelle

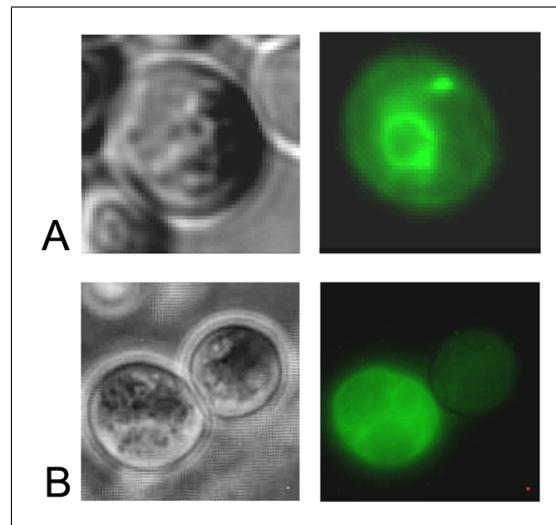


Abbildung 3.7: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung *hKCNQ1/yEGFP* und *hKCNE3/yEGFP* exprimierender Hefestämme. In **A** ist links die Durchlichtaufnahmen und rechts die Fluoreszenzaufnahmen von Zellen des Stammes PLY246 tok::hKCNQ1 [pYEX-hKCNE3/yEGFP] gezeigt. In **B** ist links die Durchlichtaufnahme und rechts die Fluoreszenzaufnahme von Zellen des Stammes PLY246 tok::hKCNE3 [pYEX-hKCNQ1/yEGFP] gezeigt (λ_{Ex} : 450 - 490 nm, λ_{Em} : 515 - 565 nm).

und eine weitere unterbrochene am Rand der Zelle. Die Fluoreszenzverteilung der *yEGFP/hKCNE3* ASA exprimierenden Zellen zeigte ein durchgehende randständige Fluoreszenz und eine weitere Akkumulation von Fusionsproteinen in einem Bereich innerhalb der Zelle. Die *yEGFP/hKCNE3 Δ C* exprimierenden Zellen zeigten eine durchgehende randständige Fluoreszenz.

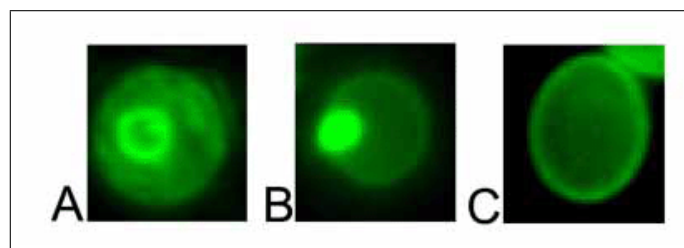


Abbildung 3.8: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von *yEGFP/hKCNE3*-Varianten exprimierender Hefezellen. Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (λ_{Ex} : 450 - 490 nm, λ_{Em} : 515 - 565 nm). **A:** PLY246 [pYEX-yEGFP/hKCNE3] **B:** PLY246 [pYEX-yEGFP/hKCNE3 ASA] **C:** PLY246 [pYEX-yEGFP/hKCNE3 Δ C]

3.3.3 Untersuchung der Expression von *hKCNQ1* und *hKCNE3* in *S. cerevisiae*

Da in dem *hKCNQ1* und *hKCNE3* koexprimierenden Stämmen jeweils nur die Expression eines Fusionsproteins fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen wurde, sollte die Transkription von *hKCNQ1* und *hKCNE3* mit Hilfe von „Northern Blots“ gezeigt werden. Ein *hKCNQ1*-spezifisches Digoxigenin-markiertes Fragment wurde mit dem Primerpaar #48 - #49 amplifiziert. Die so erhaltene 350 Basen lange Sonde entsprach den Basen 1677 bis 2027 der *hKCNQ1*-CDS. Ein Digoxigenin-markierte *hKCNE3* Fragment wurde mit den Primern #42 - #43 amplifiziert (322 bp, entspricht der *hKCNE3*-CDS + elf weiteren „Primer-Nukleotiden“).

Das Ergebnis dieser Hybridisierungen (Abb. 3.9 A) wies die Transkription von *hKCNQ1* in den Stämmen PLY246 tok::*hKCNQ1* und PLY246 tok::*hKCNQ1* [pYEX-*hKCNE3*/yEGFP] nach. Ein *hKCNE3* spezifisches Signal wurde in der RNA des Stammes PLY246 tok::*hKCNQ1* [pYEX-*hKCNE3*/yEGFP], nicht aber in der RNA aus PLY246 tok::*hKCNQ1* nachgewiesen. Somit konnte die Transkription von *hKCNQ1* und *hKCNE3* im Stamm PLY246 tok::*hKCNQ1* [pYEX-*hKCNE3*/ yEGFP] nachgewiesen werden. Analog wurde gezeigt, dass im Stamm PLY246 tok::*hKCNQ1* [pYEX-*hKCNE3*] sowohl *hKCNQ1* als auch *hKCNE3* transkribiert wurden (nicht gezeigt).

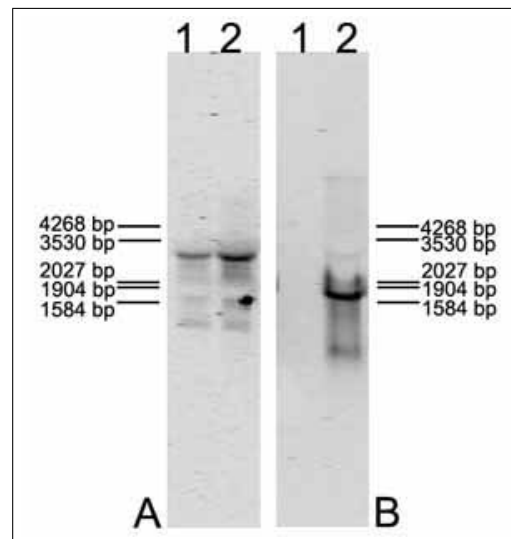


Abbildung 3.9: Untersuchung der Transkription von *hKCNQ1* und *hKCNE3*. Getestet wurde die RNA der Stämme PLY246 tok::*hKCNQ1* (**1**) und PLY246 tok::*hKCNQ1* [pYEX-*hKCNE3*/yEGFP] (**2**). **A** zeigt den „Northern Blot“, der mit einer 350 Basen langen *hKCNQ1*-spezifischen Sonde hybridisiert wurde. **B** zeigt einen entsprechenden „Blot“ nach Hybridisierung der Membran mit einer 322 Basen langen *hKCNE3* spezifischen Sonde.

3.3.4 Untersuchung des Wachstums von *hKCNQ1*- und/oder *hKCNE3* exprimierenden *S. cerevisiae* Stämmen

Nachdem durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchung und „Northern Blots“ gezeigt werden konnte, dass entsprechend transformierte Zellen *hKCNQ1* und/oder *hKCNE3* exprimieren, wurden Wachstumstests in Medien mit unterschiedlichen KCl Konzentrationen durchgeführt. Es sollte geklärt werden, ob aus *hKCNQ1*- und *hKCNE3*-Untereinheiten bestehende Kanäle in Hefezellen K^+ -Aufnahme vermitteln und somit den Wachstumsdefekt von PLY246 in Medium mit 10 mM KCl komplementieren können. Untersucht wurde das Wachstum der Stämme PLY246 tok::*hKCNQ1*, PLY246 [pYEX-*hKCNE3*/yEGFP], PLY246 [pYEX-yEGFP], PLY246 tok::*hKCNQ1* [pYEX-*hKCNE3*/yEGFP] und PLY246 tok::*hKCNQ1* [pYEX-*hKCNE3*] (Abb. 3.10). Es wurde die maximale Wachstumsrate (μ_{max}) sowie das Integral unter der Wachstumskurve (W_{int}) bestimmt. Die Ergebnisse ergaben jedoch keinen Hinweis auf einen Wachstumsvorteil der *hKCNQ1* und *hKCNE3* koexprimierenden Zellen in Medium mit 10 mM KCl. Weder PLY246 tok::*hKCNQ1* [pYEX-*hKCNE3*/yEGFP] noch PLY246 tok::*hKCNQ1* [pYEX-*hKCNE3*] wuchsen in Medium mit 10 mM KCl besser als die übrigen Stämme.

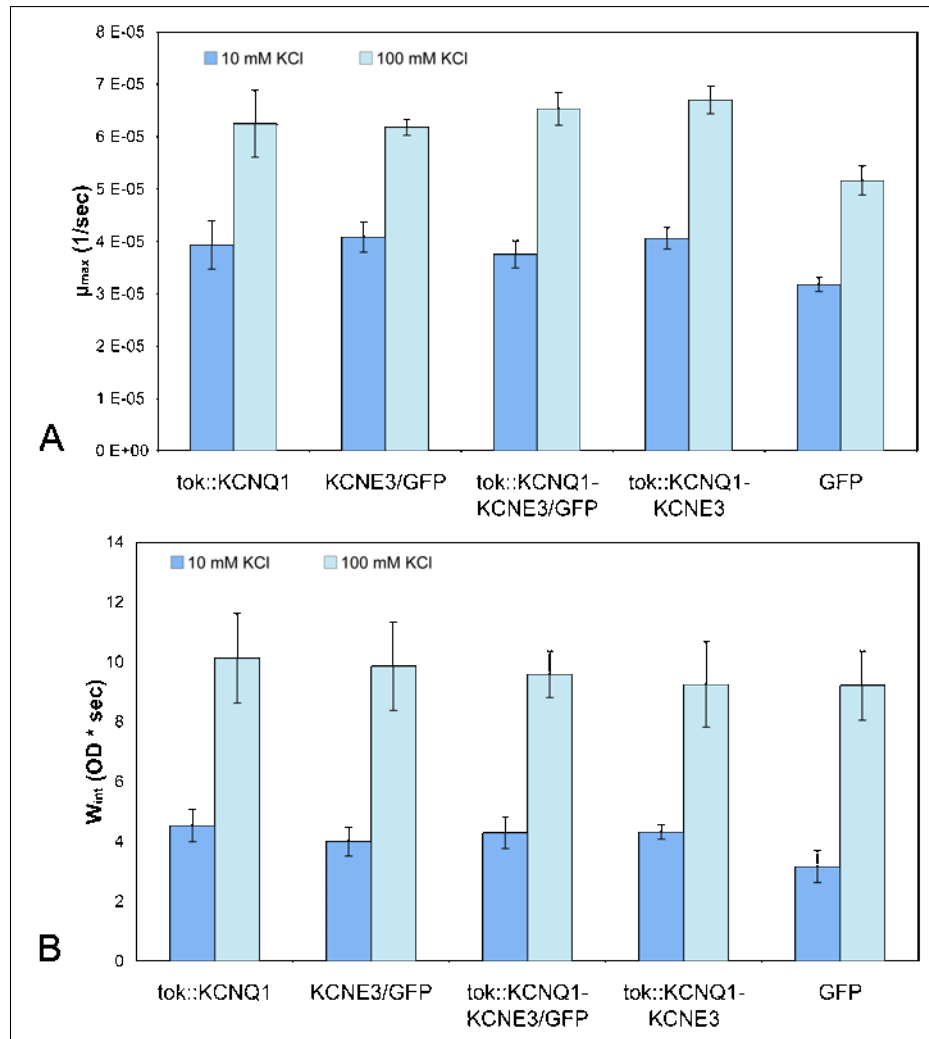


Abbildung 3.10: Wachstum von *hKCNQ1* und/oder *hKCNE3* exprimierenden Hefestämmen. In **A** ist die maximale Wachstumsrate (μ_{max}), in **B** das Integral unter der Wachstumskurve (W_{int}) aufgetragen. Dargestellt ist das Wachstum der Stämme PLY246 tok::hKCNQ1 (tok::hKCNQ1), PLY246 [pYEX-hKCNE3/yEGFP] (KCNE3/GFP), PLY246 tok::hKCNQ1 [pYEX-hKCNE3/yEGFP] (tok::hKCNQ1-KCNE3/GFP), PLY246 tok::hKCNQ1 [pYEX-hKCNE3] (tok::hKCNQ1-hKCNE3) und PLY246 [pYEX-yEGFP] (GFP). Das Wachstum wurde jeweils in Medien mit 10 mM KCl und 100 mM KCl bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus neun Replikaten aus drei Versuchen über einen Zeitraum von 15 h. Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

3.4 Expression klinisch relevanter *Kir2.1*-Mutanten in *S. cerevisiae*

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, in *S. cerevisiae* klinisch relevante Mutanten des *Kir2.1*-Kanal Gens zu exprimieren, die das Andersen-Syndrom verursachen. Es wurden die vier *Kir2.1* Mutanten [*R67W*], [*D71V*], [*S136F*] und [*G144S*] konstruiert und in Hefe untersucht.

3.4.1 Untersuchung der zellulären Lokalisation von *yEGFP/mKir2.1*-Varianten in Hefe

Es wurden die Hefestämme PLY246 [pYEX-GFP/*mKir2.1*], PLY246 [pYEX-*yEGFP/mKir2.1* [*R67W*]], PLY246 [pYEX-*yEGFP/mKir2.1* [*D71V*]], PLY246 [pYEX-*yEGFP/mKir2.1* [*S136F*]] und PLY246 [pYEX-*yEGFP/mKir2.1* [*G144S*]] hergestellt und anschließend die Lokalisation der jeweiligen Fusionsproteine fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Die Fluoreszenz des *yEGFP/mKir2.1* exprimierenden Stammes befand sich größtenteils in einem ringförmigen Bereich innerhalb der Zelle als auch an der Zellperipherie. Zwischen diesen beiden Strukturen waren immer wieder kleine fluoreszierende Bereiche sichtbar. Das *yEGFP/mKir2.1* Fusionsprotein scheint, wenn überhaupt, nur zu einem geringen Teil in der Plasmamembran lokalisiert zu sein. Festzuhalten ist, dass eine ähnliche Verteilung der Fluoreszenz in den *yEGFP/mKir2.1*-Mutanten exprimierenden Zellen wie in den Wildtyp *yEGFP/mKir2.1* exprimierenden Zellen vorlag (Abb. 3.11).

Eine genauere Untersuchung der Lokalisation von *yEGFP/mKir2.1* sollte durch Kollokalisationsversuche stattfinden. Als „ER-Marker-Gen“ wurde monomeres „red fluorescent protein“ (mRFP, Campbell *et al.* (2002)) N-terminal mit einer Signalsequenz und C-terminal mit dem ER-Retentionssignal HDEL (Pelham, 1995) fusioniert (*sig/mRFP/HDEL*, Abb. 3.12).

Anschließend wurde ein Hefestamm hergestellt, der chromosomal *sig/mRFP/HDEL* und episodisch *GFP/mKir2.1* exprimierte. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen dieses Stammes ergaben nach Überlagerung der Einzelkanalbilder gelbliche Fluoreszenz. Das bedeutet, dass ein Großteil der *yEGFP/mKir2.1* Fusionsproteine im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert waren (Abb. 3.13).

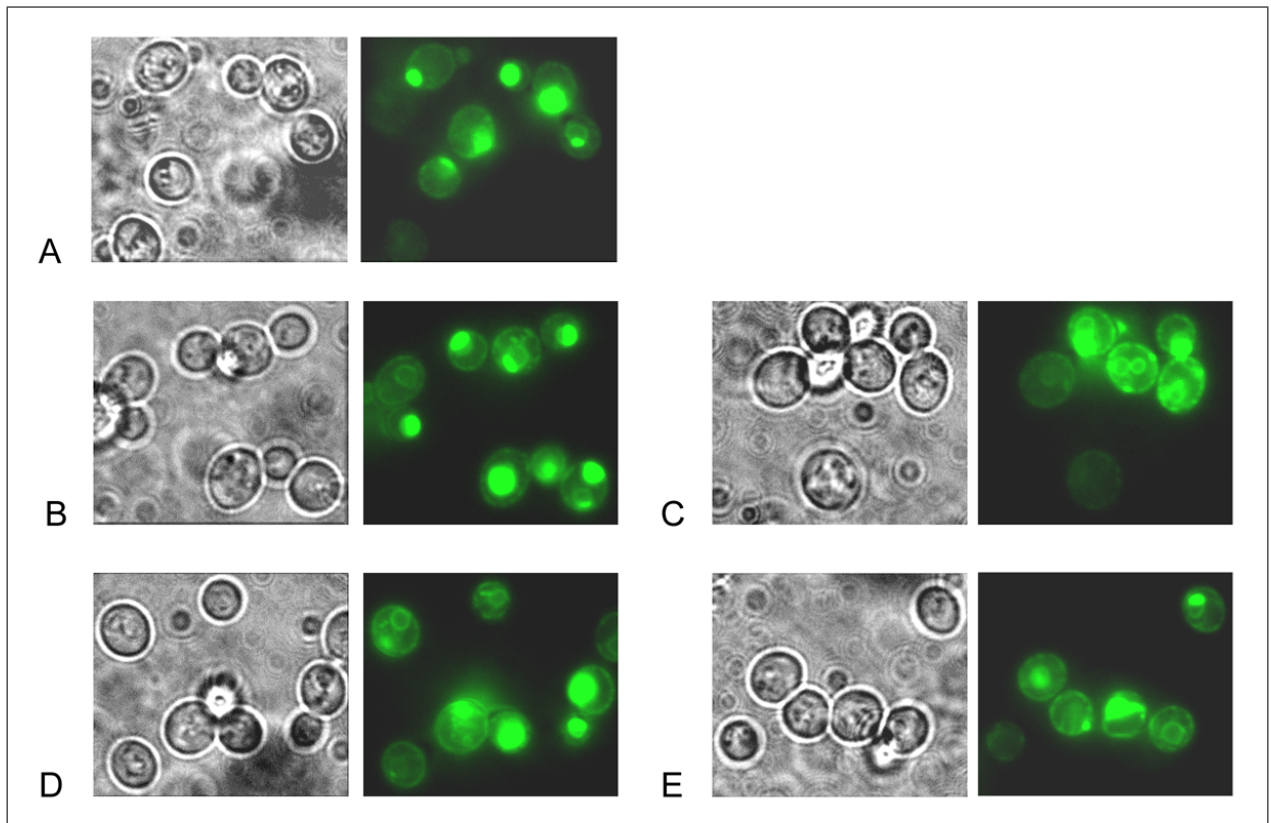


Abbildung 3.11: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der *yEGFP/mKir2.1* und mutiertes *yEGFP/mKir2.1* exprimierenden Hefestämme. A: PLY246 [pYEX-*yEGFP/mKir2.1*] (Kontrolle) **B:** PLY246 [pYEX-*yEGFP/mKir2.1* [R67W]] **C:** PLY246 [pYEX-*yEGFP/mKir2.1* [D71V]] **D:** PLY246 [pYEX-*yEGFP/mKir2.1* [S136F]] **E:** PLY246 [pYEX-*yEGFP/mKir2.1* [G144S]]. Links ist jeweils die Durchlichtaufnahme, rechts die Fluoreszenzaufnahme abgebildet (λ_{Ex} : 450 - 490 nm, λ_{Em} : 515 - 565 nm).

3.4.2 Wachstumstests mit *yEGFP/mKir2.1* bzw. mutiertes *yEGFP/mKir2.1* exprimierenden Hefestämmen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die untersuchten Kir2.1-Mutationen keinen Einfluss auf die Verteilung haben, wurde das Wachstum der jeweiligen Hefestämme untersucht. In Abbildung 3.14 sind Wachstumskurven des *yEGFP/mKir2.1* exprimierenden Stammes und (beispielhaft für eine *yEGFP/mKir2.1*-Mutante) die Wachstumskurven des Stammes PLY246 [pYEX-*yEGFP/mKir2.1*[R67W]] sowie des nur *yEGFP* exprimierenden Kontrollstammes in Medien mit 10 mM bzw. 100 mM KCl dargestellt. In Medium mit 100 mM KCl wuchsen alle drei Stämme ähnlich gut. In Medium mit 10 mM KCl hingegen wuchsen der *yEGFP/mKir2.1* [R67W] exprimierende Stamm und der *yEGFP* exprimierende Kontrollstamm deutlich schlechter als der *yEGFP/mKir2.1* exprimierende Stamm.

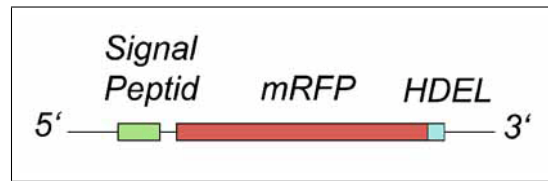


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung von *sig/mRFP/HDEL*. Schematisch dargestellt ist in rot *mRFP*, N-terminal von *mRFP* liegt die Signalsequenz (grün) und C-terminal von *mRFP* liegt der HDEL kodierende Bereich (blau).

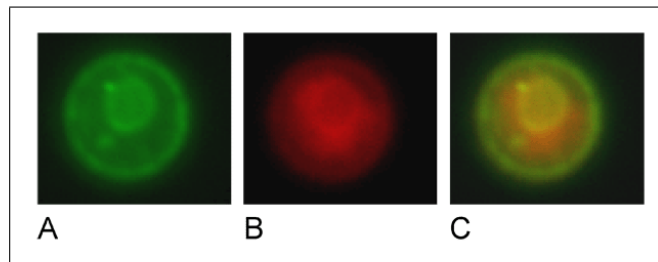


Abbildung 3.13: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Lokalisation von GFP/mKir2.1 in Hefezellen. Untersucht wurde der Stamm PLY240 tok::*sig/mRFP/HDEL* [pYEX-GFP/mKir2.1] **A:** GFP-Anregung **B:** RFP-Anregung **C:** Überlagerung der beiden Bilder nach GFP- bzw. RFP-Anregung.

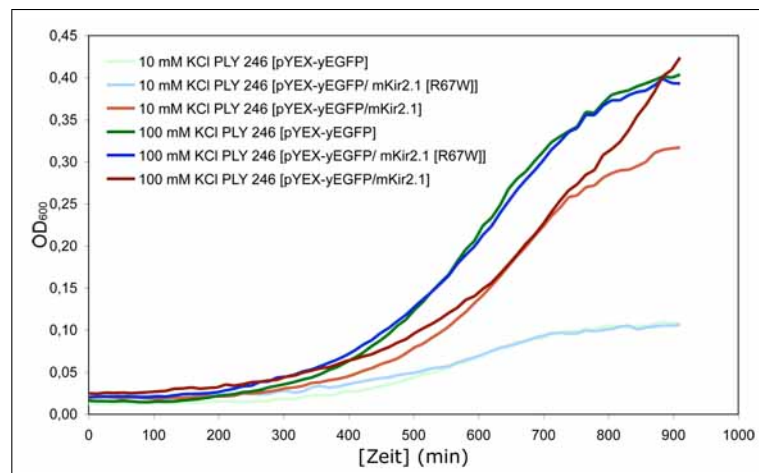


Abbildung 3.14: Wachstum von *yEGFP*, *yEGFP/mKir2.1* bzw. *yEGFP/mKir2.1 [R67W]* exprimierenden Hefestämmen. Die Wachstumskurven der Stämme PLY246 [pYEX-yEGFP] (Negativkontrolle, grün), PLY246 [pYEX-yEGFP/mKir2.1] (rot) und PLY246 [pYEX-yEGFP/mKir2.1 [R67W]] (blau) wurden in Medien mit 10 mM bzw. 100 mM KCl durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) in Intervallen von 15 min ermittelt.

In Abbildung 3.15 ist zu erkennen, dass die maximalen Wachstumsraten der Stämme PLY246 [pYEX-yEGFP/mKir2.1 [D71V]], PLY246 [pYEX-yEGFP/mKir2.1[S136F]], PLY246[pYEX-yEGFP/mKir2.1 [G144S]] der von PLY246 [pYEX-yEGFP/mKir2.1 [R67W]] entsprechen. Die Wachs-

tumsraten dieser Stämme in Medium mit 10 mM KCl ist damit etwas niedriger als die des *yEGFP* exprimierenden Stammes und deutlich niedriger als die des *yEGFP/mKir2.1* exprimierenden Stammes.

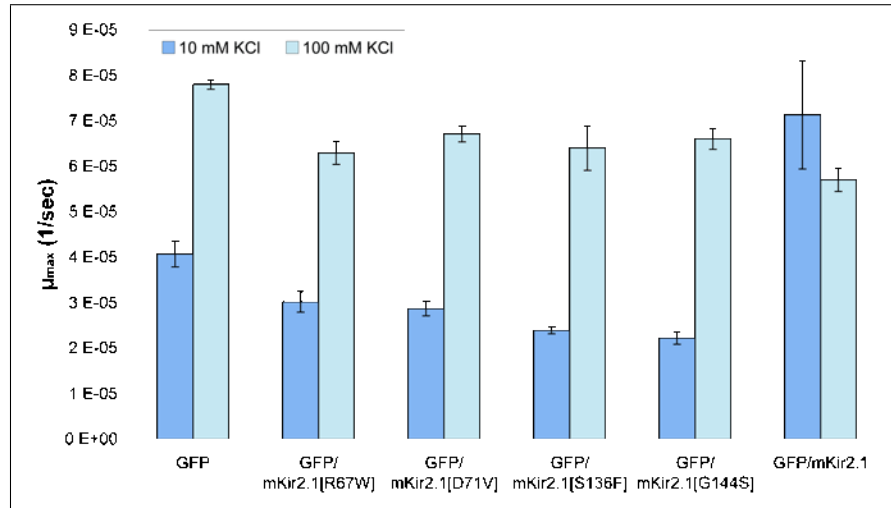


Abbildung 3.15: Vergleich der maximalen Wachstumsraten *yEGFP/mKir2.1* bzw. *yEGFP/mKir2.1*-Mutanten exprimierender Stämme bei unterschiedlichen KCl-Konzentrationen. Gezeigt ist die maximale Wachstumsrate (μ_{max}) der Stämme PLY246 [pYEX-*yEGFP/mKir2.1*] (GFP/*mKir2.1*), PLY246 [pYEX-*yEGFP/mKir2.1* [R67W]] (GFP/*mKir2.1*[R67W]), PLY246 [pYEX-*yEGFP/mKir2.1* [D71V]] (GFP/*mKir2.1*[D71V]), PLY246 [pYEX-*yEGFP/mKir2.1* [S136F]] (GFP/*mKir2.1*[S136F]), PLY246 [pYEX-*yEGFP/mKir2.1* [G144S]] (GFP/*mKir2.1*[G144S]) und als Negativkontrolle das Wachstum des *yEGFP* exprimierenden Stammes (GFP) in Medium mit 10 mM bzw. 100 mM KCl. Dargestellt sind jeweils die aus drei Replikaten berechneten Mittelwerte. Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

3.4.3 Koexpression von *mKir2.1* unter Kontrolle von P_{CUP1} und *mKir2.1* (-Mutanten) unter Kontrolle von P_{GAL1}

Nachdem gezeigt wurde, dass mutiertes *mKir2.1* exprimierende Hefestämme nicht zu einem verbesserten Wachstum in Medium mit 10 mM KCl führten, sollte untersucht werden, ob der in *Xenopus*-Oocyten gezeigte dominant negative Effekt dieser Kir2.1-Mutanten auch in Hefezellen nachzuweisen ist. Um eine Koexpression von *mKir2.1*- und mutierten *mKir2.1*-Genen zu ermöglichen, mussten verschiedene Voraussetzungen erfüllt werden: a) ein regulierbarer Promotor musste für die *mKir2.1*-Mutanten verwendet werden, b) ein neues Plasmid mit dem *mKir2.1* Wildtyp Gen musste konstruiert werden. Dieses Plasmid musste *mKir2.1* fusioniert mit einem alternativen Fluoreszenzgene (mRFP) enthalten, und einen zu den in den bisher verwendeten Plasmiden alternativen Selektionsmarker. c) Aus b ergibt sich, dass ein neuer Wirtstamm hergestellt werden musste, so dass beide Plasmide selektiv vorliegen konnten.

(a) Ein regulierbarer Promotor sollte verwendet werden, damit durch An- und Ausschalten der Transkription der *mKir2.1*-Mutanten in Hefe deren Einfluss auf das Wachstum bei konstitutiver *mKir2.1* Wildtyp Expression untersucht werden konnte. Hierzu wurde zunächst P_{GAL1} verwendet. Vorab wurde getestet, inwieweit sich die Transkription des von P_{GAL1} kontrollierten Gens im verwendeten Hefestamm regulieren lässt. Dafür wurde ein Plasmid hergestellt, das *yEGFP* unter der Kontrolle von P_{GAL1} enthielt. Nach erfolgreicher Transformation von PLY246 mit dem Konstrukt zeigte die anschließende Untersuchung der GFP-Fluoreszenz diese Stammes in Medium mit bzw. ohne Galaktose, dass durch 2% Galaktose die GFP-Fluoreszenz um ungefähr das fünffache erhöht wurde (Abb. 3.16).

Demnach schien P_{GAL1} als regulierbarer Promotor für die geplanten Koexpressions-Versuche geeignet zu sein. Es wurden entsprechende Plasmide hergestellt, bei denen P_{GAL1} die Transkription des *yEGFP/mKir2.1*-Gens bzw. der mutierte *yEGFP/mKir2.1*-Gene kontrolliert.

(b) Es wurde ein Plasmid hergestellt, das ein *mRFP/mKir2.1* Fusionsgen unter der Kontrolle von P_{CUP1} enthielt. Als Selektionsmarker wurde in diesem Plasmid, im Gegensatz zu den P_{GAL1} -Plasmiden, die *URA3*- und *LEU2*-Gene enthalten, das *HIS3*-Gen verwendet.

(c) Da die Disruption des *Tok1*-Gens bei PLY246 durch Integration einer „*HIS3*-Kassette“ erfolgt war, musste das *HIS3*-Gen aus diesem Stamm entfernt werden. Dies erfolgte durch Ersetzen des *HIS3*-Gens mit dem *TRP1*-Gen via homologer Rekombination (Konstruktion der Plasmide

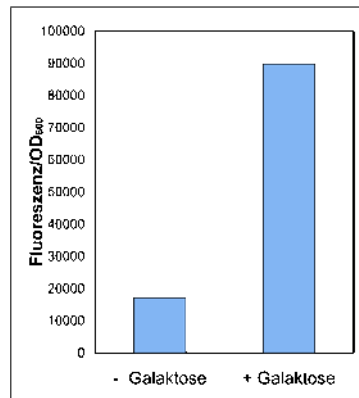


Abbildung 3.16: Regulation von P_{GAL1} durch Galaktose. Gezeigt ist die GFP-Fluoreszenz dividiert durch die OD_{600} des Stammes PLY246 [pYEX- P_{GAL1} -yEGFP]. Der Test wurde in Medium mit 100 mM KCl durchgeführt.

siehe 7.3.3). Der so hergestellte Stamm PLY246T wurde mit pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1 transformiert. Dieser Hefestamm (PLY246T [pYEX-(his)-mRFP/mKir2.1]) wurde anschließend mit den jeweils (mutiertes) *mKir2.1* unter der Kontrolle von P_{GAL1} enthaltenen Plasmiden transformiert (Abschnitt 2.4.4). Die Kolokalisation beider Fusionsproteine wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht und bestätigt. Exemplarisch sind in Abbildung 3.17 die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des *mRFP/mKir2.1* und *yEGFP/mKir2.1* sowie des *mRFP/mKir2.1* und *yEGFP/mKir2.1* [D71V] koexprimierenden Stammes gezeigt.

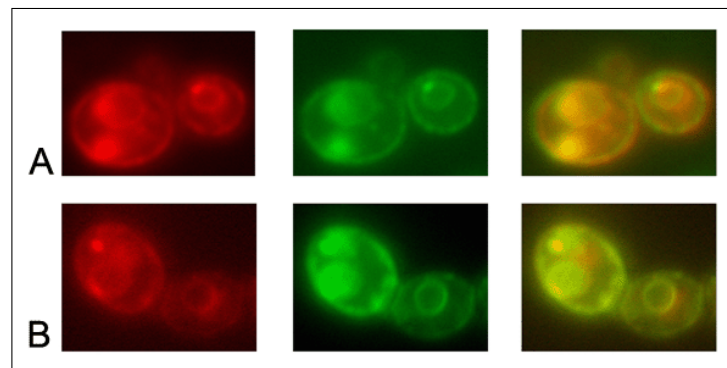


Abbildung 3.17: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *mRFP/mKir2.1* unter Kontrolle von P_{CUP1} und mutiertes *yEGFP/mKir2.1* unter Kontrolle von P_{GAL1} koexprimierenden Hefezellen. **A** PLY246T [pYEX-mRFP/mKir2.1][pY- P_{GAL1} -yEGFP/mKir2.1], **B** PLY246T [pYEX-mRFP/mKir2.1][pY- P_{MET25} -yEGFP/mKir2.1 [D71V]]. Die linke Spalte zeigt jeweils die RFP-Fluoreszenzaufnahmen (λ_{Ex} : 555 - 570 nm, λ_{Em} : 580 - 625 nm). Die mittlere Spalte zeigt die GFP-Fluoreszenzaufnahmen (λ_{Ex} : 450 - 490 nm, λ_{Em} : 515 - 565 nm). Die rechte Spalte zeigt die Überlagerung der beiden Bilder aus der GFP und RFP-Anregung.

Die Ergebnisse der Wachstumstests der Hefestämme, die *mRFP/mKir2.1* unter der Kontrolle von P_{CUP1} exprimierten und zusätzlich unter Kontrolle von P_{GAL1} *yEGFP/mKir2.1*- bzw. *yEGFP/ mKir2.1*-Mutanten, sind in Abbildung 3.18 gezeigt. Die maximalen Wachstumsraten (μ_{max}) in Medien mit und ohne Galaktose unterschieden sich kaum. Alle Stämme wuchsen in Medium mit 100 mM KCl mit Galaktose jeweils etwas schlechter als in Medium, das nur Glukose enthielt. Auch die Differenzen der Wachstumsraten in 10 mM KCl Medien mit und ohne Galaktose waren gering und sogar kleiner als die Standardabweichung. Es zeigte sich aber, dass die *mRFP/mKir2.1* mit *yEGFP/mKir2.1*, *mRFP/mKir2.1* mit *yEGFP* und *mRFP/mKir2.1* mit *yEGFP/mKir2.1*[R67W] koexprimierenden Stämme in Medium mit 10 mM KCl ein deutlich besseres Wachstum zeigten als die Stämme, die *mRFP/mKir2.1* mit *yEGFP/mKir2.1*[D71V] (bzw. [S136F], [G144S]) koexprimierten (Abb. 3.18). Somit war bei den letztgenannten Stämmen ein dominant negativer Effekt mit und ohne Galaktose nachweisbar. Dieser Effekt konnte jedoch nicht unterdrückt werden, da die Basalaktivität von P_{GAL1} auch ohne Zugabe von Galaktose so hoch war, dass ausreichend Protein hergestellt wurde, um bei Koexpression mit *mKir2.1*[D71V], [S136F], [G144S] die Funktion von *mKir2.1* zu unterdrücken.

Um das zu klären, wurde die Aktivität von P_{GAL1} sowie der Einfluss von Galaktose auf das Wachstum genauer untersucht. Das Wachstum der Stämme PLY246 [pYEX-GFP/*mKir2.1*], PLY246 [pYEX-*yEGFP*] und PLY246 [pYEX- P_{GAL1} -*yEGFP/mKir2.1*] wurde in Medien mit 100 mM KCl und 0,5% Glukose, 100 mM KCl und 0,5% Glukose + 1,5% Galaktose, 10 mM KCl und 0,5% Glukose und 10 mM KCl und 0,5% Glukose + 1,5% Galaktose bestimmt. Die in Abbildung 3.19 dargestellten Resultate zeigen zunächst, dass alle Stämme in Medien mit Galaktose und Glukose schlechter wuchsen als in Medien, die ausschließlich Glukose enthielten. Interessant ist der Vergleich des Wachstums in Medium mit 10 mM KCl ohne Galaktose zwischen PLY246 [pYEX- P_{GAL1} -*yEGFP/mKir2.1*], bei dem die Expression von *yEGFP/mKir2.1* unter diesen Bedingungen unterdrückt sein sollte und PLY246 [pYEX-GFP/*mKir2.1*], bei dem die Expression des Kanalgens nicht beeinflusst sein sollte. Dies deutet auf eine hohe Basalaktivität von P_{GAL1} hin. Somit war P_{GAL1} für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Koexpressionsversuche nicht geeignet.

Daher wurde als Alternative der durch Methionin inhibierbare P_{MET25} (Sangsoda *et al.*, 1985; Tirode *et al.*, 1997; Solow *et al.*, 2005) in Betracht gezogen. Es wurde ein Stamm hergestellt, der *yEGFP* unter der Kontrolle von P_{MET25} exprimiert. In einem Vortest wurde die Aktivität von

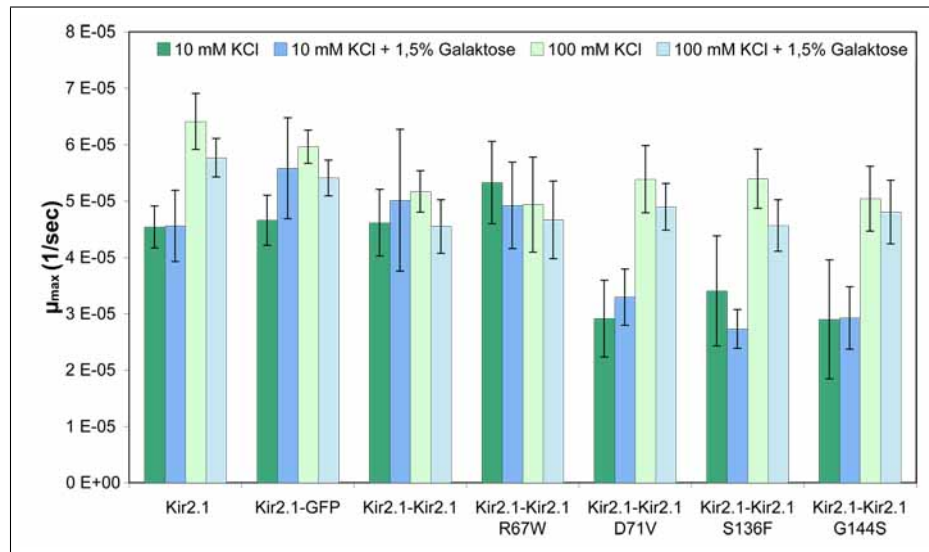


Abbildung 3.18: Wachstum von Hefestämmen, die *mRFP/mKir2.1* unter Kontrolle von P_{CUP1} und *yEGFP/mKir2.1*-Mutanten unter Kontrolle von P_{MET25} koexprimieren. Es ist das Wachstum der Stämme PLY246T [pYEX-*mRFP/mKir2.1*] (Kir2.1), PLY246T [pYEX-*mRFP/mKir2.1*][pY- P_{GAL1} -*yEGFP/mKir2.1*] (Kir2.1-GFP), PLY246T [pYEX-*mRFP/mKir2.1*][pY- P_{GAL1} -*yEGFP/mKir2.1*] (Kir2.1-Kir2.1), PLY246T [pYEX-*mRFP/mKir2.1*][pY- P_{GAL1} -*yEGFP/mKir2.1*] [R67W] (Kir2.1-Kir2.1[R67W]), PLY246T [pYEX-*mRFP/mKir2.1*][pY- P_{GAL1} -*yEGFP/mKir2.1*] [D71V] (Kir2.1-Kir2.1[D71V]), PLY246T [pYEX-*mRFP/mKir2.1*][pY- P_{GAL1} -*yEGFP/mKir2.1*] [S136F] (Kir2.1-Kir2.1[S136F]) und PLY246T [pYEX-*mRFP/mKir2.1*][pY- P_{GAL1} -*yEGFP/mKir2.1*] [G144S] (Kir2.1-Kir2.1[G144S]) aufgetragen. In **blau** ist jeweils das Wachstum mit 1,5% Galaktose, in **grün** ohne Galaktose dargestellt. **Helle Farben** stellen die maximale Wachstumsrate (μ_{max}) in Medium mit 10 mM KCl dar, **dunkle Farben** in Medium mit 100 mM KCl. Aufgetragen sind die Mittelwerte dreier Replikate. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

P_{MET25} bei verschiedenen Methionin-Konzentrationen getestet (Abb. 3.20). Die gemessenen Fluoreszenzwerte zeigten eine deutliche Inhibierung der Expression von *yEGFP* mit steigender Methionin-Konzentration im Medium. 2 mM Methionin im Medium waren ausreichend, um die Transkription von *yEGFP* über die vollständige Versuchszeit zu unterdrücken (Abb. 3.20 A).

Außerdem wurde der Einfluss von verschiedenen Methionin Konzentrationen im Medium auf Stämme mit und ohne P_{MET25} untersucht. Dazu wurde die maximale Wachstumsrate (μ_{max}) von Stämmen mit bzw. ohne P_{MET25} verglichen. Es zeigte sich, dass mit zunehmender Methionin-Konzentration das Wachstum der Zellen leicht abnahm (Abb. 3.20 B).

Es wurden Plasmide hergestellt, die *yEGFP/mKir2.1* bzw. *yEGFP/mKir2.1*-Mutanten unter der Kontrolle von P_{MET25} enthalten (Konstruktion 7.3.3). Anschließend wurden die jeweiligen Hefestämme hergestellt, um die Expression sowohl von *mRFP/mKir2.1* unter Kontrolle von P_{CUP1} als auch von *yEGFP/mKir2.1* bzw. *yEGFP/mKir2.1*-Mutanten unter der Kontrolle von P_{MET25}

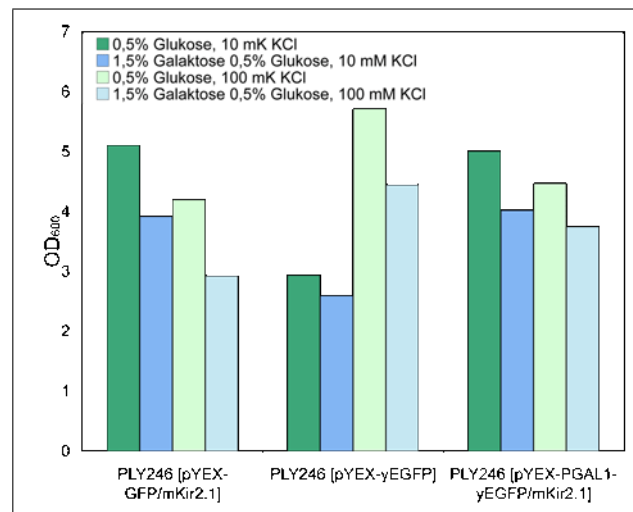


Abbildung 3.19: Einfluss von Galaktose auf das Wachstum von Hefestämmen. Es wurde die OD_{600} der Stämme PLY246 [pYEX-GFP/mKir2.1], PLY246 [pYEX-yEGFP] und PLY246 [pYEX-P_{GAL1}-yEGFP/mKir2.1] nach 15 h aufgetragen. Die Stämme wurden in Medien mit 10 mM und 100 mM KCl angezogen. Die Medien enthielten außerdem jeweils 0,5% Glukose bzw. 0,5% Glukose und 1,5% Galaktose.

zu untersuchen.

3.4.4 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der *mRFP/mKir2.1* unter Kontrolle von P_{CUP1} und (mutiertes) *yEGFP/mKir2.1* unter Kontrolle von P_{MET25} koexprimierenden Stämme

Um zu überprüfen, ob auch in diesen Stämmen die beiden Fusionsproteine kolokalisiert vorlagen, wurden die Stämme PLY246T [pYEX-mRFP/mKir2.1][pY-P_{MET25}-yEGFP/mKir2.1], PLY246T [pYEX-mRFP/mKir2.1][pY-P_{MET25}-yEGFP/mKir2.1 [R67W]], PLY246T [pYEX-mRFP/mKir2.1][pY-P_{MET25}-yEGFP/mKir2.1 [D71V]], PLY246T [pYEX-mRFP/mKir2.1] [pY-P_{MET25}-yEGFP/mKir2.1[S136F]] und PLY246T [pYEX-mRFP/mKir2.1] [pY-P_{MET25}-yEGFP/mKir2.1 [G144S]] fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Bei allen untersuchten Zellen der unterschiedlichen Stämme war die Verteilung der durch mRFP/mKir2.1 hervorgerufenen roten Fluoreszenz und der durch die yEGFP/ mKir2.1 bzw. yEGFP/mKir2.1-Mutanten verursachten grünen Fluoreszenz ähnlich lokalisiert (Abb. 3.21) und mit der von einzeln exprimierten *yEGFP/mKir2.1* (-Mutanten) (Abb. 3.11) vergleichbar. Dieser Versuch zeigte, dass beide in den Hefezellen vorhandenen Fusionsproteine (mRFP/mKir2.1 und yEGFP/mKir2.1) wahrscheinlich kolokalisiert

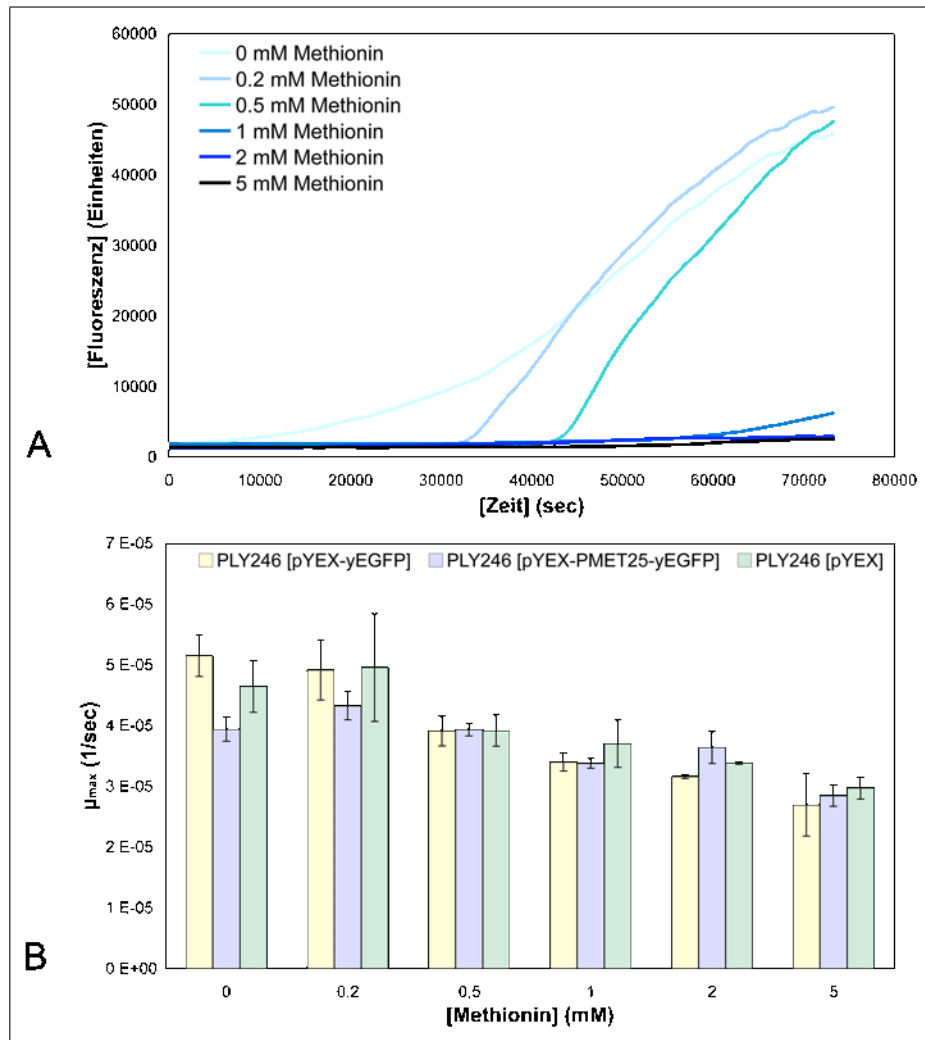


Abbildung 3.20: Untersuchung der Aktivität von P_{MET25} . In **A** ist die Fluoreszenz des Stammes PLY246 [pYEX- P_{MET25} -yEGFP] in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. In **B** entsprechend μ_{max} , sowie die maximale Wachstumsrate zwei weiterer Stämme (PLY246 [pYEX-yEGFP] und PLY246 [pYEX]), die den Einfluss von Methionin auf das Wachstum von Stämmen ohne P_{MET25} zeigen. Die Fluoreszenz und OD_{600} der Stämme wurden in Medien mit 100 mM KCl und verschiedenen Methionin-Konzentrationen (0; 0,2; 0,5; 1; 2; 5 mM) gemessen. Gezeigt sind jeweils die aus drei Replikaten berechneten Mittelwerte. Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

waren. Demnach war die Voraussetzung für Wachstumstests zur Untersuchung des dominant negativen Effekts der *Kir2.1*-Mutanten bei Koexpression mit dem *Kir2.1* Wildtyp erfüllt.

