

<b>I. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Molekulare Diversität der Kaliumkanäle	1
1.2 Spannungsabhängige Kaliumkanäle	2
1.3 Strukturmerkmale spannungsabhängiger Kaliumkanäle	4
1.4 Die EAG-Kaliumkanäle	6
1.5 Die EAG-Kanäle des Menschen	8
1.6 Kaliumkanäle - Zellzyklus und Proliferation	9
1.7 Ionenkanal-Erkrankungen	10
1.8 Onkogenes Potential von Kaliumkanälen	11
1.9 Genregulation und Krebs	12
1.10 Ziele der Arbeit	13
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1 Material	14
2.1.1 Geräte	14
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	15
2.1.3 Kits und Säulenmaterial	15
2.1.4 Chemikalien	16
2.1.4.1 Chemikalien und Lösungen	16
2.1.4.2 Oligonukleotide	17
2.1.4.3 Radiochemikalien	17
2.1.4.4 Längenstandard für DNA	17
2.1.4.5 Längenstandard für RNA	18
2.1.5 Puffer und Lösungen	18
2.1.6 Nährmedien und Agarplatten	22
2.1.6.1 Medien	22
2.1.6.2 Agarplatten	22
2.1.7 Plasmide	22
2.1.8 Enzyme und Proteine	23
2.1.9 Biologisches Material	23
2.1.9.1 Bakterienstämme	23
2.1.9.2 Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> )	24
2.1.9.3 Zelllinien	24

<b>2.2 Methoden</b>	<b>25</b>
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	25
2.2.1.1 Durchführung von Klonierungen	25
2.2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden	26
2.2.2.1 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien	26
2.2.2.2 Herstellung elektro-kompetenter Bakterien	26
2.2.2.3 Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	27
2.2.2.4 Transformation elektro-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	27
2.2.2.5 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA-Lösungen	27
2.2.2.6 Ethanol-Präzipitation von DNA	28
2.2.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus Flüssigkulturen	28
2.2.3 Modifikation von DNA	29
2.2.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	29
2.2.3.2 Vektorpräparation	29
2.2.3.3 Auffüllen von Einzelstrangüberhängen	30
2.2.3.4 Phosphorylierung	30
2.2.3.5 Ligation	30
2.2.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese	31
2.2.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	31
2.2.6 DNA-Amplifikation mit der Polymerase-Kettenreaktion-PCR	32
2.2.7 PCR-Sequenzierung mit fluoreszierenden Terminatoren	33
2.2.8 RACE (Rapid amplification of cDNA ends)	33
2.2.8.1 5'-RACE mit dem CapSite 5'-terminus cDNA Kit	34
2.2.8.2 5'-RACE mit dem SMART RACE cDNA Amplification Kit	35
2.2.8.3 5'-RACE mit dem Marathon cDNA Amplification Kit	37
2.2.8.4 Inverse Einzelstrang-5'-RACE	38
2.2.9 Amplifikation genomischer Sequenzen mit dem GenomeWalker Kit	40
2.2.10 Durchmusterung einer Cosmid-Bibliothek	41
2.2.10.1 Cosmid-Bibliothek	41
2.2.10.2 Radioaktive Markierung von Sonde und Vektor für die Durchmusterung	41
2.2.10.3 Hybridisierungs- und Waschbedingungen der Cosmid- Filter	42
2.2.10.4 Transfer von DNA auf Nitrozellulose-Membranen (" <i>Southern Blotting</i> ")	42
2.2.10.5 Autoradiografie	42
2.2.11 Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von RNA	43
2.2.11.1 Isolierung von polyA <sup>+</sup> -RNA aus Zelllinien	43
2.2.11.2 Konzentrationsbestimmung von RNA	44
2.2.11.3 RNA-Agarose-Gelelektrophorese	44
2.2.11.4 cDNA-Erststrangsynthese	44

