



Marco Gymnopoulos (Autor)  
**Die mRNA-Verteilung von Ca<sup>2+</sup>- abhängigen  
Kaliumkanälen (SK) in der Entwicklung des  
Nervensystems der Ratte**

Marco Gymnopoulos

---

**Die mRNA-Verteilung von Ca<sup>2+</sup>-abhängigen  
Kaliumkanälen (SK) in der Entwicklung  
des Nervensystems der Ratte**

---



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3491>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,  
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

<b>I</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Spannungsabhängige <math>\text{Ca}^{2+}</math>-unabhängige Kaliumströme</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Calciumabhängige Kaliumströme</b>	<b>2</b>
<b>1.3</b>	<b>Molekulare Diversität der Kaliumkanäle</b>	<b>4</b>
<b>1.4</b>	<b>Calciumabhängige Kaliumkanäle</b>	<b>4</b>
<b>1.5</b>	<b>Die Rolle des <math>\text{Ca}^{2+}</math>-Gleichgewichts in der Entwicklung des Gehirns</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>10</b>
2.1.1	Geräte	10
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	10
2.1.3	Kits und Säulenmaterial	11
2.1.4	Chemikalien	12
2.1.4.1	Chemikalien zur Analyse	12
2.1.4.2	Oligonukleotide	12
2.1.4.3	Radiochemikalien	13
2.1.4.4	Längenstandards für DNA	13
2.1.4.5	Längenstandards für RNA	13
2.1.5	Puffer und Lösungen	13
2.1.6	Nährmedien und Agarplatten	16
2.1.6.1	Medien	16
2.1.6.2	Agarplatten	16
2.1.7	Plasmide	17
2.1.8	Enzyme und Proteine	17
2.1.9	Biologisches Material	18
2.1.9.1	Bakterienstämme	18
2.1.9.2	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> )	18
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>19</b>
2.2.1	Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von DNA-Fragmenten	19
2.2.1.1	Klonierungsmethoden	19
2.2.1.1.1	Spaltung von DNA mit Restriktionendonukleasen	19
2.2.1.1.2	Vektorpräparation	19
2.2.1.1.3	Gelelektrophoretische Trennung von DNA	19
2.2.1.1.4	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	20
2.2.1.2	DNA-Amplifikation in Bakterien	20
2.2.1.2.2	Ligation	20

2.2.1.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus Flüssigkulturen	21
2.2.1.3	PCR-Sequenzierung mit fluoreszierenden Terminatoren	22
2.2.1.4	DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
2.2.1.5	RACE (Rapid amplification of cDNA ends)	23
2.2.1.5.1	5'-RACE	23
2.2.1.5.2	3'-RACE	24
2.2.1.6	$\lambda$ -Phagen	24
2.2.1.6.1	cDNA- $\lambda$ -Phagen Bibliotheken	24
2.2.1.6.2	Titerbestimmung der Phagenbibliotheken	24
2.2.1.6.3	Ausplattieren von $\lambda$ -Phagen Bibliotheken und Herstellung von Filterabzügen	25
2.2.1.6.4	Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Sonden	25
2.2.1.6.5	Hybridisierung- und Waschbedingungen	26
2.2.1.6.6	Autoradiografie	26
2.2.1.6.7	Vereinzelung der $\lambda$ -Phagen	26
2.2.1.6.8	<i>In vivo</i> Excision von pBluescript SK(-) Phagemid Vektoren	27
2.2.2	Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von RNA	27
2.2.2.1	Gewebepräparation für RNA-Experimente	28
2.2.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA	28
2.2.2.3	Isolierung von polyA <sup>+</sup> -RNA aus Geweben	28
2.2.2.4	RNA-Quantifizierung	29
2.2.2.5	Elektrophorese von RNA in Agarosegelen	29
2.2.2.6	cDNA-Erststrangsynthese	30
2.2.2.7	<i>In vitro</i> Transkription	30
2.2.2.8	Transfer von RNA auf Nylon-Membranen („Northern-Blotting“) und Hybridisierung an immobilisierter RNA	31
2.2.3	<i>In situ</i> Hybridisierung mit Oligonukleotiden	31
2.2.3.1	Silanisierung der Objektträger	31
2.2.3.2	Gewebepräparation und Kryostatschnitte	31
2.2.3.3	Radioaktive Polyadenylierung von Oligonukleotiden	32
2.2.3.4	Hybridisierung	32
2.2.3.5	Exposition in Photoemulsion und Entwicklung	33
2.2.3.6	Gegenfärbung nach Nissl	33
2.2.4	Bildbearbeitung	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Isolierung und Charakterisierung von cDNAs der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen K<sup>+</sup>-Kanäle mit geringer Leitfähigkeit (SK)</b>	<b>34</b>
3.3.1	Isolierung von SK cDNA-Klonen aus cDNA- $\lambda$ -Phagen-Bibliotheken	34
3.1.2	Charakterisierung ausgewählter SK-cDNAs	34

