

Klaus Hentrich

**BKAP, ein neu entdecktes Protein, das mit dem
C-Terminus des calcium- und spannungsabhängigen
Kaliumkanals der Ratte interagiert**



Cuvillier Verlag Göttingen

**BKAP, ein neu entdecktes Protein, das mit dem C-Terminus
des calcium- und spannungsabhängigen Kaliumkanals
der Ratte interagiert**

Dissertation zu Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Chemie
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Klaus Hentrich
aus Hanau

Bochum 2002

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2003
Zugl.: Bochum, Univ., Diss., 2002
ISBN 3-89873-703-9

Tag der Disputation: 4. Februar 2003

Promotionskommission:

Prof. Dr. C. Wöll (Vorsitz)
Prof. Dr. M. Hollmann (Referent)
Prof. Dr. W. Stühmer (Koreferent)
Prof. Dr. W. Schuhmann (3. Prüfer)

Der überwiegende Teil dieser Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in der Abteilung Molekulare Biologie neuronaler Signale unter der Leitung von Prof. Dr. W. Stühmer angefertigt.

Ein Teil der Ergebnisse wurde am University College London im Wellcome Laboratory for Molecular Pharmacology in der Arbeitsgruppe von Dr. M. Stocker erarbeitet.

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2003
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2003
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-89873-703-9

I	Abkürzungsverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
1.1	Molekulare Diversität der Kaliumkanäle	1
1.2	Der BK-Kanal	3
1.3	Physiologische Funktionen des BK-Kanals	4
1.4	Potentielle Interaktionspartner des BK-Kanals von Säugetieren	5
1.5	Ziel der vorliegenden Arbeit	6
2	Material und Methoden	7
2.1	Material	7
2.1.1	Geräte.....	7
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	8
2.1.3	Kits und Säulenmaterial.....	8
2.1.4	Chemikalien	8
2.1.4.1	Chemikalien und Lösungen	8
2.1.4.2	Oligonukleotide.....	9
2.1.4.3	Längenstandards für DNA.....	9
2.1.4.4	Längenstandards für Protein	10
2.1.5	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	10
2.1.6	Nährmedien und Agarplatten	11
2.1.6.1	<i>E.coli</i>	11
2.1.6.2	<i>S.cerevisiae</i>	11
2.1.6.3	Zellkultur	12
2.1.7	Plasmide.....	12
2.1.8	Enzyme und Proteine.....	13
2.1.9	Antikörper	13
2.1.9.1	Erstantikörper.....	13
2.1.9.2	Zweitantikörper	13
2.1.10	Biologisches Material	14
2.1.10.1	Bakterienstämme	14
2.1.10.2	Hefestamm	14
2.1.10.3	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>).....	14

2.2	Methoden	15
2.2.1	Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von DNA	15
2.2.1.1	Klonierungsmethoden.....	15
2.2.1.1.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	15
2.2.1.1.2	Vektorpräparation	15
2.2.1.1.3	Elektrophoretische Trennung von DNA	16
2.2.1.1.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	16
2.2.1.1.5	Klonierung eines HA-Epitops in den Expressionsvektor pcDNA3	17
2.2.1.2	DNA-Amplifikation in Bakterien.....	17
2.2.1.2.1	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> DH5 α	17
2.2.1.2.2	Ligation	18
2.2.1.2.3	Transformation von <i>E. coli</i>	18
2.2.1.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus Flüssigkulturen.....	19
2.2.1.3	DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	21
2.2.1.4	PCR-Sequenzierung mit fluoreszierenden Terminatoren	22
2.2.2	Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von RNA.....	23
2.2.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus neuronalem Gewebe.....	23
2.2.2.2	cDNA-Erststrangsynthese	23
2.2.2.3	Detektion von immobilisierter RNA (<i>Northern Blot</i>).....	24
2.2.2.3.1	Radioaktive Markierung von DNA	24
2.2.2.3.2	Hybridisierung	24
2.2.3	Basismethoden der Biochemie.....	25
2.2.3.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
2.2.3.2	Coomassie-Färbung	26
2.2.3.3	Transfer und Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (<i>Western Blot</i>).....	26
2.2.3.4	Expression von rekombinanten Proteinen in Bakterien.....	27
2.2.3.4.1	Herstellung kompetenter Bakterien für die Elektroporation	28
2.2.3.4.2	Elektroporation.....	28
2.2.3.4.3	Anzucht von Bakterienkulturen für die Proteingewinnung.....	28
2.2.3.5	Reinigung der rekombinanten Proteine	29
2.2.3.5.1	GST-Fusionsproteine	29
2.2.3.5.2	Proteine mit Hexahistidin- <i>Tag</i>	30