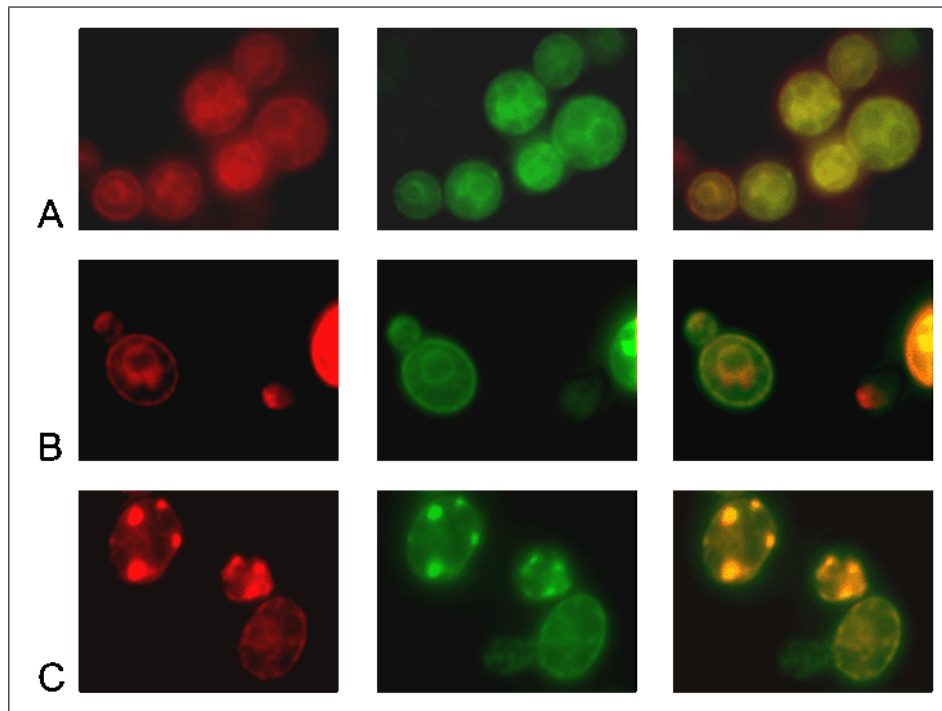


Abbildung 3.21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *mRFP/mKir2.1* unter Kontrolle von P_{CUP1} und mutiertes *yEGFP/mKir2.1* unter Kontrolle von P_{MET25} koexprimierenden Hefezellen. A PLY246T [pYEX-*mRFP/mKir2.1*][pY- P_{MET25} -*yEGFP/mKir2.1* [R67W]], **B** PLY246T [pYEX-*mRFP/mKir2.1*][pY- P_{MET25} -*yEGFP/mKir2.1* [D71V]], **C** PLY246T [pYEX-*mRFP/mKir2.1*][pY- P_{MET25} -*yEGFP/mKir2.1* [G144S]]. Die linke Spalte zeigt jeweils die RFP-Fluoreszenzaufnahmen (λ_{Ex} : 555 - 570 nm, λ_{Em} : 580 - 625 nm). Die mittlere Spalte zeigt die GFP-Fluoreszenzaufnahmen (λ_{Ex} : 450 - 490 nm, λ_{Em} : 515 - 565 nm). Die rechte Spalte zeigt die Überlagerung der beiden Bilder aus der GFP und RFP-Anregung.

3.4.5 Untersuchung des Wachstums von *mRFP/mKir2.1* unter Kontrolle von P_{CUP1} und (mutiertes) *yEGFP/mKir2.1* unter Kontrolle von P_{MET25} koexprimierenden Stämmen

Das Wachstum der Stämme, die *mRFP/mKir2.1* unter der Kontrolle von P_{CUP1} und *yEGFP/mKir2.1* bzw. *yEGFP/mKir2.1*-Mutanten unter der Kontrolle von P_{MET25} koexprimierten, wurde in Medien mit 10 mM KCl, mit 10 mM KCl + 2 mM Methionin, mit 100 mM KCl und mit 100 mM KCl + 2 mM Methionin bestimmt. In Abbildung 3.22 A sind die maximalen Wachstumsraten der jeweiligen Stämme bei allen vier getesteten Wachstumsbedingungen dargestellt. Schon bei den getesteten Kontrollbedingungen (Medium mit 100 mM KCl ohne Methionin, in Abbildung 3.22 A in hell orange dargestellt) gab es deutliche Unterschiede der Wachstumsraten der einzelnen Stämme. Dadurch wurde der Einfluss von Methionin auf das Wachstum bei 10 mM KCl

nicht direkt ersichtlich.

Um vergleichbare Werte zu erhalten, wurde deshalb zunächst das Wachstum in Medium mit 10 mM KCl relativ zum Wachstum in entsprechendem (mit oder ohne Methionin) Medium mit 100 mM KCl bestimmt. Um den Einfluss von Methionin darzustellen, wurden anschließend die so erhaltenen relativen Wachstumswerte bei Wachstum in Medium mit 10 mM KCl ohne Methionin als Prozent des Wachstums in entsprechendem Medium mit 2 mM Methionin berechnet und die Differenz zu 100% (entsprechend keinem Einfluß von Methionin) bestimmt (Formel 2.2, Seite 51). Die so berechneten Differenzen, also die relativen Wachstumsinhibierungen, sind in Abbildung 3.22 B gezeigt.

Aufgrund der Erhöhung der P_{MET25} Aktivität in Medium ohne Methionin im Vergleich zu Medium mit Methionin, erhöhte sich bei Koexpression von (P_{MET25}) -yEGFP/mKir2.1 mit (P_{CUP1}) -mRFP/mKir2.1 die Menge an yEGFP/mKir2.1. Wie erwartet hatte dies aber keinen Einfluss auf das Wachstum. Ebenso führte eine Erhöhung der yEGFP/mKir2.1 [R67W] Menge bei Koexpression mit mRFP/mKir2.1 nicht zu einer signifikanten Veränderung des Wachstums. Im Gegensatz dazu bewirkte die verstärkte Expression der anderen untersuchten mKir2.1-Mutanten bei Koexpression mit mRFP/mKir2.1 eine deutliche Verringerung des Wachstums. Stämme, die mRFP/mKir2.1 und yEGFP/mKir2.1 [D71V] koexprimierten, zeigten ein um ca. 15% schwächeres Wachstum, wenn yEGFP/mKir2.1 [D71V] verstärkt transkribiert wurde. Der mRFP/mKir2.1 und yEGFP/mKir2.1 [S136F] koexprimierende Stamm wuchs um ca. 10% schlechter und der mRFP/mKir2.1 und yEGFP/mKir2.1 [G144S] koexprimierende Stamm um ca. 22% schlechter, wenn kein Methionin im Medium enthalten war und somit die Transkription der jeweiligen yEGFP/mKir2.1-Mutanten verstärkt wurde.

Es konnte somit gezeigt werden, dass die Kir2.1-Mutanten (mKir2.1 [D71V], [S136F] bzw. [G144S]) bei Koexpression mit Kir2.1 Wildtyp auch in *S. cerevisiae* einen dominant negativen Effekt haben.

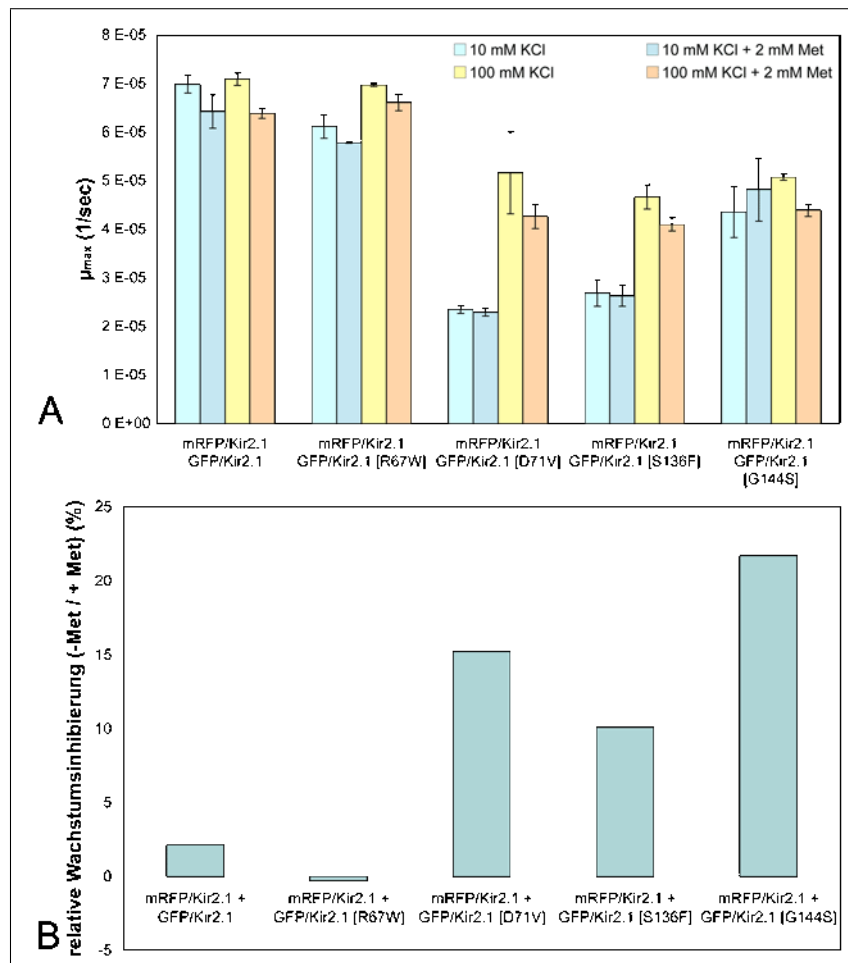


Abbildung 3.22: Untersuchung des Wachstums von *mKir2.1* unter Kontrolle von P_{CUP1} und (mutiertes) *mKir2.1* unter Kontrolle von P_{MET25} koexprimierenden Stämmen. Es ist das Wachstum der Stämme PLY246T [pYEX-mRFP/mKir2.1][pY- P_{MET25} -yEGFP/mKir2.1] (mRFP/Kir2.1-GFP/Kir2.1), PLY246T [pYEX-mRFP/mKir2.1][pY- P_{MET25} -yEGFP/mKir2.1 [R67W]] (mRFP/Kir2.1-GFP/Kir2.1[R67W]), PLY246T [pYEX-mRFP/mKir2.1][pY- P_{MET25} -yEGFP/mKir2.1 [D71V]] (mRFP/Kir2.1-GFP/Kir2.1[D71V]), PLY246T [pYEX-mRFP/mKir2.1][pY- P_{MET25} -yEGFP/mKir2.1[S136F]] (mRFP/Kir2.1-GFP/Kir2.1[S136F]) und PLY246T [pYEX-mRFP/mKir2.1][pY- P_{MET25} -yEGFP/mKir2.1[G144S]] (mRFP/Kir2.1-GFP/Kir2.1[G144S]) aufgetragen. In **A** ist die maximale Wachstumsrate (μ_{max}) aufgetragen. Es wurde der Mittelwert dreier Replikate gezeigt, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. In **B** ist die relative Wachstumsänderung in % dargestellt (Formel 2.2, Seite 51). Errechnet wurde diese, indem die Wachstumsrate der in 10 mM KCl Medium (+ bzw. - Met) gewachsenen Stämme auf die Wachstumsrate der entsprechenden Stämme, die in 100 mM KCl Medium (+ bzw. - Met) gewachsen waren, bezogen wurde. Anschließend wurden die so erhaltenen relativen Wachstumswerte bei Wachstum in Medium mit 10 mM ohne Methionin als Prozent des Wachstums in entsprechendem Medium mit 2 mM Methionin berechnet und die Differenz zu 100% bestimmt. Dargestellt ist somit die relative Wachstumsinhibierung in %.

3.5 Expression von *rKir3.2* und verschiedenen *rKir3.2*-Mutanten in *S. cerevisiae*

Nachdem gezeigt wurde, dass nicht nur Kir2.1 sondern auch klinisch relevante Kir2.1 Mutanten mit dem Hefetestsystem untersucht werden können, sollte das System um einen weiteren einwärts-gleichrichtenden Kanal erweitert werden. Es wurde die Unterfamilie der G-Protein aktivierten K⁺-Kanäle (Kir3.x) ausgewählt. G-Protein aktivierte K⁺-Kanäle öffnen (d. h. die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle wird erhöht) wenn ein G-Protein β/γ -Dimer an die α -Untereinheiten gebunden hat. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem aus Kir3.2-Untereinheiten bestehenden homomeren Kanal gearbeitet. Verschiedene Mutationen (z. B. [S177T], [S177W], [V188G]) des *Kir3.2*-Gens führen zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit in Abwesenheit eines G-Protein β/γ -Dimers (Yi *et al.*, 2001; Bichet *et al.*, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Hefestämme hergestellt und untersucht, die *rKir3.2*, *rKir3.2* [S177T], *rKir3.2* [S177W] und *rKir3.2* [V188G] alleine als auch jeweils mit yEGFP fusioniert, exprimieren. Zusätzlich wurde die Mutante *rKir3.2* [G156S] (bzw. *yEGFP/rKir3.2* [G156S]) untersucht, welche die sogenannte „weaver“-Mutation enthält. Diese Mutation führt dazu, dass keine K⁺-Selektivität mehr vorhanden ist und Na⁺ durch den Kanal diffundiert (Slesinger *et al.*, 1996; Kofuji *et al.*, 1996).

3.5.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der *yEGFP/rKir3.2* bzw. mutiertes *yEGFP/rKir3.2* exprimierenden Hefestämme

Die zelluläre Lokalisation der Fusionsproteine *yEGFP/rKir3.2* bzw. *yEGFP/rKir3.2*-Mutanten wurde fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert (Abb. 3.23). Bei allen untersuchten *yEGFP/rKir3.2* bzw. mutierte *yEGFP/rKir3.2* Fusionsgene exprimierenden Hefestämmen waren fluoreszierender Bereiche in Form eines nicht durchgehenden Ringes an der Zellperipherie zu erkennen, als auch ein ringförmiger, stärker fluoreszierende Bereich in der Zelle. Die Verteilung der Fluoreszenz war ähnlich der von *yEGFP/mKir2.1*. Wahrscheinlich handelt es sich ebenfalls um im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisierte Fusionsproteine. Trotzdem ist es möglich, dass einige Fusionsproteine in der Plasmamembran lokalisiert waren.

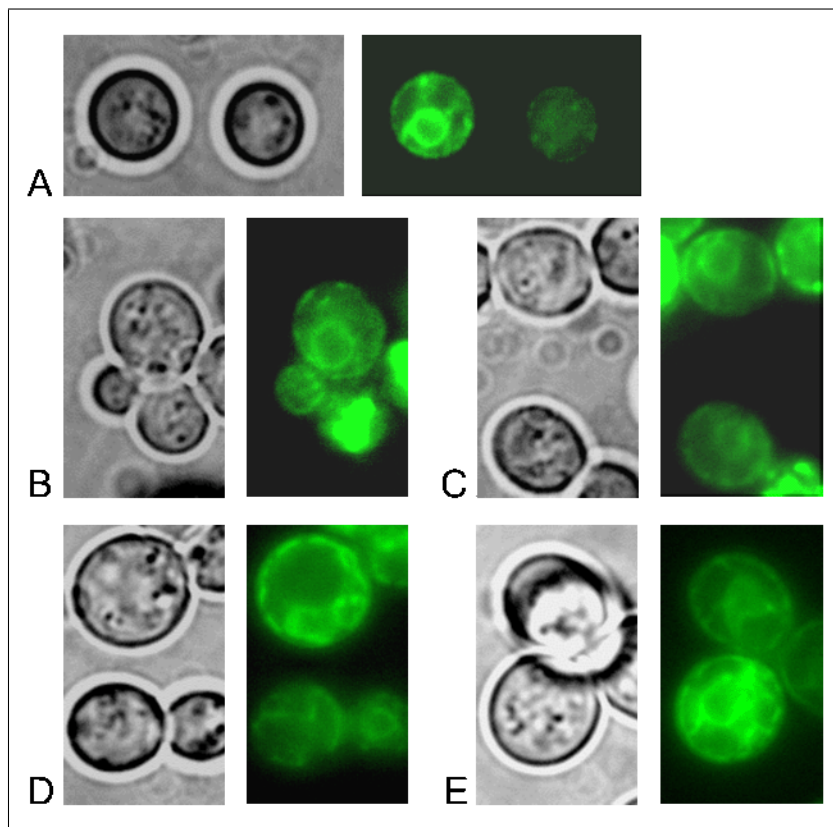


Abbildung 3.23: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der *yEGFP/rKir3.2* bzw. mutiertes *yEGFP/rKir3.2* exprimierenden Hefezellen. **A:** PLY246 [pYEX-yEGFP/Kir3.2] (Kontrolle), **B:** PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [G156S]], **C:** PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [S177T]], **D:** PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [S177W]], **E:** PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [V188G]]. Links ist jeweils die Durchlichtaufnahme, rechts die Fluoreszenzaufnahme gezeigt (λ_{Ex} : 450 - 490 nm, λ_{Em} : 515 - 565 nm).

3.5.2 Wachstum von *yEGFP/rKir3.2* bzw. *yEGFP/rKir3.2*-Mutanten exprimierenden Hefestämmen

Die Überprüfung der Funktion der rKir3.2 (-Mutanten) erfolgte, indem Wachstumstest durchgeführt wurden. Als Kontrollen wurde PLY246 [pYEX-GFP] (Negativkontrolle) und zusätzlich PLY246 [pYEX-yEGFP/mKir2.1] (Positivkontrolle) verwendet (Abb. 3.24). In Medium mit 100 mM KCl (Kontrollbedingung) wuchsen alle Stämme ähnlich. Wie erwartet wuchsen der *yEGFP/rKir3.2* exprimierende Stamm als auch der *yEGFP/rKir3.2* [G156S] exprimierende Stamm in Medium mit 10 mM KCl kaum. Der *yEGFP/rKir3.2* [S177T] exprimierende Stamm wuchs in Medium mit 10 mM KCl ähnlich wie der *yEGFP* exprimierende Stamm und damit besser als die zuvor genannten Stämme. Die Stämme PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [S177W]] und PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [V188G]] wuchsen in diesem Medium ähnlich gut wie der

yEGFP/mKir2.1 exprimierende Stamm. Die maximale Wachstumsrate war ähnlich hoch wie in Medium mit 100 mM KCl. Wurde das Integral unter der Wachstumskurve (W_{int}) betrachtet, zeigte sich ein interessanter Unterschied: Der Stamm PLY246 [pYEX-*yEGFP/rKir3.2* [V188G]] wuchs zwar mit ähnlicher μ_{max} wie PLY246 [pYEX-*yEGFP/rKir3.2* [S177W]], zeigte aber ein höheres W_{int} und erreichte also eine höhere End-OD als PLY246 [pYEX-*yEGFP/rKir3.2* [S177W]]. Somit konnte auch zwischen diesen beiden Stämmen ein Unterschied beobachtet werden (Abb. 3.25).

Untersuchungen mit Stämmen, welche die entsprechenden Konstrukte ohne *yEGFP*-Fusion exprimierten, ergaben ähnliche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Für die weiteren Untersuchungen wurden die Stämme verwendet, welche die Fusionsgene exprimierten, da durch die GFP-Fluoreszenz eine einfache visuelle Überprüfung der Expression möglich war.

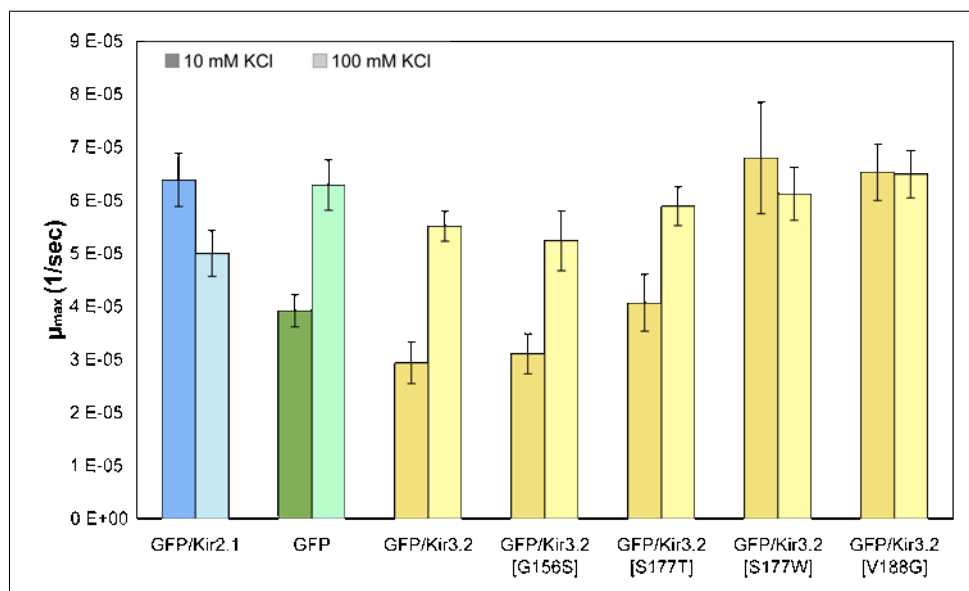


Abbildung 3.24: Wachstum von *yEGFP/rKir3.2* bzw. mutiertes *yEGFP/rKir3.2* exprimierenden Hefestämmen. Es wurden die Stämme PLY246 [pYEX-*yEGFP/mKir2.1*] (GFP/Kir2.1), PLY246 [pYEX-*yEGFP*] (GFP), PLY246 [pYEX-*yEGFP/rKir3.2*] (GFP/Kir3.2), PLY246 [pYEX-*yEGFP/rKir3.2* [G156S]] (GFP/Kir3.2 [G156S]), PLY246 [pYEX-*yEGFP/rKir3.2* [S177T]] (GFP/Kir3.2 [S177T]), PLY246 [pYEX-*yEGFP/rKir3.2* [S177W]] (GFP/Kir3.2 [S177W]) und PLY246 [pYEX-*yEGFP/rKir3.2* [V188G]] (GFP/Kir3.2 [V188G]) untersucht. In **hellen Farben** ist die Wachstumsrate (μ_{max}) der Stämme, die auf Medium mit 10 mM KCl wuchsen, dargestellt, in **kräftigen Farben** die Wachstumsrate (μ_{max}) der Stämme, die auf Medium mit 100 mM KCl wuchsen. Dargestellt sind die Mittelwerte von 18 Replikaten aus drei Versuchen, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

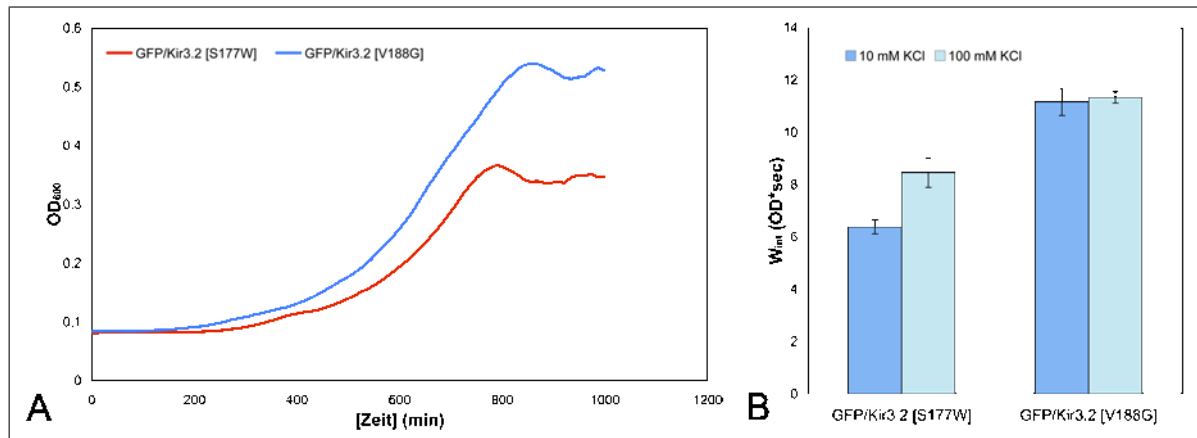


Abbildung 3.25: Wachstum von *yEGFP/rKir3.2 [S177W]* und *yEGFP/rKir3.2 [V188G]* exprimierenden Hefestämmen. Es wurden in **A** exemplarisch Wachstumskurven der Stämme PLY246 [pYEX-*yEGFP/rKir3.2 [S177W]*] (GFP/Kir3.2 [S177W]) und PLY246 [pYEX-*yEGFP/rKir3.2 [V188G]*] (GFP/Kir3.2 [V188G]) dargestellt. In **B** ist das Integral unter der Wachstumskurve (W_{int}) dieser beiden Stämme, gewachsen in Medium mit 10 mM KCl bzw. 100 mM KCl, gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte von sechs Replikaten, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

3.5.3 Untersuchung des Einflusses von monovalenten Kationen

Aus der Literatur war bekannt, dass die *rKir3.2* Mutation [S177W] eine reduzierte K^+ -Selektivität bewirkt. Um zu untersuchen, ob diese reduzierte K^+ -Selektivität auch in Hefe nachweisbar ist, wurde der Einfluss von monovalenten Kationen (Li^+ , Na^+) auf die *rKir3.2* bzw. *rKir3.2*-Mutanten exprimierenden Stämme untersucht. Mit Wachstumstests in Medien mit und ohne LiCl bzw. NaCl, sollte der Einfluss von Li^+ bzw. Na^+ auf das Wachstum der Stämme untersucht werden. Zunächst wurde die Sensitivität der *yEGFP/rKir3.2 [S177W]* bzw. *yEGFP/rKir3.2 [V188G]* exprimierenden Stämme gegenüber Li^+ durch Wachstumstest in Medien mit 10 mM KCl und LiCl Konzentrationen von 0, 1, 10, 100 und 300 mM untersucht. Sowohl aus der maximalen Wachstumsrate (μ_{max}) als auch aus dem Integral unter der Wachstumskurve (W_{int}) wurde das relative Wachstum berechnet (Abb. 3.26). Während das Wachstum des *yEGFP/rKir3.2 [V188G]* exprimierenden Stammes kaum von LiCl beeinflusst wurde, nahm das Wachstum des *yEGFP/rKir3.2 [S177W]* exprimierenden Stammes mit steigender LiCl Konzentration immer stärker ab. Interessanterweise zeigte sich diese Sensitivität deutlicher, wenn das Integral unter der Wachstumskurve (W_{int}) betrachtet wurde.

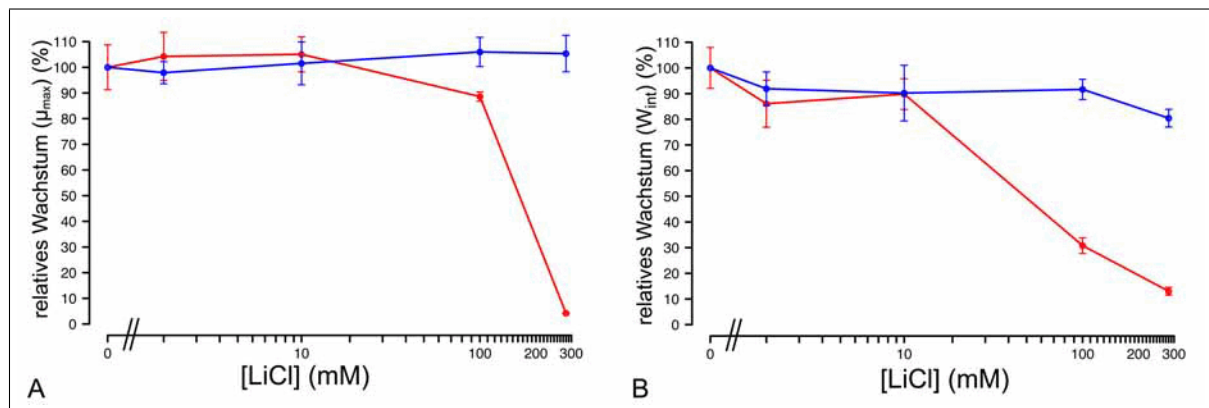


Abbildung 3.26: Wachstum von *yEGFP/rKir3.2 [S177W]* bzw. *-[V188G]* exprimierenden Stämmen in Medien mit 10 mM KCl und unterschiedlichen LiCl-Konzentrationen. Es wurden die Stämme PLY246 [pYEX-*yEGFP/rKir3.2 [S177W]*] (rot) und PLY246 [pYEX-*yEGFP/rKir3.2 [V188G]*] (blau) getestet. In **A** ist das aus der maximalen Wachstumsrate (μ_{max}) berechnete relative Wachstum in % gegen [LiCl] in mM aufgetragen. In **B** ist das aus dem Integral unter der Wachstumskurve berechnete relative Wachstum in % gegen [LiCl] in mM aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus vier (0, 1, 300 mM LiCl) bzw. sechs (10, 100 mM LiCl) Replikaten aus zwei Versuchen, die Wachstumstests liefen über 15 h. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Als nächstes wurde der Einfluss von NaCl auf das Wachstum der *yEGFP/rKir3.2* bzw. *yEGFP/rKir3.2*-Mutanten exprimierenden Hefestämme in Wachstumstests untersucht. Es wurde das Wachstum in Medium mit 10 mM KCl mit und ohne NaCl (290 mM) untersucht (Abb. 3.27).

Bei Betrachtung des Integrals unter der Wachstumskurve (W_{int}) ist zu sehen, dass PLY246 [pYEX-*yEGFP/rKir3.2 [S177W]*] in Medium mit 290 mM NaCl nur noch 33% des Wachstums in Medium ohne NaCl aufweist. Die Stämme PLY246 [pYEX-*yEGFP*] und PLY246 [pYEX-*yEGFP/rKir3.2 [V188G]*] wuchsen zwar ebenfalls schlechter in Medium mit 290 mM NaCl, aber im Vergleich zu PLY246 [pYEX-*yEGFP/rKir3.2 [S177W]*] ist der Wachstumsnachteil wesentlich geringer. Der *yEGFP* exprimierende Stamm wächst noch zu ca. 65%, der *yEGFP/rKir3.2 [V188G]* exprimierende zu fast 100%. Der Stamm PLY246 [pYEX-*yEGFP/rKir3.2 [S177W]*] war also nicht nur gegenüber LiCl sondern auch gegenüber hohen NaCl Konzentrationen sensitiv. Überraschenderweise wuchsen die Stämme PLY246 [pYEX-*yEGFP/rKir3.2*] und PLY246 [pYEX-*yEGFP/rKir3.2 [S177T]*] in Medium mit 290 mM NaCl besser als in Medium ohne NaCl. Das verbesserte Wachstum dieser beiden Stämme in Medium mit NaCl wurde im Folgenden näher untersucht.

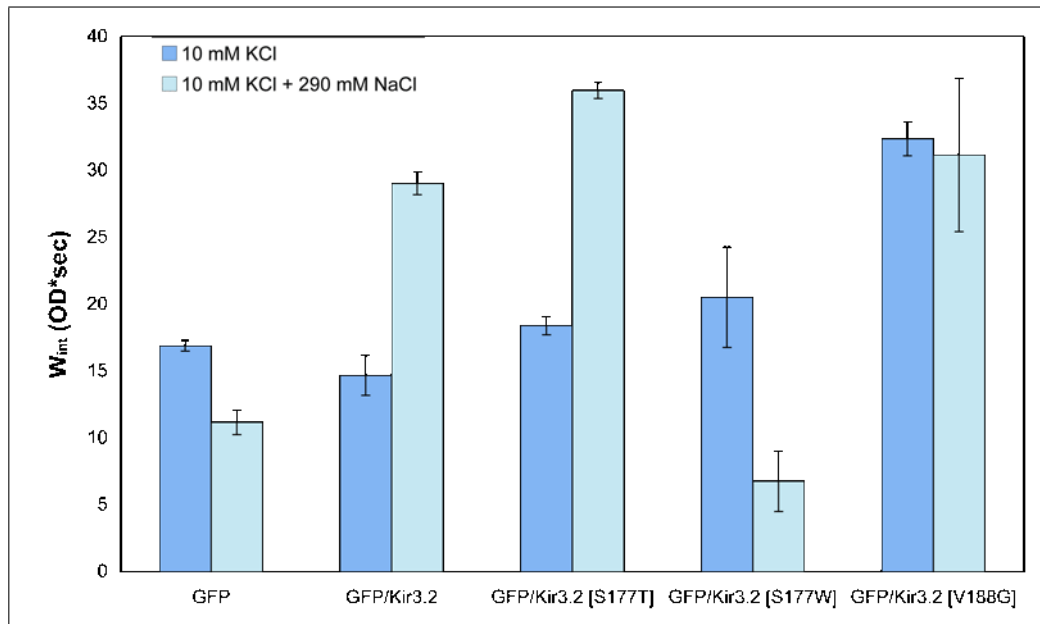


Abbildung 3.27: Wachstumstest von *yEGFP/rKir3.2 [S177W]* bzw. *-[V188G]* exprimierenden Stämmen in Medien mit 10 mM KCl mit 0 bzw. 290 mM NaCl. Es wurde das Wachstum der Stämme PLY246 [pYEX-yEGFP] (GFP), PLY246 [pYEX-yEGFP/Kir3.2] (GFP/Kir3.2), PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [S177T]] (GFP/Kir3.2 [S177T]), PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [S177W]] (GFP/Kir3.2 [S177W]) und PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [V188G]] (GFP/Kir3.2 [V188G]) in Medien mit 10 mM KCl bzw. 10 mM KCl und 290 mM NaCl untersucht. Aufgetragen wurde der Mittelwert des Integrals unter der Wachstumskurve (W_{int} in OD*sec) aus jeweils drei Replikaten. Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

3.5.4 Untersuchungen zur Ursache des verbesserten Wachstums von *rKir3.2* bzw. *rKir3.2 [S177T]* exprimierenden Stämmen in Medium mit 10 mM KCl durch NaCl Zugabe

Als Ursache des verbesserten Wachstums der Stämme PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2] und PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [S177T]] in Medium mit 290 mM NaCl konnte die erhöhte Osmolarität, die erhöhte Ionenstärke oder aber der direkte Einfluss von Na^+ -Ionen auf den Kanal in Betracht kommen. Welche dieser drei Möglichkeiten der Grund für den Wachstumsvorteil war, wurde durch die im folgenden beschriebenen Tests untersucht.

Ionenstärke und Osmolarität

Als nächstes wurde der Einfluss der Ionenstärke und der Osmolarität auf das Wachstum der Stämme PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2] und [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [S177T]] getestet. Dafür wurden Wachstumstests in Medien mit 10 mM KCl und 0 bzw. 290 mM Cholinchlorid durchgeführt. Bei keinem der getesteten Stämmen führte Cholinchlorid zu einem besseren Wachstum,

im Vergleich zu dem Wachstum im Medium mit nur 10 mM KCl wuchsen beiden Stämmen sogar minimal schlechter. Der Stamm PLY246 [pYEX-yEGFP/Kir3.2] zeigte mit Cholinchlorid sogar ein stark verschlechtertes Wachstum (Abb. 3.28). Somit schien weder die Ionenstärke noch die Osmolarität eine Erklärung für den beobachteten Wachstumsvorteil zu sein.

Demnach scheint der direkte Einfluss von NaCl der Grund für den beobachteten Wachstumsvorteil in Medium mit 10 mM KCl und NaCl im Vergleich zu Medium mit 10 mM KCl ohne NaCl zu sein.

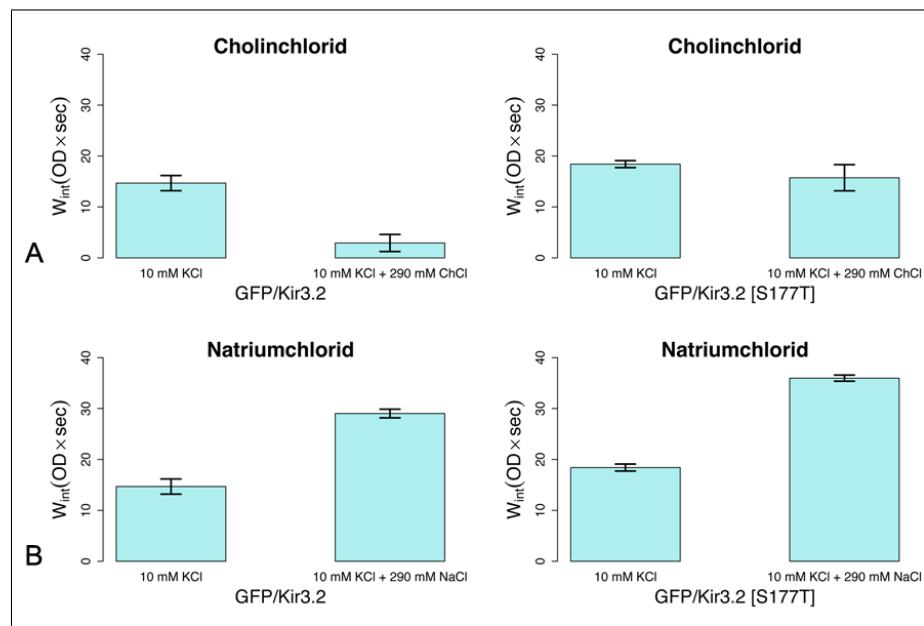


Abbildung 3.28: Untersuchung des Einflusses von Cholinchlorid und Natriumchlorid auf das Wachstum von *yEGFP/Kir3.2* bzw. *yEGFP/rKir3.2* [S177T] exprimierenden Stämmen. Dargestellt ist das Integral unter der Wachstumskurve (W_{int} in $OD \times sec$) der Stämme PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2] und PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [S177T]], gewachsen in Medium mit 10 mM KCl. In **A** wurde das Wachstum in Medium ohne bzw. mit 290 mM Cholinchlorid dargestellt und in **B** das Wachstum in Medium ohne bzw. mit 290 mM NaCl. Es wurde der Mittelwert von drei Replikaten über einen Zeitraum von 15 h aufgetragen, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

In weiteren Tests sollte der positive Effekt von NaCl auf das Wachstum der Stämme PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2] und [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [S177T]] in Medium mit 10 mM KCl genutzt werden, um vor allem auch die Eigenschaften des Kir3.2 Wildtyps in Hefe untersuchen zu können. Mit Medium mit 10 mM KCl und 100 mM NaCl wurden Bedingungen gefunden, unter denen die Stämme PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2] und [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [S177T]] ähnlich gut wie in Medium mit 290 mM NaCl wuchsen. Das Wachstum des Stamms PLY246 [pYEX-

yEGFP/rKir3.2 [S177W]] in Medium mit 10 mM KCl und 100 mM NaCl war aber im Gegensatz zu Medium mit 290 mM NaCl nicht signifikant schlechter.

3.5.5 Pharmakologische Untersuchungen

3.5.5.1 Untersuchung des Einflusses von Ba²⁺ auf rKir3.2 bzw. rKir3.2-Mutanten exprimierende Hefestämme

Der Einfluss eines bekannten K⁺-Kanalinhitors, Ba²⁺ (Proks *et al.*, 2003) wurde getestet, um zu untersuchen inwieweit rKir3.2-Kanäle (bzw. deren Varianten) in Hefezellen auch pharmakologisch untersucht werden können. Dazu wurde wieder das Wachstum von PLY246-Stämmen, welche die entsprechenden rKir3.2-Gene exprimierten, im Vergleich zum Kontrollstamm (yEGFP exprimierend) in Medien mit 10 mM KCl und unterschiedlichen BaCl₂-Konzentration untersucht (Abb. 3.29). Um die Offenwahrscheinlichkeit des rKir3.2 „Wildtyp“-Kanals zu erhöhen und somit die Untersuchung überhaupt zu ermöglichen, wurden Medien verwendet, die 100 mM NaCl enthielten. Mit steigender BaCl₂-Konzentration (im Bereich von 0 μM - 1000 μM) wurde das Wachstum der rKir3.2 bzw. rKir3.2-Mutanten exprimierenden Stämme (PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2], PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [S177T]], PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [S177W]], PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [V188G]]) inhibiert, während das Wachstum des Kontrollstammes PLY246 [pYEX-yEGFP] nicht beeinflusst wurde. Die Stämme (PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2], PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [S177T]], PLY246 [pYEX-yEGFP/rKir3.2 [S177W]]) reagierten ähnlich sensitiv, während das Wachstum des rKir3.2 [V188G] exprimierenden Stammes weniger inhibiert wurde.

3.5.5.2 Untersuchung des Einflusses von Hygromycin B auf rKir3.2 bzw. rKir3.2-Mutanten exprimierende Hefestämme

Hygromycin B ist ein positiv geladenes toxisches Molekül, dessen Aufnahme in die Zelle von der elektrischen Membranspannung (auch Membranpotential bezeichnet) abhängt (Perlin *et al.*, 1988; Madrid *et al.*, 1998). Je hyperpolarisierter die Plasmamembran ist, desto empfindlicher sind die Zellen für Hygromycin B. In Hefe funktionell vorliegende K⁺-Kanäle erhöhen die Leitfähigkeit für K⁺ (verglichen mit dem yEGFP exprimierendem Kontrollstamm) und depolarisieren dadurch die Plasmamembran. Dementsprechend sollten die funktionell rKir3.2

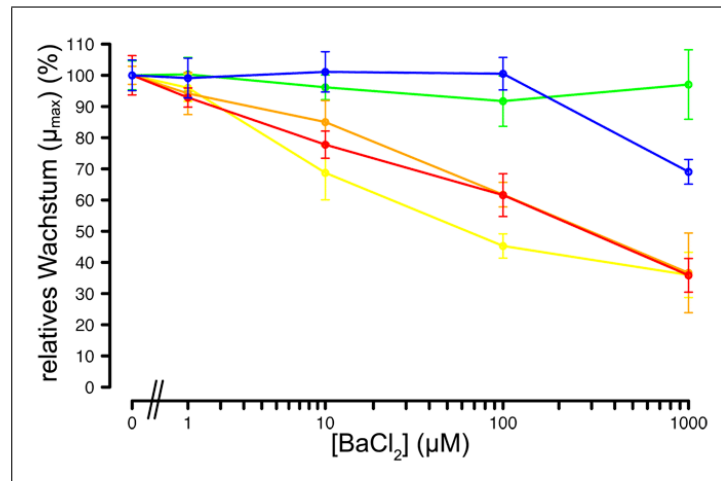


Abbildung 3.29: Einfluss von Ba²⁺ auf das Wachstum von *rKir3.2* (-Mutanten) exprimierenden Hefestämmen. Es wurde das relative Wachstum, berechnet aus μ_{max} in %, gegen die BaCl₂ Konzentration in μ M aufgetragen. Betrachtet wurden die Stämme PLY246 [pYEX-yEGFP] (**grün**), PLY246 [pYEX-yEGFP/*rKir3.2*] (**gelb**), PLY246 [pYEX-yEGFP/*rKir3.2* [S177T]] (**orange**), PLY246 [pYEX-yEGFP/*rKir3.2* [S177W]] (**rot**) und PLY246 [pYEX-yEGFP/*rKir3.2* [V188G]] (**blau**). Es wurden sechs (0, 1, 1000 μ M BaCl₂) bzw. neun (10, 100 μ M BaCl₂) Replikate aus drei Versuchen ausgewertet, eingezeichnet ist die jeweilige Standardabweichung.

(-Mutanten) exprimierenden Stämme weniger empfindlich gegenüber Hygromycin B sein als der *yEGFP* exprimierende Kontrollstamm. Mit Hygromycin B konnte also ebenfalls die Funktionalität von *rKir3.2* und den schon beschriebenen *rKir3.2*-Mutanten in Hefe untersucht werden (Abb. 3.30).

Es wurden Wachstumstests (Abb. 3.30 A) in Medien mit 20 mM KCl und steigenden Hygromycin B Konzentration durchgeführt. 20 mM KCl wurden verwendet, um auch ein gutes Wachstum des Kontrollstamms zu gewährleisten. Die Tests ergaben, dass der Kontrollstamm (*yEGFP*) und der *yEGFP/rKir3.2* exprimierende Stamm mit EC₅₀-Werten von ca. 3 μ M am empfindlichsten gegenüber Hygromycin B waren. Die *yEGFP/rKir3.2* [S177T] und *yEGFP/rKir3.2* [S177W] exprimierenden Stämme waren mit Hygromycin B EC₅₀-Werten von 6 μ M bzw. 8 μ M etwas weniger empfindlich und der *yEGFP/rKir3.2* [V188G] exprimierende Stamm wies mit einem EC₅₀-Wert von 130 μ M die geringste Hygromycin B Empfindlichkeit auf.

Wurden entsprechende Wachstumstests in Medien mit 20 mM KCl und 100 mM NaCl durchgeführt, ergab sich ein verändertes Bild (Abb. 3.30 B). Der *yEGFP/rKir3.2* exprimierende Stamm (EC₅₀: 40 μ M) reagierte im Vergleich zu dem *yEGFP* exprimierendem Stamm (EC₅₀: 8 μ M) deutlich weniger sensitiv auf Hygromycin B. Noch weniger empfindlich waren die

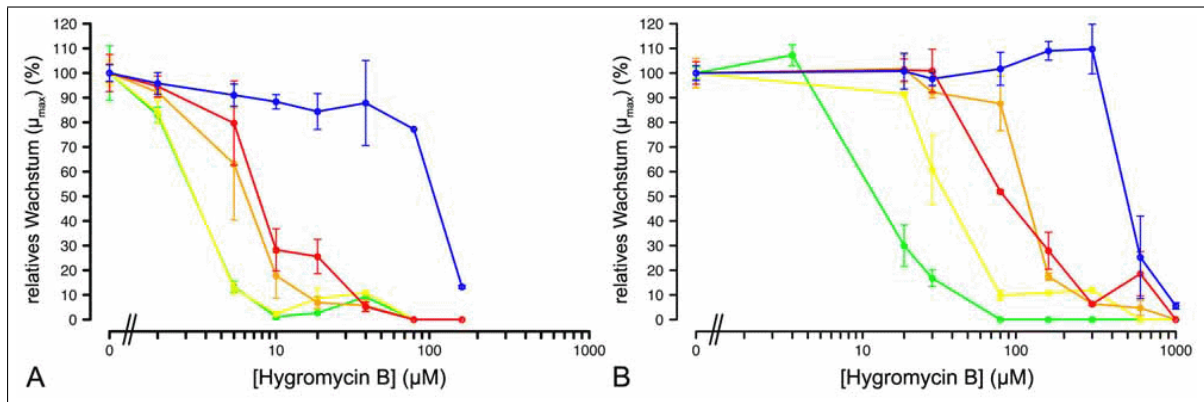


Abbildung 3.30: Wachstum von *rKir3.2* (-Mutanten) exprimierenden Hefestämmen in Medium mit 20 mM KCl ohne und mit 100 mM NaCl und unterschiedlichen Hygromycin B Konzentrationen. Gearbeitet wurde mit den Stämmen PLY246 [pYEX-yEGFP] (grün), PLY246 [pYEX-yEGFP/*rKir3.2*] (gelb), PLY246 [pYEX-yEGFP/*rKir3.2* [S177T]] (orange), PLY246 [pYEX-yEGFP/*rKir3.2* [S177W]] (rot) und PLY246 [pYEX-yEGFP/*rKir3.2* [V188G]] (blau). Dargestellt ist das relative Wachstum in % gegen die Hygromycin B Konzentration in μM . **A** stellt das Wachstum der in Medium ohne NaCl gewachsenen Stämme dar, **B** zeigt die Ergebnisse der Stämme, welche in Medium mit 100 mM NaCl wuchsen. Es wurde der Mittelwert von sechs Replikaten aus zwei Versuchen über einen Zeitraum von 15 h aufgetragen, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

yEGFP/rKir3.2 [S177T] und *yEGFP/rKir3.2*[S177W] exprimierenden Stämme: die entsprechenden EC_{50} -Werte betragen 130 μM bzw. 80 μM . Somit war der *yEGFP/rKir3.2* [S177T] exprimierende Stamm der weniger empfindlichere der beiden. Die mit Abstand geringste Hygromycin B-Empfindlichkeit hatte wiederum der *yEGFP/rKir3.2* [V188G] exprimierende Stamm mit einem EC_{50} -Wert von 500 μM .

Vergleicht man das Wachstum der *yEGFP*, *yEGFP/rKir3.2* bzw. mutiertes *yEGFP/rKir3.2* exprimierenden Stämme gewachsen in Medien ohne NaCl mit dem Wachstum der entsprechenden Stämme in Medien mit 100 mM NaCl, zeigt sich bei allen Stämmen eine tendenziell geringere Hygromycin B-Empfindlichkeit, wenn die Stämme in Medien mit 100 mM NaCl gewachsen sind. Besonders ausgeprägt ist diese Empfindlichkeit bei *yEGFP/rKir3.2* bzw. *yEGFP/rKir3.2*[S177T] exprimierenden Stämmen, die bei 100 mM NaCl aktiviert werden. Auch bei dem *yEGFP/rKir3.2* [S177W] exprimierendem Stamm, von dem gezeigt wurde, dass eine reduzierte K^+ -Selektivität vorliegt, war eine starke Verringerung der Empfindlichkeit zu beobachten, die möglicherweise auf durch Na^+ -Einstrom vermittelte Depolarisation zurückzuführen war.

