

**Funktionelle Analyse des *Slc4a10*-Gens
an transgenen Mausmodellen
(*Mus musculus*, LINNÉ 1758)**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

von
Stefan Jacobs
geboren in Bedburg

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Priv.-Doz. Dr. M. HÜBNER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. T. BURMESTER
Tag der Disputation: 02. Februar 2007

Hamburg, den 10. Januar 2007



A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, overlapping loops and a long horizontal stroke at the end.

Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Biomembranen	1
1.2 Pumpen, Kanäle und Carrier	2
1.3 Die <i>Slc4</i> -Genfamilie	4
1.4 <i>Slc4</i> -Gene mit Expression im Zentralnervensystem	8
1.4.1 <i>Slc4a3 (AE3)</i>	8
1.4.2 <i>Slc4a4 (NBCe1)</i>	8
1.4.3 <i>Slc4a8 (NDCBE)</i>	9
1.4.4 <i>Slc4a10 (NCBE)</i>	9
1.5 pH und Gehirnfunktion	10
1.6 Aufgabenstellung	10
2 Material und Methode	12
2.1 Verwendete Tiere	12
2.2 Chemikalien und Geräte	12
2.3 Allgemeine molekularbiologische Methoden	13
2.3.1 <i>Primersynthese</i>	13
2.3.2 <i>Isolation von genomischer DNS</i>	13
2.3.3 <i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i>	14
2.3.4 <i>Enzymatische Modifikation von DNS</i>	15
2.3.5 <i>DNS-Gelelektrophorese</i>	16
2.3.6 <i>DNS-Extraktion aus Agarosegelen</i>	16
2.3.7 <i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	17
2.3.8 <i>DNS-Sequenzierung</i>	19
2.3.9 <i>Southern Blot</i>	19
2.3.10 <i>RNS-Präparation</i>	21
2.3.11 <i>Isolation von Gesamt-RNS aus Gewebe</i>	22
2.3.12 <i>Northern Blot</i>	22
2.3.13 <i>cDNS-Synthese</i>	23
2.3.14 <i>Quantitative Real-Time PCR</i>	24
2.3.15 <i>Klonierung von PCR-Fragmenten</i>	25

II

2.3.16	<i>Herstellen von kompetenten Bakterien</i>	26
2.3.17	<i>Transformation kompetenter Bakterien</i>	27
2.3.18	<i>Isolierung von Plasmid-DNS (Minipräparation)</i>	28
2.3.19	<i>Isolierung von Plasmid-DNS (Maxipräparation)</i>	28
2.4	Allgemeine mikrobiologische Methoden	29
2.4.1	<i>Bakterien und Vektoren</i>	29
2.4.2	<i>Nährmedien und Agarplatten</i>	29
2.4.3	<i>Glycerinkulturen</i>	30
2.4.4	<i>Plattenkulturen</i>	30
2.4.5	<i>Flüssigkulturen</i>	30
2.5	Proteinbiochemische Methoden	30
2.5.1	<i>Membranpräparation von Gewebe</i>	30
2.5.2	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i>	31
2.5.3	<i>Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)</i>	32
2.5.4	<i>Western Blot</i>	34
2.5.5	<i>Herstellung eines polyklonalen anti-NCBE-Antikörpers</i>	36
2.5.6	<i>Antikörperaufreinigung</i>	36
2.5.7	<i>Test des Antiserums</i>	37
2.5.8	<i>Verwendete Antikörper</i>	37
2.6	Histologie	38
2.6.1	<i>Perfusion der Mäuse</i>	38
2.6.2	<i>Kryoschnitte für Objektträger</i>	39
2.6.3	<i>Kryoschnitte für die Free-floating-Technik</i>	39
2.6.4	<i>Paraffinschnitte</i>	40
2.6.5	<i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)</i>	40
2.6.6	<i>Gelatinisieren von Objektträgern</i>	41
2.6.7	<i>Immunhistologie</i>	42
2.6.8	<i>Licht- und Fluoreszenzmikroskopie</i>	43
2.6.9	<i>Konfokale Mikroskopie</i>	43
2.6.10	<i>Elektronenmikroskopie</i>	43
2.7	Genetische Modifikation von Mäusen	44
2.7.1	<i>Generierung der NCBE-defizienten Mäuse</i>	46
2.7.2	<i>Konstruktion des Targeting-Vektors</i>	46
2.7.3	<i>Erstes Targeting und Nachweis der homologen Rekombination</i>	48
2.7.4	<i>Zweites Targeting</i>	48
2.7.5	<i>Zucht der konstitutiven und der konditionalen NCBE-Knockout-Mäuse</i>	49
2.8	Stammzellkultur und ES-Zell Targeting	50
2.8.1	<i>Isolation primärer Fibroblasten (Feederzellen)</i>	50
2.8.2	<i>Mitotische Inaktivierung von embryonalen Fibroblasten</i>	51
2.8.3	<i>Herkunft der Stammzellen</i>	51
2.8.4	<i>Kultur der ES-Zellen</i>	51

III

2.8.5	<i>Subkultivierung der ES-Zellen</i>	52
2.8.6	<i>Einfrieren der ES-Zellen</i>	52
2.8.7	<i>Auftauen der ES-Zellen</i>	53
2.8.8	<i>Elektroporation der ES-Zellen</i>	53
2.8.9	<i>Selektion rekombinierter ES-Zellen</i>	53
2.8.10	<i>Isolierung resistenter Klone</i>	54
2.8.11	<i>Expansion isolierter Klone</i>	54
2.8.12	<i>Transiente Transfektion der ES-Zellen mit Cre-Plasmiden</i>	54
2.8.13	<i>DNS-Präparation aus ES-Zellen</i>	55
2.8.14	<i>Vorbereitung der Klone zur Injektion in Blastozysten</i>	55
2.9	Verhaltensversuche	56
2.9.1	<i>Open Field-Test</i>	56
2.9.2	<i>Novel Object Exploration</i>	56
2.9.3	<i>„Actimot“-Versuch</i>	57
2.9.4	<i>Elevated Plus Maze</i>	57
2.9.5	<i>Dark-Light-Transitionstest</i>	58
2.9.6	<i>Hot Plate-Test</i>	58
2.9.7	<i>„Rotarod“-Versuch</i>	59
2.9.8	<i>MORRIS Water Maze</i>	59
2.10	Bestimmung der Krampfschwelle	60
2.11	Intrazelluläre pH-Messung an vitalen Gehirnschnitten	61
3	Ergebnisse	63
3.1	Nachweis der Mutation im <i>Slc4a10</i> -Gen	63
3.1.1	<i>Genotypisierung der konstitutiven NCBE-Knockout-Mäuse</i>	63
3.1.2	<i>Genotypisierung der konditionalen NCBE-Knockout-Mäuse</i>	64
3.1.3	<i>Nachweis der NCBE-Defizienz auf RNS- und Proteinebene</i>	65
3.2	Herstellung eines polyklonalen anti-NCBE-Antikörpers	66
3.3	Lokalisation des natriumabhängigen Chlorid-Bikarbonat-Austauschers NCBE	67
3.3.1	<i>Northern Blot</i>	67
3.3.2	<i>Western Blot</i>	68
3.3.3	<i>Immunhistologie</i>	70
3.4	Erscheinungsbild der NCBE ^{-/-} -Maus	78
3.5	Morphologie des zentralen Nervensystems	79
3.6	Verhaltensversuche	81
3.6.1	<i>Aktivitätsbestimmung im „Actimot“-Versuch</i>	82
3.6.2	<i>Verhalten der NCBE^{-/-}-Mäuse im Open Field-Test und Novel Object-Test</i>	82
3.6.3	<i>Verhalten im Elevated Plus Maze</i>	84
3.6.4	<i>Verhalten im Dark-Light-Transitionstest</i>	84

IV

3.6.5	„Rotarod“-Test	85
3.6.6	Hot Plate-Test	86
3.6.7	MORRIS Water Maze	86
3.7	Bestimmung der Krampfschwelle	87
3.8	Expression von Chlorid-Transportern und pH-Regulatoren im NCBE-Knockout	89
3.9	Alternative Spleißvariante des NCBE in <i>Mus musculus</i>	89
3.10	Intrazelluläre pH-Messung	90
4	Diskussion	92
4.1	Die Generierung der NCBE ^{-/-} -Maus	92
4.2	Die Lokalisation des NCBE	93
4.3	Erscheinungsbild der NCBE ^{-/-} -Maus	95
4.4	Morphologie des NCBE ^{-/-} -Gehirns	96
4.5	Verhalten der NCBE ^{-/-} -Mäuse	98
4.6	Neuronal Erregbarkeit NCBE-defizienter Mäuse	100
4.7	Mögliche Ursachen einer erhöhten Krampfschwelle bei NCBE ^{-/-} -Mäusen	102
5	Zusammenfassung	106
6	Literaturverzeichnis	108
7	Anhang	120
7.1	Aminosäuresequenzvergleich der murinen <i>Slc4</i> -Genfamilie	120
7.2	Veröffentlichungen	124
7.3	Danksagung	125

Abkürzungsverzeichnis

+/+	Wildtyp
+/-	Heterozygot
-/-	<i>Knockout</i>
°C	Grad Celsius
Δ	Differenz
A	Ampere
ATP	Adenosintriphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Centi
cDNS	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
CO ₂	Kohlendioxid
C-Terminus	Carboxyterminus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dest	Destilliert
DIDS	4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-disulfat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	beliebiges 2'-Desoxy-Nukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ERG	Elektroretinogramm
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
k	Kilo
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knockout</i>
l	Liter

VI

LB	Luria Broth
LTP	Langzeitpotenzierung
M	Molar
m	Milli bzw. Meter
Min	Minute
μ	Mikro
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure
n	Nano bzw. Anzahl
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
p	Pico bzw. Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pfu	Plauebildende Einheit
PSD	postsynaptische Dichte
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkriptase
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
Std.	Stunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TM	Transmembrandomäne
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
u	units
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Biomembranen

Jede Zelle ist durch eine semipermeable Zellmembran von ihrer Umgebung abgetrennt. Die Basisstruktur der Biomembranen ist eine Phospholipiddoppelschicht. Lipide sind molekulare Bestandteile, die wasserunlöslich, aber in organischen Lösungsmitteln löslich sind. Zu den Lipiden gehören Fettsäuren, Triglyceride, Steroide, Glycolipide und Phospholipide. Die Phospholipide bestehen aus einer hydrophilen Kopfgruppe und zwei langen, hydrophoben Kohlenwasserstoffschwänzen. Diese Moleküle bilden im wässrigen Milieu die dreidimensional geschlossenen, ca. 4 bis 5 nm dicken Phospholipiddoppelschichten, indem die Lipidmoleküle ihren hydrophoben Teil von der wässrigen Phase ab- und ihren hydrophilen Kopf der wässrigen Phase zuwenden. Diese Membran ist unter physiologischen Bedingungen flüssig, mit einer Viskosität vergleichbar mit der von Olivenöl. Für Cholesterine und teilweise hydrophobe Membranproteine ist die Biomembran ein Lösungsmittel, in dem die Moleküle lateral diffundieren können. Für hydrophile Stoffe und insbesondere für Ionen, die wichtige Funktionen in der Zelle erfüllen, stellt diese Membran aber eine effektive Diffusionsbarriere dar.

Durch diese Barriere ist im Inneren der Zelle ein konstantes Milieu gelöster Stoffe gewährleistet. Mit der Abgrenzung des intrazellulären Volumens von der extrazellulären Umgebung entsteht aber auch die Notwendigkeit, Transportwege für bestimmte Stoffe und Ionen über die Plasmamembran zu ermöglichen.

Die große biologische Bedeutung des Transmembrantransportes kann man daran erkennen, dass ca. 30 % der Proteine, die im Genom einer tierischen Zelle kodiert sind, Membranproteine sind. Durchschnittlich 15 bis 30 % dieser Membranproteine sind wiederum Transportproteine.

Der Transmembrantransport von Ionen ist für viele Stoffwechselfvorgänge notwendig. So werden an Zellmembranen Konzentrationsgradienten aufgebaut, welche als Energiespeicher für verschiedene Transportprozesse, zur Übertragung von elektrischen Signalen in Nerven- und Muskelzellen oder zur Bildung von ATP benötigt werden (ADAM, 2003; ALBERTS, 2002). Zudem wird über den Ionentransport durch Plasmamembranen durch passiven Wasserstrom (Osmose) das Zellvolumen oder die Sekretion an Epithelien gesteuert.

Jede Zelle besitzt deshalb eine an ihre spezifische Funktion angepasste Ausstattung von Transportproteinen.

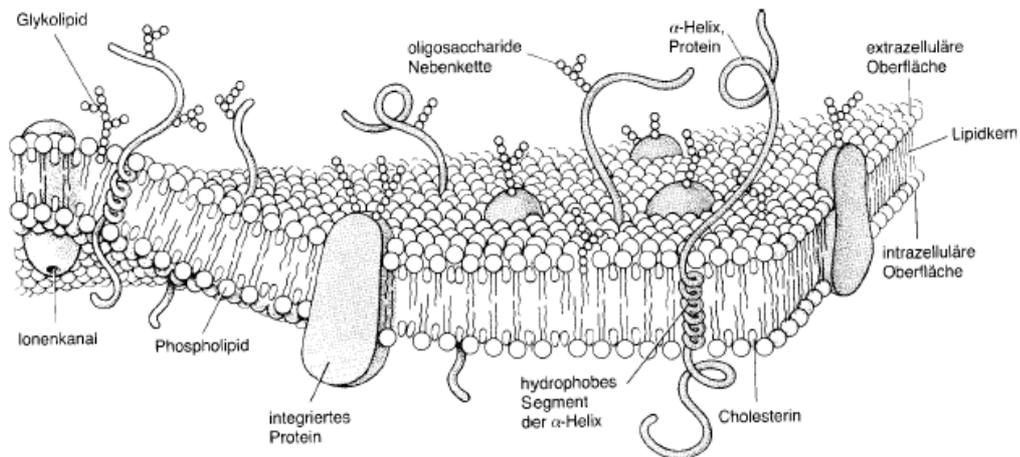


Abbildung 1.1: Schema einer biologischen Membran (SINGER und NICHOLSON, 1972). Nach dem „Fluid-Mosaic-Modell“ wird die zähflüssige Membran von integralen Membranproteinen durchsetzt, die mit ihren Transmembrandomänen in der Phospholipiddoppelschicht integriert sind. Einige dieser Proteine sind Pumpen, Ionenkanäle oder Carrier.

1.2 Pumpen, Kanäle und Carrier

Abhängig von der Art und der Energiequelle des Ionentransports unterscheidet man zwischen Pumpen, Kanälen und Carrier.

Pumpen:

Pumpen sind Enzyme, die chemische Energie in Ionentransport umwandeln. Es werden Ionen oder Moleküle unter ATP-Verbrauch gegen ihren elektrochemischen Gradienten transportiert. Man spricht daher von einem aktiven Transport. In nahezu allen eukaryotischen Zellen sind Na^+/K^+ -ATPasen und $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -ATPasen entscheidend daran beteiligt, Ionengradienten aufzubauen. Diese elektrochemischen Gradienten an der Zellmembran sind die Triebkraft für passive Transportmechanismen entlang des Gradienten durch Kanäle und Carrier.

Kanäle:

Ionenkanäle haben einen wesentlichen Anteil am Ionentransport durch die biologische Membran. Diese Proteine bilden durch die Membran reichende, hydrophile Poren, welche nur für einige Ionen durchlässig sind (ALBERTS, 2002; HILLE, 1992). Die meisten Kanäle sind hoch selektive Uniporter, die sich öffnen und schließen können. Das Öffnen der Pore führt zu

einer Diffusion der Ionen mit einer sehr hohen Durchflussrate entlang des Gradienten. Die Ionenkanäle werden über das Membranpotential, eine Volumenänderung, den pH-Wert oder über einen Liganden gesteuert. Ionenkanäle haben eine große physiologische Bedeutung und etliche Erkrankungen werden auf die Fehlfunktion bestimmter Ionenkanäle zurückgeführt. Der Aufbau und die Funktion von Ionenkanälen ist daher von großem medizinischen Interesse (LEHMANN-HORN und JURKAT-ROTT, 1999; HÜBNER und JENTSCH, 2002).

Carrier:

Die Carrier lassen sich in drei Untergruppen einteilen. Zu einer Gruppe gehören die Uniporter, die lediglich ein Ion oder Molekül aufnehmen und mit einer Konformationsänderung dieses Ion entlang des Konzentrationsgradienten auf die andere Seite der Membran transportieren. Dieser passive Transport wird oft als erleichterte Diffusion bezeichnet.

Zu den anderen beiden Untergruppen gehören die Symporter und Antiporter. Diese Proteine können unter bestimmten Voraussetzungen wie die ATP-getriebenen Pumpen (siehe oben) Ionen aktiv gegen den Konzentrationsgradienten transportieren. Dazu wird der Teilchenfluss der einen Ionensorte gegen das Gefälle ihres elektrochemischen Potentials durch die Differenz des elektrochemischen Potentials einer anderen Ionensorte getrieben (ADAM *et al.*, 2003). Je nach der Kopplung des Transports unterscheidet man diese Proteine in Symporter (gleichgerichteter Transport) und Antiporter (entgegengesetzter Transport). Da Symporter und Antiporter mehrere Ionen oder Moleküle transportieren, werden sie auch oft als Cotransporter bezeichnet.

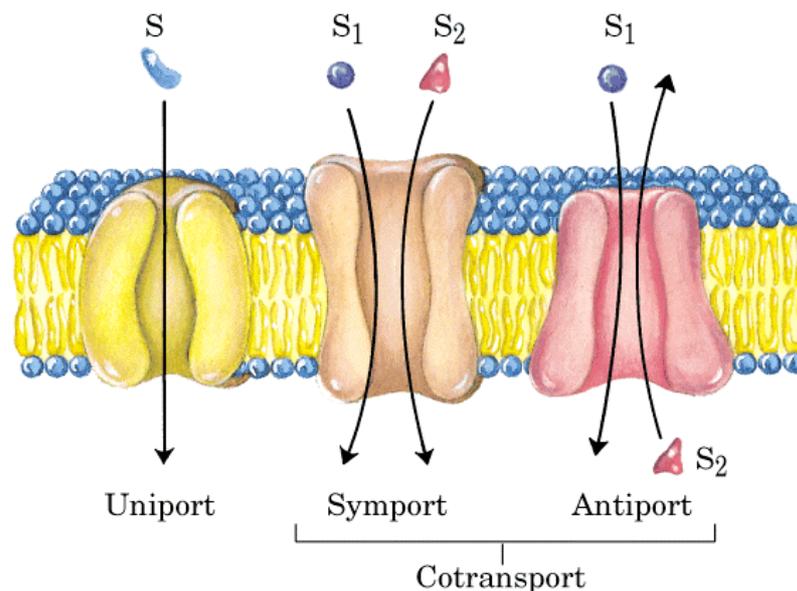


Abbildung 1.2: Die drei generellen Klassen des Transportsystems. Die Bezeichnungen treffen für den passiven und den aktiven Transport zu (NELSON und COX, LEHNINGER Principles of Biochemistry, 3rd ed., 2000).

1.3 Die *Slc4*-Genfamilie

Die *Slc4*-Genfamilie besteht bislang aus zehn Mitgliedern, welche alle für integrale Membranproteine mit einem sehr ähnlichen Hydrophobizitäts-Plot kodieren. Alle Proteine dieser Genfamilie durchspannen mit 10 bis 14 Transmembrandomänen die Zellmembran. (siehe Abbildung 1.3). Weitere Gemeinsamkeiten sind der lange N-terminale Schwanz und die Inhibition durch Stilbenderivate wie 4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-disulfat (DIDS). Eine dritte Gemeinsamkeit in der *Slc4*-Genfamilie ist die Glycosylierung an mindestens zwei Glycosylierungsstellen in der dritten extrazellulären Schleife (ROMERO *et al.*, 2004). Die einzige Ausnahme stellt das *Slc4*-Protein AE1, bei dem die vierte extrazelluläre Schleife glycosyliert ist.

Eine Röntgenkristalluntersuchung der N-terminalen Domäne von AE1 zeigte, dass AE1 als Dimer vorliegt (ZHANG *et al.*, 2000). Aufgrund der Ähnlichkeiten innerhalb der *Slc4a*-Genfamilie wird daher vermutet, dass alle *Slc4*-Transporter Dimere bilden.

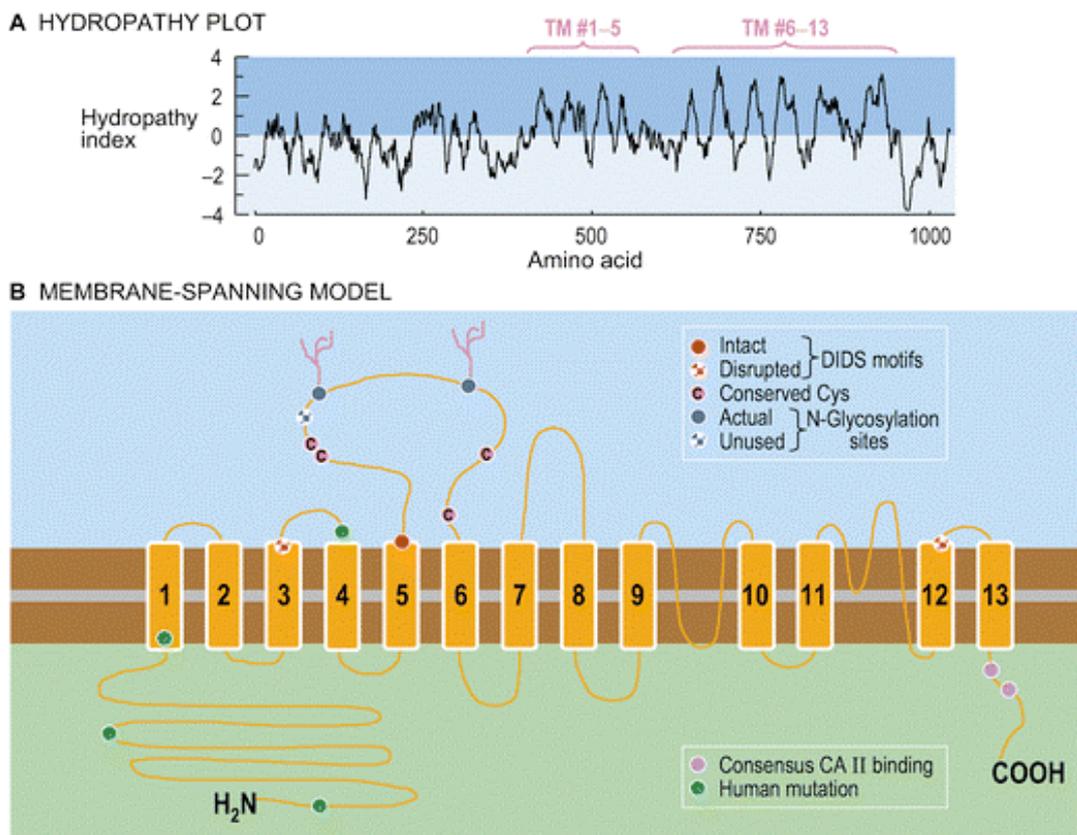


Abbildung 1.3: Strukturanalyse des *Slc4*-Proteins NBCe1 **A** Hydrophobizitäts-Plot der renalen Spleißvariante des humanen NBCe1. **B** Topologiemodell des NBCe1 basierend auf dem Modell vom *Slc4*-Protein AE1 von ZHU *et al.* 2003 (ROMERO *et al.*, 2004).

Neun der *Slc4*-Mitglieder kodieren für einen Bikarbonattransporter mit oder ohne Austausch von Chlorid- und/oder Natriumionen (ROMERO *et al.*, 2004). Die *Slc4*-Transporterfamilie ist daher auch besser bekannt als die Bikarbonat-Transporter-Familie.

Mit diesen Transporteigenschaften sind die Transporter sowohl an der Aufrechterhaltung des physiologischen pH von einzelnen Zellen als auch des Gesamtorganismus beteiligt. Ferner nehmen sie an der Regulation des Zellvolumens und an der Natrium- und Chloridabsorption verschiedener Zellen teil.

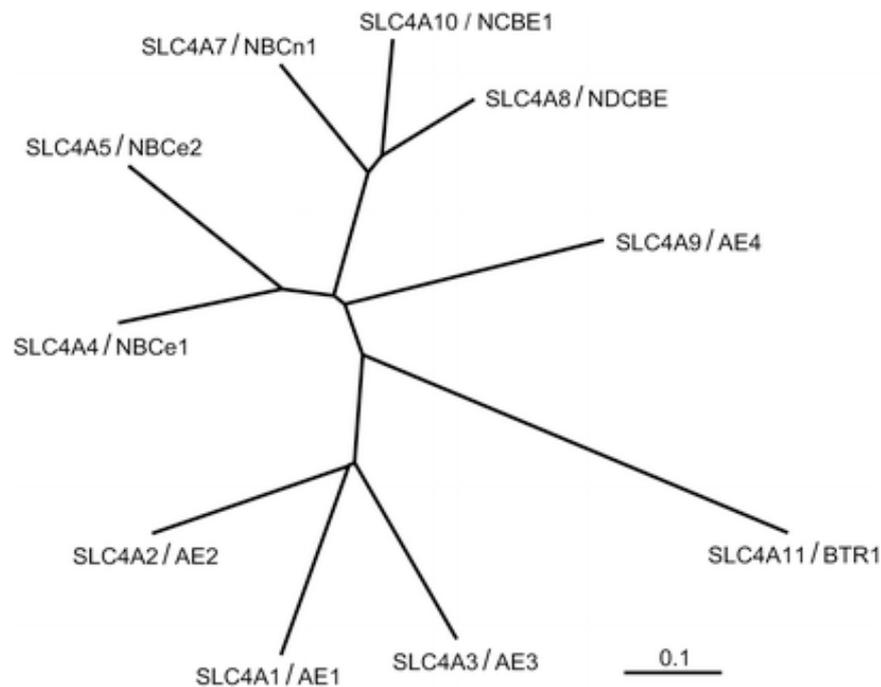


Abbildung 1.4: Phylogenetisches Dendrogramm der humanen SLC4-Genfamilie (ROMERO *et al.*, 2004).