2.2.3.6	Gewinnung polyklonaler Antikörper.....	31
2.2.3.7	Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper.....	31
2.2.3.7.1	Entfernen von GST-Antikörpern.....	31
2.2.3.7.2	Reinigung an immobilisiertem Antigen.....	31
2.2.4	Untersuchung von Proteininteraktionen.....	32
2.2.4.1	Wechselwirkung mit membrangebundenen Proteinen (<i>Filter Overlay</i>).....	32
2.2.4.2	Kosedimentation mit GST-Fusionsproteinen (<i>GST-Pulldown</i>).....	33
2.2.4.2.1	Kosedimentation von in <i>E.coli</i> exprimierten Proteinen.....	33
2.2.4.2.2	Kosedimentation aus Lysaten von Säugetierzellen.....	33
2.2.4.3	Kovalente Kopplung an aktivierte Agarose.....	34
2.2.4.4	Das Zwei-Hybrid-System in Hefe.....	34
2.2.4.4.1	Das verwendete Hefesystem.....	34
2.2.4.4.2	Transformation von Hefe.....	35
2.2.4.4.3	Präparation von Lachssperma-DNA für die Transformation.....	36
2.2.4.4.4	β -Galaktosidasetest.....	36
2.2.5	Experimente mit Säugetierzelllinien in Kultur.....	36
2.2.5.1	Zellkultur.....	37
2.2.5.2	Transiente Transfektion.....	37
2.2.5.3	Lysate für <i>Western</i> - und Interaktionsstudien.....	37
2.2.5.4	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	38
2.2.5.5	Immunfluoreszenz.....	38
2.2.5.5.1	Beschichten von Deckgläsern.....	38
2.2.5.5.2	Nachweis der Proteine.....	38
2.2.6	Biochemische Experimente mit neuronalem Gewebe.....	39
2.2.6.1	Membranpräparation und Extraktion von Membranproteinen.....	39
2.2.6.2	Primärkultur von Hippocampus-Neuronen.....	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Klonierung und Sequenzanalyse des BK-assoziierten Proteins, BKAP ..	41
3.1.1	Identifizierung von BKAP als potentieller Interaktionspartner von BK.....	41
3.1.2	BKAP kommt in mehreren Spleißvarianten im Gehirn der Ratte vor.....	45
3.1.3	BKAP ist zu einem Einzelstrang-DNA bindenden Protein homolog.....	46
3.2	Interaktionsstudien mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System	47
3.2.1	Interaktion von BKAP mit BK im Zwei-Hybrid-System.....	47
3.2.2	Verkürzen von BKAP verhindert die Interaktion mit BK.....	49

3.3	Untersuchungen zur Expression von BKAP in Ratten	51
3.3.1	<i>Northern</i> -Analyse zeigt eine weite Verbreitung des BKAP-Transkriptes in Geweben der Ratte.....	51
3.3.2	BKAP und BK werden in Neuronen des peripheren Nervensystems koexprimiert.....	52
3.3.3	Die Expressionsmuster von BKAP und BK im Gehirn der Ratte stimmen weitgehend überein	54
3.4	Biochemische Studien zur Interaktion von BKAP und BK mit rekombinanten Proteinen.....	56
3.4.1	Versuch des Nachweises der Interaktion zwischen BKAP und BK mit <i>Filter Overlay</i> -Experimenten.....	57
3.4.2	GST-Kosedimentation bestätigt die Interaktion von BKAP mit dem C-Terminus des BK-Kanals.....	58
3.4.3	Die Interaktionsdomäne läßt sich auf die 76 C-terminalen Aminosäuren des BK eingrenzen	60
3.5	Expression und Lokalisierung von BKAP in Säugetierzelllinien	63
3.5.1	<i>Western</i> -Analyse von transient exprimiertem BKAP in COS-7-Zellen	64
3.5.2	BKAP zeigt ein intensives Kernsignal und koloalisiert mit BK an der Plasmamembran von COS7-Zellen.....	66
3.6	Versuch der Kosedimentation des vollständigen, in Säugetierzellen exprimierten BK-Kanals mit BKAP	68
3.6.1	Bedingungen für die Detektion des BK-Kanals im <i>Western Blot</i>	68
3.6.2	Reinigung eines BK-Antiserums	69
3.6.3	Der vollständige BK-Kanal kosedimentierte nicht mit GST-BKAP	72
3.7	Charakterisierung und subzelluläre Lokalisierung des nativen BKAP-Proteins	74
3.7.1	Reinigung und Charakterisierung eines polyklonalen BKAP-Antikörpers	74
3.7.2	Der BKAP-Antikörper erkennt eine spezifische Bande im <i>Western Blot</i> aus dem Gehirn der Ratte.....	75
3.7.3	Der BK-Kanal, nicht aber BKAP, ist in der Membranfraktion aus Rattenhirn detektierbar	77
3.7.4	Der BKAP-Antikörper markiert den Kern von Hippocampus-Neuronen.....	79