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch *Kir3.2* (-Mutanten) im Hefesystem untersucht werden können. Außerdem wurden mit Wachstumstest in Medien mit NaCl eine Möglichkeit geschaffen auch den nativen *Kir3.2* Kanal in Hefe zu untersuchen.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Eignung von *S. cerevisiae* als heterologes Expressionssystem zur schnellen und einfachen Untersuchung von K⁺-Kanälen getestet. Es wurden K⁺-Kanäle verschiedener Familien untersucht, die sich durch verschiedene Öffnungsmechanismen und Eigenschaften unterscheiden.

4.1 Lokalisationsanalysen

In Eukaryonten werden integrale Membranproteine am rauhen endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, teilweise modifiziert und über den Golgi-Apparat, in welchem häufig weitere kovalente Modifikationen stattfinden, zur Plasmamembran transportiert. Der Transport zwischen den einzelnen Kompartimenten und der Plasmamembran erfolgt vesikulär (Übersicht bei [Alberts et al., 1995](#)).

Da es sich bei dem Transport von integralen Membranproteinen vom ER über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran um einen komplexen Vorgang handelt, an dem eine Vielzahl von Proteinen beteiligt ist, ist eine Expression heterologer Membranproteine mit Schwierigkeiten verbunden (Übersicht bei [Tate, 2001](#)). So waren die Fusionsproteine häufig nur in Kompartimenten wie dem ER oder dem Golgi-Apparat zu erkennen.

Lokalisationsanalyse von rEAG1 (-Mutanten)

Die Lokalisation der in Hefe heterolog exprimierten K⁺-Kanal α -Untereinheiten wurde durch Verwendung von GFP bzw. yEGFP-Fusionsproteinen fluoreszenzmikroskopisch untersucht ([Ward and Bokman, 1982](#); [Prasher et al., 1992](#); [Kain et al., 1995](#); [Niedenthal et al., 1996](#); [Cormack et al., 1997](#)). Als Positivkontrolle für Plasmamembran-Lokalisierung wurde die Fluoreszenz von Trk1 oder auch Trk2 (Hefe eigene K⁺-Transporter) fusioniert mit yEGFP verwendet, von der anzunehmen ist, dass sie die Plasmamembran markiert ([Zeng et al., 2004](#)). Die Expression von *rEAG1/yEGFP* bzw. *rEAG1 Δ 190/yEGFP* führt zu einer randständigen Fluoreszenz (Abb. 3.1, Seite 54), die der von yEGFP/TRK1 bzw. yEGFP/TRK2 stark ähnelt. Demnach scheinen die beiden Fusionsproteine *rEAG1/yEGFP* bzw. *rEAG1 Δ 190/yEGFP* ebenfalls in der Plasmamembran lokalisiert zu sein.

Desweiteren wurde die Fluoreszenz zweier *rEAG1 Δ 190/yEGFP* „Calmodulin-Bindestelle“-Mu-

tanten untersucht. Diese Mutationen (*rEAG1Δ190 [F714S, F717S]* (*rEAG1Δ190 FS*) und *rEAG1Δ190 [R711Q, R712Q, R716Q, R718Q]* (*rEAG1Δ190 RQ*)) verringern nach Schönherr *et al.* (2000) die Inhibierung des Kanals durch Calcium/Calmodulin ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$). Überraschenderweise war in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der *rEAG1Δ190 FS/yEGFP* bzw. *rEAG1Δ190 RQ/yEGFP* exprimierenden Stämme jedoch keine Markierung der Membran sondern „bananenförmig“ fluoreszierende Strukturen innerhalb der Zelle zu erkennen (Abb. 3.3, Seite 57). Mit Hilfe der „Yeast Protein Localization Database“ (YPL.db <http://ypl.uni-graz.at/pages/home.html>) konnte eine Lokalisation in Kompartimenten wie z. B. dem Golgi-Apparat, den Endosomen oder den Peroxisomen ausgeschlossen werden, da GFP-Fusionsproteine, die in diesen Kompartimenten lokalisiert sind, ein punktförmiges Muster haben. Bei der beobachteten Fluoreszenzverteilung handelt es sich wahrscheinlich auch nicht um eine Lokalisation in den Mitochondrien, da Fusionsproteine, die in diesem Kompartiment lokalisiert sind, größtenteils in der Nähe der Plasmamembran lokalisiert sind, während im vorliegenden Fall die fluoreszierenden Bereiche im Zellinneren vorliegen. Es handelt sich somit möglicherweise um in „ER-Karmellae“ akkumulierte Fusionsproteine. Dabei handelt es sich um Stapel von ER-Zisternen, die auch unter dem Begriff „crystalloid ER“ bekannt sind. Die Überexpression einzelner Proteine, speziell auch von Membranproteinen, kann zur Bildung dieser „ER-Karmellae“ führen (Wright, 1993; Snapp *et al.*, 2003). Die unterschiedliche Lokalisation von *rEAG1/yEGFP* bzw. *rEAG1Δ190/yEGFP* und den CaM-Bindestellen-Mutanten könnte möglicherweise auf geringe Strukturveränderungen durch die Mutationen zurückzuführen sein. Bei *rEAG1Δ190 FS/yEGFP* wurden zwei große, hydrophobe Phenylalaninreste im cytoplasmatischen Bereich des C-Terminus durch kleine polare Serinreste ersetzt. Bei *rEAG1Δ190 RQ/yEGFP* wurden (ebenfalls im cytoplasmatischen Bereich des C-Terminus) vier stark positiv geladene Aminosäuren (Arginin) durch schwach positiv geladene (Glutamin) ersetzt. Beide Änderungen könnten dazu führen, dass die Faltung der Kanalproteine gestört wird und diese falsch gefalteten Proteine wiederholt die „unfolded protein response“ (UPR) im ER durchlaufen, einen Mechanismus, der eingeschaltet wird, damit akkumulierte, falsch gefaltete Proteine im ER erneut bearbeitet werden, um doch noch korrekt gefaltet das ER verlassen zu können (Überblick bei Patil and Walter (2001) und Spear and Ng (2001)). Durch UPR wird unter anderem die Expression von im ER lokalisierten Chaperonen erhöht, welche eine wichtige Rolle bei der Faltung und Glykosylierung von Proteinen spielen. Ein sogenannter Calnexin/Calreticulin-

Zyklus unterstützt hierbei die Faltung von Glykoproteinen und hält nicht richtig gefaltete Glykoproteine solange im ER zurück, bis sie korrekt gefaltet sind (Hammond and Helenius, 1995; Überblick bei Ellgaard and Helenius, 2003). In Hefe spielt das zu Calnexin und Calretikulin homologe Chaperon CNE1 (de Virgilio *et al.*, 1993; Parlati *et al.*, 1995) eine wichtige Rolle bei der Qualitätskontrolle im ER (Knop *et al.*, 1996). Prinz *et al.* (2003) zeigten, dass die Menge eines heterolog exprimierten Transmembran-Proteins, des humanen Transferrin Rezeptors (TfR), in der Plasmamembran abhängig von der Präsenz von CNE1 war.

Endgültig nicht korrekt gefaltete Proteine werden schließlich durch ER-assoziierte Degradation (ERAD) abgebaut. Dieses Kontrollsystem hat die Aufgabe Proteine, die am rauhen ER synthetisiert werden, auf korrekte Faltung, Assemblierung und Glykosylierung zu überprüfen. Defekte Proteine werden durch Export ins Cytoplasma den Proteasomen für einen dortigen Abbau zugeführt (Überblick bei Ellgaard and Helenius, 2003 und Jarosch *et al.*, 2003; Brodsky and McCracken, 1999; Schäfer and Wolf, 2005). Allerdings spricht gegen ERAD als Ursache für die Fluoreszenzverteilung, dass im Cytoplasma keine Fluoreszenz zu erkennen war. Würden die Proteine den Proteasomen zugeführt, sollte dies zumindest transient der Fall sein. Somit scheint eine Ansammlung der rEAG1 Δ 190-CaM-Bindestellen-Mutanten in der „ER-Karmellae“ am wahrscheinlichsten.

Lokalisation von Kir2.1- und Kir3.2-Varianten

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der *yEGFP/mKir2.1* exprimierenden Hefezellen zeigten eine ähnlich verteilte Fluoreszenz wie die *yEGFP/rKir3.2* exprimierenden Hefezellen. Bei beiden Stämmen waren sowohl in der Zellperipherie als auch cytoplasmatisch ringförmig fluoreszierende Strukturen zu erkennen. Der randständig liegende, fluoreszierende Bereich war im Gegensatz zu der im Zellinneren liegenden Ringstruktur nicht durchgängig (Abb. 3.11, Seite 68 bzw. Abb. 3.23, Seite 81). Das weist auf das ER hin, da in *S. cerevisiae* das ER sowohl um den Nukleus als auch direkt an der Plasmamembran lokalisiert ist (Abb. 4.1, Seite 93). Die erhaltene Fluoreszenzverteilung ist auch ähnlich der, die Burri *et al.* (2003) durch Expression eines mit GFP fusionierten permanent in der ER-Membran lokalisiertem Protein (Slt1) erhielten. Auch der Vergleich mit den Aufnahmen aus der YPL.de Datenbank spricht für eine Lokalisation von *yEGFP/mKir2.1* bzw. *yEGFP/rKir3.2* im ER der Hefezellen.

Weitere Klarheit sollte eine Koexpression von *yEGFP/mKir2.1* mit einem ER-markierendem

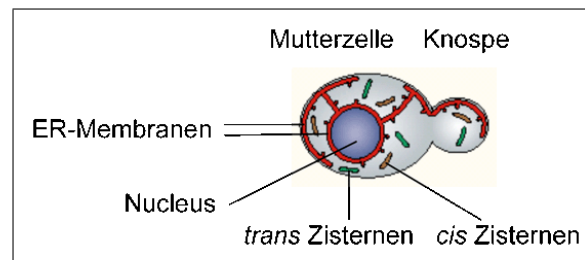


Abbildung 4.1: ER-Verteilung in *S. cerevisiae*. Schematische Darstellung der Verteilung des endoplasmatischen Retikulums (ER) in *S. cerevisiae* (nach Glick, 2002).

Gen geben. Dieses „ER-Marker-Gen“ besteht aus einer N-terminalen Signalsequenz gefolgt von *mRFP* (Campbell *et al.*, 2002) und dem ER-Retentionssignal HDEL (Pelham *et al.*, 1988; Überblick bei Pelham, 1995) (*sig/mRFP/HDEL*, Abb. 3.12, Seite 69). Diese Koexpressionsversuche führten jedoch nicht zu eindeutigen Ergebnissen. Die Fluoreszenz der Fusionsproteine *yEGFP/mKir2.1* bzw. *sig/mRFP/HDEL* war nicht gleichmäßig intensiv. Dadurch gab es kaum Zellen, in denen beide Fusionsproteine deutlich zu erkennen waren (Abb. 3.13, Seite 69). Dennoch gaben auch diese Versuche zusätzliche Hinweise auf eine Lokalisierung des *yEGFP/mKir2.1* Fusionsproteins im ER.

Des Weiteren wurde mit klinisch relevanten *mKir2.1* Mutanten (*mKir2.1* [R67W], [D71V], [S136F] bzw. [G144S]) gearbeitet, die Ursache für das Andersen Syndrom sind. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der *yEGFP/mKir2.1*-Mutanten exprimierenden Hefezellen ergaben eine ähnlich verteilte Fluoreszenz wie bei der Expression des Wildtyps *yEGFP/mKir2.1* (Abb. 3.11, Seite 68). Demnach haben die „Andersen Mutationen“ auch in Hefe keinen Einfluß auf „protein trafficking“. Bendahhou *et al.* (2003) zeigten ebenfalls eine Kollokalisierung von *Kir2.1* und *Kir2.1*-Andersen Mutanten in HEK293-Zellen. Die gezeigte Kollokalisierung ist eine wichtige Voraussetzung zur Untersuchung der klinisch relevanten *Kir2.1* Mutationen in *S. cerevisiae*.

Es wurde ebenfalls die Lokalisation von *yEGFP/rKir3.2* bzw. *yEGFP/rKir3.2*-Mutanten (*rKir3.2* [G156S], [S177T], [S177W] bzw. [V188G]) exprimierenden Hefestämme untersucht und verglichen. Auch in diesem Fall liegt eine ähnliche Fluoreszenzverteilungen der *yEGFP/rKir3.2*-Mutanten und des *yEGFP/rKir3.2*-Wildtyp vor (Abb. 3.23, Seite 81).

Lokalisationsanalyse von hKCNE3

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die Lokalisation von hKCNE3, einer β -Untereinheit mit nur einer Transmembrandomäne, untersucht. Es wird angenommen, dass der N-Terminus von hKCNE3 extrazellulär liegt und der C-Terminus intrazellulär (Schroeder *et al.*, 2000b; Abbott *et al.*, 2001; Abbott and Goldstein, 2001, 2002). Somit müsste nach der Synthese des Proteins in das ER der N-Terminus ins ER-Lumen und der C-Terminus ins Cytoplasma gerichtet sein (Hirschberg and Snider, 1987). Ein Protein, das sich mit dem N-Terminus im Lumen des ER befindet und eine Transmembrandomäne enthält, kann auf zwei verschiedene Weisen in die ER-Membran inseriert werden (von Heijne and Gavel, 1988). Eine Möglichkeit ist, dass der co-translationale Translokationsprozess durch ein N-terminal gelegenes Signalpeptid („Start-Transfer-Peptid“) eingeleitet wird. Zusätzlich enthält die Proteinsequenz dann noch ein „Stop-Transfer-Peptid“, welches das Protein in der Membran verankert, nachdem das „Start-Transfer-Peptid“ abgespalten wurde. Bei der zweiten Möglichkeit wird eine interne, hydrophobe Signalsequenz N-terminal von negativ geladenen und C-terminal von positiv geladenen Aminosäuren umschlossen. Das Protein wird mit den negativen Aminosäuren in den Translokator geleitet. Diese Aminosäuren befinden sich nun, genau wie der N-Terminus des Proteins auf der luminalen Seite des ERs. Der hydrophobe Bereich bildet die Transmembrandomäne und die positiven Aminosäuren sind ins Cytosol gerichtet. In diesem Fall wird das Signalpeptid nicht abgespalten (Walter and Lingappa (1986), Überblick bei Gilmore, 1991 und Simon, 1993; Gafvelin *et al.* (1997)).

In hKCNE3 konnte keine N-terminale Signalsequenz identifiziert werden, in der hKCNE3-Aminosäuresequenz gibt es aber zwei negative Aminosäuren, danach einige hydrophobe Aminosäuren, die von positiv geladenen Aminosäuren gefolgt werden (Abb. 4.2, Seite 95). Dies macht die zweite Möglichkeit, d. h. die Translokation des N-Terminus in das Lumen des ERs ohne Abspaltung des Signalpeptids wahrscheinlich. Somit dürfte weder N- noch C-terminal fusioniertes yEGFP abgespalten werden. Eine Untersuchung der Lokalisation von hKCNE3 ist somit sowohl über N- als auch C-terminal fusioniertes yEGFP möglich.

Die Expression von *hKCNE3/yEGFP* bzw. *yEGFP/hKCNE3* in Hefezellen (Abb. 3.6, Seite 62) ergab eine ähnliche Verteilung wie sie schon bei *yEGFP/mKir2.1* und *yEGFP/rKir3.2* beobachtet wurde. Somit scheinen auch diese beiden hKCNE3-Fusionsproteine im wesentlichen im ER lokalisiert zu sein.

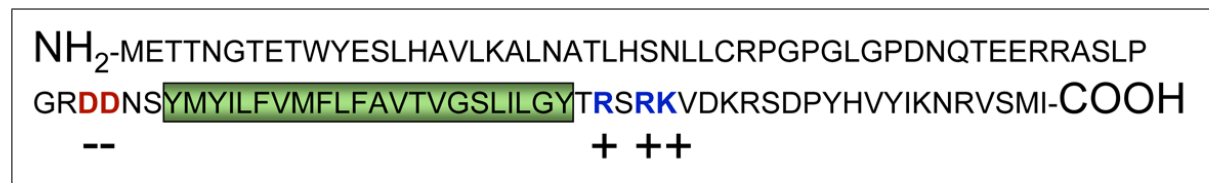


Abbildung 4.2: Aminosäuresequenz von hKCNE3. In grün hinterlegt ist die potentielle, stark hydrophobe Signalsequenz (entspricht der Transmembrandomäne), in rot sind negativ geladenen Aminosäuren, in blau die positiv geladenen Aminosäuren dargestellt. Entscheidend für die Ausrichtung der Transmembrandomäne sind die geladenen Aminosäuren vor und hinter der Signalsequenz. Nach der „positive inside rule“ sollten die negativ geladenen Aminosäuren in das Lumen des ER ragen und die positiven in das Cytoplasma (von Heijne and Gavel, 1988; Überblick bei Alberts *et al.*, 1995). Somit sollte bei hKCNE3 der N-Terminus ins ER-Lumen und der C-Terminus ins Cytoplasma ragen.

Es wurde untersucht, ob ein ER-Retentionssignal die Ursache für die Lokalisierung von hKCNE3 im ER ist. Plasmamembran-Proteine besitzen keine speziellen Lokalisationssignale, da der Transport vom ER zur Plasmamembran ein Standardweg („default pathway“) ist (Jackson *et al.*, 1990). Dagegen besitzen Proteine, die in intrazellulären Kompartimenten wie z. B. den Mitochondrien oder Peroxisomen lokalisiert sind, bestimmte Lokalisationssignale (von Heijne, 1990). ER-Proteine werden, wenn sie das ER verlassen, vom *cis*-Golgi-Netz aus wieder zurücktransportiert. Diese Proteine enthalten sogenannte ER-Retentionssignale, die von Rezeptoren im *cis*-Golgi-Netz erkannt werden und für einen vesikulären Rücktransport in COPI-Vesikeln zum ER sorgen (Pfeffer and Rothman, 1987; Pelham, 1991; Lippincott-Schwartz, 1993; Cosson and Letourneur, 1994). Bekannte ER-Retentionssignale sind z. B. [HK]DEL oder KKXX (Pelham, 1988; Nilsson *et al.*, 1989; Jackson *et al.*, 1990), sowie RKR, das im K⁺-Kanal Kir6.2 identifiziert wurde (Zerangue *et al.*, 1999). Im cytoplasmatischen Bereich des C-Terminus von hKCNE3 befindet sich das Tripeptid RSR. RSR als ER-Retentionssignal wurde in der GB1-Untereinheit des GABA_B-Rezeptors nachgewiesen (Margeta-Mitrovic *et al.*, 2000). Mit Hilfe von Deletions- und Mutationsanalysen wurde untersucht, ob RSR in Hefe als ER-Retentionssignal für hKCNE3 fungiert. Die Deletion der Aminosäuren 81 bis 103 führte in *yEGFP/hKCNE3ΔC* exprimierenden Zellen zu einer intensiven, randständigen, gleichmäßigen Verteilung der Fluoreszenz (Abb. 3.8, Seite 63). Die Doppelmutation R81A und R83A führte im *yEGFP/hKCNE3* ASA exprimierenden Stamm zu einer gleichmäßigen, randständigen Fluoreszenz, kombiniert mit einer Akkumulation weiterer Fluoreszenz im Zellinneren (Abb. 3.8, Seite 63). Bei dieser im Zellinneren vorliegenden Fluoreszenz handelt es sich wahrscheinlich um eine Lokalisierung im ER um den Kern, welches sich aufgrund der Überexpression des Proteins dort ansammelt. Die

Verteilung der yEGFP fusionierten Deletions- bzw. Doppelmutations-Mutante in der Zellperipherie ähnelt der von yEGFP/TRK1 bzw. yEGFP/TRK2 und lässt auf eine Lokalisation in der Plasmamembran schließen.

Insgesamt scheint demnach RSR in *S. cerevisiae* als ER-Retentionssignal erkannt zu werden.

Verteilung von hKCNQ2, hKCNQ3 und hKCNQ1

Fluoreszenzmikroskopische Analysen der *hKCNQ2/yEGFP* als auch *hKCNQ3/yEGFP* exprimierenden Stämme ergaben eine punktförmig verteilte Lokalisation (Abb. 3.4, Seite 59). Dieses Verteilungsmuster zeigen Fusionsproteine, die z. B. im Golgi-Apparat, in Mitochondrien, Peroxisomen oder Endosomen lokalisiert sind (Rossanese *et al.*, 1999; Huh *et al.*, 2003; Erdmann and Blobel, 1995; Kumar *et al.*, 2002). Bei *hKCNQ3/yEGFP* exprimierenden Zellen scheinen die Fusionsproteine im Golgi-Apparat lokalisiert zu sein, da die punktförmige Verteilung der Fluoreszenz am Zellrand und in der Zelle für dieses Kompartiment typisch ist (Rossanese *et al.*, 1999). Bei den *hKCNQ2/yEGFP* exprimierenden Zellen ist eine Zuordnung der Fluoreszenzverteilung nicht eindeutig, da die punktförmige Verteilung nicht über die ganze Zelle verteilt ist, sondern nah der Plasmamembran lokalisiert ist.

Auch hKCNQ2/yEGFP könnte im Golgi-Apparat lokalisiert sein. Eine Lokalisierung in den Mitochondrien, Peroxisomen oder Endosomen ist aber nach Vergleich mit den Daten der YPL.db nicht auszuschließen. Einige integrale Proteine der inneren Mitochondrienmembran werden zwar von mitochondrialen Ribosomen synthetisiert, viele Proteine werden aber auch an cytosolischen Ribosomen gebildet (Übersicht bei Hartl and Neupert, 1990). Damit mitochondriale und peroxisomale Proteine in das jeweilige Kompartiment gelangen, sind spezielle Lokalisierungssignale notwendig (Alberts *et al.*, 1995). Für einen Transport zu den Peroxisomen ist ein carboxyterminal gelegenes Lokalisierungssignal (Aminosäure-Abfolge: SKL) notwendig, welches in hKCNQ2 nicht enthalten ist. Somit ist eine Lokalisation in den Peroxisomen relativ unwahrscheinlich. Ein Transport zu den Mitochondrien erfordert alternierend positiv geladene und hydrophobe Aminosäuren. Auch diese sind in der Sequenz von hKCNQ2 nicht vorhanden, eine Lokalisation in den Mitochondrien ist daher auch unwahrscheinlich. Die Lokalisation in Endosomen ist ebenfalls unwahrscheinlich, da der Transport dorthin über Vesikel aus der Plasmamembran erfolgt und keine Fusionsproteine in der Plasmamembran beobachtet wurden.

Insgesamt erscheint die Lokalisation von hKCNQ2/yEGFP im Golgi-Apparat am wahrschein-

lichsten.

Wang *et al.* (1998), Cooper *et al.* (2000) und Rogawski (2000) zeigten, dass KCNQ2 und KCNQ3 heteromere Kanäle bilden. Fluoreszenzmikroskopische Analysen wurden durchgeführt, um zu kontrollieren, inwieweit die Koexpression der beiden Proteine deren Lokalisation beeinflusst. Die Transkription beider Gene (*hKCNQ2/yEGFP* und *hKCNQ3*) wurde mit „Northern Blots“ und anschließender Hybridisierung mit *hKCNQ2*- bzw. *hKCNQ3*-spezifischen Sonden nachgewiesen (Abb. 3.5, Seite 60). Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen führten zu keiner eindeutigen Veränderung der Lokalisation von *hKCNQ2/yEGFP* bei Koexpression mit *hKCNQ3* (Abb. 3.4, Seite 59).

KCNQ1- α - und KCNE3- β -Untereinheiten bilden einen heteromeren Kanal (Schönherr *et al.*, 2000). Es wurde die Fluoreszenz von *hKCNQ1/yEGFP* allein als auch koexprimiert mit *hKCNE3* untersucht. Bei der Expression von *hKCNQ1/yEGFP* war eine schwache cytoplasmatische Fluoreszenz zu erkennen (Abb. 3.6, Seite 62). Dabei handelt es sich nicht um intrazelluläre Kompartimente oder die Plasmamembran. Grund für diese Fluoreszenz könnte eine Translation der Proteine im Cytosol sein, indem z. B. die Signalsequenzen des Membranproteins nicht erkannt wurden. Somit könnten die Proteine nicht in den für Membranproteine typischen vesikulären Weg vom ER über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran gelangen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass es sich um Proteine handelt, die von Proteasomen im Cytosol abgebaut werden.

Auch durch die Koexpression von *hKCNE3* mit *hKCNQ1/yEGFP* änderte sich die Fluoreszenzverteilung nicht (Abb. 3.9, Seite 64). Ebenso ergab die Koexpression von *hKCNQ1* und *hKCNE3/yEGFP* die gleiche Fluoreszenzverteilung wie die Expression von *hKCNE3/yEGFP* alleine. Da die Transkription der jeweiligen Gene in beiden *hKCNQ1* und *hKCNE3* exprimierenden Stämmen nachgewiesen wurde (Abb. 3.9, Seite 64), scheinen sich *hKCNE3* und *hKCNQ1* in Hefe nicht zusammenzulagern. McDonald *et al.* (1997) zeigten, dass *KCNE1*, ein wie *KCNE3* zur Familie der *KCNE* β -Untereinheiten gehörendes Protein, sich mit *HERG*, wie *KCNQ1* eine α -Untereinheit eines auswärts-gleichrichtenden K^+ -Kanals, schon früh während der Proteinsynthese zusammenlagert. Würde die Translation von *hKCNQ1* tatsächlich im Cytosol geschehen, könnte es zu keiner Zusammenlagerung von *hKCNQ1* und *hKCNE3* in der frühen Phase der Proteinsynthese kommen, da sich *hKCNE3* und *hKCNQ1* in unterschiedlichen Kompartimenten befinden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass viele der Fusionsproteine nach der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung scheinbar nicht in der Plasmamembran lokalisiert waren. Es ist aber nicht auszuschließen, dass vereinzelt K^+ -Kanäle in die Plasmamembran eingebaut wurden. Um dies zu klären wären elektronenmikroskopische Untersuchungen notwendig. Mit K^+ -Aufnahme defekten *S. cerevisiae* Stämmen als Expressionssystem wurden bereits die K^+ Kanäle KAT1 und AKT1 aus *Arabidopsis thaliana* identifiziert (Anderson *et al.*, 1992; Sentenac *et al.*, 1992; Anderson *et al.*, 1994). Tang *et al.* (1995), Zaks-Makhina *et al.* (2004) und Hasenbrink *et al.* (2005) zeigten Ergebnisse von Wachstumstests mit in K^+ -Aufnahme defekten *S. cerevisiae* Stämmen heterolog exprimiertem *Kir2.1*, die für funktionell vorliegenden Kanäle in der Plasmamembran sprechen. Somit konnte nur über die Funktion, nicht aber durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen Hinweise auf eine Lokalisierung in der Plasmamembran erbracht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte fluoreszenzmikroskopisch die Lokalisation von rEAG1/yEGFP, rEAG1 Δ 190/yEGFP als auch yEGFP/hKCNE3 ASA und yEGFP/hKCNE3 Δ C gezeigt werden. Die Beobachtung, dass ein Großteil heterolog exprimierter Proteine im ER lokalisiert ist, wurde schon bei einer Vielzahl von heterolog exprimierten Transportern und Kanälen in *S. cerevisiae* gemacht (Prinz *et al.*, 2003; Villalba *et al.*, 1992; Kasahara and Kasahara, 1996; de Kerchove d'Exaerde *et al.*, 1995; Regenbergs *et al.*, 1995; Kasahara and Kasahara, 1997; Kiser *et al.*, 2001). Um diesen Effekt zu verhindern, müssten evtl. Chaperone oder andere Hilfsproteine zusätzlich exprimiert werden.

4.2 Die Funktionalität von K^+ -Kanälen aus Säugern in Hefe

Auswärts-gleichrichtende K^+ -Kanäle

K^+ -Kanäle, die aus KCNQ2- und/oder KCNQ3- α -Untereinheiten zusammengesetzt sind, erzeugen den sogenannten neuronalen Muscarin regulierten K^+ -Strom („M-current“) (Wang *et al.*, 1998; Cooper *et al.*, 2000; Rogawski, 2000). Der „M-current“ ist ein wichtiger Regulator der neuronalen Erregbarkeit (Cooper *et al.*, 2000) und wurde erstmals von Brown and Adams (1980) in peripheralen Neuronen und von Halliwell and Adams (1982) im zentralen Nervensystem (ZNS) beschrieben. Dieser Strom ist ein langsam aktivierender, nicht inaktivierbarer,

spannungsabhängiger K^+ -Strom, der neuronale Membranen in Richtung des Ruhepotentials repolarisiert und dadurch repetitives „Feuern“ verhindert (Brown and Adams, 1980; Marrion, 1997).

In *KCNQ2* als auch in *KCNQ3* sind Mutationen identifiziert worden, welche „benign familial neonatal convulsions“ (BFNC), eine in der frühen Kindheit auftretende Form der Epilepsie, verursachen (Biervert *et al.*, 1998; Schroeder *et al.*, 1998; del Giudice *et al.*, 2000; Dedek *et al.*, 2001; Castaldo *et al.*, 2002). Auch daher sind diese Kanäle als pharmakologische „targets“ interessant und eine Entwicklung effizienter Testsysteme ist erstrebenswert.

Biervert *et al.* (1998) konnten in *KCNQ2* exprimierenden *Xenopus laevis* Oocyten zusätzlich zum Auswärtsstrom auch einen Einwärtsstrom messen. Deshalb wurden Hefewachstumstests in Medium mit geringer KCl-Konzentration durchgeführt. Weder *KCNQ2* bzw. *KCNQ3* allein, noch *KCNQ2* und *KCNQ3* gemeinsam exprimierende Stämme hatten jedoch in Medium mit 10 mM KCl einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Kontrollstamm (Abschnitt 3.2). Entweder sind keine Kanäle in der Plasmamembran lokalisiert, oder aber weder *hKCNQ2* bzw. *hKCNQ3* alleine noch zusammen exprimierende Zellen haben einen Wachstumsvorteil.

Bei Koexpression von *hKCNQ2* und *hKCNQ3* (bei dem durch „Northern Blot“ die Transkription beider Gene gezeigt wurde (Abb. 3.5, Seite 60) ist vorstellbar, dass die Zusammenlagerung heteromerer Kanäle gar nicht oder fehlerhaft erfolgte.

Um definitive Klarheit darüber zu erlangen, ob *hKCNQ2* und/oder *hKCNQ3* in Hefe funktionell vorliegen sollen elektrophysiologische Untersuchung der entsprechenden Stämme durchgeführt werden (Kooperation mit Prof. D. Sanders, York).

Aus der Familie der auswärts-gleichrichtenden K^+ -Kanäle wurde ebenfalls *hKCNQ1* untersucht. Nach Schroeder *et al.* (2000b) bilden *KCNQ1* und *KCNE3* konstitutiv offene K^+ -Kanäle in *Xenopus*-Oocyten.

Wachstumstests (Abb. 3.9, Seite 64), die mit Hefestämmen durchgeführt wurden bei denen durch „Northern Blot“-Analyse die Expression von *hKCNQ1* und *hKCNE3/yEGFP* bzw. *hKCNE3* nachgewiesen worden war, zeigten aber keinen Wachstumsvorteil der *hKCNQ1* und *hKCNE3* koexprimierenden Stämme in Medium mit 10 mM KCl gegenüber Stämmen, welche nur *hKCNQ1*, *hKCNE3* oder *yEGFP* exprimierten.

Dies kann zum einen daran liegen, dass *hKCNQ1* in *S. cerevisiae* nicht korrekt translatiert

oder hKCNQ1 nicht korrekt gefaltet wird (siehe auch 4.1). Bei einer fehlerhaften Faltung von hKCNQ1 könnte hKCNE3 wohl auch nicht an die für ein Zusammenlagern wichtigen Aminosäuren 338 bis 340 von hKCNQ1 (Melman *et al.*, 2004) binden. Wahrscheinlich werden für die korrekte Zusammenlagerung von hKCNQ1- mit hKCNE3-Untereinheiten weitere Proteine benötigt. So konnte Kupershmидt *et al.* (2002) zeigen, dass die Koexpression von *KCNQ1* und *KCNE1* in CHO-Zellen zu einem deutlichen I_{K_s} -Strom führte, während die Koexpression dieser beiden Gene in HEK293 Zellen nur in einigen Zellen zu einem messbaren Strom führte. Kupershmидt *et al.* (2002) identifizierten auch einen potentiellen Bindungspartner für KCNE1. Dieses Protein, fhl2, enthält Cystein reiche Motive, die Zn^{2+} -Finger (LIM Domänen) bilden. Die genaue Funktionsweise dieses Proteins ist noch nicht bekannt. War das Expressionniveau des fhl2-Gens in HEK293-Zellen gering, konnte kein I_{K_s} -Stroms gemessen werden, war jedoch genügend fhl2 Protein vorhanden, konnte auch in HEK293-Zellen bei Koexpression von *KCNQ1* und *KCNE1* ein I_{K_s} -Stroms gemessen werden. Das fhl2 oder ein ähnliches Protein auch für das Zusammenlagern von KCNE3 und KCNQ1 notwendig ist, ist durchaus vorstellbar. Bisher existieren jedoch noch keine experimentellen Hinweise für diese These.

Auswärts-gleichrichtende K^+ -Kanäle der EAG-Familie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch ein K^+ -Kanal der EAG-Familie untersucht. Es wurden rEAG1 und verschiedene rEAG1-Mutanten, insbesondere rEAG1 Δ 190 (Deletion der Aminosäuren 2-190) in Hefe analysiert. Terlau *et al.* (1997) zeigten, dass rEAG1 Δ 190 einen funktionellen Kanal bildet, der im Vergleich zum Wildtyp bereits bei einer geringer depolarisierten, also stärker hyperpolarisierten, Membran öffnet. Deshalb bestand auch die Möglichkeit, dass die Expression von rEAG1 Δ 190 in PLY246 eine K^+ -Aufnahme in Medium mit geringer KCl-Konzentration vermittelt.

Mit Hilfe von Wachstumstests wurde untersucht, ob rEAG1 bzw. rEAG1 Δ 190 exprimierende Stämme den Wachstumsdefekt von PLY246 in 10 mM KCl Medium komplementieren können. Die ersten Tests wurden sowohl mit den Stämmen PLY246 [pYEX-yEGFP], PLY246 [pYEX-rEAG1/yEGFP] und PLY246 [pYEX-rEAG1 Δ 190/yEGFP], als auch mit den Stämmen PLY246 [pYEX-rEAG1] und PLY246 [pYEX-rEAG1 Δ 190] in Medien mit 10 mM bzw. 100 mM KCl durchgeführt. Das Wachstum wurde bei diesen Stämmen über einen Zeitraum von 24 h gemessen, da der rEAG1 Δ 190 exprimierende Stamm erst spät die stationäre Wachstumsphase erreichte. Da kein Einfluss von fusioniertem yEGFP nachweisbar war, wurden weitere Versu-

che nur noch mit den *rEAG1*- bzw. *rEAG1Δ190*- *yEGFP*-Fusionskonstrukte exprimierenden Stämmen durchgeführt. Ein Vergleich der maximalen Wachstumsraten (μ_{max}) der *yEGFP*, *rEAG1/yEGFP* und *rEAG1Δ190/yEGFP* exprimierenden Stämme ergab keinen signifikanten Unterschied (Abb. 3.2, Seite 56). Wurde jedoch das Wachstum als Integral unter der Wachstumskurve (W_{int}) bestimmt, wurden Unterschiede sichtbar. Der *rEAG1Δ190/yEGFP* exprimierende Stamm wuchs am besten, der *yEGFP* exprimierende Stamm am schlechtesten. Demnach erreichten die *rEAG1* bzw. *rEAG1Δ190* exprimierenden Stämme zwar keine höhere maximale Wachstumsgeschwindigkeit als die *yEGFP*-Kontrolle, wohl aber eine höhere Zelldichte. In Medium mit 100 mM KCl erreichten die getesteten Stämme noch deutlich höhere W_{int} -Werte. Daher ist auszuschließen, dass die C-Quelle, Spurenelemente oder auch Vitamine limitierende Faktoren für das Wachstum in Medium mit 10 mM KCl sind. Vielmehr scheint die K^+ -Konzentration bzw. -Aufnahme der Stämme ausschlaggebend zu sein. Das unterschiedliche Wachstum der verschiedenen Stämme in Medium mit 10 mM KCl lässt sich wie folgt erklären. Der *yEGFP* exprimierende Kontrollstamm wächst minimal, da anfangs in den Zellen noch die zum Wachstum benötigte K^+ -Konzentration in den Zellen vorliegt. Der *rEAG1/yEGFP* exprimierende Stamm wächst etwas besser als der Kontrollstamm, wahrscheinlich gelangt bei dem *rEAG1/yEGFP* exprimierenden Stämmen ein wenig K^+ in die Zellen. Die zum Wachstum benötigte K^+ -Konzentration im Zellinneren kann somit länger aufrecht erhalten werden. Bei *rEAG1Δ190/yEGFP* exprimierenden Zellen scheint der K^+ -Einstrom größer zu sein. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass *rEAG1Δ190*-Kanäle sich schon bei einer weniger depolarisierten Membran öffnen als *rEAG1*-Kanäle (Terlau *et al.*, 1997). Die zum Wachstum benötigte K^+ -Konzentration im Zellinneren kann somit noch länger aufrechterhalten werden. Die maximale Wachstumsrate ist allerdings niedrig. Möglicherweise weil *rEAG1Δ190*-Kanäle bei hyperpolarisierter Membran nur eine sehr geringe Offenwahrscheinlichkeit aufweisen. Stansfeld *et al.* (1996) beschrieben, dass intrazelluläres Ca^{2+} *rEAG1*-Kanäle inhibiert. Nach Schönherr *et al.* (2000) bindet Calmodulin (CaM) direkt an den C-Terminus von *EAG1* und vermittelt dadurch die Bindung von Ca^{2+} , wodurch es zu einer Inhibierung des Kanals kommt. Dazu reicht schon die Bindung eines Ca^{2+} /CaM Moleküls aus. Es bestand die Möglichkeit, dass durch Ca^{2+} /CaM *rEAG1*- und *rEAG1Δ190*-Kanäle in Hefe inhibiert werden. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei mutierte *rEAG1Δ190/yEGFP* Konstrukte (*rEAG1Δ190* [F714S, F717S] (*rEAG1Δ190 FS*) und *rEAG1Δ190* [R711Q, R712Q,

R716Q, *R718Q*] (*rEAG1Δ190 RQ*) hergestellt, bei denen die nach Schönherr *et al.* (2000) für die Calmodulin-Bindung wichtigen Aminosäuren mutiert sind.

Obwohl die Fusionsproteine wahrscheinlich größtenteils in „ER-Karmellae“ lokalisiert waren (Abb. 3.3, Seite 57), und sich damit die Lokalisation deutlich von derjenigen des wahrscheinlich in der Plasmamembran lokalisiertem *rEAG1Δ190* Protein (Abb. 3.1, Seite 54) unterschied, konnte verbessertes Wachstum in Medium mit 10 mM festgestellt werden. Im Vergleich zu dem verbesserten Wachstum der *rEAG1Δ190/yEGFP* exprimierenden Zellen wies das verbesserte Wachstum der *rEAG1Δ190 FS/yEGFP* bzw. *rEAG1Δ190 RQ/yEGFP* exprimierenden Zellen keine signifikanten Unterschiede auf. Auch Schönherr *et al.* (2000) beschrieben bei der Expression von *EAG-FS* in *Xenopus*-Oocyten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem durch den mutierten Kanal vermittelten Stroms und dem durch Wildtyp *EAG* vermittelten Strom. Demnach scheinen einzelne *rEAG1Δ190 FS/yEGFP* bzw. *rEAG1Δ190 RQ/yEGFP* Kanäle in der Hefe-Plasmamembran vorhanden zu sein. Ein Großteil der Kanäle wird wohl aufgrund der Mutationen nicht korrekt gefaltet. Ebenfalls denkbar ist, dass Calmodulin auch eine Funktion als Chaperon hat und diese aufgrund der defekten Bindestelle nicht mehr ausüben kann. Die nicht korrekt gefalteten Proteine sammeln sich wahrscheinlich in „ER-Karmellae“ an (Abschnitt 4.1, Lokalisationsanalyse von *rEAG1* (-Mutanten)).

Da die Expression von *rEAG1Δ190/yEGFP* zu keinem stärkeren Wachstum führt als die Expression von *rEAG1Δ190 FS/yEGFP* bzw. *rEAG1Δ190 RQ/yEGFP*, obwohl *rEAG1Δ190/yEGFP* anscheinend um ein Vielfaches häufiger in der Plasmamembran lokalisiert ist, spricht alles dafür, dass ein Großteil der *rEAG1Δ190/yEGFP*-Kanäle inaktiv vorliegt. Außerdem zeigt dieses Ergebnis, dass schon wenige funktionelle K^+ -Kanäle ausreichen um für langsames Wachstum genügend K^+ in die Zellen gelangen zu lassen.

Einwärts-gleichrichtende K^+ -Kanäle

Die Möglichkeit *Kir2.1* in *S. cerevisiae* funktionell zu exprimieren wurde bereits früher gezeigt (Tang *et al.*, 1995; Zaks-Makhina *et al.*, 2004; Hasenbrink *et al.*, 2005). Durch die heterologe Expression von *Kir2.1* kann der Wachstumsnachteil von $\Delta trk1,2$ bzw. $\Delta trk1,2 \Delta tok1$ Wirtstämmen in Medium mit 10 mM KCl kompensiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Hefestämme hergestellt, die klinisch relevante *Kir2.1*-Mutanten exprimieren, sowie Hefestämme, die diese Mutanten und *Kir2.1* koexprimieren. Da sich

mKir2.1 von humanem Kir2.1 nur in sechs Aminosäurepositionen unterscheidet, und keine der untersuchten Mutationen in der Nähe einer der zwischen mKir2.1 und hKir2.1 unterschiedlichen Aminosäuren befindet, wurde auch für diese Versuche mKir2.1 verwendet. Die untersuchten Kir2.1-Mutanten (Kir2.1 [R56W] bzw. [D71V], [S136F] und [G144S]) sind Ursache für das Andersen-Syndrom (Plaster *et al.*, 2001; Tristani-Firouzi *et al.*, 2002; Andelfinger *et al.*, 2002).

Tests mit Hefestämmen ($\Delta trk1,2 \Delta tok1$), welche die oben beschriebenen *yEGFP/mKir2.1*-Mutanten unter der Kontrolle von P_{CUP1} (Macreadie *et al.*, 1989) bzw. unter der Kontrolle von P_{GAL1} (Johnston and Davis, 1984; Guthrie and Fink, 1991) exprimierten, ergaben im Gegensatz zur Expression von *yEGFP/mKir2.1*-Wildtyp kaum ein verbessertes Wachstum in Medium mit 10 mM KCl. Vielmehr ergab sich ein Wachstum vergleichbar zu dem *yEGFP* exprimierenden Kontrollstamm (Abb. 3.15, Seite 70). Demnach führen die Mutationen zu einer Funktionsbeeinträchtigung des Kanals. Auch elektrophysiologisch wurde von Lange *et al.* (2003) für die *Kir2.1*-Mutanten [D71V], [S136F] bzw. [G144S], wenn diese in CHO-Zellen exprimiert wurden gezeigt, dass der gemessene Strom nur 10% bis 20% des vom Wildtyp vermittelten Strom ergab.

Plaster *et al.* (2001) zeigten, dass Kir2.1 [D71V] bei Koexpression von *Kir2.1* [D71V] mit Wildtyp *Kir2.1* in *Xenopus*-Oocyten einen dominant negativen Effekt ausübt, d. h. die Präsenz von Kir2.1 [D71V] unterdrückt den vom Kir2.1 Wildtyp vermittelten Wachstumsvorteil. Das gleiche zeigten Lange *et al.* (2003) für die *Kir2.1*-Mutationen [S136F] und [G144S] und Andelfinger *et al.* (2002) für die *Kir2.1*-Mutation [R67W], jeweils bei Koexpression mit *Kir2.1* Wildtyp.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch Koexpression der beschriebenen Mutanten mit dem Wildtyp untersucht, ob diese Effekte auch in Hefe nachweisbar sind. Dazu wurden Stämme hergestellt, welche *mRFP/mKir2.1*-Wildtyp unter der Kontrolle von P_{CUP1} und *yEGFP/mKir2.1* bzw. *yEGFP/mKir2.1*-Mutanten unter der Kontrolle eines regulierbaren Promotors exprimierten. Zunächst wurde P_{GAL1} als regulierbarer Promotor verwendet. Es zeigte sich aber, dass P_{GAL1} ungeeignet war, da er eine zu hohe Basalaktivität aufwies (Abb. 3.19, Seite 75).

Daher wurde der durch Methionin inhibierbare Promotor P_{MET25} (Tirode *et al.*, 1997; Solow *et al.*, 2005) getestet. Dieser Promotor stellte sich als geeignet heraus. Bei einer Methionin-Konzentration von 2 mM war sichergestellt, dass bis zum Versuchsende genügend Methionin für eine vollständige Inhibierung des Promotors vorhanden war (Abb. 3.20, Seite 76).

Es wurden neue Stämme hergestellt, welche *mRFP/mKir2.1* unter der Kontrolle von P_{CUP1} und zusätzlich *yEGFP/mKir2.1* bzw. *yEGFP/mKir2.1*-Mutanten unter der Kontrolle von P_{MET25} exprimierten. Das Wachstum dieser Stämme wurde in Medien mit 10 mM bzw. 100 mM KCl jeweils mit Methionin (P_{MET25} inaktiv) und ohne (P_{MET25} aktiv) untersucht. Diese Versuche zeigten, dass die Koexpression von *yEGFP/mKir2.1*-Mutanten [D71V], [S136F] bzw. [G144S] mit *mRFP/mKir2.1* in Medium mit 10 mM KCl ohne Methionin zu einer Wachstumshemmung von 15%, 10% bzw. 22% im Vergleich zum Wachstum in Medium mit 10 mM KCl mit Methionin führten. Somit ist der dominant negative Effekt der Kir2.1 Mutanten ([D71V], [S136F] und [G144S]) bei Koexpression mit *Kir2.1* Wildtyp (Plaster *et al.*, 2001; Lange *et al.*, 2003) auch in *S. cerevisiae* messbar. Einzig die Koexpression von *yEGFP/mKir2.1* [R67W] als auch *yEGFP/mKir2.1* mit *mRFP/mKir2.1* führte zu keiner Wachstumsverschlechterung in Medium mit 10 mM KCl ohne Methionin (Abb. 3.22, Seite 79).

Somit stellt die Koexpression von *yEGFP/mKir2.1* [R67W] mit Wildtyp *mRFP/mKir2.1* eine Ausnahme dar, die nicht zu dominant negativer Unterdrückung des durch mKir2.1 vermittelten Wachstumsvorteils in Medium mit 10 mM KCl ohne Methionin führte. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Andelfinger *et al.* (2002), die eine dominant negative Unterdrückung des Kir2.1 vermittelten Stroms bei Koexpression von *Kir2.1* [R67W] mit dem Wildtyp *Kir2.1* beobachteten.

Die Kir2.1 Mutation [R67W] nimmt unter den „Andersen Mutationen“ eine Sonderstellung ein: nach Andelfinger *et al.* (2002) hat diese Mutation geschlechtsspezifische Symptome zur Folge, die möglicherweise darauf hindeuten, dass die Kir2.1 [R67W] Effekte nicht ausschließlich durch dominant negative Unterdrückung der Kir2.1 Funktion zu erklären sind.

Das im Rahmen dieser Arbeit erhaltene Ergebnis kann auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen sein. Es könnte z. B. zu spontanen Mutationen bzw. zu einer Reorganisation der beiden in Hefe koexprimierten Plasmide gekommen sein.

Desweiteren ist zu berücksichtigen, dass nicht alle bekannten „Andersen Mutationen“ ausschließlich durch dominant negative Unterdrückung der Kir2.1 Funktion wirken. So zeigten Ai *et al.* (2002), dass [T192A] nur einen minimalen dominant negativen Effekt hat. Der Grund könnte z. B. sein, dass die Affinität von Kir2.1 [T192A]-Untereinheiten zu Wildtyp Kir2.1-Untereinheiten geringer ist, als die von Wildtyp-Untereinheiten zueinander. Möglicherweise könnte auch die Zusammenlagerung der Kir2.1 [R67W]- Untereinheiten, sowohl mit weite-

ren Kir2.1 [R67W]- als auch mit Wildtyp Kir2.1-Untereinheiten in Hefe mit geringerer Affinität erfolgen, als die Zusammenlagerung von Wildtyp Kir2.1-Untereinheiten. Da die beobachtete Unterdrückung des Kir2.1 vermittelten Wachstumsvorteils auch bei Koexpression der anderen Mutanten (mKir2.1 [D71V], [S136F] bzw. [G144S]) mit Wildtyp Kir2.1 deutlich geringer ist als die Unterdrückung des Kir2.1 vermittelten Stroms in *Xenopus*-Oocyten, ist es vorstellbar, dass in diesem Fall die Empfindlichkeit des Hefe-Systems nicht ausreicht um diesen Effekt darzustellen. Eine möglicherweise verringerte Affinität von Kir2.1 [R67W] zu anderen Kir2.1-Untereinheiten könnte evtl. durch die Fusion von yEGFP an den Aminoterminus von Kir2.1 [R67W] verursacht werden.