Die *Slc4*-Genfamilie lässt sich in zwei Hauptgruppen aufteilen. Die eine Hauptgruppe bilden die drei Chlorid-Bikarbonat-Austauscher AE1-3. Die andere Hauptgruppe besteht aus den natriumabhängigen Bikarbonattransportern NBCE1, NBCE2, NBCn1, NDCBE und NCBE. Eine gemeinsame Auffälligkeit der natriumabhängigen Transporter ist eine ungewöhnlich lange dritte extrazelluläre Schleife mit vier hochkonservierten Cysteinen.

Diese zweite Hauptgruppe lässt sich weiter nach ihren elektrogenen Eigenschaften unterteilen:

NBCn1, NDCBE und NCBE sind wie die drei Chlorid-Bikarbonat-Austauscher AE1-3 elektroneutral. NBCE1 und NBCE2 dagegen sind elektrogene Natrium-Bikarbonat-Kotransporter, welche durch ihren Transport das Membranpotential verändern (ROMERO *et al.*, 2004).

Die Transporteigenschaften von AE4 sind noch nicht gut untersucht, es wird aber aufgrund der Homologie zu den NBCs vermutet, dass es sich bei AE4 ebenfalls um einen

natriumabhängigen Chlorid-Bikarbonat-Kotransporter handeln könnte, besonders da der dritte extrazelluläre Loop von AE4 ebenfalls die vier konservierten Cysteine enthält.

BTR1 wurde wegen der Homologie zu den Bikarbonattransportern versehentlich der *Slc4*-Familie zugeordnet. Kürzlich konnte aber gezeigt werden, dass es sich bei BTR1 um einen elektrogenen Borattransporter handelt (PARK *et al.*, 2004).

Die Natrium-Bikarbonat-Kotransporter (NBCs) sind Symporter für extrazelluläres Natrium und Bikarbonat, während NDCBE und NCBE als Antiporter intrazelluläres Chlorid gegen extrazelluläres Natrium und Bikarbonat austauschen (SOLEIMANI and BURNHAM, 2001).

Der Bikarbonattransport der natriumabhängigen Transporter (NBCs, NCBE und NDCBE) in die Zelle erhöht den intrazellulären pH, da Protonen „weggepuffert“ werden. Das chemische Gleichgewicht der Kohlensäure wird durch den Einstrom von Bikarbonat zu den Dissoziationsprodukten Kohlenstoffdioxid und Wasser verschoben. Das entstehende Kohlenstoffdioxid kann dann frei durch die Zellmembran diffundieren.

Die Natrium-Protonen-Austauscher (NHE) sind noch effektivere pH-Regulatoren als die Bikarbonattransporter und bewirken durch den Transport von Protonen aus der Zelle einen direkten Säureausstrom.

Die Anionenaustauscher 1 bis 3 (AE1-3) transportieren dagegen unter physiologischen Bedingungen Bikarbonat aus der Zelle und senken den intrazellulären pH. Sie beladen die Zelle mit Säure (VAUGHAN-JONES und SPITZER, 2002).

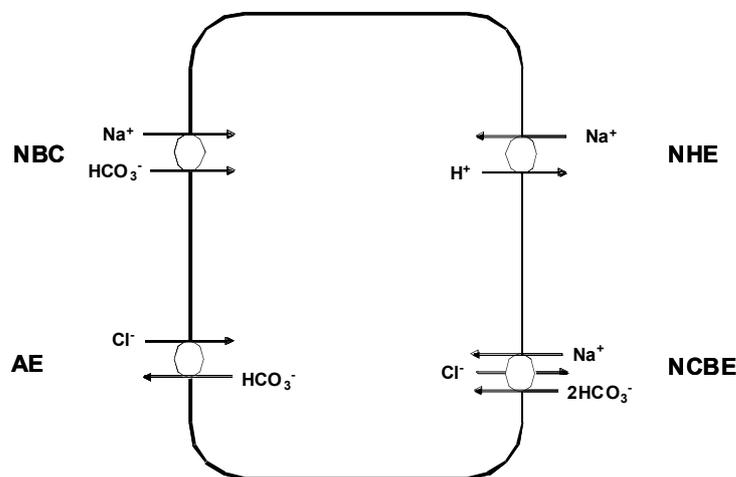


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Säure-Base-Regulatoren in nicht epithelialen Zellen.

Die Aktivität der vier abgebildeten Transporter ist mit großer Wahrscheinlichkeit allosterisch durch den intrazellulären pH reguliert (LEEM *et al.*, 1999), wobei die pH erhöhenden Transporter (NBC, NCBE und NHE) mehr von einem fallenden pH und die pH senkenden Transporter (AE1-3) durch einen steigenden pH aktiviert werden. Durch dieses Arrangement ist die Zelle in der Lage, sich vor einer schweren Azidose oder Alkalose zu schützen. Der korrekte intra- und extrazelluläre pH ist für viele Zellfunktionen essentiell (ALPER, 2002).

Die Proteine der *Slc4*-Genfamilie sind an der Regulation des intrazellulären pH in nahezu allen Zellen beteiligt. Die große Bedeutung dieser Genfamilie wird durch Erkrankungen deutlich, die durch Mutationen in den entsprechenden Genen verursacht werden.

So führen Mutationen des *Slc4a1*-Gens sowohl zu distal renal tubulären Azidosen als auch zu schweren Formen der Sphärozytose mit Hämolyse (KARET *et al.*, 1998; CHEIDDE *et al.*, 2003; TANPHAICHITR *et al.*, 1998; JAROLIM *et al.*, 1995). Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass Mutationen des *Slc4a4*-Gens zu proximal renal tubulärer Azidose mit Augenfehlbildungen führen (IGARASHI *et al.*, 1999).

Gen	Protein	Substrate	Transporttyp	Expression	Krankheit	humaner Genlocus
<i>Slc4a1</i>	AE1	Chlorid Bikarbonat	elektroneutral, Antiporter	Erythrocyten, interkalierende Zellen des renalen Sammelrohrs, Herz und Colon	Hämolyse, distal renal tubuläre Azidosen	17q21- q22
<i>Slc4a2</i>	AE2	Chlorid Bikarbonat	elektroneutral, Antiporter	basolateral in den meisten Epithelzellen		7q35-q36
<i>Slc4a3</i>	AE3	Chlorid Bikarbonat	elektroneutral, Antiporter	Gehirn, Retina, Herz und glatte Muskel- zellen, Epithelzellen der Niere	Murin: Erniedrigte Krampfschwelle Human: Polymorph- ismus führt zu gen- eralisierten Krämpfen	2q36
<i>Slc4a4</i>	NBCe1	Natrium Bikarbonat	elektrogen, Symporter	NBCe1-A: renale proximale Tubuli und Auge NBCe1-B: Breite Expression, Pankreas, Herz und Auge NBCe1-C: Gehirn	Schwere proximal renal tubuläre Azidosen, Augenfehlbildungen, Kleinwuchs	4q21
<i>Slc4a5</i>	NBCe2	Natrium Bikarbonat	elektrogen, Symporter	Leber, Hoden und Milz		2p13
<i>Slc4a7</i>	NBCn1	Natrium Bikarbonat	elektroneutral, Symporter	Milz, Hoden, Gehirn, Herz, Lunge, Leber	Blindheit, Taubheit	3p22
<i>Slc4a8</i>	NDCBE	Natrium Chlorid Bikarbonat	elektroneutral, Antiporter	Gehirn, Hoden und Ovarien		12q13
<i>Slc4a9</i>	AE4	unklar	unklar	Niere		5q31
<i>Slc4a10</i>	NCBE	Natrium Chlorid Bikarbonat	elektroneutral, Antiporter	Gehirn		2q23-q24
<i>Slc4a11</i>	BTR1	Borat Natrium Hydroxid	elektrogen, Symporter	Niere, Speicheldrüse, Hoden, Schilddrüse, Trachea	Hornhautdystrophie	20p12

Tabelle 1.1: Übersicht der *Slc4*-Genfamilie.

1.4 Slc4-Gene mit Expression im Zentralnervensystem

1.4.1 Slc4a3 (AE3)

Der natriumunabhängige Anionenaustauscher (AE3) ist zuerst 1989 von KOPITO *et al.* kloniert worden. Das humane Gen hat zwei alternative Promotoren, welche zu zwei alternativen Spleißvarianten führen. Eine Isoform wird vornehmlich im Gehirn (bAE3) und die zweite Isoform wird hauptsächlich im Herz (hAE3) exprimiert (LINDSEY *et al.*, 1990; MORGANS und KOPITO, 1993). Daneben findet man aber noch eine breite, schwächere Expression beider Varianten in verschiedenen Geweben wie Retina und Gastrointestinaltrakt (KOPITO *et al.*, 1989).

Der AE3 tauscht intrazelluläres Bikarbonat mit extrazellulärem Chlorid aus und senkt somit den intrazellulären pH. Damit trägt der AE3 zur Feinsteuerung des extra- und intrazellulären pH in verschiedenen Geweben bei. Die Spleißvariante bAE3 könnte daher eine wichtige Rolle für neuronale Funktionen spielen. Kürzlich ist die chromosomale AE3-Region 2q36 als Locus für idiopathische generalisierte Epilepsie identifiziert worden (SANDER *et al.*, 2000). Ferner ist ein Polymorphismus mit idiopathischer generalisierter Epilepsie assoziiert worden, welcher zu einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Aspartatsäure an der Position 867 im kodierenden Bereich des AE3-Gens führt (SANDER, 2002). Zudem zeigt die AE3-Knockout-Maus eine erniedrigte Krampfschwelle nach intraperitonealer Injektion von krampfauslösenden Substanzen wie Pentylentetrazol, Pilocarpin oder Bicucullin, was ebenfalls die Hypothese unterstützt, dass AE3 und somit der intrazelluläre pH die Krampfschwelle beeinflussen (HENTSCHE *et al.*, 2006).

1.4.2 Slc4a4 (NBCe1)

NBCe1 ist ein elektrogener Natrium-Bikarbonat-Kotransporter. Dieses Protein ist das erste Mal 1983 in den renal proximalen Tubuli des Salamanders (*Ambystoma*) von BORON und BOULPAEP nachgewiesen worden. Heute sind 3 Spleißvarianten A-C dieses Transporters bekannt, wobei die dritte Spleißvariante NBCe1-C fast ausschließlich im Gehirn exprimiert wird (BEVENSEE *et al.*, 2000). Es sind inzwischen vier humane Mutationen bekannt, welche zu einer schweren renal proximal tubulären Azidose, zu Augenfehlbildungen und Kleinwuchs führen (IGARASHI *et al.*, 1999).

1.4.3 Slc4a8 (NDCBE)

BORON und DE WEER haben schon 1976 an Messungen mit Mikroelektroden in Riesenaxonen von Mollusken zeigen können, dass natriumabhängige Chlorid-Bikarbonat-Austauscher eine Rolle in der intrazellulären pH-Regulation spielt. NDCBE transportiert natriumabhängig im Austausch mit intrazellulärem Chlorid extrazelluläres Bikarbonat in die Zelle und erhöht folglich den intrazellulären pH (ROMERO *et al.*, 2000). Northern Blot Analysen haben eine starke Expression in Gehirn und Hoden nachgewiesen.

Experimente an frisch dissoziierten CA1-Hippokampus-Neuronen von Ratten zeigten einen natriumabhängigen Chlorid-Bikarbonat-Austausch nach einer erzeugten Azidose in diesen Neuronen. NDCBE könnte also an der pH-Regulation von Neuronen beteiligt sein (SCHWIENING und BORON, 1994).

1.4.4 Slc4a10 (NCBE)

NCBE ist 2000 von WANG *et al.* kloniert worden und ist wie NDCBE ein natriumabhängiger Chlorid-Bikarbonat-Austauscher. NCBE ist im Nervensystem exprimiert, daneben findet man aber auch eine starke Expression in Epithelien wie im Plexus Choroideus und in der Dura (HÜBNER *et al.*, 2004). Es existieren in der Ratte die zwei Spleißvarianten rb1NCBE und rb2NCBE, welche schon früh embryonal exprimiert werden. Das rb2NCBE-Protein hat am C-Terminus 18 zusätzliche Aminosäuren und endet mit einer PSD95/Dlg/ZO-1-Domäne (PDZ-Domäne), über welche der Transporter mit dem Aktin-Zytoskelett verankert ist (LEE *et al.*, 2006). Beide Spleißvarianten erfüllen die gleichen Transportfunktionen, rb2NCBE scheint aber effektiver in der pH-Regulation zu sein (GIFFARD *et al.*, 2003).

Aufgrund der starken Expression im Nervensystem sprechen dieselben Indizien wie für NDCBE (1.4.3), dass NCBE ebenfalls eine Rolle in der pH-Regulation von Neuronen spielen könnte.

In Epithelien ist NCBE an der Sekretion beteiligt. So sind beide Spleißvarianten von NCBE an der basolateralen Seite des Plexus Choroideus lokalisiert und sind dort wahrscheinlich an der Produktion des Liquors beteiligt (BOUZINOVA *et al.*, 2005).

1.5 pH und Gehirnfunktion

Intrazelluläre Säuren fallen in allen Zellen als normales Produkt des Zellstoffwechsels an und können unkontrolliert zu einer markanten Ansäuerung führen, die die vitalen Funktionen beeinträchtigt. In diesem Punkt unterscheiden sich die Zellen des Zentralnervensystems (ZNS) nicht von den Zellen in anderen Geweben, aber im ZNS führt die elektrische Aktivität zusätzlich zu einem starken Abfall oder Anstieg der Protonenkonzentration. Die pH-Änderungen durch die neuronale Aktivität können Millisekunden bis hin zu mehreren Minuten andauern und betreffen Neurone, Gliazellen und die extrazellulären Zwischenräume (CHESLER und KAILA, 1992). Kleine Abweichungen des pH verändern die Aktivität von vielen Enzymen, Ionenkanälen und Rezeptoren. Daher kann auch die neuronale Aktivität selbst unter einem signifikanten Einfluss des pH stehen (CHESLER, 2003). Eine plötzliche Verschiebung des intrazellulären oder des extrazellulären pH kann neurotoxisch sein. Eine Azidose kann zum Koma und eine schwere Alkalose zu Krämpfen führen (KAILA und RANSOM, 1998).

Inzwischen werden Entgleisungen des pHs ebenfalls als Ursachen für Epilepsien diskutiert. So ist es bei Ratten gelungen, durch Hyperthermie eine respiratorische Alkalose zu induzieren, welche zu Krämpfen führt und somit der humanen generalisierten Epilepsie mit Fieberkrämpfen gleicht (SCHUCHMANN *et al.*, 2006). Ferner sind bei epileptischer Aktivität starke intrazelluläre Azidosen in Hippokampus-Neuronen von Ratten gemessen worden, die zwischen den Krämpfen reguliert werden. Durch eine zusätzlich induzierte Azidose konnte die epileptiforme Aktivität der Neurone verkürzt werden (XIONG *et al.*, 2000).

Um ihre Funktion zu erhalten, müssen Neurone also über präzise pH-Regulationsmechanismen verfügen. Die Wichtigkeit der pH-Regulation wird ebenfalls durch eine spontane Mutation des Natrium-Protonen-Austauschers NHE1 bei der Maus untermauert, die eine noch nicht im Detail verstandene Epilepsie und Neurodegeneration zeigt (BELL *et al.*, 1999).

1.6 Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit war die funktionelle Analyse des NCBE und Hinweise auf die physiologische Bedeutung der pH-Regulation in Neuronen zu erlangen. Eine funktionelle Analyse von Genen und Genprodukten ist aber außerhalb des Organismus nur begrenzt möglich. Die Faktoren, die für die Expression des Gens und die Funktion des Genprodukts verantwortlich sind, sind nur im Organismus in ihrer Komplexität vorhanden. Daher war der erste Fokus

dieser Arbeit die Verifizierung der konditionalen und konstitutiven NCBE-*Knockout*-Mauslinien auf DNS-, RNS- und Proteinebene. Nach Überprüfung der Inaktivierung von NCBE sollten dann die Folgen für den Organismus durch die Analyse des Phänotyps der NCBE-*Knockout*-Mäuse untersucht werden, wozu morphologische, verhaltensbiologische und elektrophysiologische Untersuchungen vorgenommen wurden. Da das humane Gen von NCBE in die Nähe eines Epilepsie-Locus kartiert (LOPES-CENDES *et al.*, 2000), wurde an den NCBE-defizienten Mäusen mit Pentylentetrazol und Pilocarpin auch die zerebrale Krampfbereitschaft getestet.

Für immunhistochemische Studien war kein käuflich zu erwerbender Antikörper gegen NCBE erhältlich, deshalb sollte durch Immunisierung von Kaninchen spezifisch gegen NCBE gerichtete Antikörper generiert werden, um zusätzlich noch detaillierte Information zur Expression und zur Lokalisation von NCBE zu erhalten.

2 Material und Methode

2.1 Verwendete Tiere

In dieser Arbeit wurde der Natrium-abhängige Bikarbonat-Chlorid-Austauscher NCBE von *Mus musculus* (LINNÉ, 1758) untersucht.

Für die Generierung der NCBE-*Knockout*-Maus wurden Tiere aus der Inzucht-Mauslinie C57/BL6 aus dem Zentrum für molekulare Neurobiologie (ZMNH, Hamburg) bezogen. Die verwendeten embryonalen R1-Stammzellen aus einer Blastozyste einer 129Sv-cp x 129J-Mausunterstammkreuzung (NAGY *et al.*, 1993) waren ebenfalls im ZMNH vorhanden.

Alle Mäuse wurden auf konventionelle Weise in klimatisierten Tierställen gehalten. Sie erhielten Futter und Wasser *ad libitum*.

Die Erzeugung der *Knockout*-Maus (Nummer 37/03) wie auch die Tierversuche wurden von der Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales genehmigt.

2.2 Chemikalien und Geräte

Alle verwendeten Chemikalien wurden in Analysequalität bezogen und stammen, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma (Deisenhofen). Zur Herstellung sämtlicher Lösungen wurde H₂O_{bidest.} verwendet. Lösungen, die für spezielle Anwendungen (PCR, RNS-Methoden) bestimmt waren oder über längere Zeit verwendet werden sollten, wurden autoklaviert.

Im Allgemeinen wurden folgende Geräte benutzt:

Zentrifugen: Heraeus Biofuge pico, Rotor 3325 (Kendro GmbH, Hanau)
 Microzentrifuge 5417R, Rotor F-45-30-11 (Eppendorf, Hamburg)
 Kühlzentrifuge 5810R, Rotor A-4-62 (Eppendorf, Hamburg)
 Speed Vac Plus SC110A (Savant Instruments, Farmingdale, NY, USA)

Photometer: Biophotometer (Eppendorf, Hamburg)

pH-Meter: pH-Meter pH526 (WTW, Weilheim)

Heizblock:	Thermomixer comfort (Eppendorf Hamburg)
Gel- und Blotkammern:	Sub-cell GT, Sub-cell Modell 192, Mini Protean 3 Cell (BIO-RAD, München) Fastblot B44 (Biometra, Göttingen)
Thermocycler:	PTC-200, MJ-Research Inc., (Waltham, MA, USA)

Desweiteren wurden diverse Waagen, Wasserbäder, Brutschränke und Rührer benutzt. Spezielle Geräte werden an entsprechender Stelle genannt.

2.3 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.3.1 Primersynthese

Alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen. Bei der Auswahl der Primer wurde darauf geachtet, dass sie nicht mit sich selbst komplementär waren und somit keine Dimere oder Haarnadelstrukturen bilden. Sie sollten eine Länge von 17-30 Nukleotide haben und ihr GC-Gehalt sollte etwa 50-60 % betragen. Zwei miteinander eingesetzte Primer (*forward* und *reward*) müssen so gewählt werden, dass ihre „*annealing*“-Temperaturen möglichst beieinander liegen. Die Auswahl der Primer erfolgte mit dem im Internet frei zugänglichen Primerkalkulationsprogramm „Oligonucleotide Properties Calculator“ (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>). Die lyophilisierten Primer wurden in autoklaviertem H₂O_{bidest.} in einer Konzentration von 100 pmol/μl gelöst und bei -20° C gelagert.

2.3.2 Isolation von genomischer DNS

Um genomische DNS für die Genotypisierung der Mäuse zu erhalten, wurden ca. 0,2 cm lange Schwanzspitzen der Tiere abgetrennt und in 500 μl speziellem Lysis-Puffer mit 20 μl Proteinase K-Zusatz bei 55° C unter kräftigem Schütteln in einem Thermomixer (Eppendorf) über Nacht verdaut.

Am Folgetag wurde die zu extrahierende Lösung durch die Zugabe von 500 μl eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) phenolysiert. Die Phenolysierung entfernt

2.3.4 Enzymatische Modifikation von DNS

2.3.4.1 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die spezifische, meist palindromische DNS-Sequenzen erkennen und spalten. Bei der Spaltung der DNS können je nach verwendetem Restriktionsenzym entweder glatte doppelsträngige Enden („*blunt ends*“) entstehen, bei denen beide DNS-Stränge an der gleichen Position getrennt werden oder es entstehen einzelsträngige Überhänge („*sticky ends*“). Die gebildeten DNS-Fragmente besitzen eine 5'-Phosphat- und eine 3'-OH-Gruppe und lassen sich wieder mit anderen DNS-Fragmenten ligieren (2.3.4.3). Sämtliche verwendete Restriktionsenzyme und die benötigten Puffer wurden von der Firma NEB bezogen. Die Restriktionsansätze wurden nach Herstellervorgaben angesetzt und meist für 90 Minuten bei 37° C inkubiert. Die entstandenen DNS-Fragmente wurden per Gelelektrophorese (2.3.5) untersucht und zur Weiterverarbeitung aus dem Gel extrahiert (2.3.6).

2.3.4.2 Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNS-Fragmenten verhindert bei der Ligation (2.3.4.3) unerwünschte Ringschlüsse kompatibler DNS-Fragmentenden. Dazu wurden 45 µl der Probe mit 5 µl *calf intestine phosphatase*-Puffer (Roche) und 1 µl Alkalischer Phosphatase (Roche) für 60 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde die Alkalische Phosphatase durch Zugabe von 2 µl EGTA 0,5 M und durch Erhitzung auf 65° C für 20 Minuten denaturiert. Die dephosphorylierte DNS wurde über eine Säule (JETquick PCR Product Purification Spin Kit, Genomed) aufgereinigt.

2.3.4.3 Ligation

Die T4-DNA-Ligase (NEB) katalysiert unter ATP-Verbrauch die Ligation von linearisierten DNS-Fragmenten zwischen einer endständigen 5'-Phosphat- und einer 3'-OH-Gruppe.

Die Ligation fand in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit einem dreifach molaren Überschuss an Insert-DNS gegenüber der Vektor-DNS, dem ATP-haltigen Ligase-Puffer und 1/10 Vol T4-DNA-Ligase statt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16° C. Anschließend konnten kompetente Bakterien mit den rekombinanten Plasmiden transformiert werden (2.3.17).

2.3.5 DNS-Gelelektrophorese

DNS besitzt aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats eine negative Ladung und wandert deshalb in einem elektrischen Feld in Richtung Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist im Agarosegel abhängig von der Molekülgröße. Je kleiner ein DNS-Fragment ist, desto schneller bewegt es sich durch das Gel.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1%igen horizontalen Agarosegelen, die mit Ethidiumbromid versetzt wurden. Ethidiumbromid ist ein fluoreszierendes, interkalierendes Molekül, das sich zwischen Basenpaarstapel der DNS einlagert und so die DNS im UV-Durchlicht sichtbar macht. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,05 ng/ml) versetzt. Nach Abkühlen auf 50-60° C wurde ein geeignetes Gel gegossen. Die Polymerisation dauerte etwa 30-40 Minuten. Die DNS-Proben wurden mit 6 x Probenpuffer bis zu einer 1 x Endkonzentration versetzt und in die Taschen des Gels gefüllt. Um die Größe der aufgetrennten Banden bestimmen zu können, wurde zusätzlich als Marker die 1 kb-DNS-Leiter von der Firma Fermentas aufgetragen. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 1 x TAE verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke und 120 V. Wenn die untere violette Front des Probenpuffers das untere Drittel des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt.

Die Auswertung der Gele erfolgte im UV-Durchlicht.

50 x TAE:	2 M Tris
	5,71 % Eisessig
	50 mM EDTA
6 x DNS-Ladepuffer:	25% Ficoll 400
	100 mM EDTA
	0,25% Bromphenolblau

2.3.6 DNS-Extraktion aus Agarosegelen

Erwünschte DNS-Fragmente wurden mit einem Skalpell unter einer UV-Lampe aus dem Gel ausgeschnitten. Mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen (Hilden) konnten die DNS-Fragmente aus den Agarosegelen eluiert werden. Das Prinzip der DNS-Extraktion beruht auf der selektiven Bindung von DNS an eine Matrix aus Silicagel unter hohen Salzkonzentrationen bei pH-Werten unterhalb von pH 7,5. In einem leicht alkalischen Milieu (bei pH-Werten größer pH 8) und bei niedrigeren Salzkonzentrationen lassen sich die gebundenen DNS-Moleküle nach einem Waschschrift wieder ablösen und eluieren. Mit

dieser Methode können Fragmente von 40 bp bis 10 kb extrahiert und gereinigt werden. Kleinere DNS-Moleküle, wie Primer, werden hierbei entfernt.

Es wurde nach Angaben des Herstellers gearbeitet. Eluiert wurde die DNA in 50 µl *low* TE-Puffer oder Elutionspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,5). Die DNS-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (2.3.3).