3.8	Untersuchungen zum Kerntransport eines BK-Fragments	81
3.8.1	Der intrazelluläre C-Terminus des BK-Kanals enthält ein funktionelles Kerntransportsignal	82
3.8.2	Koexpression von BKAP führt zur Akkumulation des BK-C-Terminus im Kern von Säugetierzellen.....	87
4	Diskussion	90
4.1	Charakterisierung von BKAP	91
4.2	Interaktion von BKAP mit dem BK-Kanal	95
4.3	Hat der C-Terminus des BK-Kanals eine regulatorische Funktion im Zellkern?	101
5	Zusammenfassung	104
6	Literaturverzeichnis	105
II	Anhang	IX
II.I	Oligonukleotide	IX
II.II	Übersicht der verwendeten Konstrukte	XI
II.III	Der Vektor pcDNA3-HA	XII
II.IV	Klonierungen	XII
II.V	Konzentrationen der Erstantikörper	XIV

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro- (10^{-6})
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
<i>as</i>	<i>antisense</i> (Oligonukleotid)
As	Aminosäure(n)
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
bp	Basenpaare
BK	calcium- und spannungsabhängiger Kaliumkanal
BKAP	BK-assoziiertes Protein
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	doppelsträngige Kopie einer mRNA
Ci	Curie ($3,7 \times 10^{10}$ Becquerel)
cpm	<i>counts per minute</i>
C-Terminus	Carboxyterminus eines Proteins
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii, et aliae</i> oder <i>et alia</i>
EtOH	Ethanol
f	femto- (10^{-15})
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

Frag.	Fragment
G	Guanin
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IC ₅₀	Antagonistenkonzentration mit halbmaximaler Wirkung
IF	Immunfluoreszenz
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Broth
m	milli- (10 ⁻³)
M	Molarität
min	Minute
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
n	nano- (10 ⁻⁹)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information, USA</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure
N-Terminus	Aminoterminus eines Proteins
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	offener Leserahmen
p	piko- (10 ⁻¹²)
pBKS ⁺	pBluescript KS ⁺
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Zimmertemperatur
s	Sekunde
s	<i>sense</i> (Oligonukleotid)
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Seq.	Sequenzierung
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris-hydroxymethyl-Aminomethan
Trx	Thioredoxin
u	<i>unit</i> (Einheit für die spezifische Enzymaktivität)
ü.N.	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolettes Licht
X	beliebige Aminosäure (in einem Proteinmotiv)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-galaktopyranosid
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
YTH	<i>yeast two-hybrid</i>

Des Weiteren werden für die Namen der Aminosäuren die etablierten Drei-Buchstaben- und Ein-Buchstaben-Abkürzungen verwendet (Sambrook et al., 1989).

1.2 Der BK-Kanal

Die Klonierung eines BK-Kanals erfolgte zuerst aus *Drosophila* (Atkinson *et al.*, 1991; Adelman *et al.*, 1992); Ausgangspunkt war die Mutante *Slowpoke* (Elkins *et al.*, 1986), daher die häufig anzutreffende Abkürzung *Slo*. In der Folgezeit wurden zu *dSlo* homologe Gene auch in anderen Spezies identifiziert, z.B. der Maus, der Ratte und dem Menschen (Butler *et al.*, 1993; Tseng-Crank *et al.*, 1994; Hülsemann, 1998). Ein BK-Kanal hat bei symmetrischer K^+ -Konzentration eine Leitfähigkeit von ca. 250 pS (Wallner *et al.*, 1999a). Die membranspannende Region S1 - S6 des BK ist zu den spannungsaktivierten Kaliumkanälen homolog; BK verfügt jedoch über eine weitere N-terminale Transmembrandomäne (S0) und einen über 800 Aminosäuren langen intrazellulären C-Terminus, der weitere hydrophobe Segmente (S7 - S10) enthält (Adelman *et al.*, 1992; Butler *et al.*, 1993; Meera *et al.*, 1997). Während an die SK-Kanäle konstitutiv Calmodulin als Ca^{2+} -Sensor gebunden ist (Xia *et al.*, 1998a), wurde beim BK-Kanal ein Sequenzabschnitt im C-Terminus identifiziert, der aufgrund der vielen negativ geladenen Aspartatreste eine potentielle Ca^{2+} -Bindungsstelle darstellt und an der Regulation des Kanals durch Ca^{2+} einen wesentlichen Anteil hat. Die Region wird als „*calcium bowl*“ bezeichnet und befindet sich zwischen S9 und S10 (Schreiber und Salkoff, 1997; Schreiber *et al.*, 1999).

