A ANHANG 2

A.1 OLIGONUKLEOTIDE 2

A.2 KLONIERUNGSSTRATEGIEN UND SEQUENZANALYSEN 5

A.2.1 C-TERMINALE MARKIERUNG DER $GABA_A$-REZEPTOR UNTEREINHEITEN 5
A.2.1.1 Kurzer Abstandshalter zwischen GFP-Molekül und Untereinheit 5
A.2.1.2 Langer Abstandshalter zwischen dem GFP-Molekül und dem Rest der Untereinheit 5

A.2.2 N-TERMINALE MARKIERUNG DER UNTEREINHEITEN 5
A.2.2.1 Kein zusätzliches, immunoreaktves Epitop zwischen GFP-Molekül und dem Rest der Untereinheit 5
A.2.2.2 Zwischen GFP-Molekül und den Rest der Untereinheit integriertes Epitop 5
A.2.2.3 Thrombin-Schnittstelle hinter der vierten Aminosäure der Untereinheit 5
A.2.2.4 Thrombin-Schnittstelle hinter GFP-Molekül und immunoreaktivem Epitop 5
A.2.2.5 Generierung eines Abstandshalters zwischen GFP-Molekül und dem Rest der Untereinheit (Reaktion 1) 5
A.2.2.6 Generierung eines Abstandshalters zwischen GFP-Molekül und dem Rest der Untereinheit (Reaktion 2) 5
A.2.2.7 Generierung eines Abstandshalters zwischen GFP-Molekül und dem Rest der Untereinheit (Reaktion3) 5
A.2.2.8 Generierung eines Abstandshalters zwischen GFP-Molekül und dem Rest der Untereinheit (Reaktion 4) 5
A.2.2.9 Generierung eines Abstandshalters zwischen GFP-Molekül und dem Rest der Untereinheit (Reaktion 5) 5
A.2.2.10 Generierung eines Abstandshalters zwischen GFP-Molekül und Untereinheit und Insertion einer zusätzlichen TEV-Schnittstelle (Reaktion 5) 5

A.3 VEKTORINFORMATIONEN 5

A.3.1 C-TERMINAL MARKIERTE $GABA_A$-REZEPTOR-UNTEREINHEITEN 5
A.3.1.1 Kurzer Abstandshalter zwischen GFP und Untereinheit 5
A.3.1.2 Langer Abstandshalter zwischen GFP und Untereinheit 5

A.3.2 N-TERMINAL MARKIERTE $GABA_A$-REZEPTOR-UNTEREINHEITEN 5
A.3.2.1 Kein zusätzliches, immunoreaktves Epitop zwischen GFP-Molekül und Untereinheit 5
A.3.2.2 Zwischen GFP-Molekül und Untereinheit integriertes Epitop 5
A.3.2.3 Thrombin-Schnittstelle hinter der vierten Aminosäure der Untereinheit 5
A.3.2.4 Thrombin-Schnittstelle hinter GFP-Molekül und immunoreaktivem Epitop 5
A.3.2.5 Abstandshalter bestehend aus 50 Aminosäuren (Ala, Ser) zwischen GFP-Molekül und Untereinheit 5
A.3.2.6 Abstandshalter mit einer Länge von 40 Aminosäuren gefolgt von einer TEV-Schnittstelle und einer Thrombin-Schnittstelle 5

A Anhang

A.1 Oligonukleotide

1. Fralp1Hind3:	5´ GCC CGG GAA GCT TAT GAA GAA AAG TCG GGG TCT CTC TGA CTA TCT TTG GGC CTG GAC CC 3´
2. Ralp1BamH1	5´ GGC CGG GGA TCC GGT TGA TGG GGT GTG GG 3´
3. Rralp1mycKpn1	5´ CGC CCC GGT ACC CCC AGA TCC TCT TCT GAG ATG AGT TTT TGT TCT TGA TGG GGT GTG GG 3´
4. Fralp2Hind3	5´ TCA GCT GGC GCT AAG CTT GTG GAC CCA GCC AGG TTG GTG CTG GC 3´
5. Ralp2BamH1	5´ GGG GGG GGA TCC GGA GGA CTA ACC CC 3´
6. Rralp2HAKpn1	5´ CCC GCC GGT ACC GGT GGT AGG TCG TAT GGG TAA GGA CTA ACC CC 3´
7. Alpha1-N-XhoI/Thr-for (Phosph.):	5’ **P**-AGC TAT GGA CAG CCC TCC CAA CTC GAG CTG GTG CCC CGG GGG TCG GAT GAA CTT AAG GAC AAC ACC 3’
8. Alpha1-N-XhoI/Thr-rev (Phosph.):	5’ **P**-GGT GTT GTC CTT AAG TTC ATC CGA CCC CCG GGG CAC CAG CTC GAG TTG GGA GGG CTG TCC ATA GCT 3’
9. Alpha2-N-XhoI/Thr-for (Phosph.):	5’ **P**-GGT GCT GGC TAA CAT CCA AGA ACT CGA GCT GGT GCC CCG GGG GTC GGA TGA GGC TAA AAA TAA TAT CAC C 3’
10. Alpha2-N-XhoI/Thr-rev (Phosph.):	5’ **P**-GGT GAT ATT ATT TTT AGC CTC ATC CGA CCC CCG GGG CAC CAG CTC GAG TTC TTG GAT GTT AGC CAG CAC C 3’
11. Alpha1-N-XhoI-fo (Phosph.):	5’ **P**-GGA CAG CCC TCC CAA CTC GAG GAT GAA CTT AAG GAC 3’
12. Alpha1-N-XhoI-rev (Phosph.):	5’ **P**-GTC CTT AAG TTC ATC CTC GAG TTG GGA GGG CTG TCC 3’
13. Alpha2-N-XhoI-fo (Phosph.):	5’ **P**-GCT AAC ATC CAA GAA CTC GAG GAT GAG GCT AAA AAT 3’
14. Alpha2-N-XhoI-rev (Phosph.):	5’ **P**-ATT TTT AGC CTC CTA CTC GAG TTC TTG GAT GTT AGC 3’
15. Forward-ExFP-XhoI:	5’ GGG GGG GGG CTC GAG ATC GTG AGC AAG GGC GAG GAG C 3’
16. Reverse-ExFP-XhoI:	5’ CCC CCC CCC CTC GAG CCC CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC G 3’
17. EXFP-XhoI-Myc-rev	5’ CCC CCC CTC GAG CAG ATC CTC TTC TGA GAT GAG TTT TTG TTC CCC CTT GTA CAG CTC GTC C 3’

18. EXFP-XhoI-HA-rev	5’ CCC CCC CTC GAG AGC GTA ATC TGG AAC ATC GTA TGG GTA CCC CTT GTA CAG CTC GTC C 3’
19. Alpha1HindIIIrev:	5’ AAT GGC TAT CTT AAG CTT CTG CAG GTC GAG ACG CGA TTT TGC 3’
20. Alpha2BamH1rev:	5’ TTG ACT CAT CCC GGA TCC TCT AGG TAA ATG TGT TGA AAA GGC AAT GG 3’
21. Alpha1mycThrfo:	5’ GGG AAT TGG GGG CTC GAG GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG CTG GTG CCC CGG GGG TCG GAT GAA CTT AAG G 3’
22. Alpha2HAfo:	5’ CCC CGG GGG CCC CTC GAG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT CTG GTG CCC CGG GGG TCG GAT GAG GC 3’
23. GFPspXbaIrev(1):	5’ CCC CCC CCC CCC CTC TAG ATG ATG CTG ATG CTG ATG CTG ATG CTG ATG CCT TGT ACA GCT CGT CCA TGC CGA GAG TGA T 3’
24. GFPspHindIIIrev(2):	5’ CGC GCG CGC GCG CGA AGC TTA CTT GCA GAA GCA GAA GCA GAA GCA GAC GCT GAT GCT GAT GCT GAT GCT GAT GCT GAT GC 3’
25. GFPspXbaIrev(3):	5’ GAG AGA GAG AGA GTC TAG ACG ACG CCG ACG CCG ACG CCG ACG CCG ACG CAC TTG CAG AAG CAG AAG CAG AAG CAG ACG C 3’
26. GFPspHindIIIrev(4):	5’ TTT ATT GTT AAA AAG CTT GGA GGC GGA GGC GGA GGC GGA GGC GGA GGC CGA CGC CGA CGC CGA CGC CGA CGC CGA CGC 3’
27. GFPspXhoIrev(5):	5’ TCC CCC GGG ATG GCT CGA GAC TAG CAC TTG CAC TAG CAC TTG CAC TAG CGG AGG CGG AGG CGG AGG CGG AGG CGG AGG C 3’
28. 5XhoI_TEV_rev	5’ TTT CCC CCG GGA TGG CTC GAG ACT AGC AGC TCC CTG AAA GTA CAG ATT CTC GGA GGC GGA GGC GGA GGC GGA GGC GGA GGC 3’
29. XhoI_Thr_rev(5)	5’ TTT CCC CCG GGA TGG CTC GAG ACT AGC AGC CGA CCC CCG GGG CAC CAG GGA GGC GGA GGC GGA GGC GGA GGC GGA GGC 3’
30. Alpha1_#1_fo(Xba):	5’ GGG GAT CCT CTA GAG TCG AGA CGC CTC CCG G 3’
31. Alpha1_#1_rev(Xho):	5’ CCC CCC CCC CTC GAG TTG GGA GGG CTG TCC 3’
32. Alpha1_#2_rev(HindIII):	5’ ATG GCG GCC AAG CTT CTG CAG GTC GAG ACG C 3’
33. Alpha1_#2_fo(Xho,Bgl2):	5’ GGG GGG GGG CTC GAG AGA TCT GAT GAA CTT AAG GAC AAC ACC 3’
34. Alpha1_part2_(XbaITEVTeil1)fo:	5’ GGG GGG GGG TCT AGA GAG AAT CTG TAC TTT CAG GGA AGA TCT CTT AAG GAC AAC AAC ACT GTC TTC ACG AGG 3’
35. Alpha1_pt2_XhoBgl2TEVTeil2)fo:	5’ GGG GGG GGG CTC GAG AGA TCT GAG CAA AAG CTG ATT TCT GAG GAG GAT CTG GAG AAT CTG TAC TTT CAG GGA AGA TCT C 3’

36. Alpha1_HindIIIrev_part2: 5’ CCC CCC CCA AGC TTA CTA TTG ATG GGG TGT GGG GGC 3’

37. Alpha1_XbaI_fo_part1: 5’ GGG GGG GGG CTC TAG ATG AAG AAA AGT CGG 3’

38. MEGA_XhoI_fo: 5’ CTC CCA AGA TCT CGA GCA GAA GCT GAT TTC 3’

39. MEGA_XhoI_rev: 5’ GAA ATC AGC TTC TGC TCG AGA TCT TGG GAG 3’

40. MEGASpacerbehThr_rev: 5’ TCC TGC TCC TGC TCC TGC TCC TGC TCC TGC AGA TCC TCG GGG TAC AAG ATC C 3’

41. MEGAThrombin_fo: 5’ CTT GTA CCC CGA GGA TCT AAG GAC AAC ACC ACT GTC TT 3’

42. MEGAThrombin_rev: 5’ AGA TCC TCG GGG TAC AAG ATC CTC CTC AGA AAT CA 3’

43. MEGAmycneu_fo: 5’ CAG AAG CTG ATT TCT GAG GAG GAT CTT AAG GAC AAC ACC ACT GTC 3’

44. MEGAmycneu_rev: 5’ ATC CTC CTC AGA AAT CAG CTT CTG TTC ATC TTG GGA GGG CTG TC 3’

45. MEGASpacerbehThr_fo: 5’ GCA GGA GCA GGA GCA GGA GCA GGA GCA GGA AAG GAC AAC ACC ACT GTC TTC 3’

A.2 Klonierungsstrategien und Sequenzanalysen

A.2.1 C-terminale Markierung der $GABA_A$-Rezeptor Untereinheiten

A.2.1.1 Kurzer Abstandshalter zwischen GFP-Molekül und Untereinheit

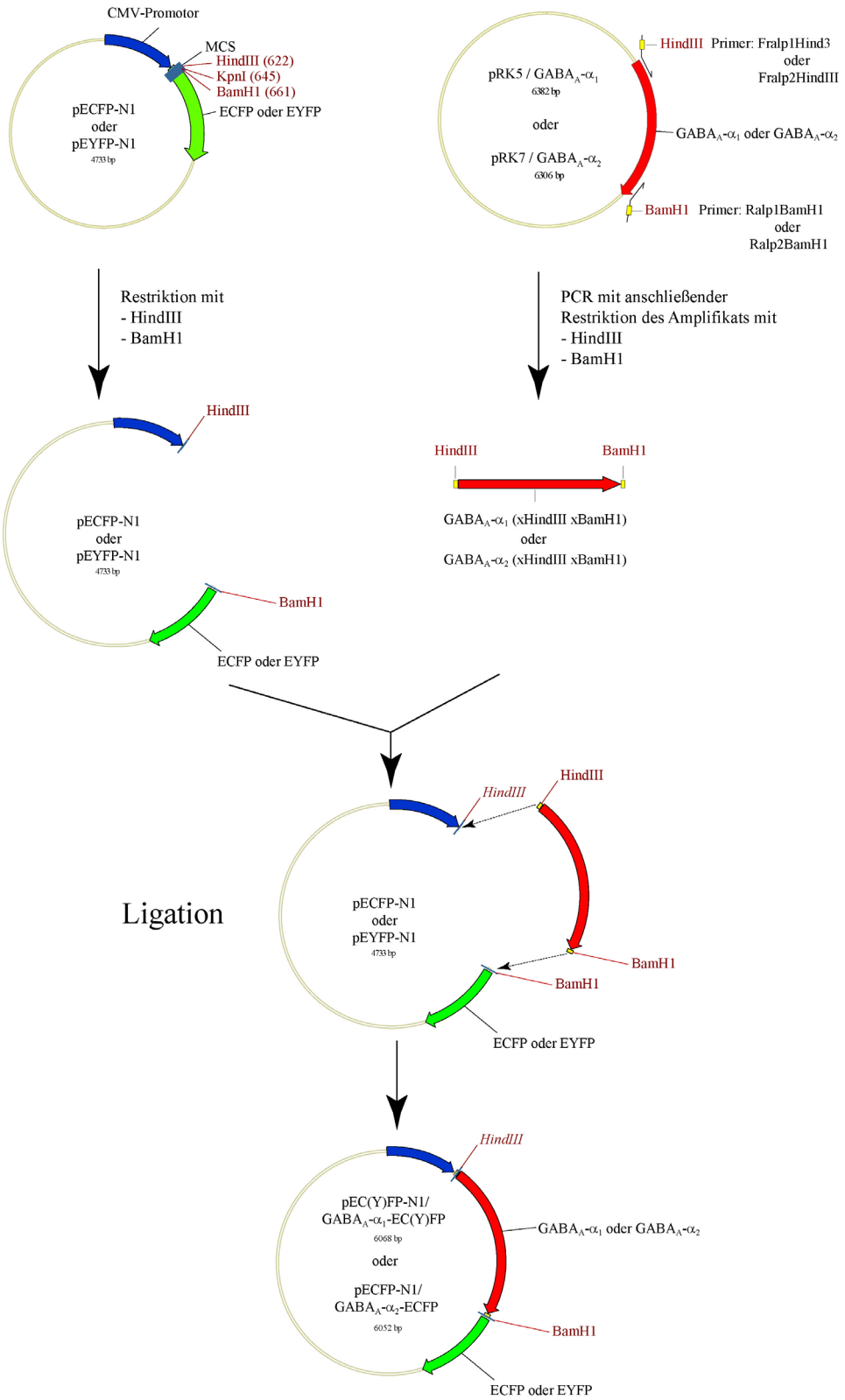


Abbildung A-1: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der Konstrukte pEC(Y)FP/$GABA_A$-α_1- EC(Y)FP und pECFP/$GABA_A$-α_2- ECFP. bp, „base pairs“ = Basenpaare.

```
                 •       580         •       600         •       620         •       640
                                                                         M  K  K  S  R
 561 GCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTATGAAGAAAAGTC 640
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 561 GCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTC===================== 620

                 •       580         •       600         •       620

                 •       660         •       680         •       700         •       720
      G  L  S  D  Y  L  W  A  W  T  L  I  L  S  T  L  S  G  R  S  Y  G  Q  P  S  Q
 641 GGGGTCTCTCTGACTATCTTTGGGCCTGGACCCTCATTCTGAGCACTCTCTCGGGAAGAAGCTATGGACAGCCCTCCCAA 720
     ==============================================================================

                                                  ⋮

                 •      1860         •      1880         •      1900         •      1920
      P  E  P  K  K  T  F  N  S  V  S  K  I  D  R  L  S  R  I  A  F  P  L  L  F  G
1841 CGCCAGAACCCAAGAAAACCTTTAACAGCGTCAGCAAAATCGACCGACTGTCAAGAATAGCCTTTCCGCTGCTATTTGGA 1920
     ==============================================================================

                 •      1940         •      1960         •      1980         •      2000
     I  F  N  L  V  Y  W  A  T  Y  L  N  R  E  P  Q  L  K  A  P  T  P  H  Q  P  D  P
1921 ATCTTTAACTTAGTCTATTGGGCCACGTATTTAAACAGAGAGCCTCAGCTAAAAGCCCCCACACCCCATCAACCGGATCC 2000
 621 ======================================================================================= 621

                 •      2020         •      2040         •      2060         •      2080
      P  V  A  T  M  V  S  K  G  E  E  L  F  T  G  V  V  P  I  L  V  E  L  D  G  D  V
2001 ACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACG 2080
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 622 ACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACG 701
                    M  V  S  K  G  E  E  L  F  T  G  V  V  P  I  L  V  E  L  D  G  D  V
                 •       640         •       660         •       680         •       700

                 •      2100         •      2120         •      2140         •      2160
      N  G  H  K  F  S  V  S  G  E  G  E  G  D  A  T  Y  G  K  L  T  L  K  F  I  C
2081 TAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGC 2160
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 702 TAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGC 781
      N  G  H  K  F  S  V  S  G  E  G  E  G  D  A  T  Y  G  K  L  T  L  K  F  I  C
                 •       720         •       740         •       760         •       780

                                                  ⋮

                 •      2660         •      2680         •      2700         •      2720
     K  D  P  N  E  K  R  D  H  M  V  L  L  E  F  V  T  A  A  G  I  T  L  G  M  D  E
2641 AAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGA 2720
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1262 AAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGA 1341
     K  D  P  N  E  K  R  D  H  M  V  L  L  E  F  V  T  A  A  G  I  T  L  G  M  D  E
                 •      1280         •      1300         •      1320         •      1340

                 •      2740         •      2760         •      2780         •      2800
      L  Y  K  *
2721 GCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCGACTCTAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAA 2800
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1342 GCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCGACTCTAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAA 1421
      L  Y  K  *
                 •      1360         •      1380         •      1400         •      1420
```

Abbildung A-2: Vergleich der Nukleinsäure- und Aminosäurensequenzen der Konstrukte pEC(Y)FP-

N1/GABA$_A$-α$_1$-EC(Y)FP und pEC(Y)FP-N1. Dargestellt ist ein Vergleich der Sequenzen der Konstrukte pEC(Y)FP-N1/GABA$_A$-α$_1$-EC(Y)FP (obere drei Reihen) mit der Sequenz des kommerziell erhältlichen Vektors pEC(Y)FP-N1 der Firma Clontech (BD Biosciences (untere drei Reihen). Die Zahlen deuten auf die einzelnen Positionen der Nukleinsäuren im Vektor. Der Übersicht wegen, wurde bei dieser Darstellung darauf verzichtet, die komplette DNA-Sequenz des klonierten Konstruktes im Vektor darzustellen. Die mittels PCR amplifizierte DNA-Sequenz der α$_1$-Untereinheit (gelber Kasten) wurde unter Einhaltung des Leserasters des GFP-Teils über eine HindIII- und BamH1-Restriktionsschnittstelle in den Vektor inseriert (HindIII, **AAGCTT**, Position 622 – 627; BamH1, **GGATCC**, Position 1995 – 2000). Die Position der α$_1$-Untereinheit ist gelb markiert (gelber Kasten, Position 628 bis 1992). Die gewählte Klonierungsstrategie hat zur Folge, dass zwischen der α$_1$-Untereinheit und EC(Y)FP ein sieben Aminosäuren umfassender Abstandshalter entsteht (blauer Kasten, Position 1993 bis 2013). Die Sequenz des GFP-Moleküls (ECFP oder EYFP) befindet sich im Konstrukt zwischen Position 2014 bis 2730 (grüner Kasten). Das Stopcodon befindet sich an Position 2731 bis 2733 (Stern, TAA).

```
                 •       580         •       600         •       620         •       640
                                                                          M  R  T  K  L
561 GCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTATGAGGACAAAAT 640
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
561 GCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTT============= 627

                 •       580         •       600         •       620

                 •       660         •       680         •       700         •       720
      S  T  C  N  V  W  F  P  L  L  V  L  L  V  W  N  P  A  R  L  V  L  A  N  I  Q
641 TGAGCACTTGCAACGTATGGTTTCCGCTGCTTGTTCTCCTGGTGTGGAACCCAGCCAGGTTGGTGCTGGCTAACATCCAA 720
    ==========================================================================================

                                                  ⋮

                 •      1860         •      1880         •      1900         •      1920
      E  A  K  K  T  F  N  S  V  S  K  I  D  R  M  S  R  I  V  F  P  V  L  F  G  T
1841 CCGAAGCCAAGAAAACTTTCAACAGTGTCAGCAAAATCGACAGAATGTCTAGAATAGTGTTCCCGGTTCTGTTTGGTACT 1920
    ==========================================================================================

                 •      1940         •      1960         •      1980         •      2000
      F  N  L  V  Y  W  A  T  Y  L  N  R  E  P  V  L  G  V  S  P  P  D  P  P  V  A  T
1921 TTTAATTTAGTTTACTGGGCTACGTATTTAAACCGGGAGCCTGTATTAGGGGTTAGTCCTccGGATCCACCGGTCGCCAC 2000
                                                                  ||||||||||||||||||
    ==========================================================================GGATCCACCGGTCGCCAC 677
                                                                   D  P  P  V  A  T
                                                                                   •

                 •      2020         •      2040         •      2060         •      2080
      M  V  S  K  G  E  E  L  F  T  G  V  V  P  I  L  V  E  L  D  G  D  V  N  G  H  K
2001 CATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACA 2080
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 678 CATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACA 757
      M  V  S  K  G  E  E  L  F  T  G  V  V  P  I  L  V  E  L  D  G  D  V  N  G  H  K
     680         •       700         •       720         •       740         •

                                                  ⋮

                 •      2660         •      2680         •      2700         •      2720
      E  K  R  D  H  M  V  L  L  E  F  V  T  A  A  G  I  T  L  G  M  D  E  L  Y  K  *
2641 GAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTA 2720
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1318 GAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTA 1397
      E  K  R  D  H  M  V  L  L  E  F  V  T  A  A  G  I  T  L  G  M  D  E  L  Y  K  *
    1320         •      1340         •      1360         •      1380         •

                 •      2740         •      2760         •      2780         •      2800

2721 AAGCGGCCGCGACTCTAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCT 2800
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1398 AAGCGGCCGCGACTCTAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCT 1477
      S
    1400         •      1420         •      1440         •      1460         •
```

Abbildung A-3: Vergleich der Nukleinsäure- und Aminosäurensequenzen der Konstrukte pEYFP-N1/GABA$_A$-α_2-EYFP und pEYFP-N1. Dargestellt ist ein Vergleich der Sequenzen der Konstrukte pEYFP-N1 / GABA$_A$-α_2-EC(Y)FP (obere drei Reihen) mit der Sequenz des kommerziell erhältlichen Vektors pEYFP-N1 der Firma Clontech (BD Biosciences) (untere drei Reihen). Die Zahlen deuten auf die einzelnen Positionen der Nukleinsäuren im Vektor. Der Übersicht wegen, wurde bei dieser Darstellung darauf verzichtet, die komplette DNA-Sequenz des klonierten Konstruktes im Vektor darzustellen. Die mittels PCR amplifizierte DNA-Sequenz der α_2-Untereinheit (gelber Kasten)

wurde über eine HindIII- und BamH1-Restriktionsschnittstelle in den Vektor inseriert (HindIII, **AAGCTT**, Position 622 – 627; BamH1, **GGATCC**, Position 1983 – 1987). Die Position der α_2-Untereinheit ist gelb markiert (gelber Kasten, Position 628 bis 1980). Die gewählte Klonierungsstrategie hat zur Folge, dass zwischen der α_2-Untereinheit und EYFP ein sieben Aminosäuren umfassender Abstandshalter entsteht (blauer Kasten, Position 1981 bis 2001). Die Sequenz des GFP-Moleküls (EYFP) befindet sich im Konstrukt zwischen Position 2002 bis 2718 (grüner Kasten). Das Stopcodon befindet sich an Position 2719 bis 2721 (Stern, TAA).