Low TE-Puffer: 1 ml Tris-HCl (1M, pH 8)
 20 µl EDTA (0,1 M, pH 8)
 mit H₂O_{bidest.} auf 100 ml auffüllen

2.3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion kann ein in Länge und Sequenz definierter Abschnitt amplifiziert werden. Der Bereich wird durch spezifische Primer festgelegt, die an einen Einzelstrang binden und den Startpunkt für die thermostabile DNS-Polymerase liefern. Als Substrat für die DNS-Polymerase dient ein Gemisch aus den vier Desoxyribonukleotid-Triphosphaten (dNTP's).

Die PCR besteht aus drei Schritten, die einen Zyklus bilden. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige Matrizen-DNS bei 94° C denaturiert. Der folgende Schritt, die Anlagerung (*Annealing*) der spezifischen Oligonukleotidprimer an ihre komplementären Sequenzen, erfolgt bei einer Temperatur, die abhängig von der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer ist. Im letzten Schritt, der Elongation, werden die komplementären Stränge ausgehend von den Primern in 5'→3'-Richtung mit Hilfe der *Taq*-Polymerase synthetisiert. Dies erfolgt bei 72° C.

Anschließend beginnt der nächste Zyklus mit der Denaturierung der entstandenen Doppelstränge. Es folgen ca. 30 bis 35 weitere Zyklen. Auf diese Weise wird die DNS zwischen den spezifischen Primern exponentiell vervielfältigt. Am Ende des letzten Zyklus wird bei 72° C 10 Minuten elongiert, damit das Enzym alle amplifizierten Stränge vervollständigen kann.

Die verwendeten Reagenzien wurden von der Firma Qiagen (Hilden) bezogen. Als Thermocycler wurde das Gerät PTC-200 der Firma MJ-Research Inc. (Waltham, MA, USA) benutzt.

2.3.7.1 Genotypisierung mittels PCR

Zur Bestimmung des Genotyps der verwendeten Mauslinien wurden spezifische PCR-Protokolle entwickelt, um die Genotypisierung zu vereinfachen. Für alle PCR-Reaktionen war nur ein einziges Programm notwendig, lediglich die verwendeten Primer sind zum Teil unterschiedlich. Zur Genotypisierung des konstitutiven *Knockouts* wurde eine Multiplex-PCR durchgeführt, das heißt, dass in einer Reaktion mehrere Primerpaare gleichzeitig vorliegen. Man erhält entsprechend mehrere Banden in unterschiedlicher Größe. Im vorliegenden Fall wurden drei Primer verwendet. Der Vorwärtsprimer konnte mit beiden Rückwärtsprimern jeweils ein spezifisches Fragment erzeugen.

Mauslinie	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	PCR-Fragment	Genotyp
Konstitutiver <i>Knockout</i>	NCBE hin2	CTGCAAGCAATGTGTGAGGAG	598 bp	WT
	NCBEWTR1	GAGCAGCCCAGATGTACACCAGC		
	NCBE rück2	CTCCCTACAGACCTCCAACAGCG	694 bp	KO
Konditionaler <i>Knockout</i>	NCBE hinkond1	GGAGGACTGTTGGGAGAAGC	811 bp	WT
	NCBE rück2	CTCCCTACAGACCTCCAACAGCG	934 bp	flox

Tabelle 2.1: Genotypisierungsprimer.

PCR-Ansatz (50µl): 5 µl 10 x Polymerase Puffer
 1 µl 10 µM von jedem dNTP
 1 µl gDNS (100 ng)
 1 µl von jedem Primer (10 pmol)
 1,5 µl 50 mM MgCl₂
 2,5 units *Taq*-Polymerase
 38 µl H₂O

PCR-Programm:

1. Denaturierung	94° C	5 Minuten
2. Denaturierung	94° C	30 Sekunden.
3. Annealing	58° C	30 Sekunden.
4. Elongation	72° C	1 Minute.

Die Schritte 2 bis 4 werden 35 Mal wiederholt

5. Elongation	72° C	10 Minuten
6. Kühlung	4° C	∞

2.3.8 DNS-Sequenzierung

DNS-Sequenzierungen erfolgten im Institut für Humangenetik nach der Didesoxy-Methode (SANGER *et al.*, 1977) mit dem ABI Prism Dye Terminator Kit und dem Sequenzierungsgerät ABI Prism 377 DNA Sequenzer der Firma PE Applied Biosystems (Weiterstadt). Das Prinzip der Methode beruht auf dem Einbau von fluoreszenzmarkierten Di-Desoxynukleotiden. Diese führen in einer PCR-Reaktion zum Kettenabbruch, so dass sich am Ende einer jeden solchen Kette ein markiertes Nukleotid befindet. Die vier ddNTPs sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert, die während der Kapillar-Elektrophorese von einem Laser detektiert werden. Anhand der Größe der einzelnen PCR-Fragmente und deren Fluoreszenzfarbe kann die Sequenz der Probe ermittelt werden.

2.3.9 Southern Blot

Gel und Membrantransfer:

Das Prinzip des Southern Blots besteht darin, eine bestimmte Menge DNS mittels Gelelektrophorese (2.3.5) aufzutrennen und anschließend die DNS-Fragmente im Gel auf eine Nylonmembran zu übertragen. Die DNS auf der Membran wird immobilisiert und kann mit spezifischen radioaktiv markierten Sonden hybridisiert werden und durch Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden.

Ein 0,7%iges, mit den zuvor verdauten DNS-Proben beladenes Agarosegel wurde 5-7 Stunden bei 70-100 V mittels Elektrophorese aufgetrennt. Nach dem Auftrennen wurde das Gel 15 Minuten in 0,25 M HCl inkubiert. Dies führt durch partielle Depurinierung zu Strangbrüchen, was den Transfer großer DNS-Fragmente auf die Membran erleichtert. Dabei ist ein Farbumschlag des Auftragspuffers von blau auf grün/gelb zu beobachten. Anschließend wurde das Gel kurz in H₂O gespült und 15 Minuten in 0,4 M NaOH äquilibriert. Für den anschließenden Blotaufbau wurde eine Glasplatte auf einer Wanne platziert. Als Transferpuffer wurde 0,4 M NaOH eingesetzt, womit eine Kunststoffwanne ausreichend befüllt wurde. Hierauf wurde eine in den Transferpuffer ragende Brücke aus Whatman-Papier gelegt. Nun wurden 3 mit 0,4 M NaOH angefeuchtete Whatman-Papiere in der Größe des Gels luftblasenfrei auf die Brücke gelegt. Darauf wiederum wurden zuerst das Gel und darauf die Nylonmembran in gleicher Größe gelegt. Auf die Membran kamen schließlich 3 weitere mit 0,4 M NaOH angefeuchtete Whatman-Papiere und abschließend wurde eine mehrere

Zentimeter hohe Schicht Zellstoff aufgesetzt. Dieser Blotaufbau wurde mit Gewichten beschwert. Durch den Druck und die Saugwirkung werden die DNS-Fragmente aus dem Gel in Richtung der Membran transferiert, wo die negativ geladene DNS von der positiv geladenen Membran gebunden wird. Der DNS-Transfer erfolgte über Nacht. Am Folgetag wurde der Blot schrittweise abgebaut und die Membran mit der Seite nach oben, auf die die DNS übertragen wurde, in 2 x SSC gewaschen und anschließend getrocknet. Durch zwei Stunden backen bei 80° C wurden die DNS-Fragmente kovalent an die Membran gebunden. Anschließend konnte die Hybridisierung erfolgen.

20 x SSC: 3 M NaCl
 0,3 M Natriumcitrat

Herstellung radioaktiv markierter Sonden:

Die radioaktive Markierung erfolgte mittels des redi prime 2 Pufferkits der Firma Amersham Biosciences. Hierbei wurde 5 ng DNS-Sonde mit H₂O auf 45 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und 5 Minuten auf 95° C erhitzt. Die denaturierte Sonde wurde kurz auf Eis gestellt und anschließend auf das gebrauchsfertige Lyophilisat des redi prime 2 Pufferkits pipettiert, welches die benötigten Random Primer, Nukleotide, Polymerase usw. enthält. Nach kurzem Mischen und Abzentrifugieren wurden nun 5 µl (50 µCi) der ³²P markierten dCTPs hinzugefügt. Der gesamte Ansatz wurde anschließend für 30 Minuten bei 37° C inkubiert, wobei in den neusynthetisierten DNS-Strängen die radioaktiv markierten Nukleotide eingebaut werden. Eine MicroSpin G-25 Säule von Amersham Biosciences wurde durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 3000 rpm vom Transportmedium befreit. Anschließend wurde die gesamte Probe über diese Säule durch Zentrifugation bei 3000 rpm gereinigt. Zur quantitativen Kontrolle der Radioaktivität wurde 1 µl der Probe mit einem Szintillationszähler von Beckmann gemessen. Die radioaktiv markierte Sonde kann nun an komplementären DNS-Fragmenten hybridisieren und detektiert werden.

Hybridisierung:

Zur Prähybridisierung wurde die Membran zunächst mit 20 ml Speed Hybrid 2 und 200 µg/ml denaturierter Heringssperma-DNS in ein Hybridisierungsrohr gegeben und bei 68° C für 30 Minuten im Rotationsofen geblockt. Währenddessen wurde die radioaktiv markierte DNS-Sonde (2.3.9.2) 5 Minuten bei 95° C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Zur Hybridisierung der Membran wurden 500.000 bis max. 1.000.000 cpm der DNS-Sonde mit 200 µg/ml denaturierter Heringssperma-DNS in 20 ml Speed Hybrid 2 eingesetzt. Dieses Gemisch wurde anschließend zusammen mit der prähybridisierten DNS-Membran in ein Hybridisierungsrohr gegeben und über Nacht bei 68° C im Rotationsofen hybridisiert.

Am Folgetag wurde die Membran dreimal jeweils 30 Minuten mit 2 x SSC/0,1 % SDS und 5 Minuten mit 0,1 x SSC/0,1 % SDS bei 65° C gewaschen, bis der Waschpuffer keine Radioaktivität mehr aufwies und in feuchtem Zustand in Haushaltsfolie eingepackt. Zur bildgebenden Dokumentation wurde auf die Membran für einige Tage in einer Filmkassette ein konventioneller Röntgenfilm (Kodak BioMax MS) aufgelegt. Der Film wurde in einem Optimax X-Ray Film Processor (Protec, Oberstenfeld) entwickelt. Die Lagerung der Membran erfolgte feucht in Haushaltsfolie bei -80° C.

20 x SSPE: 3,6 M NaCl
 200 mM Natriumphosphat
 0,02 M EDTA
 pH 7,7

Speed Hybrid 2: 7 % SDS
 10 % Polyethylenglycol
 1,5 x SSPE

2.3.10 RNS-Präparation

Ein wichtiger Punkt bei der RNS-Präparation ist eine saubere und schnelle Arbeitsweise, um den Abbau der RNS durch RNasen zu vermeiden.

Daher ist folgendes zu beachten:

- das Tragen von Handschuhen
- die Verwendung von gestopften Pipettenspitzen sowie gereinigten und autoklavierten Geräten und Gefäßen
- das Arbeiten auf Eis
- die Vorbereitung aller für die Isolation notwendigen Lösungen und Materialien, um zügiges Arbeiten zu ermöglichen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit DEPC-H₂O angesetzt.

DEPC-H₂O: 100 ml H₂O_{bidest}
 100 µl DEPC (Diethylpyrocarbonat)
 kurz aufkochen oder alternativ 2 Stunden bei 37° C erhitzen
 autoklavieren

2.3.11 Isolation von Gesamt-RNS aus Gewebe

Für die Isolierung von Gesamt-RNS aus Mausgewebe wurde das RNeasy Maxi/Midi Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet.

Für die RNS-Extraktion wurden zunächst die benötigten Organe der zuvor durch CO₂-Inhalation getöteten Maus entnommen und in Flüssigstickstoff gefroren. Die Gewebe wurden anschließend nach Angaben des Herstellers im Homogenisierungspuffer unter Anwendung eines elektrischen Homogenisierungsstabs zerkleinert und zu einer einheitlichen Suspension gerührt. Nach 10-minütiger Zentrifugation der Suspension bei 5000 g wurde der Überstand in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol 70 % Ethanol geschüttelt. Nun wurde das Gemisch über eine mitgelieferte entsprechende Säule gegeben und erneut bei 5000 g für 5 Minuten zentrifugiert und nach Angaben des Herstellers weiterverarbeitet. Zum Schluss wurde die RNS mit DEPC-H₂O eluiert und bei -80° C gelagert. Die Isolierung der RNS erfolgte unter streng RNase-freien Bedingungen.

2.3.12 Northern Blot

Das Prinzip des Northern Blots besteht darin, eine definierte Menge RNS in einem denaturierenden 1%igen Agarosegel aufzutrennen und anschließend aus dem Gel auf eine Nylonmembran zu übertragen. Die RNS wird auf der Membran immobilisiert und kann mit spezifischen radioaktiv markierten Sonden hybridisiert und durch Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden.

Vor der Elektrophorese wurden die Gelkammer, der Gelkamm und der Gelschlitten mit 70%igen Ethanol gereinigt und anschließend mit autoklaviertem H₂O_{bidest.} gespült. Zum Ansetzen der Gellösung wurden stets nur autoklavierte Glasgeräte benutzt. Für ein Gel wurde 1,44 g Agarose mit 88 ml DEPC-H₂O aufgekocht und anschließend 12 ml 10 x MOPS-Puffer (3-(N-Morpholino)-2-Hydroxypropansulfon-säure-Natriumsalz) hinzugegeben. Nach Abkühlen auf 50-60° C wurden 20 ml Formaldehyd (≥ 37 %) dazugegeben und das Gel gegossen. Formaldehyd verhindert die Aktivität von RNAsen während der Elektrophorese. Als Elektrophoresepuffer diente 1 x MOPS-Puffer. Die RNS-Proben (in der Regel 5-10 µg) wurden mit 3 Vol des RNS-Probenpuffer versetzt, 5 Minuten bei 65° C denaturiert und dann auf das Gel aufgetragen. Nach ca. 2 bis 3 Stunden Elektrophorese war die Gesamt-RNS genügend nach ihrer Größe aufgetrennt und das Gel konnte 20 Minuten mit 20 x SSC gewaschen werden.

Der Blotaufbau erfolgte wie beim Southern Blot (siehe 2.3.9.1). Als Transferpuffer wurde 20 x SSC verwendet.

Am Folgetag wurde der Blot abgebaut und die Membran für 2 Minuten in 2 x SSC gewaschen und anschließend für 2 Stunden bei 80° C gebacken. Anschließend wurde die Membran für 5 Minuten in 5 % Essigsäure gewaschen und für ca. 10 Minuten in 0,04 % Methyleneblau Färbelösung gefärbt. Die gefärbte Membran wurde nun mehrmals mit H₂O_{bidest.} gewaschen und anhand der sichtbar werdenden 28-S-RNS und 18-S-RNS Banden auf ihre Qualität überprüft. Die Hybridisierung erfolgte wie beim Southern Blot (2.3.9.3).

DEPC-H₂O: 100 ml H₂O_{bidest.}
 100 µl DEPC (Diethylpyrocarbonat)
 kurz aufkochen oder alternativ 2 Stunden bei 37°C erhitzen
 autoklavieren

10 x MOPS: 200 mM MOPS
 50 mM Natriumacetat
 10 mM EDTA (pH 8)
 pH 7

RNS-Probenpuffer: 720 µl Formamid
 160 µl 10 x MOPS
 260 µl Formaldehyd
 180 µl DEPC-H₂O
 10 µl Glycerin
 80 µl gesättigte Bromphenolblau-Lösung

20 x SSC: 3 M NaCl
 0,3 M Natriumcitrat

2.3.13 cDNS-Synthese

Die cDNS-Synthese wurde mit dem Superscript II Kit von Invitrogen durchgeführt. Die Gesamt-RNS-Präparation (2.3.11) wurde zuerst mit 2 u DNase von NEB behandelt, um mögliche Verunreinigungen durch DNS zu verhindern. Durch Verwendung von Oligo(dT)-Primern wurde primär mRNS, deren Moleküle am 3'-Ende eine poly(A)-Sequenz tragen, in Einzelstrang-DNS umgeschrieben. Ein anschließender Verdau des RNS-Anteil der RNS-cDNS-Hybride erfolgte mit der RNase H von Invitrogen.

2.3.14 Quantitative Real-Time PCR

Mit Hilfe des SYBR Green Jumpstart™ Taq Ready Mix (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) ist es möglich, cDNS zu amplifizieren und zu quantifizieren. Das System nutzt den Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green, der an kleine Vertiefungen der doppelsträngigen DNS-Helix bindet. Der zu amplifizierende DNS-Abschnitt wird durch die verwendeten Primer festgelegt und sollte ca. 100 bis 150 Basen lang und exonübergreifend sein, um eine eventuelle Kontamination mit genomischer DNS im Reaktionsansatz zu egalisieren. An dem entstehenden Amplifikat, welches durch die Taq-Polymerase synthetisiert wird, binden mehrere Moleküle des Farbstoffs. Durch die Bindung wird die emittierende Fluoreszenz bei gleicher Anregung um ein Vielfaches verstärkt, so dass man eine direkt zur Anzahl der synthetisierten Doppelstränge proportionale Fluoreszenz messen kann. Die Anregung des SYBR-Green Farbstoffes erfolgt durch das Fluorometer des *Cyclers* bei einer Wellenlänge von 528 nm. Dieser steht in Verbindung mit einem angeschlossenen Computer, an dem die Auswertung erfolgte.

Von jeder Probe erfolgte eine dreifache Bestimmung. Zu jedem Versuch wurde ebenfalls eine Leerkontrolle mitgeführt, um Kontaminationen auszuschließen. Als interne Kontrolle wurde auch der cDNS-Gehalt des Haushaltsgens Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase (HPRT) bestimmt, der dann zur Auswertung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode herangezogen wurde.

Der $\Delta C_{T-Probe}$ -Wert wurde als Differenz aus den C_T -Werten der cDNS der zu untersuchenden Gene und der cDNS des Haushaltsgens HPRT berechnet. Der $\Delta C_{T-Kontrolle}$ -Wert berechnete sich aus der Differenz der cDNS der gleichen Gene vom Kontrolltier. Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert ergab sich aus der Differenz von $\Delta C_{T-Probe}$ zu $\Delta C_{T-Kontrolle}$ -Wert.

$$\Delta C_{T-Probe} = C_{T-GenX} - C_{T-HPRT}$$

$$\Delta C_{T-Kontrolltier} = C_{T-GenX-Kontrolltier} - C_{T-HPRT-Kontrolltier}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T-Probe} - \Delta C_{T-Kontrolle}$$

Das Verhältnis der Expression wurde durch $2^{\Delta\Delta C_T}$ bestimmt und gilt streng nur bei idealer Amplifikation, bei der jeder PCR-Zyklus eine Verdopplung der DNS bewirkt.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Länge(Bp)	Gen	Nummer
Slc4a10QF	CGCAATCGATCTGCCAATCT	20	Slc4a10	1
Slc4a10QRev	GAGCTGTGGTTGCCTTTGTCA	21	Slc4a10	2
Slc4a7QF	TGCACCTCCCATTCGAAAG	19	Slc4a7	3
Slc4a7Qrev	GGCAGTTTTGGCCATTTTCAT	20	Slc4a7	4

Slc4a8QF	GCCTAAAACCACGGTCTGGAA	21	Slc4a8	5
Slc4a8Qrev	GGCACCTCATGGTCCAAATCT	21	Slc4a8	6
Slc9a1QF	GATGAAGCAGGCCATTGAGCT	21	Slc9a1	7
Slc9a1Qrev	GCAAGATGCGGTCTGAAGTCA	21	Slc9a1	8
Slc9a3QF	TATCTCAGCTGTGAACCCCGA	21	Slc9a3	9
Slc9a3Qrev	GCAGAACAACACCAATGGCTC	21	Slc9a3	10
Slc9a5QFRno	AGCCTACCTCACTGCCGAAAT	21	Slc9a5	11
Slc9a5QrevRno	TGCCAAGGAGCATGAAGATG	20	Slc9a5	12
Slc9a8QF	GAACGGCAATCTCGGCTTTT	20	Slc9a8	13
Slc9a8Qrev	AATCGCAATAGTGGCGACTGG	21	Slc9a8	14
Slc26a8QF	CAATCTGCCTAACGCTGTGCT	21	Slc26a8	15
Slc26a8Qrev	TACTGGTCCTGCCTCCACAAA	21	Slc26a8	16
Slc26a11QF	TTGCTCATTCTCCTGCACTCG	21	Slc26a11	17
Slc26a11Qrev	TTCGTTATTGCCTCTCGGAGG	21	Slc26a11	18
Slc12a4QF	TTCTGTGACAGGCATCATGGC	21	Slc12a4	19
Slc12a4Qrev	AGCGAAGTGGTAACAATGGCC	21	Slc12a4	20
Slc12a7QF	AGGCTTGGAAGGAGGCAGATA	21	Slc12a7	21
Slc12a7Qrev	TCATGCACGATCCACCACA	19	Slc12a7	22
Slc12a6QF	AAGTGGTGGAGATGCACGACA	21	Slc12a6	23
Slc12a6Qrev	TGTTTTGGACAGCCGCATATG	21	Slc12a6	24

Tabelle 2.2: Primer und Größe des PCR-Produkts für die Quantifizierung durch Real-Time-PCR.

2.3.15 Klonierung von PCR-Fragmenten

Zur Sequenzanalyse wurden die aufgereinigten PCR-Fragmente in einen Vektor ligiert, anschließend in *E. coli* XL1-Blue MRF' transformiert und dort vermehrt.

Für die Klonierung wurde das TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen, Groningen) mit dem Vektor pCR[®]4-TOPO[®] verwendet. Bei diesem Klonierungsverfahren ist keine Ligase notwendig. Eine kovalent an den Vektor gebundene Topoisomerase I schneidet die Vektor-DNA nach der spezifischen Sequenz 5'-CCCTT. Es kommt zur Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des gespaltenen Stranges und der Hydroxylgruppe eines Tyrosylrestes der Topoisomerase. Diese Bindung wird durch den Angriff des 5'-OH von dem PCR-Produkt gelöst, so dass das gewünschte Insert in den Vektor hineinligiert wird. Zur Gewährleistung der Ligation ist ein überhängendes Desoxyadenosin am PCR-Produkt erforderlich, das zu dem Desoxythymidinüberhang des Vektors komplementär ist.

Ligationsansatz: 4,5 µl PCR-Produkt

0,5 µl pCR[®] 4-TOPO[®] Vektor (10 ng)
1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂)

Der Ligationsansatz wurde gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Transformation wurde der gesamte Ansatz zu 25 µl chemisch kompetenten *E. coli*-TOP10-Zellen gegeben und für 30 Minuten auf Eis gehalten. Nach einem kurzen Hitzeschock (30 Sekunden bei 42° C), der die Aufnahme der Plasmide in die Bakterien bewirkte, wurden 250 µl SOC-Medium zum Ansatz gegeben und die Bakterien mindestens eine Stunde bei 37° C geschüttelt. Danach wurden die transformierten Bakterien auf LB-Ampicillin-Agarplatten (2.4.2) ausplattiert. Von den Kolonien wurden Flüssigkulturen für die Plasmidpräparation angesetzt. Der Erfolg der Ligation wurde über Restriktionsverdau der isolierten Plasmide und anschließender Gelelektrophorese getestet.

SOC-Medium: 2 % Trypton
 0,5 % Hefeextrakt
 10 mM NaCl
 2,5 mM KCL
 10 mM MgCl₂
 10 mM MgSO₄
 20 mM Glucose
 pH 7,0

2.3.16 Herstellen von kompetenten Bakterien

Es wurde der Bakterienstamm *Echerichia coli* (*E. coli*) XL1 blue verwendet. Zunächst wurden Bakterien auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden dann einzelne Kolonien mit Pipettenspitzen in sechs Reagenzgläser mit je 2 ml Y-broth angeimpft und zwei Stunden bei 37° C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden diese Vorkulturen in 500 ml Y-broth geschüttet und bis zu einer OD bei 600 nm von 0,3-0,35 wachsen gelassen. Nun wurde die Kultur auf zwei 50 ml Polypropylenröhrchen verteilt, kurz auf Eis gestellt und dann bei 4° C und 2000 g pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in je 15 ml TFB 1 resuspendiert und 60-90 Minuten erneut auf Eis gestellt. Anschließend wurde ein weiteres Mal mit 2000 g pelletiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in je 2 ml TFB 2 resuspendiert. Die Bakterien wurden nun in 200 µl Aliquots aufgeteilt, sofort in Flüssigstickstoff gefroren und anschließend bei -80° C gelagert.

LB Medium: 1 % Bacto-tryptone

	0,5 % Bacto Hefeextrakt
	200 mM NaCl
	pH 7,5
Y-broth:	LB Medium
	4 mM MgSO ₄
	5 mM KCl
TFB 1:	15 % Glycerin
	10 mM CaCl ₂
	30 mM Kaliumacetat
	pH 5,8
	100 mM RbCl
	50 mM MnCl ₂
TFB 2:	15 % Glycerin
	10 mM MOPS
	75 mM CaCl ₂
	10 mM RbCl

2.3.17 Transformation kompetenter Bakterien

Transformation bezeichnet das Einbringen fremder DNS in Bakterien. Zyklische Plasmide mit einem eigenen Replikationsursprung, der von den bakteriellen DNS-Polymerasen erkannt wird, werden in der Zelle vervielfältigt und bei der Zellteilung auf die Tochterzellen verteilt. Aufgrund des Antibiotikums im Medium kommt es zu einem Selektionsdruck, der dafür sorgt, dass die Bakterien die fremde DNS behalten. Zu 50 µl auf Eis aufgetauter kompetenter Bakterien wurden 5 µl eines Ligationsansatzes oder 0,5 µg einer DNS-Präparation hinzupipettiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienansätze 90 Sekunden auf 42° C erwärmt. Danach wurden 800 µl SOC-Medium hinzugegeben und ca. eine Stunde bei 37° C unter Schütteln inkubiert. Zwischen 50 µl und 1 ml des Ansatzes wurden nun auf einer LB-Ampicillin-Agarplatte (2.4.2) mit einer Pipette gleichmäßig verteilt, ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert (2.4.4). Von dieser Plattenkultur wurden am Folgetag Einzelkolonien entnommen und in Flaschenkultur (2.4.5) vermehrt.