Außerdem nimmt die Kir2.1 Mutation [R67W] unter den „Andersen Mutationen“ eine Sonderstellung ein: nach [Andelfinger et al. \(2002\)](#) hat diese Mutation geschlechtsspezifische Symptome zur Folge, die möglicherweise darauf hindeuten, dass die Kir2.1 [R67W] Effekte nicht ausschließlich durch dominant negative Unterdrückung der Kir2.1 Funktion zu erklären sind und das vielmehr die in *Xenopus*-Oocyten beobachteten Effekte die Ausnahme darstellen.

G-Protein-aktivierte einwärts-gleichrichtende K⁺-Kanäle

Kir3.2 gehört zur Unterfamilie der G-Protein-aktivierten einwärts-gleichrichtenden K⁺-Kanäle ([Jan and Jan, 1997a](#)). Ein Kir3.x-Kanal alleine hat eine sehr geringe Offenwahrscheinlichkeit. Diese wird erhöht, wenn ein G-Protein β/γ -Dimer ($G_{\beta\gamma}$) bindet ([Wickman et al., 1994](#); [Kofuji et al., 1995](#); [Lim et al., 1995](#); [Huang et al., 1995](#)). Durch „Hefe-Screening“ einer Kir3.2-Bibliothek mit zufällig enthaltenden Mutationen identifizierten [Yi et al. \(2001\)](#) und [Bichet et al. \(2004\)](#) einige Kir3.2-Mutanten, die auch ohne die Bindung von $G_{\beta\gamma}$ eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit aufweisen. Die Charakterisierung der Mutanten fand jedoch nicht in Hefe, sondern in *Xenopus* Oocyten statt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob diese Eigenschaften von Kir3.2 (-Mutanten) in Hefe getestet werden können und mit den elektrophysiologischen Untersuchungen mit *Xenopus*-Oocyten übereinstimmen. Es wurde jeweils eine der drei Mutationen [S177T], [S177W] und [V188G] in die Sequenz einer Kir3.2 α -Untereinheit eingefügt.

Die Mutation [V188G] in Kir3.2 hat zur Folge, dass die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals sehr hoch ist, auch wenn kein $G_{\beta\gamma}$ gebunden ist ([Yi et al., 2001](#)). Die Mutationen [S177T] und [S177W] haben nach [Yi et al. \(2001\)](#) bzw. [Bichet et al. \(2004\)](#) ebenfalls eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit zur Folge. Die Mutation [S177W] führt zusätzlich zu einer reduzierten

K⁺-Selektivität, wenn das entsprechende Gen in *Xenopus*-Oocyten exprimiert wurde.

Ebenfalls untersucht wurde die Kir3.2 Mutation [G156S]. Diese Mutation (Patil *et al.*, 1995) entspricht der „weaver“ Mutation (Rakic and Sidman, 1973; Sotelo and Changeux, 1974). Slesinger *et al.* (1996) und Kofuji *et al.* (1996) zeigten, dass die K⁺-Selektivität nicht mehr gegeben ist und dadurch Na⁺ durch den Kanal diffundieren kann. In der „weaver“ Maus wurde festgestellt, dass im Gehirn Neuronen absterben, wodurch es zu Entwicklungsstörungen, Störungen der Gleichgewichtsregulation und der Bewegungskoordination kommt (Rakic and Sidman, 1973). In Abschnitt 3.5.2 wurde beschrieben, dass die Expression von *rKir3.2* Wildtyp als auch die von *rKir3.2* [G156S] wie erwartet zu keinem Wachstum in Medium mit 10 mM KCl führte. Im Vergleich zur Expression des Wildtyps führte die Expression von *rKir3.2* [S177T] zu einem minimalen Wachstum in Medium mit 10 mM KCl. Die Expression von *rKir3.2* [S177W] und *rKir3.2* [V188G] führte zu einem deutlichen Wachstum in Medium mit 10 mM KCl (Abb. 3.24, Seite 82). Beim Vergleich des Integrals unter der Wachstumskurve (W_{int}) zeigt sich, dass die Expression von *rKir3.2* [V188G] einen noch größeren Wachstumsvorteil als die Expression von *rKir3.2* [S177W] vermittelt (Abb. 3.25, Seite 83).

Es konnte also auch mit Hilfe des Hefe-Wachstumstest gezeigt werden, dass die Mutanten [S177T], [S177W] und [V188G] eine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Aktivität aufweisen, wenn kein G-Protein β/γ -Dimer gebunden ist. Das stimmt mit den Beobachtungen von Yi *et al.* (2001) und Bichet *et al.* (2004) überein, die zeigten, dass die Mutationen [S177T], [S177W] bzw. [V188G] die Offenwahrscheinlichkeit erhöhen.

Wie erwähnt, zeigte der *rKir3.2* [S177W] exprimierende Stamm in Medium mit 10 mM KCl besseres Wachstum, als der nur minimal wachsende *rKir3.2* [S177T] exprimierende Stamm. Yi *et al.* (2001) und Bichet *et al.* (2004) zeigten allerdings, dass der *Kir3.2* [S177T] exprimierende Stamm deutlich auf Medium mit niedriger KCl-Konzentration wuchs, der *Kir3.2* [S177W] exprimierende Stamm dagegen kaum. Diese Unterschiede könnten durch unterschiedliche Versuchsbedingungen erklärt werden. Yi *et al.* (2001) und Bichet *et al.* (2004) verwendeten Festmedien, während die hier durchgeführten Versuche in Flüssigmedien erfolgten. Ein weiterer Unterschied ist der unterschiedliche genetische Hintergrund des verwendeten Wirtsstamms.

K⁺-Selektivität von Kir3.2-Mutanten:

Es wurden Selektivitätsuntersuchungen mit verschiedenen *rKir3.2*-Varianten ([S177W], [V188G]) in *S. cerevisiae* durchgeführt. In Abbildung 3.26, Seite 84, ist gezeigt, dass die Zugabe von für

Hefe toxisches LiCl keinen Einfluss auf das Wachstum von *yEGFP/rKir3.2 [V188G]* exprimierenden Hefezellen hat, während bei den *yEGFP/rKir3.2 [S177W]* exprimierenden Zellen die Zugabe von LiCl zu einer deutlichen Verringerung des Wachstums führt. Dieser Wachstumsnachteil war schon bei Betrachtung der maximalen Wachstumsrate (μ_{max}) erkennbar. Noch deutlicher sichtbar wurde er aber bei der Betrachtung des Integrals unter der Wachstumskurve (W_{int}). Li^+ gelangt also in die Zellen des *rKir3.2 [S177W]* exprimierenden Stammes und beeinträchtigt dadurch das Wachstum, d. h. *rKir3.2 [S177W]*-Kanäle scheinen nicht K^+ selektiv zu sein.

Ebenfalls konnte bei dem *yEGFP/rKir3.2 [S177W]* exprimierenden Stamm eine Sensitivität gegenüber NaCl nachgewiesen werden (Abb. 3.27, Seite 85). Die Versuche mit NaCl im Medium (10 mM KCl und 290 mM NaCl) ergaben, dass das Wachstum von PLY246 [pYEX-*yEGFP/rKir3.2 [S177W]*] deutlich geringer ist als ohne NaCl im Medium. Kein anderer der getesteten Stämme zeigte solch einen Wachstumseinbruch. Dies ist wahrscheinlich dadurch zu begründen, dass ein aus *rKir3.2 [S177W]*-Untereinheiten bestehender Kanal Na^+ -durchlässig ist. NaCl und KCl lagen in einem Verhältnis von 290 mM zu 10 mM vor. Dieser hohe Na^+ -Überschuss und die fehlende K^+ -Selektivität führten zu einem stark reduzierten K^+ - und einem deutlich verstärktem Na^+ -Einstrom. So kann die für die Hefe notwendige intrazelluläre K^+ -Konzentration nicht aufrechterhalten werden. In diesen Versuchen zeigte sich der Wachstumsnachteil allerdings erst bei hohen NaCl-Konzentrationen. Wurde 100 mM NaCl dem Medium mit 10 mM KCl zugegeben wuchs der *rKir3.2 [S177W]* exprimierende Stamm ähnlich wie in Medium mit 10 mM KCl ohne NaCl. Hiermit wurde gezeigt, dass sich die reduzierte K^+ -Selektivität, verursacht durch die Mutation [S177W] in Kir3.2, nicht nur in *Xenopus*-Oocyten (Yi *et al.*, 2001; Bichet *et al.*, 2004), sondern auch in Hefe nachvollziehen lässt.

Eine sehr interessante Beobachtung war, dass die Zugabe von NaCl (290 mM als auch 100 mM) zum Medium ein verstärktes Wachstum der *rKir3.2* (bzw. *rKir3.2 [S177T]*) exprimierenden Stämme in Medium mit 10 mM KCl ermöglichte (Abb. 3.27, Seite 85). Dieses verbesserte Wachstum kann verschiedene Ursachen haben: die Osmolarität könnte die Ursache sein, aber auch Ionenstärke oder der direkte Einfluss von Na^+ . Es wurde der Einfluss der Ionenstärke und der Osmolarität analysiert, indem Cholinchlorid (2-hydroxyethyltrimethylammoniumchlorid) verwendet wurde (Chevalier and Rupp, 1993). Für Cholin ist die Membran aufgrund seiner Größe impermeabel. Es wurde das Wachstum der *rKir3.2* (-Mutanten) expri-

mierenden Stämme und als Kontrollstamm der *yEGFP* exprimierende Stamms in Medium mit 10 mM KCl und mit bzw. ohne 290 mM Cholinchlorid (ChCl) getestet. Es wurde jedoch kein Wachstumsvorteil durch die Zugabe von ChCl beobachtet. Im Gegenteil, Cholinchlorid hatte sogar einen leicht negativen Einfluss auf das Wachstum. In Abb. 3.28, Seite 86, sind die Ergebnisse des *rKir3.2* bzw. *rKir3.2 [S177T]* exprimierenden Stammes gezeigt.

Somit blieb als Erklärung ein direkter Einfluss von Na^+ auf die Offenwahrscheinlichkeit des Kir3.2-Wildtyps als auch von Kir3.2 [S177T]. [Sui et al. \(1996\)](#) zeigten, dass bei Koexpression von *Kir3.1* und *Kir3.4*, als auch *Kir3.1* und *Kir3.2* ([Lesage et al., 1995](#)) in *Xenopus*-Oocyten durch intrazelluläre Zugabe von Na^+ die Kanalaktivität unabhängig von einer G-Protein- β/γ -Dimer Bindung zunimmt. Somit hätte Na^+ einen ähnlichen Effekt auf die Offenwahrscheinlichkeit von Kir3.2- bzw. Kir3.2 [S177T]-Kanälen, wie die Bindung der G-Protein β/γ -Dimere.

[Huang et al. \(1998\)](#) zeigten, dass Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) heteromere Kir3.1-Kir3.4 Kanäle aktiviert. Eine mögliche Erklärung für den Einfluss von Na^+ auf die Offenwahrscheinlichkeit gaben [Mark and Herlitze \(2000\)](#) in einem Übersichtsartikel. Wahrscheinlich bewirkt Na^+ eine verbesserte Bindung von PIP_2 an die Kir3.2-Untereinheit, wodurch die Offenwahrscheinlichkeit erhöht wird. Bei der Bindung von PIP_2 spielen zwei Arginine im C-Terminus von Kir3.2 eine entscheidende Rolle (Abb. 4.3, Seite 109) ([Zhang et al., 1999](#)). Die positive Ladung dieser Arginine könnte von einem Aspartatrest neutralisiert werden, der in der Nähe liegt. Na^+ könnte sich an das Aspartat anlagern und dessen Einfluss verringern, wodurch die Interaktion zwischen PIP_2 und den Kanaluntereinheiten verstärkt wird ([Chan et al., 1997](#); [Ho and Murrell-Lagnado, 1999a,b](#); [Zhang et al., 1999](#)).

Es ist festzuhalten, dass Bedingungen definiert wurden, die eine Untersuchung des *rKir3.2*-Wildtyps und der Kir3.2 [S177T] Mutante in *S. cerevisiae* ermöglichen.

Auf Grund des Einflusses von NaCl auf *rKir3.2* Wildtyp und *rKir3.2 [S177T]* konnten in weiteren Versuchen alle *rKir3.2* (-Mutanten) exprimierenden Stämme pharmakologisch untersucht werden. Exemplarisch wurde der Einfluss von BaCl_2 getestet, da Ba^{2+} ein bekannter K^+ -Kanal-Blocker ist. Das Ba^{2+} -Ion, welches eine ähnliche Größe wie K^+ hat, blockiert K^+ -Kanäle (z. B. Kir6.2 oder auch Kir3.x) ([Neyton and Miller, 1988](#); [Jiang and MacKinnon, 2000](#); [Kobayashi et al., 2004](#)), indem es an den Selektivitätsfilter bindet und so die Pore „verstopft“ ([Proks et al., 2003](#)).

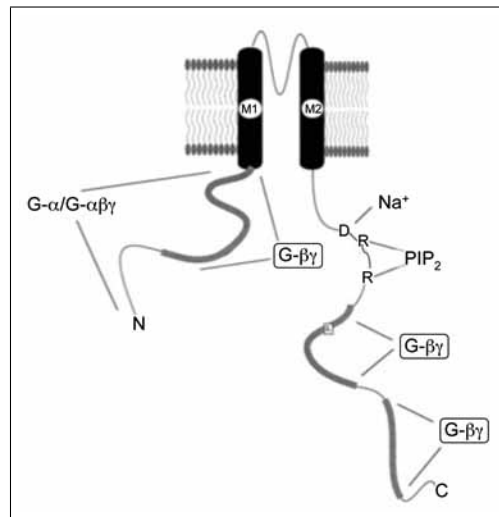


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung einer Kir3.2-Untereinheit. Schematisch ist eine Kir3.2 Untereinheit mit den beiden Transmembrandomänen „M1“ und „M2“ dargestellt, markiert ist das Aspartat (D), dessen negative Ladung durch Na^+ neutralisiert werden könnte, sowie die beiden nah gelegenen Argininreste (R), welche die Bindung mit PIP_2 beeinflussen. Desweiteren sind die Bindungsstellen der β/γ -Dimere des G-Proteins ($\text{G-}\beta\gamma$) sowohl am N- als auch am C-Terminus markiert (Huang *et al.*, 1995, 1997). Abbildung nach Mark and Herlitze (2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Wachstumstests mit *Kir3.2* (-Mutanten) exprimierenden Stämmen durchgeführt, für die Medien mit 10 mM KCl, 100 mM NaCl und verschiedenen BaCl_2 -Konzentrationen verwendet wurden (Abb. 3.29, Seite 88). In Medien mit BaCl_2 wuchsen die *Kir3.2*-Wildtyp bzw. -Mutanten exprimierenden Stämme deutlich schlechter als in entsprechenden Medien ohne Ba^{2+} , während Ba^{2+} keinen Einfluss auf das schwache Wachstum des *yEGFP* exprimierenden Stamms hatte. Die verschiedenen *rKir3.2* (-Mutanten) exprimierenden Hefestämme zeigten unterschiedliche Ba^{2+} -Sensitivitäten. Der *Kir3.2* [V188G] exprimierende Stamm wies mit einem Wachstumseinbruch von 30% in Medium mit 1 mM BaCl_2 eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber Ba^{2+} auf als die *rKir3.2*, *rKir3.2* [S177T] bzw. *rKir3.2* [S177W] exprimierenden Stämme, die jeweils um ca. 65% schlechter in Medium mit 1 mM BaCl_2 wuchsen, als in Medium ohne BaCl_2 . Je deutlicher der Wachstumsvorteil gegenüber dem *yEGFP* exprimierendem Stamm war, also je höher demnach wahrscheinlich die Offenwahrscheinlichkeit der jeweiligen Kanäle war, desto weniger sensitiv reagierten die Stämme auf Ba^{2+} in Medium mit 10 mM KCl.

Da Ba^{2+} ein spezifischer K^+ -Kanal Blocker ist und mit steigender Konzentration an BaCl_2 im Medium sich das Wachstum der *Kir3.2*-Wildtyp bzw. -Mutanten exprimierenden Stämme ver-

schlechtert, zeigen diese Ergebnisse, dass eine Untersuchung von K⁺-Kanälen in Hefe möglich ist.

Weitere pharmakologische Untersuchungen wurden mit Hygromycin B durchgeführt. Die Hygromycin B-Empfindlichkeit wird als Indikator für das Membranpotential verwendet (Mercier *et al.*, 2004; Hasenbrink *et al.*, 2005). Je hyperpolarisierter die Membran ist, desto toxischer wirkt Hygromycin B (Perlin *et al.*, 1988). Der verwendete $\Delta trk1,2 \Delta tok1$ Wirtsstamm ist stark hyperpolarisiert (Madrid *et al.*, 1998). Die heterologe Expression von K⁺-Kanälen sollte zu einem erhöhten K⁺-Einstrom, und damit zu einer Reduktion der Hyperpolarisation und somit des toxischen Effekts von Hygromycin B führen.

In Abbildung 3.30 A, Seite 89, sind die Ergebnisse der Wachstumstests in Medien mit 20 mM KCl und verschiedenen Hygromycin B Konzentrationen gezeigt. Medien mit 20 mM KCl wurden verwendet, um ein gutes Wachstum aller Stämme, insbesondere des Kontrollstamms zu erhalten. Der *yEGFP* exprimierende Stamm und der *rKir3.2* exprimierende Stamm haben einen Hygromycin B EC₅₀-Wert von 3 μ M. Die *Kir3.2 [S177T]* bzw. *Kir3.2 [S177W]* exprimierenden Stämme liegen mit EC₅₀-Werten von 6 bzw. 8 μ M nur minimal höher. Der *Kir3.2 [V188G]* exprimierende Stamm ist mit einem Hygromycin B EC₅₀-Wert von 130 μ M am unempfindlichsten gegenüber Hygromycin B. Somit haben Stämme, welche *rKir3.2*-Mutanten mit einer erhöhter Offenwahrscheinlichkeit exprimieren, eine geringere Hygromycin B-Empfindlichkeit als der *yEGFP* exprimierende Stamm. Da diese Versuche in Medien ohne NaCl durchgeführt wurden, ist die Offenwahrscheinlichkeit des *rKir3.2*-Wildtyps nicht erhöht und die Membran bleibt hyperpolarisiert. Dementsprechend ist die Empfindlichkeit des *rKir3.2* exprimierenden Stammes gegenüber Hygromycin B ebenfalls hoch.

Wurden entsprechende Versuche in Medien mit 100 mM NaCl durchgeführt, waren alle Stämme weniger empfindlich gegenüber Hygromycin B. Es ergaben sich auch deutlichere Unterschiede in der Hygromycin B Empfindlichkeit zwischen den einzelnen Stämmen, als bei Verwendung der Medien ohne NaCl. Der *yEGFP* exprimierende Stamm hat einen Hygromycin B EC₅₀-Wert von 8 μ M. Wildtyp *rKir3.2* exprimierende Zellen reagieren unter diesen Bedingungen deutlich weniger sensitiv auf Hygromycin B (EC₅₀: 40 μ M). Der *Kir3.2 [S177T]* exprimierende Stamm ist mit einem EC₅₀-Wert von 130 μ M nun weniger empfindlich als der *rKir3.2 [S177W]* exprimierende Stamm (EC₅₀: 80 μ M). Der *Kir3.2 [V188G]* exprimierende Stamm ist mit einem Hygromycin B EC₅₀-Wert von 500 μ M am unempfindlichsten gegenüber Hygromycin B.

Die Ergebnisse der Wachstumstests in Medien mit 20 mM KCl, 100 mM NaCl und unterschiedlichen Hygromycin B Konzentrationen zeigen, dass die untersuchten Stämme im Vergleich zum Test ohne NaCl im Medium unterschiedliche Hygromycin B-Empfindlichkeitsveränderungen aufweisen. Die *yEGFP* bzw. *rKir3.2 [V188G]* exprimierenden Stämme sind um das drei- bis vierfache weniger empfindlich gegenüber Hygromycin B. Dieser Effekt ist wahrscheinlich unspezifisch, da 100 mM NaCl in den Medien die Hefezellemembran depolarisiert. Bei den *rKir3.2 [S177W]*, *rKir3.2 [S177T]* bzw. *rKir3.2* exprimierenden Stämmen sinkt die Empfindlichkeit um das 10-, 22- bzw. 13-fache. Die gesunkene Empfindlichkeit des *rKir3.2 [S177W]* exprimierenden Stammes konnte dadurch erklärt werden, dass aufgrund der zuvor gezeigten reduzierten K^+ -Selektivität mehr Na^+ in die Zelle gelangen kann als bei den anderen Stämmen, so dass die Zellen depolarisierter vorliegen. Die K^+ -Konzentration in den Zellen ist aber noch ausreichend hoch, so dass 100 mM NaCl im Medium noch keinen negativen Einfluss auf das Wachstum des Stammes hat. Bei den *rKir3.2 [S177T]* bzw. *rKir3.2* exprimierenden Stämmen wird durch NaCl im Medium die Offenwahrscheinlichkeit der K^+ -Kanäle erhöht. Somit findet ein größerer K^+ -Einstrom statt als in einem entsprechenden Medium ohne NaCl. Daher sind die Zellen stärker depolarisiert als z. B. der *yEGFP* exprimierende Stamm.

Es konnte somit zum einen gezeigt werden, dass *rKir3.2* sowie *rKir3.2*-Mutanten (*[S177T]*, *[S177W]* bzw. *[V188G]*) funktionell in *S. cerevisiae* vorliegen und zum anderen, dass durch NaCl im Medium wahrscheinlich die Offenwahrscheinlichkeit des Wildtyp *rKir3.2*-Kanals als auch des *rKir3.2 [S177T]*-Kanals erhöht wird, so dass die Expression der entsprechenden Gene in $\Delta trk1,2 \Delta tok1$ Hefezellen in Medium mit 10 mM KCl und 100 mM NaCl ein verbessertes Wachstum des jeweiligen Stammes bewirken.

Diese Ergebnisse zeigten, dass *Kir3.2*-Mutanten mit dem Hefesystem untersucht werden können. Außerdem wurden Bedingungen gefunden, die ebenfalls eine Untersuchung des *Kir3.2* Wildtyps in Hefe ermöglichen. Mit *Kir2.1* wurde ein weiterer weiterer einwärts-gleichrichtender K^+ -Kanal untersucht. Hier wurden insbesondere klinisch relevante Mutanten analysiert.

Auswärts-gleichrichtende K^+ -Kanäle wurde ebenfalls in Hefe (PLY246) exprimiert. Als einziger Kanal dieser Gruppe zeigten jedoch *rEAG1* bzw. *rEAG1 Δ 190* exprimierende Stämme ein verbessertes Wachstum in Medium mit niedriger KCl-Konzentration.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass sich *S. cerevisiae* als Expressionssystem für ver-

schiedene K⁺-Kanäle aus Säugern eignet.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um Einblicke in das Zusammenlagern von verschiedenen α -Untereinheiten zu erlangen als auch um ein größeres Verständnis über das Zusammenspiel mit Chaperonen zu erlangen. Um das Spektrum in *S. cerevisiae* untersuchbarer Kanäle zu erweitern, wird als Voraussetzung eine Identifikation eines einfach nachweisbaren Phänotyps in Hefe heterolog exprimierter auswärts-gleichrichtende K⁺-Kanäle benötigt.

5 Zusammenfassung

K⁺-Kanäle bilden die größte und heterogenste Gruppe der Ionenkanäle. Die Sequenzhomologie zwischen K⁺-Kanal α -Untereinheiten ist sehr gering. Auch die Regulation der K⁺-Kanäle kann durch verschiedene Mechanismen erfolgen. Um die Eignung von *S. cerevisiae* als universelles Expressionssystem für K⁺-Kanäle zu testen, wurde die Expression verschiedener K⁺-Kanal-Gene (Auswärts-gleichrichter: KCNQ1, KCNQ2, KCNQ3, rEAG1 (-Varianten), Einwärts-gleichrichter: Kir2.1 (-Mutanten), Kir3.2 (-Mutanten)) und die Funktionsfähigkeit der entsprechenden Proteinprodukte in *S. cerevisiae* untersucht.

Die Expression der Gene und die Lokalisation der Genprodukte wurde mit Hilfe von GFP-Fusionskonstrukten überprüft. Dazu wurde ein Hefe optimiertes GFP (*yEGFP*) an den Amino- oder Carboxy-Terminus des zu untersuchenden K⁺-Kanals fusioniert. So konnte gezeigt werden, dass ein Transport von rEAG1/*yEGFP* und rEAG1 Δ 190/*yEGFP* in die Plasmamembran erfolgte. Andere untersuchte K⁺-Kanal/*yEGFP* Fusionsproteine (hKCNQ2/*yEGFP*, hKCNQ3/*yEGFP*, *yEGFP*/ mKir2.1 (-Mutanten), *yEGFP*/rKir3.2 (-Mutanten) und *yEGFP*/hKCNE3 bzw. hKCNE3/*yEGFP*) wurden zum großen Teil in Kompartimenten wie dem ER oder dem Golgi-Apparat zurückgehalten. Untersuchungen von Deletions- und Mutations-Varianten von hKCNE3, *yEGFP*/hKCNE3 Δ C und *yEGFP*/hKCNE3 ASA, zeigten, dass diese Fusionsproteine in der Plasmamembran lokalisiert waren. So wurde das Tripeptid RSR im C-terminalen Bereich von hKCNE3 als ein in Hefe wirksames ER-Retentionssignal identifiziert.

Grundlage der funktionellen Tests war die Verwendung eines Hefestamms dem die endogenen K⁺-Translokationssysteme fehlen (Δ *trk1,2* Δ *tok1*) und der deshalb kaum in Medium mit niedriger KCl-Konzentration wächst. Getestet wurde, ob die Präsenz eines heterologen K⁺-Kanals zu verbessertem Wachstum in Medium mit niedriger KCl-Konzentration führt.

Es wurden heteromere K⁺-Kanäle der KCNQ-Familie (prinzipiell auswärts-gleichrichtende Kanäle) untersucht, die jedoch auch einen Einwärtsstrom vermitteln können. Die Kanäle bestanden entweder aus zwei verschiedenen α -Untereinheiten (hKCNQ2 - hKCNQ3) oder aus einer α - und einer β -Untereinheit (hKCNQ1 - hKCNE3) bestanden. Weder bei *KCNQ2* bzw. *hKCNQ3* alleine noch *hKCNQ2* und *KCNQ3* gemeinsam exprimierenden Stämmen konnte jedoch im Vergleich zum Kontrollstamm (*yEGFP* exprimierende Tripelmutante) verbessertes Wachstum in Medium mit niedriger KCl-Konzentration festgestellt werden. Auch die Koexpres-

sion von KCNQ1- und KCNE3-Untereinheiten die einen konstitutiv offenen K^+ -Kanal bilden, führte in Hefe nicht zu verbessertem Wachstum gegenüber dem Kontrollstamm in Medium mit niedriger KCl-Konzentration.

Mit rEAG1, rEAG1 Δ 190 und rEAG1-Mutanten wurden Varianten eines Kanals der EAG-Familie untersucht. Hier wurde eine minimale Wachstumsverbesserung des rEAG1 exprimierenden Stammes in Medium mit niedriger KCl-Konzentration gegenüber dem Kontrollstamm beobachtet. Bei rEAG1 Δ 190, einer Deletionsmutante, die schon bei weniger depolarisierter Membran öffnet, war dieser Effekt stärker ausgeprägt.

Als Vertreter der großen Gruppe der einwärts-gleichrichtenden Kir-Kanäle wurden Kir2.1 und Kir3.2 gewählt, zwei Kanalproteine deren Öffnung durch unterschiedliche Mechanismen erfolgt. Für Kir2.1, das einen stark einwärts-gleichrichtenden Kanal kodiert, war die funktionelle heterologe Expression in *S. cerevisiae* schon beschrieben. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag hier auf solchen Kir2.1-Mutanten, die Ursache des Andersen-Syndrom sind. Erstmals konnte mit *S. cerevisiae* als Expressionssystem gezeigt werden, dass die vom Kir2.1-Wildtyp verursachte Wachstumsverbesserung K^+ -Aufnahme defekter Hefezellen in Medium mit wenig K^+ durch Koexpression mit nicht funktionellen mKir2.1-Mutanten (mKir2.1 [D71V], [S136F] bzw. [G144S]) wieder aufgehoben wird. Diese drei nicht funktionellen Mutanten haben somit sehr wahrscheinlich einen dominant negativen Effekt auf die Kir2.1 Funktion.

Desweiteren wurde mit Kir3.2 ein G-Protein aktivierter K^+ -Kanal untersucht. Die Expression von Kir3.2-Mutanten, welche ohne G-Protein Bindung eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit aufweisen, führte zu verbessertem Wachstum in Medium mit niedriger KCl-Konzentration. Die bekannte reduzierte K^+ -Selektivität der Kir3.2 [S177W] Mutation, konnte ebenfalls im Hefesystem nachgewiesen werden. Pharmakologische Untersuchungen der Effekte von Ba^{2+} und Hygromycin B auf Kir3.2 (-Mutanten) zeigten, dass *S. cerevisiae* als Expressions- und Testsystem für Kir3.2-Kanäle geeignet ist. Es konnte gezeigt werden, dass Na^+ im Medium zu verbessertem Wachstum des den Kir3.2 Wildtyp exprimierenden Stamms führt. Damit konnten Bedingungen definiert werden bei denen auch ohne Bindung eines G-Proteins die Offenwahrscheinlichkeit von Kir3.2 erhöht ist und somit die Untersuchung dieses Kanals in *S. cerevisiae* möglich wird.

6 Literaturverzeichnis

- Abbott, G. and Goldstein, S. (2001), Potassium channel subunits encoded by the KCNE gene family: physiology and pathophysiology of the MinK-related peptides (MiRPs). *Mol Interv*, **1**, 95–107.
- Abbott, G. and Goldstein, S. (2002), Disease-associated mutations in KCNE potassium channel subunits (MiRPs) reveal promiscuous disruption of multiple currents and conservation of mechanism. *FASEB J*, **16**, 390–400.
- Abbott, G., Goldstein, S., and Sesti, F. (2001), Do all voltage-gated potassium channels use MiRPs? *Circ Res*, **88**, 981–983.
- Abraham, M., Jahangir, A., Alekseev, A., and Terzic, A. (1999), Channelopathies of inwardly rectifying potassium channels. *FASEB J*, **13**, 1901–1910.
- Ai, T., *et al.* (2002), Novel KCNJ2 mutation in familial periodic paralysis with ventricular dysrhythmia. *Circulation*, **105**, 2592–4.
- Alberts, B., *et al.* (1995), *Molekularbiologie der Zelle*, volume 3. Auflage. VCG.
- An, W., *et al.* (2000), Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature*, **403**, 553–6.
- Andelfinger, G., *et al.* (2002), KCNJ2 mutation results in Andersen syndrome with sex-specific cardiac and skeletal muscle phenotypes. *Am J Hum Genet*, **71**, 663–668.
- Andersen, E., Krasilnikoff, P., and Overvad, H. (1971), Intermittent muscular weakness, extrasystoles, and multiple developmental anomalies. A new syndrom? *Acta Paediatr. Scand*, **60**, 559–564.
- Anderson, J., Nakamura, R., and Gaber, R. (1994), Heterologous expression of K⁺ channels in *Saccharomyces cerevisiae*: strategies for molecular analysis of structure and function. *Symp Soc Exp Biol*, **48**, 85–97.
- Anderson, J., *et al.* (1992), Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 3736–40.
- Ashcroft, F. and Gribble, F. (1999), ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia*, **42**, 903–19.
- Barhanin, J., *et al.* (1996), K(V)LQT1 and Isk (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature*, **384**, 78–80.

- Baumann, A., Grupe, A., Ackermann, A., and Pongs, O. (1988), Structure of the voltage-dependent potassium channel is highly conserved from *Drosophila* to vertebrate central nervous systems. *EMBO J*, **7**, 2457–63.
- Bendahhou, S., *et al.* (2003), Defective potassium channel Kir2.1 trafficking underlies Andersen-Tawil syndrome. *J Biol Chem*, **278**, 51779–51785.
- Bertl, A., *et al.* (2003), Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2* and *tok1* null mutations. *Mol Microbiol*, **47**, 767–780.
- Bichet, D., *et al.* (2004), Evolving potassium channels by means of yeast selection reveals structural elements important for selectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 4441–4446.
- Biervert, C., *et al.* (1998), A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science*, **279**, 403–406.
- Bihler, H., Slayman, C., and Bertl, A. (1998), NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **432**, 59–64.
- Bihler, H., Slayman, C., and Bertl, A. (2002), Low-affinity potassium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium-blocked non-specific cation channel. *Biochim Biophys Acta*, **1558**, 109–18.
- Birnboim, H. and Doly, J. (1979), A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc. Acids Res.*, **7**, 1513.
- Brodsky, J. and McCracken, A. (1999), ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Semin Cell Dev Biol*, **10**, 507–13.
- Bröker, M. (1993), Rapid transformation of cryopreserved competent *Schizosaccharomyces pombe* cells. *Bio. Techniques*, **15**, 599–600.
- Brown, D. and Adams, P. (1980), Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature*, **283**, 673–6.
- Burri, L., *et al.* (2003), A SNARE required for retrograde transport to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 9873–9877.
- Busch, A., *et al.* (1997), The role of the *IsK* protein in the specific pharmacological properties of the *IKs* channel complex. *Br. J. Pharmacol.*, **122**, 187–189.
- Campbell, R., *et al.* (2002), A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7877–7882.

- Castaldo, P., *et al.* (2002), Benign familial neonatal convulsions caused by altered gating of KCNQ2/KCNQ3 potassium channels. *J Neurosci*, **22**, RC199–.
- Chan, K., Sui, J., Vivaudou, M., and Logothetis, D. (1997), Specific regions of heteromeric subunits involved in enhancement of G protein-gated K⁺ channel activity. *J Biol Chem*, **272**, 6548–55.
- Chandy, K. and Gutman, G. (1995), *Voltage-gated potassium channel genes*. In: *Handbook of Receptors and Channels*, pages 1–71. CRC Press.
- Chen, H., *et al.* (2003), Charybdotoxin binding in the I(Ks) pore demonstrates two MinK subunits in each channel complex. *Neuron*, **40**, 15–23.
- Chevalier, P. and Rupp, R. (1993), Inhibition of Sucrose:Sucrose Fructosyl Transferase by Cations and Ionic Strength. *Plant Physiol*, **101**, 589–594.
- Chouabe, C., *et al.* (1997), Properties of KvLQT1 K⁺ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J*, **16**, 5472–9.
- Clement, J., *et al.* (1997), Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. *Neuron*, **18**, 827–38.
- Cooper, E. and Jan, L. (1999), Ion channel genes and human neurological disease: recent progress, prospects, and challenges. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4759–4766.
- Cooper, E., *et al.* (2000), Colocalization and coassembly of two human brain M-type potassium channel subunits that are mutated in epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4914–4919.
- Cormack, B., *et al.* (1997), Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology*, **143 (Pt 2)**, 303–11.
- Cosson, P. and Letourneur, F. (1994), Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science*, **263**, 1629–31.
- Dascal, N., *et al.* (1993), Atrial G protein-activated K⁺ channel: expression cloning and molecular properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10235–9.
- de Kerchove d'Exaerde, A., *et al.* (1995), Functional complementation of a null mutation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase by a plant H⁽⁺⁾-ATPase gene. *J Biol Chem*, **270**, 23828–37.
- de Virgilio, C., *et al.* (1993), CNE1, a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of the genes encoding mammalian calnexin and calreticulin. *Yeast*, **9**, 185–8.

- Dedek, K., *et al.* (2001), Myokymia and neonatal epilepsy caused by a mutation in the voltage sensor of the KCNQ2 K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12272–12277.
- del Giudice, M., *et al.* (2000), Benign familial neonatal convulsions (BFNC) resulting from mutation of the KCNQ2 voltage sensor. *Eur. J. Hum. Genet.*, **8**, 994–997.
- Doheny, K., *et al.* (1993), Identification of essential components of the *S. cerevisiae* kinetochore. *Cell*, **73**, 761–74.
- Donaldson, M., *et al.* (2003), PIP2 binding residues of Kir2.1 are common targets of mutations causing Andersen syndrome. *Neurology*, **60**, 1811–1816.
- Doupnik, C., Davidson, N., and Lester, H. (1995), The inward rectifier potassium family. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **5**, 268–277.
- Doyle, D., *et al.* (1998), The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, **280**, 69–77.
- Dumaine, R. and Antzelevitch, C. (2002), Molecular mechanisms underlying the long QT syndrome. *Curr Opin Cardiol*, **17**, 36–42.
- Duprat, F., *et al.* (1997), TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J*, **16**, 5464–71.
- Ellgaard, L. and Helenius, A. (2003), Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 181–91.
- Erdmann, R. and Blobel, G. (1995), Giant peroxisomes in oleic acid-induced *Saccharomyces cerevisiae* lacking the peroxisomal membrane protein Pmp27p. *J Cell Biol*, **128**, 509–523.
- Fairman, C., Zhou, X., and Kung, C. (1999), Potassium uptake through the TOK1 K⁺ channel in the budding yeast. *J. Membr. Biol.*, **168**, 149–157.
- Fakler, B., *et al.* (1995), Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K⁺ channels is caused by intracellular spermine. *Cell*, **80**, 149–54.
- Fanger, C., *et al.* (1999), Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1. *J Biol Chem*, **274**, 5746–54.
- Felix, R. (2000), Channelopathies: ion channel defects linked to heritable clinical disorders. *J Med Genet*, **37**, 729–740.
- Ferrer, J., *et al.* (1995), Pancreatic islet cells express a family of inwardly rectifying K⁺ channel subunits which interact to form G-protein-activated channels. *J Biol Chem*, **270**, 26086–91.

- Ficker, E., *et al.* (1994), Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science*, **266**, 1068–72.
- Fink, M., *et al.* (1996a), Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *EMBO J*, **15**, 6854–62.
- Fink, M., *et al.* (1996b), A new K⁺ channel beta subunit to specifically enhance Kv2.2 (CDRK) expression. *J Biol Chem*, **271**, 26341–8.
- Fink, M., *et al.* (1998), A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J*, **17**, 3297–308.
- Folander, K., *et al.* (1990), Cloning and expressing of the delayed-rectifier IsK channel from neonatal rat heart and diethylstilbestrol-primed rat uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 2975–2979.
- Gaber, R., Styles, C., and Fink, G. (1988), TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell. Biol.*, **8**, 2848–2859.
- Gafvelin, G., Sakaguchi, M., Andersson, H., and von Heijne, G. (1997), Topological rules for membrane protein assembly in eukaryotic cells. *J Biol Chem*, **272**, 6119–27.
- Ganetzky, B., *et al.* (1999), The eag family of K⁺ channels in *Drosophila* and mammals. *Ann N Y Acad Sci*, **868**, 356–69.
- Gilmore, R. (1991), The protein translocation apparatus of the rough endoplasmic reticulum, its associated proteins, and the mechanism of translocation. *Curr Opin Cell Biol*, **3**, 580–4.
- Glick, B. (2002), Can the Golgi form de novo? *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 615–619.
- Goffeau, A., *et al.* (1996), Life with 6000 genes. *Science*, **274**, 546, 563–7.
- Goldstein, S., *et al.* (2005), International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol Rev*, **57**, 527–40.
- Gulbis, J., Zhou, M., Mann, S., and MacKinnon, R. (2000), Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage-dependent K⁺ channels. *Science*, **289**, 123–7.
- Güldener, U., *et al.* (1996), A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res*, **24**, 2519–24.
- Gurney, A., *et al.* (2003), Two-pore domain K channel, TASK-1, in pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res*, **93**, 957–64.

- Guthrie, C. and Fink, G. (1991), *Guide to yeast genetics and molecular biology*. Academic Press.
- Gutman, G., *et al.* (2003), International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev*, **55**, 583–586.
- Gutman, G., *et al.* (2005), International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev*, **57**, 473–508.
- Halliwel, J. and Adams, P. (1982), Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res*, **250**, 71–92.
- Hammond, C. and Helenius, A. (1995), Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 523–9.
- Haro, R. and Rodriguez-Navarro, A. (2002), Molecular analysis of the mechanism of potassium uptake through the TRK1 transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, **1564**, 114–22.
- Hartl, F. and Neupert, W. (1990), Protein sorting to mitochondria: evolutionary conservations of folding and assembly. *Science*, **247**, 930–8.
- Hasenbrink, G., *et al.* (2005), Analysis of the mKir2.1 channel activity in potassium influx defective *Saccharomyces cerevisiae* strains determined as changes in growth characteristics. *FEBS Lett*, **579**, 1723–1731.
- Hille, B. (1992), G protein-coupled mechanisms and nervous signaling. *Neuron*, **9**, 187–95.
- Hille, B. (2001), *Ionic Channels of Excitable Membranes*, volume 3. edition. Sinauer Associates, Inc.
- Hirschberg, C. and Snider, M. (1987), Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem*, **56**, 63–87.
- Ho, I. and Murrell-Lagnado, R. (1999a), Molecular determinants for sodium-dependent activation of G protein-gated K⁺ channels. *J Biol Chem*, **274**, 8639–48.
- Ho, I. and Murrell-Lagnado, R. (1999b), Molecular mechanism for sodium-dependent activation of G protein-gated K⁺ channels. *J Physiol*, **520 Pt 3**, 645–51.
- Hoffman, C. and Winston, F. (1987), A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57**, 267.
- Hosaka, Y., *et al.* (2003), Function, subcellular localization and assembly of a novel mutation of KCNJ2 in Andersen's syndrome. *J Mol Cell Cardiol*, **35**, 409–415.

- Hoshi, T., Zagotta, W., and Aldrich, R. (1990), Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science*, **250**, 533–8.
- Hoshi, T., Zagotta, W., and Aldrich, R. (1991), Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron*, **7**, 547–56.
- Huang, C., Feng, S., and Hilgemann, D. (1998), Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP₂ and its stabilization by Gbetagamma. *Nature*, **391**, 803–6.
- Huang, C., Jan, Y., and Jan, L. (1997), Binding of the G protein betagamma subunit to multiple regions of G protein-gated inward-rectifying K⁺ channels. *FEBS Lett*, **405**, 291–298.
- Huang, C., *et al.* (1995), Evidence that direct binding of G beta gamma to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel is important for channel activation. *Neuron*, **15**, 1133–43.
- Huh, W., *et al.* (2003), Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, **425**, 686–691.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990), High efficiency transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *Gene*, **96**, 23–28.
- Ishii, T., *et al.* (1997), A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11651–6.
- Isomoto, S., Kondo, C., and Kurachi, Y. (1997), Inwardly rectifying potassium channels: their molecular heterogeneity and function. *Jpn J Physiol*, **47**, 11–39.
- Jackson, M., Nilsson, T., and Peterson, P. (1990), Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J*, **9**, 3153–62.
- Jan, L. and Jan, Y. (1997a), Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu Rev Neurosci*, **20**, 91–123.
- Jan, L. and Jan, Y. (1997b), Voltage-gated and inwardly rectifying potassium channels. *J. Physiol.*, **505**, 267–282.
- Jarosch, E., Lenk, U., and Sommer, T. (2003), Endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Int Rev Cytol*, **223**, 39–81.
- Jenkinson, D. (2006), Potassium channels - multiplicity and challenges. *Br J Pharmacol*, **147 Suppl 1**, S63–71.
- Jentsch, T. (2000), Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci*, **1**, 21–30.

- Jiang, Y. and MacKinnon, R. (2000), The barium site in a potassium channel by x-ray crystallography. *J. Gen. Physiol*, **115**, 269–272.
- Jiang, Y., *et al.* (2003a), The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, **423**, 42–8.
- Jiang, Y., *et al.* (2003b), X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, **423**, 33–41.
- Johnston, M. and Davis, R. (1984), Sequences that regulate the divergent GAL1-GAL10 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **4**, 1440–8.
- Joiner, W., Wang, L., Tang, M., and Kaczmarek, L. (1997), hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11013–8.
- Kain, S., *et al.* (1995), Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. *Biotechniques*, **19**, 650–5.
- Kamb, A., Iverson, L., and Tanouye, M. (1987), Molecular characterization of Shaker, a *Drosophila* gene that encodes a potassium channel. *Cell*, **50**, 405–13.
- Karschin, C., *et al.* (1994), Distribution and localization of a G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channel in the rat. *FEBS Lett*, **348**, 139–44.
- Kasahara, T. and Kasahara, M. (1996), Expression of the rat GLUT1 glucose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*, **315 (Pt 1)**, 177–82.
- Kasahara, T. and Kasahara, M. (1997), Characterization of rat Glut4 glucose transporter expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with Glut1 glucose transporter. *Biochim Biophys Acta*, **1324**, 111–9.
- Ketchum, K., *et al.* (1995), A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature*, **376**, 690–695.
- Kharkovets, T., *et al.* (2000), KCNQ4, a K⁺ channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4333–4338.
- Kim, D. (2003), Fatty acid-sensitive two-pore domain K⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci*, **24**, 648–54.
- Kim, L., *et al.* (2004), Ito channels are octomeric complexes with four subunits of each Kv4.2 and K⁺ channel-interacting protein 2. *J Biol Chem*, **279**, 5549–54.

- Kiser, G., *et al.* (2001), Expression and degradation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys*, **390**, 195–205.
- Knop, M., Hauser, N., and Wolf, D. (1996), N-Glycosylation affects endoplasmic reticulum degradation of a mutated derivative of carboxypeptidase *ycsY* in yeast. *Yeast*, **12**, 1229–38.
- Ko, D., Liang, H., and Gaber, R. (1990), TRK2 is required for low affinity K⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **125**, 305–312.
- Kobayashi, T., Washiyama, K., and Ikeda, K. (2004), Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by various antidepressant drugs. *Neuropsychopharmacology*, **29**, 1841–1851.
- Kofuji, P., Davidson, N., and Lester, H. (1995), Evidence that neuronal G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels are activated by G beta gamma subunits and function as heteromultimers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 6542–6.
- Kofuji, P., *et al.* (1996), Functional analysis of the weaver mutant GIRK2 K⁺ channel and rescue of weaver granule cells. *Neuron*, **16**, 941–52.
- Köhler, M., *et al.* (1996), Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science*, **273**, 1709–14.
- Kreusch, A., Pfaffinger, P., Stevens, C., and Choe, S. (1998), Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel. *Nature*, **392**, 945–948.
- Kubisch, C., *et al.* (1999), KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell*, **96**, 437–446.
- Kubo, Y., Baldwin, T., Jan, Y., and Jan, L. (1993a), Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature*, **362**, 127–133.
- Kubo, Y., *et al.* (1993b), Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel. *Nature*, **364**, 802–6.
- Kubo, Y., *et al.* (2005), International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev*, **57**, 509–26.
- Kumar, A., *et al.* (2002), Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev*, **16**, 707–719.
- Kupersmidt, S., *et al.* (2002), Cardiac-enriched LIM domain protein *fhl2* is required to generate I(Ks) in a heterologous system. *Cardiovasc Res*, **56**, 93–103.

- Kuryshv, Y., Gudz, T., Brown, A., and Wible, B. (2000), KChAP as a chaperone for specific K(+) channels. *Am J Physiol Cell Physiol*, **278**, C931–41.
- Kuryshv, Y., *et al.* (2001), KChAP/Kvbeta1.2 interactions and their effects on cardiac Kv channel expression. *Am J Physiol Cell Physiol*, **281**, C290–9.
- Lange, P., Er, F., Gassanov, N., and Hoppe, U. (2003), Andersen mutations of KCNJ2 suppress the native inward rectifier current IK1 in a dominant-negative fashion. *Cardiovasc. Res.*, **59**, 321–327.
- Lesage, F. and Lazdunski, M. (1998), Mapping of human potassium channel genes TREK-1 (KCNK2) and TASK (KCNK3) to chromosomes 1q41 and 2p23. *Genomics*, **51**, 478–9.
- Lesage, F. and Lazdunski, M. (2000), Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol*, **279**, F793–801.
- Lesage, F., Maingret, F., and Lazdunski, M. (2000), Cloning and expression of human TRAAK, a polyunsaturated fatty acids-activated and mechano-sensitive K(+) channel. *FEBS Lett*, **471**, 137–40.
- Lesage, F., *et al.* (1995), Molecular properties of neuronal G-protein-activated inwardly rectifying K+ channels. *J Biol Chem*, **270**, 28660–7.
- Lesage, F., *et al.* (1996), A pH-sensitive yeast outward rectifier K+ channel with two pore domains and novel gating properties. *J Biol Chem*, **271**, 4183–7.
- Lim, N., *et al.* (1995), A G protein-gated K channel is activated via beta 2-adrenergic receptors and G beta gamma subunits in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol*, **105**, 421–39.
- Lippincott-Schwartz, J. (1993), Bidirectional membrane traffic between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Trends Cell Biol*, **3**, 81–8.
- Lodish, H., *et al.* (1996), *Molekulare Zellbiologie*, volume 2. Auflage. de Gruyter.
- Logothetis, D., *et al.* (1987), The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K+ channel in heart. *Nature*, **325**, 321–6.
- Logothetis, D., *et al.* (1988), Specificity of action of guanine nucleotide-binding regulatory protein subunits on the cardiac muscarinic K+ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 5814–8.
- Lopatin, A., Makhina, E., and Nichols, C. (1994), Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature*, **372**, 366–9.
- Lottspeich, F. and Zorbas, H. (1998), *Bioanalytik*, volume 1. Auflage. Spektrum, Akad. Verl.