A.2.1.2 Langer Abstandshalter zwischen dem GFP-Molekül und dem Rest der Untereinheit

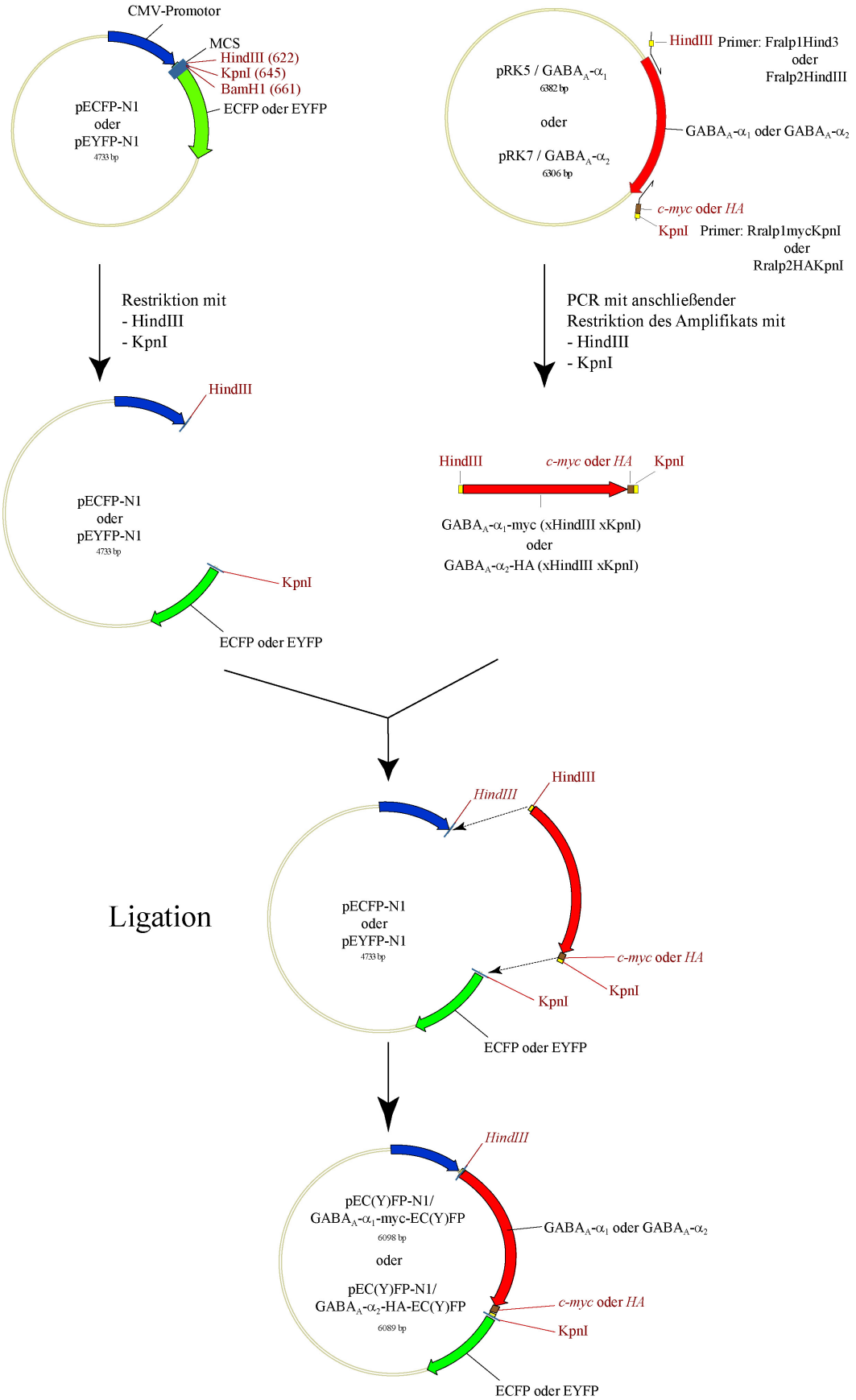


Abbildung A-4: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der Konstrukte pEC(Y)FP/GABA$_A$-α_1-myc-EC(Y)FP und pEC(Y)FP/GABA$_A$-α_2-HA-EC(Y)FP. bp, „base pairs“ = Basenpaare.

```
                 •       580         •       600         •       620         •       640
                                                                         M  K  K  S  R
 561 GCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTATGAAGAAAAGTC 640
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 561 GCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTC==================== 620

                 •       580         •       600         •       620

                 •       660         •       680         •       700         •       720
       G  L  S  D  Y  L  W  A  W  T  L  I  L  S  T  L  S  G  R  S  Y  G  Q  P  S  Q
 641 GGGGTCTCTCTGACTATCTTTGGGCCTGGACCCTCATTCTGAGCACTCTCTCGGGAAGAAGCTATGGACAGCCCTCCCAA 720
     ==========================================================================================

                 •       1940        •       1960        •       1980        •       2000
     I  F  N  L  V  Y  W  A  T  Y  L  N  R  E  P  Q  L  K  A  P  T  P  H  Q  E  Q  K
1921 ATCTTTAACTTAGTCTATTGGGCCACGTATTTAAACAGAGAGCCTCAGCTAAAAGCCCCCACACCCCATCAAGAACAAAA 2000
     ==================================================================================

                 •       2020        •       2040        •       2060        •       2080
      L  I  S  E  E  D  L  G  V  P  R  A  R  D  P  P  V  A  T  M  V  S  K  G  E  E  L
2001 ACTCATCTCAGAAGAGGATCTGGGGGTACCGCGGGCCCGGGATCCACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC 2080
                                  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 621 ==============================GCGGGCCCGGGATCCACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC 671
                                                                M  V  S  K  G  E  E  L
                                                 •       640         •       660         •

                 •       2100        •       2120        •       2140        •       2160
       F  T  G  V  V  P  I  L  V  E  L  D  G  D  V  N  G  H  K  F  S  V  S  G  E  G
2081 TGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGC 2160
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 672 TGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGC 751
       F  T  G  V  V  P  I  L  V  E  L  D  G  D  V  N  G  H  K  F  S  V  S  G  E  G
            680         •       700         •       720         •       740         •

                 •       2660        •       2680        •       2700        •       2720
     L  L  P  D  N  H  Y  L  S  T  Q  S  A  L  S  K  D  P  N  E  K  R  D  H  M  V  L
2641 CTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCT 2720
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1232 CTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCT 1311
     L  L  P  D  N  H  Y  L  S  T  Q  S  A  L  S  K  D  P  N  E  K  R  D  H  M  V  L
          1240        •       1260        •       1280        •       1300        •

                 •       2740        •       2760        •       2780        •       2800
      L  E  F  V  T  A  A  G  I  T  L  G  M  D  E  L  Y  K  *
2721 GCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCGACTCTAGATCAT 2800
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1312 GCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCGACTCTAGATCAT 1391
      L  E  F  V  T  A  A  G  I  T  L  G  M  D  E  L  Y  K  *
          1320        •       1340        •       1360        •       1380        •
```

Abbildung A-5: Vergleich der Nukleinsäure- und Aminosäurensequenzen der Konstrukte pEC(Y)FP-N1/GABA$_A$-α_1-myc-EC(Y)FP und pEC(Y)FP-N1. Dargestellt ist ein Vergleich der Sequenzen der Konstrukte pEC(Y)FP-N1 / GABA$_A$-α_1-myc-EC(Y)FP (obere drei Reihen) mit der Sequenz des kommerziell erhältlichen Vektors pEC(Y)FP-N1 der Firma Clontech (BD Biosciences (untere drei Reihen). Die Zahlen deuten auf die

einzelnen Positionen der Nukleinsäuren im Vektor. Der Übersicht wegen, wurde bei dieser Darstellung darauf verzichtet, die komplette DNA-Sequenz des klonierten Konstruktes im Vektor darzustellen. Die mittels PCR amplifizierte DNA-Sequenz der α_1-Untereinheit (gelber Kasten) wurde unter Einhaltung des Leserasters des GFP-Teils über eine HindIII- und KpnI-Restriktionsschnittstelle in den Vektor inseriert (HindIII, **AAGCTT**, Position 622 – 627; KpnI, **GGTACC**, Position 2025 – 2030). Die Position der α_1-Untereinheit ist gelb markiert (gelber Kasten, Position 628 bis 1992). Mit Hilfe der Methode der PCR wurde am 3'-Ende der α_1-Untereinheit eine für ein cmyc-Epitop codierende Sequenz angefügt (**EQKLISEEDL**, Position 1993 bis 2022). Die gewählte Klonierungsstrategie hat zur Folge, dass zwischen der α_1-Untereinheit und EC(Y)FP ein 22 Aminosäuren umfassender Abstandshalter entsteht (blauer Kasten, Position 1993 bis 2058). Die Sequenz des GFP-Moleküls (ECFP oder EYFP) befindet sich im Konstrukt zwischen Position 2059 bis 2775 (grüner Kasten). Das Stopcodon befindet sich an Position 2776 bis 2778 (Stern, TAA).

```
                 •       580         •       600         •       620         •       640
                                                                          M  R  T  K  L
561 GCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTATGAGGACAAAAT 640
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
561 GCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTC===================== 620

                 •       580         •       600         •       620

                 •       660         •       680         •       700         •       720
     S  T  C  N  V  W  F  P  L  L  V  L  L  V  W  N  P  A  R  L  V  L  A  N  I  Q
641 TGAGCACTTGCAACGTATGGTTTCCGCTGCTTGTTCTCCTGGTGTGGAACCCAGCCAGGTTGGTGCTGGCTAACATCCAA 720
    ==============================================================================

                                                  ⋮

                 •      1860         •      1880         •      1900         •      1920
     E  A  K  K  T  F  N  S  V  S  K  I  D  R  M  S  R  I  V  F  P  V  L  F  G  T
1841 CCGAAGCCAAGAAAACTTTCAACAGTGTCAGCAAAATCGACAGAATGTCTAGAATAGTGTTCCCGGTTCTGTTTGGTACT 1920
     ==============================================================================

                 •      1940         •      1960         •      1980         •      2000
     F  N  L  V  Y  W  A  T  Y  L  N  R  E  P  V  L  G  V  S  P  Y  P  Y  D  L  P  P
1921 TTTAATTTAGTTTACTGGGCTACGTATTTAAACCGGGAGCCTGTATTAGGGGTTAGTCCTTACCCATACGACCTACCACC 2000
     ==============================================================================

                 •      2020         •      2040         •      2060         •      2080
     V  P  R  A  R  D  P  P  V  A  T  M  V  S  K  G  E  E  L  F  T  G  V  V  P  I  L
2001 GGTACCGCGGGCCCGGGATCCACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCC 2080
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
621 =====CGCGGGCCCGGGATCCACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCC 695
                                        M  V  S  K  G  E  E  L  F  T  G  V  V  P  I  L
                         •       640         •       660         •       680         •

                                                  ⋮

                 •      2660         •      2680         •      2700         •      2720
     S  T  Q  S  A  L  S  K  D  P  N  E  K  R  D  H  M  V  L  L  E  F  V  T  A  A  G
2641 AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGG 2720
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1256 AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGG 1335
     S  T  Q  S  A  L  S  K  D  P  N  E  K  R  D  H  M  V  L  L  E  F  V  T  A  A  G
      1260         •      1280         •      1300         •      1320         •

                 •      2740         •      2760         •      2780         •      2800
      I  T  L  G  M  D  E  L  Y  K  *
2721 GATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCGACTCTAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGA 2800
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1336 GATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCGACTCTAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGA 1415
      I  T  L  G  M  D  E  L  Y  K  *
      1340         •      1360         •      1380         •      1400         •
```

Abbildung A-6: Vergleich der Nukleinsäure- und Aminosäurensequenzen der Konstrukte pEC(Y)FP-N1/GABA$_A$-α_2-HA-EC(Y)FP und pEC(Y)FP-N1. Dargestellt ist ein Vergleich der Sequenzen der Konstrukte pEC(Y)FP-N1/GABA$_A$-α_2-HA-EC(Y)FP (obere drei Reihen) mit der Sequenz des kommerziell erhältlichen Vektors pEC(Y)FP-N1 der Firma Clontech (BD Biosciences (untere drei Reihen). Die Zahlen deuten auf die einzelnen Positionen der Nukleinsäuren im Vektor. Der Übersicht wegen, wurde bei dieser Darstellung darauf verzichtet, die komplette DNA-Sequenz des klonierten Konstruktes im Vektor darzustellen. Die mittels PCR amplifizierte DNA-Sequenz der α_2-Untereinheit (gelber Kasten) wurde unter Einhaltung des Leserasters des GFP-Teils über eine

HindIII- und KpnI-Restriktionsschnittstelle in den Vektor inseriert (HindIII, **AAGCTT**, Position 622 – 627; KpnI, **GGTACC**, Position 2001 – 2006). Die Position der α_2-Untereinheit ist gelb markiert (gelber Kasten, Position 628 bis 1980). Mit Hilfe der Methode der PCR wurde am 3'-Ende der α_2-Untereinheit eine für ein HA-Epitop codierende Sequenz angefügt (**YPYDLP**, Position 1981 bis 1998). Die gewählte Klonierungsstrategie hat zur Folge, dass zwischen der α_2-Untereinheit und EC(Y)FP ein 18 Aminosäuren umfassender Abstandshalter entsteht (blauer Kasten, Position 1981 bis 2034). Die Sequenz des GFP-Moleküls (ECFP oder EYFP) befindet sich zwischen Position 2035 bis 2751 (grüner Kasten). Das Stopcodon befindet sich an Position 2752 bis 2754 (Stern, TAA).

A.2.2 N-terminale Markierung der Untereinheiten

A.2.2.1 Kein zusätzliches, immunoreaktves Epitop zwischen GFP-Molekül und dem Rest der Untereinheit

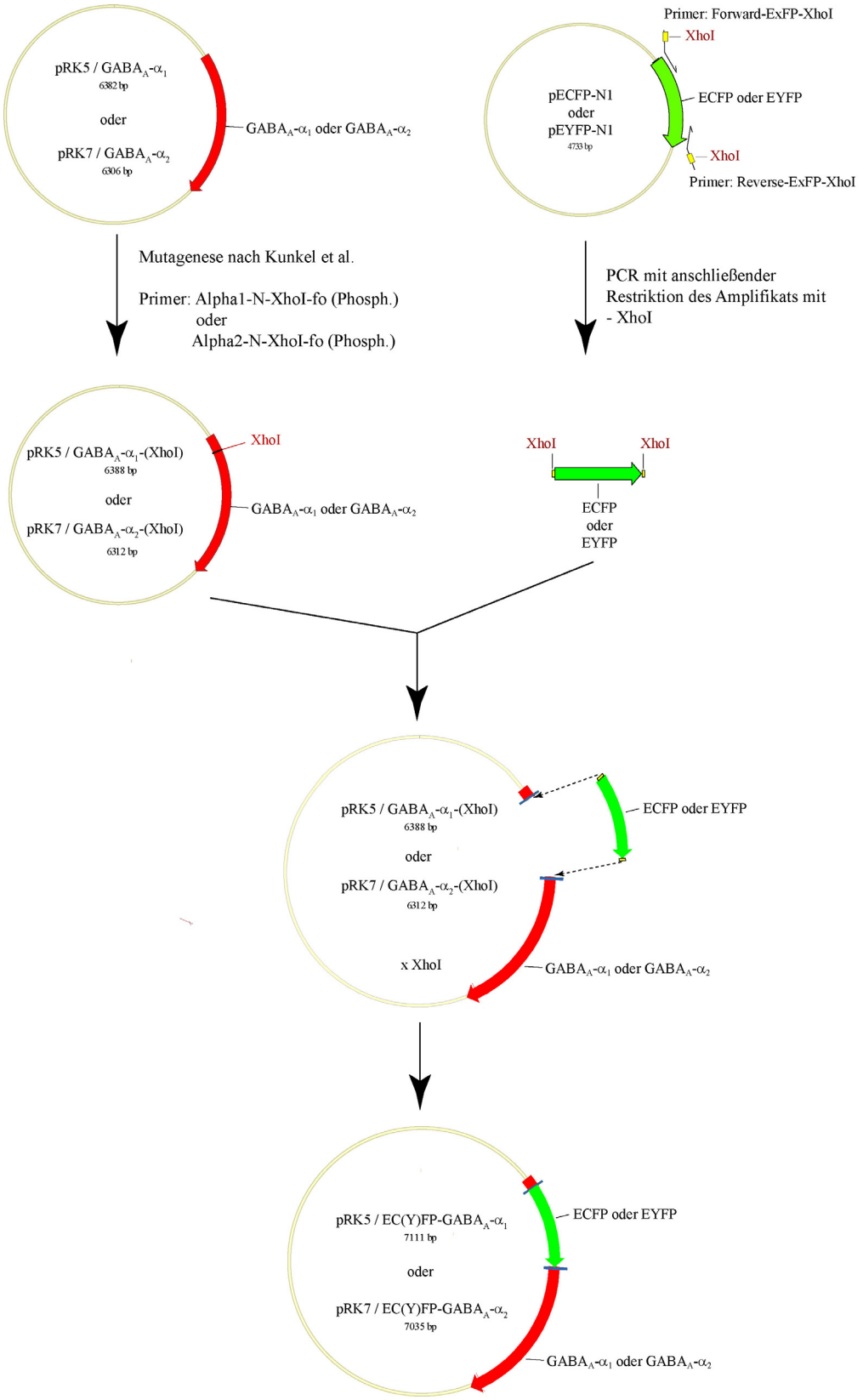


Abbildung A-7: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der Konstrukte pRK5/EC(Y)FP-GABA$_A$-α$_1$ und pRK7/EC(Y)FP-GABA$_A$-α$_2$. bp, „base pairs“ = Basenpaare.

```
                                                                  •       980         •      1000         •      1020         •      1040
                                                                  M   K   K   S   R   G   L   S   D   Y   L
 961 TGGAGCGATCCGGTGCCCAGAGGGggCCCCGAGCTGGACAAGCCCGTGATGAAGAAAAGTCGGGGTCTCTCTGACTATCT 1040
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 961 TGGAGCGATCCGGTGCCCAGAGGGggCCCCGAGCTGGACAAGCCCGTGATGAAGAAAAGTCGGGGTCTCTCTGACTATCT 1040
                                                                  M   K   K   S   R   G   L   S   D   Y   L
                                                                  •       980         •      1000         •      1020         •      1040

                                                                  •      1060         •      1080         •      1100         •      1120
                                                                  W   A   W   T   L   I   L   S   T   L   S   G   R   S   Y   G   Q   P   S   Q   L   E   M   V   S   K   G
1041 TTGGGCCTGGACCCTCATTCTGAGCACTCTCTCGGGAAGAAGCTATGGACAGCCCTCCCAACTCGAGATGGTGAGCAAGG 1120
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1041 TTGGGCCTGGACCCTCATTCTGAGCACTCTCTCGGGAAGAAGCTATGGACAGCCCTCCCAA==================== 1101
                                                                  W   A   W   T   L   I   L   S   T   L   S   G   R   S   Y   G   Q   P   S   Q
                                                                  •      1060         •      1080         •      1100

                                                                  •      1140         •      1160         •      1180         •      1200
                                                                  E   E   L   F   T   G   V   V   P   I   L   V   E   L   D   G   D   V   N   G   H   K   F   S   V   S
1121 GCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCC 1200
     ================================================================================
```

```
                                                                  •      1780         •      1800         •      1820         •      1840
                                                                  M   V   L   L   E   F   V   T   A   A   G   I   T   L   G   M   D   E   L   Y   K   L   E   D   E   L   K
1761 CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGCTCGAGGATGAACTTA 1840
                                                                                                           ||||||||||
1102 ==========================================================================GATGAACTTA 1111
                                                                                                           D   E   L   K
                                                                                                                       •

                                                                  •      1860         •      1880         •      1900         •      1920
                                                                  D   N   T   T   V   F   T   R   I   L   D   R   L   L   D   G   Y   D   N   R   L   R   P   G   L   G
1841 AGGACAACACCACTGTCTTCACGAGGATTTTGGACCGACTGCTGGATGGTTATGACAATCGTCTGAGACCAGGCTTGGGA 1920
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1112 AGGACAACACCACTGTCTTCACGAGGATTTTGGACCGACTGCTGGATGGTTATGACAATCGTCTGAGACCAGGCTTGGGA 1191
                                                                  D   N   T   T   V   F   T   R   I   L   D   R   L   L   D   G   Y   D   N   R   L   R   P   G   L   G
                                                                      1120         •      1140         •      1160         •      1180         •
```

```
                                                                  •      2980         •      3000         •      3020         •      3040
                                                                  K   K   T   F   N   S   V   S   K   I   D   R   L   S   R   I   A   F   P   L   L   F   G   I   F   N   L
2961 CAAGAAAACCTTTAACAGCGTCAGCAAAATCGACCGACTGTCAAGAATAGCCTTTCCGCTGCTATTTGGAATCTTTAACT 3040
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2232 CAAGAAAACCTTTAACAGCGTCAGCAAAATCGACCGACTGTCAAGAATAGCCTTTCCGCTGCTATTTGGAATCTTTAACT 2311
                                                                  K   K   T   F   N   S   V   S   K   I   D   R   L   S   R   I   A   F   P   L   L   F   G   I   F   N   L
                                                                      2240         •      2260         •      2280         •      2300         •

                                                                  •      3060         •      3080         •      3100         •      3120
                                                                  V   Y   W   A   T   Y   L   N   R   E   P   Q   L   K   A   P   T   P   H   Q   *
3041 TAGTCTATTGGGCCACGTATTTAAACAGAGAGCCTCAGCTAAAAGCCCCCACACCCCATCAATAGGTTCTTTTAGTCGTA 3120
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2312 TAGTCTATTGGGCCACGTATTTAAACAGAGAGCCTCAGCTAAAAGCCCCCACACCCCATCAATAGGTTCTTTTAGTCGTA 2391
                                                                  V   Y   W   A   T   Y   L   N   R   E   P   Q   L   K   A   P   T   P   H   Q   *
                                                                      2320         •      2340         •      2360         •      2380         •
```

Abbildung A-8: Vergleich der Nukleinsäure- und Aminosäurensequenzen der Konstrukte pRK5/EC(Y)FP-GABA$_A$-α$_1$ und pRK5/GABA$_A$-α$_1$ (wt). Dargestellt ist ein Vergleich der Sequenzen der Konstrukte pRK5/EC(Y)FP-GABA$_A$-α$_1$ (obere drei Reihen) mit der Sequenz der Wildtyp-Form der Untereinheit α$_1$ (pRK5/GABA$_A$-α$_1$ (wt), untere drei Reihen). Die Zahlen deuten auf die einzelnen Positionen der Nukleinsäuren im Vektor. Der Übersicht wegen, wurde bei dieser Darstellung darauf verzichtet, die komplette DNA-Sequenz des klonierten Konstruktes im Vektor darzustellen. Das Startcodon befindet sich an Position 1009 (ATG, Pfeil) und markiert gleichzeitig den Beginn des Signalpeptids, welches sich bis zu Position 1089 erstreckt. Das Signalpeptid ist im prozessierten Protein nicht mehr vorhanden, da es von einer Signalpeptidase während der Translation der DNA cotranslational abgespalten wird. Die ersten vier Aminosäuren der prozessierten α$_1$-Untereinheit sind in Position

1090 bis 1101 dargestellt (QPSQ, gelber Kasten). Direkt im Anschluss folgt eine XhoI-Restriktionsschnittstelle (CTCGAG, Position 1102 bis 1107). Das inserierte GFP-Molekül (ECFP oder EYFP) befindet sich im Konstrukt zwischen Position 1108 bis 1824 (grüner Kasten). Im Anschluss an den GFP-Teil folgt erneut eine XhoI-Restriktionsschnittstelle (CTCGAG, Position 1825 bis 1830). Der restliche Teil der α_1-Untereinheit befindet sich zwischen Position 1831 und 3102 (gelber Kasten). Das Stopcodon befindet sich in Position 3103 bis 3105 (Stern, TAG).

```
                                                  →
            •       900         •       920         •       940         •       960
                                         M  R  T  K  L  S  T  C  N  V  W  F  P  L
 881 CACTCCCAGGTCCAACTGCACCTCGGTTCTAAGCTTCCATGAGGACAAAATTGAGCACTTGCAACGTATGGTTTCCGCTG 960
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 881 CACTCCCAGGTCCAACTGCACCTCGGTTCTAAGCTTCCATGAGGACAAAATTGAGCACTTGCAACGTATGGTTTCCGCTG 960
                                         M  R  T  K  L  S  T  C  N  V  W  F  P  L
            •       900         •       920         •       940         •       960

            •       980         •      1000         •      1020         •      1040
     L  V  L  L  V  W  N  P  A  R  L  V  L  A  N  I  Q  E  L  E  M  V  S  K  G  E  E
 961 CTTGTTCTCCTGGTGTGGAACCCAGCCAGGTTGGTGCTGGCTAACATCCAAGAACTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA 1040
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 961 CTTGTTCTCCTGGTGTGGAACCCAGCCAGGTTGGTGCTGGCTAACATCCAAGAA=========================== 1014
     L  V  L  L  V  W  N  P  A  R  L  V  L  A  N  I  Q  E
            •       980         •      1000         •

            •      1060         •      1080         •      1100         •      1120
      L  F  T  G  V  V  P  I  L  V  E  L  D  G  D  V  N  G  H  K  F  S  V  S  G  E  G
1041 GCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGG 1120
     ================================================================================

                                          ⋮

            •      1700         •      1720         •      1740         •      1760
     L  L  E  F  V  T  A  A  G  I  T  L  G  M  D  E  L  Y  K  L  E  D  E  A  K  N  N
1681 CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGCTCGAGGATGAGGCTAAAAATAA 1760
                                                                  ||||||||||||||||||
1015 ==========================================================GATGAGGCTAAAAATAA 1031
                                                                  D  E  A  K  N  N
                                                                     1020         •

            •      1780         •      1800         •      1820         •      1840
      I  T  I  F  T  R  I  L  D  R  L  L  D  G  Y  D  N  R  L  R  P  G  L  G  D  S  I
1761 TATCACCATCTTTACAAGAATTCTAGACAGACTTCTGGATGGTTACGATAATCGTCTTAGACCAGGACTGGGAGACAGCA 1840
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1032 TATCACCATCTTTACAAGAATTCTAGACAGACTTCTGGATGGTTACGATAATCGTCTTAGACCAGGACTGGGAGACAGCA 1111
      I  T  I  F  T  R  I  L  D  R  L  L  D  G  Y  D  N  R  L  R  P  G  L  G  D  S  I
          1040         •      1060         •      1080         •      1100         •

                                          ⋮

            •      2900         •      2920         •      2940         •      2960
     N  S  V  S  K  I  D  R  M  S  R  I  V  F  P  V  L  F  G  T  F  N  L  V  Y  W  A
2881 AACAGTGTCAGCAAAATCGACAGAATGTCTAGAATAGTGTTCCCGGTTCTGTTTGGTACTTTTAATTTAGTTTACTGGGC 2960
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2152 AACAGTGTCAGCAAAATCGACAGAATGTCTAGAATAGTGTTCCCGGTTCTGTTTGGTACTTTTAATTTAGTTTACTGGGC 2231
     N  S  V  S  K  I  D  R  M  S  R  I  V  F  P  V  L  F  G  T  F  N  L  V  Y  W  A
          2160         •      2180         •      2200         •      2220         •

            •      2980         •      3000         •      3020         •      3040
      T  Y  L  N  R  E  P  V  L  G  V  S  P  *
2961 TACGTATTTAAACCGGGAGCCTGTATTAGGGGTTAGTCCTTGAGTCTAGACATTGTTACTTGGGCTGTATTGCAGTGTTA 3040
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2232 TACGTATTTAAACCGGGAGCCTGTATTAGGGGTTAGTCCTTGAGTCTAGACATTGTTACTTGGGCTGTATTGCAGTGTTA 2311
      T  Y  L  N  R  E  P  V  L  G  V  S  P  *
          2240         •      2260         •      2280         •      2300         •
```

Abbildung A-9: Vergleich der Nukleinsäure- und Aminosäurensequenzen der Konstrukte pRK7/EC(Y)FP-GABA$_A$-α_2 und pRK7/GABA$_A$-α_2 (wt). Dargestellt ist ein Vergleich der Sequenzen der Konstrukte pRK7/EC(Y)FP-GABA$_A$-α_2 (obere drei Reihen) mit der Sequenz der Wildtyp-Form der Untereinheit α_2 (pRK7/GABA$_A$-α_2 (wt), untere drei Reihen). Die Zahlen deuten auf die einzelnen Positionen der Nukleinsäuren im Vektor. Der Übersicht wegen, wurde bei dieser Darstellung darauf verzichtet, die komplette DNA-Sequenz des klonierten Konstruktes im Vektor darzustellen. Das Startcodon befindet sich an Position 919 (ATG, Pfeil) und markiert gleichzeitig den Beginn des Signalpeptids, welches sich bis zu Position 1002 erstreckt. Das Signalpeptid ist

im prozessierten Protein nicht mehr vorhanden, da es von einer Signalpeptidase während der Translation der DNA cotranslational abgespalten wird. Die ersten vier Aminosäuren der prozessierten α_1-Untereinheit sind in Position 1003 bis 1014 dargestellt (**NIQE**, gelber Kasten). Direkt im Anschluss folgt eine XhoI-Restriktionsschnittstelle (CTCGAG, Position 1015 bis 1020). Das inserierte GFP-Molekül (ECFP oder EYFP) befindet sich im Konstrukt zwischen Position 1016 bis 1740 (grüner Kasten). Im Anschluss an den GFP-Teil folgt erneut eine XhoI-Restriktionsschnittstelle (CTCGAG, Position 1738 bis 1743). Der restliche Teil der α_1-Untereinheit befindet sich zwischen Position 1744 und 3000 (gelber Kasten). Das Stopcodon befindet sich in Position 3001 bis 3003 (Stern, TGA).