SOC-Medium: 2 % Trypton

0,5 % Hefeextrakt
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
20 mM Glucose
pH 7,0

2.3.18 Isolierung von Plasmid-DNS (Minipräparation)

Die Plasmidisolierung aus Bakterien erfolgte mit dem E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I der Firma Peqlab (Erlangen). Diese Methode basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterien (BIRNBAUM und DOLY, 1979), anschließender Präzipitation der bakteriellen Proteine und einer Aufreinigung der DNS über eine Silicagel-Membran-Säule. Es wurde nach Angaben des Herstellers gearbeitet.

Die Bakterien, die das zu isolierende Plasmid enthielten, wurden in Flüssigkulturen (2.4.5) über Nacht herangezogen. Für die Plasmidpräparation wurden 3 ml dieser Bakterienkulturen eingesetzt. Diese wurden zunächst pelletiert und unter alkalischen Bedingungen lysiert. RNS wurde durch RNase A verdaut. Das alkalische Lysat wurde dann neutralisiert und an Hochsalzbedingungen angeglichen. Dies hatte zur Folge, dass denaturierte Proteine, Zelltrümmer und membrangebundene chromosomale DNS präzipitierten und abzentrifugiert werden konnten. Der Überstand mit der Plasmid-DNS wurde auf eine HiBind[®]-Miniprepsäule geladen, an deren Silikamembran die Plasmid-DNS reversibel gebunden wurde. Durch Waschen der Säule mit einem Waschpuffer wurden restliche Kontaminationen entfernt. Zum Schluss wurde die Plasmid-DNS in 50 µl H₂O_{bidest.} eluiert und bei -20° C aufbewahrt.

2.3.19 Isolierung von Plasmid-DNS (Maxipräparation)

Wurden größere Mengen sehr reiner Plasmide benötigt, wurden das Maxipräparation-Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Das Verfahren beruht ebenfalls auf der alkalischen Lyse, verwendet jedoch zur Reinigung der Plasmide nach der Entfernung der Zellreste und der genomischen DNS durch Zentrifugation und Filtration zusätzlich eine Anionenaustauschersäule. Die Wasch- und Elutionspuffer sorgen für eine vollständige Abtrennung aller Verunreinigungen (RNS, Protein, Salze).

2.4 Allgemeine mikrobiologische Methoden

2.4.1 Bakterien und Vektoren

Bakterien:

E. coli XL1-Blue MRF' (Stratagene, Heidelberg); Resistenz gegen Tetracyclin

E. coli-TOP10 chemically competent cells aus dem TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, Groningen)

Vektoren:

pCR® 4-TOPO® (Invitrogen, Groningen): 3957 bp; Kanamycin- und Ampicillinresistenz

pBluescript II KS (Stratagene, Heidelberg): 3kb; Ampicillinresistenz

pCMV-SPORT6 (Invitrogen, Groningen): 4396 bp; Ampicillinresistenz

pKO Scrambler V901 (Lexicon Genetics Inc., The Woodlands, Texas): 1969 bp; Ampicillinresistenz

pBS246 (Life Technologies): 2534 bp; Ampicillinresistenz

2.4.2 Nährmedien und Agarplatten

Alle Nährmedien wurden direkt nach der Herstellung für 30 Minuten bei 121° C und 1,0 bar autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden die Agar-Lösungen auf 55° C abgekühlt und etwa 5 mm hoch in Petrischalen gegossen (große Platten: Ø 132 mm; kleine Platten: Ø 82 mm). Um selektives Wachstum bestimmter Bakterien zu begünstigen, wurden nach der Abkühlung noch 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin oder 12,5 µg/ml Tetracyclin dem Medium hinzugefügt. Nach Erstarren der Agar-Lösungen wurden die Platten bei 4° C im Kältelabor aufbewahrt, während Nährmedien bei Raumtemperatur und im Dunkeln gelagert wurden.

LB-Medium (pro Liter):	10,0 g NaCl
	10,0 g Tryptone
	5,0 g Hefeextrakt
	pH 7,0

LB-Agar:	20,0 g Agar-Agar auf 1 Liter LB-Medium
----------	--

2.4.3 Glycerinkulturen

Glycerinkulturen dienen zur Aufbewahrung von Bakterien bei -80°C . Aus frischen Flüssigkulturen der zu konservierenden Bakterien wurden $500\ \mu\text{l}$ entnommen, mit dem gleichen Volumen an 50% (w/v) Glycerin vermischt und bei -80°C eingefroren. Solche Glycerinkulturen sind für mehrere Jahre haltbar.

2.4.4 Plattenkulturen

Die Bakterien wurden mit einer ausgeglühten Pasteurpipette oder einer sterilen Impfschlinge auf einer Agarplatte ausgestrichen, welche mit einem geeigneten Antibiotikum versetzt wurde. Diese Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und konnten anschließend bei 4°C gelagert werden.

2.4.5 Flüssigkulturen

Um eine Flüssigkultur herzustellen, wurde eine Einzelkultur mit Hilfe einer sterilen Impfschlinge von einer Plattenkultur gepickt und in LB-Medium überführt. Die Art des verwendeten Antibiotikums hing von den verwendeten Bakterien und Vektoren ab. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C und $200\ \text{rpm}$ geschüttelt.

LB-Medium (pro Liter): $10,0\ \text{g NaCl}$
 $10,0\ \text{g Tryptone}$
 $5,0\ \text{g Hefeextrakt}$
 $\text{pH } 7,0$

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Membranpräparation von Gewebe

Die Membranpräparation dient zur Trennung der Zellmembranen von den restlichen Zellbestandteilen. Dieses Verfahren bietet insbesondere dann einen Vorteil, wenn membranständige Proteine untersucht werden sollen, da hierdurch der Anteil dieser an der

Gesamtlösung deutlich erhöht werden kann. Somit kann aufgrund der höheren Konzentration an Zielproteinen bei nachfolgenden Experimenten wie z.B. Western Blot (2.5.4) ein vielfach besseres Endergebnis erzielt werden.

Die benötigten Organe einer zuvor durch CO₂-Insufflation getöteten Maus wurden sofort nach der Entnahme in 3 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer mit Hilfe eines elektrischen Zerkleinerungsstabes (Kinematica Polytron PT 1200) homogenisiert und zu einer einheitlichen Suspension weiterverarbeitet. Zusätzlich wurde durch nachfolgende Anwendung eines Ultraschallstabes (Branson Sonifier 250, 10 Stöße, Cycle 0,5/Amplitude 40) eine weitere Verkleinerung von Gewebeschrott, Zelltrümmern etc. erreicht. Anschließend wurde die Probe zweimal jeweils 10 Minuten bei 1000 g zentrifugiert, wobei bei der zweiten Zentrifugation der Überstand der ersten Zentrifugation eingesetzt wurde. Der zweite Überstand wurde in spezielle Röhrchen (Beckman) überführt, die für die nachfolgende Ultrazentrifugation geeignet waren. Bei exakt austarierten Gegengewichten wurden die Proben bei 100000 g (50000 rpm) und 4° C 30 Minuten ultrazentrifugiert (Beckman TL100 Ultracentrifuge), so dass die membranösen Anteile der Zellsuspension pelletiert wurden. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet je nach Gewebe in 100 bis 500 µl Sample Puffer aufgenommen. Die Resuspension erfolgte erneut unter Anwendung des Ultraschallstabes.

Homogenisierungspuffer: 125 mM NaCl
 18 mM Tris
 4,5 mM EDTA
 4 mM Pefabloc SC (Roche, Mannheim)
 1 x Complete (Roche, Mannheim)

Sample Puffer: 45 mM Tris (pH 6,8)
 1,8 % SDS
 4,5 mM EDTA
 4 mM Pefabloc SC (Roche, Mannheim)
 1 x Complete (Roche, Mannheim)

2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde das Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit der Firma Pierce angewendet. Das Prinzip dieser Methode basiert auf einer Reaktion zwischen Cu²⁺ Ionen und dem zu untersuchenden Protein, wobei in Anwesenheit

von OH^- ein Protein- Cu^{1+} Komplex entsteht. Dieser Komplex reagiert in einem nächsten Schritt mit Bicinchoninsäure (BCA) zu einem BCA- Cu^{1+} Komplex, wobei eine violette Farbe entsteht. Diese Farbe kann bei 562 nm in einem ELISA Reader gemessen werden und korreliert linear mit der Proteinkonzentration. Die genaue Quantifizierung erfolgt durch Hinzunahme einer Standardreihe von Rinderserumalbuminverdünnungen (BSA), bei der die Konzentrationen bekannt sind und mit der die zu untersuchenden Proteinlösungen verglichen werden.

Es wurde zunächst nach Angaben des Herstellers auf einer geeigneten 96-*well*-Platte die BSA-Standardreihe angesetzt. Anschließend wurden die zu untersuchenden Proteinlösungen (je 100 μl) unverdünnt und in 1:10 verdünnter Form auf dieselbe Platte aufgetragen. Nun wurde nach Angaben des Herstellers eine Mischung aus BCA Reagenzien A, B und C angefertigt, wovon jeweils 100 μl pro *well* hinzupipettiert wurden. Nach 1 Stunde Inkubation bei 50° C wurde die Absorption bei 562 nm gemessen.

2.5.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Proteine besitzen Ladungen und wandern somit in einem elektrischen Feld. Als Matrix für die Wanderung dienen Polyacrylamidgele, die aus einem großmaschigen Sammelgel und einem höhervernetzten Trenngel bestehen, wodurch eine Erhöhung der Auflösung erreicht wird. Acrylamid bildet im Beisein von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethyldiamin (TEMED) lange Ketten. N,N'-Methylenbisacrylamid verknüpft diese Ketten, so dass eine netzförmige Struktur entsteht. Durch unterschiedliche Konzentrationen an Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid entstehen Netze mit bestimmter Maschengröße, in denen Proteine unterschiedlicher Größe und Ladung voneinander getrennt werden können. In der PAGE können Proteine sowohl unter nativen (native PAGE) als auch unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE) aufgetrennt werden.

SDS-PAGE:

Bei der SDS-PAGE werden Proteine nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Durch Natriumdodecylsulfat (SDS), β -Mercaptoethanol und Erhitzung wird das Protein denaturiert. β -Mercaptoethanol ist ein reduzierendes Agens, das Disulfidbrücken spaltet. SDS ist ein negativ geladenes Detergens, das die Proteine umgibt, und die Eigenladung des Proteins maskiert. Auf diese Weise spielen eventuelle proteineigene Ladungen bei der elektrophoretischen Auftrennung keine Rolle mehr (LAEMMLI, 1970).

Sammelgel 4%ig: 1 ml Rotiphorese Gel 30 (Roth, Karlsruhe)
 30%ige Acrylamidlösung mit 0,8% Bisacrylamid (37,5:1)
 1,8 ml 4 x Sammelgelpuffer
 4,7 ml H₂O
 9 µl TEMED
 24 µl 10% APS

Elektrophorese:

Nach vollständiger Polymerisation der Gele wurden die Gelplatten so in die Elektrophoresekammer (Mini Protean 3 Cell, BIO-RAD) eingespannt, dass sich die kleineren Glasplatten innen befanden. Dann wurden die Probenkämme entfernt und die obere und untere Pufferkammer mit 1 x SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Taschen wurden daraufhin mit den denaturierten Proben und dem Molekulargewichtsmarker beladen. Anschließend wurde der Kammerdeckel aufgesetzt und die Kabel an ein Spannungsgerät (Standard Power Pack P25, Biometra) angeschlossen, so dass die obere Pufferkammer mit der Kathode und die untere mit der Anode verbunden waren. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 90 mV im Sammelgel und von 130 mV im Trenngel bis die Bromphenolblaufront das Gelende erreicht hatte.

10 x SDS-Laufpuffer: 20 g/l SDS
 30,3 g/l Tris
 144,2 g/l Glycin
 pH 8,3

2.5.4 Western Blot

Beim Western Blot werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes aus einem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran bzw. auf eine PVDF-Membran transferiert und damit immobilisiert. Hier stehen sie dann für immunologische Nachweise zur Verfügung.

Es wurde das „semi-dry“-Verfahren angewendet. Bei diesem Verfahren liegt der Stapel aus Filterpapier, Gel und Membran zwischen zwei Plattenelektroden. Whatman-Papier und die PVDF-Membran (Roche, Mannheim) wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten. Die PVDF-Membran wurde kurz in 100 % Methanol getaucht, danach in H₂O geschwenkt und anschließend für 15 Minuten in Transferpuffer equilibriert. Das Proteingel wurde mit der PVDF-Membran luftblasenfrei zwischen je 3 mit Transferpuffer getränktem Whatman-

Papieren gelegt. Diesen Stapel presst man zwischen zwei Plattenelektroden (siehe Abbildung). Der Transfer erfolgte bei 5 mA/cm^2 für 1 Stunde in einer Blotkammer (Fastblot B44, Biometra).

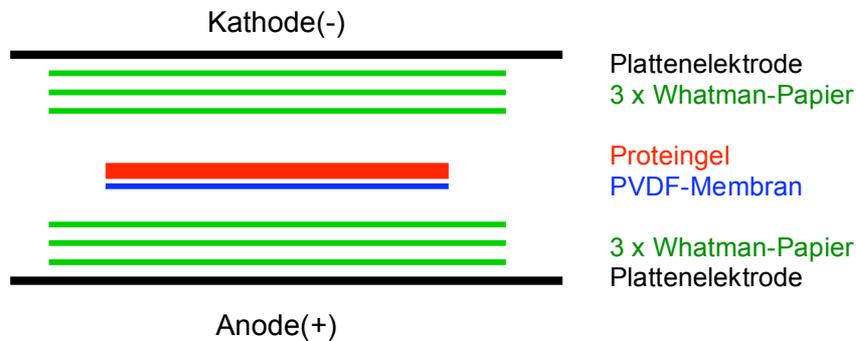


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau eines „semi-dry“-Blots

Transfer-Puffer:	25 mM	Tris
	150 mM	Glycin
	10%	Methanol
	pH 8,3	

Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran kurz mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen und auf Whatman-Papier angetrocknet. Anschließend wurde sie eine Stunde in Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Proteinbindestellen abzusättigen. Danach erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper in Blockpuffer über Nacht bei 4° C auf einem Schüttler. Am nächsten Tag wurde der primäre Antikörper dreimal für je 10 Minuten mit TBST wieder ausgewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden sekundären, peroxidasegekoppelten Antikörper in Blockpuffer für zwei Stunden. Nach drei weiteren Waschschritten wurden die Antikörper mit Hilfe des ECL-Kits (Amersham) durch Chemolumineszenz detektiert. Dies geschah durch Auflegen eines Filmes (Hyperfilm ECL, Amersham).

10 x TBS:	200 mM Tris
	1,5 M NaCl
	pH 7,5

TBST:	0,1% Tween 20
	in 1 x TBS

Blockpuffer: 4% (w/v) Magermilchpulver
in TBST

2.5.5 Herstellung eines polyklonalen anti-NCBE-Antikörpers

Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper wurde bei der Firma Davids Biotechnologie (Regensburg) in Auftrag gegeben und kommerziell erworben.

Prinzipiell erfolgt die Antikörpergewinnung durch mehrmalige Kaninchenimmunisierung, wobei den Kaninchen hierfür die ausgesuchten Peptide injiziert werden, nachdem diese zuvor durch Kopplung an einer immunogenen Trägersubstanz vorbereitet worden sind. Nach der Grundimmunisierung (erste Injektion) und nach jeder nachfolgenden Injektion wurde dem Kaninchen Serum entnommen. Nach der letzten Injektion erfolgte die Ausblutung.

2.5.6 Antikörperaufreinigung

Die so gewonnenen Seren wurden nach Erhalt aufgereinigt. Hierzu wurden zunächst die beiden Peptide getrennt an Sulfolinkgelsäulen (Pierce) gekoppelt. Anschließend wurden die Antikörper durch Affinitätsaufreinigung an diesen Säulen aus dem Antiserum isoliert.

Für die Peptidkopplung wurden je 0,8 ml Sulfolink in spezielle gravitationsgetriebene Säulen gegeben. Der Überstand wurde abgelassen und die Säulen insgesamt sechs mal mit je 1 ml 1 x Kopplungspuffer gewaschen. Gleichzeitig wurden jeweils 1 mg der Peptide in 200 µl H₂O_{bidest.} gelöst und mit 50 µl 5 x Kopplungspuffer versetzt. Anschließend wurden die Peptidlösungen auf die Säulen gegeben und die verstopften Säulen rotierten zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurde die Lösung abgelassen, die Säulen dreimal mit 1 ml 1 x Kopplungspuffer gewaschen und nach Zugabe von je 1 ml Blocklösung erneut verschlossen und rotiert. Nach 30 Minuten Blocken bei Raumtemperatur wurden die Säulen anschließend zweimal mit je 8 ml 1 M NaCl und 10 ml 1 x TBS gewaschen.

Die gewaschenen Säulen wurden mit 4 ml 1:1 in 1 x TBS verdünntem Serum über Nacht bei 4° C unter ständiger Rotation inkubiert. Der Überstand wurde danach abgelassen und die Säulen zweimal mit 10 ml 1 x PBS und einmal mit 5 ml 0,1 x PBS gewaschen. Für die Elution der Antikörper wurde in jeweils 4 Reaktionsgefäße 50 µl 1 M Tris 2 M NaCl pH 8,5 vorgelegt und diese anschließend unterhalb der Säulen platziert, um die eluierten Antikörper aufzufangen. Die Antikörper wurden in drei Schritten mit 0,1 M Glycin von pH 5 bis pH 2,5 eluiert. Nun wurden die 500 µl Aliquots des Eluats in die zuvor vorbereiteten Röhrchen abgelassen. Das Eluats sollte einen pH-Wert um 8 haben. Lag der pH-Wert nach Kontrolle

mit pH-Papier zu hoch, wurde dieser mit Tris pH 6,8 gesenkt. Zur Stabilisierung wurde zuletzt in jedes Röhrchen 100 µg BSA/ml Eluat hinzugefügt. Die aufgereinigten Antikörper wurden bei -80° C gelagert. Die Säulen wurden nach der Elution erneut zweimal mit je 5 ml 1 M NaCl gewaschen, mit je 4 ml 1 mM NaN_3 gespült und nach Zugabe von 1 ml NaN_3 verschlossen und bei 4° C gelagert.

Kopplungspuffer: 50 mM Tris/HCl
5 mM EDTA
pH 8,5

Blocklösung: 50 mM Cystein
in Kopplungspuffer

10 x TBS: 200 mM Tris
1,5 M NaCl
pH 7,5

10 x PBS: 80 g NaCl
2 g KCL
14,4 g Na_2HPO_4
2,4 g KH_2PO_4
auf 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

2.5.7 Test des Antiserums

Das aufgereinigte Antiserum wurde mittels Western Blots (2.5.4) und Immunhistologie (2.6.6) auf seine Spezifität und seine optimale einzusetzende Konzentration getestet. Zur Kontrolle dienten Präparationen von NCBE-*Knockout*-Mäusen.

2.5.8 Verwendete Antikörper

Primärantikörper:

1. Anti-NCBE: polyklonaler Antikörper gegen die NCBE-Peptidsequenz KHRKRDRERDSGLEDC aufgereinigtes Antiserum aus Kaninchen. (1:250)
2. Anti-Parvalbumin: monoklonaler Maus-Antikörper (Sigma, Taufkirchen). (1:1000)
3. Anti-GAD: monoklonaler Maus-Antikörper (Chemicon, Hofheim). (1:250)

4. Anti-MAP-2: monoklonaler Maus-Antikörper (Chemicon, Hofheim). (1:500)
5. Anti-CNPase: monoklonaler Maus-Antikörper (Sigma, Taufkirchen). (1:500)
6. Anti-GFAP: monoklonaler Maus-Antikörper (Chemicon, Hofheim). (1:500)
7. Anti-Gephyrin: monoklonaler Maus-Antikörper (SYSY, Göttingen). (1:500)
8. Anti-Synaptophysin: monoklonaler Maus-Antikörper (Chemicon, Hofheim). (1:100)

Sekundärantikörper:

1. ECL™ Esel-Anti-Kaninchen FAB-Fragmente gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase (GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, UK). (1:4000)
2. Vectastain Ziege-Anti-Kaninchen IgG gekoppelt mit Biotin (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) (1:200)
3. Ziege-Anti-Kaninchen IgG (H+L) gekoppelt mit Alexa Fluor 546 (Invitrogen, Leiden, NL). (1:2000)
4. Ziege-Anti-Maus IgG (H+L) gekoppelt mit Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Leiden, NL). (1:2000)

2.6 Histologie

2.6.1 Perfusion der Mäuse

Zur histologischen Untersuchung der transgenen Mäuse wurden die Versuchstiere nach ausreichender Anästhesie mit 12%igem Chloralhydrat (200-300 µl intraperitoneal) mit einer 4%igen Formaldehydlösung perfundiert. Hierzu wurde ein Zugang über einen thorakalen Längsschnitt geschaffen, über den eine Kanüle im linken Herzventrikel platziert wurde. Anschließend wurde im Bereich des rechten Vorhofs eine Inzision durchgeführt, die das Ausbluten des Tieres gewährleisten sollte. Durch die Kanüle wurde 0,1 M PB-Puffer in den linken Ventrikel gespült, bis das Tier ausgeblutet war (ca. 2 Minuten). Anschließend wurde über denselben intrakardialen Zugang mit Fixierungslösung solange perfundiert, bis das Tier ausreichend fixiert war. Jetzt konnten die Tiere präpariert werden. Die benötigten Organe wurden für eine Stunde bei 4° C in der Fixierungslösung nachfixiert.

Für Kryoschnitte (2.6.2, 2.6.3) wurden die präparierten Organe in 30%iger Sucrose-Lösung zur Kryoprotektion überführt und bei 4° C inkubiert bis das Gewebe so viel Sucrose aufgenommen hatte, dass die Organe ausreichend dehydriert und in der Lösung

abgesunken waren. Diese Organe konnten auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert werden.

0,1 M PB-Puffer: 77,4 ml 1 M Na_2HPO_4
 22,6 ml 1 M NaH_2PO_4
 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 1 l auffüllen
 pH 7,4

Fixierungslösung: 4 % PFA in 0,1 M PB-Puffer

2.6.2 Kryoschnitte für Objektträger

Kleinere Gewebe wie Pankreas, Cochlea und Auge, sowie instabile Gewebe wie Hoden, Magen und Darm wurden in Tissue-Tek (Sakura) eingebettet, gefroren und in der gewünschten Orientierung bei -20°C in einem Kryotom (HM-500, Microm) in einer Dicke von 10 bis 20 μm geschnitten und auf Objektträger (Marienfeld) geschmolzen. Die Schnitte wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.6.3 Kryoschnitte für die *Free-floating*-Technik

Bei der *Free-floating*-Technik liegen die Schnitte vorerst frei schwimmend vor und werden erst nach der Immunfärbung auf Objektträger überführt. Diese Technik ist nur für stabile Gewebe wie das Gehirn geeignet. Das Gehirn wurde nach der Kryoprotektion mit 30 % Sucrose in 5 % Sucrose, 0,02 % NaN_3 eingebettet und auf Trockeneis gefroren. Das gefrorene Organ wurde mit einem Schlittenmikrotom (SM2000 R, Leica) in einer Dicke von 50 μm geschnitten und vorsichtig mit einem Pinsel in eine 24-well-Zellkulturschale (Becton Dickinson Labware) mit vorgelegtem 0,1 M PB-Puffer überführt. Die Schnitte konnten mit einer Zugabe von 0,02 % NaN_3 in den PB-Puffer mehrere Tage bei 4°C gelagert werden.

0,1 M PB-Puffer: 77,4 ml 1 M Na_2HPO_4
 22,6 ml 1 M NaH_2PO_4
 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 1 l auffüllen
 pH 7,4

2.6.4 Paraffinschnitte

Für die HE-Färbung (2.6.5) wurden die perfundierten Organe (2.6.1) in Paraffin eingebettet, um histologische Schnitte von guter Qualität zu erhalten. Dazu wurden die nachfixierten Organe zweimal für 20 Minuten in PBS gewaschen und in einer Isopropanolreihe dehydriert und anschließend in Paraffin eingebettet.

Isopropanolreihe:

2 Stunden 60 % Isopropanol bei RT
 2 Stunden 75 % Isopropanol bei RT
 2 Stunden 90 % Isopropanol bei RT
 über Nacht 100 % Isopropanol bei 4° C
 12 Stunden Isopropanol-Paraffin (1:1) bei 60° C
 nach 12 Stunden Paraffin bei 60° C in Einbettform ausgießen

Die eingebetteten Organe wurden mit einem Schlittenmikrotom (SM2000 R, Leica) in einer Dicke von 10 µm geschnitten und in einem Wasserbad bei 40° C geglättet. Diese Schnitte konnten dann auf Objektträger (Marienfeld) überführt werden.

2.6.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Für die histologische Untersuchung auf morphologische Auffälligkeiten wurden Paraffinschnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (HE-Färbung). Hämatoxylin ist ein positiv geladener Farbstoff und färbt folglich negativ geladene Strukturen wie DNS und die RNS des Endoplasmatischen Retikulums (ER) blau. Eosin ist ein negativ geladener Farbstoff und gibt allen anderen Strukturen eine Gegenfärbung in unterschiedlichen Rot-Tönen.

Für die Färbung wurden die Paraffinschnitte in Glasküvetten durch die folgende Färbereihe entparaffinisiert, danach rehydriert und gefärbt und anschließend wieder mit einer Ethanolreihe dehydriert und eingedeckelt.