- Loukin, S., *et al.* (1997), Random mutagenesis reveals a region important for gating of the yeast K⁺ channel Ykc1. *EMBO*, **16**, 4817–4825.
- Ludwig, J., Owen, D., and Pongs, O. (1997), Carboxy-terminal domain mediates assembly of the voltage-gated rat ether-a-go-go potassium channel. *EMBO J*, **16**, 6337–6345.
- Ludwig, J., *et al.* (1994), Functional expression of a rat homologue of the voltage gated ether a go-go potassium channel reveals differences in selectivity and activation kinetics between the Drosophila channel and its mammalian counterpart. *EMBO J*, **13**, 4451–8.
- Macreadie, I., Jagadish, M., Azad, A., and Vaughan, P. (1989), Versatile cassettes designed for the copper inducible expression of proteins in yeast. *Plasmid*, **21**, 147–50.
- Madrid, R., Gomez, M., Ramos, J., and Rodriguez-Navarro, A. (1998), Ectopic potassium uptake in trk1 trk2 mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membranepotential. *J. Biol. Chem.*, **273**, 14838–14844.
- Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y., and Jan, L. (2000), A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron*, **27**, 97–106.
- Mark, M. and Herlitze, S. (2000), G-protein mediated gating of inward-rectifier K⁺ channels. *Eur J Biochem*, **267**, 5830–5836.
- Marrion, N. (1997), Control of M-current. *Annu Rev Physiol*, **59**, 483–504.
- Matsuda, H. (1991a), Effects of external and internal K⁺ ions on magnesium block of inwardly rectifying K⁺ channels in guinea-pig heart cells. *J Physiol*, **435**, 83–99.
- Matsuda, H. (1991b), Magnesium gating of the inwardly rectifying K⁺ channel. *Annu Rev Physiol*, **53**, 289–98.
- McCrossan, Z. and Abbott, G. (2004), The MinK-related peptides. *Neuropharmacology*, **47**, 787–821.
- McDonald, T., *et al.* (1997), A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I(Kr). *Nature*, **388**, 289–92.
- Melman, Y., *et al.* (2004), KCNE1 binds to the KCNQ1 pore to regulate potassium channel activity. *Neuron*, **42**, 927–37.
- Mercier, R., *et al.* (2004), Yeast hygromycin sensitivity as a functional assay of cyclic nucleotide gated cation channels. *Plant Physiol Biochem*, **42**, 529–36.
- Miake, J., Marban, E., and Nuss, H. (2003), Functional role of inward rectifier current in heart probed by Kir2.1 overexpression and dominant-negative suppression. *J Clin Invest*, **111**, 1529–1536.

- Morales, M., *et al.* (1996), The N-terminal domain of a K⁺ channel beta subunit increases the rate of C-type inactivation from the cytoplasmic side of the channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 15119–23.
- Moss, B. and Magleby, K. (2001), Gating and conductance properties of BK channels are modulated by the S9-S10 tail domain of the alpha subunit. A study of mSlo1 and mSlo3 wild-type and chimeric channels. *J Gen Physiol*, **118**, 711–34.
- Nagaya, N. and Papazian, D. (1997), Potassium channel alpha and beta subunits assemble in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **272**, 3022–3027.
- Neyroud, N., *et al.* (1997), A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat Genet*, **15**, 186–9.
- Neyton, J. and Miller, C. (1988), Discrete Ba²⁺ block as a probe of ion occupancy and pore structure in the high-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *J. Gen. Physiol*, **92**, 569–586.
- Nichols, C. and Lopatin, A. (1997), Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol*, **59**, 171–91.
- Niedenthal, R., Riles, L., Johnston, M., and Hegemann, J. (1996), Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast*, **12**, 773–86.
- Nilsson, T., Jackson, M., and Peterson, P. (1989), Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*, **58**, 707–18.
- Ogielska, E., *et al.* (1995), Cooperative subunit interactions in C-type inactivation of K channels. *Biophys J*, **69**, 2449–57.
- Oliver, D., Baukowitz, T., and Fakler, B. (2000), Polyamines as gating molecules of inward-rectifier K⁺ channels. *Eur J Biochem*, **267**, 5824–9.
- Panyi, G., Sheng, Z., and Deutsch, C. (1995), C-type inactivation of a voltage-gated K⁺ channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophys J*, **69**, 896–903.
- Papazian, D., Timpe, L., Jan, Y., and Jan, L. (1991), Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature*, **349**, 305–10.
- Parlati, F., Dominguez, M., Bergeron, J., and Thomas, D. (1995), *Saccharomyces cerevisiae* CNE1 encodes an endoplasmic reticulum (ER) membrane protein with sequence similarity to calnexin and calreticulin and functions as a constituent of the ER quality control apparatus. *J Biol Chem*, **270**, 244–53.

- Patil, C. and Walter, P. (2001), Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 349–55.
- Patil, N., *et al.* (1995), A potassium channel mutation in weaver mice implicates membrane excitability in granule cell differentiation. *Nat Genet*, **11**, 126–9.
- Pelham, H. (1988), Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment. *EMBO J*, **7**, 913–8.
- Pelham, H. (1991), Recycling of proteins between the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Curr Opin Cell Biol*, **3**, 585–91.
- Pelham, H. (1995), Sorting and retrieval between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 530–5.
- Pelham, H., Hardwick, K., and Lewis, M. (1988), Sorting of soluble ER proteins in yeast. *EMBO J*, **7**, 1757–62.
- Perlin, D., Brown, C., and Haber, J. (1988), Membrane potential defect in hygromycin B-resistant pma1 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **263**, 18118–22.
- Pfeffer, S. and Rothman, J. (1987), Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu Rev Biochem*, **56**, 829–52.
- Piros, E., Shen, L., and Huang, X. (1999), Purification of an EH domain-binding protein from rat brain that modulates the gating of the rat ether-a-go-go channel. *J Biol Chem*, **274**, 33677–33683.
- Plaster, N., *et al.* (2001), Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen’s syndrome. *Cell*, **105**, 511–519.
- Pongs, O. (1992), Molecular biology of voltage-dependent potassium channels. *Physiol Rev*, **72**, S69–88.
- Prasher, D., *et al.* (1992), Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, **111**, 229–33.
- Prinz, B., Stahl, U., and Lang, C. (2003), Intracellular transport of a heterologous membrane protein, the human transferrin receptor, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int Microbiol*, **6**, 49–55.
- Proks, P., Antcliff, J., and Ashcroft, F. (2003), The ligand-sensitive gate of a potassium channel lies close to the selectivity filter. *EMBO Rep.*, **4**, 70–75.

- Rajan, S., *et al.* (2001), THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K⁺ channels. *J Biol Chem*, **276**, 7302–11.
- Rakic, P. and Sidman, R. (1973), Weaver mutant mouse cerebellum: defective neuronal migration secondary to abnormality of Bergmann glia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **70**, 240–4.
- Ramos, J., Alijo, R., Haro, R., and Rodriguez-Navarro, A. (1994), TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **176**, 249–252.
- Ramos, J., Contreras, P., and Rodriguez-Navarro, A. (1985), A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, **143**, 88–93.
- Rasmusson, R., *et al.* (1998), Inactivation of voltage-gated cardiac K⁺ channels. *Circ Res*, **82**, 739–50.
- Regenberg, B., Villalba, J., Lanfermeijer, F., and Palmgren, M. (1995), C-terminal deletion analysis of plant plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase: yeast as a model system for solute transport across the plant plasma membrane. *Plant Cell*, **7**, 1655–66.
- Reid, J., *et al.* (1996), The *S. cerevisiae* outwardly-rectifying potassium channel (DUK1) identifies a new family of channels with duplicated pore domains. *Receptors Channels*, **4**, 51–62.
- Reimann, F. and Ashcroft, F. (1999), Inwardly rectifying potassium channels. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 503–508.
- Rettig, J., *et al.* (1994), Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of beta-subunit. *Nature*, **369**, 289–94.
- Roeper, J., *et al.* (1998), NIP domain prevents N-type inactivation in voltage-gated potassium channels. *Nature*, **391**, 390–393.
- Rogawski, M. (2000), KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels and the molecular pathogenesis of epilepsy: implications for therapy. *Trends Neurosci*, **23**, 393–8.
- Romey, G., *et al.* (1997), Molecular mechanism and functional significance of the MinK control of the KvLQT1 channel activity. *J Biol Chem*, **272**, 16713–16716.
- Roosild, T., Le, K., and Choe, S. (2004), Cytoplasmic gatekeepers of K⁺-channel flux: a structural perspective. *Trends Biochem Sci*, **29**, 39–45.
- Rossanese, O., *et al.* (1999), Golgi structure correlates with transitional endoplasmic reticulum organization in *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **145**, 69–81.
- Roy, M., Dumaine, R., and Brown, A. (1996), HERG, a primary human ventricular target of the non-sedating antihistamine terfenadine. *Circulation*, **94**, 817–23.

- Saldana, C., *et al.* (2002), Splitting the two pore domains from TOK1 results in two cationic channels with novel functional properties. *J Biol Chem*, **277**, 4797–805.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989), *A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sangsoda, S., Cherest, H., and Surdin-Kerjan, Y. (1985), The expression of the MET25 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated transcriptionally. *Mol Gen Genet*, **200**, 407–14.
- Sanguinetti, M. and Spector, P. (1997), Potassium channelopathies. *Neuropharmacology*, **36**, 755–62.
- Sanguinetti, M., *et al.* (1996), Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature*, **384**, 80–3.
- Schachtmann, D., *et al.* (1992), Expression of an inward-rectifying potassium channel by the *Arabidopsis* KAT1 cDNA. *Science*, **258**, 1654–1658.
- Schäfer, A. and Wolf, D. (2005), Yeast Genomics in the Elucidation of Endoplasmic Reticulum (ER) Quality Control and Associated Protein Degradation (ERQD). *Methods Enzymol*, **399**, 459–68.
- Schmitt, N., *et al.* (2000), A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *EMBO J*, **19**, 332–40.
- Schönherr, R., Lober, K., and Heinemann, S. (2000), Inhibition of human ether a go-go potassium channels by Ca(2+)/calmodulin. *EMBO J*, **19**, 3263–3271.
- Schreiber, M. and Salkoff, L. (1997), A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys J*, **73**, 1355–63.
- Schroeder, B., Kubisch, C., Stein, V., and Jentsch, T. (1998), Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. *Nature*, **396**, 687–690.
- Schroeder, B., *et al.* (2000a), A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature*, **403**, 196–199.
- Schroeder, B., *et al.* (2000b), KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents. *J Biol Chem*, **275**, 24089–24095.
- Schulte, U., *et al.* (1999), pH gating of ROMK (K(ir)1.1) channels: control by an Arg-Lys-Arg triad disrupted in antenatal Bartter syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 15298–303.
- Schulze-Bahr, E., *et al.* (1997a), Autosomal recessive long-QT syndrome (Jervell Lange-Nielsen syndrome) is genetically heterogeneous. *Hum Genet*, **100**, 573–6.

- Schulze-Bahr, E., *et al.* (1997b), KCNE1 mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome.
- Schumacher, M., Rivard, A., Baechinger, H., and Adelman, J. (2001), Structure of the gating domain of a Ca²⁺-activated K⁺ channel complexed with Ca²⁺/calmodulin. *Nature*, **410**, 1120–4.
- Sentenac, H., *et al.* (1992), Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science*, **256**, 663–5.
- Sesti, F. and Goldstein, S. (1998), Single-channel characteristics of wild-type IKs channels and channels formed with two minK mutants that cause long QT syndrome. *J Gen Physiol*, **112**, 651–63.
- Sewing, S., Roeper, J., and Pongs, O. (1996), Kv beta 1 subunit binding specific for shaker-related potassium channel alpha subunits. *Neuron*, **16**, 455–63.
- Shi, G., *et al.* (1996), Beta subunits promote K⁺ channel surface expression through effects early in biosynthesis. *Neuron*, **16**, 843–52.
- Shi, J., *et al.* (2002), Mechanism of magnesium activation of calcium-activated potassium channels. *Nature*, **418**, 876–80.
- Shieh, C., Coghlan, M., Sullivan, J., and Gopalakrishnan, M. (2000), Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev*, **52**, 557–94.
- Signorini, S., *et al.* (1997), Normal cerebellar development but susceptibility to seizures in mice lacking G protein-coupled, inwardly rectifying K⁺ channel GIRK2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 923–7.
- Sikorski, R. and Hieter, P. (1989), A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19–27.
- Simon, D., *et al.* (1996), Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K⁺ channel, ROMK. *Nat Genet*, **14**, 152–6.
- Simon, S. (1993), Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol*, **5**, 581–8.
- Slesinger, P., *et al.* (1996), Functional effects of the mouse weaver mutation on G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels. *Neuron*, **16**, 321–31.
- Snapp, E., *et al.* (2003), Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *J Cell Biol*, **163**, 257–69.
- Solow, S., Sengbusch, J., and Laird, M. (2005), Heterologous protein production from the inducible MET25 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Prog*, **21**, 617–20.

- Sotelo, C. and Changeux, J. (1974), Bergmann fibers and granular cell migration in the cerebellum of homozygous weaver mutant mouse. *Brain Res*, **77**, 484–91.
- Spear, E. and Ng, D. (2001), The unfolded protein response: no longer just a special teams player. *Traffic*, **2**, 515–23.
- Stansfeld, C., *et al.* (1996), Elevation of intracellular calcium by muscarinic receptor activation induces a block of voltage-activated rat ether-a-go-go channels in a stably transfected cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 9910–4.
- Strong, M., Chandy, K., and Gutman, G. (1993), Molecular evolution of voltage-sensitive ion channel genes: on the origins of electrical excitability. *Mol Biol Evol*, **10**, 221–42.
- Sui, J., Chan, K., and Logothetis, D. (1996), Na⁺ activation of the muscarinic K⁺ channel by a G-protein-independent mechanism. *J. Gen Physiol.*, **108**, 381–391.
- Takumi, T., Ohkubo, H., and Nakanishi, S. (1988), Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science*, **242**, 1042–1045.
- Tang, W., *et al.* (1995), Functional expression of a vertebrate inwardly rectifying K⁺ channel in yeast. *Mol. Biol. Cell.*, **6**, 1231–1240.
- Tate, C. (2001), Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies. *FEBS Lett*, **504**, 94–8.
- Tawil, R., *et al.* (1994), Andersen's syndrome: potassium-sensitive periodic paralysis, ventricular ectopy, and dysmorphic features. *Ann. Neurol.*, **35**, 326–330.
- Terlau, H., *et al.* (1997), Amino terminal-dependent gating of the potassium channel rat eag is compensated by a mutation in the S4 segment. *J Physiol*, **502 (Pt 3)**, 537–43.
- Tinel, N., *et al.* (2000a), KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *EMBO J*, **19**, 6326–30.
- Tinel, N., *et al.* (2000b), M-type KCNQ2-KCNQ3 potassium channels are modulated by the KCNE2 subunit. *FEBS Lett*, **480**, 137–41.
- Tirode, F., *et al.* (1997), A conditionally expressed third partner stabilizes or prevents the formation of a transcriptional activator in a three-hybrid system. *J Biol Chem*, **272**, 22995–9.
- Tristani-Firouzi, M., *et al.* (2002), Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). *J Clin Invest*, **110**, 381–388.
- Varshney, A. and Mathew, M. (2004), Architecture of a membrane protein: The voltage-gated K⁺ channel. *Current Science*, **87**.

- Vergani, P., Miosga, T., Jarvis, S., and Blatt, M. (1997), Extracelluläre K⁺ and Ba²⁺ mediate voltage-dependent inactivation of the outward-rectifying K⁺-channel encoded by the yeast gene TOK1. *FEBS Lett.*, **405**, 337–344.
- Vergara, C., Latorre, R., Marrion, N., and Adelman, J. (1998), Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol*, **8**, 321–329.
- Vidal, M., *et al.* (1995), Identification of essential nucleotides in an upstream repressing sequence of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**, 2370–2374.
- Villalba, J., *et al.* (1992), Functional expression of plant plasma membrane H⁺-ATPase in yeast endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **267**, 12341–9.
- Vogalis, F., Storm, J., and Lancaster, B. (2003), SK channels and the varieties of slow after-hyperpolarizations in neurons. *Eur J Neurosci*, **18**, 3155–3166.
- von Heijne, G. (1990), Protein targeting signals. *Curr Opin Cell Biol*, **2**, 604–8.
- von Heijne, G. and Gavel, Y. (1988), Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur J Biochem*, **174**, 671–8.
- Walter, P. and Lingappa, V. (1986), Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol*, **2**, 499–516.
- Wang, H., *et al.* (1998), KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science*, **282**, 1890–1893.
- Wang, Q., *et al.* (1996), Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet*, **12**, 17–23.
- Ward, W. and Bokman, S. (1982), Reversible denaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry*, **21**, 4535–40.
- Warmke, J., Drysdale, R., and Ganetzky, B. (1991), A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila* *eag* locus. *Science*, **252**, 1560–2.
- Warmke, J. and Ganetzky, B. (1994), A family of potassium channel genes related to *eag* in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 3438–3442.
- Wei, A., *et al.* (2005), International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev*, **57**, 463–72.
- Wible, B., *et al.* (1998), Cloning and expression of a novel K⁺ channel regulatory protein, KChAP. *J Biol Chem*, **273**, 11745–51.

- Wickman, K., *et al.* (1994), Recombinant G-protein beta gamma-subunits activate the muscarinic-gated atrial potassium channel. *Nature*, **368**, 255–7.
- Wright, R. (1993), Insights from inducible membranes. *Curr Biol*, **3**, 870–3.
- Xia, X., *et al.* (1998), Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*, **395**, 503–7.
- Xu, J. and Li, M. (1998), Auxiliary subunits of Shaker-type potassium channels. *Trends Cardiovasc Med*, **8**, 229–34.
- Yamada, M., Inanobe, A., and Kurachi, Y. (1998), G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Rev*, **50**, 723–60.
- Yang, W., *et al.* (1997), KvLQT1, a voltage-gated potassium channel responsible for human cardiac arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4017–21.
- Yang, W., *et al.* (1998), Functional expression of two KvLQT1-related potassium channels responsible for an inherited idiopathic epilepsy. *J Biol Chem*, **273**, 19419–23.
- Yellen, G. (2002), The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, **419**, 35–42.
- Yi, B., Lin, Y., Jan, Y., and Jan, L. (2001), Yeast screen for constitutively active mutant G protein-activated potassium channels. *Neuron*, **29**, 657–667.
- Yu, W., Xu, J., and Li, M. (1996), NAB domain is essential for the subunit assembly of both alpha-alpha and alpha-beta complexes of shaker-like potassium channels. *Neuron*, **16**, 441–53.
- Zagotta, W., Hoshi, T., and Aldrich, R. (1990), Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science*, **250**, 568–71.
- Zaks-Makhina, E., Kim, Y., Aizenman, E., and Levitan, E. (2004), Novel neuroprotective K⁺ channel inhibitor identified by high-throughput screening in yeast. *Mol Pharmacol*, **65**, 214–219.
- Zeng, G., Pypaert, M., and Slayman, C. (2004), Epitope tagging of the yeast K⁽⁺⁾ carrier Trk2p demonstrates folding that is consistent with a channel-like structure. *J Biol Chem*, **279**, 3003–13.
- Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y., and Jan, L. (1999), A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron*, **22**, 537–548.

Zhang, H., *et al.* (1999), Activation of inwardly rectifying K⁺ channels by distinct PtdIns(4,5)P₂ interactions. *Nat Cell Biol*, **1**, 183–8.

Zhao, Y., Hopkins, K., and Liebermann, H. (1993), A methode for the preparation and storage of frozen, competent *Schizosaccharomyces pombe* speroblasts. *Bio Techniques*, **15**, 23.

Zhou, X., *et al.* (1995), YKC1 encodes the depolarization-activated K⁺ channel in the plasma-membrane of yeast. *FEBS Lett*, **373**, 170–176.

7 Anhang

7.1 Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Tabelle 7.1: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide. In dieser Tabelle ist die jeweilige Nukleotidsequenz mit zusätzlichen Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen (unterstrichen) und zusätzlich angefügten Nukleotiden (kursiv) aufgelistet. Mutierte Nukleotide sind fett gedruckt dargestellt.

Nr.	Nukleotidsequenz	Restriktions- enzym	Name
#1	5' <u>GAGACTCGAGCC</u> ACCATGACAATGGCCAAGTTAAC TGAATCC	<i>XhoI</i>	B652
#2	5' <u>GAGAGGATCCT</u> CACCATTCTCTCTGTCAGTTCTTCCG	<i>BamHI</i>	B653
#3	5'ACTGCTGCTGGTATTACCCATGG		B648
#4	5'ACCTCTACAAATGTGGTATGGCTG		B649
#5	5'GACCCAACACGGTCCGGATTAAGAG		B655
#6	5'CTCTTAATCCAG ACCGT GTTGGGGTC		B654
#7	5'GACCCCAACAC CC ACTGGATTAAGAG		B657
#8	5'CTCTTAATCCAGT GGGT GTGGGGTC		B656
#9	5'CATACATCCT CC CATGAGGCG		B659
#10	5'CGCCTTCATGG G AGGATGTATG		B658
#11	5'CTGTAGCCATAACTAATGGTGGTTTC		B661
#12	5'GAAACCACCATT A GTTATGGCTACAG		B660
#13	5'TGGCCATGGAGTTCAGACAGT		H398
#14	5'TGCTCGGATCCTAGGGACTCCTGGCCT		H392
#15	5'TGGA ACTG TTGGAAGAGCT GCTG GACAGGGTGG		B478
#16	5' GC AGCTCTTCCA AC AGTTCCA AC AGCAGAAAG		B479
#17	5'CTGGCGGG G ACCTTTGGGAGACCTCCTGAC		B477
#18	5'AGGCTCT CC CAAAGGT CC CGCCAGCAG		B476
#19	5' <u>CTTCGAATTCT</u> ATGGGCAGTG	<i>EcoRI</i>	B614
#20	5'TCTGCCAGGTACC ACT GTCCCTTCTCACC		B641
#21	5' GGACAGTGGTACCTGGCAGACATCTT		B640

Nr.	Nukleotidsequenz	Restriktions- enzym	Name
#22	5'CGGTGGATCCTTAGTCATATC	<i>Bam</i> HI	B615
#23	5'GTAGTAAAGATGACTGCCAGGTACCT		B643
#24	5'AGGTACCTGGCAGTCATCTTTACTAC		B642
#25	5'GTCTGGGTCTCGATGAAGAAGAGGAA		B645
#26	5'TTCCTCTTCTTCATCGAGACCCAGAC		B644
#27	5'CTGAAACCATAGCTAATGGTTGTCTGGGT		B647
#28	5'ACCCAGACAACCATTAGCTATGGTTTCAG		B646
#29	5'GAGATCTAGACTAGTACGGATTAGAAGCCGCCA	<i>Xba</i> I	B638
#30	5'AGAGCCCGGGGTTTTTCTCCTTGACGTAAAG	<i>Xma</i> I	B639
#31	5'GAGAGAATTCCACCATGGTGCAGAAGTCGCGCA	<i>Eco</i> RI	B400
#32	5'GAGAGGATCCTCACTTCCTGGGCCCGGCCAGC	<i>Bam</i> HI	B402
#33	5'GCTGGACTTCCTGGTGAATA		B403
#34	5'CACCTTTAGACATCTTCCTGGGCCCGGCCAGCC		B404
#35	5'GGCCCAGGAAGATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTC		B405
#36	5'GAGAGGATCCTTATTTGTACAATTCATCCATACC	<i>Bam</i> HI	B406
#37	5'GAGAGTCGACCACCATGGGGCTCAAGGCGCGCA	<i>Sal</i> I	B407
#38	5'GAGAGGATCCTTAAATGGGCTTATTGGAAGG	<i>Bam</i> HI	B408
#39	5'GGCAAGTCCTCCTTCCTCAG		B409
#40	5'CCTTTAGACATAATGGGCTTATTGGAAGGGGTCC		B410
#41	5CAATAAGCCCATTATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTC'		B411
#42	5'GAGAGAATTCCACCATGGAGACTACCAATGGAACG	<i>Eco</i> RI	B428
#43	5'GAGAGGATCCTTAGATCATAGACACACGGTTC	<i>Bam</i> HI	B429
#44	5'GTGTCTATGATCATGTCTAAAGGTGAAGAATTC		B430
#45	5'ACCTTTAGACATGATCATAGACACACGGTTCTTG		B431
#46	5'GAGACTCGAGCCACCATGACAATGGCCAAGTAACT GAATCC	<i>Xho</i> I	B652
#47	5'GAGAGGATCCTCACCCATTCTCTCTGTCAGTTCTTC CG	<i>Bam</i> HI	B653

Nr.	Nukleotidsequenz	Restriktions- enzym	Name
#48	5'CAGAGGAGGCTGGACCAGTCC		B426
#49	5'ACCTTTAGACATGGACCCCTCATCGGGGCCC		B425
#50	5'AGGGGTCCATGTCTAAAGGTGAAGAATTA		B424
#51	5'CCGTAGCCAATGGTGGTCAGCGTG		B423
#52	5'CAGAGAAGAAGGAGGACAAC		B421
#53	5'TACACCGCCTCCGCCAAAGTGGACAAGCG		B487
#54	5'ACTTTGGCGGAGGCGGTGTATCCCAGGAT		B490
#55	5'GAGGATCCTTACTCGTTCTCGTAGCAGAAGATCATAG ACACACGGTTCTTGATA	<i>Bam</i> HI	B481
#56	5'GAGAGCCGGCAACGACATTACTATATATAATATAGG AAGC	<i>Nae</i> I	B285
#57	5'GAGAGACGTCAGGCAAGTGCACAAACAATACTTAAA TAAATACTAC	<i>Aat</i> II	B286

7.2 Verwendete Plasmide

7.2.1 Auflistung auf die im Rahmen dieser Arbeit zurückgegriffenen Plasmide

Tabelle 7.2: Auflistung auf die im Rahmen dieser Arbeit zurückgegriffenen Plasmide. Angegeben ist der jeweilige Plasmidname, der Promotor, welcher das zu exprimierende Gen kontrolliert, vorhandene Selektionsmarker für Hefe und Bakterien (kursiv) und Hersteller des Plasmids.

Name	Promotor	Selektionsmarker	Herkunft
pYEX-yEGFP-mut3-C1	<i>P_{CUP1}</i>	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>	J. Ludwig
pYEX-BX-rEAG1/yEGFP	<i>P_{CUP1}</i>	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>	J. Ludwig
pYEX-BX-rEAG1	<i>P_{CUP1}</i>	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>	J. Ludwig
pEGFP-C1-mKir2.1	<i>P_{CUP1}</i>	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>	J. Ludwig
p77X-rEAG1Δ190	<i>P_{PMA1}</i>	LEU2, <i>amp^r</i>	J. Ludwig
p77X	<i>P_{PMA1}</i>	LEU2, <i>amp^r</i>	J. Ludwig
tok rEAG1Δ190 sk		LEU2, <i>amp^r</i>	J. Ludwig
p679		LEU2, HIS3, <i>amp^r</i>	Doheny et al. (1993)

Name	Promotor	Selektionsmarker	Herkunft
pYEX-BX-CJ	P_{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>	C. Hantel, J. Ludwig
pNS1n-KCNQ1			Neurosearch
pRS423- P_{MET25}	P_{MET25}	HIS3, <i>amp^r</i>	C.Hantel, J. Ludwig
pSH47	P_{GAL1}	URA3, <i>amp^r</i>	Güldener et al. (1996)
pRS423		HIS3, <i>amp^r</i>	Sikorski and Hieter (1989)
pTLN-KCNQ2			Schroeder et al. (1998)
pTLN-KCNQ3			Schroeder et al. (1998)
pTLN-KCNE3			Schroeder et al. (2000b)

7.2.2 Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmide

In folgender Tabelle sind die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmide zusammengestellt, detaillierte Konstruktionsbeschreibungen sind in Abschnitt 7.3 aufgezeichnet.

Tabelle 7.3: Übersicht über die hergestellten Plasmide. In dieser Tabelle sind die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmide, ihre Namen, der Promotor, welcher das zu exprimierende Gen kontrolliert und die vorhandenen Selektionsmarker für Hefe und Bakterien (kursiv) aufgelistet.

Name	Promotor	Selektionsmarker
pYEX-BX-CJ-v2	P_{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-rKir3.2	P_{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-yEGFP/rKir3.2	P_{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-rKir3.2 [G156S]	P_{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-rKir3.2 [S177T]	P_{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-rKir3.2 [S177W]	P_{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-rKir3.2 [V188G]	P_{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-yEGFP/rKir3.2 [G156S]	P_{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-yEGFP/rKir3.2 [S177T]	P_{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-yEGFP/rKir3.2 [S177W]	P_{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-yEGFP/rKir3.2 [V188G]	P_{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-BX-rEAG1 Δ 190/yEGFP	P_{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>

Name	Promotor	Selektionsmarker
pYEX-BX-rEAG1Δ190	P _{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-BX-rEAG1Δ190 [F714S, F717S] /yEGFP]	P _{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-BX-rEAG1Δ190 [R711Q, R712Q, R716Q, R718Q]/yEGFP	P _{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-yEGFP/mKir2.1	P _{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-yEGFP/mKir2.1 [R67W]	P _{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-yEGFP/mKir2.1 [D71V]	P _{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-yEGFP/mKir2.1 [S136F]	P _{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-yEGFP/mKir2.1 [G144S]	P _{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-P _{GAL1} -yEGFP-C1	P _{GAL1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-P _{GAL1} -yEGFP/mKir2.1	P _{GAL1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-P _{GAL1} -yEGFP/mKir2.1 [R67W]	P _{GAL1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-P _{GAL1} -yEGFP/mKir2.1 [D71V]	P _{GAL1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-P _{GAL1} -yEGFP/mKir2.1 [S136F]	P _{GAL1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-P _{GAL1} -yEGFP/mKir2.1 [G144S]	P _{GAL1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1	P _{CUP1}	URA3, HIS3, <i>amp^r</i>
pYEX-P _{MET25} -yEGFP-C1	P _{MET25}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
p77x-(His)-sig/mRFP/HDEL	P _{PMA1}	HIS3, <i>amp^r</i>
pYEX-P _{MET25} -yEGFP/mKir2.1	P _{MET25}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-P _{MET25} -yEGFP/mKir2.1[R67W]	P _{MET25}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-P _{MET25} -yEGFP/mKir2.1[D71V]	P _{MET25}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-P _{MET25} -yEGFP/mKir2.1[S136F]	P _{MET25}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-P _{MET25} -yEGFP/mKir2.1[G144S]	P _{MET25}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>
p77trp	P _{PMA1}	TRP1, <i>amp^r</i>
p77X-hKCNQ1	P _{PMA1}	LEU2, <i>amp^r</i>
p77X-hKCNQ1/yEGFP	P _{PMA1}	LEU2, <i>amp^r</i>
p77X-hKCNE3	P _{PMA1}	LEU2, <i>amp^r</i>
pYEX-hKCNE3/yEGFP	P _{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>

Name	Promotor	Selektionsmarker
pYEX-(His)-mRFP/hKCNE3	P_{CUP1}	HIS3, URA3, amp^r
pYEX-yEGFP/hKCNE3	P_{CUP1}	URA3, LEU2, amp^r
pYEX-yEGFP/hKCNE3 ASA	P_{CUP1}	URA3, LEU2, amp^r
pYEX-yEGFP/hKCNE3 Δ C	P_{CUP1}	URA3, LEU2, amp^r
pYEX-hKCNE3	P_{CUP1}	URA3, LEU2, amp^r
pYEX-hKCNQ1	P_{CUP1}	URA3, LEU2, amp^r
pYEX-hKCNQ1/yEGFP	P_{CUP1}	URA3, LEU2, amp^r
pYEX-hKCNQ2	P_{CUP1}	URA3, LEU2, amp^r
pYEX-hKCNQ2/yEGFP	P_{CUP1}	URA3, LEU2, amp^r
pYEX-hKCNQ3/yEGFP	P_{CUP1}	URA3, LEU2, amp^r
p77X-hKCNQ3	P_{PMA1}	LEU2, amp^r
p77X-hKCNQ2	P_{PMA1}	LEU2, amp^r
p77X-hKCNQ2/GFP	P_{PMA1}	LEU2, amp^r
p77X-Ascl	P_{PMA1}	LEU2, amp^r

7.3 Herstellung der Plasmide

Die Plasmide wurden unter Verwendung von molekularbiologischen Standardmethoden hergestellt. Wurden DNA-Fragmente via PCR (2.8.1, 2.8.2 oder 2.8.3) gewonnen und kloniert, wurde die Sequenz dieses Fragmentes nach dem Klonieren durch Sequenzierung (2.7.2) kontrolliert.

7.3.1 Herstellung der Plasmide zur Expression von *rEAG1* bzw. *rEAG1* Δ 190 (-Varianten)

7.3.1.1 Konstruktion von pYEX-rEAG1 Δ 190/yEGFP

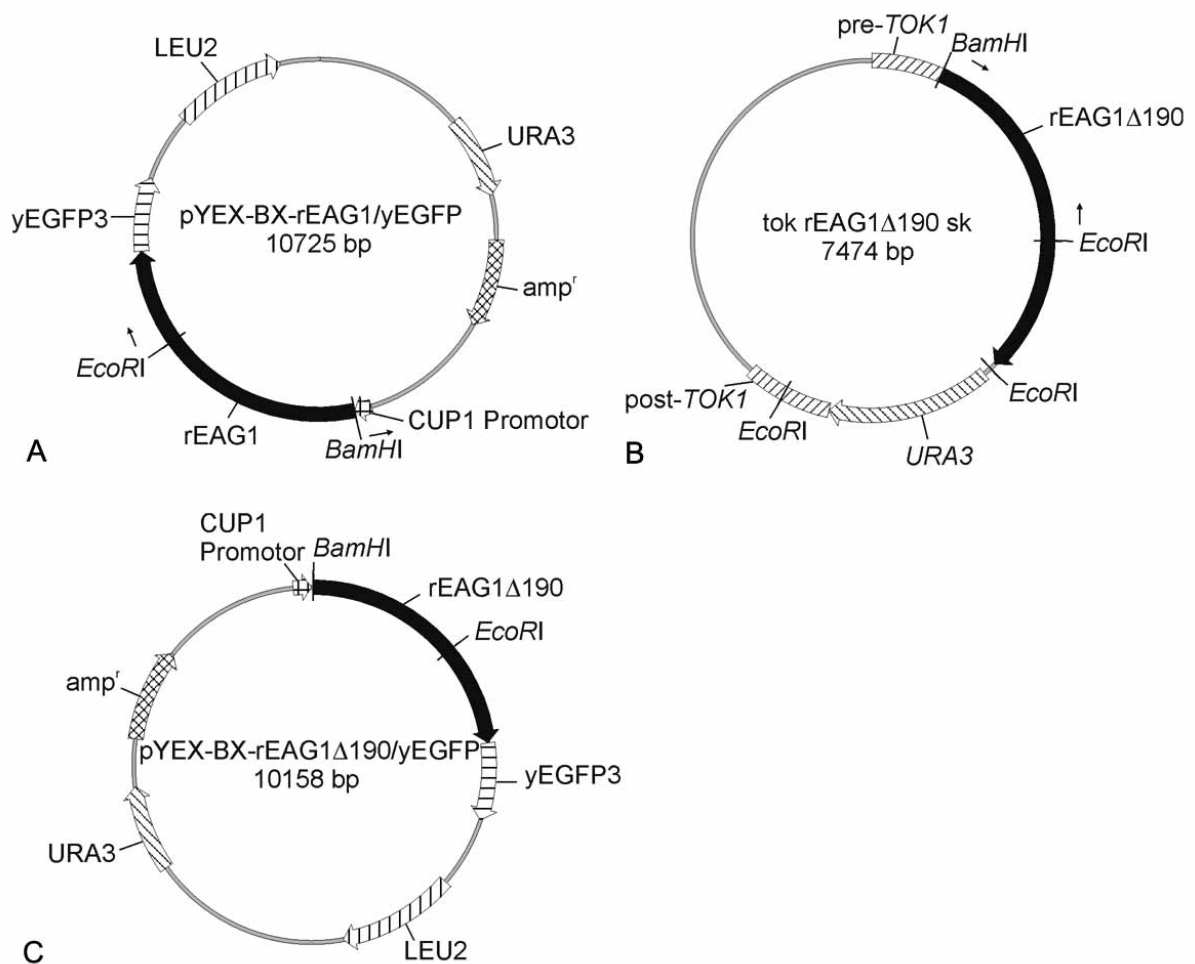


Abbildung 7.1: Konstruktion von pYEX-rEAG1 Δ 190/yEGFP. Das Plasmid pYEX-BX-rEAG1 Δ 190/yEGFP (C) wurde aus einem 8854 bp großen *EcoRI/BamHI* Fragment des Plasmids pYEX-BX-rEAG1/GFP (A) und einem 1404 bp großen *BamHI/EcoRI* Fragment aus tok rEAG1 Δ 190 sk (B) generiert.

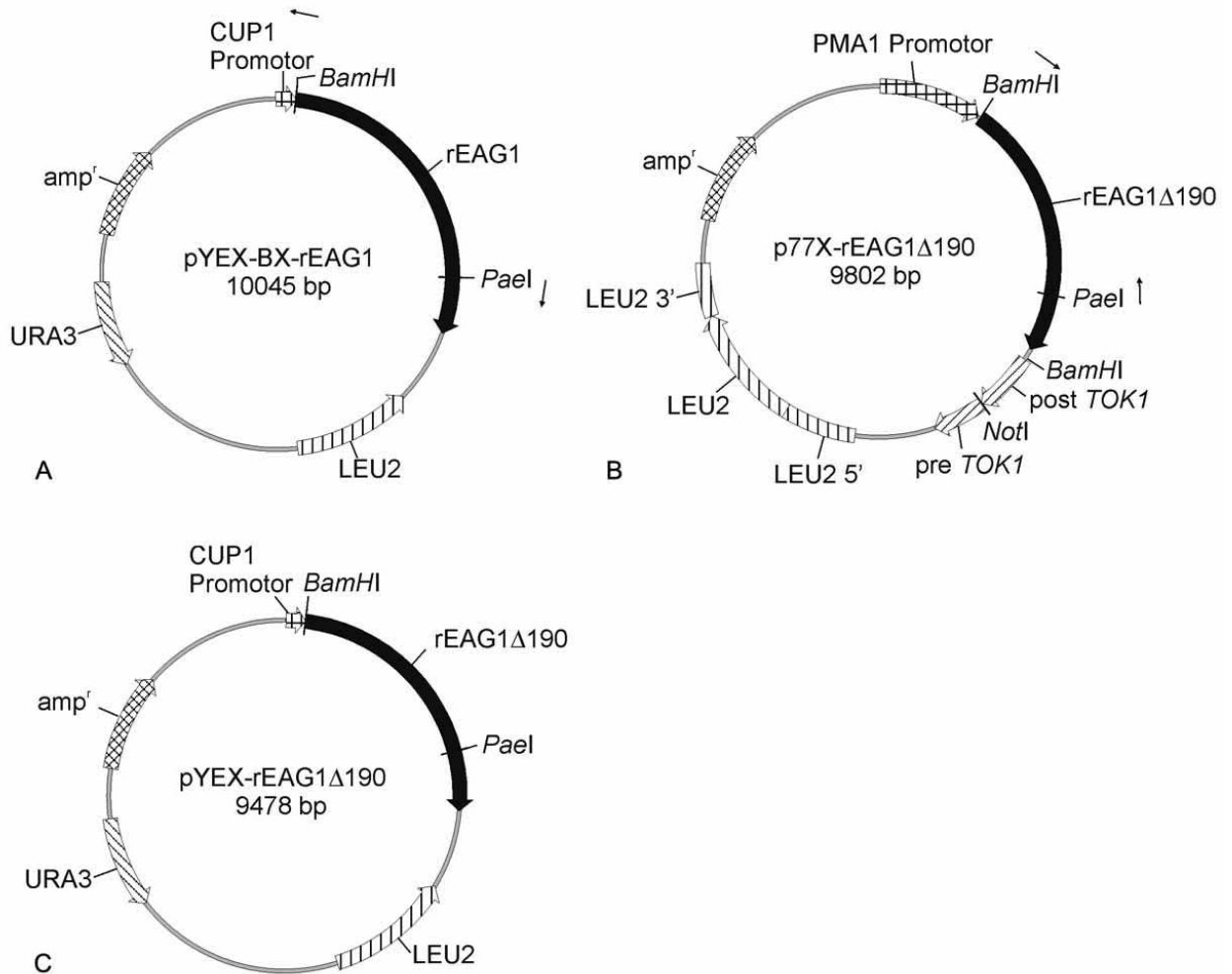
7.3.1.2 Konstruktion von pYEX-rEAG1 Δ 190

Abbildung 7.2: Konstruktion von pYEX-rEAG1 Δ 190. Das Plasmid pYEX-rEAG1 Δ 190 (C) wurde generiert, indem das 7672 bp große *Pae*I - *Bam*HI pYEX-BX-rEAG1 Fragment (A) mit dem 1806 bp großen *Bam*HI - *Pae*I p77X-rEAG1 Δ 190 Fragment (B) ligiert wurde.

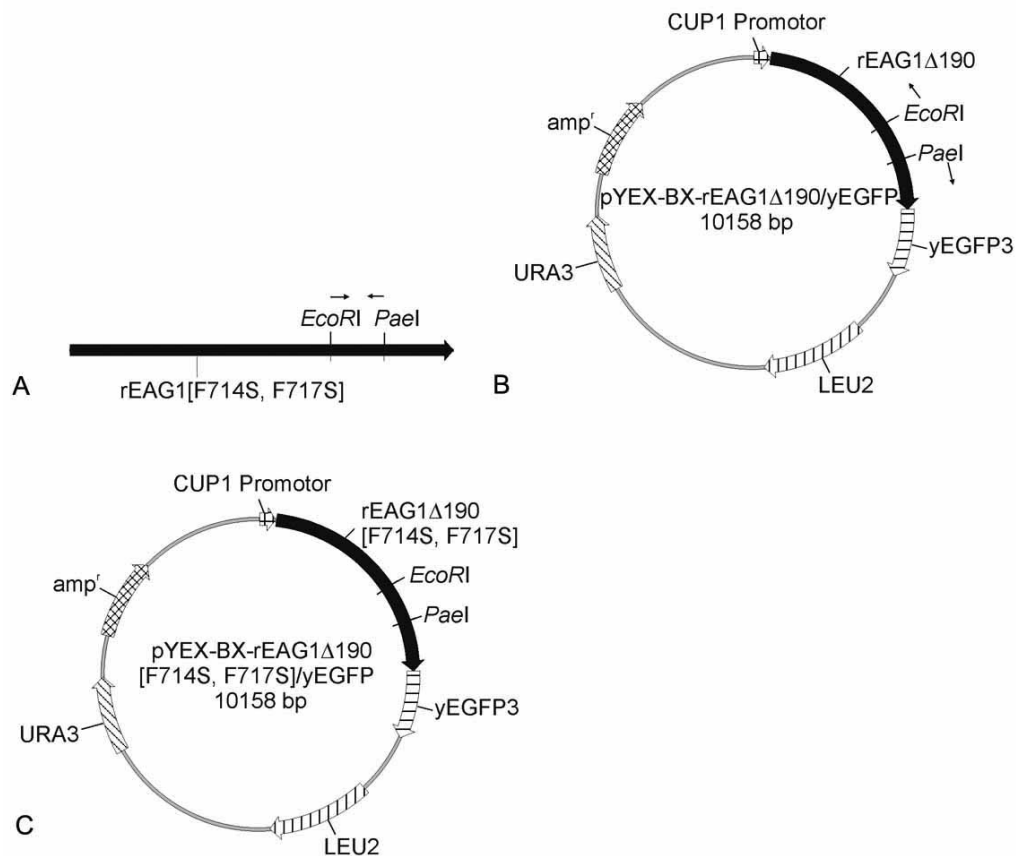
7.3.1.3 Konstruktion von pYEX-rEAG1 Δ 190 [F714S, F717S]/yEGFP

Abbildung 7.3: Konstruktion von rEAG1 Δ 190 [F714S, F717S]/yEGFP. Nach Schönherr *et al.* (2000) wurden Mutationen, die die Calciumsensitivität verringern, abgeleitet. Es wurde rEAG1 Δ 190 [F714S, F717S]/yEGFP (C) konstruiert. Über *in vitro* Mutagenese (2.8.2) wurde diese Doppel-Mutation hergestellt. Als Matrizen DNA diente pYEX-rEAG1 Δ 190/yEGFP (s. o.). Verwendet wurden für die Doppel-Mutation rEAG1 Δ 190 [F714S, F717S]/yEGFP in der PCR 1A als 1AS - 1A_A Primerpaar #13 - #17 und in der PCR 1B als 1B_S - 1BA das Primerpaar #14 - #18. Die erhaltenen Amplifikate wurden eluiert und mittels der „Vorbereitungs-PCR“ wurde die Matrizen-DNA für PCR 2 (Primerpaar 1AS - 1BA: #13 - #14) hergestellt. Das Amplifikat der PCR 2 wurde gereinigt und mit *PaeI/EcoRI* geschnitten (A). Das 402 bp große Fragment wurde eluiert und mit dem ebenfalls *PaeI/EcoRI* geschnittenem, 9756 bp großen, pYEX-BX-rEAG1 Δ 190/yEGFP-Fragment (B) ligiert.

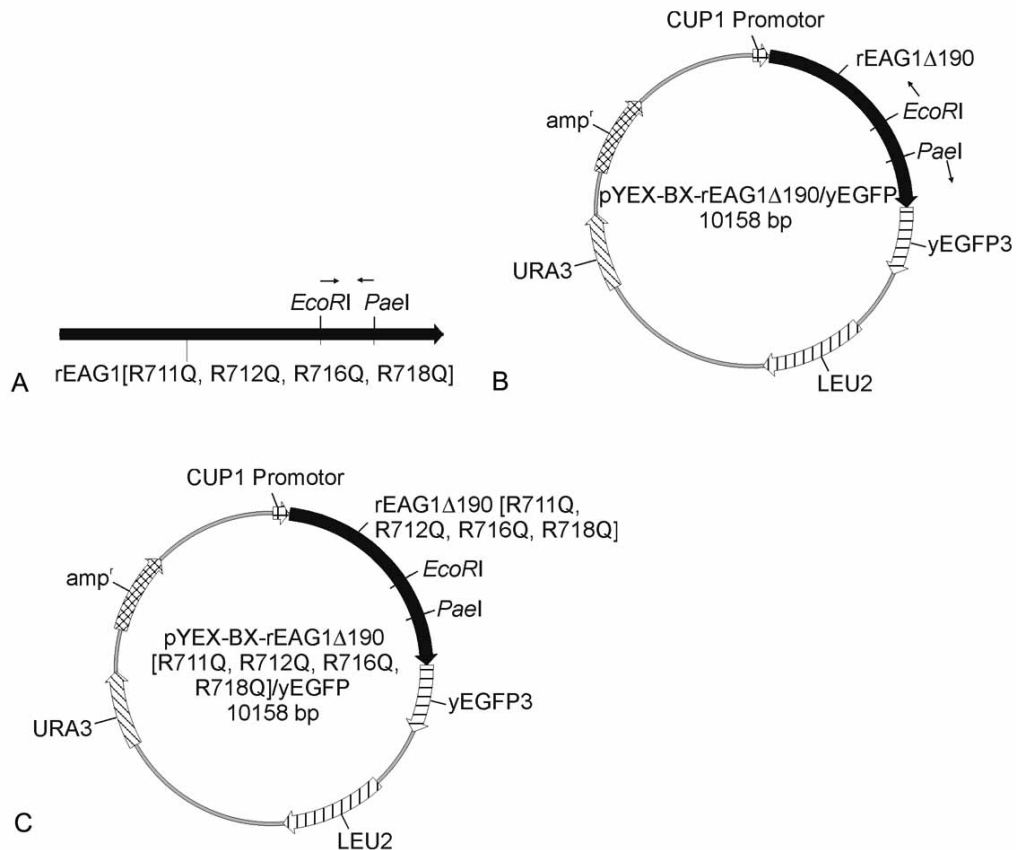
7.3.1.4 Konstruktion von pYEX-rEAG1 Δ 190 [R711Q, R712Q, R716Q, R718Q]/yEGFP

Abbildung 7.4: Konstruktion von rEAG1 Δ 190 [R711Q, R712Q, R716Q, R718Q]/yEGFP. Nach Schönherr *et al.* (2000) wurden Mutationen, die die Calciumsensitivität verringern, abgeleitet. Es wurde rEAG1 Δ 190 [R711Q, R712Q, R716Q, R718Q]/yEGFP (C) konstruiert. Über *in vitro* Mutagenese (2.8.2) wurde diese Vierfach-Mutation hergestellt. Als Matrizen DNA diente pYEX-rEAG1 Δ 190/yEGFP (s. o.). Um rEAG1 Δ 190 [R711Q, R712Q, R716Q, R718Q]/yEGFP zu amplifizieren wurde in PCR 1A als 1AS - 1A_A das Primerpaar #13 - #15 und in PCR 1B als 1B_S - 1BA das Primerpaar #14 - #16 verwendet. Es wurden die erhaltenen Amplifikate eluiert und mittels der „Vorbereitungs-PCR“ die Matrizen-DNA für PCR 2 generiert. In PCR 2 wurde das Primerpaar 1AS - 1BA (#13 - #14) eingesetzt. Das Amplifikat der PCR 2 wurde gereinigt und mit PaeI/EcoRI geschnitten (A). Das 402 bp große Fragment wurde eluiert und mit dem ebenfalls PaeI/EcoRI geschnittenem, 9756 bp großen, pYEX-BX-rEAG1 Δ 190/yEGFP-Fragment (B) ligiert.