A.2.2.2 Zwischen GFP-Molekül und den Rest der Untereinheit integriertes Epitop

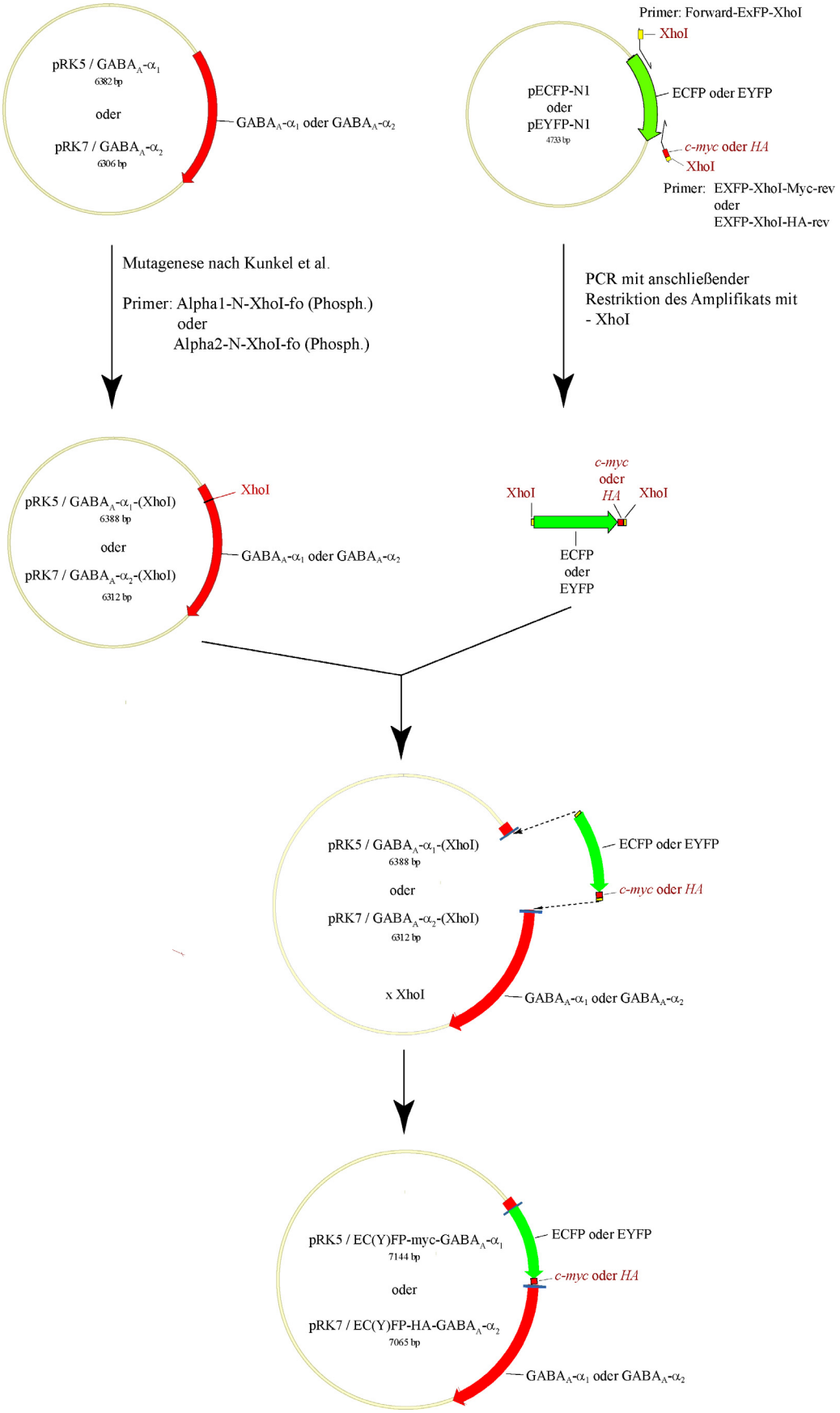


Abbildung A-10: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der Konstrukte pRK5/EC(Y)FP-myc-GABA$_A$-α$_1$ und pRK7/EC(Y)FP-HA-GABA$_A$-α$_2$. bp, „base pairs“ = Basenpaare.

```
                                                                  M  K  K  S  R  G  L  S  D  Y  L
 961 TGGAGCGATCCGGTGCCCAGAGGGggCCCCGAGCTGGACAAGCCCGTGATGAAGAAAAGTCGGGGTCTCTCTGACTATCT 1040
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 961 TGGAGCGATCCGGTGCCCAGAGGGggCCCCGAGCTGGACAAGCCCGTGATGAAGAAAAGTCGGGGTCTCTCTGACTATCT 1040
                                                                  M  K  K  S  R  G  L  S  D  Y  L
                 •       980         •      1000         •      1020         •      1040

                 •      1060         •      1080         •      1100         •      1120
      W  A  W  T  L  I  L  S  T  L  S  G  R  S  Y  G  Q  P  S  Q  L  E  M  V  S  K  G
1041 TTGGGCCTGGACCCTCATTCTGAGCACTCTCTCGGGAAGAAGCTATGGACAGCCCTCCCAACTCGAGATGGTGAGCAAGG 1120
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1041 TTGGGCCTGGACCCTCATTCTGAGCACTCTCTCGGGAAGAAGCTATGGACAGCCCTCCCAA==================== 1101
      W  A  W  T  L  I  L  S  T  L  S  G  R  S  Y  G  Q  P  S  Q
                 •      1060         •      1080         •      1100

                 •      1140         •      1160         •      1180         •      1200
        E  E  L  F  T  G  V  V  P  I  L  V  E  L  D  G  D  V  N  G  H  K  F  S  V  S
1121 GCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCC 1200
     ================================================================================

                                          ⋮

                 •      1780         •      1800         •      1820         •      1840
      M  V  L  L  E  F  V  T  A  A  G  I  T  L  G  M  D  E  L  Y  K  G  E  Q  K  L  I
1761 CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGGGAACAAAAACTCA 1840
     ================================================================================

                 •      1860         •      1880         •      1900         •      1920
        S  E  E  D  L  L  E  D  E  L  K  D  N  T  T  V  F  T  R  I  L  D  R  L  L  D
1841 TCTCAGAAGAGGATCTACTCGAGGATGAACTTAAGGACAACACCACTGTCTTCACGAGGATTTTGGACCGACTGCTGGAT 1920
                            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1102 =======================GATGAACTTAAGGACAACACCACTGTCTTCACGAGGATTTTGGACCGACTGCTGGAT 1158
                            D  E  L  K  D  N  T  T  V  F  T  R  I  L  D  R  L  L  D
                                      •      1120         •      1140         •

                                          ⋮

                 •      3060         •      3080         •      3100         •      3120
        A  F  P  L  L  F  G  I  F  N  L  V  Y  W  A  T  Y  L  N  R  E  P  Q  L  K  A
3041 TAGCCTTTCCGCTGCTATTTGGAATCTTTAACTTAGTCTATTGGGCCACGTATTTAAACAGAGAGCCTCAGCTAAAAGCC 3120
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2279 TAGCCTTTCCGCTGCTATTTGGAATCTTTAACTTAGTCTATTGGGCCACGTATTTAAACAGAGAGCCTCAGCTAAAAGCC 2358
        A  F  P  L  L  F  G  I  F  N  L  V  Y  W  A  T  Y  L  N  R  E  P  Q  L  K  A
   2280         •      2300         •      2320         •      2340         •

                 •      3140         •      3160         •      3180         •      3200
      P  T  P  H  Q  *
3121 CCCACACCCCATCAATAGGTTCTTTTAGTCGTATTCTGTTGTTCAGTCCTCTGCACTGAGAATCGCTTTCTGTTCTCAAC 3200
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2359 CCCACACCCCATCAATAGGTTCTTTTAGTCGTATTCTGTTGTTCAGTCCTCTGCACTGAGAATCGCTTTCTGTTCTCAAC 2438
      P  T  P  H  Q  *
   2360         •      2380         •      2400         •      2420         •
```

Abbildung A-11: Vergleich der Nukleinsäure- und Aminosäurensequenzen der Konstrukte pRK5/EC(Y)FP-myc-GABA$_A$-α_1 und pRK5/GABA$_A$-α_1 (wt). Dargestellt ist ein Vergleich der Sequenzen der Konstrukte pRK5/EC(Y)FP-myc-GABA$_A$-α_1 (obere drei Reihen) mit der Sequenz der Wildtyp-Form der Untereinheit α_1 (pRK5/GABA$_A$-α_1 (wt), untere drei Reihen). Die Zahlen deuten auf die einzelnen Positionen der Nukleinsäuren im Vektor. Der Übersicht wegen, wurde bei dieser Darstellung darauf verzichtet, die komplette DNA-Sequenz des klonierten Konstruktes im Vektor darzustellen. Das Startcodon befindet sich an Position 1009 (ATG, Pfeil) und markiert gleichzeitig den Beginn des Signalpeptids, welches sich bis zu Position 1089 erstreckt. Das Signalpeptid ist im prozessierten Protein nicht mehr vorhanden, da es von einer Signalpeptidase während der Translation der DNA cotranslational abgespalten wird. Die ersten vier Aminosäuren der prozessierten α_1-Untereinheit sind in Position

1090 bis 1101 dargestellt (**QPSQ**, gelber Kasten). Direkt im Anschluss folgt eine XhoI-Restriktionsschnittstelle (CTCGAG, Position 1102 bis 1107). Das inserierte GFP-Molekül (ECFP oder EYFP) befindet sich im Konstrukt zwischen Position 1108 bis 1827 (grüner Kasten). Im Anschluss an den GFP-Teil folgt ein *cMyc*-Epitop (**EQKLISEEDL**, Position 1828 bis 1857) und eine XhoI-Restriktionsschnittstelle (CTCGAG, Position 1858 bis 1863). Der restliche Teil der α_1-Untereinheit befindet sich zwischen Position 1864 und 3135 (gelber Kasten). Das Stopcodon befindet sich in Position 3136 bis 3138 (Stern, TAG).

```
                                                  •       900         •       920         •       940         •       960
                                                   M  R  T  K  L  S  T  C  N  V  W  F  P  L
 881 CACTCCCAGGTCCAACTGCACCTCGGTTCTAAGCTTCCATGAGGACAAAATTGAGCACTTGCAACGTATGGTTTCCGCTG 960
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 881 CACTCCCAGGTCCAACTGCACCTCGGTTCTAAGCTTCCATGAGGACAAAATTGAGCACTTGCAACGTATGGTTTCCGCTG 960
                                                   M  R  T  K  L  S  T  C  N  V  W  F  P  L
                                                  •       900         •       920         •       940         •       960

                                                  •       980         •      1000         •      1020         •      1040
     L  V  L  L  V  W  N  P  A  R  L  V  L  A  N  I  Q  E  L  E  M  V  S  K  G  E  E
 961 CTTGTTCTCCTGGTGTGGAACCCAGCCAGGTTGGTGCTGGCTAACATCCAAGAACTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA 1040
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 961 CTTGTTCTCCTGGTGTGGAACCCAGCCAGGTTGGTGCTGGCTAACATCCAAGAA============================ 1014
     L  V  L  L  V  W  N  P  A  R  L  V  L  A  N  I  Q  E
                                                  •       980         •      1000         •

                                                  •      1060         •      1080         •      1100         •      1120
      L  F  T  G  V  V  P  I  L  V  E  L  D  G  D  V  N  G  H  K  F  S  V  S  G  E  G
1041 GCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGG 1120
     ==============================================================================
                                                  •      1700         •      1720         •      1740         •      1760
     L  L  E  F  V  T  A  A  G  I  T  L  G  M  D  E  L  Y  K  G  Y  P  Y  D  V  P  D
1681 CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGGTACCCATACGATGTTCCAGA 1760
     ==============================================================================
                                                  •      1780         •      1800         •      1820         •      1840
      Y  A  L  E  D  E  A  K  N  N  I  T  I  F  T  R  I  L  D  R  L  L  D  G  Y  D  N
1761 TTACGCTCTCGAGGATGAGGCTAAAAATAATATCACCATCTTTACAAGAATTCTAGACAGACTTCTGGATGGTTACGATA 1840
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1015 =============GATGAGGCTAAAAATAATATCACCATCTTTACAAGAATTCTAGACAGACTTCTGGATGGTTACGATA 1081
                 D  E  A  K  N  N  I  T  I  F  T  R  I  L  D  R  L  L  D  G  Y  D  N
                                                  1020         •      1040         •      1060         •      1080

                                                  •      1940         •      1960         •      1980         •      2000
     D  T  D  M  E  Y  T  I  D  V  F  F  R  Q  K  W  K  D  E  R  L  K  F  K  G  P  M
1921 GATACAGATATGGAATATACAATAGATGTTTTCTTTCGACAAAAATGGAAAGACGAGCGGTTAAAATTTAAAGGTCCCAT 2000
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1162 GATACAGATATGGAATATACAATAGATGTTTTCTTTCGACAAAAATGGAAAGACGAGCGGTTAAAATTTAAAGGTCCCAT 1241
     D  T  D  M  E  Y  T  I  D  V  F  F  R  Q  K  W  K  D  E  R  L  K  F  K  G  P  M
                                                  •      1180         •      1200         •      1220         •      1240

                                                  •      2900         •      2920         •      2940         •      2960
     N  K  P  A  E  A  K  K  T  F  N  S  V  S  K  I  D  R  M  S  R  I  V  F  P  V  L
2881 AACAAGCCAGCCGAAGCCAAGAAAACTTTCAACAGTGTCAGCAAAATCGACAGAATGTCTAGAATAGTGTTCCCGGTTCT 2960
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2122 AACAAGCCAGCCGAAGCCAAGAAAACTTTCAACAGTGTCAGCAAAATCGACAGAATGTCTAGAATAGTGTTCCCGGTTCT 2201
     N  K  P  A  E  A  K  K  T  F  N  S  V  S  K  I  D  R  M  S  R  I  V  F  P  V  L
                                                  •      2140         •      2160         •      2180         •      2200

                                                  •      2980         •      3000         •      3020         •      3040
      F  G  T  F  N  L  V  Y  W  A  T  Y  L  N  R  E  P  V  L  G  V  S  P  *
2961 GTTTGGTACTTTTAATTTAGTTTACTGGGCTACGTATTTAAACCGGGAGCCTGTATTAGGGGTTAGTCCTTGAGTCTAGA 3040
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2202 GTTTGGTACTTTTAATTTAGTTTACTGGGCTACGTATTTAAACCGGGAGCCTGTATTAGGGGTTAGTCCTTGAGTCTAGA 2281
      F  G  T  F  N  L  V  Y  W  A  T  Y  L  N  R  E  P  V  L  G  V  S  P  *
                                                  •      2220         •      2240         •      2260         •      2280
```

Abbildung A-12: Vergleich der Nukleinsäure- und Aminosäurensequenzen der Konstrukte pRK7/EC(Y)FP-HA-GABA$_A$-α$_2$ und pRK7/GABA$_A$-α$_2$ (wt). Dargestellt ist ein Vergleich der Sequenzen der Konstrukte

pRK7/EC(Y)FP-HA-GABA$_A$-α_2 (obere drei Reihen) mit der Sequenz der Wildtyp-Form der Untereinheit α_2 (pRK7/GABA$_A$-α_2 (wt), untere drei Reihen). Die Zahlen deuten auf die einzelnen Positionen der Nukleinsäuren im Vektor. Der Übersicht wegen, wurde bei dieser Darstellung darauf verzichtet, die komplette DNA-Sequenz des klonierten Konstruktes im Vektor darzustellen. Das Startcodon befindet sich an Position 919 (ATG, Pfeil) und markiert gleichzeitig den Beginn des Signalpeptids, welches sich bis zu Position 1002 erstreckt. Das Signalpeptid ist im prozessierten Protein nicht mehr vorhanden, da es von einer Signalpeptidase während der Translation der DNA cotranslational abgespalten wird. Die ersten vier Aminosäuren der prozessierten α_1-Untereinheit sind in Position 1003 bis 1014 dargestellt (**NIQE**, gelber Kasten). Direkt im Anschluss folgt eine XhoI-Restriktionsschnittstelle (CTCGAG, Position 1015 bis 1020). Das inserierte GFP-Molekül (ECFP oder EYFP) befindet sich im Konstrukt zwischen Position 1016 bis 1740 (grüner Kasten). Im Anschluss an den GFP-Teil folgt ein HA-Epitop (**YPYDVPDYA**, Position 1741 bis 1767) und eine XhoI-Restriktionsschnittstelle (CTCGAG, Position 1768 bis 1773). Der restliche Teil der α_1-Untereinheit befindet sich zwischen Position 1774 und 3030 (gelber Kasten). Das Stopcodon befindet sich in Position 3031 bis 3033 (Stern, TGA).

A.2.2.3 Thrombin-Schnittstelle hinter der vierten Aminosäure der Untereinheit

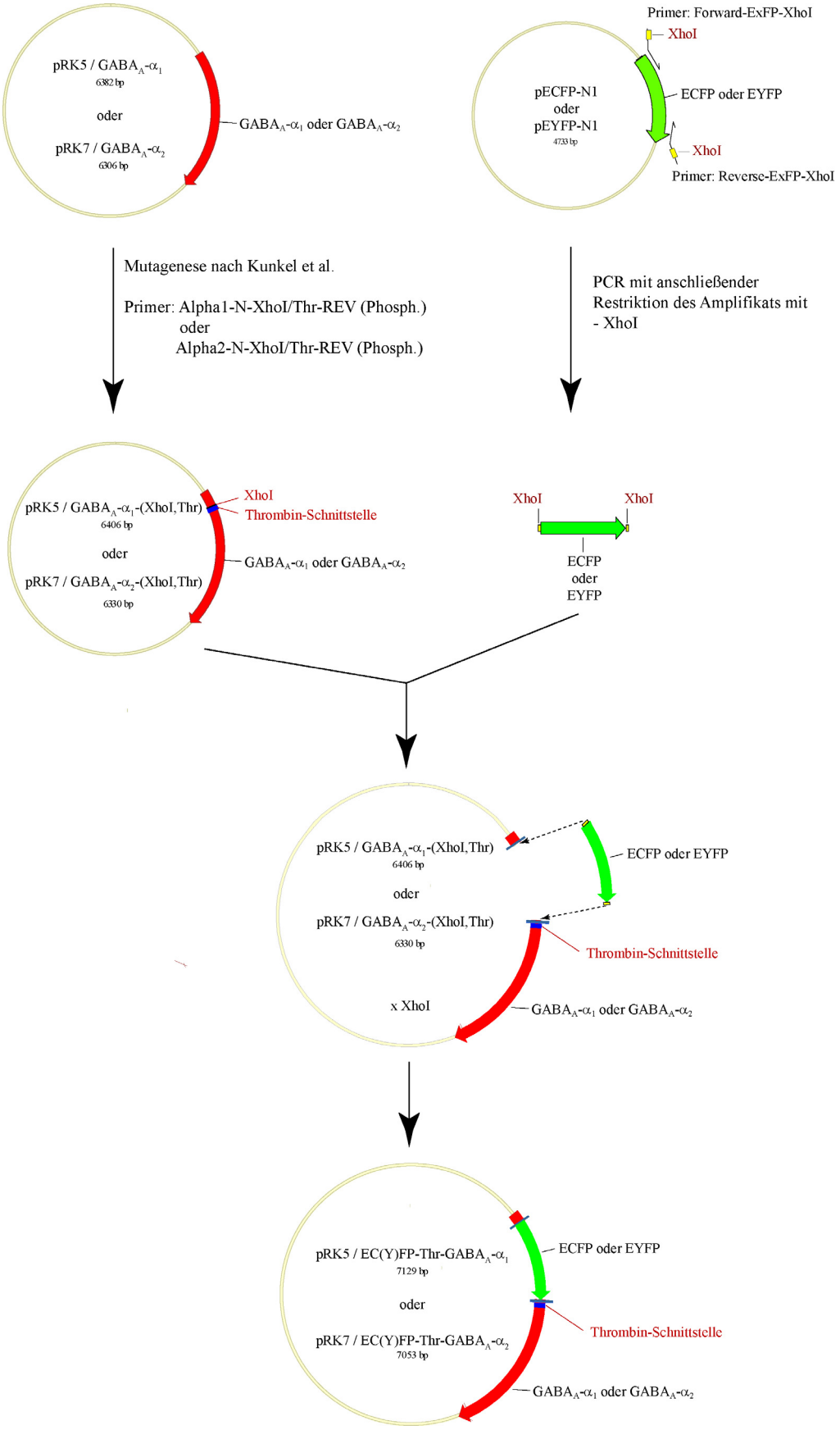


Abbildung A-13: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der Konstrukte pRK5/EC(Y)FP-Thr-GABA$_A$-α$_1$ und pRK7/EC(Y)FP-Thr-GABA$_A$-α$_2$. bp, „base pairs“ = Basenpaare.

```
                                                                  ---------->
                 •       980         •      1000         •      1020         •      1040
                                                          M  K  K  S  R  G  L  S  D  Y  L
 961 TGGAGCGATCCGGTGCCCAGAGGGggCCCCGAGCTGGACAAGCCCGTGATGAAGAAAAGTCGGGGTCTCTCTGACTATCT 1040
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 961 TGGAGCGATCCGGTGCCCAGAGGGggCCCCGAGCTGGACAAGCCCGTGATGAAGAAAAGTCGGGGTCTCTCTGACTATCT 1040
                                                          M  K  K  S  R  G  L  S  D  Y  L
                 •       980         •      1000         •      1020         •      1040

                 •      1060         •      1080         •      1100         •      1120
      W  A  W  T  L  I  L  S  T  L  S  G  R  S  Y  G  Q  P  S  Q  L  E  M  V  S  K  G
1041 TTGGGCCTGGACCCTCATTCTGAGCACTCTCTCGGGAAGAAGCTATGGACAGCCCTCCCAACTCGAGATGGTGAGCAAGG 1120
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1041 TTGGGCCTGGACCCTCATTCTGAGCACTCTCTCGGGAAGAAGCTATGGACAGCCCTCCCAA=================== 1101
      W  A  W  T  L  I  L  S  T  L  S  G  R  S  Y  G  Q  P  S  Q
                 •      1060         •      1080         •      1100

                 •      1140         •      1160         •      1180         •      1200
      E  E  L  F  T  G  V  V  P  I  L  V  E  L  D  G  D  V  N  G  H  K  F  S  V  S
1121 GCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCC 1200
     ================================================================================

                                                  ¦
                                                  ¦
                                                  ¦
                 •      1780         •      1800         •      1820         •      1840
      M  V  L  L  E  F  V  T  A  A  G  I  T  L  G  M  D  E  L  Y  K  L  E  L  V  P  R
1761 CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGCTCGAGCTGGTGCCCC 1840
     ==============================================================================

                 •      1860         •      1880         •      1900         •      1920
        G  S  D  E  L  K  D  N  T  T  V  F  T  R  I  L  D  R  L  L  D  G  Y  D  N  R
1841 GGGGGTCGGATGAACTTAAGGACAACACCACTGTCTTCACGAGGATTTTGGACCGACTGCTGGATGGTTATGACAATCGT 1920
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1102 ========GATGAACTTAAGGACAACACCACTGTCTTCACGAGGATTTTGGACCGACTGCTGGATGGTTATGACAATCGT 1173
             D  E  L  K  D  N  T  T  V  F  T  R  I  L  D  R  L  L  D  G  Y  D  N  R
                      •      1120         •      1140         •      1160         •

                                                  ¦
                                                  ¦
                                                  ¦
                 •      3060         •      3080         •      3100         •      3120
      F  G  I  F  N  L  V  Y  W  A  T  Y  L  N  R  E  P  Q  L  K  A  P  T  P  H  Q
3041 TATTTGGAATCTTTAACTTAGTCTATTGGGCCACGTATTTAAACAGAGAGCCTCAGCTAAAAGCCCCCACACCCCATCAA 3120
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2294 TATTTGGAATCTTTAACTTAGTCTATTGGGCCACGTATTTAAACAGAGAGCCTCAGCTAAAAGCCCCCACACCCCATCAA 2373
      F  G  I  F  N  L  V  Y  W  A  T  Y  L  N  R  E  P  Q  L  K  A  P  T  P  H  Q
        2300         •      2320         •      2340         •      2360         •

                 •      3140         •      3160         •      3180         •      3200
     *
3121 TAGGTTCTTTTAGTCGTATTCTGTTGTTCAGTCCTCTGCACTGAGAATCGCTTTCTGTTCTCAACGCAGTGATTCCTGTC 3200
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2374 TAGGTTCTTTTAGTCGTATTCTGTTGTTCAGTCCTCTGCACTGAGAATCGCTTTCTGTTCTCAACGCAGTGATTCCTGTC 2453
     *
        2380         •      2400         •      2420         •      2440         •
```