Färbereihe:

Zweimal 5 Minuten Xylol
 4 Minuten 100 % Ethanol
 4 Minuten 90 % Ethanol
 4 Minuten 70 % Ethanol
 4 Minuten 50 % Ethanol

2 Minuten	H ₂ O _{bidest.}
10 Minuten	Mayers Hämatoxylin (Sigma)
8 Minuten	unter Leitungswasser spülen
10 Sekunden	70 % Ethanol/ 1% HCl
5 Minuten	unter Leitungswasser spülen
5 Minuten	Eosin-Färbelösung
10 Sekunden	50 % Ethanol
30 Sekunden	70 % Ethanol
1 Minute	90 % Ethanol
Zweimal 2 Minuten	100 % Ethanol
Zweimal 3 Minuten	Xylol

Die Schnitte wurden in Entellan (Merck) eingedeckelt und bei RT getrocknet. Anschließend konnten die Schnitte lichtmikroskopisch dokumentiert und ausgewertet werden.

Eosin-Stock: 1 g Eosin G (Merck) in 100 ml H₂O_{bidest.}

Eosin-Färbelösung: 25 ml Eosin-Stock
 225 ml H₂O_{bidest.}
 150 µl konz. Essigsäure
 vor Gebrauch filtrieren

2.6.6 Gelatinisieren von Objektträgern

Schnitte, die nach der *Free-floating*-Methode behandelt wurden, mussten nach der Färbung auf gelatinisierte Objektträger überführt werden. Handelsübliche Objektträger (Marienfeld) wurden dazu 10 Minuten in H₂O_{bidest.} gebadet und dann 30 Sekunden in eine Gelatine-Lösung getaucht. Die Gelatine-Lösung wurde abgetropft und die gelatinisierten Objektträger wurden bis zur Verwendung staubfrei und trocken gelagert.

Gelatine-Lösung: 1,5 g Gelatine in 40 ml H₂O_{bidest.} bei ca. 50° C lösen
 0,1 g Chromalaun (Sigma) hinzugeben
 mit H₂O auf 200 ml auffüllen.

2.6.7 Immunhistologie

Immunfluoreszenzfärbung:

Die Schnitte wurden dreimal für je 10 Minuten mit 0,1 M PB-Puffer gewaschen. Nach dem Waschen erfolgte die Blockierung der Schnitte für eine Stunde in Blocklösung bei Raumtemperatur. Anschließend wurde mit den primären Antikörpern über Nacht bei 4° C in Blocklösung inkubiert. Die Antikörper wurden stets in den oben (2.5.8) angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Die Schnitte wurden nach der Inkubation dreimal für 10 Minuten in 0,1 M PB-Puffer/0,25 % Triton X-100 gewaschen und mit den entsprechenden, mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten, sekundären Antikörpern, sowie mit TOTO3 (1:6000) als DNS-Marker in Blocklösung für 1 bis 2 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden wieder dreimal im Dunkeln für 10 Minuten in 0,1 M PB-Puffer/0,25 % Triton X-100 und einmal 10 Minuten in 0,1 M PB-Puffer ohne Triton X-100 gewaschen. *Free-floating*-Schnitte mussten noch mit einem Pinsel auf gelatinisierte Objektträger (2.6.6) überführt werden. Abschließend wurden die Schnitte in Flouromount-G (SouthernBiotech, Birmingham) eingedeckelt und bis zur mikroskopischen Auswertung bei 4° C dunkel gelagert.

0,1 M PB-Puffer: 77,4 ml 1 M Na₂HPO₄
 22,6 ml 1 M NaH₂PO₄
 mit H₂O_{bidest} auf 1 l auffüllen
 pH 7,4

Blocklösung: 5 % NGS
 0,25 % Triton X-100
 in 0,1 M PB-Puffer

DAB-Färbung:

Zur DAB-Färbung wurde das Vectastain ABC-Kit der Firma Vecta Laboratories (Bulingame, USA) verwendet.

Nach der Fixierung wurden endogene Peroxidasen zerstört, um ein erhöhtes Hintergrundsignal zu vermeiden. Dazu wurden die Schnitte 30 Minuten mit 3 % H₂O₂ in 0,1 M PB-Puffer behandelt. Bei der Inkubation mit den primären und sekundären Antikörpern wurde wie bei der Immunfluoreszenzfärbung (s.o.) verfahren.

Als sekundärer Antikörper wurde der mit Biotin gekoppelte Antikörper aus dem Vectastain ABC-Kit (Vecta Laboratories) verwendet. Nach der Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurden die Schnitte dreimal in 0,1 M PB-Puffer/0,25 % Triton X-100 gewaschen und danach

für 30 Minuten mit einer Mischung aus Avidin (1:100) und biotinylierter Peroxidase (1:100) in Blocklösung inkubiert. Die Schnitte wurden erneut 10 Minuten mit 0,1 M PB-Puffer/0,25 % Triton X-100, 10 Minuten mit 0,1 M PB-Puffer und danach 10 Minuten in 0,01 M PB-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit der DAB/Nickel-Färbelösung inkubiert. Erschien die DAB-Färbung ausreichend zu sein, wurde die Farbreaktion mit 0,01 M PB-Puffer/0,5 % H₂O₂ abgebrochen. Die gefärbten Schnitte wurden mit einem Pinsel auf gelatinisierte Objektträger übertragen und bei RT über Nacht getrocknet. Am Folgetag konnten die Schnitte durch eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert werden und wurden darauf mit Entellan (Merck) eingedeckelt.

DAB/Nickel-Färbelösung: 0,05 % 3,3-Diaminobenzidin (DAB)
 0,03 % H₂O₂
 0,04 % Nickelammoniumsulfat
 in 0,01 M PB-Puffer

2.6.8 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Die Lichtmikroskopie wurde am Axiophot Photomikroskop (Zeiss) durchgeführt, das über eine angeschlossene Videodokumentationsanlage DX 20 HC (Kappa, Gleichen) verfügte. Die Bildverarbeitung erfolgte mit der Software KAPPA Image Base (Kappa, Gleichen).

2.6.9 Konfokale Mikroskopie

Das konfokale Lasermikroskop Leica TCS (Leica, Oberkochen) ermöglichte es, optische Sektionen im Präparat darzustellen, Streulicht aus anderen Ebenen wird dabei ausgeschlossen. Dadurch ergibt sich eine wesentlich höhere Auflösung als sie durch normale Mikroskopie zu erreichen ist.

2.6.10 Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden immunhistologische DAB-Färbungen von Wildtyp und NCBE-defizienten Mäusen angefertigt. Die Präparation und die Färbung für die Elektronenmikroskopie, sowie die Aufnahmen am Elektronenmikroskop EM 902 A (Zeiss)

wurden von Frau Dr. Manuela Schweizer von der Serviceeinrichtung für Histologie im ZMNH (Hamburg) durchgeführt.

2.7 Genetische Modifikation von Mäusen

Die Aufklärung der Funktion bestimmter Gene wurde durch die Entwicklung transgener Tiermodelle deutlich vereinfacht. Die Erzeugung solcher Modelle lässt sich entweder durch zufällige Integration von Genen oder durch zielgerichtete homologe Rekombination erreichen. Der Nachteil des erstgenannten Verfahrens ist, dass die zufällige Integration ins Genom zur Zerstörung anderer Gene führen kann, was die Analyse des Phänotyps stark erschwert. Außerdem kann eine zufällige Integration zu einer Überexpression dieses Gens führen. Der Vorteil dieser Methode ist der geringere Arbeits- und Zeitaufwand.

Die homologe Rekombination dagegen erlaubt die exakt definierte Veränderung eines Gens, dessen Funktion man untersuchen möchte. Das Zielgen lässt sich an unveränderter Stelle im Genom inaktivieren (*Knockout*), verändern oder durch ein Reporterkonstrukt ersetzen (JAENISCH 1988; CAPECCHI 1989).

Das Verfahren umfasst mehrere Schritte. Zuerst wird ein Vektor konstruiert, welcher in totipotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen) transferiert wird, die zur Erzeugung der *Knockout*-Mäuse verwendet werden.

Die Methode des „*gene targeting*“ benutzt die natürliche Fähigkeit der Zellen zur homologen Rekombination, welche zum großen Teil zur genetischen Variabilität aller Tiere und Bakterien beiträgt. Dabei kommt es zum Austausch großer homologer DNS-Sequenzen zwischen zwei komplementären DNS-Strängen.

Das *Knockout*-Konstrukt enthält die gewünschte, veränderte genomische Gensequenz, welche von zwei unveränderten homologen Bereichen flankiert wird und zwei Selektionskassetten, die eine spätere Selektion erlauben. Die erste Selektionskassette befindet sich im Vektor und codiert für das toxische Diphtherietoxin A (Dta). Die zweite Kassette ist das Neomycin-Resistenz-Gen Neomycinphospho-transferase (Neo), welche in die veränderte genomische Sequenz inkloniert wurde.

Der zuvor linearisierte Vektor lagert sich mit den flankierenden homologen Bereichen an den komplementären DNS-Strang des Genoms an und es kann zur homologen Rekombination kommen, wobei die veränderte Sequenz ins Genom der ES-Zelle integriert werden kann (erstes *Targeting*).

Die ES-Zellen, bei denen die unerwünschte Vektorsequenz mit ins Genom integriert wurde, synthetisieren Diphtherietoxin A und sterben ab. Zur positiven Selektion werden die ES-Zellen

mit dem toxischen Neomycin (bzw. G-418) behandelt und nur die ES-Zellen mit der gewünschten Rekombination enthalten das Neomycinphospho-transferase-Gen im Genom und sind resistent (positive Selektion).

Um eine Deletion im Zielgen für eine *Knockout*-Maus zu erzeugen und um die Neo-Kassette wieder aus dem Genom der ES-Zellen zu entfernen, wurde das Cre/loxP-Rekombinationssystem verwendet.

Das Cre/loxP-System beinhaltet zwei Komponenten. Zum einen die Cre-Rekombinase, ein sehr gut charakterisiertes 38 kDa Rekombinase-Protein aus den Bakteriophagen P1 und zum anderen die spezifischen 34 bp langen Erkennungssequenzen, die *loxP sites*. Bei gleicher Orientierung der *loxP sites* wird die dazwischen liegende DNS von der Cre-Rekombinase deletiert, bei entgegengesetzter Orientierung der *loxP sites* wird die DNS invertiert (HOESS und ABREMSKI und, 1984; HOESS *et al.*, 1982; KILBY *et al.*, 1993).

Um die Entfernung eines Exons und der Neo-Kassette aus dem Zielgen zu ermöglichen, werden diese Bereiche „gefloxt“, d.h. sie werden von zwei in gleicher Orientierung liegenden *loxP sites* flankiert. Diese „geflochten“ Sequenzen können durch die Cre-Rekombinase deletiert werden, wobei eine *loxP site* in der DNS verbleibt (Gu, 1993; Zou *et al.*, 1994).

Im zweiten *Targeting* werden die korrekt rekombinierten ES-Zellen aus dem ersten *Targeting* transient mit der Cre-Rekombinase transfiziert. Die „geflochte“ Selektionskassette und die, durch eine dritte *loxP site*, „geflochte“ genomische Sequenz können deletiert werden.

Es bleiben Stammzellen übrig, die zuerst das Transgen integriert und im zweiten Schritt den gewünschten Sequenzabschnitt und die Selektionskassette deletiert haben. Diese konstitutiven *Knockout*-Stammzellen werden in Blastozysten injiziert. Diese werden in pseudoschwangere Leihmütter transplantiert und die Chimären werden von diesen ausgetragen.

Bei drei verwendeten *loxP sites* kann es im zweiten *Targeting* aber ebenfalls zu einem Rekombinationsereignis kommen, bei der nur die „geflochte“ Selektionskassette deletiert wird. Man erhält konditionale *Knockout*-Stammzellen, bei denen die genomische Sequenz noch vollständig vorliegt, aber das Zielgen noch „gefloxt“ ist. Das Expressionsniveau des durch *loxP sites* „geflochten“ Gens sollte gegenüber dem Wildtyp unverändert sein und aufgrund dessen nicht zu phänotypischen Veränderungen führen. Kreuzung dieser konditionalen *Knockout*-Mäuse mit transgenen Mäusen, die ein Cre-Rekombinase-Gen unter der Kontrolle eines zelltypspezifischen Promoters haben, führt zur zelltypspezifischen Deletion der „geflochten“ Zielsequenz (KÜHN *et al.*, 1995; LAKSO *et al.*, 1992).

2.7.1 Generierung der NCBE-defizienten Mäuse

Anhand eines *Knockout*-Mausmodells sollte gezeigt werden, welche Konsequenzen der Verlust von NCBE für den Organismus hat, um Hinweise über die physiologische Funktion des Proteins zu erhalten. Daher wurde in Vorarbeit von Dr. Christian Hübner ein *Targeting*-Vektor (2.7.2) konstruiert, um sowohl einen konstitutiven als auch einen konditionalen *Knockout* zu generieren. Zur Deletion wurde hierzu das Exon 12 ausgewählt, welches für die erste Transmembranregion kodiert. Zusätzlich führt der Verlust dieses Exons zu einer Verschiebung des Leserahmens, so dass ein Codon schon nach 462 Aminosäuren für ein Stop (siehe Anhang) kodiert und damit die Translation beendet. Um neben dem konstitutiven *Knockout* ebenfalls einen konditionalen *Knockout* zu erhalten, wurde zwischen Exon 12 und Exon 13 eine dritte loxP *site* eingebaut. Falls durch die Cre-Rekombinase nur die Selektionskassette deletiert wird, ist durch die dritte loxP *site* das Exon 12 noch weiterhin von loxP *sites* flankiert.

Mit dem konstruierten *Targeting*-Vektor wurde von Herrn Dr. Christian Hübner das Genom von ES-R1-Zellen *in vitro* manipuliert (2.7.3 und 2.7.4). Die ES-Zellen wurden anschließend in der Serviceeinrichtung für transgene Tiere des ZMNH (Hamburg) von Frau Dr. Irm Hermans-Borgmeyer in Blastozysten transplantiert. Die Blastozysten wurden anschließend in den Uterus von pseudoschwangeren Ammenmäusen transferiert, die die Chimären austrugen. Durch den chimären Nachwuchs, welcher teilweise mutierte Stammzellen in der Keimbahn hatte, erfolgte die Züchtung homozygoter *Knockout*-Mäuse (2.9.3).

2.7.2 Konstruktion des Targeting-Vektors

Ein *Targeting*-Vektor besteht aus zwei zum genomischen Ziel-Lokus homologen Bereichen (Armen), unterbrochen von der einzuführenden Mutation und zusätzlichen Selektionsmarkern. Die Effizienz der homologen Rekombination ist von der Lage und der Länge der homologen Arme des *Targeting*-Vektors abhängig. So erhöht sich die Effizienz um das 200fache mit einer Verlängerung der homologen Arme von 1,3 auf 6,8 kb (HASTY *et al.*, 1991).

Zur Konstruktion des *Targeting*-Vektors stand ein isolierter Lambda-Klon aus einer Maus-DNS-Bibliothek mit einem genomischen DNS-Fragment von Exon 11 bis Exon 14 des *Slc4a10*-Gens zur Verfügung. Aus dem Klon wurde durch einen Restriktionsverdau mit *BamH* I ein Fragment mit den Exons 11 bis 14 ausgeschnitten, und über eine *BamH* I-Restriktionsschnittstelle in den pKO Scrambler V901-Vektor von der Firma Lexicon Genetics Inc. (The Woodlands, USA) kloniert. Zur negativen Selektion war in den Vektor das

Diphtherietoxin A (Dta)-Gen eingebaut. So wurden die ES-Zellen eliminiert, in denen eine nicht homologe Rekombination und damit eine zufällige Integration des Dta-Gens ins Genom stattfand, da die Expression des Diphtherietoxins A zum Zelltod führt. Zur positiven Selektion wurde eine Neomycin-Resistenz (Neo)-Kassette in das Intron 11 des *Slc4a10*-Genfragments über eine *Mun*I-Schnittstelle inkloniert. Dadurch wurde die spätere Selektion der ES-Zellen auf die seltenen positiven Rekombinationsereignisse durch eine Neomycinbehandlung ermöglicht. Zur späteren Deletion mit der Cre-Rekombinase war die Neo-Selektionskassette schon von zwei gleich orientierten *loxP sites* flankiert. Als letzter Klonierungsschritt wurde über eine *Swa*I-Restriktionsschnittstelle die dritte *loxP site* in das Intron 12 des *Slc4a10*-Gens eingefügt, wobei zu beachten war, dass alle drei *loxP sites* die gleiche Orientierung aufweisen, damit die Cre-Rekombinase die dazwischen liegende DNS deletiert und nicht invertiert. Das Fragment mit der dritten *loxP site* wurde mittels PCR aus dem pBS246-Vektor (Life Technologies) amplifiziert und enthält eine *Spe*I-Restriktionsschnittstelle, welche für die spätere Genotypisierung verwendet wurde.

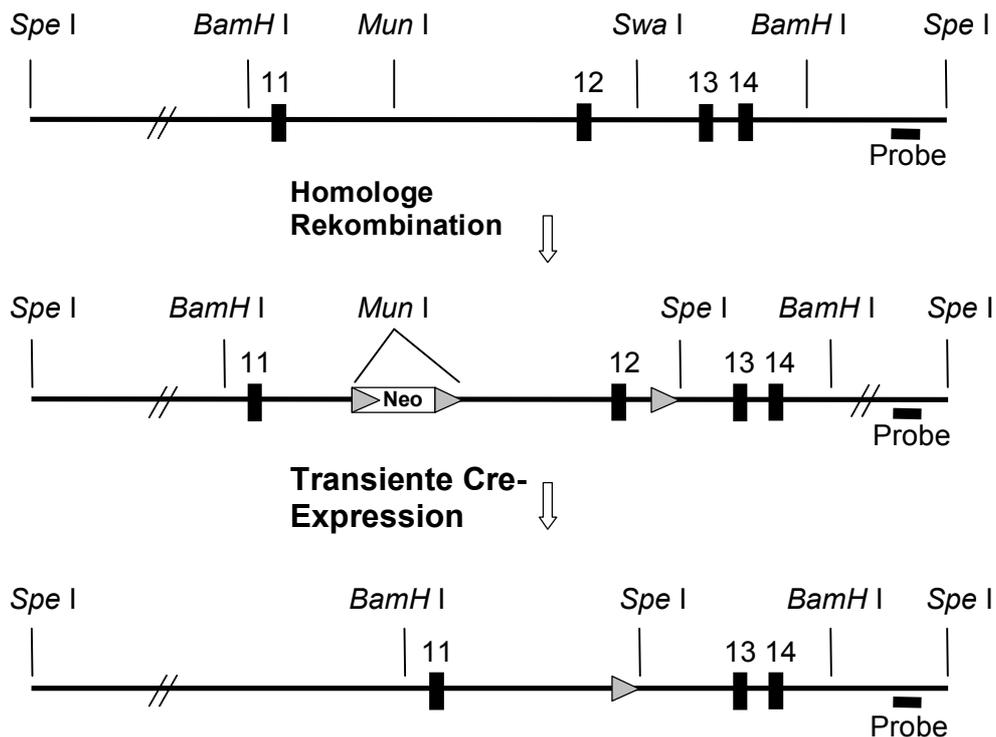


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der positiven Rekombinationsereignisse im *Slc4a10*-Gen nach dem ersten und zweiten *Targeting*.

2.7.3 Erstes Targeting und Nachweis der homologen Rekombination

Pluripotente ES-R1-Zellen, die aus einer 129Sv-cp x 129J-Mausunterstammkreuzung hervorgegangen waren (NAGY *et al.*, 1993), wurden durch Elektroporation mit dem linearisierten *Targeting*-Vektor transfiziert (2.8.8). Nach Behandlung der Zellen mit G418-Selektivmedium konnten die ES-Zellklone (2.8.9), die die Antibiotikaeinwirkung überlebt hatten, isoliert und expandiert werden (2.8.10). Anschließend wurde deren genomische DNS auf homologe Rekombination hin mit Hilfe des Southern Blot-Verfahrens (2.3.9) getestet. Zum Screening der G418 resistenten ES-Zellen und der späteren Mäuse wurde eine DNS-Sonde hergestellt, die außerhalb der Sequenz des Targeting-Vektors lag. Auf diese Weise konnte ein homolog integrierter Vektor von einem zufällig integrierten Vektor unterschieden werden. Die Sonde wurde mittels PCR mit dem Vorwärtsprimer GATCTTATACCTCAAAA-TGCATAC und dem Rückwärtsprimer GTAATGGACCTGACTATGGC aus genomischer Maus-DNS amplifiziert und in pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor kloniert (2.3.15). Durch einen Restriktionsverdau des Vektors mit *EcoR* I wurde die 411 bp lange Sonde aus dem Vektor geschnitten und konnte durch Elektrophorese im Agarosegel vom Vektor getrennt und aus dem Gel extrahiert (2.3.6) werden.

Die Sonde hybridisiert nach einem *Spe* I-Restriktionsverdau der genomischen Maus-DNS beim Wildtyp an ein 17,5 kb großes Fragment. Im mutierten Allel ist jedoch eine zusätzliche *Spe* I-Schnittstelle eingebracht, wodurch die Sonde im *Knockout* nach einem *Spe* I-Restriktionsverdau der genomischen DNS an ein kleineres Fragment mit 4,8 kb hybridisiert. Da die homologe Rekombination nur ein Allel betrifft und somit jeder rekombinierte Klon auch ein Wildtyp-Allel trägt, wurden bei dem *Screening* Doppelbanden von 17,5 kb und 4,8 kb erwartet.

2.7.4 Zweites Targeting

Bei dem zweiten *Targeting* wurden die positiven Klone aus dem ersten Screening mit Cre exprimierenden Plasmiden transient transfiziert (2.8.12). Durch die Rekombination mit Cre kann es theoretisch zu drei möglichen Ereignissen kommen. Im ersten Fall kann durch die Rekombination nur die Neo-Selektionskassette deletiert sein. In diesem Fall hat man einen konditionalen *Knockout*-Klon, bei dem das Exon 12 noch durch loxP *sites* flankiert ist. Im zweiten Fall ist der gesamte Bereich von der ersten bis zur dritten loxP *site* mit der Selektionskassette und dem Exon 12 deletiert worden, so dass ein konstitutiver *Knockout*-Klon vorliegt. Im dritten und unerwünschten Fall kann es zu einer Deletion des Exons 12 gekommen sein, die Selektionskassette ist aber nicht aus dem Genom deletiert worden.

Um den dritten Fall und die Klone ohne Rekombination durch Cre von den anderen zu selektieren, wurden alle Klone auf zwei 96-*well*-Platten aufgeteilt, so dass sich die ES-Zellen aus einem geteilten Klon auf beiden Platten an identischer Position befanden.

Anschließend wurde eine dieser Platten erneut mit G418-Selektionsmedium behandelt (2.8.9). ES-Zellklone, bei denen durch die Cre-Rekombination die geflochte Neo-Selektionskassette entfernt worden war, überlebten diese Behandlung nicht. Auf der unbehandelten 96-*well*-Platte befanden sich also entsprechend der Position der abgestorbenen Klone die positiven konstitutiven und konditionalen *Knockout*-Klone. Diese wurden erneut mittels Southern Blot genotypisiert, expandiert und zur Blastozysteninjektion der Seviceeinrichtung für transgene Tiere des ZMNH (Hamburg) übergeben.

Dort wurden diese modifizierten ES-R1-Zelle in 3,5 Tage alte Blastozysten von Mäusen der Linie C57BL/6 injiziert und in C57BL/6-Ammen transferiert.

2.7.5 Zucht der konstitutiven und der konditionalen NCBE-*Knockout*-Mäuse

Die pluripotenten ES-R1-Zellen stammen aus einer männlichen Blastozyste aus einer 129Sv-cp x 129J-Mausunterstammkreuzung (NAGY *et al.*, 1993). Aus diesem Grund konnten also nur die männlichen Chimären die Mutation in der Keimbahn haben.

Außerdem unterscheiden sich die ES-R1-Zellen im Allel für die Fellfarbe von den schwarzen C57BL/6-Mäusen. So ließ sich der Grad des Chimärismus anhand des Anteils der Agoutifärbung (gelbbraun) im Fell abschätzen. Ein hoher Agouti-Anteil in der Fellfarbe ist ein Indiz für einen hohen Anteil von ES-R1-Zellen im Tier, so dass auch die Wahrscheinlichkeit für mutierte Keimzellen höher ist. Die hochchimären männlichen Tiere wurden mit C57BL/6-Weibchen verpaart. Das Agouti-Allel der mutierten ES-R1-Zellen ist dominant gegenüber der schwarzen Fellfarbe, folglich ließen sich aus diesen Verpaarungen leicht alle Nachkommen mit dem heterozygoten ES-R1-Allel an der Fellfarbe erkennen.

Bei den Agouti-gefärbten Nachkommen wurde an der Schwanzspitze eine Biopsie entnommen und zur Genotypisierung die genomische DNS isoliert (2.3.2). Die Genotypisierung wurde mittels Southern Blot (2.3.9) und PCR (2.3.7.1) durchgeführt. Nachkommen, die heterozygot für die Mutation in *Slc4a10* waren, wurden zur Zucht von homozygoten NCBE-*Knockout*-Mäusen miteinander verpaart. Dabei wurden immer die heterozygoten Mäuse aus einem ES-Zellklon miteinander verpaart, so dass zwei getrennte konstitutive NCBE-*Knockout*-Mauslinien (NCBE-A6-KO und NCBE-C5-KO) und eine konditionale NCBE-*Knockout*-Mauslinie (NCBE-D51-flox) generiert wurden.

