

# I. Abkürzungsverzeichnis I

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Ionenkanäle	1
1.2 Kaliumkanäle Selektive Permeation	2
1.3 Spannungsabhängige Kaliumkanäle Molekulare Vielfalt	4
1.4 Kv Kanäle <i>Gating</i>	8
1.4.1 Aktivierung	8
1.4.2 Inaktivierung	10
1.5 Kv Kanäle Physiologische und Pathologische Bedeutung	11
1.6 Ca <sup>2+</sup> -abhängige Kaliumkanäle	13
1.7 SK Kanäle Molekulare Vielfalt	13
1.8 SK Kanäle <i>Gating</i>	13
1.8.1 Aktivierung	13
1.9 SK Kanäle Physiologische und Pathologische Bedeutung	15
1.10 Zielsetzung der Arbeit	17

<b>2. Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1 Material	19
2.1.1 Geräte	19
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3 Kits und Säulenmaterial	20
2.1.4 Chemikalien	21
2.1.4.1 Chemikalien zur Analyse	21
2.1.4.2 Oligonukleotide	22
2.1.4.3 Radiochemikalien	22
2.1.5 Puffer und Lösungen	22
2.1.6 Nährmedien und Platten	26
2.1.6.1 Nährmedien	26
2.1.6.2 Platten	26
2.1.7 Plasmide	26
2.1.8 Enzyme	27
2.1.9 Bakterienstämme	27
2.1.10 Frösche	27
2.2 Methoden	28
2.2.1 Klonierung von DNA in Plasmide	28
2.2.1.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	28
2.2.1.2 Vektorpräparation	28
2.2.1.3 Gelelektrophorese von DNA	28
2.2.1.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	29
2.2.1.5 Ligation	29
2.2.2 DNA-Amplifikation	30
2.2.2.1 DNA-Amplifikation in Bakterien	30
2.2.2.2 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion	31
2.2.3 <i>In-vitro</i> -Mutagenese	32
2.2.3.1 Fusion unabhängiger Gene durch „Spleißen überlappender Enden“	32
2.2.3.2 De-novo-DNA-Synthese mit Oligonukleotiden	33
2.2.4 DNA-Sequenzierung	34
2.2.5 Konstruktion der Plasmide zur Expression in <i>Xenopus</i> -Oozyten	34
2.2.6 Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente /YTH	37
2.2.7 cRNA-Synthese	37
2.2.8 Elektrophysiologie	38
2.2.8.1 Präparation der Oozyten	38
2.2.8.2 Mikroinjektion der Oozyten	38
2.2.8.3 Elektrophysiologische Messmethoden	39
2.2.8.4 Messstand und Verstärker	40
2.2.8.5 Glaspipetten und Elektroden	41
2.2.8.6 Datenaufzeichnung, Korrekturen und Pulsprotokolle	41

2.2.8.7	Datenanalyse	45
2.2.9.	5' RACE ( <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i> )	47
2.2.10	RNase-Schutzexperimente ( <i>RNase Protection Assay</i> , RPA)	48
2.2.10.1	Herstellung der RNA-Sonden	48
2.2.10.2	Polyacrylamidgele	49
2.2.10.3	Hybridisierung	49
2.2.10.4	RNase-Verdau	49
2.2.11	Herstellung der RPA-Konstrukte	50
2.2.12	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Marker	52
2.2.13	<i>In-situ</i> -Hybridisierung	53
2.2.14	Arbeiten mit $\zeta$ -Phagen	53
2.2.14.1	genomische $\zeta$ -Phagen-Bibliothek	53
2.2.14.2	Titerbestimmung der $\zeta$ -Phagen-Bibliothek	53
2.2.14.3	Ausplattieren der $\zeta$ -Phagen-Bibliothek	54
2.2.14.4	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	54
2.2.14.5	Hybridisierung und Waschen der Filterabzüge	55
2.2.14.6	Vereinzelung der Phagen	55
2.2.14.7	Präparation von DNA aus vereinzelt Phagen	55
2.2.15	<i>Southern Blot</i>	56
2.2.15.1	Transfer enzymatisch gespaltener DNA auf Nylonmembranen	56
2.2.15.2	Hybridisierung von <i>Southern-Blot</i> -Membranen	56

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	58
3.1	Isolierung von rKv9.1 und rKv9.3	58
3.2.	Genstruktur von rKv9.1 und rKv9.3	63
3.3	Gewebeverteilung der Transkripte von rKv9.1 und rKv9.3	67
3.4	Chimäre Kv- Untereinheiten	68
3.5	Der Spannungssensor von Kv9.3	70
3.6	Regulierende Funktion von Kv9.1 und Kv9.3	72
3.7	Modulatorische Untereinheiten und Kv2.1 interagieren über die T1-Domäne	75
3.8	Modulatorische Untereinheiten und Kv3.4 interagieren über die Transmembransegmente	77
3.9	Kv2.1/Kv9.3 Aktivierung und Deaktivierung	79
3.10	Kv2.1/Kv9.3 Inaktivierung	79
3.11	Kv2.1/Kv9.3 Erholung von der Inaktivierung	82
3.12	Kv2.1/Kv9.3 Kumulative Inaktivierung	85
3.13	Kv2.1 Pharmakologie der Inaktivierung	85
3.14	Kv2.1 Konformation inaktivierter Kanäle	87
3.15	NRD und die regulierende Funktion von Kv9.3	89
3.16	S6 und die regulierende Funktion von Kv9.3	90
3.17	Kv2.1-P410T Pharmakologie der Inaktivierung	93
3.18	Heteromere Kv2.1/Kv2.1-P410T-Kanäle	93
3.19	PXP und der Verlust der Funktion von Kv9.3	96
3.20	5'-RACE für rSK2	97
3.21	Genstruktur von rSK2	98
3.22	Alternative Transkripte von rSK2	100
3.23	Verteilung der alternativen Transkripte von SK2 im ZNS	108

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	109
4.1	Modulatorische Untereinheiten	109
4.2	Genstruktur der modulatorischen Untereinheiten	110
4.3	Gewebeverteilung der Transkripte modulatorischer Untereinheiten	111
4.4	Porenregion der modulatorischen Untereinheiten	113
4.5	Spannungssensor der modulatorischen Untereinheiten	114
4.6	T1-Domäne der modulatorischen Untereinheiten	114
4.7	Regulation von Kv2.1 durch modulatorische Untereinheiten	115
4.8	Kv2.1 Inaktivierung	116
4.9	Modulatorische Untereinheiten Inaktivierung	118
4.10	Strukturelle Grundlagen der Funktion modulatorischer Untereinheiten	119
4.11	Der Inaktivierungsmechanismus Eine Analyse	121
4.12	Kv2.1/Kv9.3 Physiologische Implikationen	122

4.13	SK-Kanäle.....	124
4.14	Alternative SK- -Untereinheiten.....	124
4.15	Transkriptionsregulation von SK2.....	127
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>129</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>132</b>
<b>7.</b>	<b>Eigene Publikationen zum Dissertationsthema.....</b>	<b>143</b>
<b>II.</b>	<b>Anhang</b>	<b>V</b>
II.I	Oligonukleotide	V
II.II	Sequenz des 3,4 kb Fragments des Phagen 19-20I (SK2)	VII
<b>III.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>XI</b>