Abbildung A-14: Vergleich der Nukleinsäure- und Aminosäurensequenzen der Konstrukte pRK5 / EC(Y)FP-Thr(N4)-GABA$_A$-α_1 und pRK5 / GABA$_A$-α_1 (wt). Dargestellt ist ein Vergleich der Sequenzen der Konstrukte pRK5 / EC(Y)FP-Thr(N4)-GABA$_A$-α_1 (obere drei Reihen) mit der Sequenz der Wildtyp-Form der Untereinheit α_1 (pRK5 / GABA$_A$-α_1 (wt), untere drei Reihen). Die Zahlen deuten auf die einzelnen Positionen der Nukleinsäuren im Vektor. Der Übersicht wegen, wurde bei dieser Darstellung darauf verzichtet, die komplette DNA-Sequenz des klonierten Konstruktes im Vektor darzustellen. Das Startcodon befindet sich an Position 1009 (ATG, Pfeil) und markiert gleichzeitig den Beginn des Signalpeptids, welches sich bis zu Position 1089 erstreckt. Das Signalpeptid ist im prozessierten Protein nicht mehr vorhanden, da es von einer Signalpeptidase während der Translation der DNA cotranslational abgespalten wird. Die ersten vier Aminosäuren der prozessierten α_1-Untereinheit sind in Position 1090

bis 1101 dargestellt (QPSQ, gelber Kasten). Direkt im Anschluss folgt eine XhoI-Restriktionsschnittstelle (CTCGAG, Position 1102 bis 1107). Das inserierte GFP-Molekül (ECFP oder EYFP) befindet sich im Konstrukt zwischen Position 1108 bis 1824 (grüner Kasten). Danach folgt eine erneute XhoI-Restriktionsschnittstelle (CTCGAG, Position 1825 bis 1830) gefolgt von der inserierten Erkennungssequenz für die Protease Thrombin (ΛçΠΡΓΣ, Position 1831 bis 1848). Der restliche Teil der α_1-Untereinheit befindet sich zwischen Position 1849 und 3120 (gelber Kasten). Das Stopcodon befindet sich in Position 3121 bis 3123 (Stern, TAG).

```
                                                  M  R  T  K  L  S  T  C  N  V  W  F  P  L
 881 CACTCCCAGGTCCAACTGCACCTCGGTTCTAAGCTTCCATGAGGACAAAATTGAGCACTTGCAACGTATGGTTTCCGCTG 960
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 881 CACTCCCAGGTCCAACTGCACCTCGGTTCTAAGCTTCCATGAGGACAAAATTGAGCACTTGCAACGTATGGTTTCCGCTG 960
                                                  M  R  T  K  L  S  T  C  N  V  W  F  P  L
                 •       900         •       920         •       940         •       960

                 •       980         •      1000         •      1020         •      1040
     L  V  L  L  V  W  N  P  A  R  L  V  L  A  N  I  Q  E  L  E  M  V  S  K  G  E  E
 961 CTTGTTCTCCTGGTGTGGAACCCAGCCAGGTTGGTGCTGGCTAACATCCAAGAACTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA 1040
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 961 CTTGTTCTCCTGGTGTGGAACCCAGCCAGGTTGGTGCTGGCTAACATCCAAGAA=========================== 1014
     L  V  L  L  V  W  N  P  A  R  L  V  L  A  N  I  Q  E
                 •       980         •      1000         •

                 •      1060         •      1080         •      1100         •      1120
      L  F  T  G  V  V  P  I  L  V  E  L  D  G  D  V  N  G  H  K  F  S  V  S  G  E  G
1041 GCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGG 1120
     ================================================================================

                                                  ⋮

                 •      1620         •      1640         •      1660         •      1680
      L  L  P  D  N  H  Y  L  S  T  Q  S  A  L  S  K  D  P  N  E  K  R  D  H  M  V
1601 TGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTC 1680
     ================================================================================

                 •      1700         •      1720         •      1740         •      1760
     L  L  E  F  V  T  A  A  G  I  T  L  G  M  D  E  L  Y  K  L  E  L  V  P  R  G  S
1681 CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGCTCGAGCTGGTGCCCCGGGGGTC 1760
     ================================================================================

                 •      1780         •      1800         •      1820         •      1840

      D  E  A  K  N  N  I  T  I  F  T  R  I  L  D  R  L  L  D  G  Y  D  N  R  L  R  P
1761 GGATGAGGCTAAAAATAATATCACCATCTTTACAAGAATTCTAGACAGACTTCTGGATGGTTACGATAATCGTCTTAGAC 1840
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1015 =GATGAGGCTAAAAATAATATCACCATCTTTACAAGAATTCTAGACAGACTTCTGGATGGTTACGATAATCGTCTTAGAC 1093
      D  E  A  K  N  N  I  T  I  F  T  R  I  L  D  R  L  L  D  G  Y  D  N  R  L  R  P
        1020         •      1040         •      1060         •      1080         •

                                                  ⋮

                 •      2900         •      2920         •      2940         •      2960
     E  A  K  K  T  F  N  S  V  S  K  I  D  R  M  S  R  I  V  F  P  V  L  F  G  T  F
2881 GAAGCCAAGAAAACTTTCAACAGTGTCAGCAAAATCGACAGAATGTCTAGAATAGTGTTCCCGGTTCTGTTTGGTACTTT 2960
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2134 GAAGCCAAGAAAACTTTCAACAGTGTCAGCAAAATCGACAGAATGTCTAGAATAGTGTTCCCGGTTCTGTTTGGTACTTT 2213
     E  A  K  K  T  F  N  S  V  S  K  I  D  R  M  S  R  I  V  F  P  V  L  F  G  T  F
        2140         •      2160         •      2180         •      2200         •

                 •      2980         •      3000         •      3020         •      3040
      N  L  V  Y  W  A  T  Y  L  N  R  E  P  V  L  G  V  S  P  *
2961 TAATTTAGTTTACTGGGCTACGTATTTAAACCGGGAGCCTGTATTAGGGGTTAGTCCTTGAGTCTAGACATTGTTACTTG 3040
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2214 TAATTTAGTTTACTGGGCTACGTATTTAAACCGGGAGCCTGTATTAGGGGTTAGTCCTTGAGTCTAGACATTGTTACTTG 2293
      N  L  V  Y  W  A  T  Y  L  N  R  E  P  V  L  G  V  S  P
        2220         •      2240         •      2260         •      2280         •
```

Abbildung A-15: Vergleich der Nukleinsäure- und Aminosäurensequenzen der Konstrukte pRK7 / EC(Y)FP-Thr(N4)-GABA$_A$-α$_2$ und pRK7 / GABA$_A$-α$_2$ (wt). Dargestellt ist ein Vergleich der Sequenzen der Konstrukte pRK7

/ EC(Y)FP-Thr(N4)-GABA$_A$-α_2 (obere drei Reihen) mit der Sequenz der Wildtyp-Form der Untereinheit α_2 (pRK7 / GABA$_A$-α_2 (wt), untere drei Reihen). Die Zahlen deuten auf die einzelnen Positionen der Nukleinsäuren im Vektor. Der Übersicht wegen, wurde bei dieser Darstellung darauf verzichtet, die komplette DNA-Sequenz des klonierten Konstruktes im Vektor darzustellen. Das Startcodon befindet sich an Position 919 (ATG, Pfeil) und markiert gleichzeitig den Beginn des Signalpeptids, welches sich bis zu Position 1000 erstreckt. Das Signalpeptid ist im prozessierten Protein nicht mehr vorhanden, da es von einer Signalpeptidase während der Translation der DNA cotranslational abgespalten wird. Die ersten vier Aminosäuren der prozessierten α_2-Untereinheit sind in Position 1003 bis 1014 dargestellt (**NIQE**, gelber Kasten). Direkt im Anschluss folgt eine XhoI-Restriktionsschnittstelle (CTCGAG, Position 1015 bis 1020). Das inserierte GFP-Molekül (ECFP oder EYFP) befindet sich im Konstrukt zwischen Position 1021 bis 1737 (grüner Kasten). Direkt anschließend an den GFP-Teil des Moleküls folgt eine erneute XhoI-Restriktionsschnittstelle (CTCGAG, Position 1738 bis 1743) gefolgt von der inserierten Erkennungssequenz für die Protease Thrombin (**LVPRGS**, Position 1744 bis 1761). Der restliche Teil der α_2-Untereinheit befindet sich zwischen Position 1762 und 3018 (gelber Kasten). Das Stopcodon befindet sich in Position 3019 bis 3021 (Stern, TGA).

A.2.2.4 Thrombin-Schnittstelle hinter GFP-Molekül und immunoreaktivem Epitop

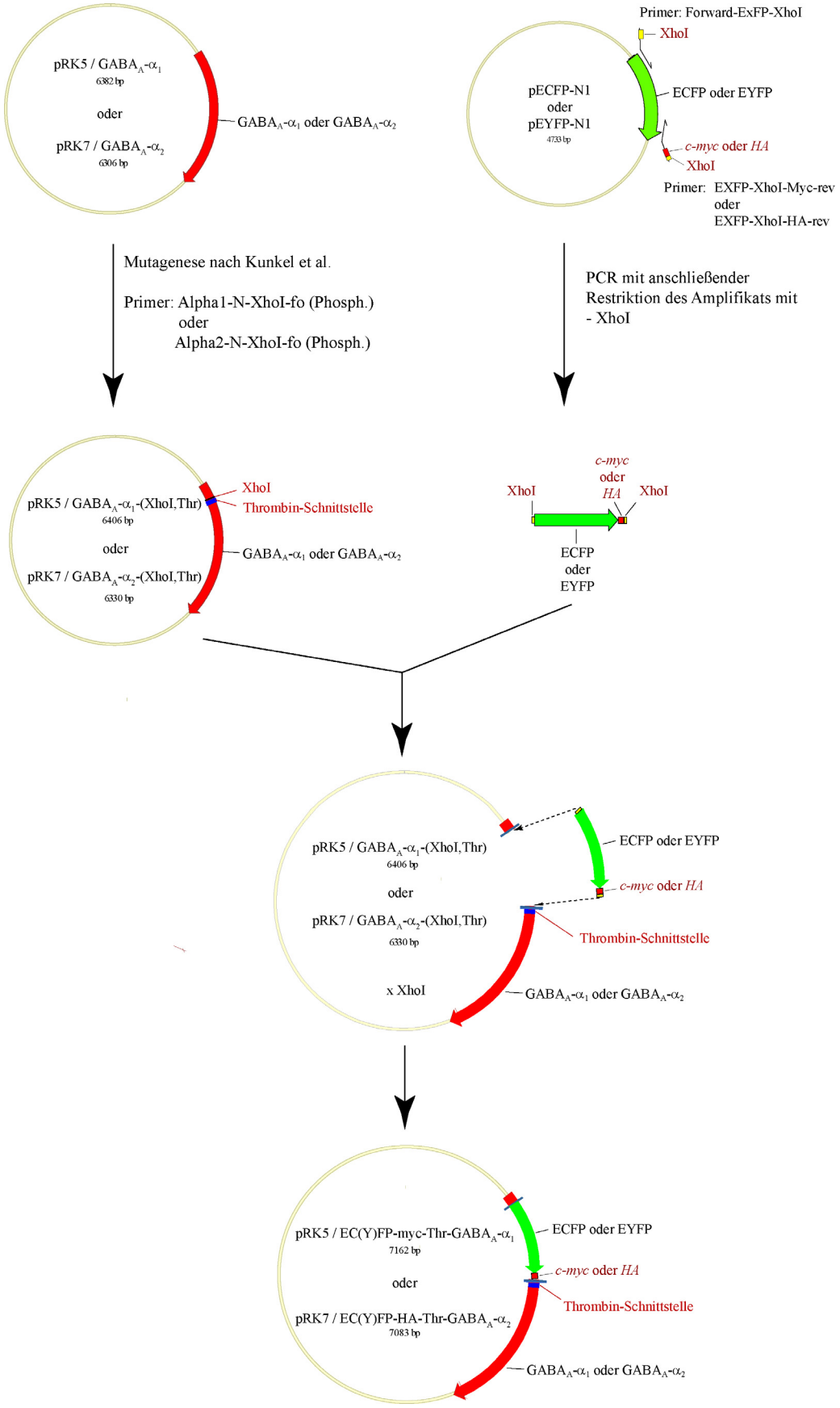


Abbildung A-16: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der Konstrukte pRK5/EC(Y)FP-myc-Thr-GABA$_A$-α$_1$ und pRK7/EC(Y)FP-HA-Thr-GABA$_A$-α$_2$. bp, „base pairs“ = Basenpaare.

```
                                                                                  M  K  K  S  R  G  L  S  D  Y  L
 960 CTGGAGCGATCCGGTGCCCAGAGGGggCCCCGAGCTGGACAAGCCCGTGATGAAGAAAAGTCGGGGTCTCTCTGACTATC 1039
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 960 CTGGAGCGATCCGGTGCCCAGAGGGggCCCCGAGCTGGACAAGCCCGTGATGAAGAAAAGTCGGGGTCTCTCTGACTATC 1039
                                                                                  M  K  K  S  R  G  L  S  D  Y  L

1040 TTTGGGCCTGGACCCTCATTCTGAGCACTCTCTCGGGAAGAAGCTATGGACAGCCCTCCCAACTCGAGATGGTGAGCAAG 1119
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1040 TTTGGGCCTGGACCCTCATTCTGAGCACTCTCTCGGGAAGAAGCTATGGACAGCCCTCCCAA=================== 1101

1760 ACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGGGAACAAAAACTC 1839
     ==========================================================================================

1840 ATCTCAGAAGAGGATCTGCTCGAGCTGGTGCCCCGGGGGTCGGATGAACTTAAGGACAACACCACTGTCTTCACGAGGAT 1919
                                                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1102 ========================================GATGAACTTAAGGACAACACCACTGTCTTCACGAGGAT 1139

3040 ATCGACCGACTGTCAAGAATAGCCTTTCCGCTGCTATTTGGAATCTTTAACTTAGTCTATTGGGCCACGTATTTAAACAG 3119
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2260 ATCGACCGACTGTCAAGAATAGCCTTTCCGCTGCTATTTGGAATCTTTAACTTAGTCTATTGGGCCACGTATTTAAACAG 2339

3120 AGAGCCTCAGCTAAAAGCCCCCACACCCCATCAATAGGTTCTTTTAGTCGTATTCTGTTGTTCAGTCCTCTGCACTGAGA 3199
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2340 AGAGCCTCAGCTAAAAGCCCCCACACCCCATCAATAGGTTCTTTTAGTCGTATTCTGTTGTTCAGTCCTCTGCACTGAGA 2419
```

Abbildung A-17: Vergleich der Nukleinsäure- und Aminosäurensequenzen der Konstrukte pRK5/EC(Y)FPmycThr(N4)-GABA$_A$-α$_1$ und pRK5/GABA$_A$-α$_1$ (wt). Dargestellt ist ein Vergleich der Sequenzen der

Konstrukte pRK5 / EC(Y)FPmycThr(N4)-$GABA_A$-α_1 (obere drei Reihen) mit der Sequenz der Wildtyp-Form der Untereinheit α_1 (pRK5 / $GABA_A$-α_1 (wt), untere drei Reihen). Die Zahlen deuten auf die einzelnen Positionen der Nukleinsäuren im Vektor. Der Übersicht wegen, wurde bei dieser Darstellung darauf verzichtet, die komplette DNA-Sequenz des klonierten Konstruktes im Vektor darzustellen.Das Startcodon befindet sich an Position 1009 (ATG, Pfeil) und markiert gleichzeitig den Beginn des Signalpeptids, welches sich bis zu Position 1089 erstreckt. Das Signalpeptid ist im prozessierten Protein nicht mehr vorhanden, da es von einer Signalpeptidase während der Translation der DNA cotranslational abgespalten wird. Die ersten vier Aminosäuren der prozessierten α_1-Untereinheit sind in Position 1090 bis 1101 dargestellt (**QPSQ**, gelber Kasten). Direkt anschließend wurde eine XhoI-Restriktionsschnittstelle eingefügt (**CTCGAG**, Position 1102 bis 1107). Das inserierte GFP-Molekül (ECFP oder EYFP) befindet sich im Konstrukt zwischen Position 1108 bis 1827 (grüner Kasten). Im Anschluss an den GFP-Teil folgt ein cmyc-Epitop (**EQKLISEEDL**, Position 1828 bis 1857), eine XhoI-Restriktionsschnittstelle (**CTCGAG**, Position 1858 bis 1863), sowie eine Erkennungssequenz der Protease Thrombin (**LVPRGS**, Position 1864 bis 1881). Der restliche Teil der α_1-Untereinheit befindet sich zwischen Position 1882 und 3153 (gelber Kasten). Das Stopcodon befindet sich in Position 3154 bis 3156 (Stern, TAG).

```
                                                  →
            •       900         •       920         •       940         •       960
                                         M  R  T  K  L  S  T  C  N  V  W  F  P  L
 881 CACTCCCAGGTCCAACTGCACCTCGGTTCTAAGCTTCCATGAGGACAAAATTGAGCACTTGCAACGTATGGTTTCCGCTG 960
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 881 CACTCCCAGGTCCAACTGCACCTCGGTTCTAAGCTTCCATGAGGACAAAATTGAGCACTTGCAACGTATGGTTTCCGCTG 960
                                         M  R  T  K  L  S  T  C  N  V  W  F  P  L
            •       900         •       920         •       940         •       960

            •       980         •      1000         •      1020         •      1040
     L  V  L  L  V  W  N  P  A  R  L  V  L  A  N  I  Q  E  L  E  M  V  S  K  G  E  E
 961 CTTGTTCTCCTGGTGTGGAACCCAGCCAGGTTGGTGCTGGCTAACATCCAAGAACTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA 1040
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 961 CTTGTTCTCCTGGTGTGGAACCCAGCCAGGTTGGTGCTGGCTAACATCCAAGAA=========================== 1014
     L  V  L  L  V  W  N  P  A  R  L  V  L  A  N  I  Q  E
            •       980         •      1000         •

            •      1060         •      1080         •      1100         •      1120
      L  F  T  G  V  V  P  I  L  V  E  L  D  G  D  V  N  G  H  K  F  S  V  S  G  E  G
1041 GCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGG 1120
     ================================================================================

                                                  ⋮

            •      1700         •      1720         •      1740         •      1760
     L  L  E  F  V  T  A  A  G  I  T  L  G  M  D  E  L  Y  K  G  Y  P  Y  D  V  P  D
1681 CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGGTACCCATACGATGTTCCAGA 1760
     ==================================================================================

            •      1780         •      1800         •      1820         •      1840
      Y  A  L  E  L  V  P  R  G  S  D  E  A  K  N  N  I  T  I  F  T  R  I  L  D  R  L
1761 TTACGCTCTCGAGCTGGTGCCCCGGGGGTCGGATGAGGCTAAAAATAATATCACCATCTTTACAAGAATTCTAGACAGAC 1840
                                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1015 ================================GATGAGGCTAAAAATAATATCACCATCTTTACAAGAATTCTAGACAGAC 1063
                                   D  E  A  K  N  N  I  T  I  F  T  R  I  L  D  R  L
                                     1020         •      1040         •      1060

            •      1860         •      1880         •      1900         •      1920
      L  D  G  Y  D  N  R  L  R  P  G  L  G  D  S  I  T  E  V  F  T  N  I  Y  V  T
1841 TTCTGGATGGTTACGATAATCGTCTTAGACCAGGACTGGGAGACAGCATTACTGAAGTCTTCACCAACATCTATGTGACC 1920
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1064 TTCTGGATGGTTACGATAATCGTCTTAGACCAGGACTGGGAGACAGCATTACTGAAGTCTTCACCAACATCTATGTGACC 1143
      L  D  G  Y  D  N  R  L  R  P  G  L  G  D  S  I  T  E  V  F  T  N  I  Y  V  T
           •      1080         •      1100         •      1120         •      1140

                                                  ⋮

            •      2980         •      3000         •      3020         •      3040
      I  V  F  P  V  L  F  G  T  F  N  L  V  Y  W  A  T  Y  L  N  R  E  P  V  L  G  V
2961 AATAGTGTTCCCGGTTCTGTTTGGTACTTTTAATTTAGTTTACTGGGCTACGTATTTAAACCGGGAGCCTGTATTAGGGG 3040
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2184 AATAGTGTTCCCGGTTCTGTTTGGTACTTTTAATTTAGTTTACTGGGCTACGTATTTAAACCGGGAGCCTGTATTAGGGG 2263
      I  V  F  P  V  L  F  G  T  F  N  L  V  Y  W  A  T  Y  L  N  R  E  P  V  L  G  V
           •      2200         •      2220         •      2240         •      2260

            •      3060         •      3080         •      3100         •      3120
      S  P  *
3041 TTAGTCCTTGAGTCTAGACATTGTTACTTGGGCTGTATTGCAGTGTTATATTTAGTTTTGTTTTGTTTTGTTTGTTTCAT 3120
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2264 TTAGTCCTTGAGTCTAGACATTGTTACTTGGGCTGTATTGCAGTGTTATATTTAGTTTTGTTTTGTTTTGTTTGTTTCAT 2343
      S  P  *
           •      2280         •      2300         •      2320         •      2340
```

Abbildung A-18: Vergleich der Nukleinsäure- und Aminosäurensequenzen der Konstrukte pRK7/EC(Y)FP-HA-Thr(N4)-GABA$_A$-α$_2$ und pRK7/GABA$_A$-α$_2$ (wt). Dargestellt ist ein Vergleich der Sequenzen der Konstrukte

pRK7 / EC(Y)FP-HA-Thr(N4)-$GABA_A$-α_2 (obere drei Reihen) mit der Sequenz der Wildtyp-Form der Untereinheit α_2 (pRK7 / $GABA_A$-α_2 (wt), untere drei Reihen). Die Zahlen deuten auf die einzelnen Positionen der Nukleinsäuren im Vektor. Der Übersicht wegen, wurde bei dieser Darstellung darauf verzichtet, die komplette DNA-Sequenz des klonierten Konstruktes im Vektor darzustellen.Das Startcodon befindet sich an Position 919 (ATG, Pfeil) und markiert gleichzeitig den Beginn des Signalpeptids, welches sich bis zu Position 1002 erstreckt. Das Signalpeptid ist im prozessierten Protein nicht mehr vorhanden, da es von einer Signalpeptidase während der Translation der DNA cotranslational abgespalten wird. Die ersten vier Aminosäuren der prozessierten α_1-Untereinheit sind in Position 1003 bis 1014 dargestellt (**NIQE**, gelber Kasten). Direkt anschließend wurde eine XhoI-Restriktionsschnittstelle eingefügt (**CTCGAG**, Position 1015 bis 1020). Das inserierte GFP-Molekül (ECFP oder EYFP) befindet sich im Konstrukt zwischen Position 1021 bis 1740 (grüner Kasten). Im Anschluss an den GFP-Teil folgt ein HA-Epitop (**YPYDVPDYA**, Position 1741 bis 1767), eine XhoI-Restriktionsschnittstelle (**CTCGAG**, Position 1768 bis 1773), sowie eine Erkennungssequenz der Protease Thrombin (**LVPRGS**, Position 1774 bis 1791). Der restliche Teil der α_1-Untereinheit befindet sich zwischen Position 1791 und 3048 (gelber Kasten). Das Stopcodon befindet sich in Position 3049 bis 3051 (Stern, TGA).

