

1 EINLEITUNG	3
1.1 BIOLOGISCHE MEMBRANEN UND ZELLULÄRER IONENTRANSPORT.....	3
1.2 IONENKANÄLE.....	4
1.3 SPANNUNGSABHÄNGIGE KATIONENKANÄLE.....	5
1.3.1 <i>Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle der Kv-Superfamilie</i>	6
1.3.1.1 Struktur.....	6
1.3.1.2 Die KCNQ-Kanalfamilie.....	8
1.3.1.3 KCNQ2 und KCNQ3.....	9
1.4 CHLORIDKANÄLE.....	12
1.4.1 <i>Die spannungsabhängigen Chloridkanäle der CLC-Familie</i>	12
1.4.1.1 Die erste Unterfamilie.....	14
1.4.1.2 Die zweite Unterfamilie.....	16
1.4.1.3 Die dritte Unterfamilie.....	17
1.4.1.4 CIC-5.....	18
1.5 ENDOZYTOTOSE.....	21
1.5.1 <i>Mechanismen der rezeptorvermittelten Endozytose</i>	21
1.5.2 <i>Endozytosemotive</i>	24
1.6 AUFGABENSTELLUNG.....	27
2 MATERIAL	29
2.1 CHEMIKALIEN UND ENZYME.....	29
2.2 FILMMATERIALIEN UND BILDGEBENDE VERFAHREN.....	29
2.3 PUFFER UND LÖSUNGEN.....	29
2.4 BAKTERIENKULTUR.....	31
2.4.1 <i>Bakterienstämme</i>	31
2.4.2 <i>Medien</i>	32
2.5 PLASMIDVEKTOREN.....	32
2.6 EUKARYONTISCHE KULTURZELLEN.....	33
2.7 ZELLKULTURMEDIENTEN UND LÖSUNGEN ZUR ARBEIT MIT EUKARYONTISCHEN ZELLEN.....	33
3 METHODEN	34
3.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	34
3.1.1 <i>Handhabung von Bakterienstämmen</i>	34
3.1.1.1 Kultivierung von Bakterienstämmen.....	34
3.1.1.2 Präparation transformationskompetenter Bakterien.....	34
3.1.1.3 Transformation von Bakterien.....	34
3.1.2 <i>Präparation von DNA</i>	35
3.1.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus 2ml-Kulturen (Miniprep).....	35
3.1.2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus 50ml-Kulturen (Midiprep).....	35
3.1.2.3 Ethanol-fällung von Nucleinsäuren.....	35
3.1.3 <i>Enzymatische Modifikationen von DNA</i>	36
3.1.3.1 Restriktionsverdau von DNA.....	36
3.1.3.2 Auffüllreaktion überhängender 5'-Enden.....	36
3.1.3.3 Phosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	37
3.1.3.4 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	37
3.1.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten.....	37
3.1.4 <i>RNA-Herstellung durch in vitro-Transkription</i>	37
3.1.5 <i>Agarosegelelektrophorese von Nucleinsäuren</i>	38
3.1.5.1 Gelelektrophorese von DNA.....	38
3.1.5.2 Nicht-denaturierende Gelelektrophorese von RNA.....	38
3.1.6 <i>Isolierung von DNA aus Agarosegelen</i>	38
3.1.7 <i>Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren durch Extinktionsmessung</i>	39
3.1.8 <i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	39
3.1.8.1 Standard PCR.....	39
3.1.8.2 PCR aus Einzelkolonien.....	40
3.1.8.3 Einführung von Punktmutanten durch zweifach rekombinante PCR.....	41
3.1.8.4 Erzeugung von Proteinfusionen und chimären Proteinen durch rekombinante PCR.....	42
3.1.9 <i>Sequenzierung von DNA</i>	43
3.1.10 <i>Northern-Blot Analyse</i>	43
3.1.10.1 Herstellung von DEPC-behandeltem Wasser.....	43
3.1.10.2 Extraktion von RNA aus Geweben und Zellkulturzellen.....	43
3.1.10.3 Denaturierende Agarosegelelektrophorese und Kapillarblotten von RNA.....	44

3.1.10.4 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten.....	44