3.1.2.1	Die SK1-Kanaluntereinheit der Ratte	35
3.1.2.2	Charakterisierung von rSK1-Varianten	39
3.1.2.3	Die SK2-Kanaluntereinheit der Ratte	41
3.1.2.4	Die SK3-Kanaluntereinheit der Ratte	44
<b>3.2</b>	<b>Untersuchung zur Expression der isolierten SK-Kanaluntereinheiten in Ratten</b>	<b>46</b>
3.2.1	Aufklärung der gewebespezifischen Transkription der rSK2-Kanaluntereinheit mittels Northern-Blot-Analyse	46
3.2.2	Untersuchung der entwicklungsspezifischen Expression der rSK-Kanaluntereinheiten in pränatalen Rattenhirnen mittels Northern-Blot-Analysen	48
3.2.3	Untersuchung der entwicklungsspezifischen Expression in postnatalen Stadien des Rattenhirns mittels Northern-Blot-Analysen	50
<b>3.3</b>	<b>Analyse der Verteilung von rSK-Transkripten im Gehirn der Ratte durch <i>in situ</i> Hybridisierung</b>	<b>52</b>
3.3.1	Analyse der Expressionsmuster von rSK-Kanaluntereinheiten in pränatalen Stadien des Rattenhirns	52
3.3.1.1	Übersichten der pränatalen Expressionsmuster der rSK2-Untereinheiten in sagittalen Gewebeschnitten	52
3.3.1.2	Analyse der embryonalen Expression der rSK-Untereinheiten auf zellulärer Ebene	56
3.3.1.2.1	rSK-Expression im Vorderhirn (Striatum, Cortex, Hippocampus)	56
3.3.1.2.2	Expression der rSK-Untereinheiten im Ganglion trigeminale	60
3.3.1.2.3	Expressionsmuster der rSK-Untereinheiten im Ganglion inferius	61
3.3.1.2.4	SK-Transkripte im Cerebellum des pränatalen Rattenhirns	62
3.3.1.2.5	Expressionsmuster der rSK-Untereinheiten im Rückenmark	64
3.3.1.2.6	Expression des rSK2 und rSK3 in nicht-neuralem Gewebe	65
3.3.2	Analyse der Expressionsmuster von rSK-Kanaluntereinheiten in postnatalen Stadien des Rattenhirns	66
3.3.2.1	Übersichten der rSK-Expressionsmuster in sagittalen und horizontalen Gewebeschnitten	66
3.3.2.1.1	Die rSK1-Kanaluntereinheit	66
3.3.2.1.2	Die rSK2-Kanaluntereinheit	68
3.3.2.1.3	Die rSK3-Kanaluntereinheit	70
3.3.2.2	Analyse der postnatalen Transkription der rSK-Untereinheiten auf zellulärer Ebene	72
3.3.2.2.1	Der olfaktorische Bulbus	72
3.3.2.2.2	Der Cortex	73
3.3.2.2.3	Der Hippocampus	75

---

3.3.2.2.4	Der Thalamus	77
3.3.2.2.5	Die Habenula	78
3.3.2.2.6	Die Substantia nigra	78
3.3.2.2.7	Area tegmentalis ventralis	80
3.3.2.2.8	Der Locus coeruleus	81
3.3.2.2.9	Die inferiore Olive	82
3.3.2.2.10	Der cochleare Nukleus	82
3.3.2.2.11	Das Cerebellum	83
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>87</b>
<b>4.1</b>	<b>Molekulare Charakterisierung der isolierten SK-cDNA-Sequenzen</b>	<b>87</b>
<b>4.2</b>	<b>Entwicklungsspezifische Expression der SK-Kanaluntereinheiten</b>	<b>89</b>
<b>4.3</b>	<b>Korrelation zwischen SK-Transkripten und AHP-Strömen</b>	<b>92</b>
<b>4.4</b>	<b>Physiologische Rolle der SK-Kanäle in der Entwicklung des Rattengehirns</b>	<b>95</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>99</b>
<b>II</b>	<b>Anhang</b>	<b>VIII</b>
II.I	Oligonukleotide zur Sequenzierung und für PCR	VIII
II.II	Oligonukleotide der Marathon-RACE	VIII
II.III	Oligonukleotide der Amplifinder 3'-RACE	VIII
II.IV	Oligonukleotidsonden für die in situ Hybridisierung	IX
II.V	Isolierte cDNA-Klone aus den $\lambda$ -Phagenbibliotheken	IX
II.VI	Quantifizierungen der in situ Hybridisierungssignale (postnatal)	XI
II.VI.I	rSK1	XI
II.VI.II	rSK2	XIII
II.VI.III	rSK3	XVI
II.VII	Quantifizierungen der in situ Hybridisierungssignale (pränatal)	XVIII
II.VII.I	rSK1	XVIII
II.VII.II	rSK2	XIX
II.VII.III	rSK3	XX