

I. Abkürzungsverzeichnis I

| | |
|--|----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 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 ²⁺ -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 |

| | |
|---|-----------|
| 2. Material und Methoden | 19 |
| 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 ζ -Phagen | 53 |
| 2.2.14.1 | genomische ζ -Phagen-Bibliothek | 53 |
| 2.2.14.2 | Titerbestimmung der ζ -Phagen-Bibliothek | 53 |
| 2.2.14.3 | Ausplattieren der ζ -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 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 3. | Ergebnisse | 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 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| 4. | Diskussion | 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 |
| 5. | Zusammenfassung..... | 129 |
| 6. | Literaturverzeichnis..... | 132 |
| 7. | Eigene Publikationen zum Dissertationsthema..... | 143 |
| II. | Anhang | V |
| II.I | Oligonukleotide | V |
| II.II | Sequenz des 3,4 kb Fragments des Phagen 19-20I (SK2) | VII |
| III. | Abbildungsverzeichnis | XI |