A.2.2.5 Generierung eines Abstandshalters zwischen GFP-Molekül und dem Rest der Untereinheit (Reaktion 1)

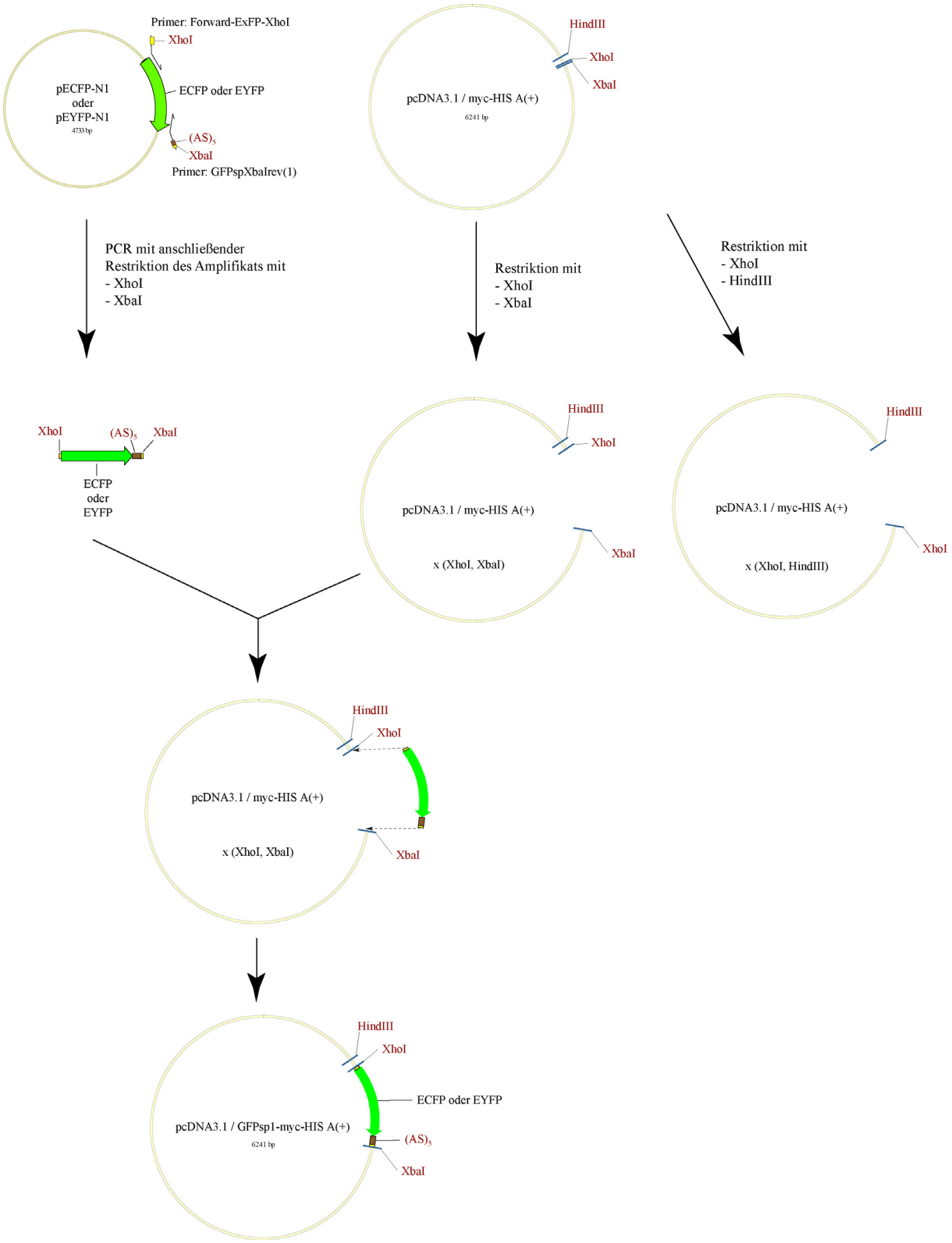


Abbildung A-19: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der Konstrukte pRK5/EC(Y)FPsp50-Thr-GABA$_A$-α_1 und pRK7/EC(Y)FPsp50-Thr-GABA$_A$-α_2. Schritt 1 von 5

A.2.2.6 Generierung eines Abstandshalters zwischen GFP-Molekül und dem Rest der Untereinheit (Reaktion 2)

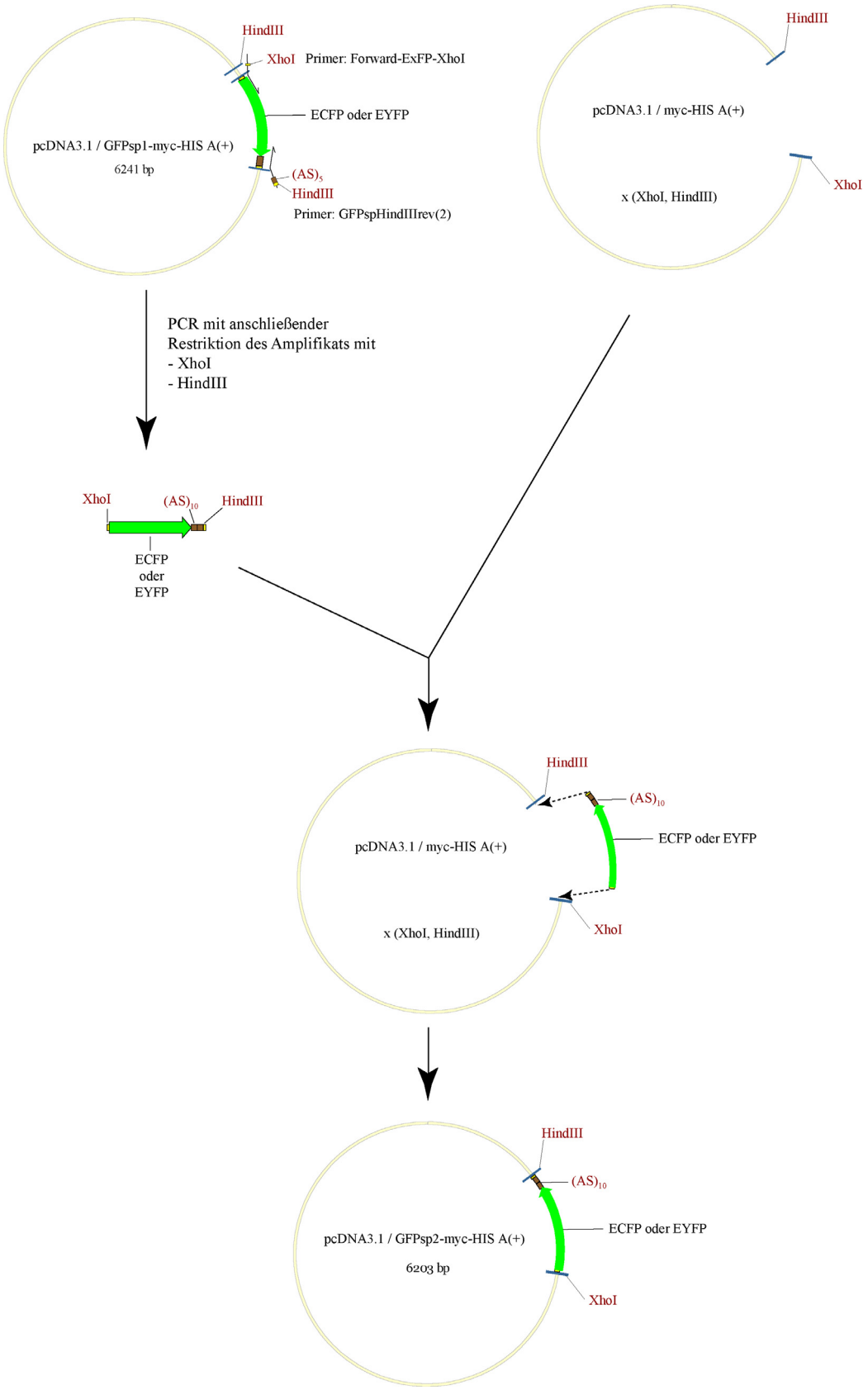


Abbildung A-20: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der Konstrukte pRK5/EC(Y)FPsp50-Thr-GABA$_A$-α_1 und pRK7/EC(Y)FPsp50-Thr-GABA$_A$-α_2. Schritt 2 von 5

A.2.2.7 Generierung eines Abstandshalters zwischen GFP-Molekül und dem Rest der Untereinheit (Reaktion3)

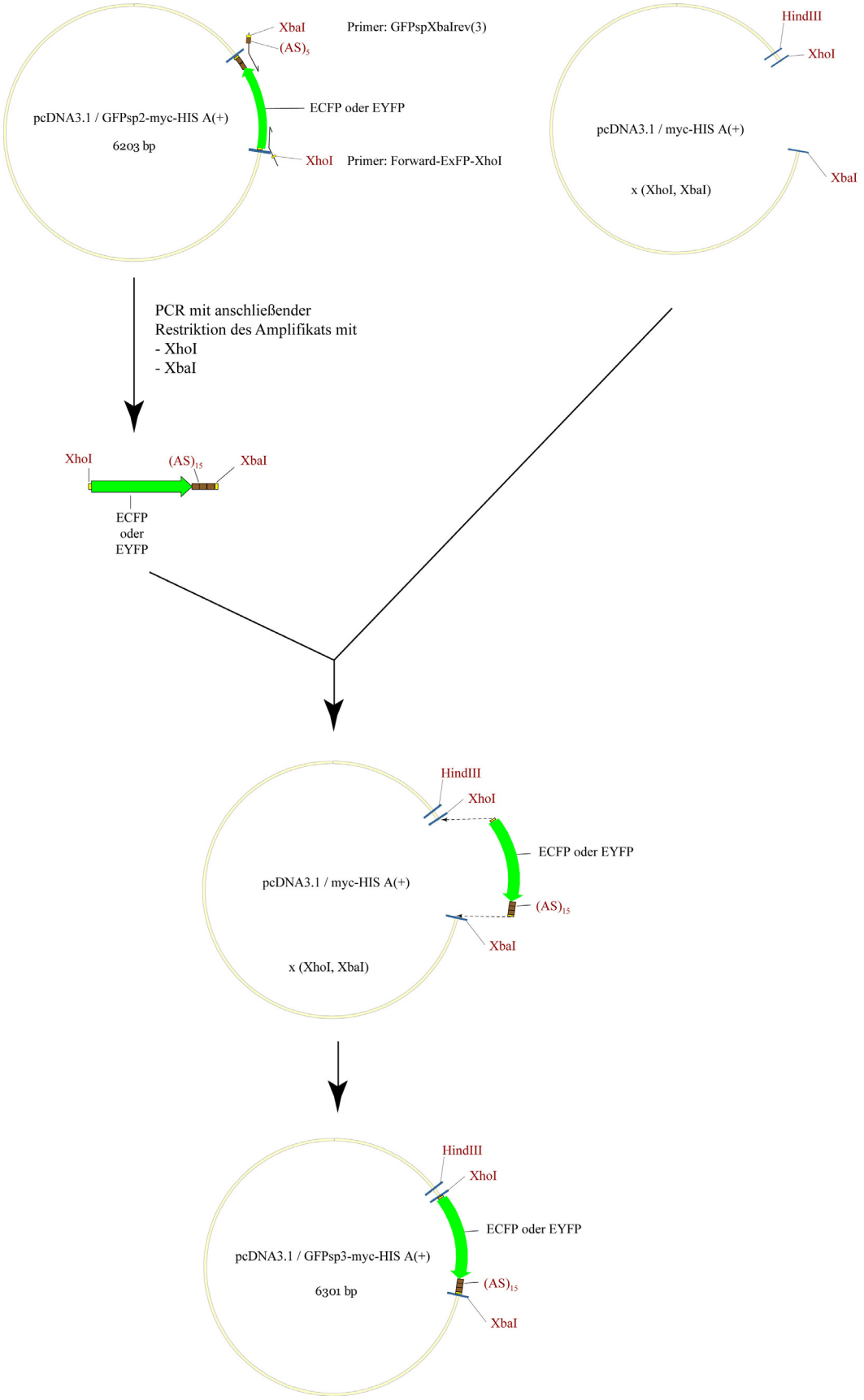


Abbildung A-21: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der Konstrukte pRK5/EC(Y)FPsp50-Thr-GABA$_A$-α_1 und pRK7/EC(Y)FPsp50-Thr-GABA$_A$-α_2. Schritt 3 von 5

A.2.2.8 Generierung eines Abstandshalters zwischen GFP-Molekül und dem Rest der Untereinheit (Reaktion 4)

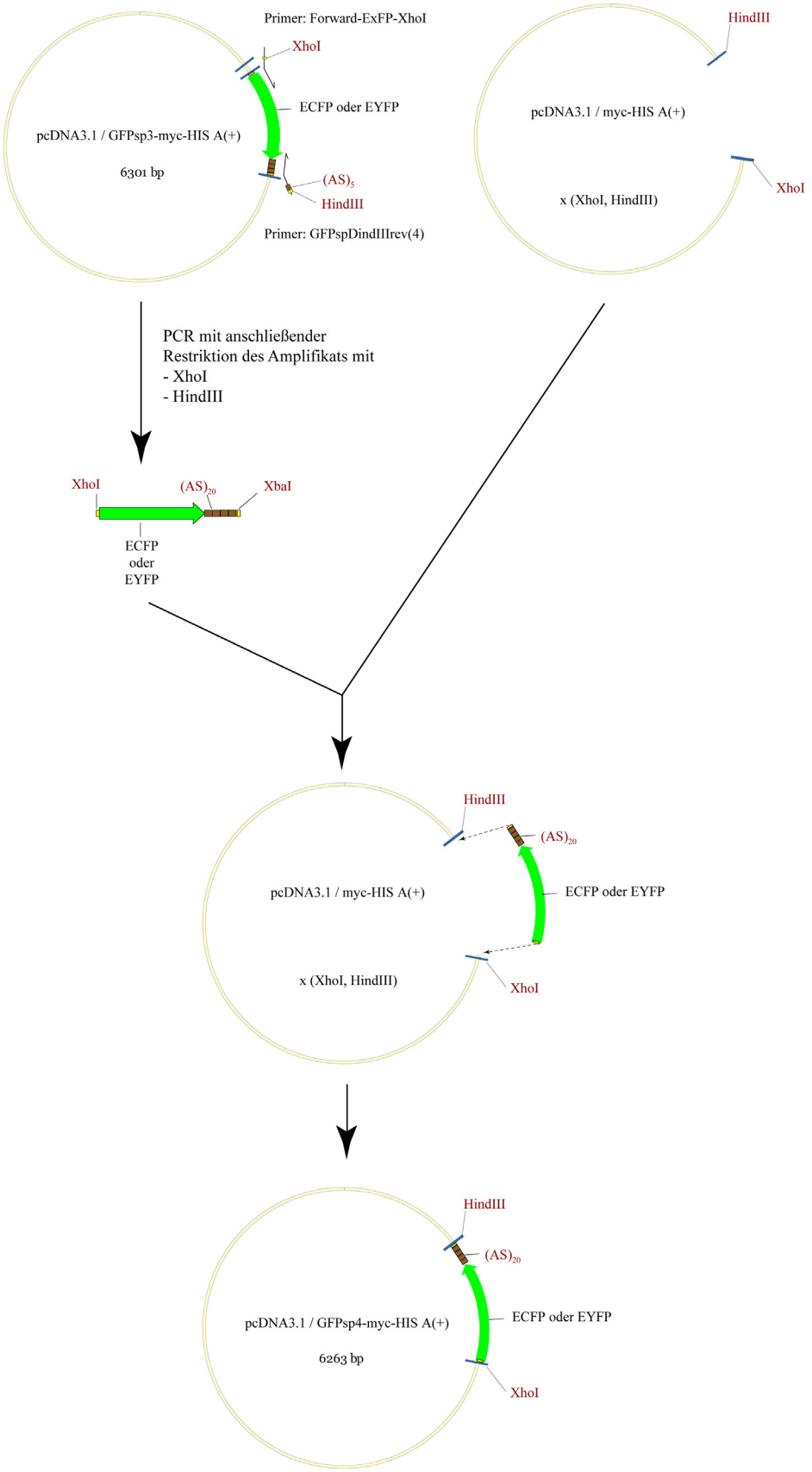


Abbildung A-22: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der Konstrukte pRK5/EC(Y)FPsp50-Thr-GABA$_A$-α_1 und pRK7/EC(Y)FPsp50-Thr-GABA$_A$-α_2. Schritt 4 von 5

A.2.2.9 Generierung eines Abstandshalters zwischen GFP-Molekül und dem Rest der Untereinheit (Reaktion 5)

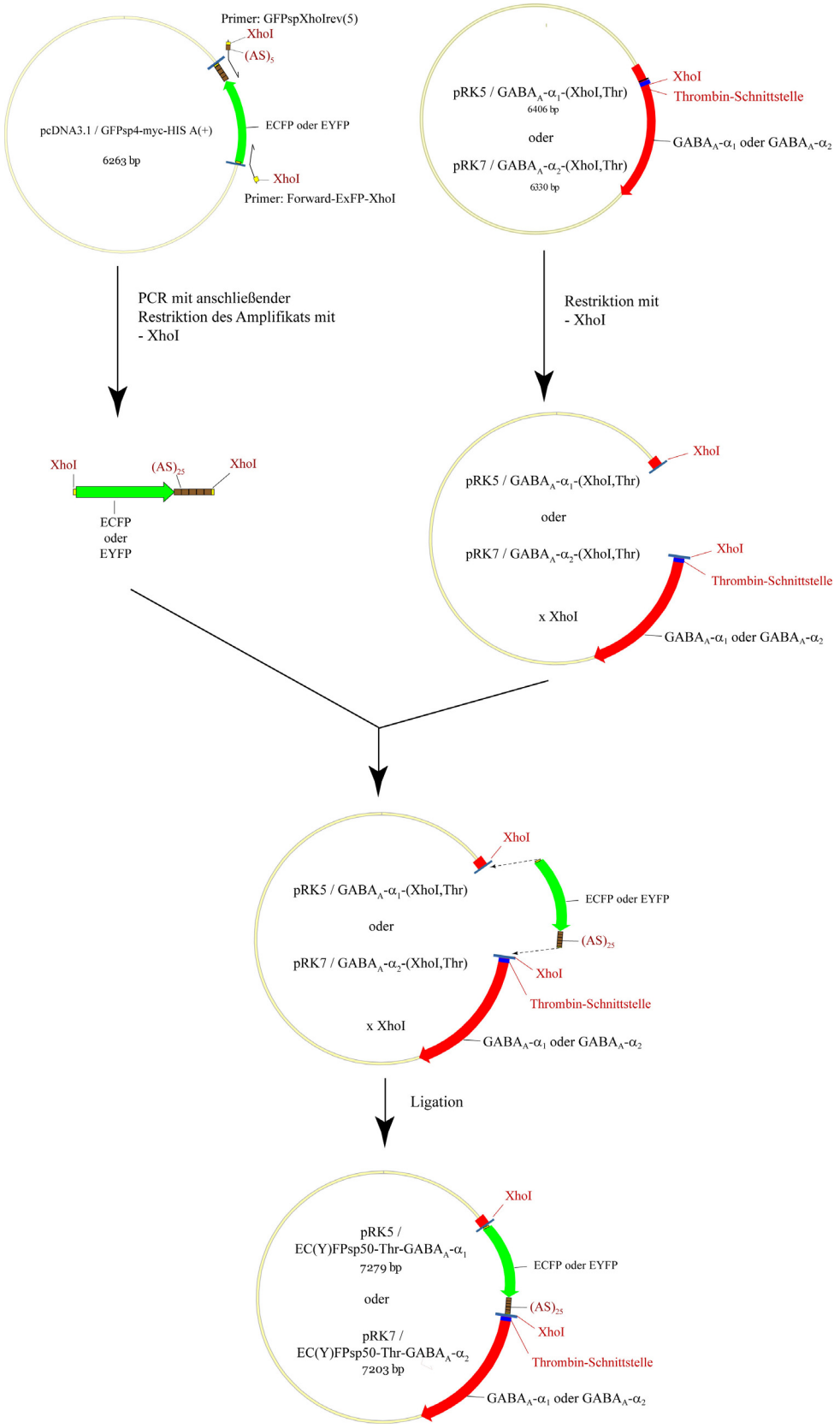


Abbildung A-23: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der Konstrukte pRK5/EC(Y)FPsp50-Thr-GABA$_A$-α$_1$ und pRK7/EC(Y)FPsp50-Thr-GABA$_A$-α$_2$. bp, Basenpaare.

```
                                                                  →
            •       980         •      1000         •      1020         •      1040
                                                     M  K  K  S  R  G  L  S  D  Y  L
 961 TGGAGCGATCCGGTGCCCAGAGGGggCCCCGAGCTGGACAAGCCCGTGATGAAGAAAAGTCGGGGTCTCTCTGACTATCT 1040
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 961 TGGAGCGATCCGGTGCCCAGAGGGggCCCCGAGCTGGACAAGCCCGTGATGAAGAAAAGTCGGGGTCTCTCTGACTATCT 1040
                                                     M  K  K  S  R  G  L  S  D  Y  L
            •       980         •      1000         •      1020         •      1040

            •      1060         •      1080         •      1100         •      1120
      W  A  W  T  L  I  L  S  T  L  S  G  R  S  Y  G  Q  P  S  Q  L  E  M  V  S  K  G
1041 TTGGGCCTGGACCCTCATTCTGAGCACTCTCTCGGGAAGAAGCTATGGACAGCCCTCCCAACTCGAGATGGTGAGCAAGG 1120
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1041 TTGGGCCTGGACCCTCATTCTGAGCACTCTCTCGGGAAGAAGCTATGGACAGCCCTCCCAA==================== 1101
      W  A  W  T  L  I  L  S  T  L  S  G  R  S  Y  G  Q  P  S  Q
            •      1060         •      1080         •      1100

            •      1140         •      1160         •      1180         •      1200
      E  E  L  F  T  G  V  V  P  I  L  V  E  L  D  G  D  V  N  G  H  K  F  S  V  S
1121 GCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCC 1200
     ================================================================================

                                        ⋮

            •      1780         •      1800         •      1820         •      1840
      M  V  L  L  E  F  V  T  A  A  G  I  T  L  G  M  D  E  L  Y  K  A  S  A  S  A  S
1761 CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGCATCAGCATCAGCAT 1840
     ================================================================================

            •      1860         •      1880         •      1900         •      1920
      A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S
1841 CAGCATCAGCATCAGCGTCTGCTTCTGCTTCTGCTTCTGCAAGTGCGTCGGCGTCGGCGTCGGCGTCGGCGTCGGCCTCC 1920
     ================================================================================

            •      1940         •      1960         •      1980         •      2000
      A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  L  E  L  V  P  R  G  S  D
1921 GCCTCCGCCTCCGCCTCCGCCTCCGCTAGTGCAAGTGCTAGTGCAAGTGCTAGTCTCGAGCTGGTGCCCCGGGGGTCGGA 2000
                                                                                    ||
1102 ================================================================================GA 1103
                                                                                    D

            •      2020         •      2040         •      2060         •      2080
      E  L  K  D  N  T  T  V  F  T  R  I  L  D  R  L  L  D  G  Y  D  N  R  L  R  P  G
2001 TGAACTTAAGGACAACACCACTGTCTTCACGAGGATTTTGGACCGACTGCTGGATGGTTATGACAATCGTCTGAGACCAG 2080
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1104 TGAACTTAAGGACAACACCACTGTCTTCACGAGGATTTTGGACCGACTGCTGGATGGTTATGACAATCGTCTGAGACCAG 1183
      E  L  K  D  N  T  T  V  F  T  R  I  L  D  R  L  L  D  G  Y  D  N  R  L  R  P  G
            •      1120         •      1140         •      1160         •      1180

                                        ⋮

            •      3220         •      3240         •      3260         •      3280
      F  N  L  V  Y  W  A  T  Y  L  N  R  E  P  Q  L  K  A  P  T  P  H  Q  *
3201 CTTTAACTTAGTCTATTGGGCCACGTATTTAAACAGAGAGCCTCAGCTAAAAGCCCCCACACCCCATCAATAGGTTCTTT 3280
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2304 CTTTAACTTAGTCTATTGGGCCACGTATTTAAACAGAGAGCCTCAGCTAAAAGCCCCCACACCCCATCAATAGGTTCTTT 2383
      F  N  L  V  Y  W  A  T  Y  L  N  R  E  P  Q  L  K  A  P  T  P  H  Q  *
            •      2320         •      2340         •      2360         •      2380
```

Abbildung A-24: Vergleich der Nukleinsäure- und Aminosäurensequenzen der Konstrukte pRK5/EC(Y)FPsp50-Thr(N4)-GABA$_A$-α$_1$ und pRK5/GABA$_A$-α$_1$ (wt). Dargestellt ist ein Vergleich der Sequenzen

der Konstrukte pRK5/EC(Y)FPsp50-Thr(N4)-$GABA_A$-α_1 (obere drei Reihen) mit der Sequenz der Wildtyp-Form der Untereinheit α_1 (pRK5/$GABA_A$-α_1 (wt), untere drei Reihen). Die Zahlen deuten auf die einzelnen Positionen der Nukleinsäuren im Vektor. Der Übersicht wegen, wurde bei dieser Darstellung darauf verzichtet, die komplette DNA-Sequenz des klonierten Konstruktes im Vektor darzustellen. Buchstaben bezeichnen die Aminosäuren im „Ein-Buchtaben-Code“. Das Startcodon befindet sich an Position 1009 (ATG, Pfeil) und markiert gleichzeitig den Beginn des Signalpeptids, welches sich bis zu Position 1089 erstreckt. Das Signalpeptid ist im prozessierten Protein nicht mehr vorhanden, da es von einer Signalpeptidase während der Translation der DNA cotranslational abgespalten wird. Die ersten vier Aminosäuren der prozessierten α_1-Untereinheit sind in Position 1090 bis 1101 dargestellt (**QPSQ**, gelber Kasten). Direkt im Anschluss folgt eine XhoI-Restriktionsschnittstelle (CTCGAG, Position 1102 bis 1107). Das inserierte GFP-Molekül (ECFP oder EYFP) befindet sich im Konstrukt zwischen Position 1108 bis 1824 (grüner Kasten). Zusätzlich wurde ein 50 Aminosäuren umfassender Abstandshalter „in-frame“ inseriert. Der Abstandshalter umfasst eine 25-fache alternierende Abfolge der Aminosäuren Alanin (A) und Serin (S) (blauer Kasten, Positionen 1825 bis 1974). Direkt anschließend an den Alanin-Serin Abstandshalter folgt eine erneute XhoI-Restriktionsschnittstelle (CTCGAG, Position 1975 bis 1980) gefolgt von der inserierten Erkennungssequenz für die Protease Thrombin (**LVPRGS**, Position 1981 bis 1998). Der restliche Teil der α_1-Untereinheit befindet sich zwischen Position 1999 und 3270 (gelber Kasten). Das Stopcodon befindet sich in Position 3271 bis 3273 (Stern, TAG).

```
                                                  →
            •       900         •       920         •       940         •       960
                                         M  R  T  K  L  S  T  C  N  V  W  F  P  L
 881 CACTCCCAGGTCCAACTGCACCTCGGTTCTAAGCTTCCATGAGGACAAAATTGAGCACTTGCAACGTATGGTTTCCGCTG 960
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 881 CACTCCCAGGTCCAACTGCACCTCGGTTCTAAGCTTCCATGAGGACAAAATTGAGCACTTGCAACGTATGGTTTCCGCTG 960
                                         M  R  T  K  L  S  T  C  N  V  W  F  P  L
            •       900         •       920         •       940         •       960

            •       980         •      1000         •      1020         •      1040
     L  V  L  L  V  W  N  P  A  R  L  V  L  A  N  I  Q  E  L  E  M  V  S  K  G  E  E
 961 CTTGTTCTCCTGGTGTGGAACCCAGCCAGGTTGGTGCTGGCTAACATCCAAGAACTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA 1040
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 961 CTTGTTCTCCTGGTGTGGAACCCAGCCAGGTTGGTGCTGGCTAACATCCAAGAA=========================== 1014
     L  V  L  L  V  W  N  P  A  R  L  V  L  A  N  I  Q  E
            •       980         •      1000         •

            •      1060         •      1080         •      1100         •      1120
      L  F  T  G  V  V  P  I  L  V  E  L  D  G  D  V  N  G  H  K  F  S  V  S  G  E  G
1041 GCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGG 1120
     ==============================================================================

                                                  ¦
                                                  ¦
            •      1700         •      1720         •      1740         •      1760
     L  L  E  F  V  T  A  A  G  I  T  L  G  M  D  E  L  Y  K  A  S  A  S  A  S  A  S
1681 CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGCATCAGCATCAGCATCAGCATC 1760
     ==============================================================================

            •      1780         •      1800         •      1820         •      1840
      A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A
1761 AGCATCAGCGTCTGCTTCTGCTTCTGCTTCTGCAAGTGCGTCGGCGTCGGCGTCGGCGTCGGCGTCGGCCTCCGCCTCCG 1840
     ==============================================================================

            •      1860         •      1880         •      1900         •      1920
       S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  L  E  L  V  P  R  G  S  D  E  A
1841 CCTCCGCCTCCGCCTCCGCTAGTGCAAGTGCTAGTGCAAGTGCTAGTCTCGAGCTGGTGCCCCGGGGGTCGGATGAGGCT 1920
                                                                            |||||||||
1015 ==============================================================================GATGAGGCT 1023
                                                                            D  E  A
                                                                                1020

            •      1940         •      1960         •      1980         •      2000
     K  N  N  I  T  I  F  T  R  I  L  D  R  L  L  D  G  Y  D  N  R  L  R  P  G  L  G
1921 AAAAATAATATCACCATCTTTACAAGAATTCTAGACAGACTTCTGGATGGTTACGATAATCGTCTTAGACCAGGACTGGG 2000
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1024 AAAAATAATATCACCATCTTTACAAGAATTCTAGACAGACTTCTGGATGGTTACGATAATCGTCTTAGACCAGGACTGGG 1103
     K  N  N  I  T  I  F  T  R  I  L  D  R  L  L  D  G  Y  D  N  R  L  R  P  G  L  G
            •      1040         •      1060         •      1080         •      1100

                                                  ¦
                                                  ¦
            •      3140         •      3160         •      3180         •      3200
     Y  W  A  T  Y  L  N  R  E  P  V  L  G  V  S  P  *
3121 TACTGGGCTACGTATTTAAACCGGGAGCCTGTATTAGGGGTTAGTCCTTGAGTCTAGACATTGTTACTTGGGCTGTATTG 3200
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2224 TACTGGGCTACGTATTTAAACCGGGAGCCTGTATTAGGGGTTAGTCCTTGAGTCTAGACATTGTTACTTGGGCTGTATTG 2303
     Y  W  A  T  Y  L  N  R  E  P  V  L  G  V  S  P  *
            •      2240         •      2260         •      2280         •      2300
```

Abbildung A-25: Vergleich der Nukleinsäure- und Aminosäurensequenzen der Konstrukte pRK7 / EC(Y)FPsp50-Thr(N4)-GABA$_A$-α$_2$ und pRK7 / GABA$_A$-α$_2$ (wt). Dargestellt ist ein Vergleich der Sequenzen der

Konstrukte pRK7 / EC(Y)FPsp50-Thr(N4)-$GABA_A$-α_2 (obere drei Reihen) mit der Sequenz der Wildtyp-Form der Untereinheit α_2 (pRK7 / $GABA_A$-α_2 (wt), untere drei Reihen). Die Zahlen deuten auf die einzelnen Positionen der Nukleinsäuren im Vektor. Der Übersicht wegen, wurde bei dieser Darstellung darauf verzichtet, die komplette DNA-Sequenz des klonierten Konstruktes im Vektor darzustellen. Das Startcodon befindet sich an Position 919 (ATG, Pfeil) und markiert gleichzeitig den Beginn des Signalpeptids, welches sich bis zu Position 1002 erstreckt. Das Signalpeptid ist im prozessierten Protein nicht mehr vorhanden, da es von einer Signalpeptidase während der Translation der DNA cotranslational abgespalten wird. Die ersten vier Aminosäuren der prozessierten α_2-Untereinheit sind in Position 1003 bis 1014 dargestellt (**NIQE**, gelber Kasten). Direkt im Anschluss folgt eine XhoI-Restriktionsschnittstelle (CTCGAG, Position 1015 bis 1020). Das inserierte GFP-Molekül (ECFP oder EYFP) befindet sich im Konstrukt zwischen Position 1021 bis 1736 (grüner Kasten). Zusätzlich wurde ein 50 Aminosäuren umfassender Abstandshalter „in-frame“ inseriert. Der Abstandshalter besteht aus einer 25-fach alternierenden Abfolge der Aminosäuren Alanin (A) und Serin (S) (blauer Kasten, Positionen 1737 bis 1887). Direkt anschließend an den Alanin-Serin Abstandshalter folgt eine erneute XhoI-Restriktionsschnittstelle (CTCGAG, Position 1889 bis 1893) gefolgt von der inserierten Erkennungssequenz für die Protease Thrombin (**LVPRGS**, Position 1894 bis 1911). Der restliche Teil der α_2-Untereinheit befindet sich zwischen Position 1912 und 3168 (gelber Kasten). Das Stopcodon befindet sich in Position 3169 bis 3171 (Stern, TAG).