Obwohl nur ein Gen bekannt ist, das für die α -Untereinheit von BK-Kanälen kodiert, wurden native BK-Kanäle mit sehr unterschiedlicher Ca^{2+} -Sensitivität, Kinetik und Sensitivität gegenüber Toxinen beschrieben (Reinhart *et al.*, 1989; McManus, 1991). Ein bedeutsamer Mechanismus, um BK-Kanäle mit variablen Eigenschaften zu erzeugen, ist das alternative Spleißen an mindestens 5 Stellen innerhalb des intrazellulären C-Terminus des BK-Kanals von Säugetieren (Butler *et al.*, 1993; Tseng-Crank *et al.*, 1994; Vogalis *et al.*, 1996; Wallner *et al.*, 1999a). Bei Spleißvarianten wurde eine veränderte apparente Ca^{2+} -Sensitivität (Tseng-Crank *et al.*, 1994) bzw. durch ein cysteinreiches Exon eine erhöhte apparente Ca^{2+} -Sensitivität und eine veränderte Kinetik beobachtet (Saito *et al.*, 1997). Darüber hinaus tragen β -Untereinheiten, Proteine mit zwei Transmembrandomänen und intrazellulären N- und C-Termini, zur Vielfalt nativer BK-Kanäle bei. Die erste β -Untereinheit wurde als Bestandteil des gereinigten BK-Kanals aus der glatten Muskulatur identifiziert und kloniert (Knaus *et al.*, 1994). Diese Untereinheit, die überwiegend in der glatten Muskulatur exprimiert wird, erhöht die Ca^{2+} - und Iberitoxin-Sensitivität und verlangsamt die Kinetik der

Aktivierung und Deaktivierung des BK-Kanals (Dworetzky *et al.*, 1996). Für die Vermittlung des Effekts der β -Untereinheit ist die N-terminale Region des BK-Kanals bis einschließlich S0 erforderlich (Wallner *et al.*, 1996). Koexpression von BK mit einer anderen β -Untereinheit (β_2 ; Wallner *et al.*, 1999b; Xia *et al.*, 1999) führt dazu, daß der Kanal inaktivierend und außerdem sensitiver gegenüber Charybdotoxin wird ($IC_{50}(\alpha) = 1 \text{ nM}$; $IC_{50}(\alpha+\beta_2) = 58 \text{ nM}$; Wallner *et al.*, 1999b). In den Haarzellen des Innenohrs des Huhnes wirken alternatives Spleißen der α -Untereinheit und eine β -Untereinheit zusammen, um BK-Kanäle mit verschiedener Kinetik und Ca^{2+} -Sensitivität zu generieren. Es wird vermutet, daß die unterschiedliche Verteilung von BK-Spleißvarianten und die Variationen im Expressionsniveau der β -Untereinheit in der Cochlea dazu dienen, die elektrischen Eigenschaften der verschiedenen Haarzellen an die Schallfrequenz, die sie verstärken sollen, anzupassen (Navaratnam *et al.*, 1997; Rosenblatt *et al.*, 1997; Ramanathan *et al.*, 1999).

1.3 Physiologische Funktionen des BK-Kanals

Da unter physiologischen Bedingungen gleichzeitig ein depolarisiertes Membranpotential und eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erforderlich sind, um BK zu aktivieren (Marty, 1981), fungiert der Kanal in der Zelle als ein Koinzidenzdetektor. Seine Aktivierung repolarisiert die Plasmamembran, wodurch u.a. der Calciumeinstrom durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (Ca_v -Kanäle) beendet wird, ein Vorgang, der in der Kybernetik als negative Rückkopplung bezeichnet wird (Vergara *et al.*, 1998). Eine Aktivierung von BK-Kanälen durch Ca^{2+} -Kanäle des N-Typs, aber nicht durch solche des L- oder P/Q-Typs, wurde mit *patch clamp*-Messungen an Hippocampus-Neuronen gezeigt (Marrion und Tavalin, 1998). In SCG-Neuronen sind BK-Kanäle hingegen mit Ca^{2+} -Kanälen des L-Typs gekoppelt (Davies *et al.*, 1996). BK-Kanäle tragen zur Repolarisierung nach einem Aktionspotential sowie zum schnellen hyperpolarisierenden Nachpotential (fAHP) bei (Storm, 1987; Sah, 1996). Sie regulieren die Ausschüttung von Neurotransmittern an der neuromuskulären Synapse des Frosches (Robitaille und Charlton, 1992). Aus den Ergebnissen der Immunhistochemie und *in situ*-Hybridisierung wurde abgeleitet, daß im zentralen Nervensystem der Ratte viele BK-Kanäle in den Axonen und Nervenendigungen lokalisiert sind, und es wird vermutet, daß präsynaptische BK-Kanäle im Gehirn ebenfalls an der Regulation der Neurotransmitter-Ausschüttung beteiligt sein könnten (Knaus *et al.*, 1996).