

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis	I
	Abkürzungsverzeichnis	III
1	Einleitung	1
1.1	Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit	7
2	Material und Methoden	8
2.1	Material	8
2.2	Bakterien und Plasmide	8
2.3	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	9
2.4	Präparation von Hühnerretinen und Außensegmenten von Sehzellen	9
2.5	Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden	9
2.6	Quantifizierung von Nukleinsäuren	10
2.6.1	Photometrische Bestimmung	10
2.6.2	Ethidiumbromid-Fluoreszenz	10
2.7	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	10
2.7.1	Alkalische Mini-Präparation	10
2.7.2	Alkalische Midi- und Maxi-Präparation	11
2.7.3	Präparation von einzelsträngiger M13-DNA	11
2.8	Modifikation von Nukleinsäuren	11
2.8.1	Glätten überhängender Enden von DNA-Fragmenten	11
2.8.2	Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten	12
2.8.3	Dephosphorylierung geschnittener Vektoren	12
2.9	Analyse von DNA	12
2.9.1	Restriktion von DNA	12
2.9.2	DNA-Sequenzierung	12
2.9.3	Gelelektrophorese	13
2.10	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	13
2.11	Klonierung von DNA-Fragmenten	14
2.11.1	Ligation	14
2.11.2	Transformation	14
2.11.3	Subklonierung von cDNA aus λ -Phagen	15
2.12	Präparation von RNA	15
2.12.1	Präparation von Gesamt-RNA	15
2.12.2	Anreicherung von polyadenylierter RNA	16

2.13	Konstruktion von cDNA-Bibliotheken	16
2.14	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	18
2.15	Amplifikation von 5'-cDNA-Enden (5'-RACE)	18
2.16	Markierung von Nukleinsäuren	19
2.17	Nachweis spezifischer Nukleinsäuren	20
2.17.1	Transfer von Nukleinsäuren	20
2.17.2	Hybridisierung	20
2.17.3	Detektion markierter Nukleinsäuren	20
2.18	<i>In vitro</i> Transkription von cRNA	21
2.19	Expression und Reinigung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen	22
2.20	Herstellung von polyklonalen Antikörpern	22
2.21	Reinigung von polyklonalen Antikörpern	23
2.22	Gelelektrophorese und Transfer von Proteinen	23
2.23	Immunologischer Nachweis von geblotteten Proteinen	24
2.24	Immunhistochemische Lokalisierung von Proteinen	24
2.25	Elektrophysiologie	25
3	Ergebnisse	27
3.1	Klonierung der cGMP-gesteuerten Kationenkanäle aus Sebstäbchen und -zapfen der Retina des Haushuhns (<i>Gallus gallus gallus L.</i>)	27
3.1.1	Isolierung von cDNA-Molekülen	27
3.1.2	Konstruktion des Plasmids pCCG6, das die vollständige cDNA CCG6 enthält	35
3.1.3	Konstruktion des Plasmids pCCG8B, das die vollständige cDNA CCG8B enthält	36
3.2	Die Primärstruktur des Hühnersehstäbchen- und des Zapfenkanals	39
3.3	Nachweis der Transkripte von CCG6 und CCG8B in der Hühnerretina	50
3.4	Herstellung von spezifischen Antikörpern gegen die CNG-Kanäle aus Sebstäbchen und Zapfen der Hühnerretina	51
3.5	Nachweis der Genprodukte CCG6 und CCG8B in den Außensegmenten von Photorezeptoren der Hühnerretina	53
3.6	Untersuchungen zur Größe der reifen Proteine des Sebstäbchen- und Zapfenkanals	54
3.7	Lokalisierung des von pCCG8B kodierten Kanals	56
3.8	Konstruktion von Klonen, die funktionell in <i>Xenopus</i> Oozyten exprimierbar sind	57
3.9	Funktionelle Expression der Kationenkanäle aus Sebstäbchen und Zapfen der Hühnerretina in <i>Xenopus</i> Oozyten	64

4	Diskussion	68
4.1	Klonierung	68
4.2	Primärstruktur	69
4.3	Untersuchungen zur Größe der reifen Kanalproteine	73
4.4	Lokalisierung der CNG-Kanäle in der Hühnerretina	74
4.5	Funktionelle Expression	75
4.5.1	Expression in <i>Xenopus</i> Oozyten	75
4.5.2	Elektrophysiologische Eigenschaften	75
5	Zusammenfassung	79
6	Literatur	80
A	Anhang	