A.2.2.10 Generierung eines Abstandshalters zwischen GFP-Molekül und Untereinheit und Insertion einer zusätzlichen TEV-Schnittstelle (Reaktion 5)

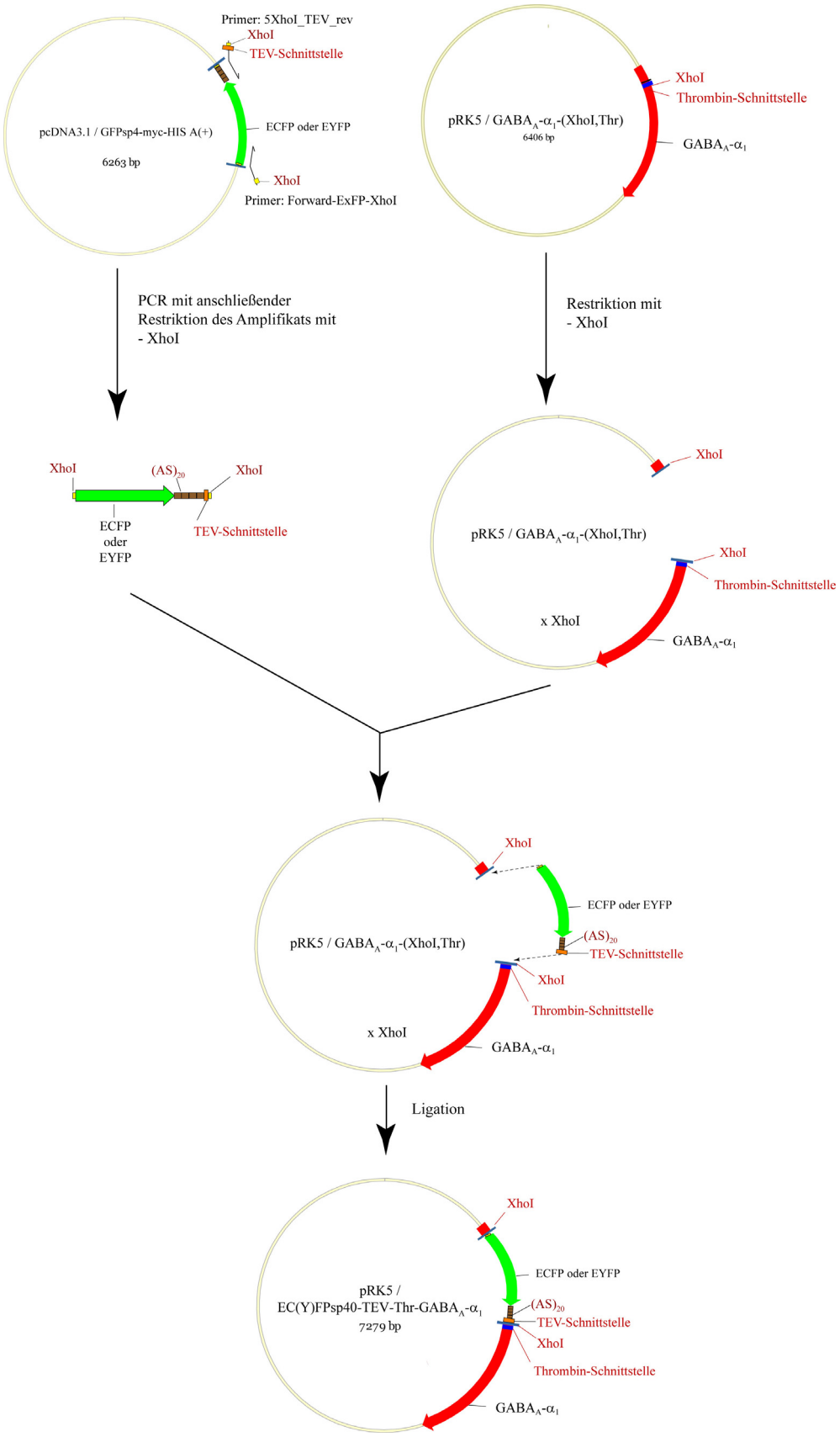


Abbildung A-26: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der Konstrukte pRK5/EC(Y)FPsp40-TEV-Thr-GABA$_A$-α$_1$. bp, „base pairs“ = Basenpaare.

```
                                                                  •      980         •      1000         •      1020         •      1040
                                                                  M  K  K  S  R  G  L  S  D  Y  L
 961 TGGAGCGATCCGGTGCCCAGAGGGggCCCCGAGCTGGACAAGCCCGTGATGAAGAAAAGTCGGGGTCTCTCTGACTATCT 1040
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 961 TGGAGCGATCCGGTGCCCAGAGGGggCCCCGAGCTGGACAAGCCCGTGATGAAGAAAAGTCGGGGTCTCTCTGACTATCT 1040
                                                                  M  K  K  S  R  G  L  S  D  Y  L
                                                                  •      980         •      1000         •      1020         •      1040

                                                                  •     1060         •      1080         •      1100         •      1120
                                                                  W  A  W  T  L  I  L  S  T  L  S  G  R  S  Y  G  Q  P  S  Q  L  E  M  V  S  K  G
1041 TTGGGCCTGGACCCTCATTCTGAGCACTCTCTCGGGAAGAAGCTATGGACAGCCCTCCCAACTCGAGATGGTGAGCAAGG 1120
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1041 TTGGGCCTGGACCCTCATTCTGAGCACTCTCTCGGGAAGAAGCTATGGACAGCCCTCCCAA=================== 1101
                                                                  W  A  W  T  L  I  L  S  T  L  S  G  R  S  Y  G  Q  P  S  Q
                                                                  •     1060         •      1080         •      1100

                                                                  •     1140         •      1160         •      1180         •      1200
                                                                    E  E  L  F  T  G  V  V  P  I  L  V  E  L  D  G  D  V  N  G  H  K  F  S  V  S
1121 GCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCC 1200
     ================================================================================

                                                                  •     1780         •      1800         •      1820         •      1840
                                                                   M  V  L  L  E  F  V  T  A  A  G  I  T  L  G  M  D  E  L  Y  K  A  S  A  S  A  S
1761 CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGCATCAGCATCAGCAT 1840
     ================================================================================

                                                                  •     1860         •      1880         •      1900         •      1920
                                                                    A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S  A  S
1841 CAGCATCAGCATCAGCGTCTGCTTCTGCTTCTGCTTCTGCAAGTGCGTCGGCGTCGGCGTCGGCGTCGGCGTCGGCCTCC 1920
     ================================================================================

                                                                  •     1940         •      1960         •      1980         •      2000
                                                                  A  S  A  S  A  S  A  S  E  N  L  Y  F  Q  G  A  A  S  L  E  L  V  P  R  G  S  D
1921 GCCTCCGCCTCCGCCTCCGCCTCCGAGAATCTGTACTTTCAGGGAGCTGCTAGTCTCGAGCTGGTGCCCCGGGGGTCGGA 2000
                                                                                                                                                ||
1102 ==========================================================================================GA 1103
                                                                                                                                                D

                                                                  •     2020         •      2040         •      2060         •      2080
                                                                   E  L  K  D  N  T  T  V  F  T  R  I  L  D  R  L  L  D  G  Y  D  N  R  L  R  P  G
2001 TGAACTTAAGGACAACACCACTGTCTTCACGAGGATTTTGGACCGACTGCTGGATGGTTATGACAATCGTCTGAGACCAG 2080
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1104 TGAACTTAAGGACAACACCACTGTCTTCACGAGGATTTTGGACCGACTGCTGGATGGTTATGACAATCGTCTGAGACCAG 1183
                                                                   E  L  K  D  N  T  T  V  F  T  R  I  L  D  R  L  L  D  G  Y  D  N  R  L  R  P  G
                                                                        •      1120         •      1140         •      1160         •      1180

                                                                  •     3220         •      3240         •      3260         •      3280
                                                                   F  N  L  V  Y  W  A  T  Y  L  N  R  E  P  Q  L  K  A  P  T  P  H  Q  *
3201 CTTTAACTTAGTCTATTGGGCCACGTATTTAAACAGAGAGCCTCAGCTAAAAGCCCCCACACCCCATCAATAGGTTCTTT 3280
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2304 CTTTAACTTAGTCTATTGGGCCACGTATTTAAACAGAGAGCCTCAGCTAAAAGCCCCCACACCCCATCAATAGGTTCTTT 2383
                                                                   F  N  L  V  Y  W  A  T  Y  L  N  R  E  P  Q  L  K  A  P  T  P  H  Q  *
                                                                        •      2320         •      2340         •      2360         •      2380
```

Abbildung A-27: Vergleich der Nukleinsäure- und Aminosäurensequenzen der Konstrukte pRK5/EYFPsp40TEV-Thr(N4)-GABA$_A$-α$_1$ und pRK5/GABA$_A$-α$_1$ (wt). Dargestellt ist ein Vergleich der Sequenzen

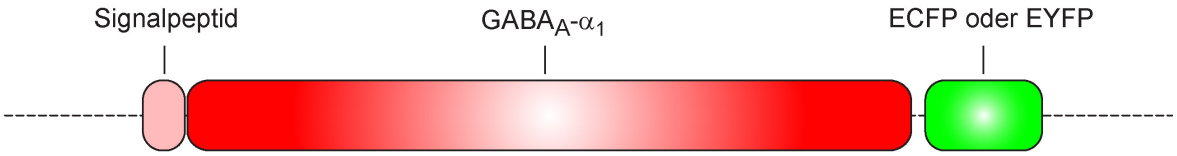
der Konstrukte pRK5 / EYFPsp40TEV-Thr(N4)-$GABA_A$-α_1 (obere drei Reihen) mit der Sequenz der Wildtyp-Form der Untereinheit α_1 (pRK5 / $GABA_A$-α_1 (wt), untere drei Reihen). Die Zahlen deuten auf die einzelnen Positionen der Nukleinsäuren im Vektor. Der Übersicht wegen, wurde bei dieser Darstellung darauf verzichtet, die komplette DNA-Sequenz des klonierten Konstruktes im Vektor darzustellen. Das Startcodon befindet sich an Position 1009 (ATG, Pfeil) und markiert gleichzeitig den Beginn des Signalpeptids, welches sich bis zu Position 1089 erstreckt. Das Signalpeptid ist im prozessierten Protein nicht mehr vorhanden, da es von einer Signalpeptidase während der Translation der DNA cotranslational abgespalten wird. Die ersten vier Aminosäuren der prozessierten α_1-Untereinheit sind in Position 1090 bis 1101 dargestellt (QPSQ, gelber Kasten). Direkt im Anschluss folgt eine XhoI-Restriktionsschnittstelle (CTCGAG, Position 1102 bis 1107). Das inserierte GFP-Molekül (ECFP oder EYFP) befindet sich im Konstrukt zwischen Position 1108 bis 1824 (grüner Kasten). Zusätzlich wurde ein 40 Aminosäuren umfassender Abstandshalter „in-frame“ inseriert. Der Abstandshalter umfasst eine 20-fache alternierende Abfolge der Aminosäuren Alanin (A) und Serin (S) (blauer Kasten, Positionen 1825 bis 1944). Zusätzlich wurde eine Erkennungssequenz für die kleine virale Protease des „tobacco etch“ Virus’ (TEV) eingefügt (ENLYFQG, Positionen 1945 bis 1966). Es folgt eine erneute XhoI-Restriktionsschnittstelle (CTCGAG, Position 1975 bis 1980) und die inserierte Erkennungssequenz der Protease Thrombin (LVPRGS, Position 1981 bis 1998). Der restliche Teil der α_1-Untereinheit befindet sich zwischen Position 1999 und 3270 (gelber Kasten). Das Stopcodon befindet sich in Position 3271 bis 3273 (Stern, TAG).

A.3 Vektorinformationen

A.3.1 C-terminal markierte $GABA_A$-Rezeptor-Untereinheiten

A.3.1.1 Kurzer Abstandshalter zwischen GFP und Untereinheit

A



B

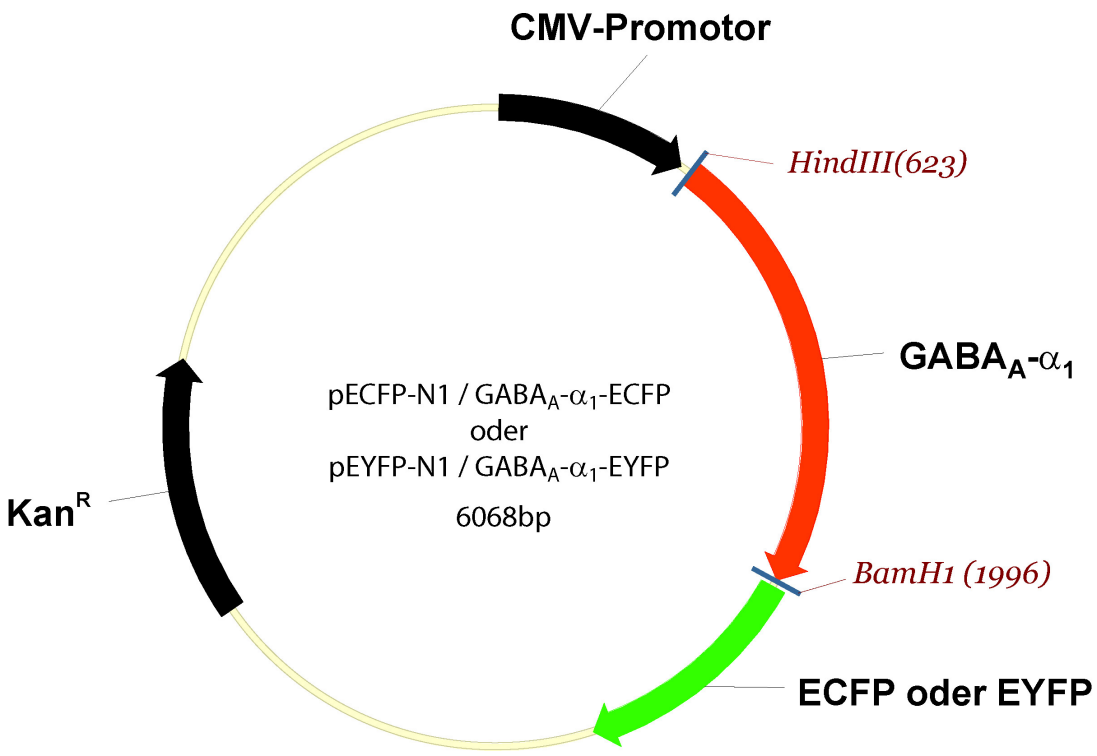


Abbildung A-28: pECFP/$GABA_A$-α_1-ECFP oder pEYFP/$GABA_A$-α_1-EYFP. (A) Schematische Darstellung der Lage wichtiger Domänen; **(B)** Vektorkarte mit der Lage der einzelnen Sequenzbereiche. Die Richtung der Pfeile gibt die Richtung der Leseraster der einzelnen Sequenzabschnitte an. In Klammern ist jeweils die Lage der angegebenen Restriktionsschnittstellen angegeben. Kan^R, Kanamyzin-Resistenzgen; bp, „base pairs“ = Basenpaare.

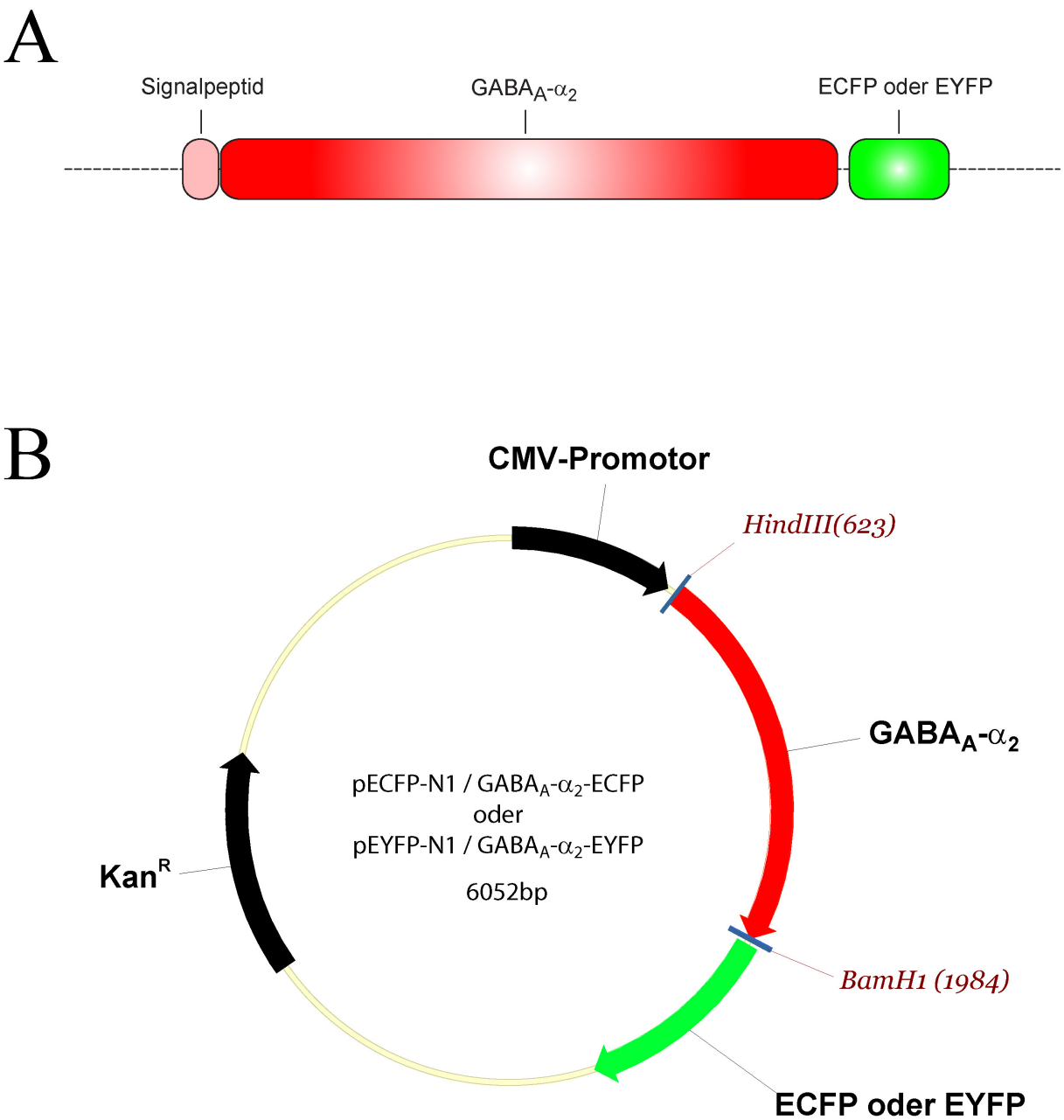


Abbildung A-29: pECFP/GABA$_A$-α$_2$-ECFP oder pEYFP/GABA$_A$-α$_2$-EYFP. (A) Schematische Darstellung der Lage wichtiger Domänen; **(B)** Vektorkarte mit der Lage der einzelnen Sequenzbereiche. Die Richtung der Pfeile gibt die Richtung der Leseraster der einzelnen Sequenzabschnitte an. In Klammern ist jeweils die Lage der angegebenen Restriktionsschnittstellen angegeben. Kan^R, Kanamyzin-Resistenzgen; bp, „base pairs“ = Basenpaare.

A.3.1.2 Langer Abstandshalter zwischen GFP und Untereinheit

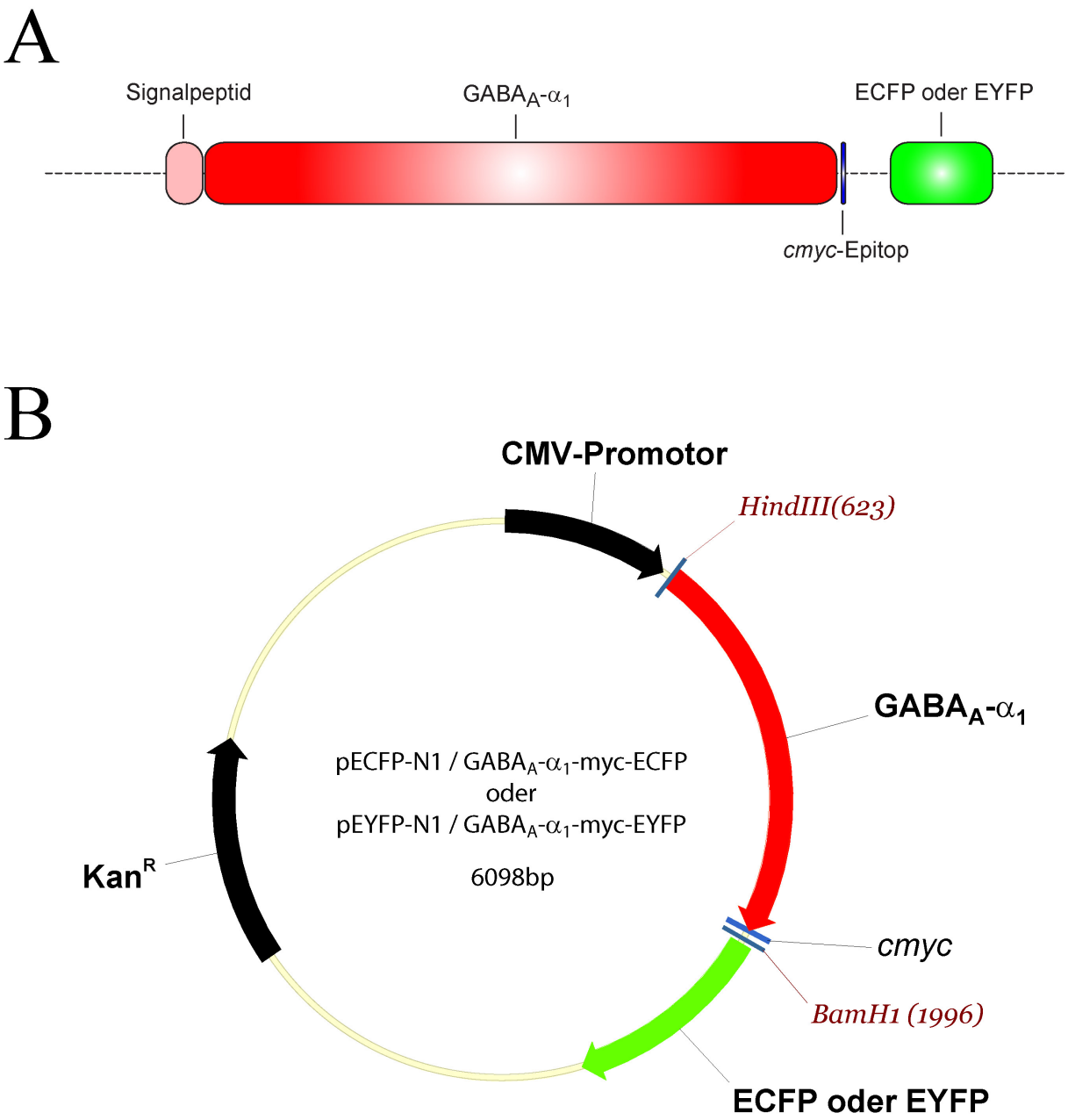


Abbildung A-30: pECFP/GABA$_A$-α$_1$-myc-ECFP oder pEYFP/GABA$_A$-α$_1$-myc-EYFP. (A) Schematische Darstellung der Lage wichtiger Domänen; **(B)** Vektorkarte mit der Lage der einzelnen Sequenzbereiche. Die Richtung der Pfeile gibt die Richtung der Leseraster der einzelnen Sequenzabschnitte an. In Klammern ist jeweils die Lage der angegebenen Restriktionsschnittstellen angegeben. Kan^R, Kanamyzin-Resistenzgen; bp, „base pairs“ = Basenpaare.