3.1.10.5 Hybridisierung von DNA-Sonden.....	45
3.2 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	45
3.2.1 Membranpräparation von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	45
3.2.2 Herstellung von Homogenaten aus Zellkulturzellen.....	45
3.2.3 Proteinbestimmung.....	46
3.2.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	46
3.2.5 Western-Blot Analyse.....	46
3.2.6 Immunpräzipitation von Proteinen.....	47
3.3 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	48
3.3.1 Gewebezellkultur.....	48
3.3.1.1 Kultivierung von Zellkulturzellen.....	48
3.3.1.2 Trypsinieren von Zellkulturzellen.....	48
3.3.1.3 Einfrieren von Zellkulturzellen.....	48
3.3.1.4 Revitalisierung von Zellkulturzellen.....	49
3.3.1.5 Transiente Transfektion von Zellkulturzellen.....	49
3.3.1.6 Stabile Transfektion und Selektion der stabil transfizierten Zellklone.....	49
3.3.1.7 Indirekte Immunfluoreszenz an Zellkulturzellen.....	50
3.3.1.8 Metabolische Markierung von Zellkulturzellen mit ³⁵ S-Methionin.....	50
3.3.2 Kultivierung von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	51
3.3.2.1 Präparation von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	51
3.3.2.2 Mikroinjektion von cRNA.....	51
3.3.3 Quantifizierung der Oberflächenexpression von Proteinen.....	52
3.4 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE METHODEN.....	52
3.4.1 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme.....	52
3.4.2 Einzelkanalaufnahmen an <i>Xenopus</i> Oozyten mittels der Patch-clamp Methode.....	54
3.4.3 Nicht-stationäre Rauschanalyse.....	54
3.4.4 Bestimmung von Halbwertszeiten mittels Brefeldin A.....	56
3.5 COMPUTERGESTÜTZTE SEQUENZANALYSEN.....	56
4 ERGEBNISSE.....	57
4.1 UNTERSUCHUNGEN AN DEN KALIUMKANALPROTEINEN KCNQ2 UND KCNQ3.....	57
4.1.1 Messung der Einzelkanalleitfähigkeit und Offenwahrscheinlichkeit mittels nicht-stationärer Rauschanalyse.....	57
4.1.2 Bestimmung der Einzelkanalleitfähigkeiten durch Einzelkanalmessungen.....	60
4.1.3 Messung der Oberflächenexpression.....	62
4.2 UNTERSUCHUNGEN AN DEM CHLORIDIONENKANAL CLC-5.....	71
4.2.1 Mutationsanalyse eines PY Motivs im zytoplasmatischen C-Terminus von CLC-5.....	71
4.2.2 Messung der Oberflächenexpression.....	73
4.2.3 Bestimmung der Halbwertszeit von CLC-5 an der Zelloberfläche.....	77
4.2.4 Bestimmung der Halbwertszeit durch pulse-chase Experimente.....	79
4.2.5 Koexpressionsstudien mit Dynamin.....	82
4.2.6 Koexpressionsstudien mit rab5.....	83
4.2.7 Koexpressionsstudien mit WWP2.....	85
4.2.8 Identifizierung eines weiteren Internalisierungsmotivs.....	88
4.2.9 Elektrophysiologische Analyse neu identifizierter CLC-5 Mutationen, die die Dent'sche Krankheit verursachen.....	91
5 DISKUSSION.....	93
5.1 DISKUSSION DER ERGEBNISSE ZU DEN UNTERSUCHUNGEN AN KCNQ2 UND KCNQ3.....	94
5.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE ZU DEN UNTERSUCHUNGEN AN CLC-5.....	99
5.3 AUSBLICK.....	107
6 ABKÜRZUNGEN.....	109
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	111
8 ANHANG.....	123
8.1 ZUSAMMENFASSUNG.....	123
8.2 ABSTRACT.....	125