7.3.2 Herstellung der Plasmide zur Expression von *hKCNQ1*, *hKCNQ2*, *hKCNQ3* und *hKCNQ3*

7.3.2.1 Konstruktion von pYEX-hKCNQ2

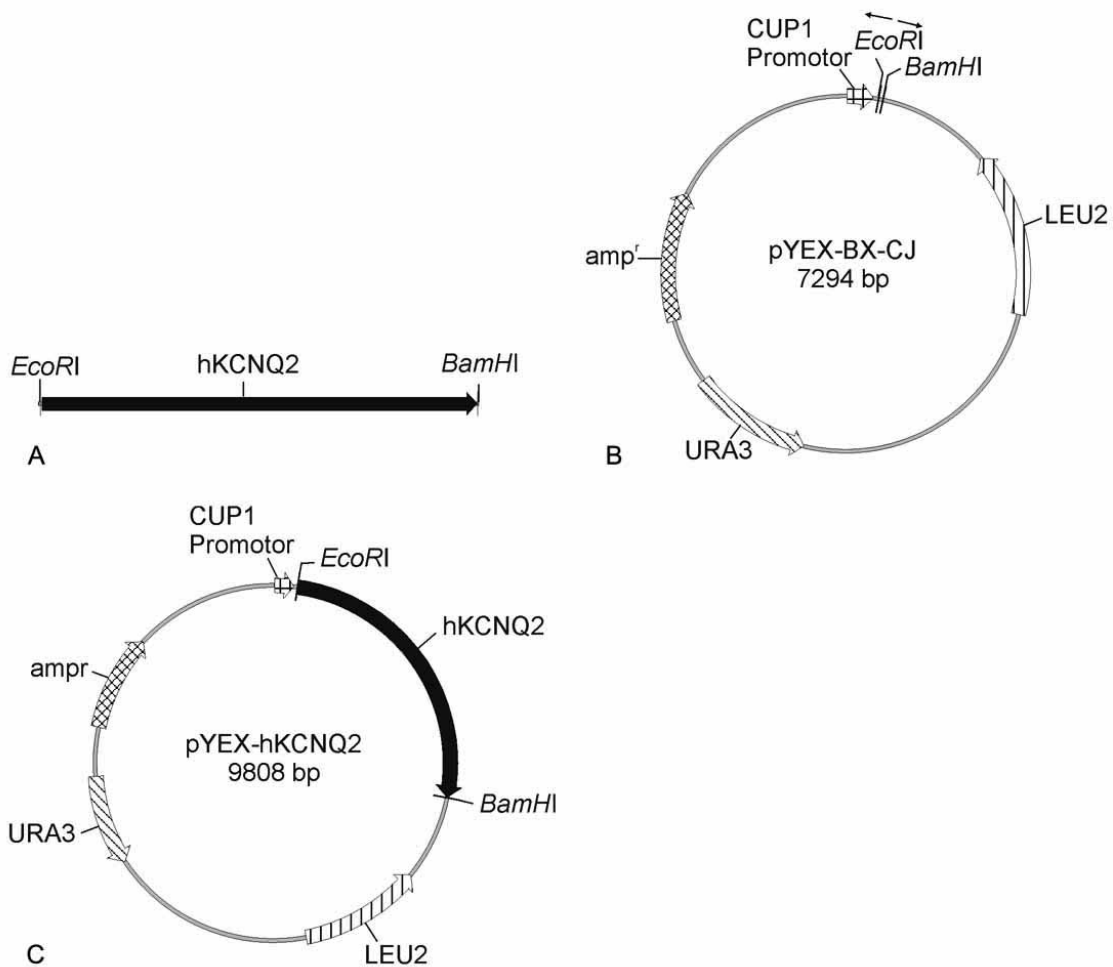


Abbildung 7.5: Konstruktion von pYEX-hKCNQ2. Das Plasmid pYEX-hKCNQ2 (C) wurde generiert, indem *hKCNQ2* per PCR (2.8.1) mit den Primern #31 und #32 amplifiziert wurde (Matrizen-DNA: pTLN-KCNQ2) und das 2545 bp große *EcoRI* - *BamHI* Fragment des PCR-Produkts (A) mit dem 7263 bp großem *BamHI* - *EcoRI* Fragment aus pYEX-BX-CJ (B) ligiert wurde.

7.3.2.2 Konstruktion von pYEX-hKCNQ2/yEGFP

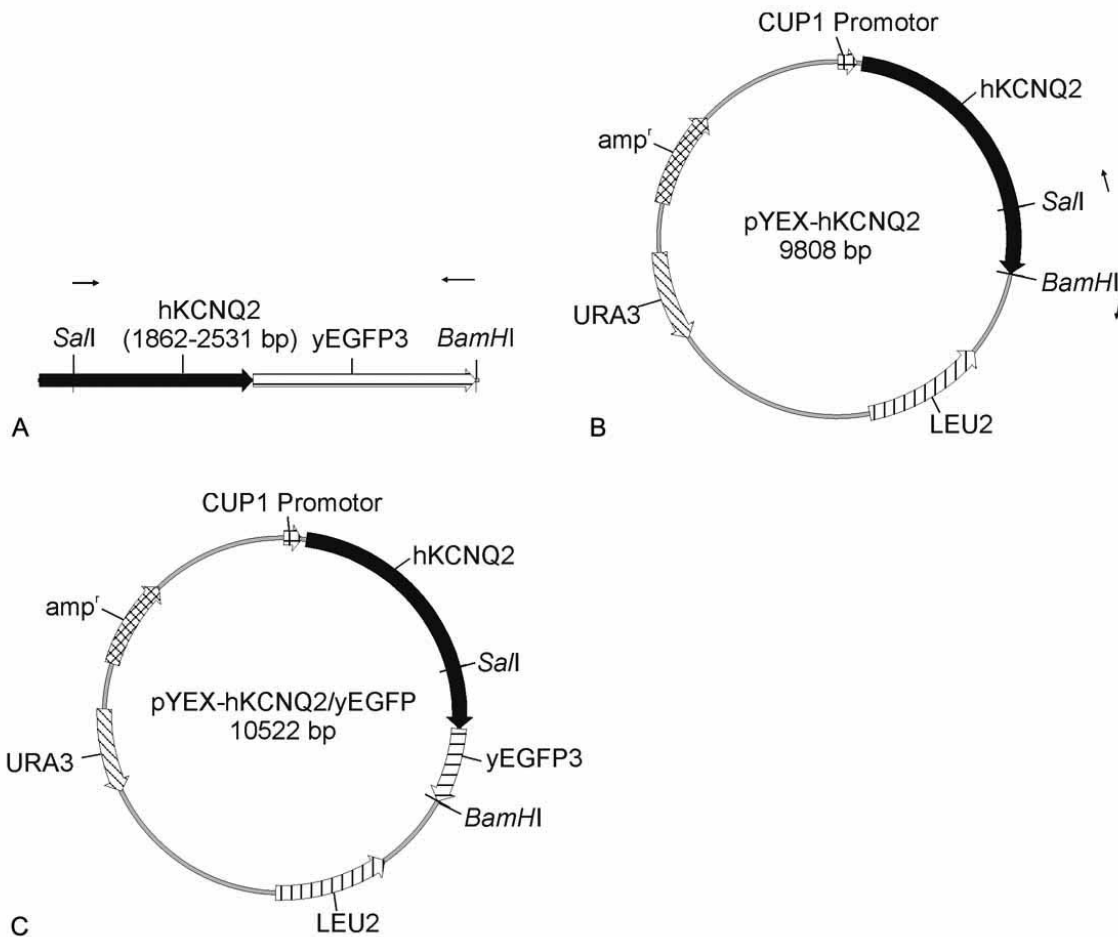


Abbildung 7.6: Konstruktion von pYEX-hKCNQ2/yEGFP. Das Plasmid pYEX-hKCNQ2/yEGFP (C) wurde generiert, indem mit Hilfe einer PCR zur Fusion zweier DNA-Fragmente (2.8.3) C-terminal an hKCNQ2 yEGFP fusioniert wurde. Für die PCR 1A wurden die Primer 1AS: #33, 1A_A: #34 und als Matrizen-DNA: pTLN-KCNQ2 verwendet. Für die PCR 1B wurden die Primer 1B_S: #35 und 1BA #36 und als Matrizen-DNA pYEX-GFP verwendet. Die PCR 2 fand mit dem Primerpaar 1AS - 1BA (#33 - #36) statt. Das 1296 bp große SalI - BamHI Fragment der PCR 2 (A) wurde mit dem 9226 bp großen BamHI - SalI Fragment aus pYEX-hKCNQ2 (B) ligiert.

7.3.2.3 Konstruktion von p77X-hKCNQ2

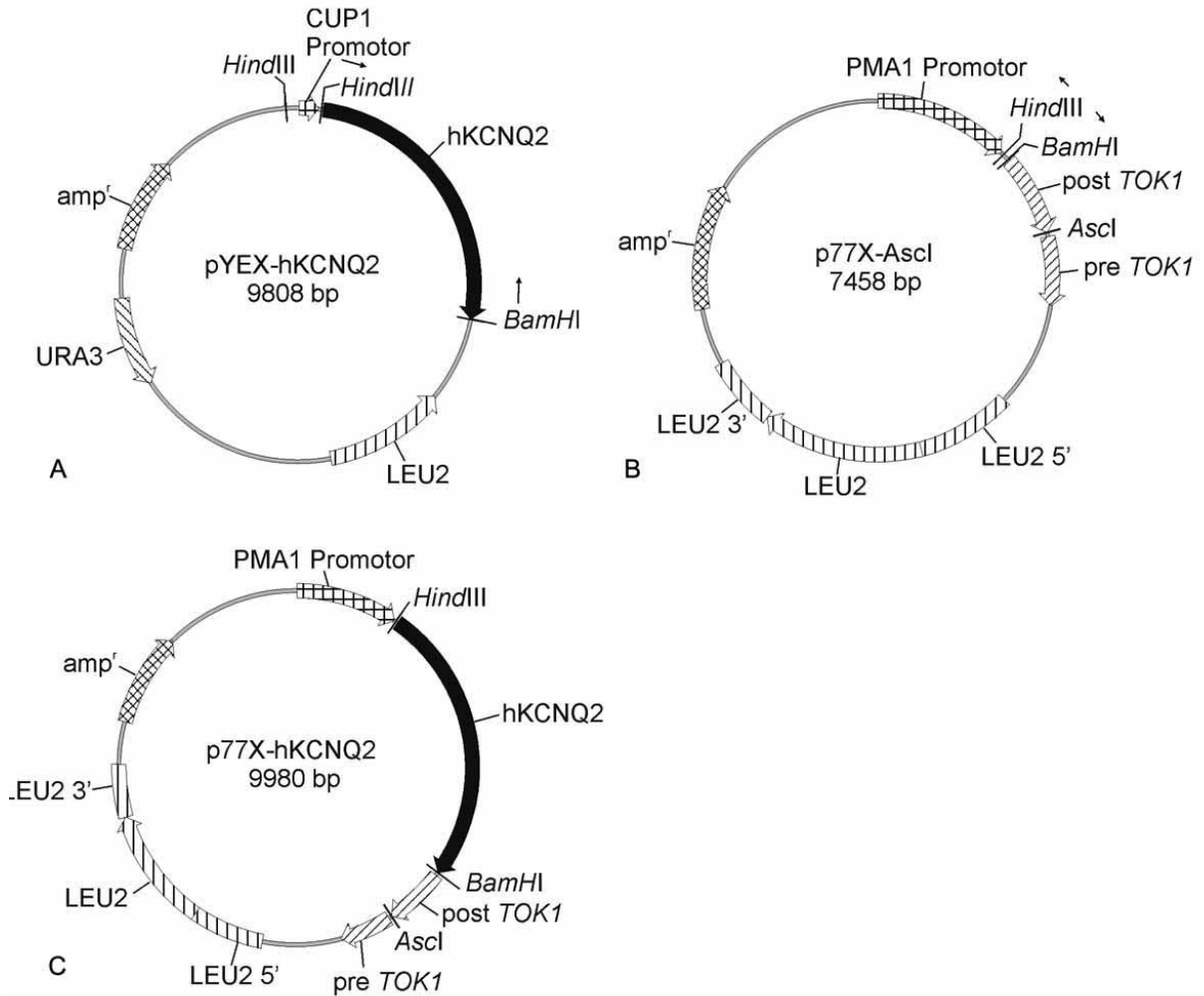


Abbildung 7.7: Konstruktion von p77X-hKCNQ2. Das Plasmid p77X-hKCNQ2 (C) wurde generiert, indem das 2552 bp große *HindIII* - *BamHI* Fragment aus pYEX-hKCNQ2 (A) mit dem 7428 bp großem *BamHI* - *HindIII* Fragment aus p77X-Ascl (B) ligiert wurde.

7.3.2.4 Konstruktion von p77X-hKCNQ2/yEGFP

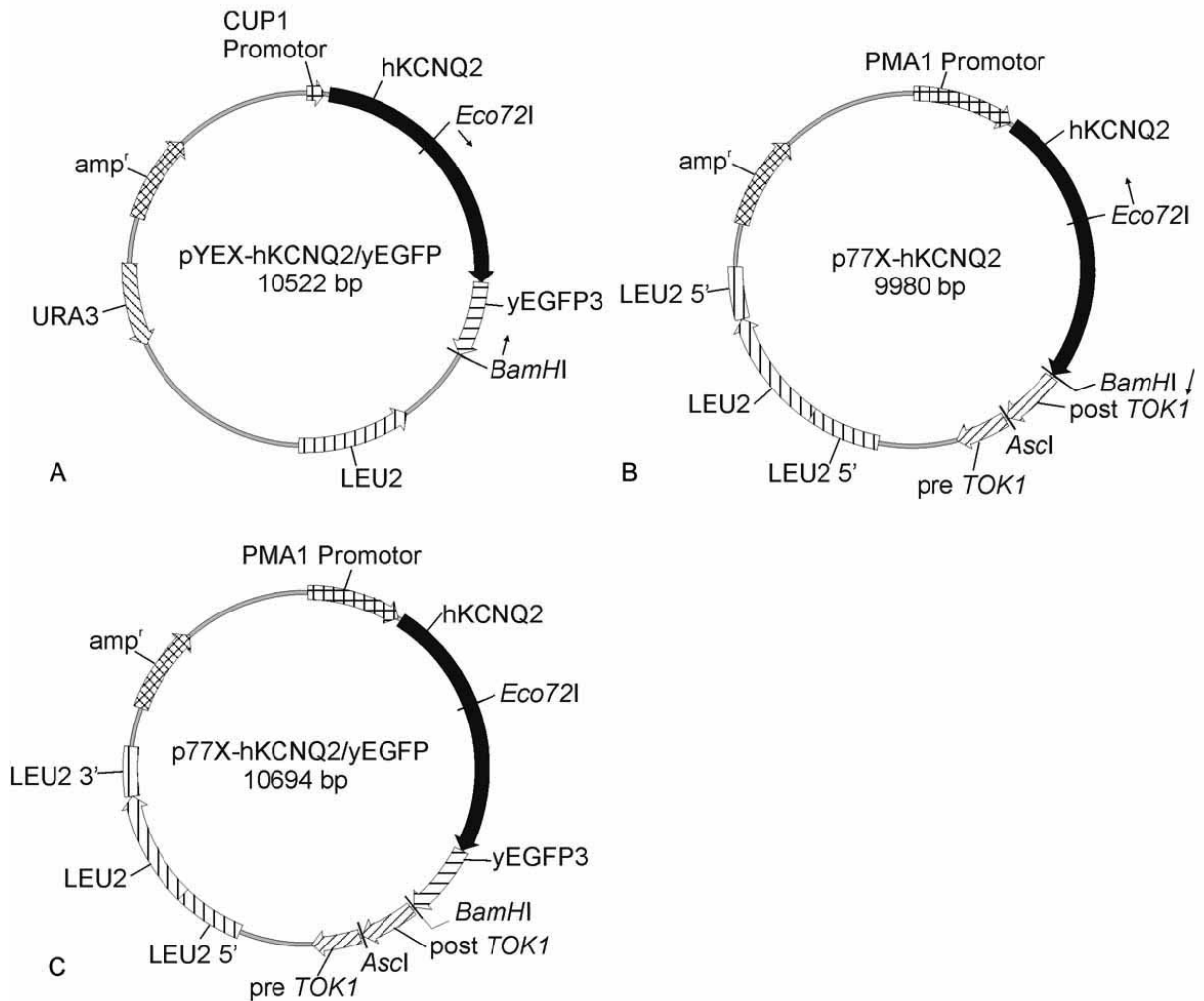


Abbildung 7.8: Konstruktion von p77X-hKCNQ2/yEGFP. Das Plasmid p77X-hKCNQ2/yEGFP (C) wurde generiert, indem das 2174 bp große *Eco72I* - *BamHI* Fragment aus pYEX-hKCNQ2/yEGFP (A) mit dem 8520 bp großem *BamHI* - *Eco72I* Fragment aus p77X-hKCNQ2 (B) ligiert wurde.

7.3.2.5 Konstruktion von pYEX-hKCNQ3

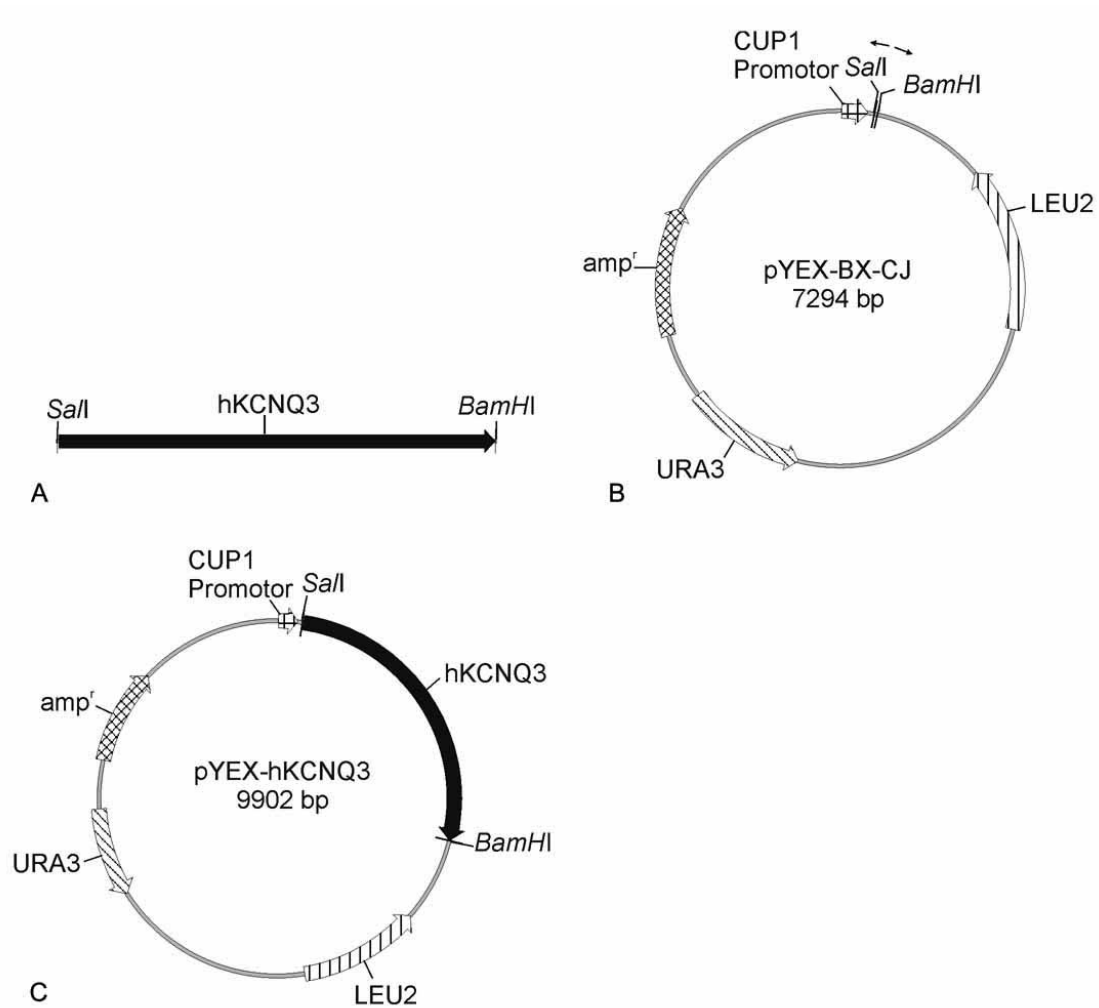


Abbildung 7.9: Konstruktion von pYEX-hKCNQ3. Das Plasmid pYEX-hKCNQ3 (C) wurde generiert, indem mittels PCR (Matrizen DNA: pTLN-KCNQ3) mit den Primern #37 und #38 ein *hKCNQ3* enthaltendes Fragment amplifiziert wurde, aus diesem das 2629 bp große *SalI* - *BamHI* Fragment (A) mit dem 7273 bp großem *BamHI* - *SalI* Fragment aus pYEX-BX-CJ (B) ligiert wurde.

7.3.2.6 Konstruktion von pYEX-hKCNQ3/yEGFP

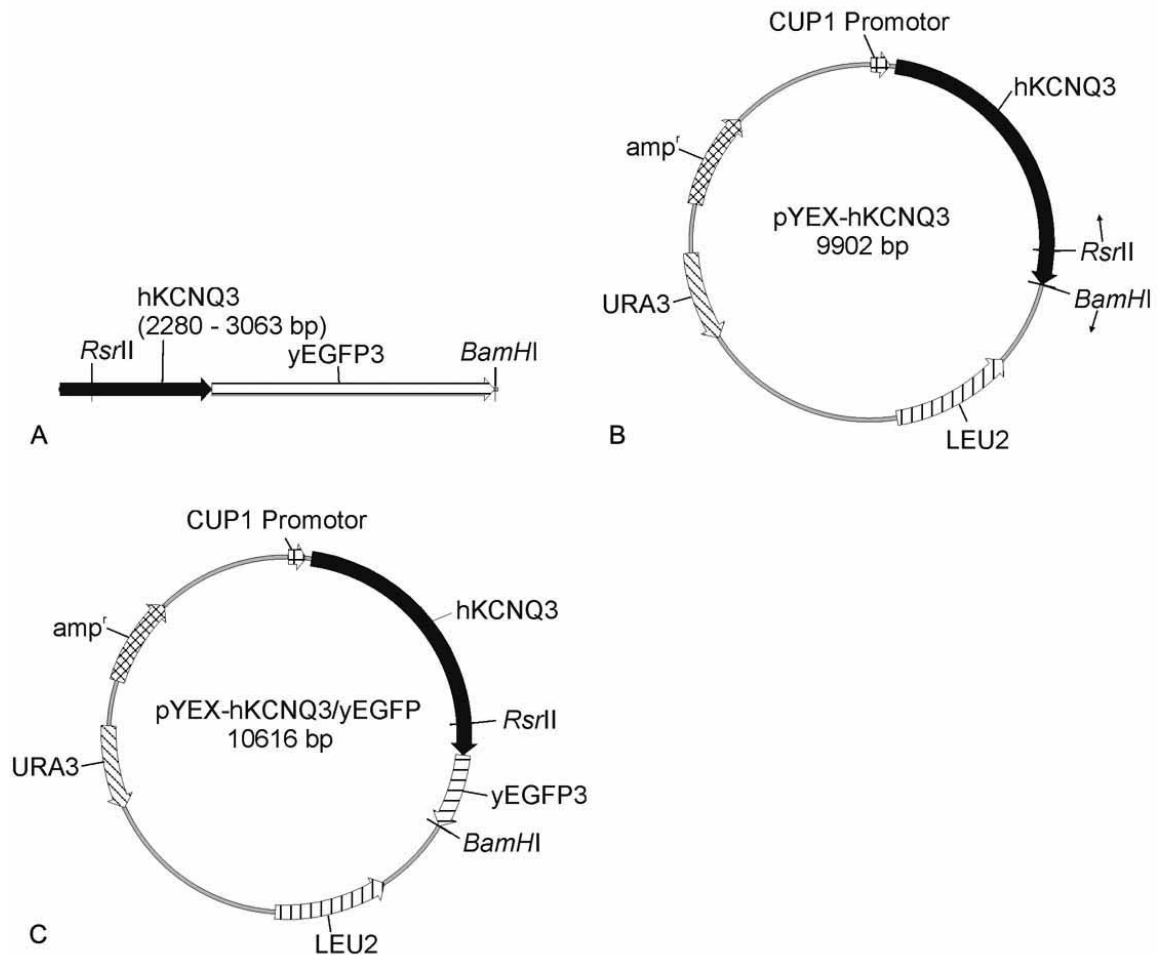


Abbildung 7.10: Konstruktion von pYEX-hKCNQ3/yEGFP. Das Plasmid pYEX-hKCNQ3/yEGFP (C) wurde generiert, indem mit Hilfe einer PCR zur Fusion zweier DNA-Fragmente (2.8.3) C-terminal an hKCNQ3 yEGFP fusioniert wurde. Für die PCR 1A wurden die Primer 1AS: #39, 1A_A: #40 und als Matrizen-DNA: pTLN-KCNQ3 verwendet. Für die PCR 1B wurden die Primer 1B_S: #41 und 1BA #36 und als Matrizen-DNA pYEX-GFP verwendet. Die PCR 2 fand mit dem Primerpaar 1AS - 1BA (#39 - #36) statt. Das 1021 bp große RsrII - BamHI Fragment der finalen PCR (A) wurde mit dem 9595 bp großen BamHI - RsrII Fragment aus pYEX-hKCNQ3 (B) ligiert wurde.

7.3.2.7 Konstruktion von p77X-hKCNQ3

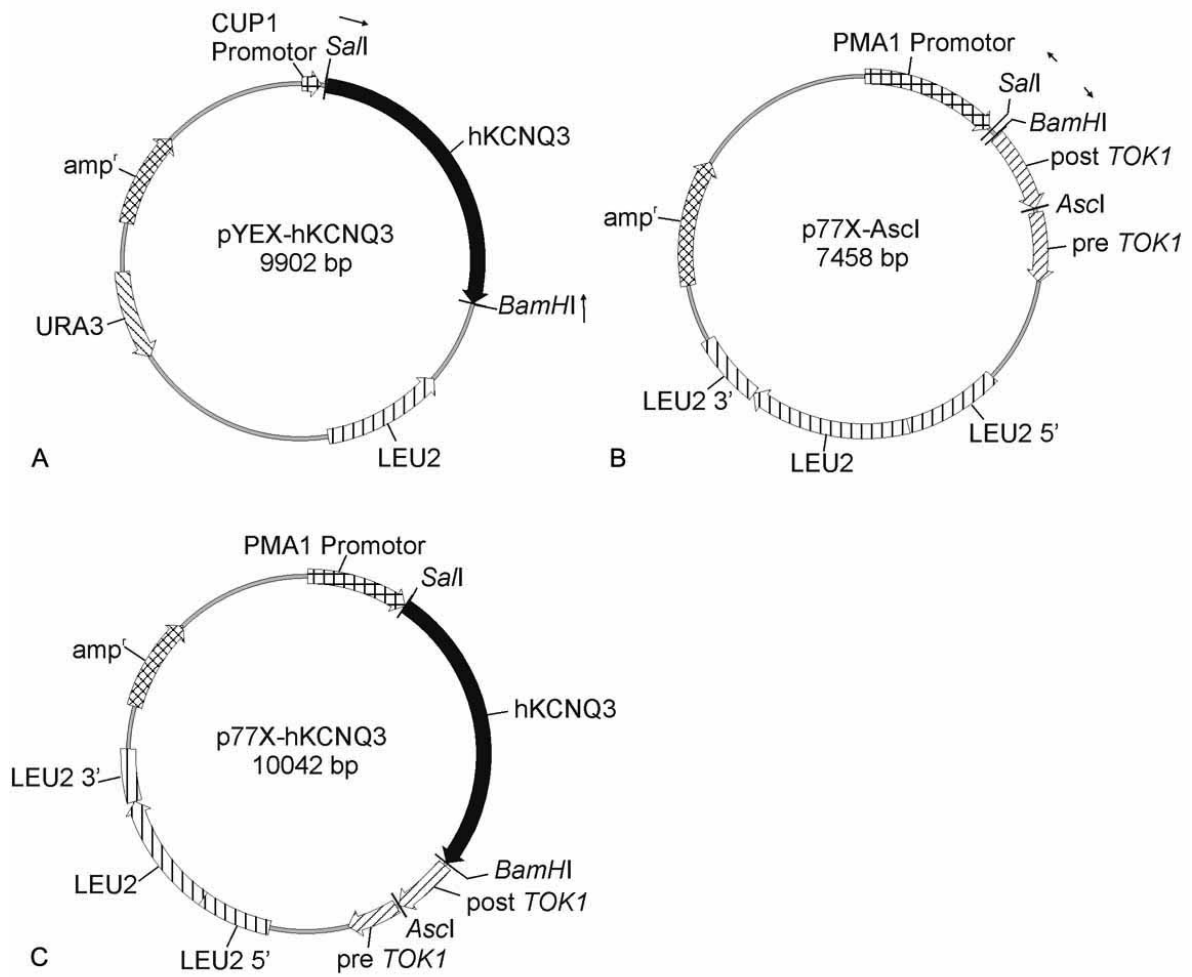


Abbildung 7.11: Konstruktion von p77X-hKCNQ3. Das Plasmid p77X-hKCNQ3 (C) wurde generiert, indem das 2629 bp große *SalI* - *BamHI* Fragment aus pYEX-hKCNQ3 (A) mit dem 7413 bp großem *BamHI* - *SalI* Fragment aus p77X-Ascl (B) ligiert wurde.

7.3.2.8 Konstruktion von p77X-hKCNQ3/yEGFP

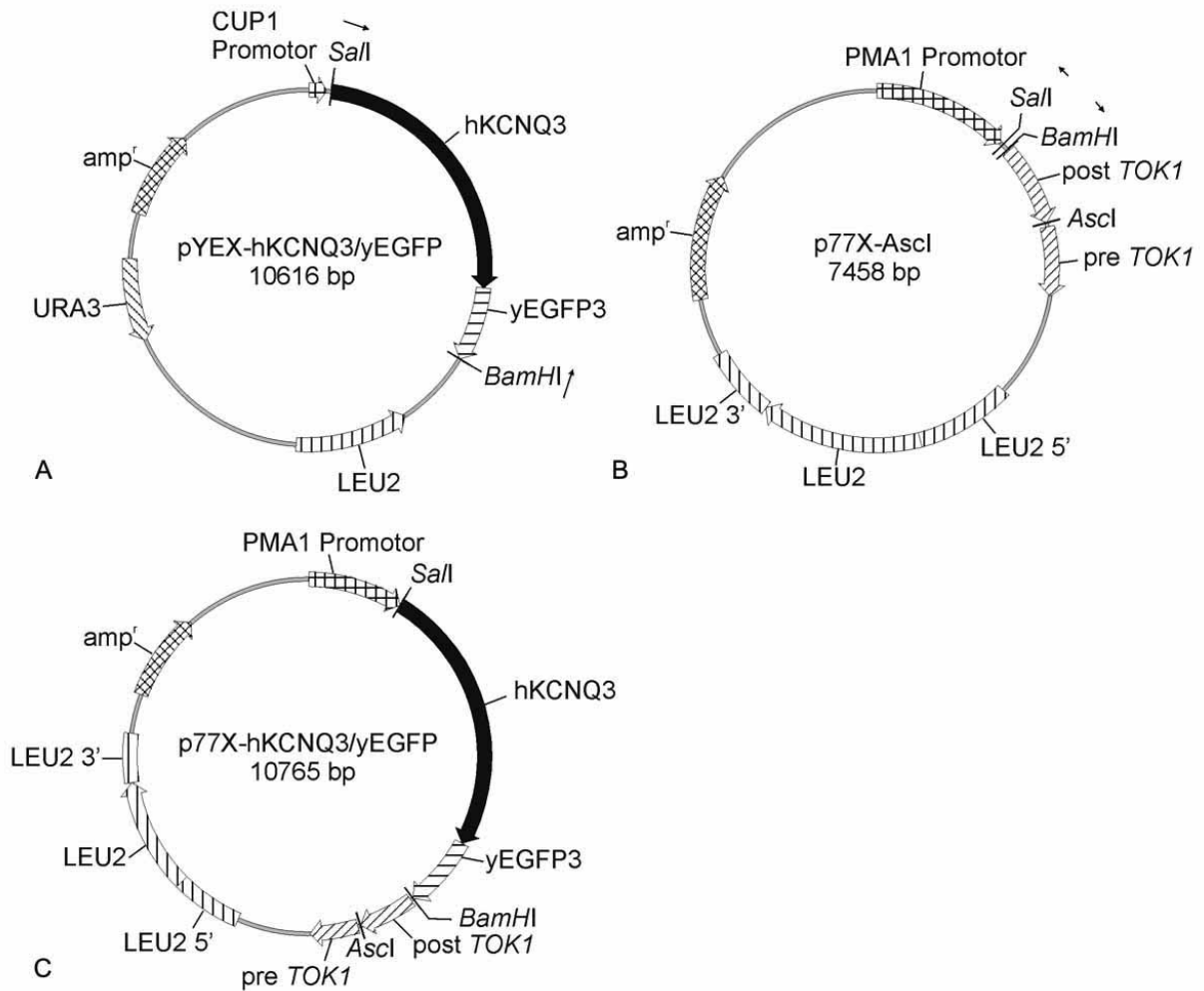


Abbildung 7.12: Konstruktion von p77X-hKCNQ3/yEGFP. Das Plasmid p77X-hKCNQ3/yEGFP (C) wurde generiert, indem das 3343 bp große *Sall* - *BamHI* Fragment aus pYEX-hKCNQ3/yEGFP (A) mit dem 7413 bp großen *BamHI* - *Sall* Fragment aus p77X-Ascl (B) ligiert wurde.

7.3.2.9 Konstruktion von pYEX-hKCNQ1

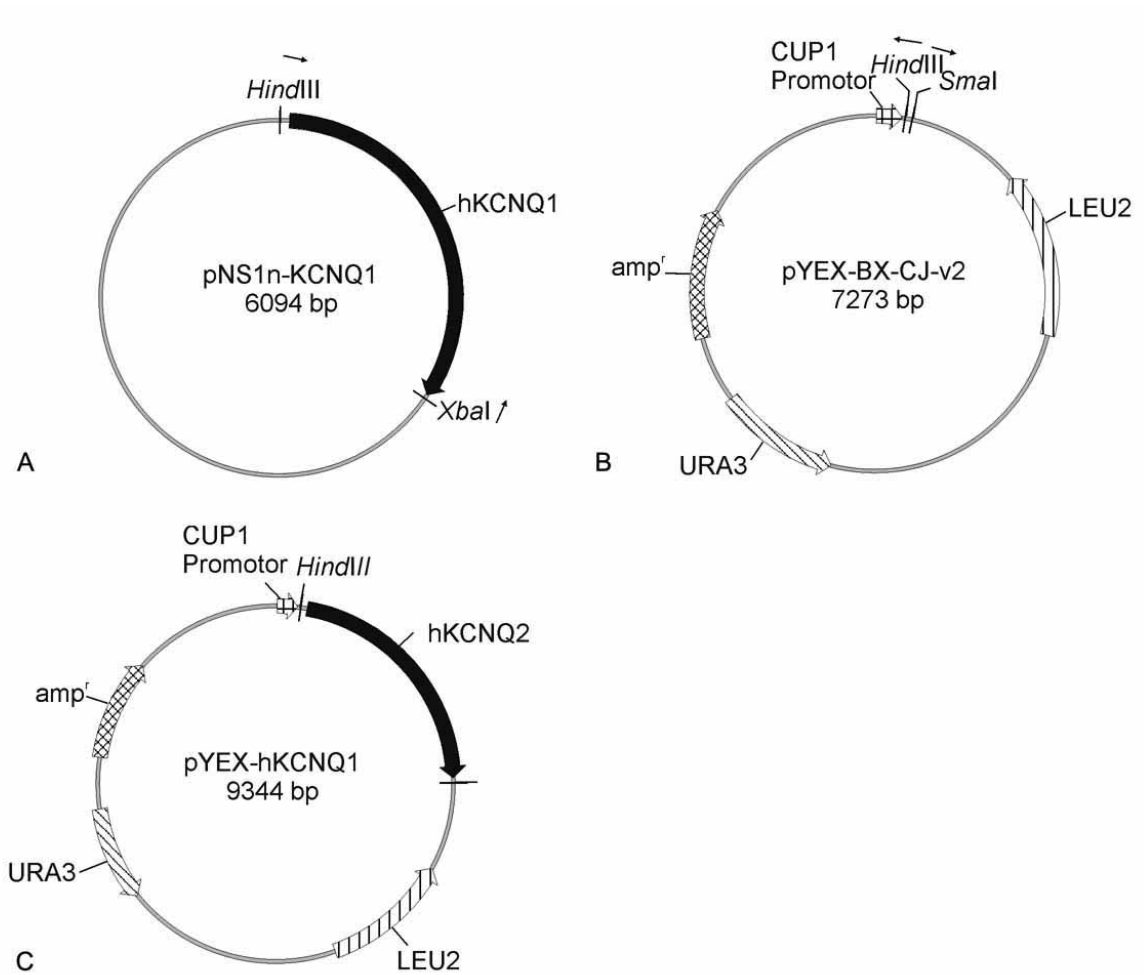


Abbildung 7.13: Konstruktion von pYEX-hKCNQ1. Das Plasmid pYEX-hKCNQ1 (C) wurde generiert, indem ein 2107 bp großes *HindIII* - *XbaI* (wurde ausgefüllt) aus pNS1n-KCNQ1 (A) mit dem 7237 bp großem *SmaI* - *HindIII* Fragment aus pYEX-BX-CJ-v2 (B) ligiert wurde.

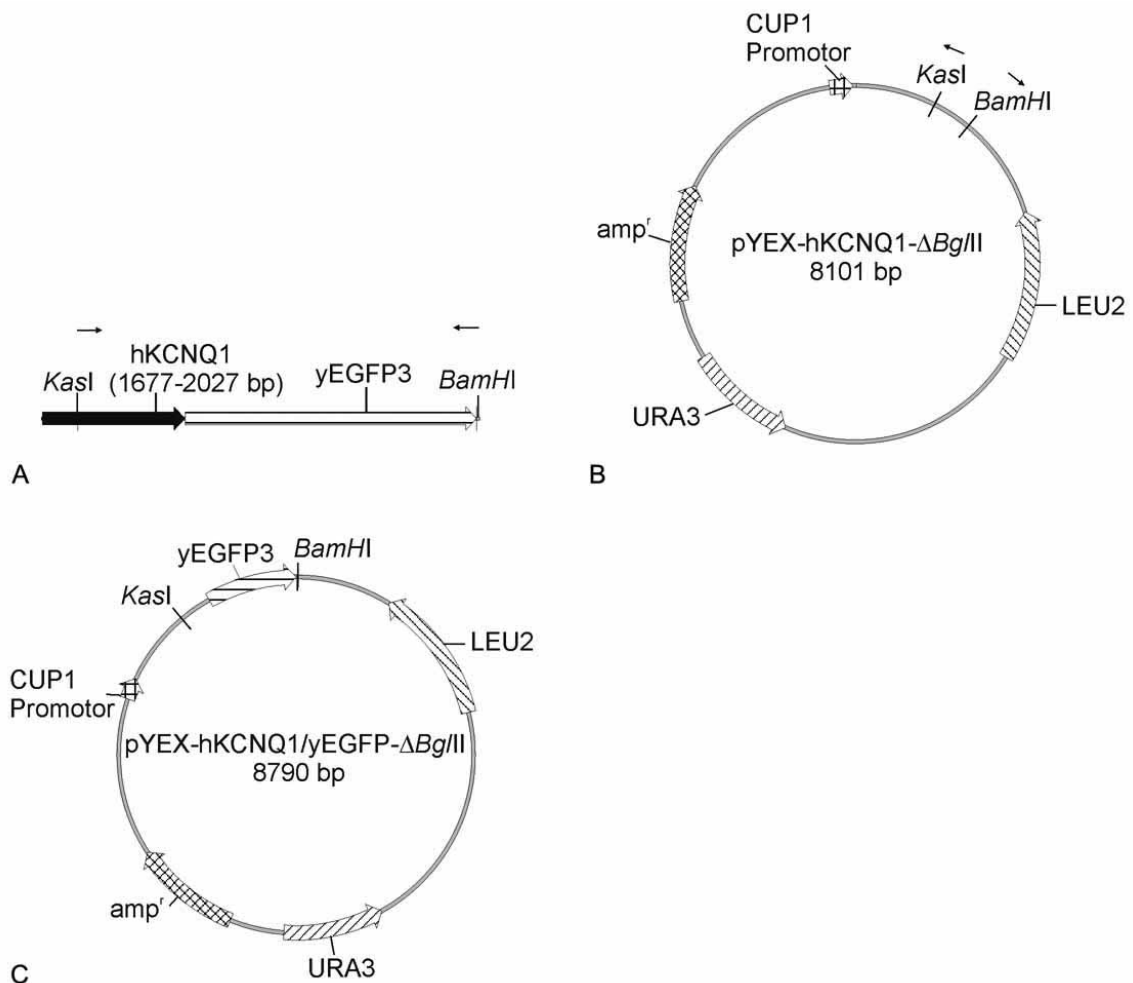
7.3.2.10 Konstruktion von pYEX-hKCNQ1/yEGFP- Δ Bg/II

Abbildung 7.14: Konstruktion von pYEX-hKCNQ1/yEGFP- Δ Bg/II. Das Plasmid pYEX-hKCNQ1/yEGFP (Abb. 7.15) wurde über das Zwischenprodukt pYEX-hKCNQ1/yEGFP- Δ Bg/II (C) generiert. Mit Hilfe einer PCR zur Fusion zweier DNA-Fragmente (2.8.3) wurde der C-Terminus von *hKCNQ1* mit *yEGFP* fusioniert amplifiziert. Verwendete Primer waren für PCR 1A: 1AS: #48 - 1A_A: #49; für PCR 1B 1B_S: #50 - 1BA: #36; für PCR 2 1AS: #48 - 1BA: #36. Als Matrizen-DNA für PCR 1A diente pYEX-hKCNQ1 und für PCR 1B pYEX-GFP. Anschließend wurde das 991 bp große KasI - BamHI Fragment der PCR 2 (A) mit dem 7909 bp großen BamHI - KasI Fragment aus pYEX-hKCNQ1- Δ Bg/II (B) ligiert.

7.3.2.11 Konstruktion von pYEX-hKCNQ1/yEGFP

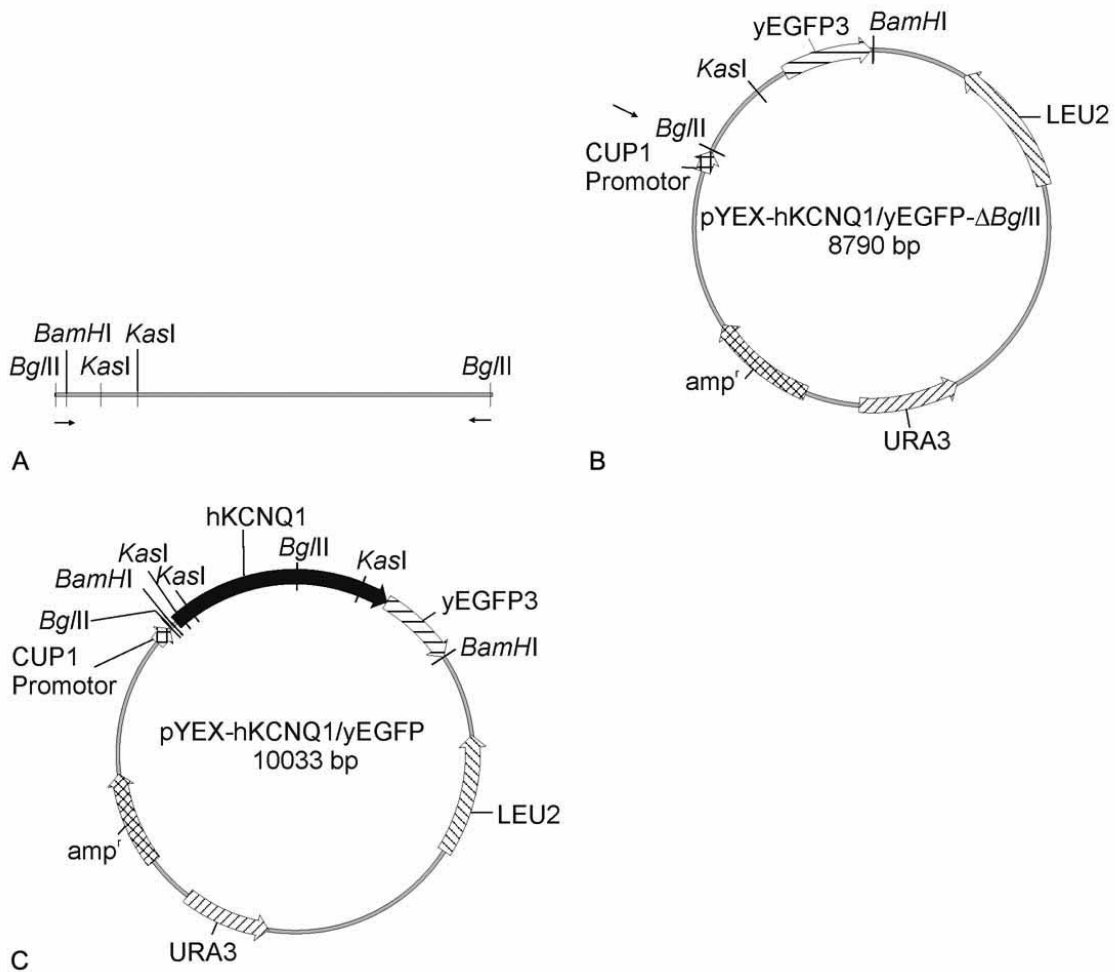


Abbildung 7.15: Konstruktion von pYEX-hKCNQ1/yEGFP. pYEX-hKCNQ1/yEGFP- Δ *Bgl*II wurde mit *Bgl*II linearisiert (**B**) und mit dem 1243 bp großen *Bgl*II Fragment aus pYEX-hKCNQ1 (**A**) ligiert um schließlich pYEX-hKCNQ1/yEGFP (**C**) zu erhalten.