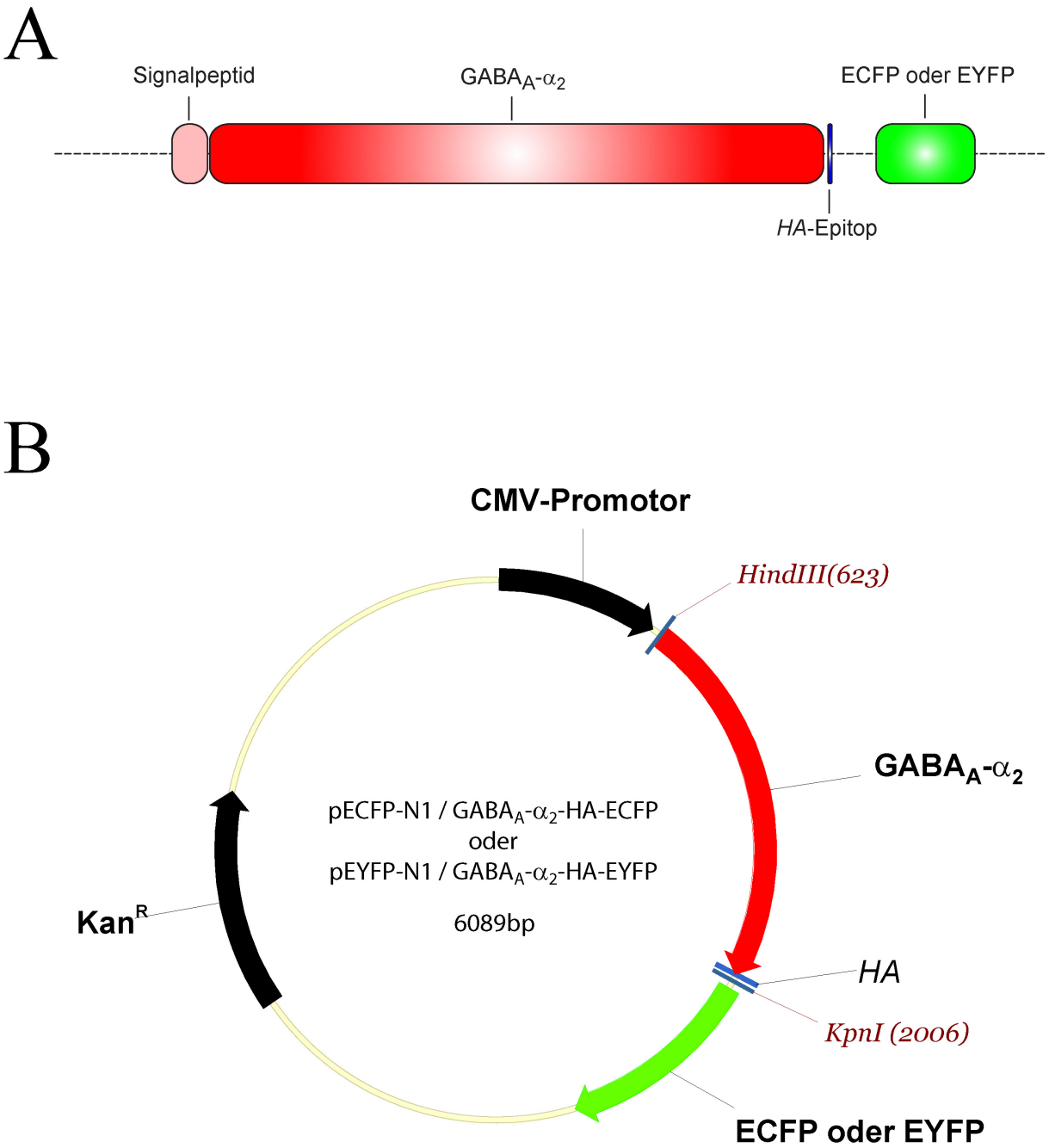


Abbildung A-31: pECFP/GABA$_A$-α$_2$-HA-ECFP oder pEYFP/GABA$_A$-α$_2$-HA-EYFP. (A) Schematische Darstellung der Lage wichtiger Domänen; **(B)** Vektorkarte mit der Lage der einzelnen Sequenzbereiche. Die Richtung der Pfeile gibt die Richtung der Leseraster der einzelnen Sequenzabschnitte an. In Klammern ist jeweils die Lage der angegebenen Restriktionsschnittstellen angegeben. Kan^R, Kanamyzin-Resistenzgen; bp, „base pairs“ = Basenpaare.

A.3.2 N-terminal markierte $GABA_A$-Rezeptor-Untereinheiten

A.3.2.1 Kein zusätzliches, immunoreaktves Epitop zwischen GFP-Molekül und Untereinheit

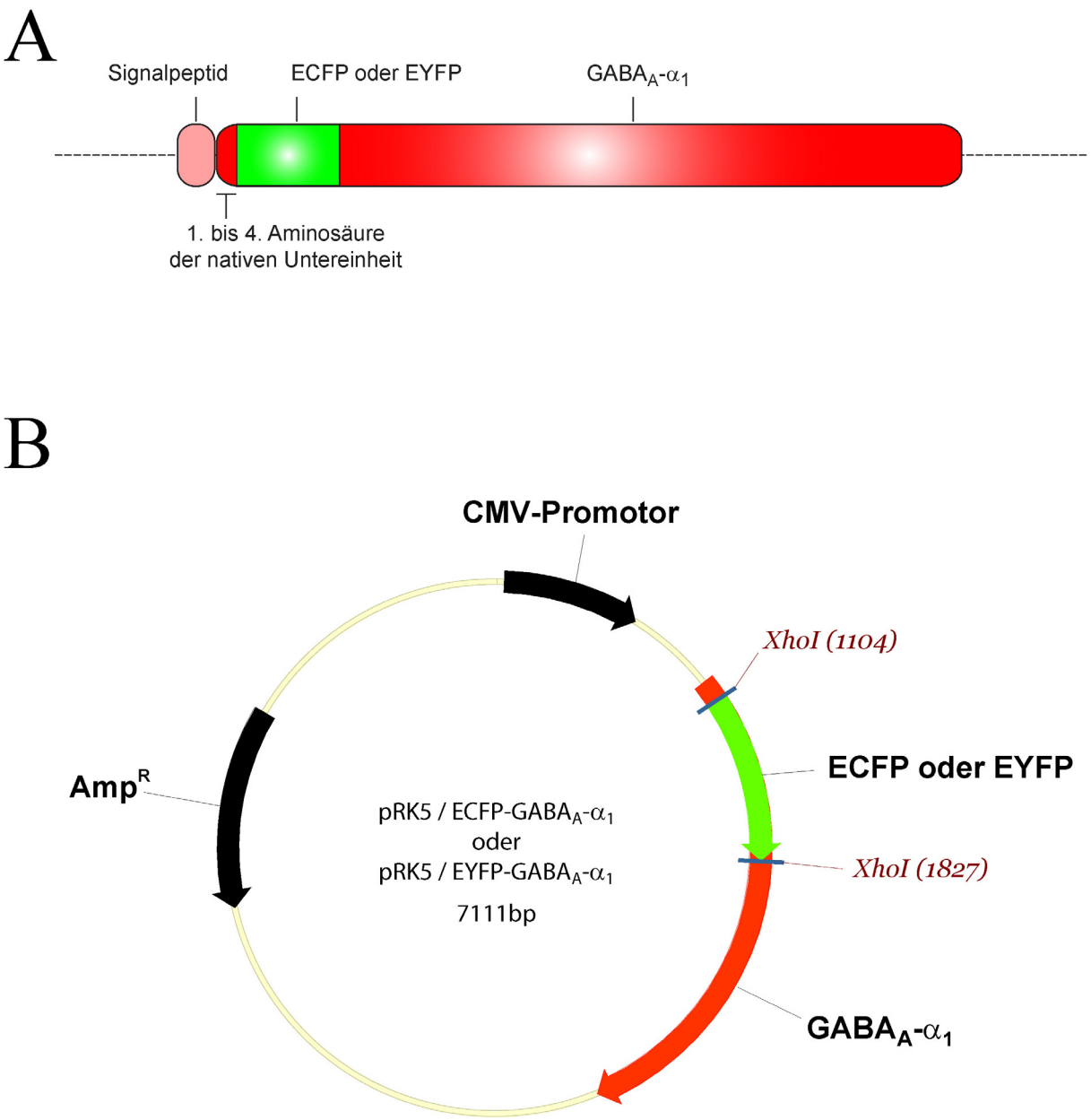
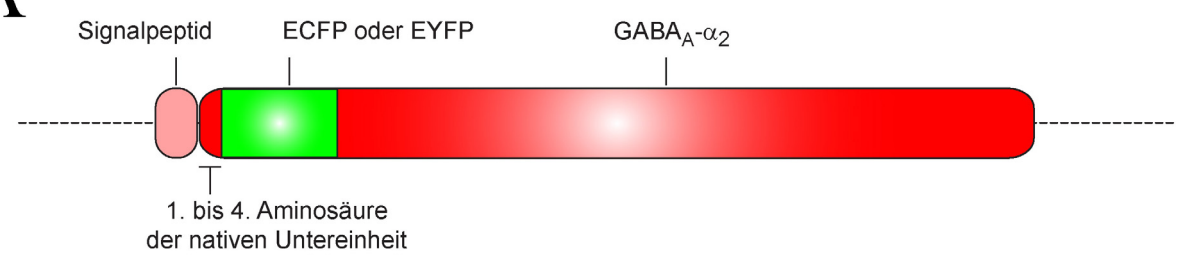


Abbildung A-32: pRK5/ECFP-$GABA_A$-α_1 oder pRK5/EYFP-$GABA_A$-α_1. (A) Schematische Darstellung der Lage wichtiger Domänen; **(B)** Vektorkarte mit der Lage der einzelnen Sequenzbereiche. Die Richtung der Pfeile gibt die Richtung der Leseraster der einzelnen Sequenzabschnitte an. In Klammern ist jeweils die Lage der angegebenen Restriktionsschnittstellen angegeben. Amp^R, Ampizilin-Resistenzgen; bp, „base pairs“ = Basenpaare.

A



B

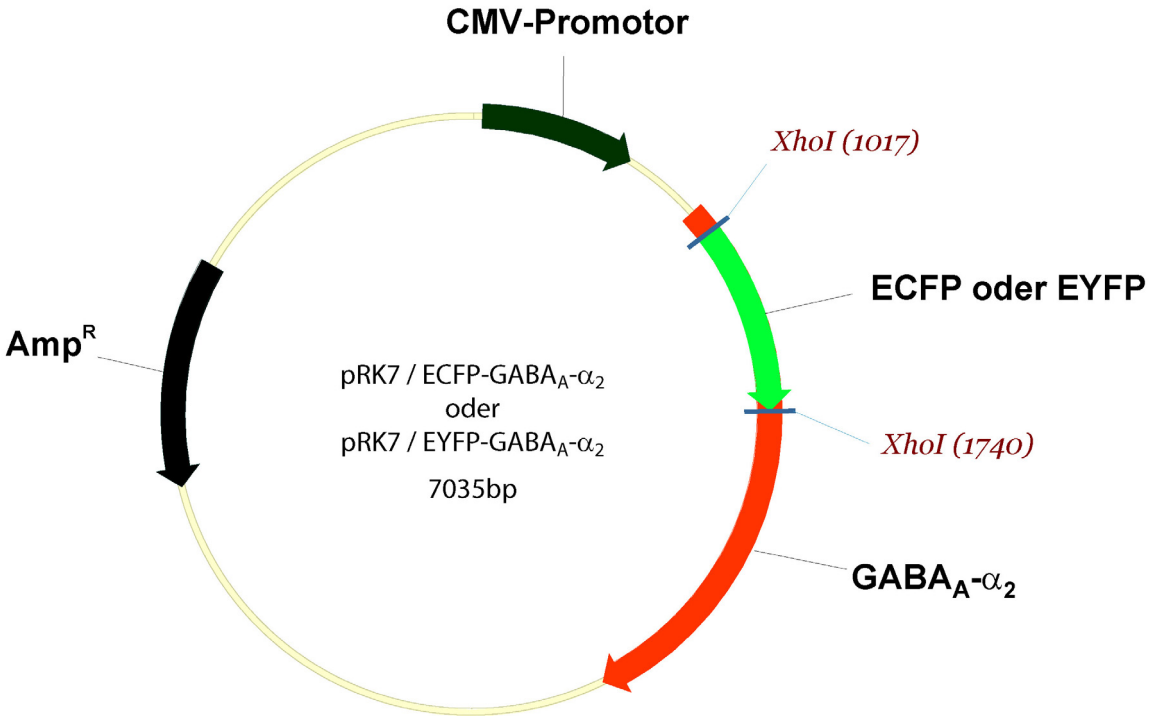


Abbildung A-33: pRK7/ECFP-GABA$_A$-α$_2$ oder pRK7/EYFP-GABA$_A$-α$_2$. (A) Schematische Darstellung der Lage wichtiger Domänen; **(B)** Vektorkarte mit der Lage der einzelnen Sequenzbereiche. Die Richtung der Pfeile gibt die Richtung der Leseraster der einzelnen Sequenzabschnitte an. In Klammern ist jeweils die Lage der angegebenen Restriktionsschnittstellen angegeben. Amp^R, Ampizilin-Resistenzgen; bp, „base pairs“ = Basenpaare.

A.3.2.2 Zwischen GFP-Molekül und Untereinheit integriertes Epitop

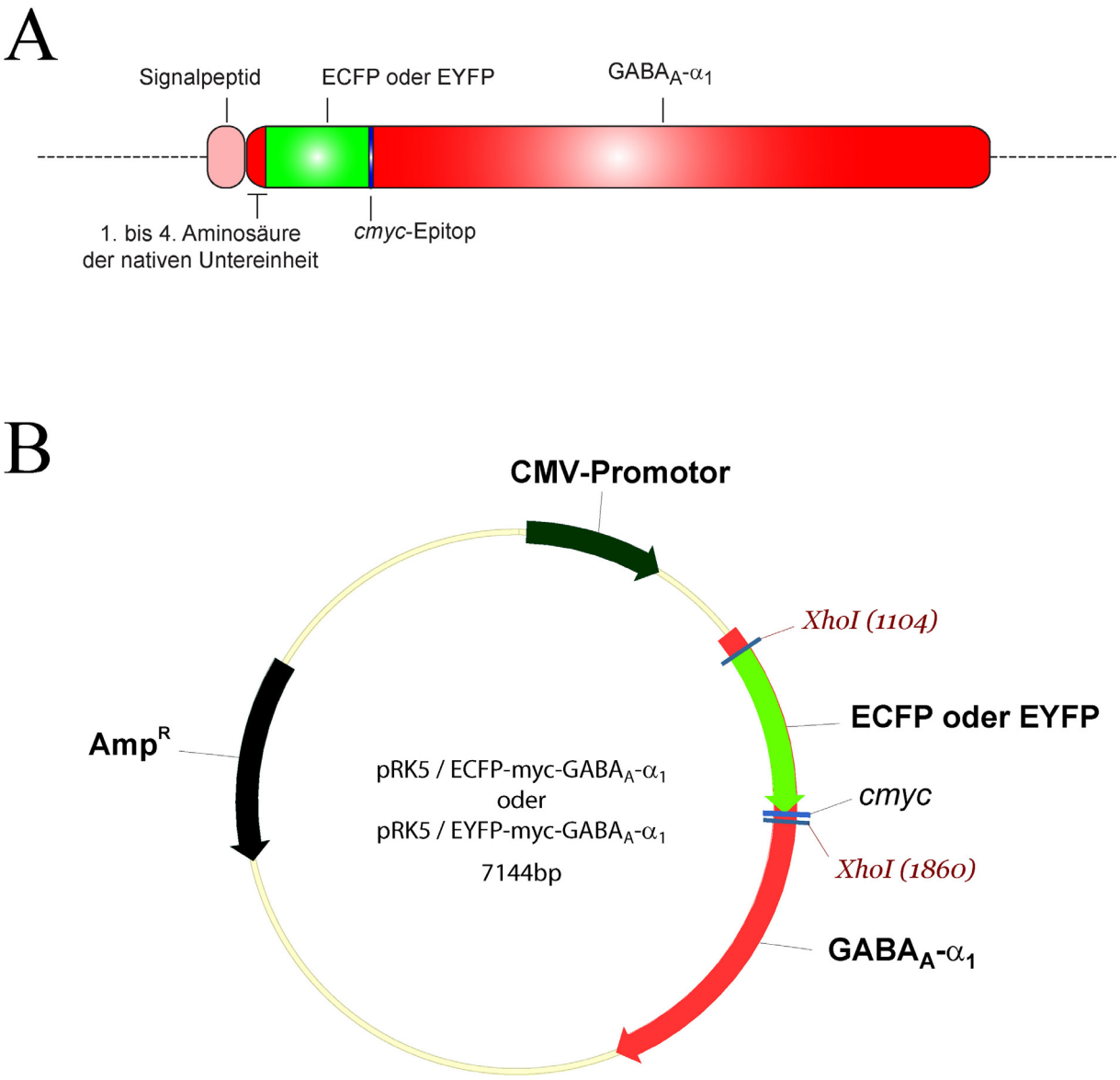


Abbildung A-34: pRK5/ECFP-myc-GABA$_A$-α$_1$ oder pRK5/EYFP-myc-GABA$_A$-α$_1$. **(A)** Schematische Darstellung der Lage wichtiger Domänen; **(B)** Vektorkarte mit der Lage der einzelnen Sequenzbereiche. Die Richtung der Pfeile gibt die Richtung der Leseraster der einzelnen Sequenzabschnitte an. In Klammern ist jeweils die Lage der angegebenen Restriktionsschnittstellen angegeben. Amp^R, Ampizilin-Resistenzgen; bp, „base pairs“ = Basenpaare.

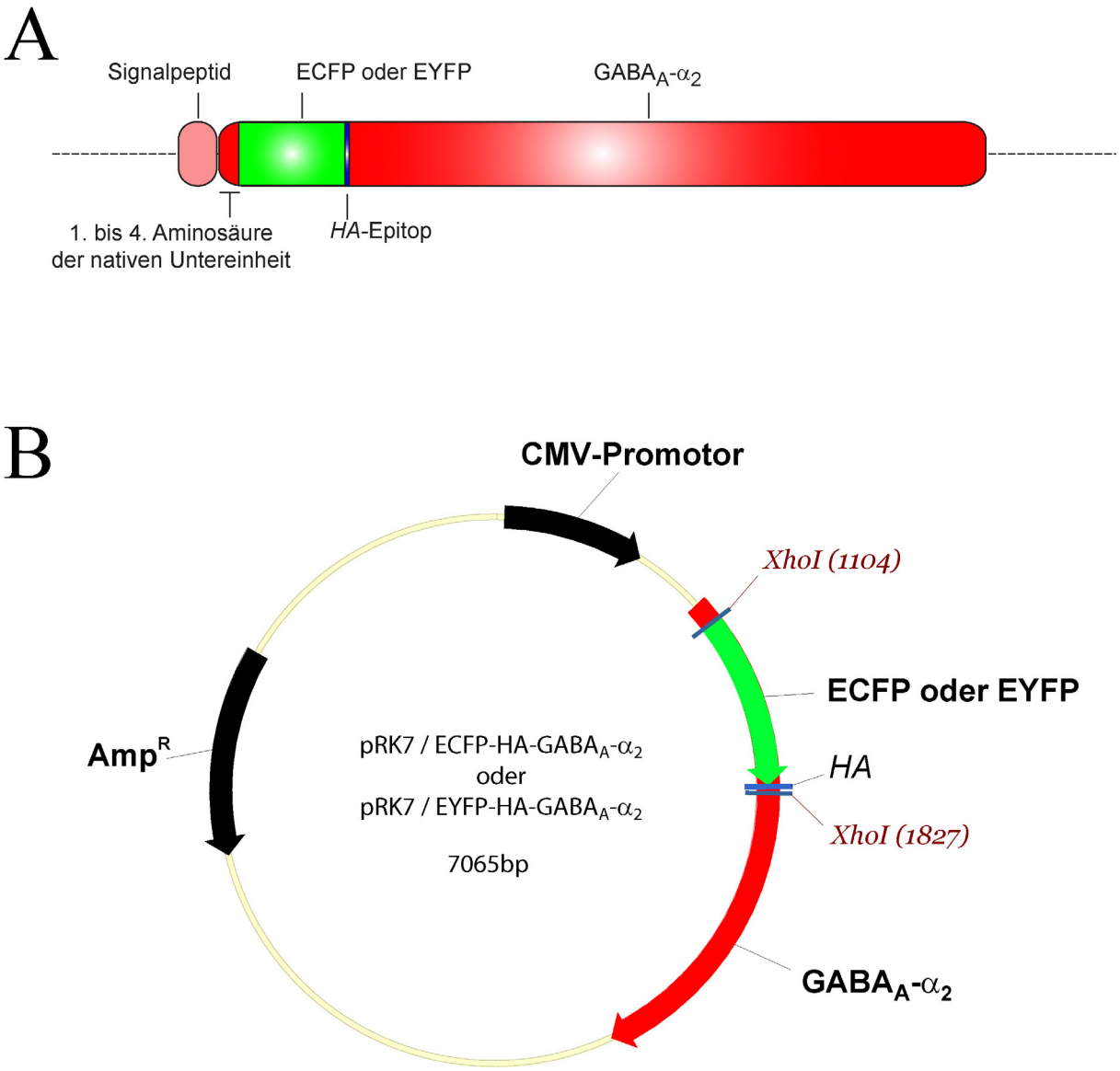


Abbildung A-35: pRK7/ECFP-HA-GABA$_A$-α$_2$ oder pRK7/EYFP-HA-GABA$_A$-α$_2$. **(A)** Schematische Darstellung der Lage wichtiger Domänen; **(B)** Vektorkarte mit der Lage der einzelnen Sequenzbereiche. Die Richtung der Pfeile gibt die Richtung der Leseraster der einzelnen Sequenzabschnitte an. In Klammern ist jeweils die Lage der angegebenen Restriktionsschnittstellen angegeben. Amp^R, Ampizilin-Resistenzgen; bp, „base pairs“ = Basenpaare.

A.3.2.3 Thrombin-Schnittstelle hinter der vierten Aminosäure der Untereinheit

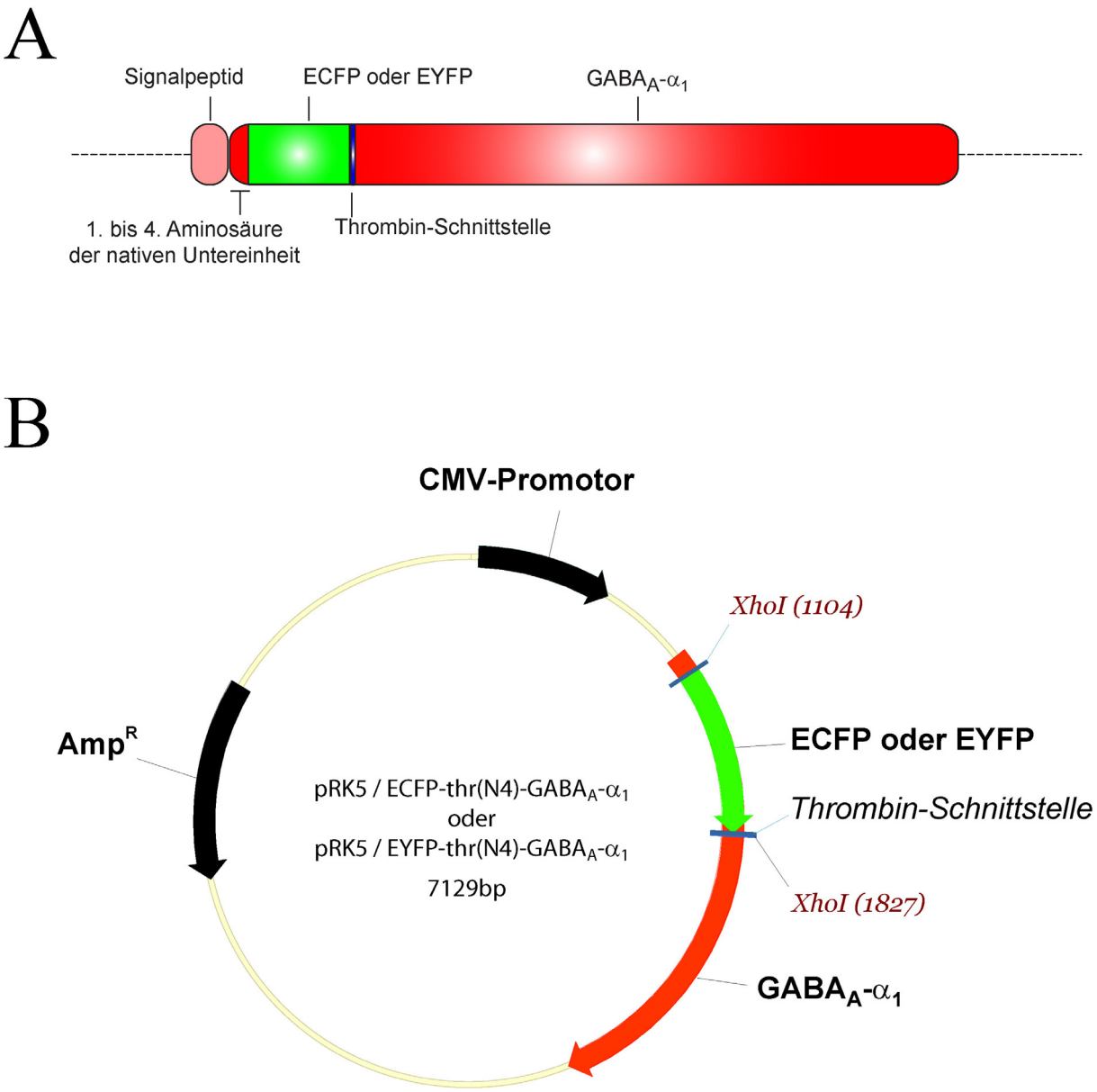
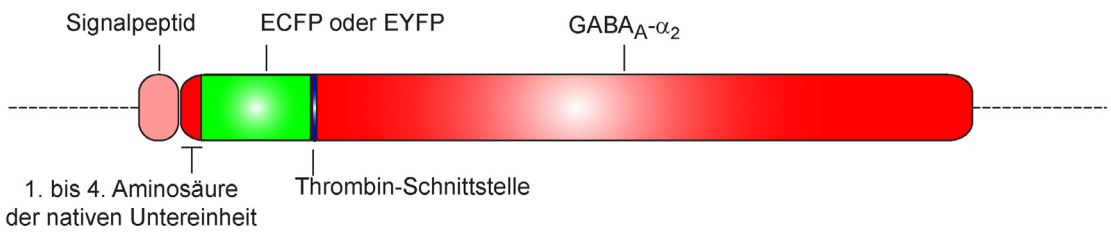


Abbildung A-36: pRK5/ECFP-thr(N4)-GABA$_A$-α$_1$ oder pRK5/EYFP-thr(N4)-GABA$_A$-α$_1$. (A) Schematische Darstellung der Lage wichtiger Domänen; **(B)** Vektorkarte mit der Lage der einzelnen Sequenzbereiche. Die Richtung der Pfeile gibt die Richtung der Leseraster der einzelnen Sequenzabschnitte an. In Klammern ist jeweils die Lage der angegebenen Restriktionsschnittstellen angegeben. Amp^R, Ampizilin-Resistenzgen; bp, „base pairs“ = Basenpaare.