2.8 Stammzellkultur und ES-Zell Targeting

2.8.1 Isolation primärer Fibroblasten (Feederzellen)

Bei der ES-Zellkultur muss darauf geachtet werden, dass die Totipotenz der ES-Zellen nicht verloren geht. Aus diesem Grund wurden die Stammzellen auf Feederzellen kultiviert, die durch Abgabe unbekannter Faktoren eine Differenzierung der ES-Zellen unterdrücken. Feederzellen sind embryonale Fibroblasten, die aus 14,5 Tage alten Mausembryonen gewonnen werden. Hierzu wurden 14,5 Tage nach der Verpaarung die trächtigen Weibchen getötet, kurz in 70 % Ethanol getaucht, ihre Uteri herauspräpariert und in eine Schale mit eiskaltem PBS überführt. Die Embryonen wurden freigelegt und bis auf ihren Rumpf reduziert. Die folgenden Tätigkeiten wurden in einer sterilen Werkbank durchgeführt. Der verbliebene Rumpf wurde in 5 ml PBS zunächst mit einer Schere mechanisch zerkleinert und dann beim Durchdrücken des Gewebebreis durch Verwendung immer feinerer Kanülen homogenisiert. Nach Zugabe von 5 ml Trypsin-EDTA und ca. 50 mg DNase I wurde der Gewebebrei in einem Reagenzröhrchen 10 Minuten im 37° C Wasserbad geschwenkt. Danach ließ man die Suspension 1 Minute absetzen und überführte 5 ml des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß mit 20 ml Feederzellmedium. Dieser Vorgang wurde mit dem verbliebenen Zellen 3 bis 5 mal wiederholt. Die vereinigten Feederzellsuspensionen wurden abzentrifugiert und in einem Feederzellmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Anzahl der lebenden Zellen in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden mit einer ungefähren Dichte von 5×10^4 Zellen/cm² auf Kulturschalen ausgesät. Nach 2 bis 3 Tagen Inkubation bei 37 C und 5 % CO₂-Gehalt, wenn die Zellen ca. 90 % konfluent waren, wurden sie im Verhältnis von 1:5 aufgeteilt. Nach weiteren 3 Tagen wurden die Zellen eingefroren.

10 x PBS: 80 g NaCl
 2 g KCl
 14,4 g Na₂HPO₄
 2,4 g KH₂PO₄
 auf 1 l H₂O_{bidest.}

Feederzellmedium: 500 ml DMEM/mit Glutamax (Gibco)
 50 ml FCS (Gibco)
 5,5 ml 100 x MEM ohne essentielle Aminosäuren (Gibco)
 5,5 ml Pen/Strep (5000 IU Pen, 5000 µg Strep/ ml, Gibco)

2.8.2 Mitotische Inaktivierung von embryonalen Fibroblasten

Um ein Überwuchern der E-Zellen mit Feederzellen zu vermeiden, wurden die konfluenten embryonalen Fibroblasten durch 2,5 bis 3 Stunden Inkubation mit 10 µg Mitomycin C/ml Feederzellmedium (2.8.1) mitotisch inaktiviert. Danach wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen, aufgeteilt und auf gelatinierten Kulturschalen in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/cm² ausgesät.

2.8.3 Herkunft der Stammzellen

Die Stammzellen stammten aus der Albino-Mauslinie 129/SvJ, welche eingefroren in der Serviceeinrichtung für transgene Tiere im ZMNH (Hamburg) zur Verfügung stehen.

2.8.4 Kultur der ES-Zellen

Die Zellen wurden in einem ES-Kulturmedium bei 37° C und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Alle 24 Stunden wurde das Medium gewechselt. Jeweils nach 48 Stunden wurden die Zellen subkultiviert.

100 x Nucleosidmix:	80 mg Adenosin (Sigma)
	85 mg Guanosin (Sigma)
	73 mg Cytidin (Sigma)
	73 mg Uridin (Sigma)
	24 mg Thymidin (Sigma)
	in 100 ml PBS lösen und sterilfiltrieren
ES-Kulturmedium:	500 ml DMEM (Gibco)
	92 ml FCS (ES-qualified, Gibco)
	6,2 ml L-Glutamin (200mM, Gibco)
	1,24 ml β-Mercaptoethanol (100 µM, Gibco)
	62 µl LIF (10 ⁷ U/ml, Esgro)
	6,2 ml Pen/Strep (5000 IU Pen, 5000 µg Strep/ml, Gibco)
	6,2 ml 100 x Nucleosidgemisch
	6,2 ml 100 x MEM ohne essentielle Aminosäuren (Gibco)

Selektionsmedium: 4 bis 6 $\mu\text{l/ml}$ G418 (50 mg/ml, Gibco) in ES-Kulturmedium

2.8.5 Subkultivierung der ES-Zellen

Die Zellen wurden nach dem Waschen mit PBS/EDTA in den Kulturschalen mit Trypsin/EDTA überschichtet und bei 37° C und 5 % CO₂-Gehalt ca. 3 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mittels einer Pasteurpipette mehrfach auf- und abpipettiert, bis alle Zellen nahezu vereinzelt vorlagen. Die Trypsinbehandlung wurde durch Zugabe von ES-Kulturmedium (2.8.4) gestoppt und die Zellen wurden 5 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einem entsprechenden Volumen ES-Kulturmedium resuspendiert und im Verhältnis 1 zu 3 bis 1 zu 5 auf Zellkulturschalen, die mit einem 1 bis 2 Tage kultivierten Feederzellrasen versehen waren, verteilt.

10 x PBS: 80 g NaCl
 2 g KCL
 14,4 g Na₂HPO₄
 2,4 g KH₂PO₄
 auf 1 l H₂O_{bidest.}

PBS/EDTA: 0,02 % EDTA in 1 x PBS

Trypsin/EDTA: 0,25 % Trypsin, 0,02 % EDTA in 1 x PBS

2.8.6 Einfrieren der ES-Zellen

Die Zellen wurden zunächst, wie unter 2.8.5 beschrieben, mit Trypsin behandelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ES-Kulturmedium (2.8.4) gestoppt. Die 96-well-Kulturschalen wurden anschließend mit einem Deckel verschlossen und in einer Styroporschachtel bei –80° C eingefroren.

Zellen, die auf größeren Kulturschalen kultiviert wurden, wurden nach der Trypsinbehandlung bei 1000 Upm abzentrifugiert, auf Eis in 1 x Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden in einer Styroporschachtel auf –70° C heruntergekühlt und dann am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff (–190° C) eingefroren.

2 x Einfriermedium:	50 % FCS (ES-qualified)
	20 % DMSO (Sigma)
	30 % ES-Kulturmedium (siehe 2.8.4)

2.8.7 Auftauen der ES-Zellen

Nach der Ermittlung positiver Klone wurden die 96-Well-Kulturschalen aufgetaut, indem man sie kurz im 37° C-Wasserbad schwimmen ließ. Mit einer Pasteurpipette wurden die Zellen des jeweiligen Klons aufgenommen. Die Zellen wurden im zehnfachen Volumen vorgewärmten ES-Kulturmediums (2.8.4) auf einem konfluenten Feederzellrasen in 24-well-Kulturschalen ausgesät und kultiviert.

Die in Kryoröhrchen eingefrorenen Zellsuspensionen wurden kurz im 37° C-Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in 10 ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt und bei 1000 rpm fünf Minuten abzentrifugiert. Die Zellen wurden mit Kulturmedium vermischt und auf mit Feederzellen bewachsene Zellkulturplatten überführt und kultiviert.

2.8.8 Elektroporation der ES-Zellen

Die Zellen einer 9 cm-Ø-Kulturschale wurden mit Trypsin behandelt (2.8.5). Die vereinzelt Zellen wurden in 20 ml 1 x PBS aufgenommen. Mit Hilfe der Neubauer Zählkammer wurde die Zelldichte bestimmt. Es wurden ca. 1×10^7 Zellen abzentrifugiert und in 500 µl 1 x PBS resuspendiert. Dazu gab man 50 bis 100 µg des linearisierten Targeting-Vektors und überführte das Gemisch in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit einer Spaltbreite von 0,4 cm. Das Gemisch wurde 5 Minuten stehen gelassen, bevor im BioRad Gene Pulser unter folgenden Bedingungen elektroporiert wurde: 3 µF/800 V Vorpuls, 500 µF/240 V Hauptpuls. Die elektroporierten Zellen wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend auf vier mit Feederzellen beschichtete Zellkulturplatten in unterschiedlicher Dichte ausgesät und kultiviert.

2.8.9 Selektion rekombinierter ES-Zellen

48 Stunden nach erfolgter Elektroporation wurde dem ES-Kulturmedium (2.8.4) Geniticin (G418), ein Analogon von Neomycin, in einer Endkonzentration von 200 bis 250 µg/ml zugesetzt. Das Medium wurde jeweils nach 24 Stunden gewechselt. Nach 2 bis 3 Tagen begannen die Zellklone, die das Neomycin-Resistenzgen nicht in ihr Genom integriert hatten,

abzusterben. Nach ca. einer Woche erreichten die selektierten Klone die nötige Größe, um sie vereinzelt zu subkultivieren.

2.8.10 Isolierung resistenter Klone

Klone, die die Selektion überlebt hatten, wurden in den Kulturschalen zweimal mit 1 x PBS gewaschen und mit 1 x PBS bedeckt. Unter dem Mikroskop wurde mit Hilfe einer Einweg-Pipettenspitze jeweils ein einzelner Klon von der Selektionsplatte gelöst. Nach einer Trypsinbehandlung wurde die Einzelzellsuspension in eine Vertiefung einer 96-well-Kulturplatte, die mit Feederzellen beschichtet war, überführt, um so die jeweiligen Klone getrennt zu kultivieren.

2.8.11 Expansion isolierter Klone

Zwei bis drei Tage nach der Isolation wurden die Zellen in der 96-well-Kulturschale zweimal mit PBS/EDTA gewaschen. Die Zellen wurden in 30 µl Trypsin/EDTA ca. drei Minuten bei 37° C inkubiert und durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Einzelzellsuspension wurde mit 170 µl Kulturmedium durchmischt und auf drei bis fünf 96-well-Kulturschalen verteilt und kultiviert. Für Zellen, die zur späteren Blastozysteninjektion eingefroren werden sollten, wurden mit Feederzellen versehene Kulturschalen verwendet. Zellen, die der Gewinnung genomischer DNS dienen sollten, wurden auf gelatinisierten Kulturschalen ausgesät.

PBS/EDTA: 0,02 % EDTA in 1 x PBS

Trypsin/EDTA: 0,25 % Trypsin, 0,02 % EDTA in 1 x PBS

2.8.12 Transiente Transfektion der ES-Zellen mit Cre-Plasmiden

Für die Blastozysteninjektion aufgetaute ES-Zellen wurden mit je 10 µg von nicht linearisierten Plasmiden, welche für die Cre-Rekombinase codieren, elektroporiert (siehe 2.8.8). Um die hervorgerufene Deletion durch die Cre-Rekombinase zu analysieren wurde 1:5 der Klone subkultiviert (2.8.5).

2.8.13 DNS-Präparation aus ES-Zellen

Die Subkulturplatten wurden kultiviert bis ein dichter Zellrasen vorhanden war, damit ausreichend Zellen für die DNS-Präparation zur Verfügung standen. Die Platte wurde einmal mit 1 x PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl Lysispuffer über Nacht in einer feuchten Kammer bei 55° C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 10 µl 8 M LiCl und 100 µl Isopropanol hinzugefügt und die Zellen wurden erneut über Nacht in der feuchten Kammer auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert, wobei eine noch längere Inkubationszeit die Ausbeute an DNS erhöhen würde.

Die DNS wurde 30 Minuten durch Zentrifugation bei 3800 rpm gefällt und der Überstand abgegossen. Nach einem Waschschrift mit 70 % Ethanol und wiederholter Zentrifugation wurden die DNS-Pellets bei 55° C getrocknet. Die Pellets wurden anschließend über Nacht bei 37° C in einer feuchten Kammer mit 100 µl *low* TE gelöst. Die Analyse erfolgte über PCR (2.3.7.1) und Southern Blot (2.3.9).

Low TE-Puffer: 1 ml Tris-HCl (1M, pH 8)
 20 µl EDTA (0,1 M, pH 8)
 mit H₂O_{bidest.} auf 100 ml auffüllen

2.8.14 Vorbereitung der Klone zur Injektion in Blastozysten

Die zur Injektion bestimmten Klone wurden aufgetaut und in einer 6-*well*-Platte kultiviert. Zwei Stunden vor der Entnahme der Zellen wurde das Medium gewechselt und dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl für zwei bis drei Minuten bei 37° C trypsiniert (2.8.11), hierbei sollten die Zellen kaum resuspendiert werden, so dass die Zellen noch Gruppen von zwei bis zehn Zellen bildeten. Einzelzellbildung sollte hierbei möglichst vermieden werden. Die resuspendierten Zellhaufen wurden in drei bis fünf ml Medium aufgenommen und 5 Minuten bei 1000 Upm zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 600 µl ES-Kulturmedium (2.8.4) aufgenommen und auf Eis gestellt. Die anschließende Injektion der Klone in Blastozysten und die Transplantation der Blastozysten in den Uterus von pseudoschwangeren Mäusen wurden in der Serviceeinrichtung für transgene Tiere im ZMNH (Hamburg) von Frau Dr. Irm Hermans-Borgmeyer durchgeführt.

2.9 Verhaltensversuche

Die Verhaltensversuche wurden am Institut für Medizinische Psychologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Die Versuchstiere wurden drei Tage vor Beginn der Verhaltensversuche aus dem Tierstall in das neue Umfeld gebracht, um sich an die neue Umgebung gewöhnen zu können. In Blindversuchen mit unbekanntem Genotypen wurden nur männliche Tiere im Alter von ca. zwölf Wochen getestet. Nach jedem Durchgang wurden die Versuchsaapparaturen mit 70 % Ethanol gereinigt.

2.9.1 Open Field-Test

Einerseits ist der *Open Field*-Test geeignet die lokomotorische Aktivität und das Explorationsverhalten von Nagetieren zu testen. Andererseits steht das Versuchstier auch im Konflikt zwischen dem Drang zur Exploration der unbekanntem Umgebung und der Aversion gegen die beleuchtete Fläche der Zentralzone. Falls Versuchstiere bei gleicher lokomotorischer Aktivität die Zentralzone meiden, kann dieses auf gesteigertes Angstverhalten der Versuchstiere hindeuten.

Die Exploration der Tiere wurde an drei aufeinander folgenden Tagen für jeweils 25 Minuten gemessen. Mit der Apparatur konnten jeweils vier Tiere parallel getestet werden. Jedes Tier befand sich in einer 50 x 50 x 50 cm erleuchteten weißen Box, die nach oben hin offen war. Über den Boxen hing eine Kamera, die mit einem Computer verbunden war. Die Boxen waren in eine Zentralzone und eine Randzone durch eine entsprechende Markierung unterteilt. Die gesamte Wegstrecke, die jede Maus in einem Zeitraum von 25 Minuten zurückgelegt hatte, wurde automatisch aufgezeichnet. Da die Bewegung der Maus mit Hilfe der Software Videomot 2 (TSE-Systems, Bad Homburg) durch Kontrastmessung verfolgt wurde, konnten nur Mäuse mit dunkler Fellfarbe für den Versuch verwendet werden. Die Software zeichnete von jedem Tier die gesamte Lokomotion, sowie die Anzahl der Besuche und die Länge des Aufenthalts in der Zentralzone auf. Die Daten standen zur späteren Auswertung digital zur Verfügung.

2.9.2 Novel Object Exploration

Bei dem *Novel Object*-Test wird in die vertraute Umgebung des Versuchstieres ein unbekannter Gegenstand platziert. Dadurch wird eine Konfliktsituation zwischen

Explorationsdrang und Aversion gegen Gegenstand geschaffen. Eine erhöhte Aversion gegen den Gegenstand deutet auf eine erhöhte Ängstlichkeit der Versuchstiere hin.

Nach Ende des dritten Versuchstages des *Open Field*-Tests (2.9.1) wurde in die Mitte der Zentralzone der Box eine 50 ml Schraubröhre gestellt. Das Explorationsverhalten der Versuchstiere wurde anschließend ebenfalls mit dem Videomot 2-System (TSE-Systems, Bad Homburg) für 25 Minuten dokumentiert. Bei der Auswertung wurde die gesamte Lokomotion, die Latenz bis zum ersten Besuch, die Häufigkeit der Besuche beim Gegenstand und die Aufenthaltsdauer beim Gegenstand berücksichtigt.

2.9.3 „Actimot“-Versuch

Hierbei handelt es sich um ein spezielles Aktivitätsmeßsystem der Firma TSE-Systems (Bad Homburg), das eine durchgehende Langzeitbeobachtung von Mäusen über mehrere Tagen innerhalb ihres normalen Käfigs ermöglicht. Dazu wurden die üblichen Haltungskäfige mit einem Bewegungsmelder versehen, der jede Sekunde Bewegungen im Käfig aufzeichnete. Die Aufzeichnungen des Bewegungsmelders konnten mit der dazugehörigen Software ausgewertet werden.

2.9.4 Elevated Plus Maze

Das *Elevated Plus Maze* ist ein plusförmiges Labyrinth mit zwei offenen und zwei an den Seiten geschlossenen Armen. Die Arme sind 30 cm lang und 5 cm breit. Die gesamte Apparatur ruht auf einem Ständer in 40 cm Höhe über dem Boden. Der Test nutzt das Explorationsbedürfnis und die angeborenen Angst vor Höhe und offene Flächen und schafft so für die Tiere eine Konfliktsituation. Eine verringerte Exploration der „offenen Arme“ der Apparatur dient folglich als Indikator für eine erhöhte Ängstlichkeit der Tiere.

Das Versuchstier wurde einmal für fünf Minuten in die Mitte des Labyrinths gesetzt und die Bewegung mit dem Videomot 2-System der Firma TSE-Systems (Bad Homburg) dokumentiert. Bei der Auswertung wurde die zurückgelegte Strecke, sowie die Anzahl und die Länge der Besuche auf den einzelnen Armen berücksichtigt.

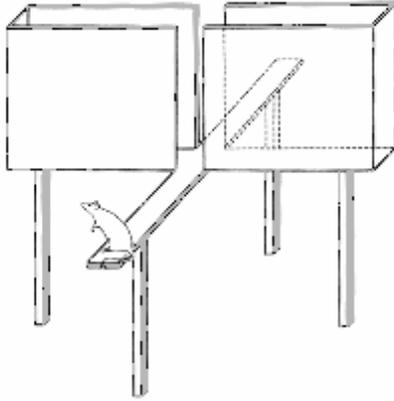


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des *Elevated Plus Maze*

2.9.5 Dark-Light-Transitionstest

Im *Dark-Light*-Transitionstest befindet sich das Tier wie beim *Elevated Plus Maze* (2.9.4) im Konflikt zwischen dem Explorationsdrang und der Aversion gegen exponierte Flächen. Das Versuchstier kann uneingeschränkt zwischen einem hellen weiträumigen Vorhof und einer kleineren dunklen Versteckmöglichkeit wechseln. Erhöhte Ängstlichkeit zeigt sich durch eine geringere Exploration des hellen Bereiches (CRAWLEY und GOODWIN, 1980).

Die *Dark-Light* Box bestand aus zwei unterschiedlich großen Kompartimenten in schwarzem und weißem Kunststoff. Das größere weiße Kompartiment mit einer Größe von 30 x 20 x 25 cm war offen und wurde hell ausgeleuchtet. Das kleinere schwarze Kompartiment mit einer Größe von 15 x 20 x 25 cm war überdacht und somit verdunkelt. Beide Kompartimente waren durch einen Tunnel verbunden. Ein Versuchsdurchlauf dauerte 10 Minuten. Zu Beginn des Versuchs wurde die Maus mit Kopfrichtung zum dunklen Kompartiment in den Tunnel gesetzt. Die Dokumentation erfolgte mit dem Videomot 2- System der Firma TSE-Systems (Bad Homburg). Parameter für die Auswertung war die Aufenthaltsdauer des Versuchstieres im hellen Vorhof der Apparatur.

2.9.6 Hot Plate-Test

Der *Hot Plate*-Test ist eines der am häufigsten genutzten Modelle für das Schmerzempfinden bei Nagern. Die Versuchstiere zeigen komplexe, aber nicht erlernte Verhaltensweisen, welches supraspinale sensorische Prozesse voraussetzt (WOOLFE und MAC DONALD, 1944). Das erste Reaktionsverhalten ist das reflexartige Wegziehen der Pfoten, worauf komplexe Verhaltensweisen wie das Lecken der Pfoten folgen.

Je fünf Mäuse pro Genotyp wurden auf eine 55° C heiße Platte gesetzt und es wurde die Reaktionszeit bis zur ersten Schmerzreaktion gemessen. Die Versuchstiere wurden dann sofort von der Heizplatte genommen, um Verbrennungen zu vermeiden.

2.9.7 „Rotarod“-Versuch

Die Analyse der Koordinationsfähigkeit erfolgte mit Hilfe des „Rotarods“. Die Mäuse wurden dabei auf einen Zylinder (ca. 5 cm Ø) gesetzt, der sich mit immer schneller werdender Geschwindigkeit um die eigene Achse drehte. Die Zeit, in der sich die Maus auf der Walze durch Mitlaufen halten konnte, bevor sie auf eine Schaumstoffmatte hinunterfiel (Fallhöhe 15 cm), galt als Korrelat der Koordinationsfähigkeiten. Unter der Matte befand sich ein Schalter, der ausgelöst wurde, sobald das Tier herabfiel. Die maximale Beobachtungszeit beim Rotarod betrug für jedes Tier 3 x 3 Minuten an zwei aufeinanderfolgenden Tagen.



Abbildung 2.4: Rotarod-Apparatur

(Quelle:<http://www.stoeltingco.com/physio/store/images%5Cstores%5C57650%20rotarod,%20mice.JPG>)

2.9.8 MORRIS Water Maze

Zur Beurteilung des Lernverhaltens und des Gedächtnisses wurde bei Nagetieren der MORRIS *Water Maze*-Test etabliert (MORRIS, 1984; REDISH und TOURETZKY, 1998). Das *Water Maze* bestand aus einem Plastikbecken mit einem Durchmesser von 150 cm und wurde ca. 20 cm hoch mit 21° C warmen Wasser befüllt. Durch Zugabe von weißer

Plackafarbe (Pelikan) erhielt das Wasser eine milchige Farbe. In einen Quadranten wurde eine 10 cm² große Plattform in das eingetrübte Wasser gestellt, so dass sie 1 cm unter der Wasseroberfläche verborgen war. An die Wände des Wasserbeckens wurden zur Erleichterung der optischen Orientierung unterschiedliche Symbole geklebt.

Der Versuch erstreckte sich über vier Tage. An den ersten drei Tagen (Training) wurden die Versuchstiere pro Durchgang einmal in jeden der 4 Quadranten gesetzt und es wurde die Zeit gemessen, bis sich die Mäuse auf die Plattform retteten. Gelang es den Tieren nicht, innerhalb von 90 Sekunden die Plattform zu finden, wurden die Tiere für 10 Sekunden auf die Plattform gesetzt. Dieser Durchgang wurde pro Tag dreimal wiederholt, so dass jede Maus jeden Tag 12 Versuche hatte, die Plattform zu finden. Am vierten Tag (Test) wurde die Plattform entfernt und erneut ein Durchgang von allen vier Startpunkten durchgeführt.

Mit einer zentral über dem Becken montierten Kamera wurde das Suchverhalten der Mäuse aufgezeichnet. Mit dem Videomot 2-System der Firma TSE-Systems (Bad Homburg) wurden die zurückgelegte Strecke, die benötigte Zeit und das Suchverhalten ausgewertet.

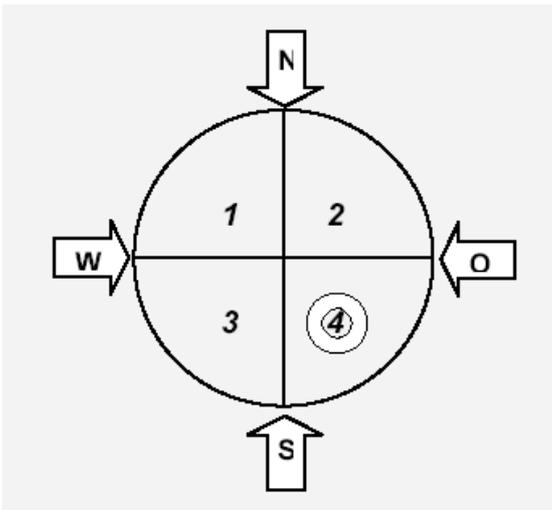


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des MORRIS *Water Maze*. Das Wasserbecken ist in vier Quadranten unterteilt. Die Startpunkte pro Durchgang sind mit Nord (N), Ost (O), Süd (S) und West (W) markiert.

Die Zielplattform wurde konstant im vierten Quadranten positioniert.

2.10 Bestimmung der Krampfschwelle

Zur Bestimmung der Krampfschwelle wurde den Tieren Pentylentetrazol (PTZ; Sigma) oder Pilocarpin intraperitoneal verabreicht. Es wird vermutet, dass PTZ den GABA_A-Rezeptor blockiert und somit zu epileptischen Anfällen führt. Pilocarpin aktiviert den Acetylcholin-Rezeptor und löst auf diese Weise ebenfalls epileptische Krämpfe aus.

PTZ wurde in einer Konzentration von 40 mg/kg bzw. 60 mg/kg in PBS verdünnt und in einem Gesamtvolumen von 300 µl injiziert. Nach der Injektion wurden die Tiere 10 Minuten

beobachtet und die Latenz bis zu den myoklonischen (fokale Krämpfe), klonischen (Verkrampfen der Vorderpfoten) und generalisierten tonisch-klonischen Krämpfen protokolliert. Pilocarpin (Sigma) wurde in einer Konzentration von 350 mg/kg in 300 µl PBS gespritzt. 30 Minuten vor der Injektion mit Pilocarpin wurde den Mäusen 1 mg/kg Methylscopolamin (Sigma) injiziert, um die periphere cholinerge Wirkung von Pilocarpin zu blocken. Nach der Verabreichung von Pilocarpin wurde die Zeit bis zum ersten generalisierten tonisch-klonischen Krampf gemessen.