7.3.2.12 Konstruktion von p77X-hKCNQ1

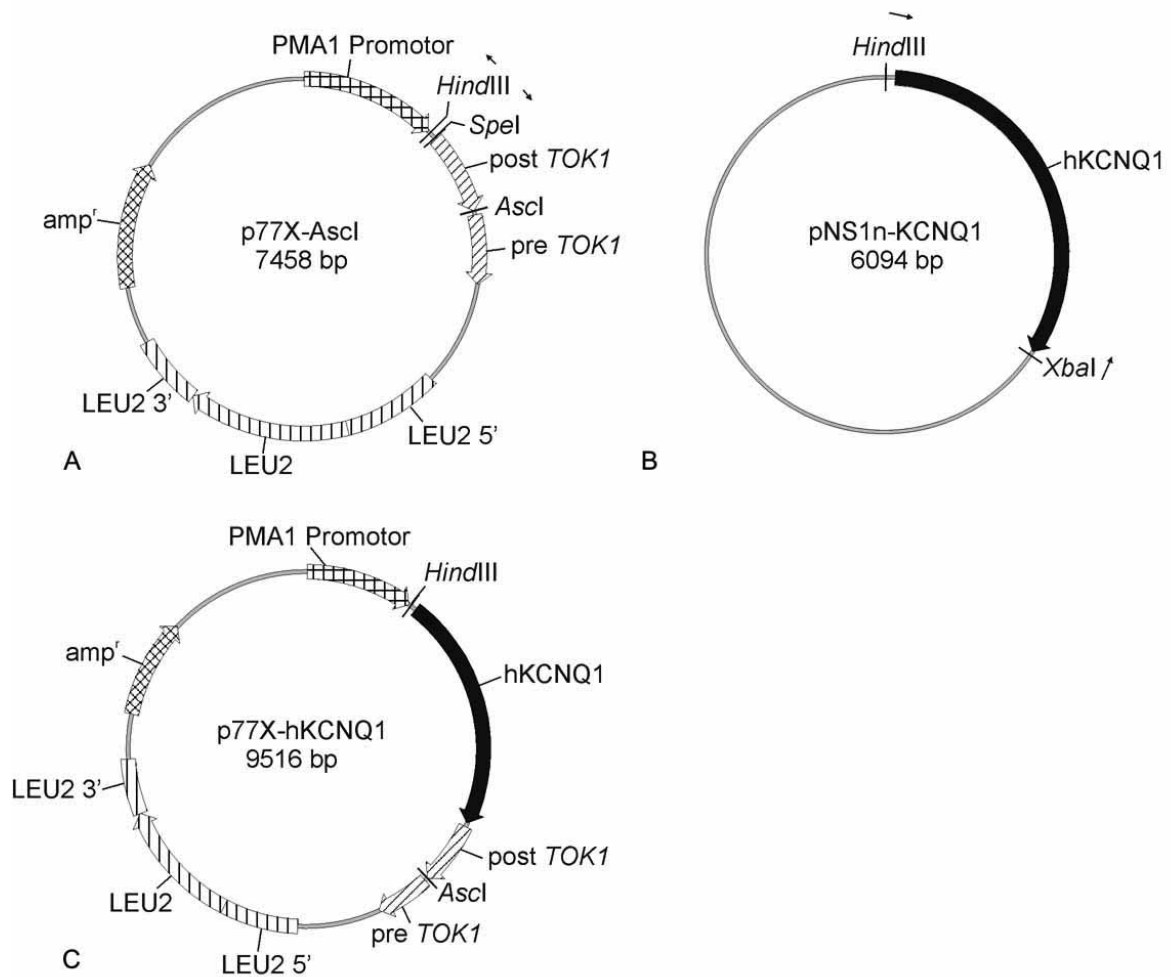


Abbildung 7.16: Konstruktion von p77X-hKCNQ1. Das Plasmid p77X-hKCNQ1 (C) wurde generiert, indem das 2103 bp große *HindIII* - *XbaI* Fragment aus pNS1n-KCNQ1 (B) mit dem 7413 bp große *SpeI* - *HindIII* aus p77X-Ascl (A) ligiert wurde.

7.3.2.13 Konstruktion von p77X-hKCNQ1/yEGFP

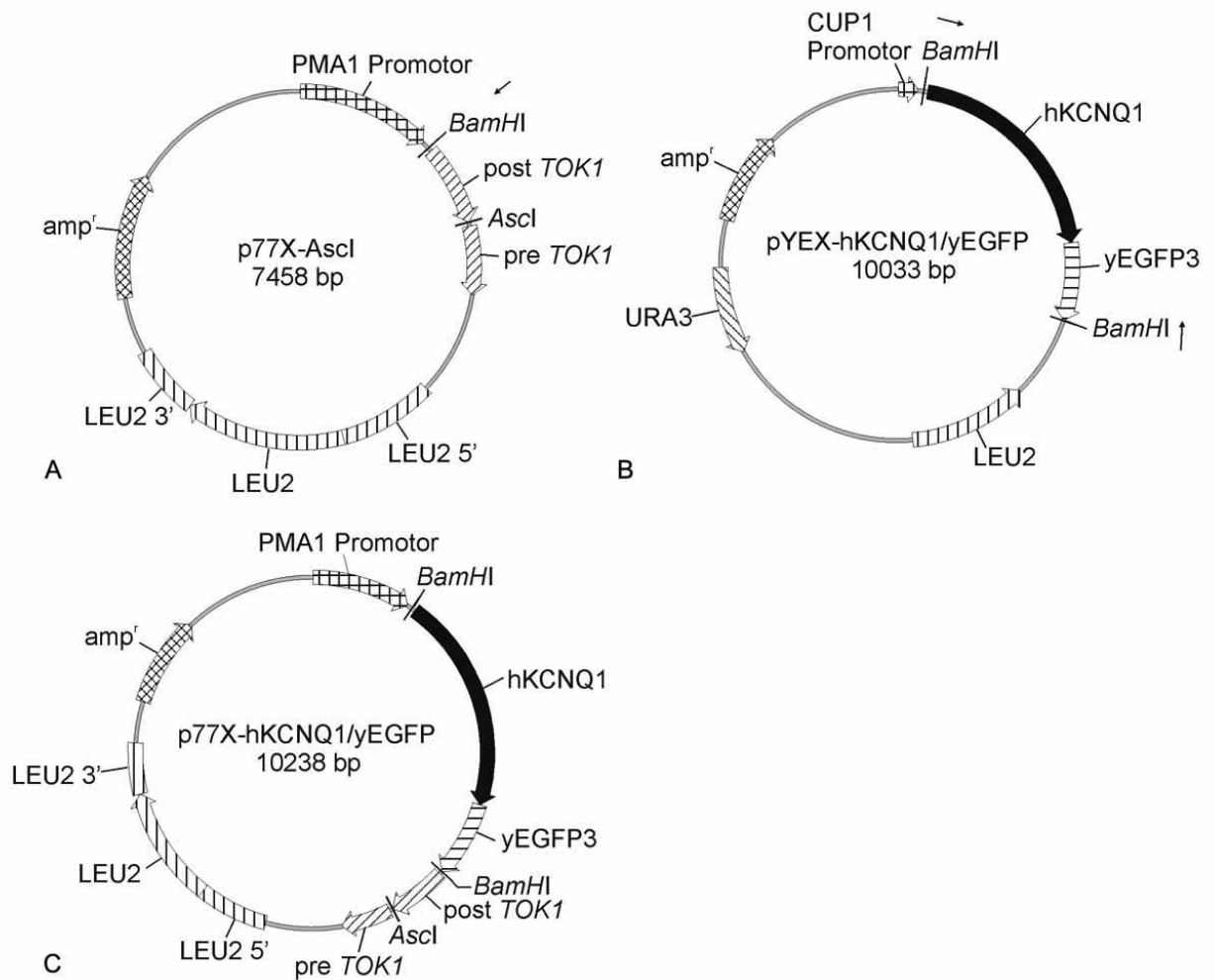


Abbildung 7.17: Konstruktion von p77X-hKCNQ1/yEGFP. Das Plasmid p77X-hKCNQ1/yEGFP (C) wurde generiert, indem das 2780 bp große *Bam*HI Fragment aus pYEX-hKCNQ1/yEGFP (B) mit dem 7458 bp großen *Bam*HI linearisiertem p77X-Ascl (A) ligiert wurde.

7.3.2.14 Konstruktion von pYEX-hKCNE3

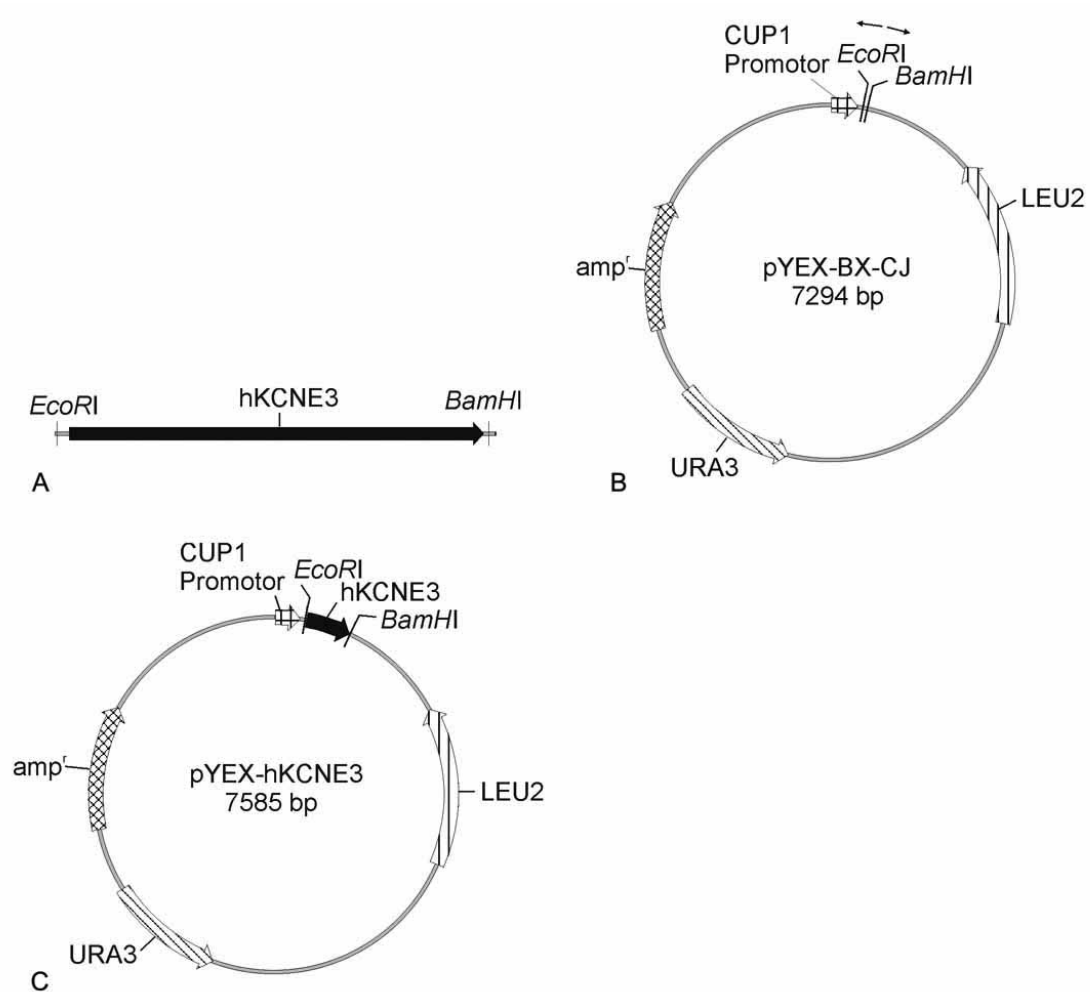


Abbildung 7.18: Konstruktion von pYEX-hKCNE3. Das Plasmid pYEX-hKCNE3 (C) wurde generiert, indem per PCR (2.8.1) mit den Primern #42 und #43 *hKCNE3* amplifiziert wurde (Matrizen-DNA: pTLN-KCNE3) und anschließend das 322 bp große *EcoRI* - *BamHI* Fragment des PCR Produkts (A) mit dem 7263 bp großen *BamHI* - *EcoRI* pYEX-BX-CJ (B) Fragments ligiert wurde.

7.3.2.15 Konstruktion von pYEX-hKCNE3/yEGFP

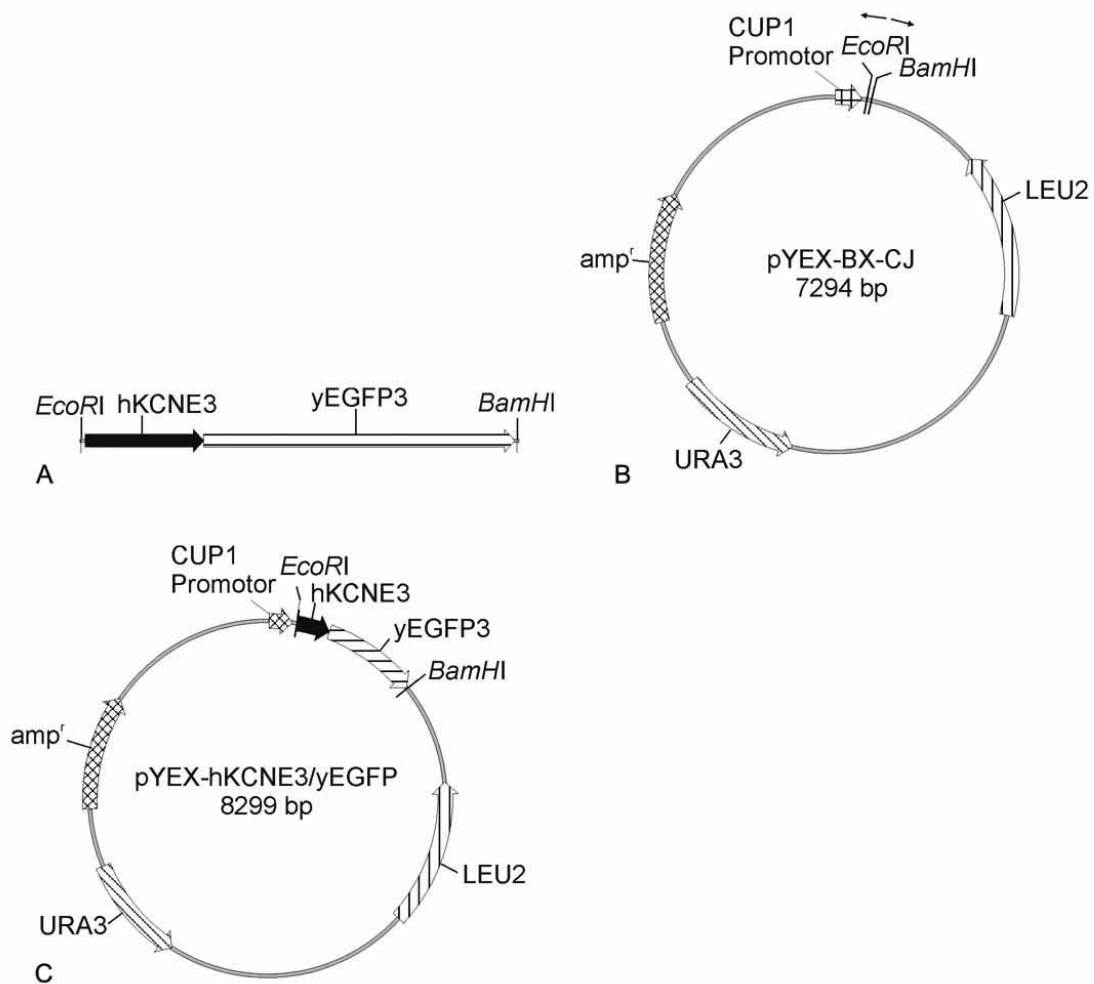


Abbildung 7.19: Konstruktion von pYEX-hKCNE3/yEGFP. Das Plasmid pYEX-hKCNE3/yEGFP (C) wurde generiert, indem mit Hilfe einer PCR zur Fusion zweier DNA-Fragmente (2.8.3) an *hKCNE3* C-terminal *yEGFP* fusioniert wurde. In der PCR 1A wurde das Primerpaar 1A_S: #42 - 1A_A: #45 eingesetzt, in PCR 1B das Primerpaar 1B_S: #44 - 1B_A: #36. PCR 2 wurde mit den Primern 1A_S - 1B_A (#42 - #36) durchgeführt. Das 1073 bp große *EcoRI* - *BamHI* Fragment der PCR 2 (A) wurde mit dem 7263 bp großen *BamHI* - *EcoRI* pYEX-BX-CJ Fragment (B) ligiert.

7.3.2.16 Konstruktion von p77X-hKCNE3

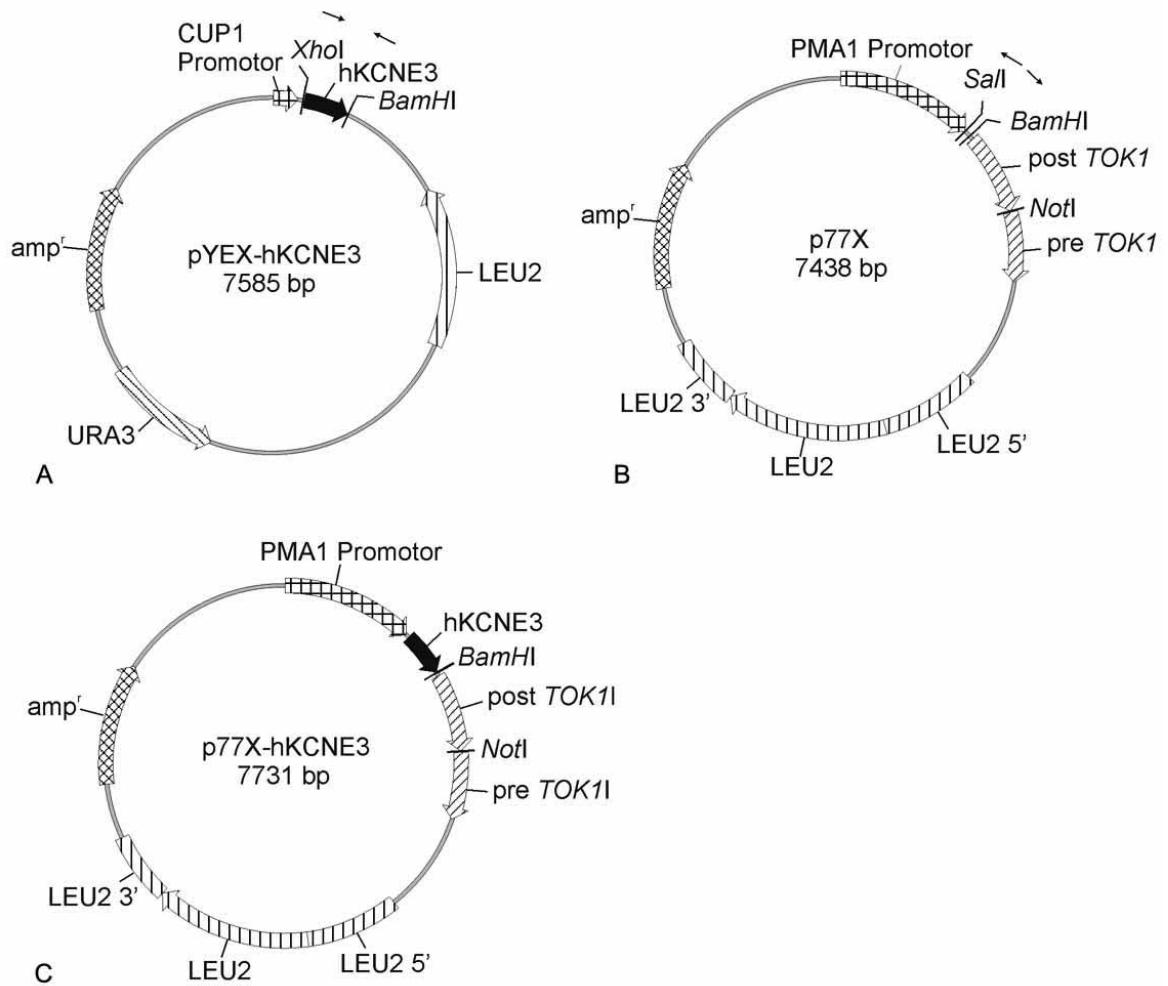


Abbildung 7.20: Konstruktion von p77X-hKCNE3. Das Plasmid p77X-hKCNE3 (C) wurde generiert, indem das 338 bp große *XhoI* - *BamHI* Fragment aus pYEX-hKCNE3 (A) mit dem 7393 bp großem *BamHI* - *SalI* Fragment aus p77X (B) ligiert wurde.

7.3.2.17 Konstruktion von pYEX-yEGFP/hKCNE3

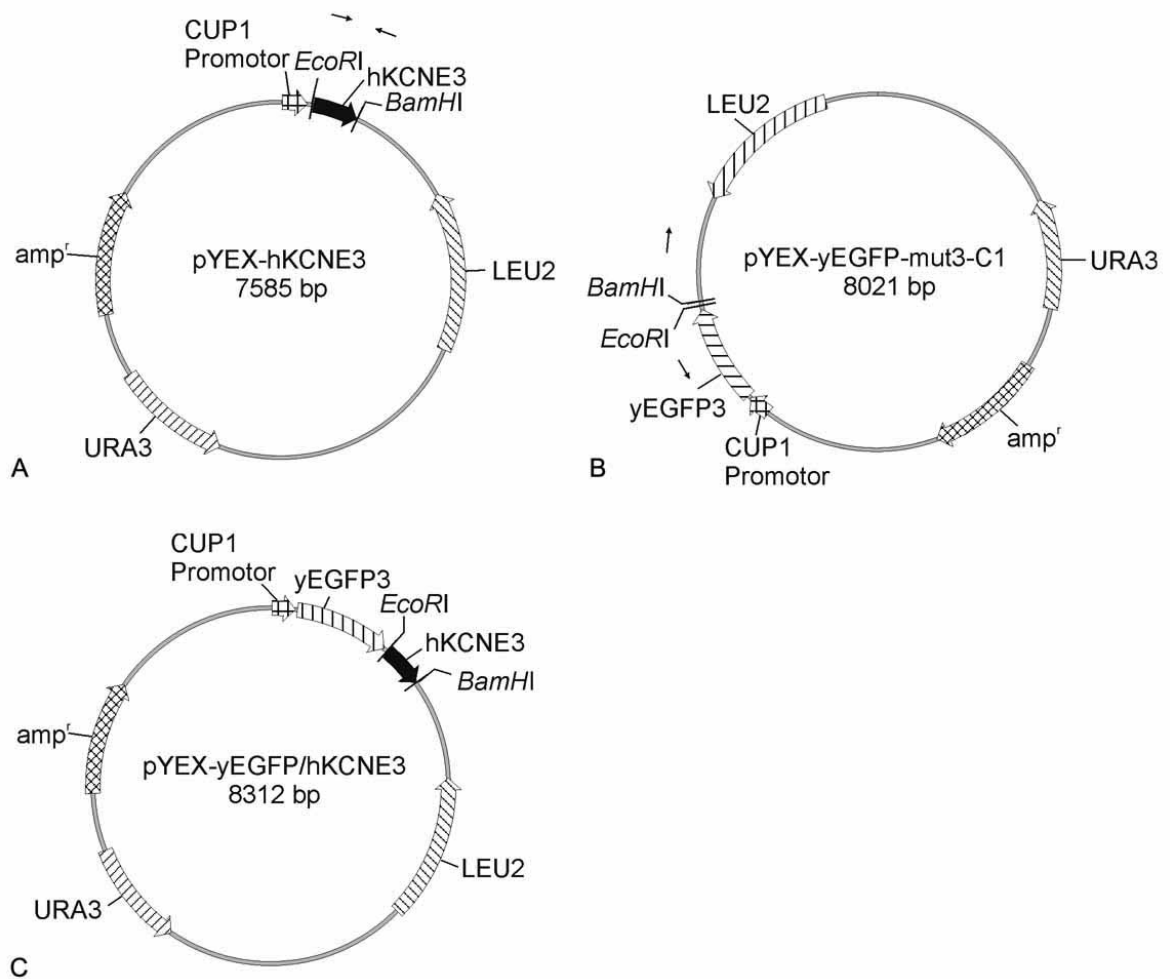


Abbildung 7.21: Konstruktion von pYEX-yEGFP/hKCNE3. Das Plasmid pYEX-yEGFP/hKCNE3 (C) wurde generiert, indem das 322 bp große *EcoRI* - *BamHI* Fragment aus pYEX-hKCNE3 (A) mit dem 7990 bp großem *BamHI* - *EcoRI* Fragment aus pYEX-yEGFP-mut3-C1 (B) ligiert wurde.

7.3.2.18 Konstruktion von pYEX-yEGFP/hKCNE3 ASA

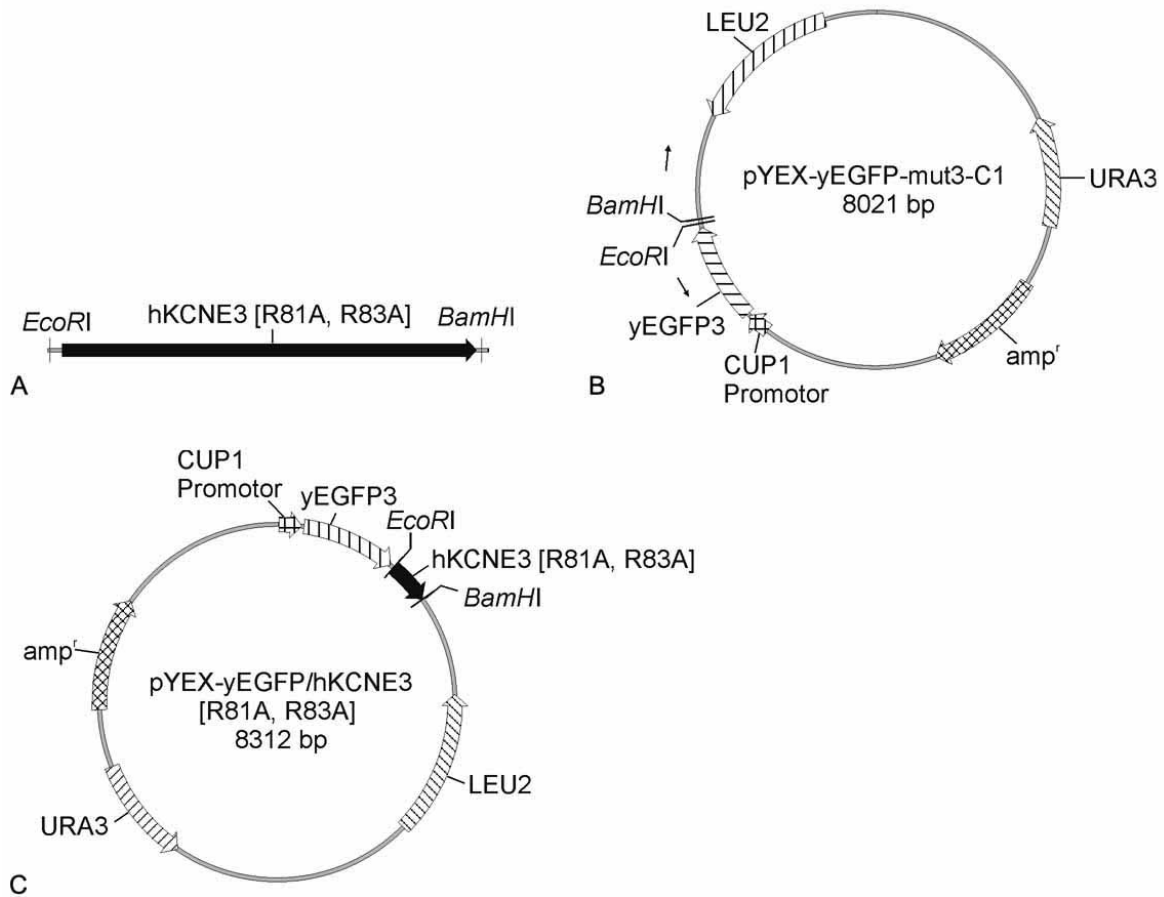


Abbildung 7.22: Konstruktion von pYEX-yEGFP/hKCNE3 [R81A, R83A]. Das Plasmid pYEX-yEGFP/hKCNE3 [R81A, R83A] (**C**) wurde generiert, indem *hKCNE3* [R81A, R83A] mit Hilfe der *in vitro* Mutagenese (2.8.2) hergestellt wurde. Für die PCR 1A wurde das Primerpaar 1AS: #42 - 1A_A: #54 und für die PCR 1B wurde das Primerpaar 1B_S: #53 - 1BA: #43 eingesetzt, als Matrizen-DNA wurde in beiden PCRs pYEX-hKCNE3 eingesetzt. Die PCR 2 wurde mit dem Primerpaar 1AS: #42 - 1BA: #43 durchgeführt.

Das in PCR 2 amplifizierte Fragment wurde mit Phenol-Chloroform (2.6.6) gereinigt und mit Ethanol gefällt (2.6.7). Anschließend wurde es mit *EcoRI* - *BamHI* geschnitten (**A**). Dieses 322 bp große Fragment und das 7990 bp große *EcoRI* - *BamHI* pYEX-yEGFP-mut3-C1 Fragment (**B**) wurden ligiert. Das Plasmid pYEX-yEGFP/hKCNE3 [R81A, R83A] wird in dieser Arbeit auch mit pYEX-yEGFP/hKCNE3 ASA bezeichnet.

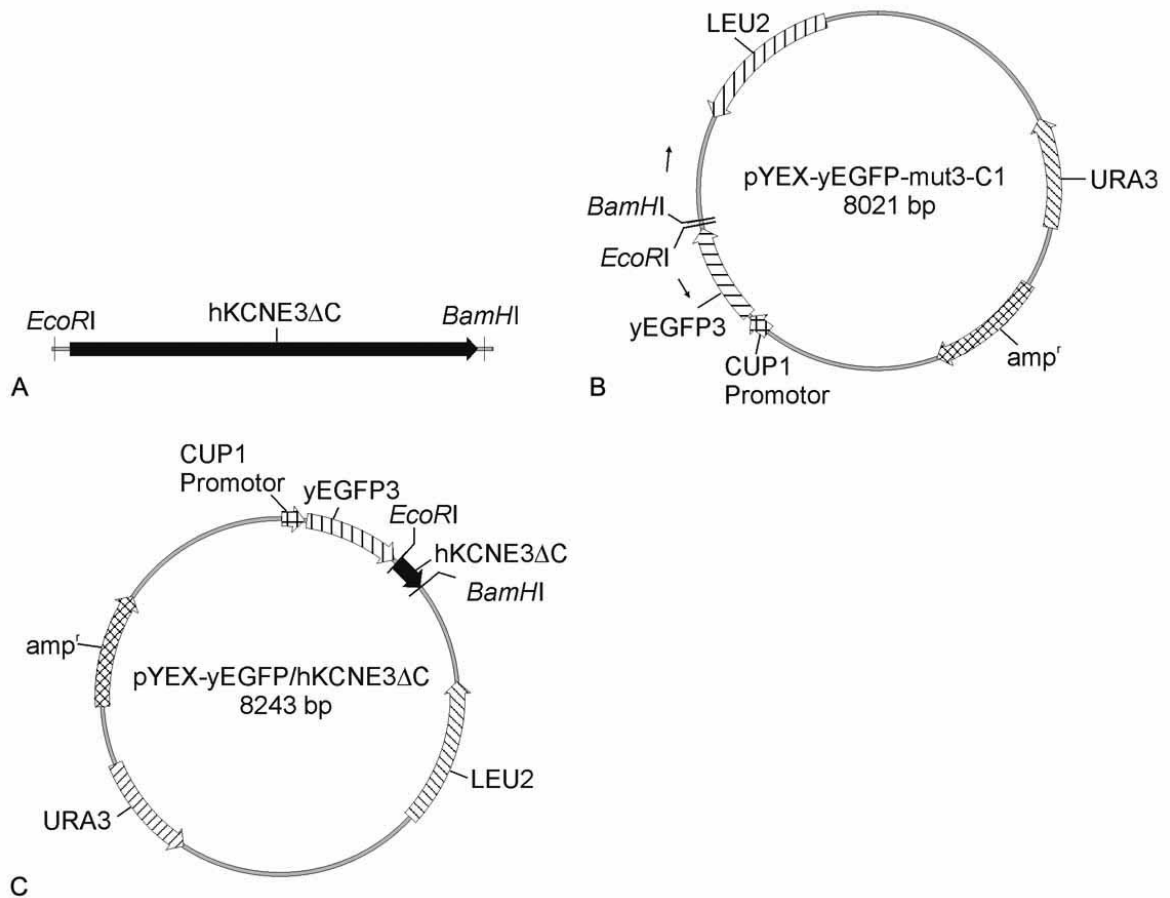
7.3.2.19 Konstruktion von pYEX-yEGFP/hKCNE3 Δ C

Abbildung 7.23: Konstruktion von pYEX-yEGFP/hKCNE3 Δ C. Das Plasmid pYEX-yEGFP/hKCNE3 Δ C (C), bei dem die Aminosäuren 81 - 103 von hKCNE3 deletiert sind, wurde generiert, indem *hKCNE3 Δ C* per PCR mit dem Primerpaar #42 - #55 und als Matrizen-DNA pYEX-hKCNE3 amplifiziert wurde, das 253 bp große *EcoRI* - *BamHI* geschnittene PCR-Fragment (A) wurde mit dem 7990 bp großen *BamHI* - *EcoRI* Fragment aus pYEX-yEGFP-mut3-C1 (B) ligiert.

7.3.3 Herstellung der Plasmide zur Expression von *mKir2.1* (-Mutanten)

7.3.3.1 Konstruktion von p77x-(His)-sig/mRFP/HDEL

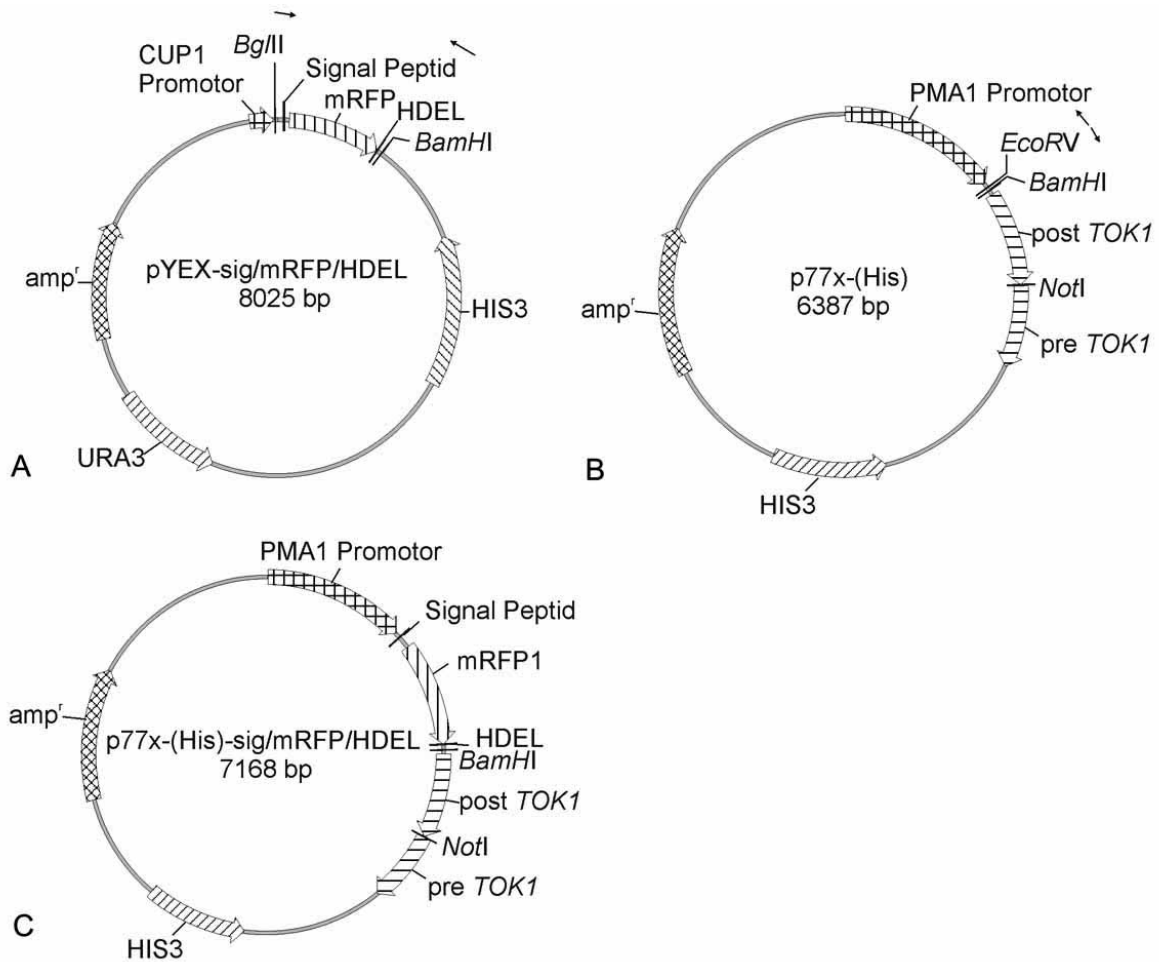


Abbildung 7.24: Konstruktion von p77x-(His)-sig/mRFP/HDEL. Das Plasmid p77x-(His)-sig/mRFP/HDEL (C) wurde generiert, indem das 803 bp große *Bgl*II - *Bam*HI Fragment aus pYEX-sig/mRFP/HDEL (A) mit dem 6365 bp großen *Bam*HI - *Eco*RIV Fragment aus p77x-(His) (B) ligiert wurde.

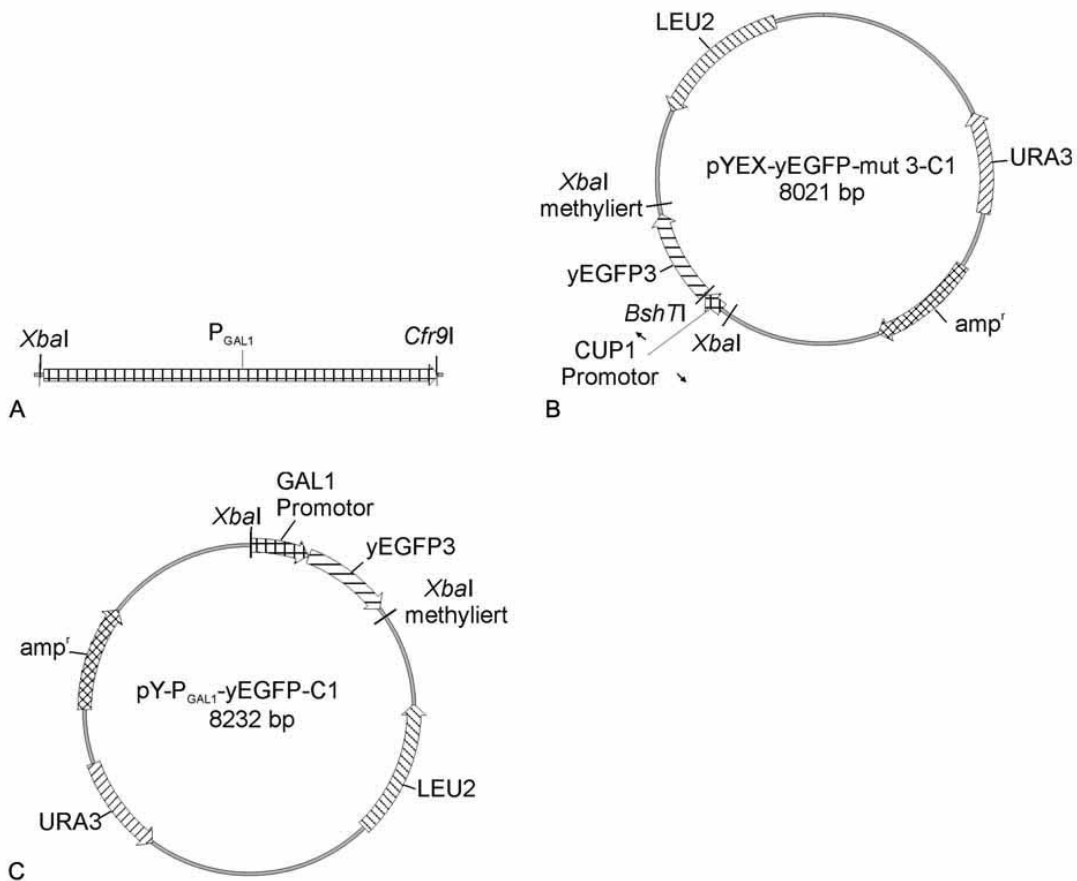
7.3.3.2 Konstruktion von pY-P_{GAL1}-yEGFP-C1

Abbildung 7.25: Konstruktion von pY-P_{GAL1}-yEGFP-C1. Das Plasmid pY-P_{GAL1}-yEGFP-C1 (**C**) wurde generiert, indem per PCR mit den Primern #29 und #30 P_{GAL1} amplifiziert wurde (Matrizen-DNA: pSH47). Das PCR-Produkt wurde mit Phenol-Chloroform extrahiert (2.6.6) und mit Ethanol gefällt (2.6.7). Anschließend wurde hintereinander mit Cfr9I und mit XbaI geschnitten (2.7.1) und das 461 bp große Fragment (**A**) eluiert (2.7.9). pYEX-yEGFP-mut3-C1 wurde hintereinander mit Bsh7I und mit XbaI geschnitten (2.7.1). Das 7771 bp große Fragment (**B**) wurde eluiert (2.7.9). Diese beiden Fragmente wurden ligiert (2.7.7), Cfr9I und Bsh7I sind zueinander kompatibel.

7.3.3.3 Konstruktion von pYEX-yEGFP/mKir2.1

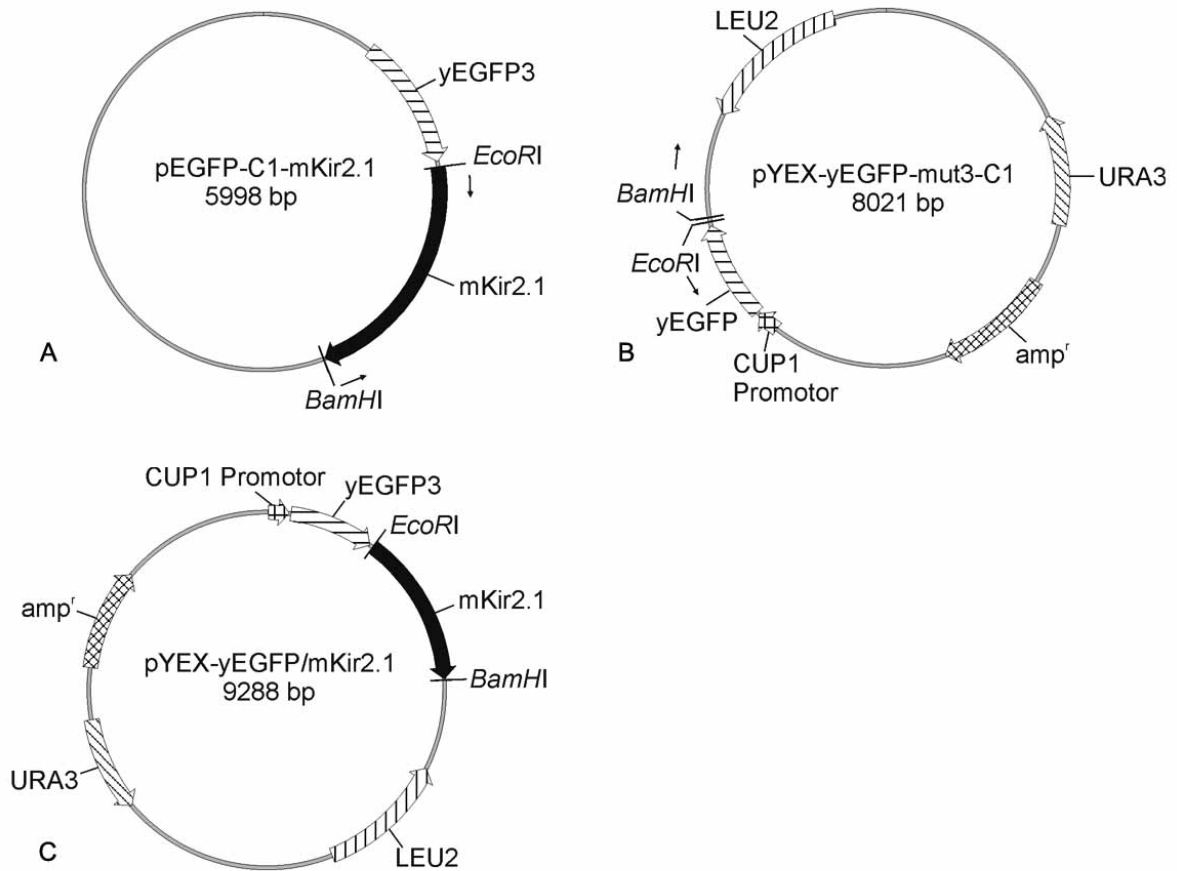


Abbildung 7.26: Konstruktion von pYEX-yEGFP/mKir2.1. Das Plasmid pYEX-yEGFP/mKir2.1 (C) wurde generiert, indem das 1298 bp große *EcoRI* - *BamHI* Fragment aus pEGFP-C1-mKir2.1 (A) mit dem 7990 bp großen *BamHI* - *EcoRI* Fragment aus pYEX-yEGFP-mut3-C1 (B) ligiert wurde.

7.3.3.4 Konstruktion der Plasmide pYEX-yEGFP/mKir2.1 mit jeweils einer der vier mKir2.1 Mutationen ([R67W], [D71V], [S136F], [G144S])

Exemplarisch ist in Abb. 7.27 die Konstruktion von pYEX-yEGFP/mKir2.1 [R67W] gezeigt. Nach dem selben Prinzip wurden die drei Plasmide pYEX-yEGFP/mKir2.1 [D71V], pYEX-yEGFP/mKir2.1 [S136F] und pYEX-yEGFP/mKir2.1 [G144S] hergestellt. Als Matrizen-DNA der PCR 1A und PCR 1B diente pYEX-yEGFP/mKir2.1. Im folgenden findet sich eine Auflistung der für die jeweilige *in vitro* Mutagenese (2.8.2) verwendeten Primerpaare:

Amplifikat	PCR 1A (1AS - 1A_A)	PCR 1B (1B_S - 1BA)	PCR 2 (1AS - 1BA)
mKir2.1 [R67W]	#19 - #20	#21 - #22	#19 - #22
mKir2.1 [D71V]	#19 - #23	#24 - #22	#19 - #22
mKir2.1 [S136F]	#19 - #25	#26 - #22	#19 - #22
mKir2.1 [G144S]	#19 - #27	#28 - #22	#19 - #22

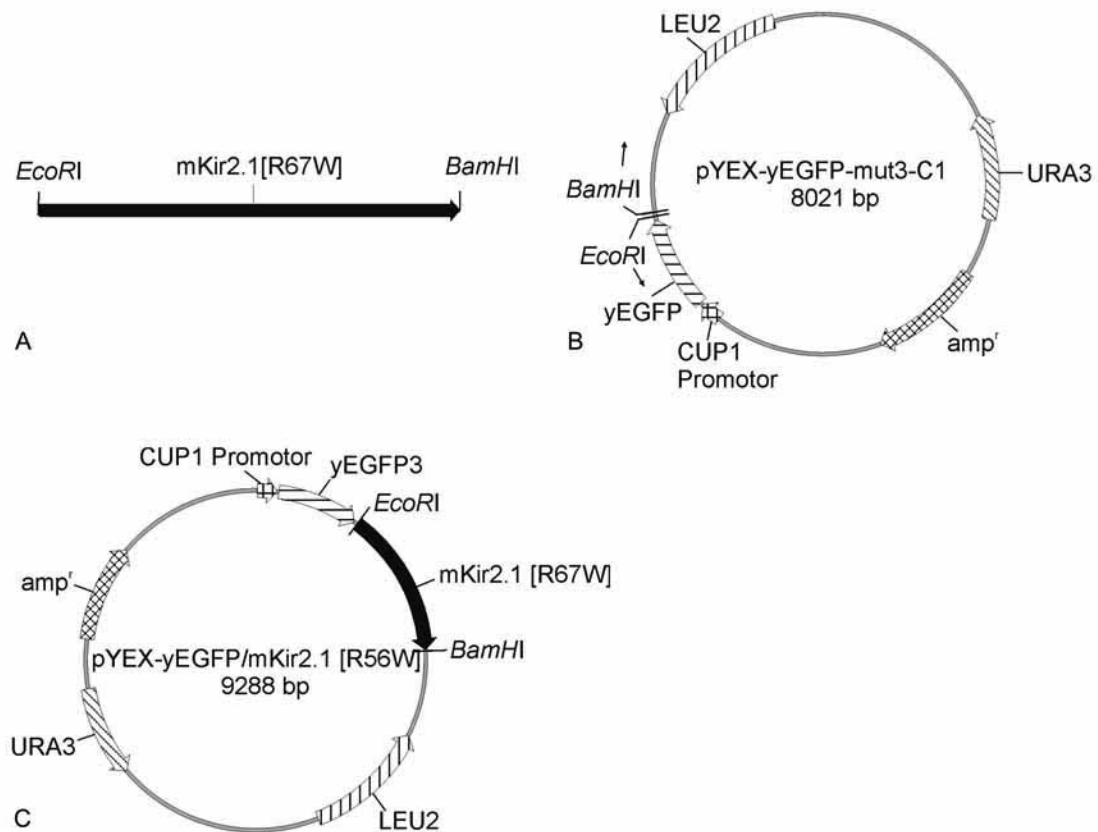


Abbildung 7.27: Konstruktion von pYEX-yEGFP/mKir2.1 [R67W]. Die für das Plasmid pYEX-yEGFP/mKir2.1 [R67W] (C) notwendige Mutation wurde mit Hilfe der *in vitro* Mutagenese (2.8.2) hergestellt. Das in PCR 2 amplifizierte Fragment wurde mit Phenol-Chloroform (2.6.6) gereinigt und mit Ethanol gefällt (2.6.7). Anschließend wurde es mit *EcoRI* - *BamHI* (A) geschnitten. Dieses 1298 bp große Fragment und das 7990 bp große *BamHI* - *EcoRI* Fragment aus pYEX-yEGFP-mut3-C1 (B) wurden ligiert.