A



B

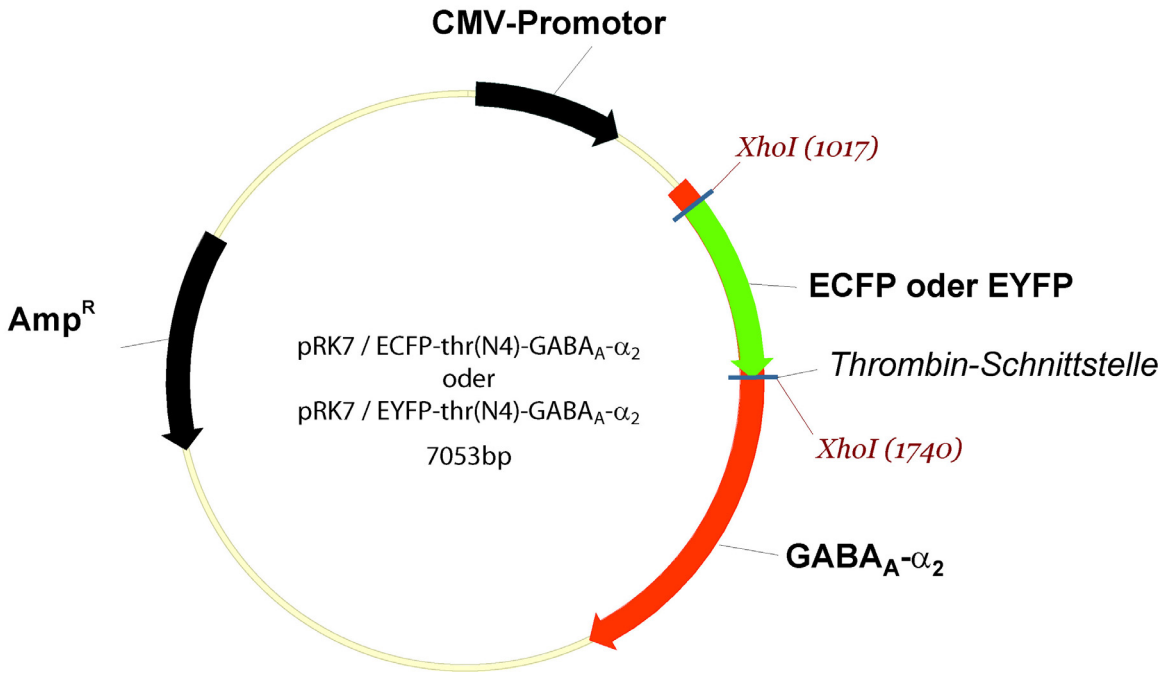


Abbildung A-37: pRK7/ECFP-thr(N4)-GABA$_A$-α$_2$ oder pRK7/EYFP-thr(N4)-GABA$_A$-α$_2$. (A) Schematische Darstellung der Lage wichtiger Domänen; **(B)** Vektorkarte mit der Lage der einzelnen Sequenzbereiche. Die Richtung der Pfeile gibt die Richtung der Leseraster der einzelnen Sequenzabschnitte an. In Klammern ist jeweils die Lage der angegebenen Restriktionsschnittstellen angegeben. Amp^R, Ampizilin-Resistenzgen; bp, „base pairs“ = Basenpaare.

A.3.2.4 Thrombin-Schnittstelle hinter GFP-Molekül und immunoreaktivem Epitop

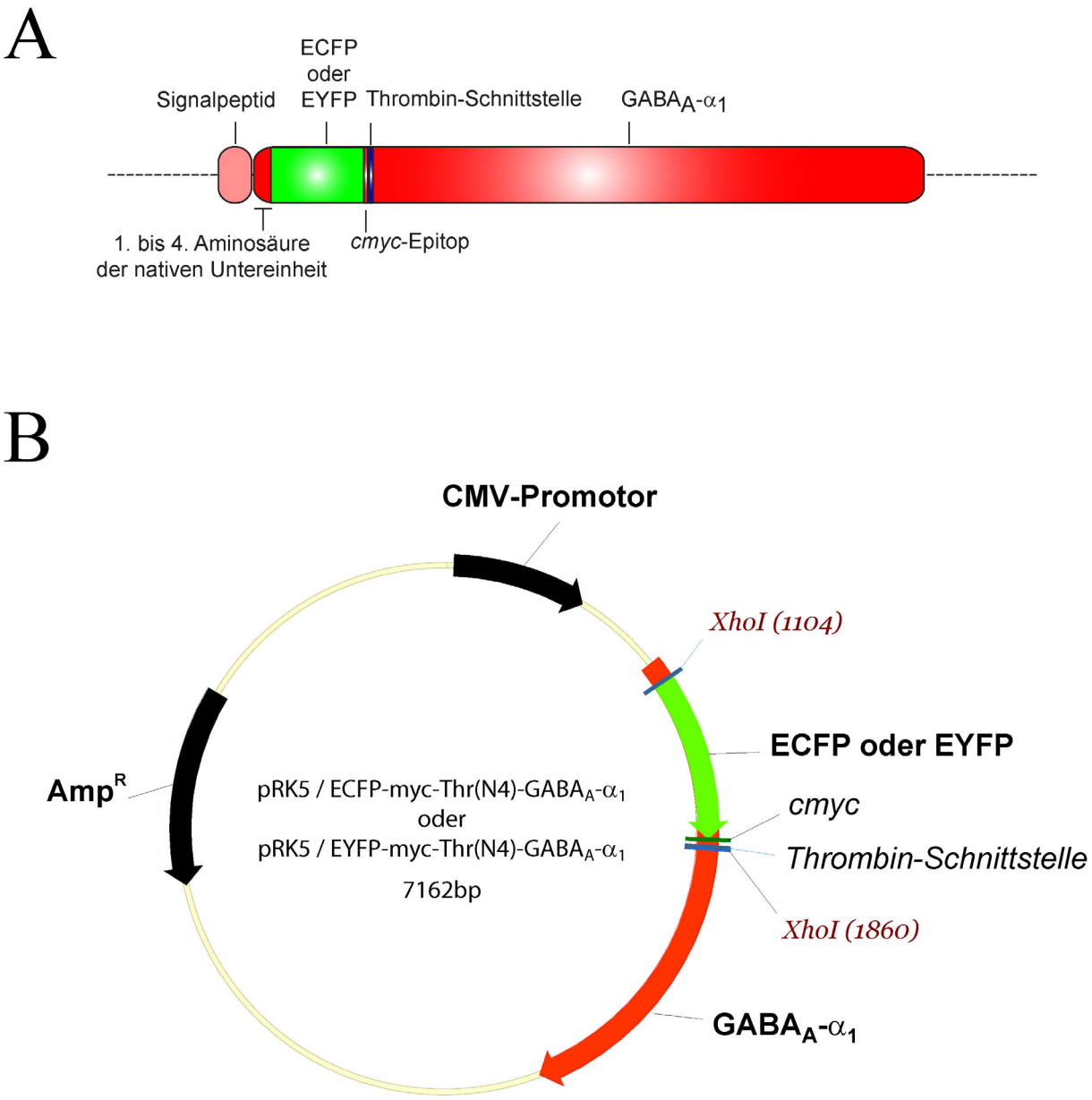
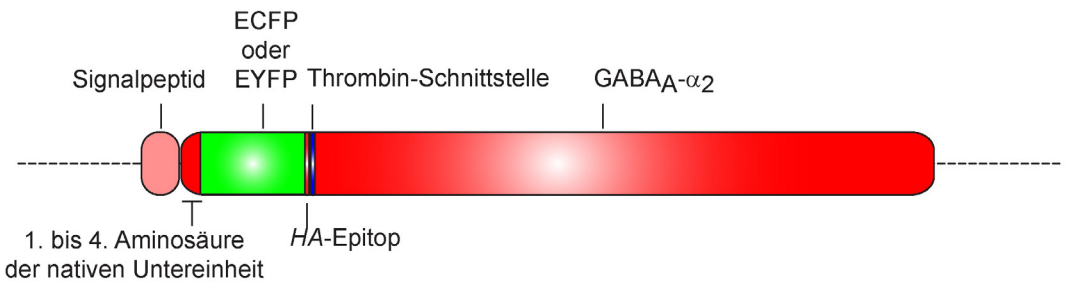


Abbildung A-38: pRK5/ECFP-myc-thr(N4)-GABA$_A$-α$_1$ oder pRK5/EYFP-myc-thr(N4)-GABA$_A$-α$_1$. (A) Schematische Darstellung der Lage wichtiger Domänen; **(B)** Vektorkarte mit der Lage der einzelnen Sequenzbereiche. Die Richtung der Pfeile gibt die Richtung der Leseraster der einzelnen Sequenzabschnitte an. In Klammern ist jeweils die Lage der angegebenen Restriktionsschnittstellen angegeben. Amp^R, Ampizilin-Resistenzgen; bp, „base pairs“ = Basenpaare.

A



B

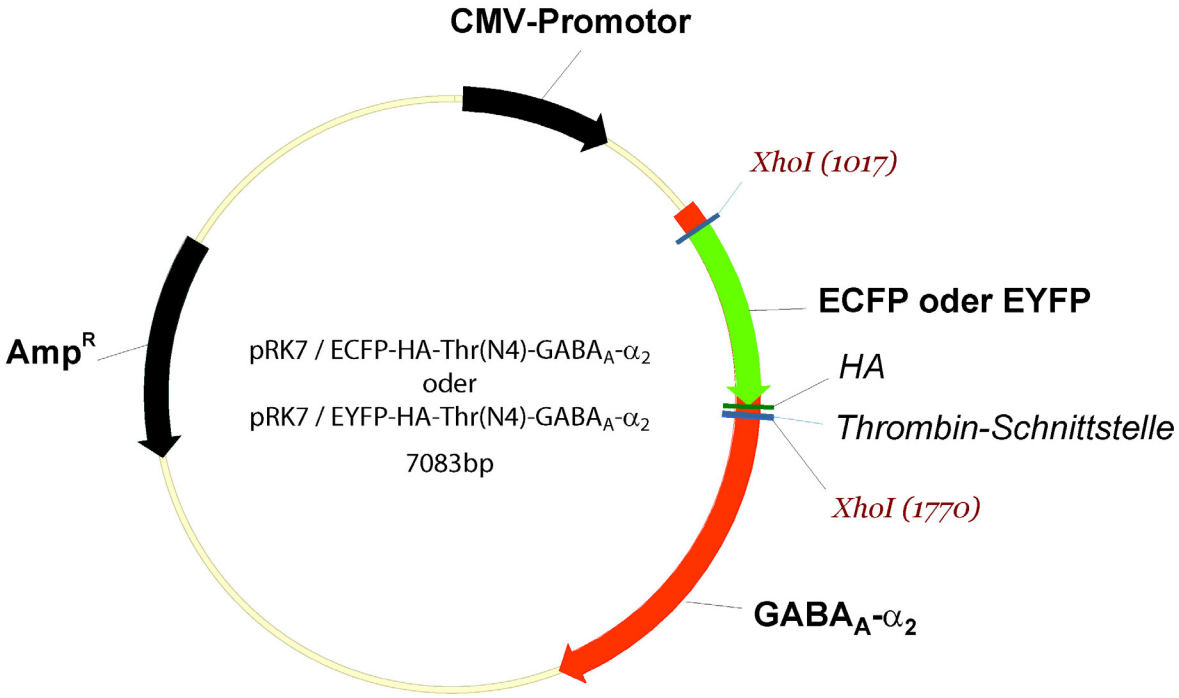


Abbildung A-39: pRK7/ECFP-HA-thr(N4)-GABA$_A$-α$_2$ oder pRK7/EYFP-HA-thr(N4)-GABA$_A$-α$_2$. (A) Schematische Darstellung der Lage wichtiger Domänen; **(B)** Vektorkarte mit der Lage der einzelnen Sequenzbereiche. Die Richtung der Pfeile gibt die Richtung der Leseraster der einzelnen Sequenzabschnitte an. In Klammern ist jeweils die Lage der angegebenen Restriktionsschnittstellen angegeben. Amp^R, Ampizilin-Resistenzgen; bp, „base pairs“ = Basenpaare.

A.3.2.5 Abstandshalter bestehend aus 50 Aminosäuren (Ala, Ser) zwischen GFP-Molekül und Untereinheit

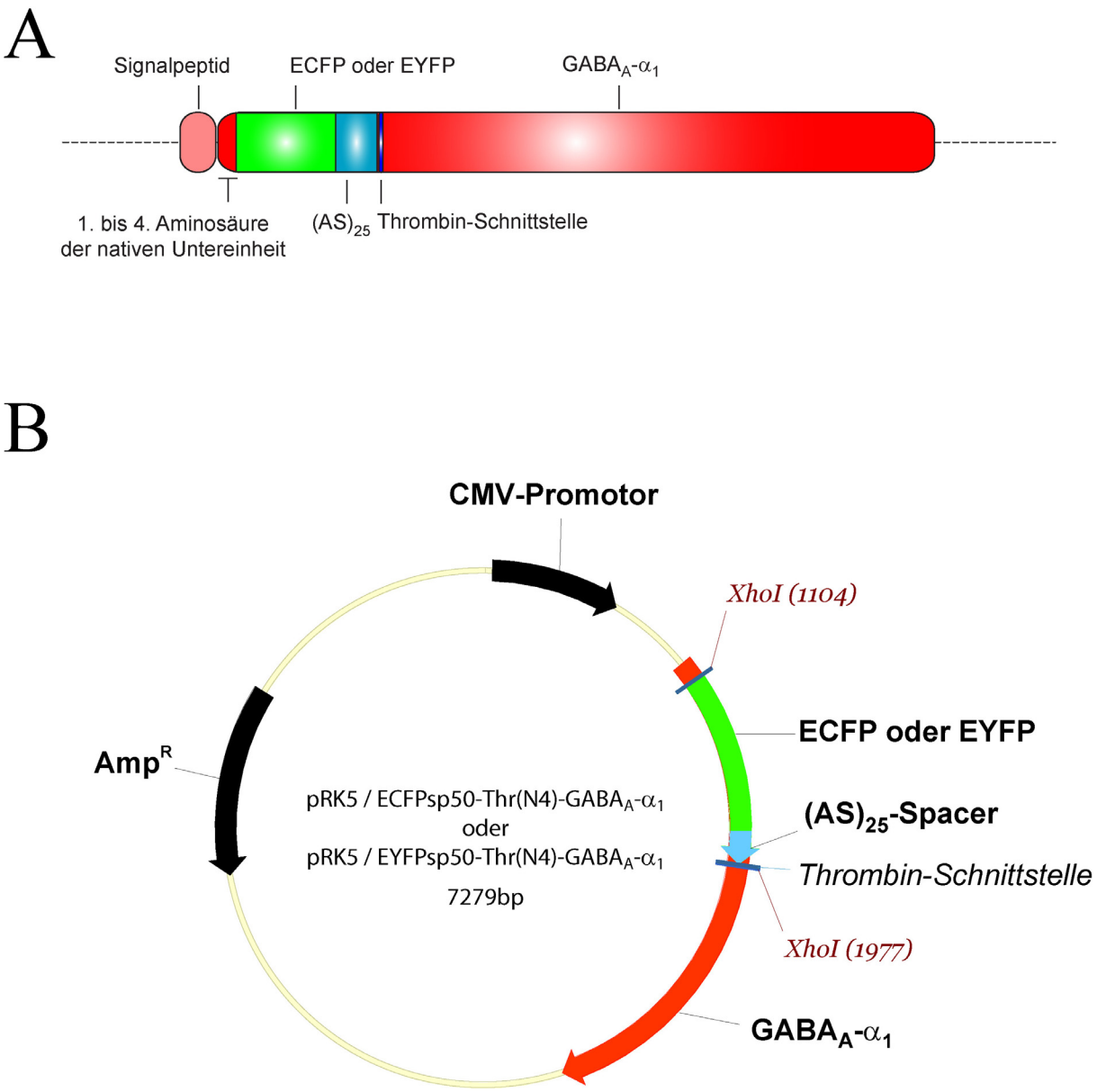


Abbildung A-40: pRK5/ECFPsp50-Thr(N4)-GABA$_A$-α$_1$ oder pRK5/EYFPsp50-Thr(N4)-GABA$_A$-α$_1$. (A) Schematische Darstellung der Lage wichtiger Domänen; **(B)** Vektorkarte mit der Lage der einzelnen Sequenzbereiche. Die Richtung der Pfeile gibt die Richtung der Leseraster der einzelnen Sequenzabschnitte an. In Klammern ist jeweils die Lage der angegebenen Restriktionsschnittstellen angegeben. Amp^R, Ampizilin-Resistenzgen; bp, „base pairs“ = Basenpaare.

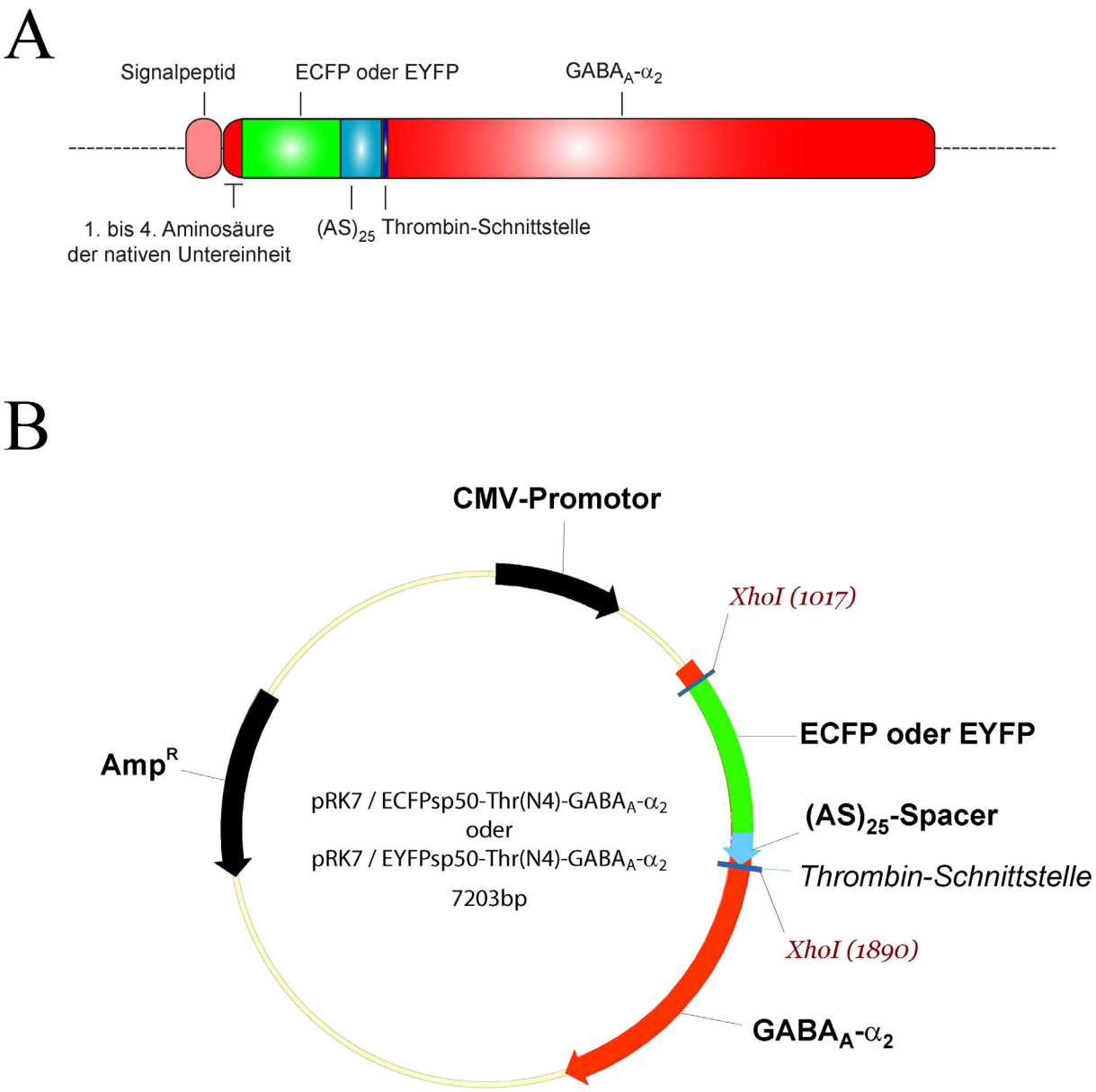


Abbildung A-41: pRK7/ECFPsp50-Thr(N4)-GABA$_A$-α$_2$ oder pRK7/EYFPsp50-Thr(N4)-GABA$_A$-α$_2$. (A) Schematische Darstellung der Lage wichtiger Domänen; **(B)** Vektorkarte mit der Lage der einzelnen Sequenzbereiche. Die Richtung der Pfeile gibt die Richtung der Leseraster der einzelnen Sequenzabschnitte an. In Klammern ist jeweils die Lage der angegebenen Restriktionsschnittstellen angegeben. Amp^R, Ampizilin-Resistenzgen; bp, „base pairs“ = Basenpaare.

A.3.2.6 Abstandshalter mit einer Länge von 40 Aminosäuren gefolgt von einer TEV-Schnittstelle und einer Thrombin-Schnittstelle

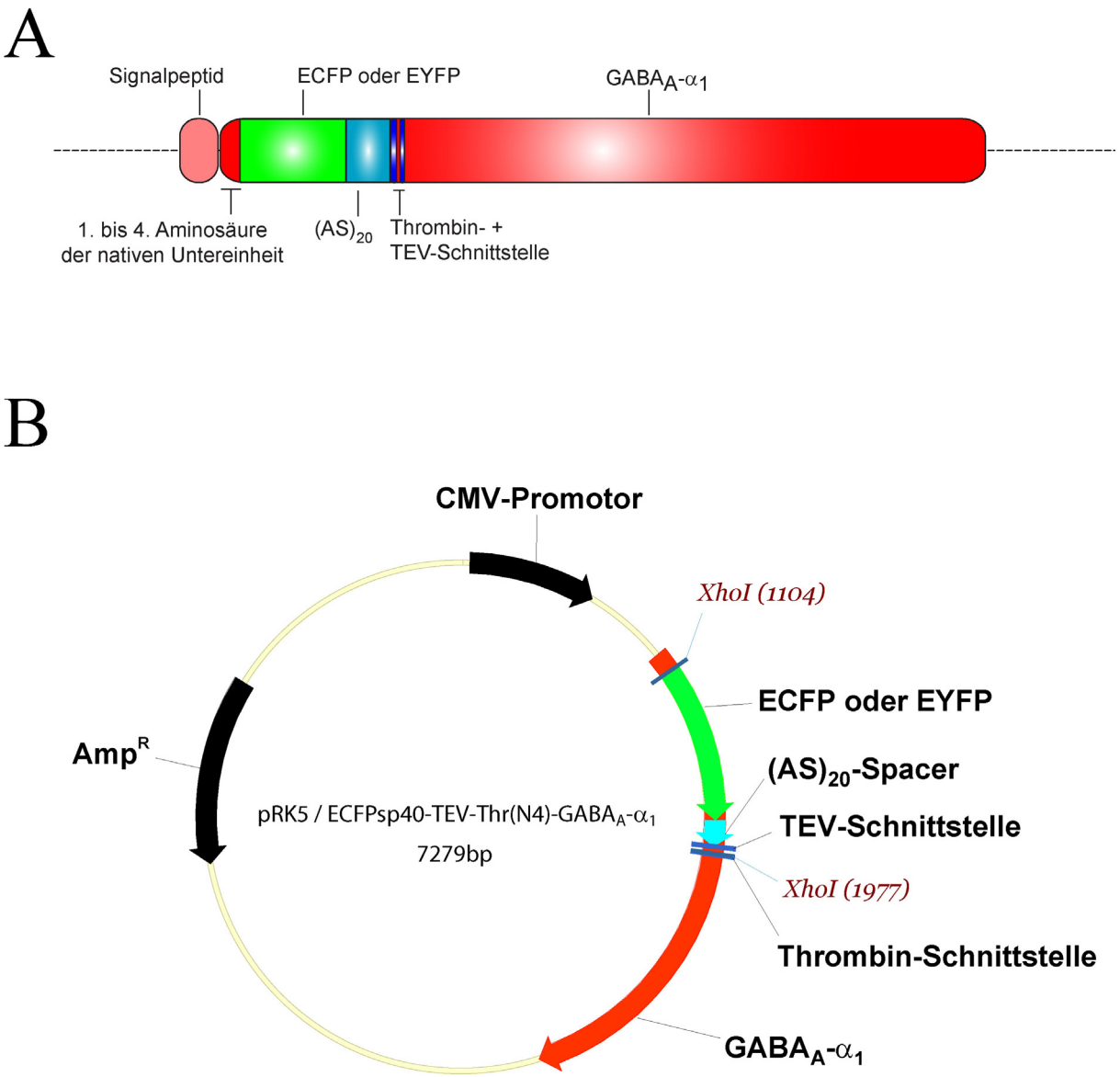


Abbildung A-42: pRK5/ECFPsp40-TEV-Thr(N4)-GABA$_A$-α$_1$ oder pRK5/EYFPsp40-TEV-Thr(N4)-GABA$_A$-α$_1$. (A) Schematische Darstellung der Lage wichtiger Domänen; **(B)** Vektorkarte mit der Lage der einzelnen Sequenzbereiche. Die Richtung der Pfeile gibt die Richtung der Leseraster der einzelnen Sequenzabschnitte an. In Klammern ist jeweils die Lage der angegebenen Restriktionsschnittstellen angegeben. Amp^R, Ampizilin-Resistenzgen; bp, „base pairs“ = Basenpaare.