2.11 Intrazelluläre pH-Messung an vitalen Gehirnschnitten

Die intrazelluläre pH-Messung (pHi) an vitalen Gehirnschnitten von NCBE-*Knockout*-Mäusen wurde bei Herrn Dr. Wiemann vom Institut für Physiologie an der Universitätsklinik Essen durchgeführt. Zur optischen Messung des pHi nutzt man die Eigenschaften des Farbstoffs 2',7-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein-Acetomethylester (BCECF-AM, Molecular Probes, Leiden, Niederlande). BCECF-AM wird durch intrazelluläre Esterasen durch Abspaltung des Acetomethylesters aktiviert. Es entsteht ein Fluoreszenzfarbstoff mit einer pH abhängigen Anregung bei 490 nm. Die Intensität der Anregung nimmt bei Erhöhung des pH zu. Die Anregung bei einer Wellenlänge von 440 nm ist dagegen vom pH unabhängig. Die Intensität der Fluoreszenz bei 440 nm ist somit nur von der Farbstoffmenge abhängig. Es kann ein Quotient aus beiden Fluoreszenzintensitäten gebildet werden, welcher nur vom intrazellulären pH und nicht von der Menge des Farbstoffs abhängt.

Zur Messung des intrazellulären pH wurden sieben Mäuse pro Genotyp mit Isofluran betäubt und das Gehirn präpariert. Das Gehirn wurde sofort in CO₂/HCO₃⁻ gepufferten artifiziellen Liquor in 400 µm dicke coronale Schnitte geschnitten. Bei der Schnittdicke blieben die synaptischen Verbindungen zwischen den Neuronen des Hippokampus zum großen Teil intakt, so dass nach wie vor die neuronale Aktivität des Hippokampus gewährleistet war. Zur pHi-Messung wurde das *Stratum pyramidale* des Hippokampus ausgewählt, da in diesem Bereich die Dichte der Neuronen gegenüber Gliazellen sehr hoch ist.

Die Gehirnschnitte wurden nach der Präparation zwei Stunden in artifiziellen Liquor präinkubiert und anschließend 10 Minuten mit 5 µM BCECF-AM beladen. Die optische Messung erfolgte in einer 2 ml-Kammer, welche unter einem Olympus Bx50Wi-Mikroskop montiert war. Während der gesamten Messung wurde die Kammer mit 32° C warmen artifiziellen Liquor gespült, welchem nach Bedarf noch die 50 µM 5-(N-Ethyl-N-Isopropyl)-Amilorid (Sigma) und 20 mM NH₄Cl (Sigma) beigefügt wurden. Die Schnitte wurden durch ein Objektiv mit 20-facher Vergrößerung besichtigt und abwechselnd mit Licht der

Wellenlänge 440 nm und 490 nm beleuchtet. Die Aufnahmen der Fluoreszenzmessung erfolgten mithilfe der Software CARAT (O. Ahrens, Bargteheide).

Artificialer Liquor:

- 124 mM NaCl
- 3 mM KCl
- 0,75 mM CaCl₂
- 1,3 mM MgSO₄
- 1,25 mM KH₂PO₄
- 26 mM NaHCO₃
- 10 mM Glucose

pH 7,35 bis 7,4 durch Begasung mit 5 % CO₂/95 % O₂
32° C

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der Mutation im *Slc4a10*-Gen

3.1.1 Genotypisierung der konstitutiven NCBE-Knockout-Mäuse

Um homozygote NCBE-Knockout-Mäuse zu erhalten wurden heterozygote NCBE-Knockout-Mäuse miteinander verpaart. Nach der MENDELSchen Verteilung sollte so bei den Nachkommen jeder Genotyp im Verhältnis 1:2:1 (Wildtyp (NCBE^{+/+}) : Heterozygoter NCBE-Knockout (NCBE^{+/-}) : Homozygoter NCBE-Knockout (NCBE^{-/-})) vorkommen. Um die Genotypen der Nachkommen unterscheiden zu können, wurde die genomische DNS aus Schwanzbiopsien gewonnen (2.3.2) und mittels Southern Blot (2.3.9) oder PCR (2.3.7.1) genotypisiert.

Für den Southern Blot wurde eine 411 bp lange DNS-Sonde hergestellt (2.7.3), die 3' außerhalb der *Targeting*-Vektor-Sequenz liegt (2.7.2). Nach einem *Spe* I-Restriktionsverdau der genomischen Wildtyp-DNS hybridisiert die Sonde an ein 17,5 kb großes Fragment. Im mutierten Allel wurde jedoch eine zusätzliche *Spe* I-Restriktionsschnittstelle eingebracht, wodurch die Sonde nach einem *Spe* I-Restriktionsverdau der genomischen DNS an ein kleineres Fragment mit 4,8 kb hybridisiert. (siehe Abbildung 3.1).

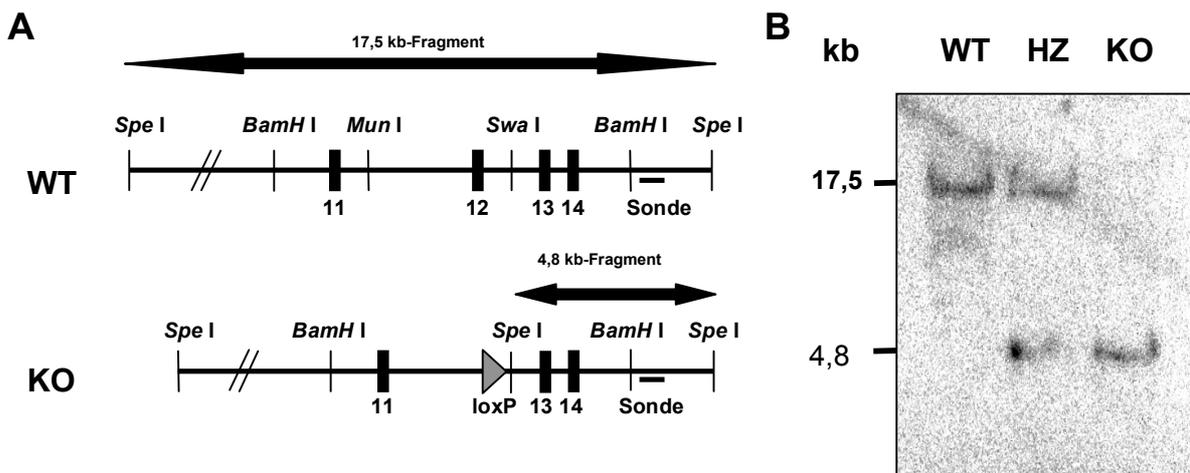


Abbildung 3.1: (A) Lage der verwendeten Sonde und Größe der erwarteten Banden im Southern Blot. Beim *Knockout* verursachte die zusätzlich eingefügte *Spe* I-Restriktionsschnittstelle ein kürzeres DNS-Fragment. (B) Im Southern Blot erschien bei NCBE^{+/+}-Tieren (WT) eine 17,5 kb-Bande, bei NCBE^{+/-}-Tieren (HZ) eine 17,5 kb-Bande sowie eine 4,8 kb-Bande und bei NCBE^{-/-}-Tieren (KO) nur eine 4,8 kb-Bande.

Zur Vereinfachung der Genotypisierung wurde eine Multiplex-PCR etabliert, bei der im Wildtyp ein 598 bp langes PCR-Produkt entstand. Dagegen führte die Genotypisierungs-PCR im *Knockout* zu einem größeren Produkt von 694 bp (siehe Abbildung 3.2).

Bei Heterozygotie wurden folglich beide PCR-Produkte amplifiziert. Durch die Primerzusammenstellung der Genotypisierungs-PCR war theoretisch auch ein zweites 3,8 kb großes Wildtyp-PCR-Produkt von Primer 1 bis Primer 3 möglich, dass aber unter den gewählten PCR-Bedingungen nicht amplifiziert wurde.

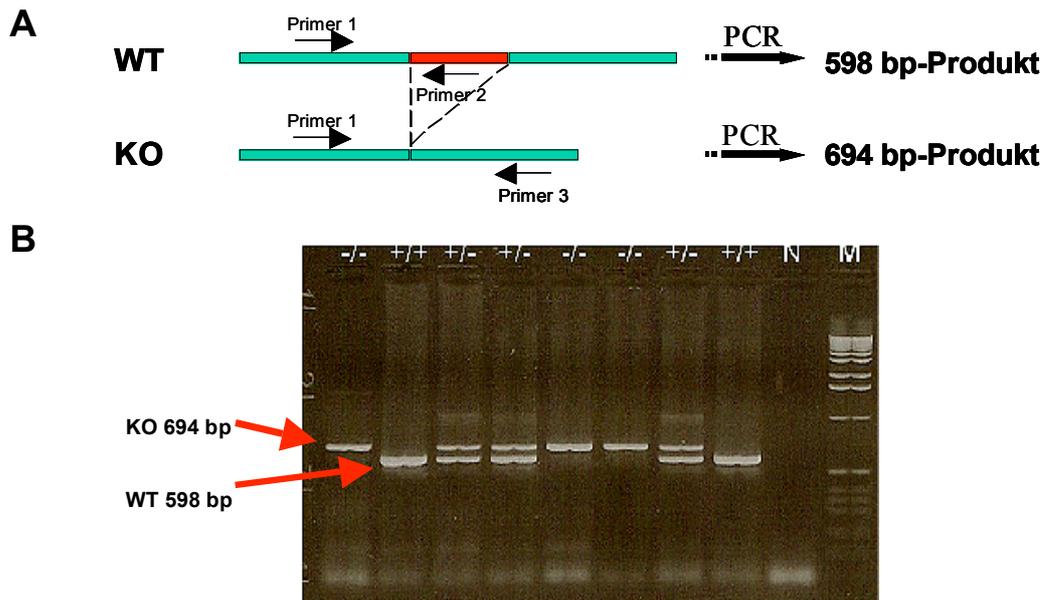


Abbildung 3.2: (A) Schematische Darstellung der Genotypisierungs-PCR. Im Wildtyp wurde der 598 bp lange Bereich zwischen Primer 1 und 2 amplifiziert. Beim NCBE-*Knockout* konnte Primer 2 nicht an der DNS-Matrize hybridisieren, da die komplementäre Sequenz deletiert war. Stattdessen entstand beim NCBE-*Knockout* ein 694 bp langes PCR-Produkt von Primer 1 bis Primer 3. (B) Gelelektrophorese einer Genotypisierungs-PCR mit den drei möglichen Genotypen. NCBE^{+/+} (+/+), NCBE^{+/-} (+/-) und NCBE^{-/-} (-/-); H₂O-Kontrolle (N); Marker (M).

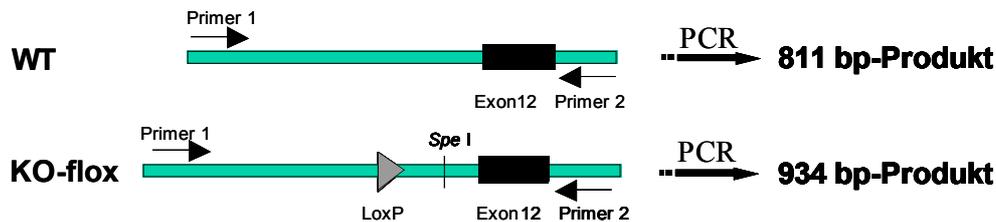
Die Genotypisierung von 244 Jungtieren im Alter von zwei Wochen aus heterozygot NCBE-defizienten Verpaarungen ergab 71 NCBE^{+/+}-Tiere (29,1 %), 126 NCBE^{+/-}-Tiere (51,6 %) und 47 NCBE^{-/-}-Tiere (19,3 %). Damit entsprachen die Genotypen des Nachwuchses ungefähr dem MENDELSchen Spaltungsgesetz (25% Wildtyp : 50% Heterozygot-*Knockout* : 25 % Homozygot-*Knockout*).

3.1.2 Genotypisierung der konditionalen NCBE-*Knockout*-Mäuse

Die konditionalen *Knockout*-Mäuse wurden ebenfalls mittels PCR genotypisiert (2.3.7.1). Es wurde ein Primerpaar gewählt, welches beim konditionalen NCBE-*Knockout* (NCBE^{-/-}-flox)

den Bereich mit der dritten loxP *site* amplifizierte. Dies ergab bei Wildtyp-Mäusen ein PCR-Produkt von 811 bp und bei NCBE^{-/-}-floxed-Mäusen ein längeres PCR-Produkt von 934 bp. Bei konditional heterozygoten NCBE-*Knockout*-Mäusen (NCBE^{+/-}-floxed) war eine entsprechende Doppelbande nachweisbar. Zur besseren Unterscheidung der Genotypen konnten die PCR-Produkte zusätzlich mit dem Restriktionsenzym *Spe* I verdaut werden. Nur das PCR-Produkt des konditionalen Allels verfügte durch das eingefügte Fragment mit der loxP *site* über eine *Spe* I-Restriktionsschnittstelle. Das Wildtyp-PCR-Produkt blieb unverdaut (siehe Abbildung 3.3).

A



B

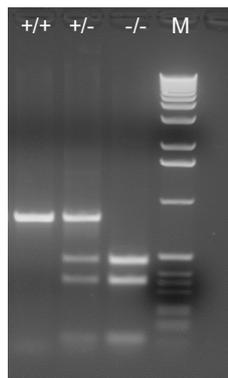


Abbildung 3.3: (A) Schematische Darstellung der PCR-Produkte zur Genotypisierung der NCBE^{-/-}-floxed-Mäuse. Wildtyp: WT; NCBE^{-/-}-floxed: KO-floxed. (B) Gelelektrophorese eines *Spe* I-Restriktionsverdaus der PCR-Produkte der drei möglichen Genotypen. NCBE^{+/+} (+/+): Kein Verdau; NCBE^{+/-}-floxed (+/-): Teilweise verdaut; NCBE^{-/-}-floxed (-/-): Vollständiger Verdau.

3.1.3 Nachweis der NCBE-Defizienz auf RNS- und Proteinebene

Um die Auswirkungen der Deletion von Exon 12 auf die Transkription und Translation zu untersuchen, wurden Northern Blots (2.3.12) und Western Blots (2.5.4) durchgeführt.

Ein cDNS-Subklon mit der murinen NCBE-Sequenz von Nukleotid 151 bis 1003 (*accession number* NM_033552) wurde als Sonde für eine Northern Analyse verwendet. Es wurde ein NCBE-Transkript mit ca. 5,4 kb in der RNS-Präparation des Gehirns detektiert, was der erwarteten Länge der murinen NCBE-mRNS entsprach. In der RNS-Präparation des Gehirns einer NCBE^{-/-}-Maus war dieses Transkript kaum noch nachweisbar (siehe Abbildung 3.4).

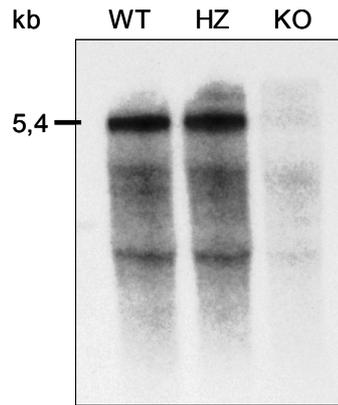


Abbildung 3.4: Northern Blot der Gesamt-RNS vom Wildtyp-Gehirn (WT), vom Gehirn einer NCBE^{+/-}-Maus (HZ) und vom Gehirn einer NCBE^{-/-}-Maus (KO). Der Blot wurde mit einer NCBE-cDNS-Sonde hybridisiert.

3.2 Herstellung eines polyklonalen anti-NCBE-Antikörpers

Zur Detektion des NCBE-Proteins war kein kommerzieller Antikörper erhältlich. Deshalb wurde ein polyklonaler Antikörper bei der Firma Davids Biotechnologie (Regensburg) in Auftrag gegeben. Hierzu wurde mit der Software MegAlign 4.05 von DNASTAR Inc. ein Alignment mit allen Aminosäuresequenzen der murinen *Slc4*-Genfamilie erstellt (siehe Anhang) und die zu den anderen Proteinen sehr heterologe Aminosäuresequenz KHRKRDRERDSGLED (Aminosäure 71 bis 85) von NCBE als Peptid zur Immunisierung der Kaninchen ausgewählt (2.5.5).

Abbildung 3.5 zeigt die Immunreaktivität des Kaninchenserums nach der letzten Immunisierung mit dem synthetisierten Peptid vor der und nach der Affinitätsaufreinigung (2.5.6) im Western Blot (2.5.4). Zum Test des Antikörperserums wurden Membranpräparationen (2.5.1) aus Hirngewebe, Testis und Magen aufgetragen, da in diesen Geweben eine NCBE-Expression beschrieben wurde (WANG *et al.*, 2000). Als Kontrolle dienten jeweils die entsprechenden Membranpräparationen eines NCBE^{+/-}- und eines NCBE^{-/-}-Tieres. Außerdem wurde das Proteingel mit dem Zelllysate NCBE-transfizierter Cos7-Zellen und nicht transfizierter Cos7-Zellen beladen (Abbildung 3.5 A). In den Membranpräparationen des Hodens und des Magens von Wildtyp und Knockout konnte kein Unterschied im Bandenmuster erkannt werden. In der Membranpräparation des Gehirns (ZNS-MP) von der Wildtyp-Maus^{+/+} und von der NCBE^{+/-}-Maus waren aber deutlich zwei Banden bei ca. 180 kDa und >250 kDa zu erkennen, die bei der Gehirn-Membranpräparation der NCBE^{-/-}-Maus fehlten. Im Zelllysate der NCBE-transfizierten Cos7-Zellen (Tr) wurden ebenfalls zwei Banden detektiert, die in der Kontrolle (Co) mit dem Zelllysate untransfizierter Cos7-Zellen nicht detektiert wurden. Das Fehlen dieser Banden im *Knockout* und in der Kontrolle deutete auf eine spezifische NCBE-Immunoreaktivität des Antikörpers hin.

Durch die Antikörperaufreinigung (2.5.6) des Serums konnten die unspezifischen Antikörper beseitigt werden (siehe Abbildung 3.5 B). Es wurden nur noch die zwei NCBE-Banden bei ca. 180 kDa und >250 kDa detektiert. Die Bande bei 180 kDa entspricht ungefähr der berechneten Größe des murinen NCBE-Proteins. Bei der Bande bei >250 kDa könnte es sich um ein Dimer oder Multimer des NCBE-Proteins handeln.

Im Western-Blot konnte weder das Gesamtprotein, noch ein trunkiertes Protein, in der Gehirn-Membranpräparation der NCBE^{-/-}-Mäuse nachgewiesen werden. Die Deletion des Exons 12 führte somit in der generierten Mauslinie zum vollständigen Verlust des NCBE-Proteins.

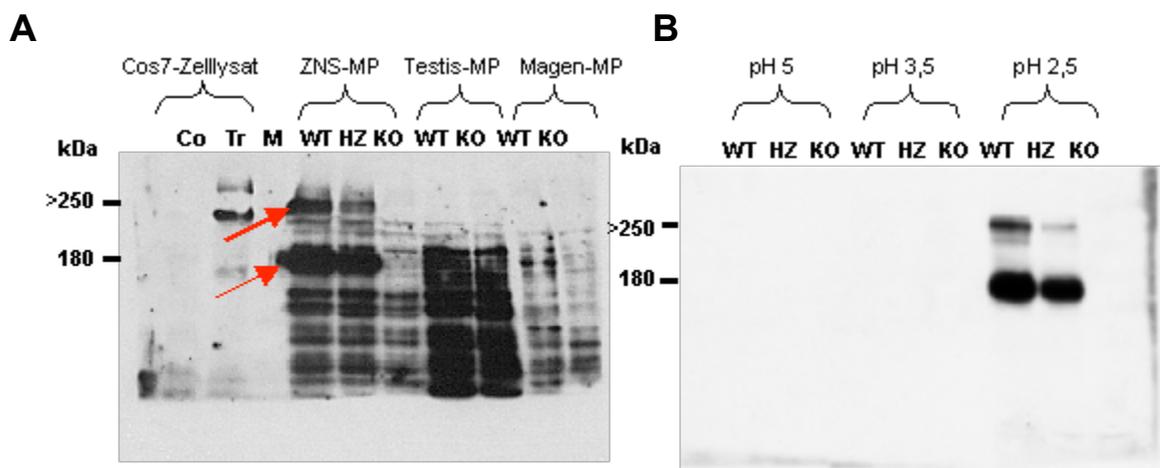


Abbildung 3.5: Test und Aufreinigung des NCBE-Antikörperserums **(A)** Im Western Blot wurden das Zellysat von NCBE-transfizierten Cos7-Zellen (Tr), das Zellysat von untransfizierten Cos7-Zellen (Co) und die Membranpräparationen vom Gehirn (ZNS-MP), vom Hoden (Testis-MP) und vom Magen (Magen-MP) aufgetragen. Das unaufgereinigte Antikörperserum detektierte Banden in der Membranpräparation des Gehirns (ZNS-MP) von der Wildtyp-Maus (WT) und von der NCBE^{+/-}-Maus (HZ), die in der Gehirn-Membranpräparation der NCBE^{-/-}-Maus (KO) fehlten. **(B)** Es wurden jeweils die Gehirn-Membranpräparationen der drei Genotypen NCBE^{+/+} (WT), NCBE^{+/-} (HZ) und NCBE^{-/-} (KO) aufgetragen. Nach dem Blot wurde die Membran in drei Teile zerschnitten und jeweils mit einer Eluat-Fraktion der Antikörperaufreinigung inkubiert. Das Eluat mit 0,1 M Glycin pH 2,5 detektierte spezifisch die NCBE-Banden.

3.3 Lokalisation des natriumabhängigen Chlorid-Bikarbonat-Austauschers NCBE

3.3.1 Northern Blot

Zur Expressionsanalyse des NCBE wurde ein Northern Blot (2.3.12) mit der isolierten Gesamt-RNS (2.3.11) aus zahlreichen Geweben (siehe Abbildung 3.6) durchgeführt. Teilweise wurde die RNS aus den Organen von mehreren Wildtyp-Mäusen isoliert, um von

jedem Organ 10 µg der RNS auftragen zu können. Es wurde die gleiche NCBE-cDNS-Sonde wie zuvor verwendet (3.1.3).

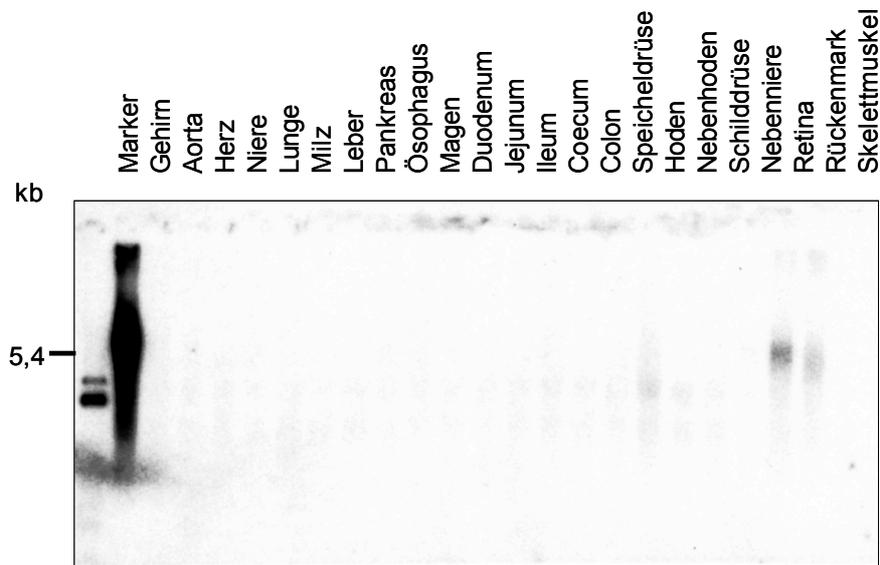


Abbildung 3.6: Expressionsanalyse von NCBE mittels *Multiple tissue northern*. Die Gesamt-RNS verschiedener Organe von Wildtyp-Mäusen wurde entsprechend der Beschriftung aufgetragen und mit einer NCBE spezifischen cDNS-Sonde hybridisiert.

Der Northern Blot zeigte eine sehr starke Expression im gesamten ZNS (Gehirn, Retina und Rückenmark). Die in der Literatur beschriebene Expression in Ileum, Hoden und Niere (WANG *et al.*, 2000) konnte nicht bestätigt werden.

3.3.2 Western Blot

In der Literatur wurde neben einer starken Expression im Gehirn auch eine Lokalisation in unterschiedlichen epithelialen Geweben beschrieben. Mit dem aufgereinigten Serum war es möglich, die beschriebene Expression auf Proteinebene im Western Blot (2.5.4) zu überprüfen. Es wurden Membranpräparationen (2.5.1) von Leber, Hoden, Ileum und Gehirn aufgetragen. Durch das generierte Mausmodell konnten NCBE-positive Wildtyp-Membranpräparationen mit den entsprechenden NCBE-*Knockout*-Membranpräparationen verglichen werden.

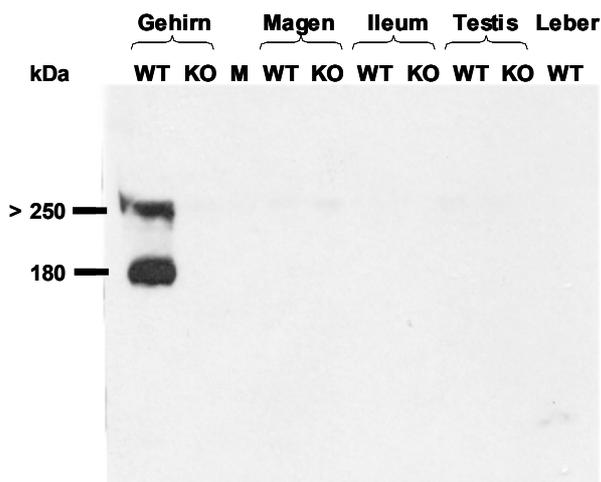


Abbildung 3.7: Analyse der Gewebeverteilung des NCBE mittels Western Blot. Entsprechend der Beschriftung wurden je 10 μ g Protein der Membranpräparationen aufgetragen. Die Inkubation erfolgte mit dem aufgereinigten NCBE-Antiserum. NCBE^{+/+} (WT), NCBE^{-/-} (KO).