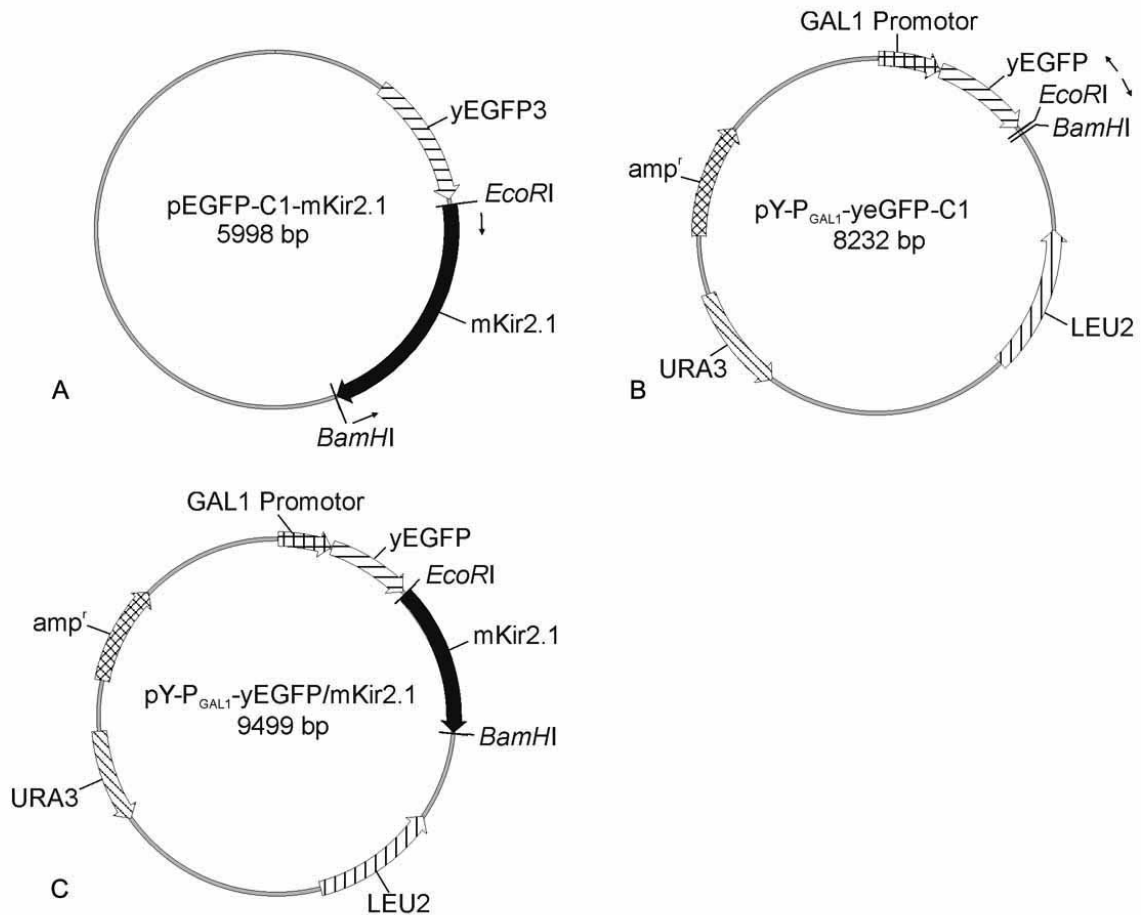
7.3.3.5 Konstruktion von $\text{pY-P}_{\text{GAL1}}\text{-yEGFP/mKir2.1}$ 

Abbildung 7.28: Konstruktion von $\text{pY-P}_{\text{GAL1}}\text{-yEGFP/mKir2.1}$. Das Plasmid $\text{pY-P}_{\text{GAL1}}\text{-yEGFP/mKir2.1}$ (C) wurde generiert, indem das 1298 bp große EcoRI - BamHI Fragment aus pEGFP-C1-mKir2.1 (A) mit dem 8201 bp großen BamHI - EcoRI Fragment aus $\text{pY-P}_{\text{GAL1}}\text{-yeGFP-C1}$ (B) ligiert wurde.

7.3.3.6 Konstruktion der Plasmide pY-P_{GAL1}-yEGFP/mKir2.1 mit jeweils einer der vier mKir2.1 Mutationen ([R67W], [D71V], [S136F], [G144S])

Exemplarisch ist in Abb. 7.29 die Konstruktion von pY-P_{GAL1}-yEGFP/mKir2.1 [R67W] gezeigt. Nach dem selben Prinzip wurden die drei Plasmide pY-P_{GAL1}-yEGFP/mKir2.1 [D71V], pY-P_{GAL1}-yEGFP/mKir2.1 [S136F] und pY-P_{GAL1}-yEGFP/mKir2.1 [G144S] hergestellt.

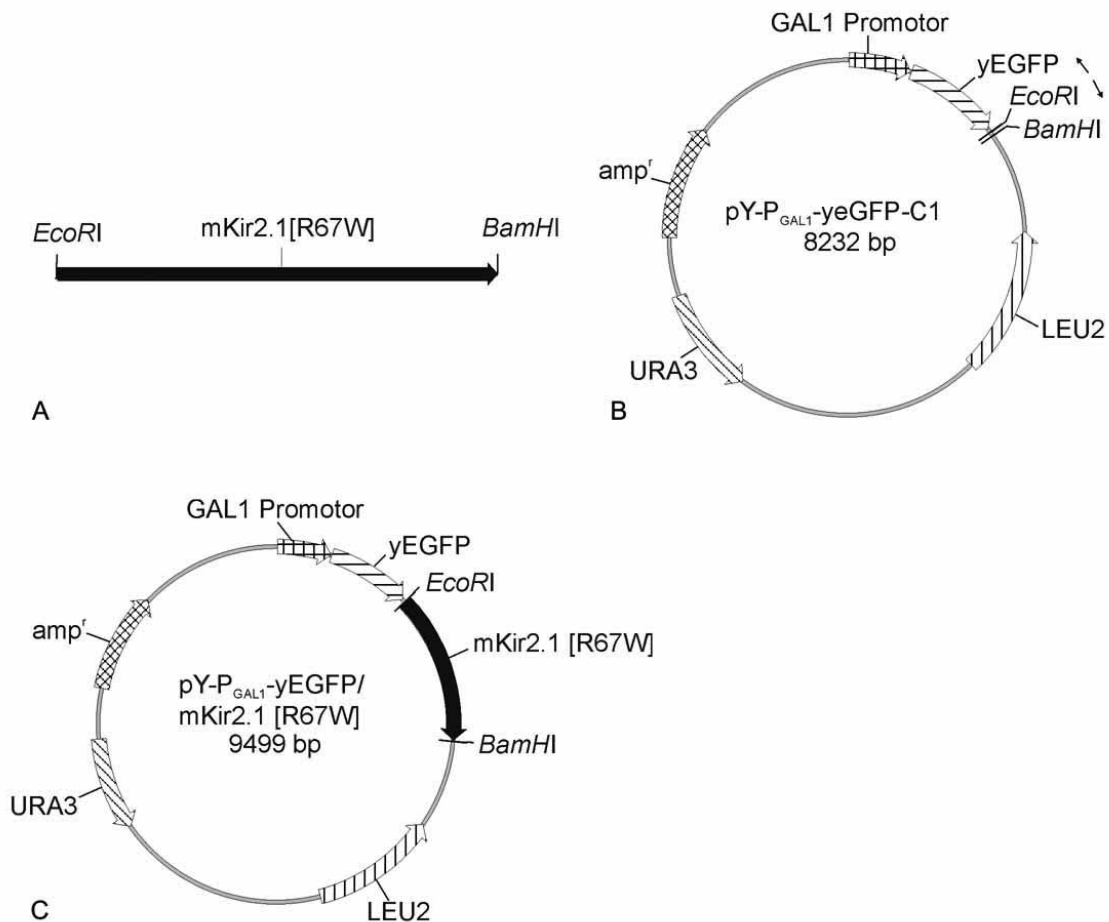


Abbildung 7.29: Konstruktion von pY-P_{GAL1}-yEGFP/mKir2.1 [R67W]. Zur Konstruktion von pY-P_{GAL1}-yEGFP/mKir2.1 [R67W] wurde das PCR Produkt *Kir2.1* [R67W], dessen Amplifikation unter 7.3.3.4 beschrieben wurde, und *EcoRI* - *BamHI* geschnitten wurde, verwendet. Dieses 1298 bp große Fragment (A) wurde mit dem 8201 bp großen pY-P_{GAL1}-yEGFP-C1 Fragment (B) ligiert.

7.3.3.7 Konstruktion von pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1

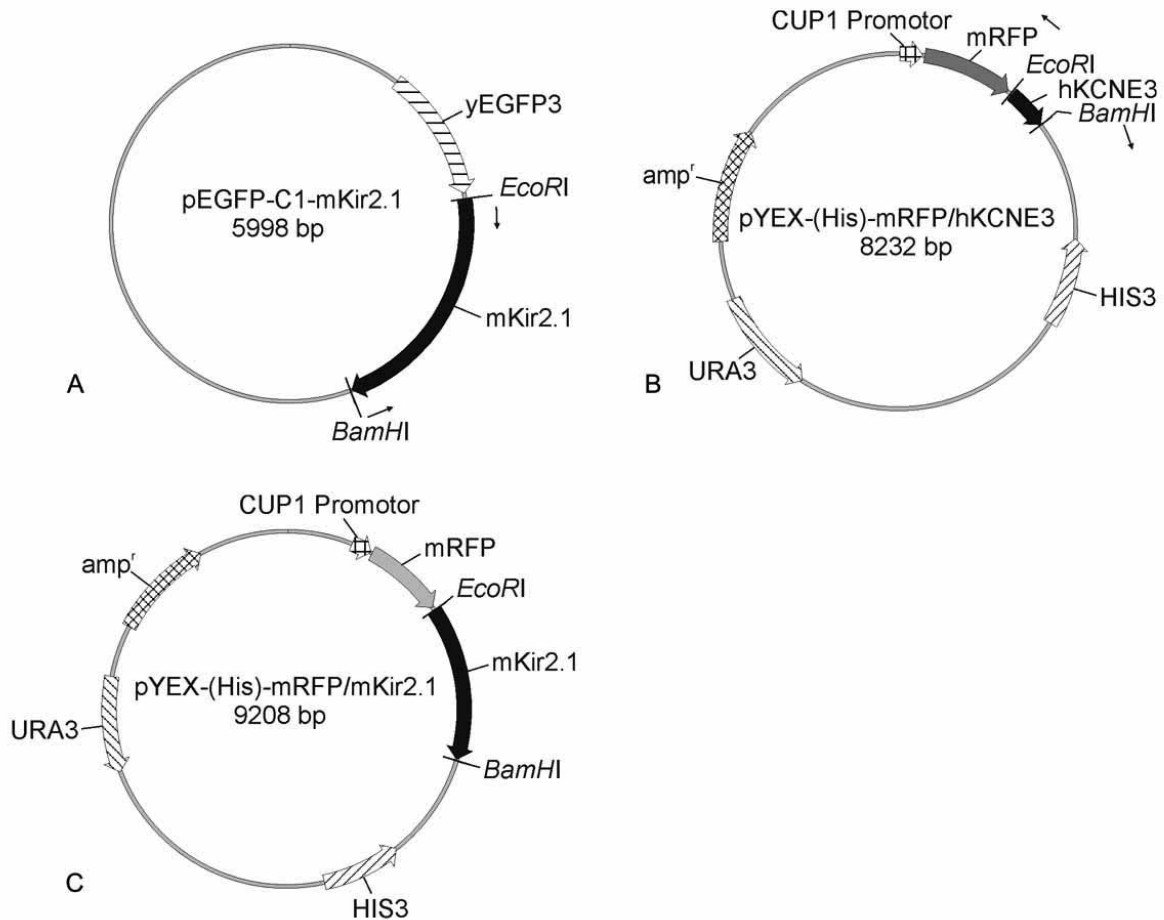


Abbildung 7.30: Konstruktion von pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1. Das Plasmid pYEX-(His)-mRFP/mKir2.1 (C) wurde generiert, indem das 1298 bp große *EcoRI* - *BamHI* Fragment aus pEGFP-C1-mKir2.1 (A) mit dem 7910 bp großen *BamHI* - *EcoRI* Fragment aus pYEX-(His)-mRFP/hKCNE3 (B) ligiert wurde.

7.3.3.8 Konstruktion von p77trp

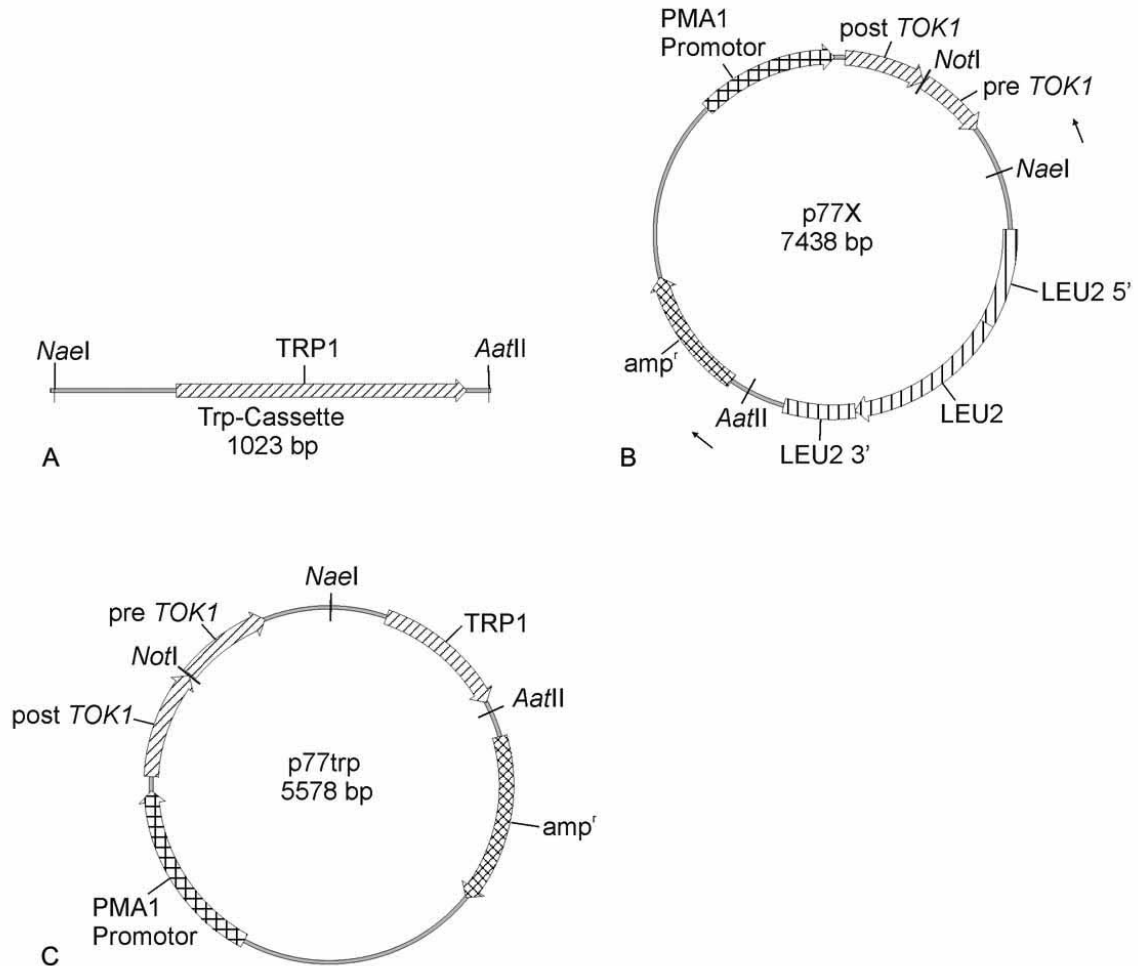


Abbildung 7.31: Konstruktion von p77trp. Das Konstrukt p77trp (C) wurde generiert, indem per PCR mit dem Primerpaar #56 und #57 die *TRP1*-Kassette amplifiziert wurde (Matrizen-DNA: pRS423) und nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion (2.6.6) und Ethanol-Fällung (2.6.7) dieses Fragment *NaeI* - *AatII* geschnitten wurde (A). Dieses 1011 bp große Fragment wurde mit dem 4567 bp großem *NaeI* - *AatII* Fragment aus p77X (B) ligiert.

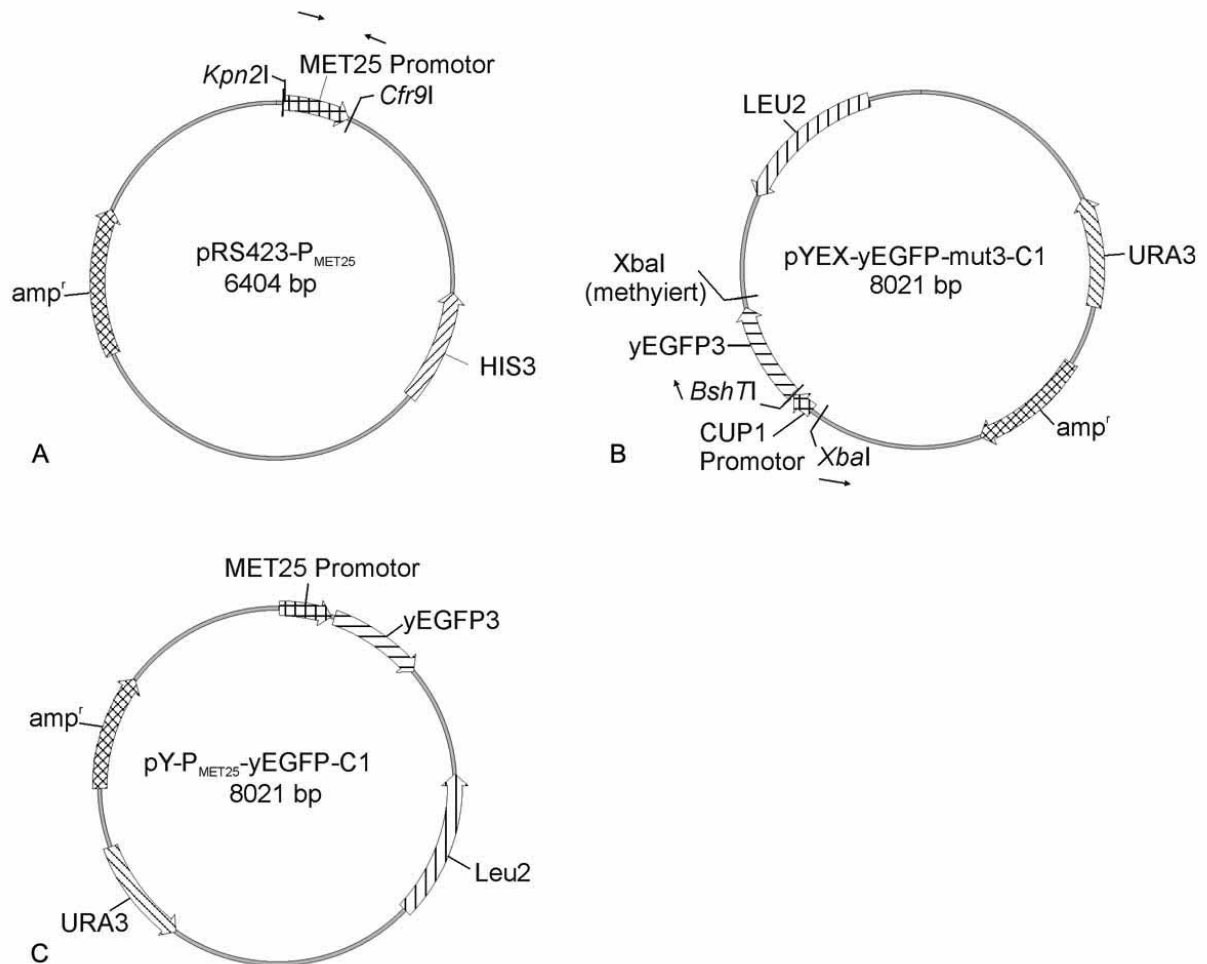
7.3.3.9 Konstruktion von pY-P_{MET25}-yEGFP-C1

Abbildung 7.32: Konstruktion von pY-P_{MET25}-yEGFP-C1. Das Plasmid pY-P_{MET25}-yEGFP-C1 (C) wurde generiert, indem das 402 bp große *Kpn21* - *Cfr91* Fragment aus pRS423-MET25 (A) mit dem 7775 bp großen *Xba1* - *Bsh7I* pYEX-yEGFP-mut3-C1 Fragment (B) ligiert wurde.

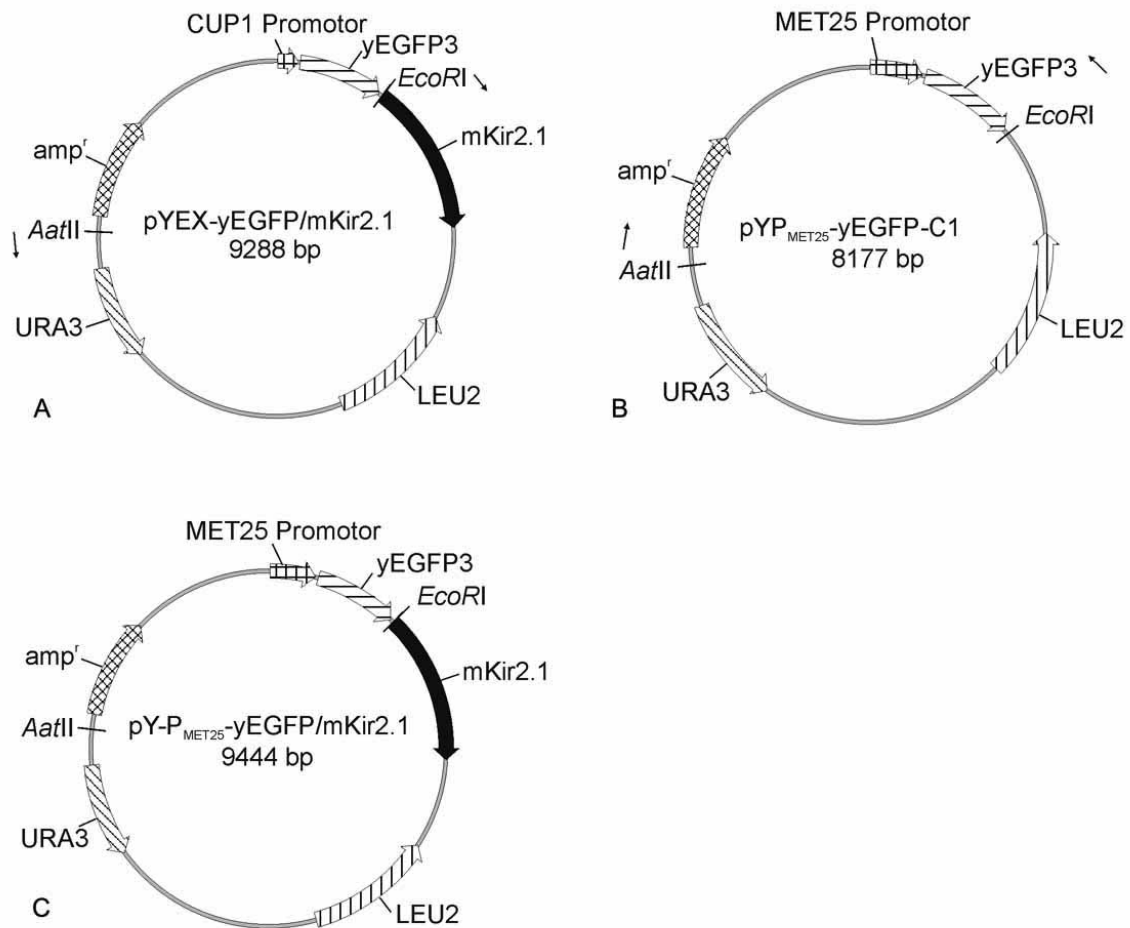
7.3.3.10 Konstruktion von $pY-P_{MET25}\text{-yEGFP/mKir2.1}$ 

Abbildung 7.33: Konstruktion von $pY-P_{MET25}\text{-yEGFP/mKir2.1}$. Das Plasmid $pY-P_{MET25}\text{-yEGFP/mKir2.1}$ (C) wurde generiert, indem das 6087 bp große $EcoRI$ - $AatII$ Fragment aus $pYEX\text{-yEGFP/mKir2.1}$ (A) mit dem 3357 bp großen $EcoRI$ - $AatII$ $pY-P_{MET25}\text{-yEGFP-C1}$ Fragment (B) ligiert wurde.

7.3.3.11 Konstruktion der Plasmide pY-P_{MET25}-yEGFP/mKir2.1 mit jeweils einer der vier mKir2.1 Mutationen ([R67W], [D71V], [S136F], [G144S])

Beispielhaft ist in Abb. 7.34 die Konstruktion von pY-P_{MET25}-yEGFP/mKir2.1 [R67W] gezeigt. Nach dem selben Prinzip wurden die drei Plasmide pY-P_{MET25}-yEGFP/mKir2.1 [D71V], pY-P_{MET25}-yEGFP/mKir2.1 [S136F] und pY-P_{MET25}-yEGFP/mKir2.1 [G144S] hergestellt.

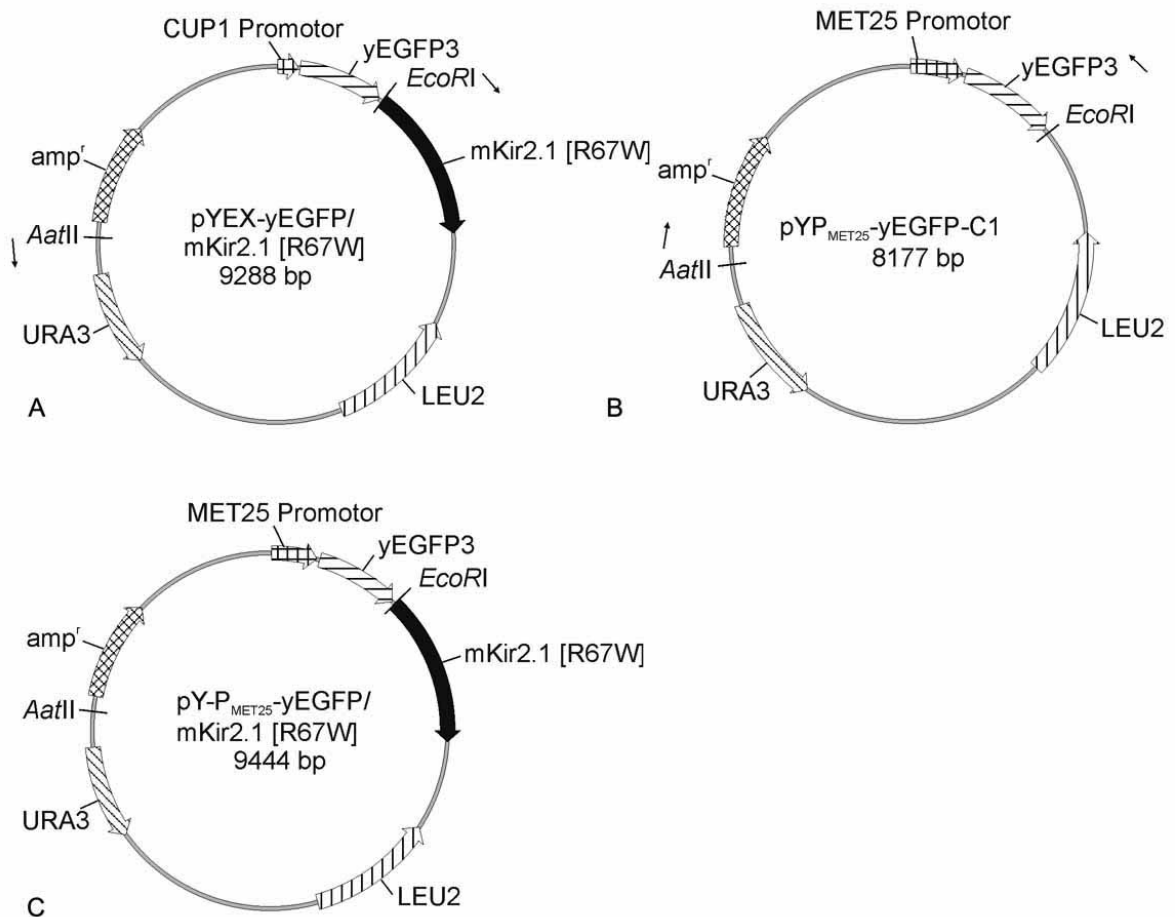


Abbildung 7.34: Konstruktion von pY-P_{MET25}-yEGFP/mKir2.1 [R67W]. Das Plasmid pY-P_{MET25}-yEGFP/mKir2.1 [R67W] (C) wurde generiert, indem das 6087 bp große EcoRI - AatII Fragment aus pYEX-yEGFP/mKir2.1 [R67W] (A) mit dem 3357 bp großen AatII - EcoRI Fragment aus pY-P_{MET25}-yEGFP-C1 (B) ligiert wurde.

7.3.4 Herstellung der Plasmide zur Expression von *rKir3.2* (-Mutanten)

7.3.4.1 Konstruktion von pYEX-rKir3.2

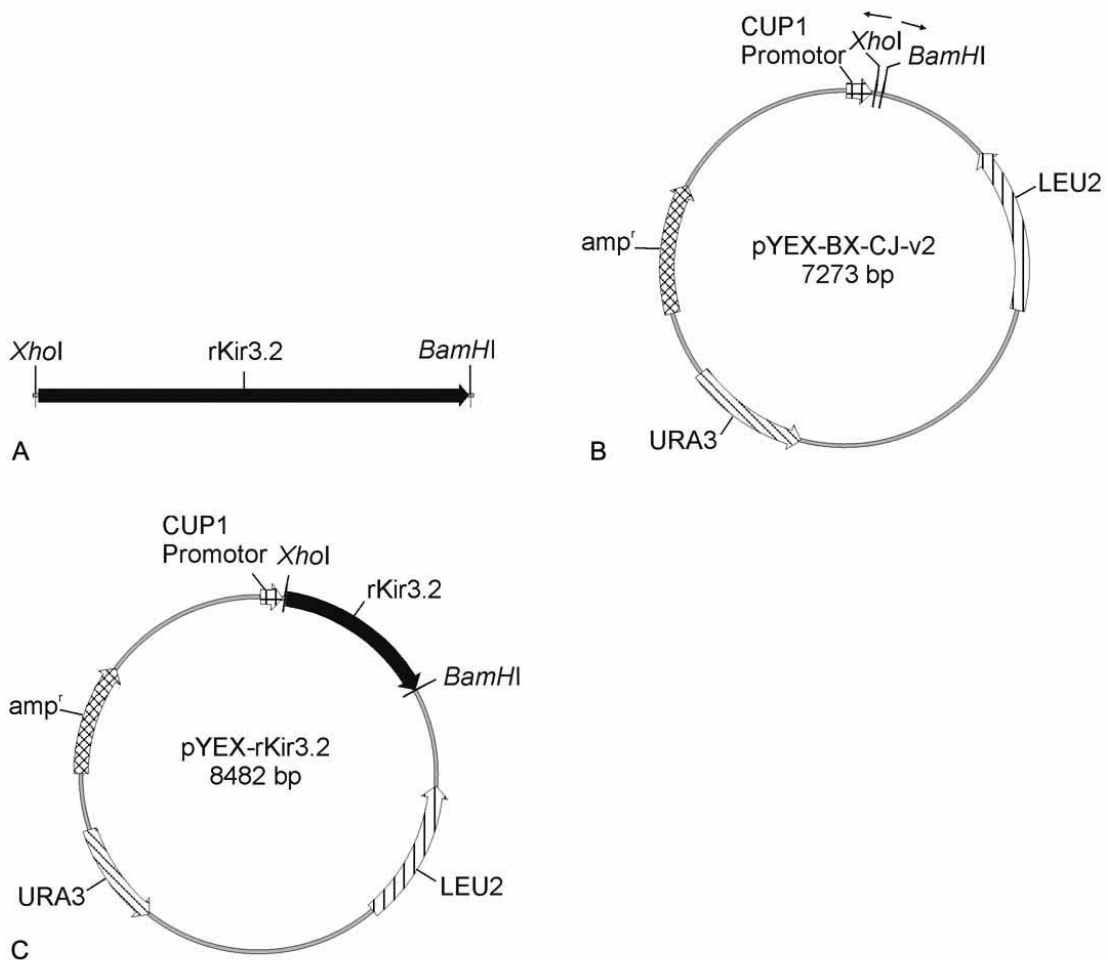


Abbildung 7.35: Konstruktion von pYEX-rKir3.2. Das Plasmid pYEX-rKir3.2 (C) wurde generiert, indem *rKir3.2* mit Hilfe einer PCR (Matrize: cDNA aus dem Gehirn von *Rattus norvegicus* (J. Ludwig)) unter Verwendung der Primer #46 und #47 amplifiziert wurde. Das Amplifikat wurde *XhoI* - *BamHI* geschnitten. Dieses 1256 bp große Fragment (A) wurde mit dem 7226 bp großen *BamHI* - *XhoI* Fragment aus pYEX-BX-CJ-v2 (B) ligiert.

7.3.4.2 Konstruktion von pYEX-yEGFP/rKir3.2

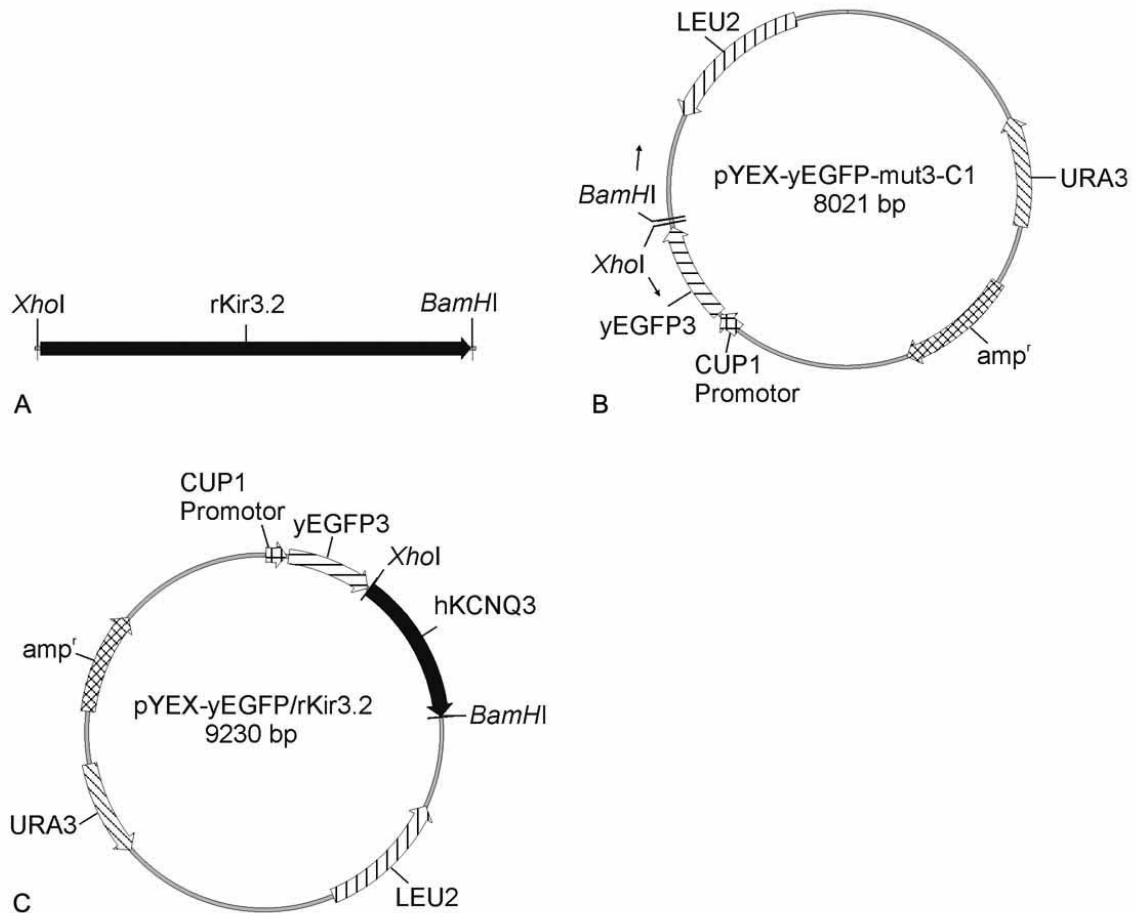


Abbildung 7.36: Konstruktion von pYEX-yEGFP/rKir3.2. Das Plasmid pYEX-yEGFP/rKir3.2 (C) wurde generiert, indem *rKir3.2* mit Hilfe einer PCR (Matrize: cDNA aus dem Gehirn von *Rattus norvegicus* (J. Ludwig)) mit den Primer #46 und #47 amplifiziert wurde. Das Amplifikat wurde *XhoI* - *BamHI* geschnitten. Dieses 1256 bp große Fragment (A) wurde mit dem 7974 bp großen *BamHI* - *XhoI* Fragment aus pYEX-yEGFP-mut3-C1 (B) ligiert.

7.3.4.3 Konstruktion von pYEX-rKir3.2 mit jeweils einer der vier Mutationen ([G156S], [S177T], [S177W], [V188G])

Beispielhaft ist in Abb. 7.37 die Konstruktion von pYEX-rKir3.2 [G156S] gezeigt. Nach dem selben Prinzip wurden die drei Plasmide pYEX-rKir3.2 [S177T], pYEX-rKir3.2 [S177W] und pYEX-rKir3.2 [V188G] hergestellt. Als Matrizen-DNA für die jeweilige PCR 1A und PCR 1B wurde pYEX-rKir3.2 verwendet. Im folgenden findet sich eine Auflistung der für die jeweilige *in vitro* Mutagenese verwendeten Primerpaare:

Amplifikat	PCR 1A (1AS - 1A_A)	PCR 1B (1B_S - 1BA)	PCR 2 (1AS - 1BA)
rKir3.2 [G156S]	#3 - #11	#4 - #12	#3 - #4
rKir3.2 [S177T]	#3 - #5	#4 - #6	#3 - #4
rKir3.2 [S177W]	#3 - #7	#4 - #8	#3 - #4
rKir3.2 [V188G]	#3 - #9	#4 - #10	#3 - #4

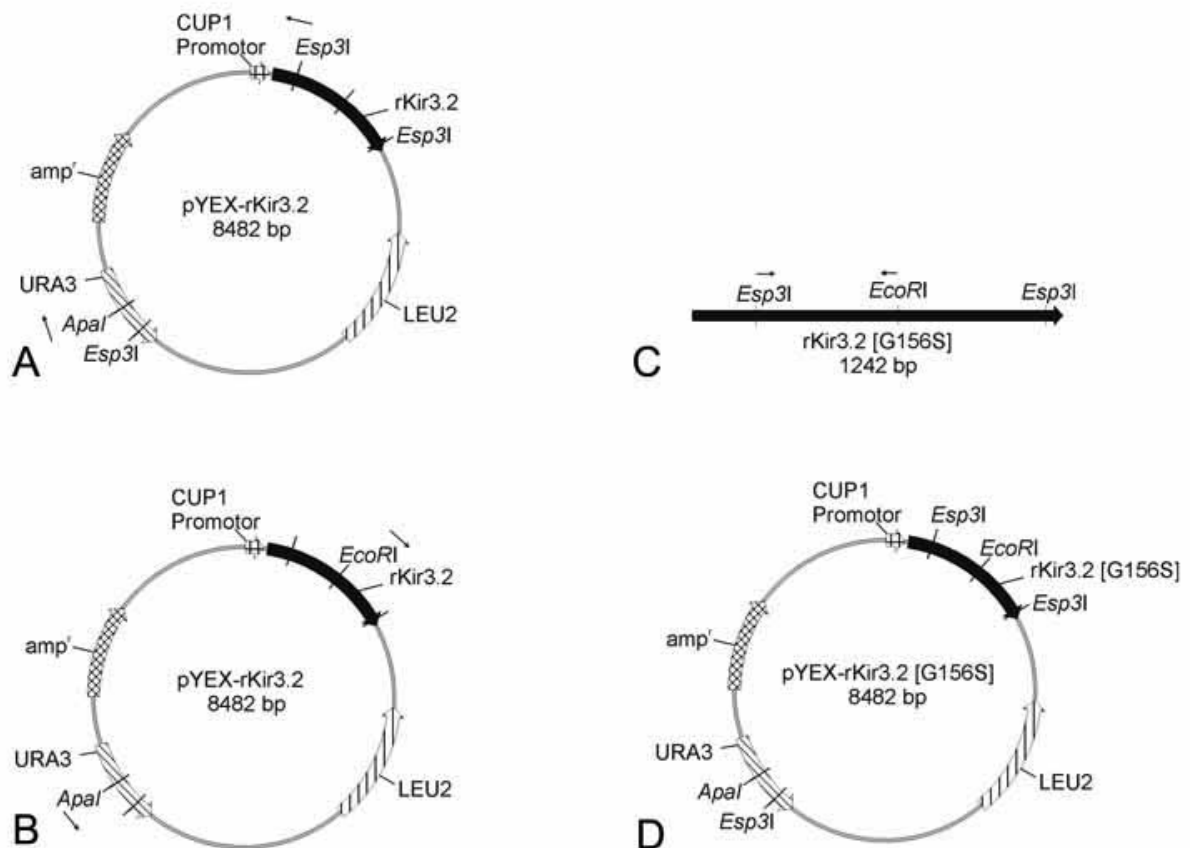


Abbildung 7.37: Konstruktion von pYEX-rKir3.2 [G156S]. pYEX-rKir3.2 [G156S] wurde generiert, indem das Plasmid pYEX-rKir3.2 einmal mit *Apal* - *Esp31* geschnitten (**A**) und die 3341 bp große Bande eluiert wurde (2.7.9), und zum zweiten das selbe Plasmid auch *EcoRI* und mit *Apal* geschnitten wurde (**B**). In diesem Fall wurde das 4665 bp große Fragment eluiert. Über *in vitro* Mutagenese (2.8.2) wurden die Mutation in rKir3.2 erzeugt. Das Amplifikat der PCR 2 wurde gereinigt und gefällt, nach einer Restriktion mit *Esp31* - *EcoRI* wurde das kleinere der beiden Fragmente (476 bp) (**C**) eluiert. Anschließend fand eine Dreierligation statt, die beiden Fragmente aus pYEX-rKir3.2 (4665 bp und 3341 bp) und das 476 bp große rKir3.2 Fragment wurden ligiert und somit pYEX-rKir3.2 [G156S] generiert (**D**).

7.3.4.4 Konstruktion von pYEX-yEGFP/rKir3.2 mit jeweils einer der vier rKir3.2 Mutationen ([G156S], [S177T], [S177W], [V188G])

In Abbildung 7.38 ist exemplarisch die Konstruktion von pYEX-yEGFP/rKir3.2 [G156S] dargestellt. Nach dem gleichen Schema wurden auch die Plasmide pYEX-yEGFP/rKir3.2 [S177T], pYEX-yEGFP/rKir3.2 [S177W] und pYEX-yEGFP/rKir3.2 [V188G] hergestellt, anstelle pYEX-rKir3.2 [G156S] wurde pYEX-rKir3.2 [S177T], pYEX-rKir3.2 [S177W] und pYEX-rKir3.2 [V188G] zur *Xba*I - *Bam*HI Restriktion eingesetzt.

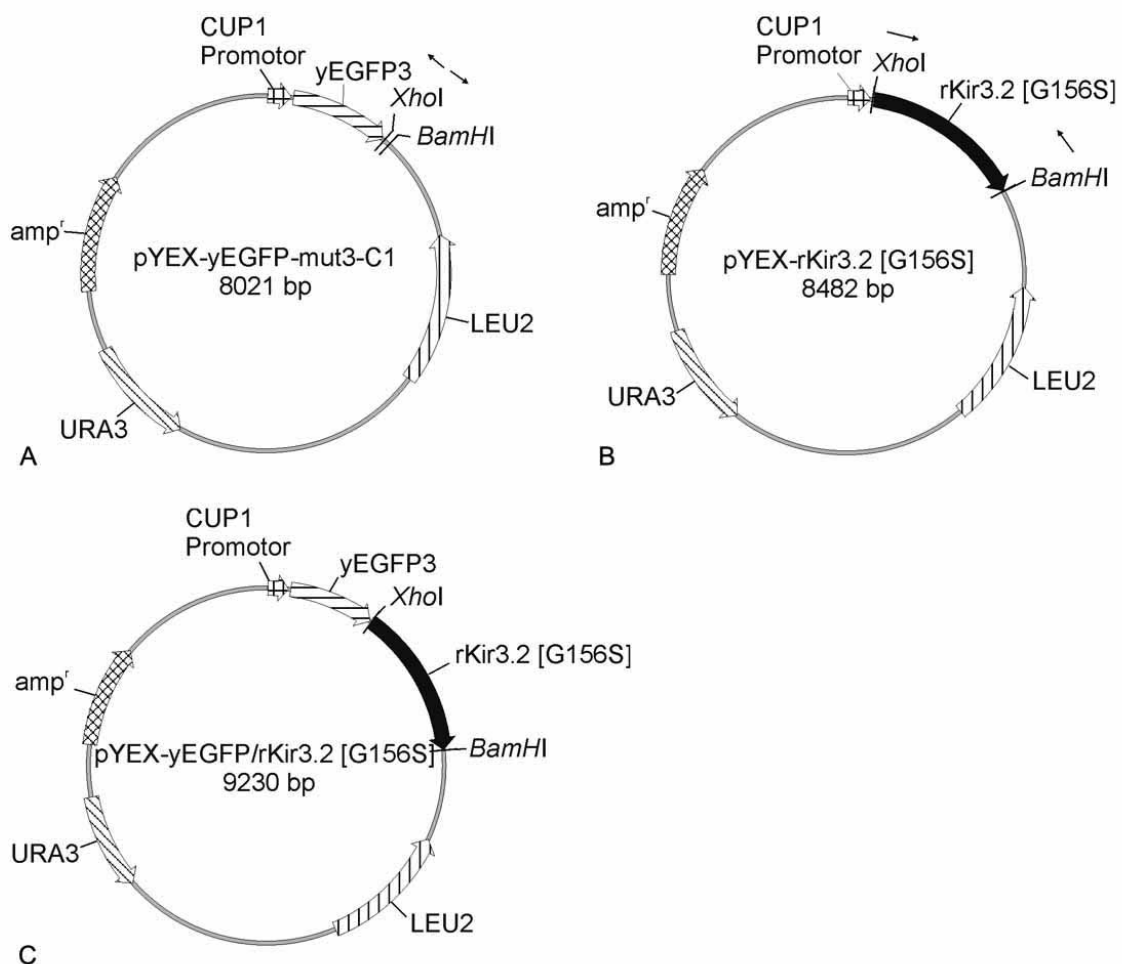


Abbildung 7.38: Konstruktion von pYEX-yEGFP/rKir3.2 [G156S]. Das Plasmid pYEX-yEGFP/rKir3.2 [G156S] (C) wurde generiert, indem das 7974 bp große *Bam*HI - *Xba*I Fragment aus pYEX-yEGFP-mut3-C1 (A) mit dem 1256 bp großem *Xba*I - *Bam*HI Fragment aus pYEX-rKir3.2 [G156S] (B) ligiert wurde.

Publikationen und Kongressbeiträge

Teile der vorliegenden Dissertation wurden auszugsweise in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Hasenbrink, G., **Schwarzer, S.**, Kolacna, L., Ludwig, J., Synchronova, H. and Lichtenberg-Fraté, H. (2005) Analysis of the mKir2.1 channel activity in potassium influx defective *Saccharomyces cerevisiae* strains determined as changes in growth characteristics. *FEBS Lett.*, 579, 1723-1731

Kolacna, L., Zimmermannova, O., Hasenbrink, G., **Schwarzer, S.**, Ludwig, J., Lichtenberg-Fraté, H. and Synchronova, H. (2005) New phenotypes of functional expression of the mKir2.1 channel in potassium efflux-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Yeast*, 22, 1315-1323

Vorträge:

Schwarzer, S., Lichtenberg-Fraté, Synchronova, H., H., Ludwig, J. (2005). Functional expression and analysis of the Kir3.2 K⁺-channel in *Saccharomyces cerevisiae*. 23rd Smyte (Small Meeting on Yeast Transport and Genetics) in New Dehli, Indien

Schwarzer, S., Lichtenberg-Fraté, H., Ludwig, J. (2004). Cellular localisation of heteromeric mammalian K⁺-channels expressed in yeast. 22nd Smyte (Small Meeting on Yeast Transport and Genetics) in Ponta Delgada, Azoren, Portugal unterstützt durch ein DFG-Stipendium

Schwarzer, S., Lichtenberg-Fraté, H., Ludwig, J (2003). Analysis of the subcellular localisation of mammalian K⁺-channels expressed in yeast. 21st Smyte (Small Meeting on Yeast Transport and Genetics) in Bonn, Deutschland

Posterbeiträge:

Schwarzer, S., Hasenbrink, G., Lichtenberg-Fraté, H., Ludwig, J (2003). Analysis of the sub-cellular localisation of mammalian K⁺-channels expressed in yeast

- Conference on Yeast genetics in Göteborg, Schweden gefördert von der „European Commission I“
- 4. Transport-Colloquium in Rauischholzhausen, Deutschland
- cellbid (Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie) in Bonn, Deutschland

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht worden ist.

Bonn, 02.05.06

Sarah Schwarzer