2.2.11.5	<i>Herstellung einer radioaktiv markierten DNA-Sonde</i>	45
2.2.11.6	<i>Transfer von RNA auf Nylon-Membranen ("Northern-Blotting") und Hybridisierung mit einer DNA-Sonde</i>	45
2.2.12	<i>RNA-Interferenz (RNAi)</i>	46
2.2.12.1	<i>siRNAs als Vermittler der RNA-Interferenz</i>	46
2.2.12.2	<i>Auswahl der siRNA-Sequenzen</i>	47
2.2.12.3	<i>Präparation der siRNA-Duplices</i>	48
2.2.12.4	<i>Klonierung des pSuppressorNeo-Vektors</i>	49
2.2.12.4.1	<i>Präparation des Vektors und des zu insertierenden DNA-Fragmentes</i>	49
2.2.12.4.2	<i>Design des Oligonukleotid-Inserts</i>	49
2.2.12.4.3	<i>Hybridisierung des Oligonukleotid-Inserts</i>	50
2.2.12.4.4	<i>Ligation von Vektor und Insert</i>	50
2.2.13	<i>Zellbiologische Methoden</i>	51
2.2.13.1	<i>Beschichtung von Deckgläsern mit Poly-L-Lysin</i>	51
2.2.13.2	<i>Zellkultur von Säugerzellen</i>	51
2.2.13.3	<i>Primärkultur von Glia-Zellen (Astrozyten)</i>	52
2.2.13.4	<i>Umsetzen von Gliazellen</i>	52
2.2.13.5	<i>Kryokonservierung</i>	53
2.2.13.6	<i>Transiente und stabile Transfektion von Zellen</i>	53
2.2.13.6.1	<i>Transiente Transfektion von Gewebekulturzellen</i>	53
2.2.13.6.2	<i>Stabile Transfektion von Gewebekulturzellen</i>	53
2.2.13.6.3	<i>Transiente Transfektionen von Gliazellen mit antisense-Oligodesoxynukleotiden (aODNs)</i>	54
2.2.13.6.4	<i>Transiente Transfektionen mit siRNA-Duplices</i>	55
2.2.13.6.5	<i>Stabile Transfektion mit siRNA-exprimierenden Vektoren</i>	56
2.2.13.6.6	<i>WST-1 Assay</i>	56
2.2.13.6.7	<i>Tranferrin-Assay</i>	57
2.2.14	<i>Bildbearbeitung</i>	58
<b>3.</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b>	<b>59</b>
3.1	<b><i>Genetische Charakterisierung von hEAG1</i></b>	<b>59</b>
3.1.1	<i>5'-RACE zur Amplifikation des 5'-UTR-Bereiches</i>	59
3.1.2	<i>Verwendung anderer RACE-Techniken</i>	61
3.1.3	<i>Verwendung des GenomeWalker Kits</i>	61
3.1.4	<i>Durchmusterung einer Cosmid-Bibliothek</i>	62
3.1.4.1	<i>Identifikation EAG-spezifischer Klone</i>	62
3.1.4.2	<i>Überprüfung der Klone</i>	63

3.1.5	<i>Genomische Organisation von heag1</i>	64
3.1.6	<i>Das heag1-Transkript in Tumorzellen</i>	65
<b>3.2</b>	<b>Endozytose</b>	67
3.2.1	<i>EAG beeinflusst die clathrin-vermittelte Endozytose</i>	67
<b>3.3</b>	<b>RNA-Interferenz (RNAi)</b>	69
3.3.1	<i>Transiente Transfektionen</i>	69
3.3.1.1	<i>Die hEAG1-Expression kann im heterologen System durch verschiedene siRNAs reguliert werden</i>	69
3.3.1.2	<i>siRNAs regulieren das Wachstum von hEAG1-exprimierenden Tumorzellen</i>	74
3.3.2	<i>Stabile Transfektionen</i>	80
3.3.2.1	<i>Stabil exprimierte siRNAs reduzieren das Wachstum von hEAG1-exprimierenden Tumorzellen</i>	80
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	84
4.1	<i>Ionenkanäle - Physiologie und Pathologie</i>	84
4.2	<i>Fehlregulation - hEAG1 und Krebs</i>	85
4.3	<i>hEAG1 und Epsin - Partner in der Endozytose?</i>	88
4.4	<i>RNAi - Eindämmung der onkogenen Wirkung von hEAG1</i>	89
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	95
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	97
<b>II.</b>	<b>Anhang</b>	VIII
II.I	<i>Verwendete Oligonukleotide (Sequenzierung, PCR, RACE)</i>	VIII
II.II	<i>Primer und Adapter der RACE-Kits</i>	IX
II.III	<i>Primer und Adapter des GenomeWalker-Kits</i>	X
II.IV	<i>Sequenzen der siRNAs</i>	X
II.V	<i>dsRNAs im pSuppressorNeo-Vektor</i>	X
II.VI	<i>Sequenzen der verwendeten Sonden</i>	XI
II.VII	<i>Exon-Intron-Übergänge des heag1a-Gens</i>	XII