Mithilfe des Western Blots (siehe Abbildung 3.7) konnte NCBE wie auch zuvor im Northern Blot (Abbildung 3.6) nur im Gehirn nachgewiesen werden.

Um die Lokalisation im Gehirn näher einzugrenzen, wurde ein Western Blot mit dem Zelllysat einer Astrozyten-Kultur durchgeführt (Abbildung 3.8). Zur Kontrolle wurde auch das Zelllysat vom Gehirn einer Wildtyp-Maus und einer NCBE^{-/-}-Maus mit aufgetragen. Als weitere Kontrolle wurde die Membran zusätzlich mit dem kommerziell erhältlichen anti-GFAP-Antikörper als Astrozytenmarker inkubiert.

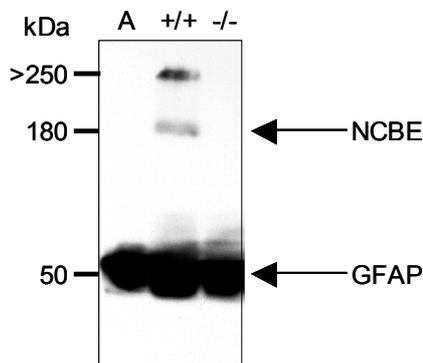


Abbildung 3.8: Western Blot einer lysierten Astrozyten-Kultur (A), eines lysierten Gehirns einer Wildtyp-Maus (+/+) und einer NCBE-Knockout-Maus (-/-).

Im Western Blot konnte nur im Lysat des Wildtyp-Gehirns NCBE nachgewiesen werden. Die in der Literatur beschriebene Lokalisation von NCBE in Astrozyten konnte mit dem NCBE-Antiserum nicht bestätigt werden.

3.3.3 Immunhistologie

DAB-Färbung:

Zur näheren Lokalisation von NCBE im Gehirn wurde das aufgereinigte NCBE-Antiserum ebenfalls für die Immunhistochemie getestet. Hierzu wurden adulte Wildtyp-Mäuse und NCBE-*Knockout*-Mäuse perfundiert (2.6.1) und Gehirn, Augen und Rückenmark präpariert.

Das Gehirn wurde sagittal geschnitten und entsprechend der *Free-floating*-Technik (2.6.3) mit DAB gefärbt (2.6.7). Als Negativ-Kontrolle wurden NCBE^{-/-}-Schnitte verwendet. Die NCBE^{-/-}-Schnitte zeigten keine DAB-Färbung (siehe Abbildung 3.9 B), weshalb die Färbungen der Immunhistochemie (siehe Abbildung 3.9) spezifisch für den NCBE sein mussten.

Mit Ausnahme der weißen Gehirns substanz fand sich eine breite Lokalisation vom NCBE im gesamten Gehirn. Besonders intensive Färbungen waren im *Plexus choroideus*, in der Molekularschicht des Cerebellums (siehe Abbildung 3.9 H) sowie im Cortex zu erkennen. Im Hippokampus wurde eine sehr außergewöhnliche Verteilung des NCBE detektiert (siehe Abbildung 3.9 C). Im *Hilus* des *Gyrus dentatus* und in der CA3-Region wurde der NCBE in Interneuronen sowie in den dendritischen Schichten (*Stratum oriens* und *Stratum radiatum*) und in der Zellkörperschicht (*Stratum pyramidale*) der Pyramidenzellen lokalisiert (Abbildung 3.9 D). Dagegen fehlte der NCBE vollständig in den Pyramidenzellen der CA1-Region, wo das Protein nur in vereinzelt Interneuronen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.9 E). In Abbildung 3.9 D ist außerdem gut zu erkennen, dass die Axone der Körnerzellen des *Gyrus dentatus* (Moosfasern) ebenfalls kein NCBE aufweisen.

Die Kryoschnitte der Augen und des Rückenmarks wurden aufgrund der schlechteren Stabilität der Schnitte direkt auf Objektträger aufgezogen (2.6.2) und dann mit DAB (2.6.7) gefärbt.

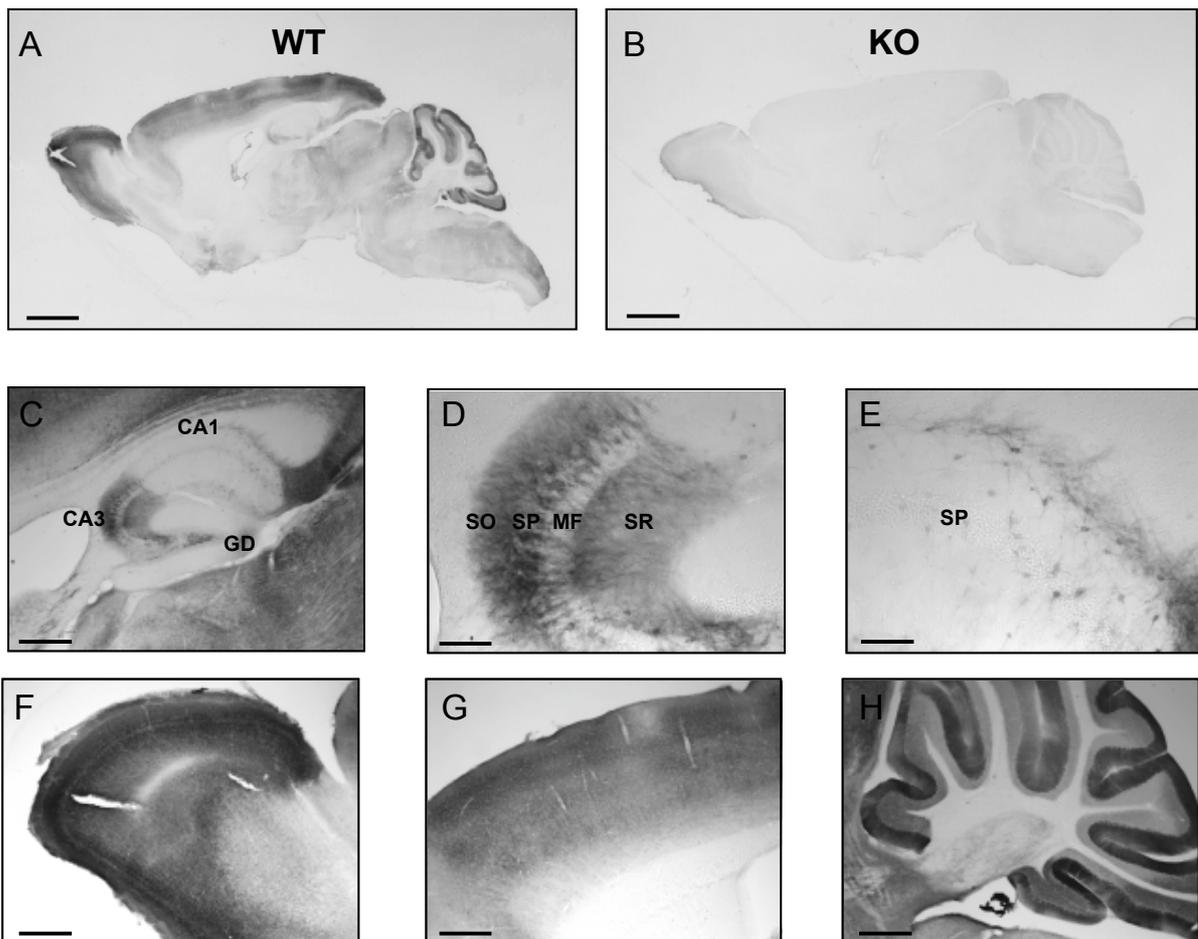


Abbildung 3.9: DAB-Färbung des NCBE in sagittalen Gehirnschnitten. **(A)** DAB-Färbung des NCBE im sagittalen Gehirnschnitt einer Wildtyp-Maus. **(B)** NCBE-Färbung der *Knockout*-Kontrolle. **(C)** Ausschnittsvergrößerung des Hippokampus. **(D)** Die CA3-Region des Hippokampus. **(E)** CA1-Region des Hippokampus. **(F)** Olfaktorischer Bulbus. **(G)** Cortex. **(H)** Cerebellum.

Bildbeschriftung: WT = Wildtyp; KO = NCBE-*Knockout*; CA1 = CA1-Region des Hippokampus; CA3 = CA3-Region des Hippokampus; GD = *Gyrus dentatus*; SO = *Stratum oriens*; SP = *Stratum pyramidale*; SR = *Stratum radiens*; MF = Moosfasern.

Größenbalken = 1mm in A und B; 200 μ m in C, F, G und H; 50 μ m in D und E.

Die DAB-Färbung des Rückenmarks einer Wildtyp-Maus zeigte ausschließlich eine NCBE-Lokalisation in der grauen Substanz (siehe Abbildung 3.10). Die weiße Substanz blieb wie in den Gehirnschnitten ungefärbt.

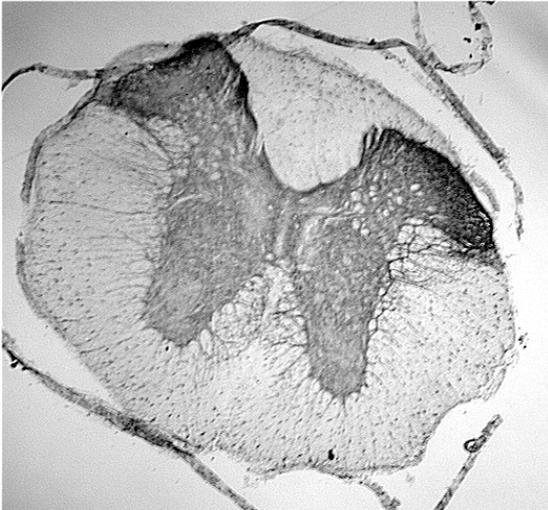


Abbildung 3.10: DAB-Färbung des NCBE im Querschnitt des Rückenmarks einer Wildtyp-Maus. Der NCBE konnte in der grauen Substanz des Rückenmarks lokalisiert werden.

Immunfluoreszenz:

Zur genaueren Analyse der subzellulären NCBE-Lokalisation im Gehirn wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von NCBE und diversen Markerproteinen durchgeführt. Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurde stets das unter 2.6.7 beschriebene Protokoll und die unter 2.5.8 angegebenen Antikörperkonzentrationen verwendet.

In allen Immunfluoreszenz-Abbildungen wurde der NCBE mit grüner Fluoreszenz und die verwendeten Markerproteine mit roter Fluoreszenz dargestellt. Zur besseren Orientierung wurden in allen Färbungen die Zellkerne mit dem Farbstoff TOTO3 angefärbt.

In Abbildung 3.11 sind die konfokalen Immunfluoreszenzfärbungen der CA3-Region des Hippokampus abgebildet. Um artifizielle Färbungen des NCBE-Antiserums auszuschließen, wurden unter identischen Bedingungen stets NCBE^{-/-}-Schnitte mitgefärbt, welche aber wie die DAB-Färbungen keine falsch positive NCBE-Färbung aufwiesen.

Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen zeigten keine überlappende Lokalisation mit dem Oligodendrozyten-Marker CNPase (siehe Abbildung 3.11 A), noch mit dem Astrogliamarker GFAP (siehe Abbildung 3.11 B). Der NCBE war assoziiert mit dem Dendriten-Marker MAP-2, mit dem der NCBE direkt im Dendritenstamm kolokalisierte oder diesen in punktförmigen Strukturen umgab, bei welchen es sich um dendritische Dornen handeln könnte (siehe Abbildung 3.11 C).

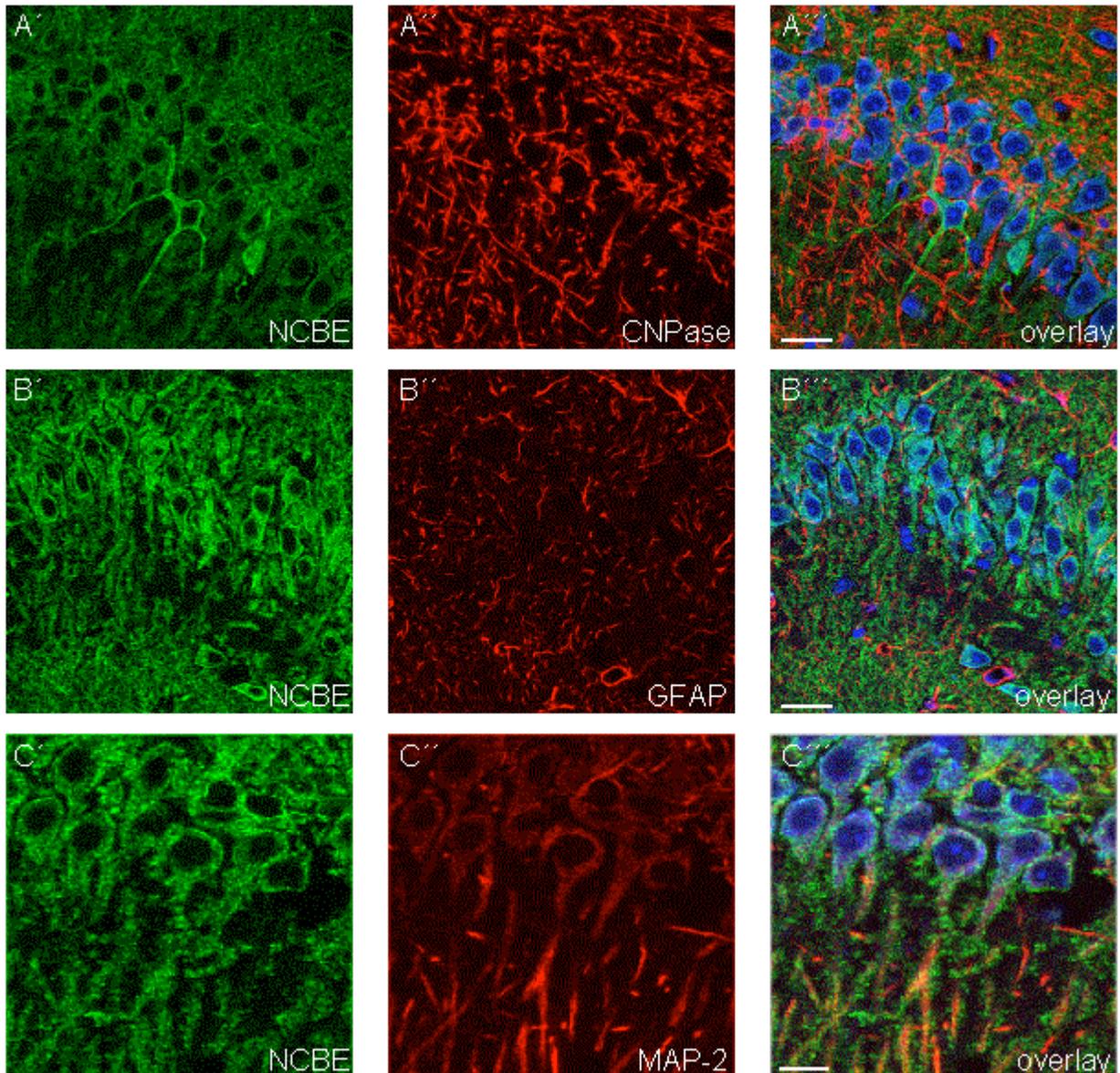


Abbildung 3.11: (A-C) Konfokale Aufnahmen der Lokalisation von NCBE in der CA3-Region des Hippokampus. (A) Doppelimmunfluoreszenzfärbung von NCBE und dem Marker für Oligodendrozyten CNPase, (B) dem Astrozyten-Marker GFAP und (C) dem Dendriten-Marker MAP-2.

Aufgrund der Expression im *Stratum pyramidale* war eine Expression in den Pyramidenzellen der CA3-Region des Hippokampus offensichtlich. Durch weitere Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen die Glutamat-Decarboxylase (GAD) und gegen Parvalbumin, welche nur in inhibitorischen Nervenzellen vorkommen, konnte ebenfalls eine Lokalisation des NCBE in einigen Interneuronen des Hippokampus nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.12).

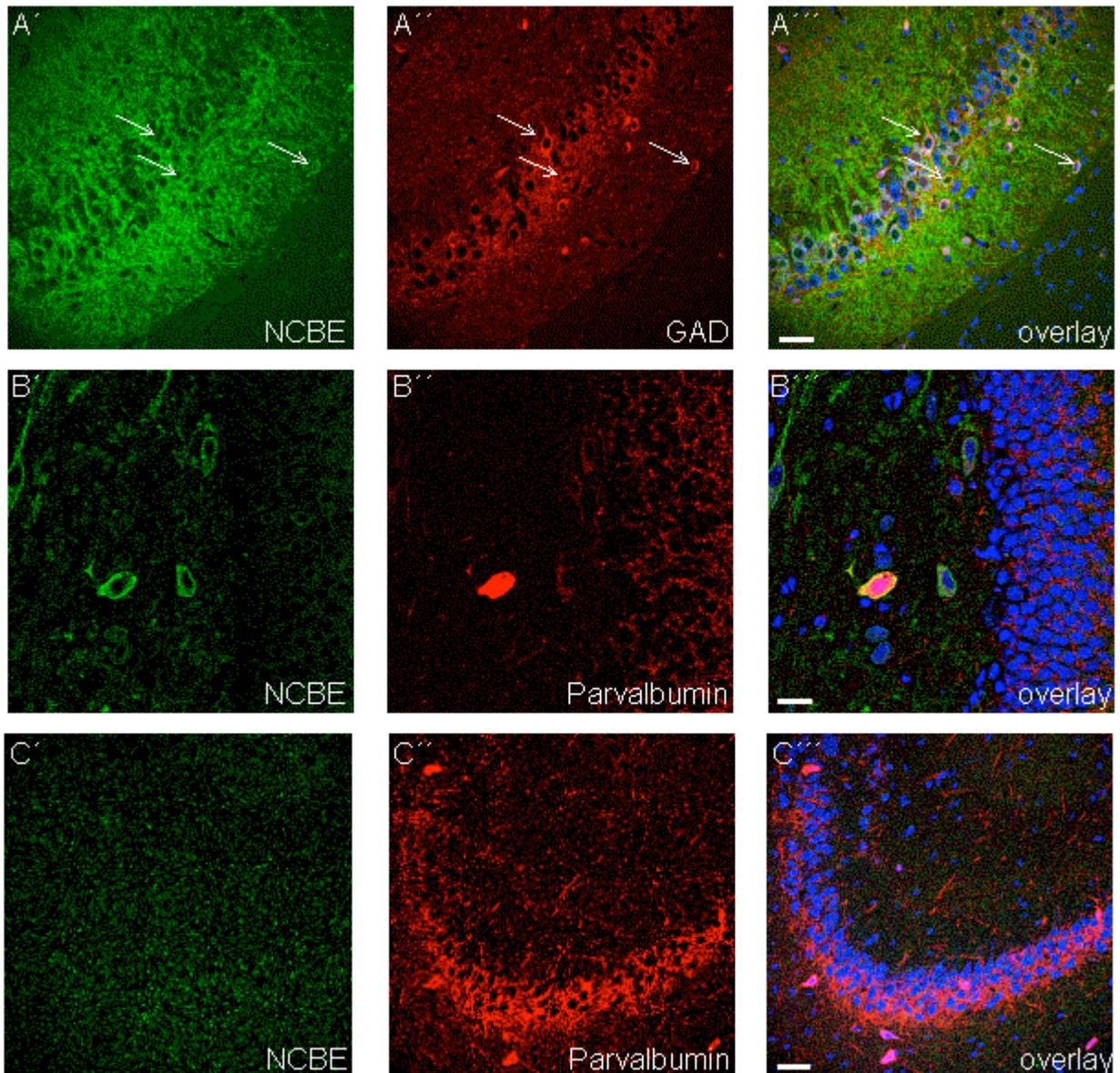


Abbildung 3.12: Kolokalisation in der Doppelimmunfluoreszenzfärbung von NCBE mit Markern für inhibitorische Neurone. **(A)** Doppelfärbung von NCBE und GAD in der CA3-Region des Hippokampus. Die Pfeile markieren einige Neurone mit Kolokalisation. **(B)** Doppelfärbung von NCBE und Parvalbumin im *Hilus* des *Gyrus dentatus*. **(C)** Doppelfärbung von NCBE und Parvalbumin in der CA3-Region des Hippokampus im NCBE^{-/-}-Schnitt.

Wie in den DAB-Färbungen war auch in den Immunfluoreszenzfärbungen eine starke Färbung in der Molekularschicht des Cerebellums zu erkennen. Neben einer dendritischen Lokalisation wurde auch im Cerebellum ein punktförmiges Signal in unmittelbarer Nähe der Dendritenstämme beobachtet (Abbildung 3.13 A), so dass vermutet wurde, dass der NCBE auch in den dendritischen Dornen der Purkinje-Zellen lokalisiert sein könnte. Immunfluoreszenzfärbungen von NCBE^{-/-}-Schnitten dienten als Negativ-Kontrolle (siehe Abbildung 3.13 B) und zeigten auch im Kleinhirn keine artifizielle Färbung durch das NCBE-Antiserum.

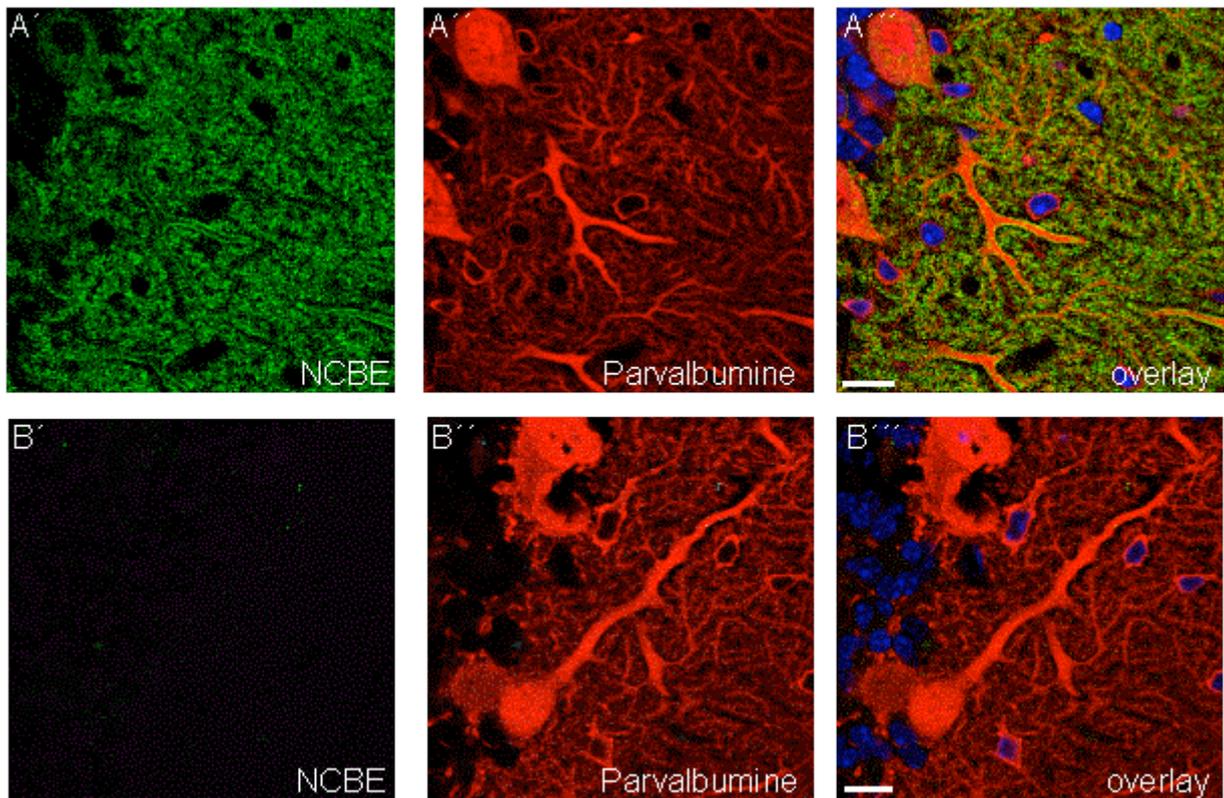


Abbildung 3.13: Konfokale Aufnahmen der Lokalisation von NCBE in der Molekularschicht des Kleinhirns. Doppelimmunfluoreszenzfärbung von NCBE und Parvalbumin als Marker für inhibitorische Neurone im Wildtyp-Schnitt (**A**) und im NCBE^{-/-}-Schnitt (**B**).

Mit dem Antiserum konnte mittels DAB-Färbungen der NCBE auch in der Inneren Schicht der Maus-Retina nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.14 B). In NCBE^{-/-}-Schnitten der Retina fehlte die DAB-Färbung vollständig (siehe Abbildung 3.14 A), so dass das Antiserum auch im Auge die Lokalisation des NCBE spezifisch detektierte. Die braune Färbung des Pigmentepithels entspricht der natürlichen Augenfarbe der präparierten Maus. Beim Wildtyp ging das Pigmentepithel durch die Präparation verloren. Die Immunfluoreszenzfärbungen (siehe Abbildung 3.14 C) bestätigten die Lokalisation von NCBE in der Inneren Schicht, in welcher die Zellkörper der Bipolarzellen liegen. Mithilfe der Zellkernfärbungen des Farbstoffs TOTO3 konnte das NCBE-Signal eindeutig der Äußeren und der Inneren plexiformen Schicht zugeordnet werden, in denen die Dendriten der Bipolarzellen enden. Wie auch in den Gehirnschnitten zeigte sich also auch in der Retina eine subzelluläre Lokalisation von NCBE in Dendriten.

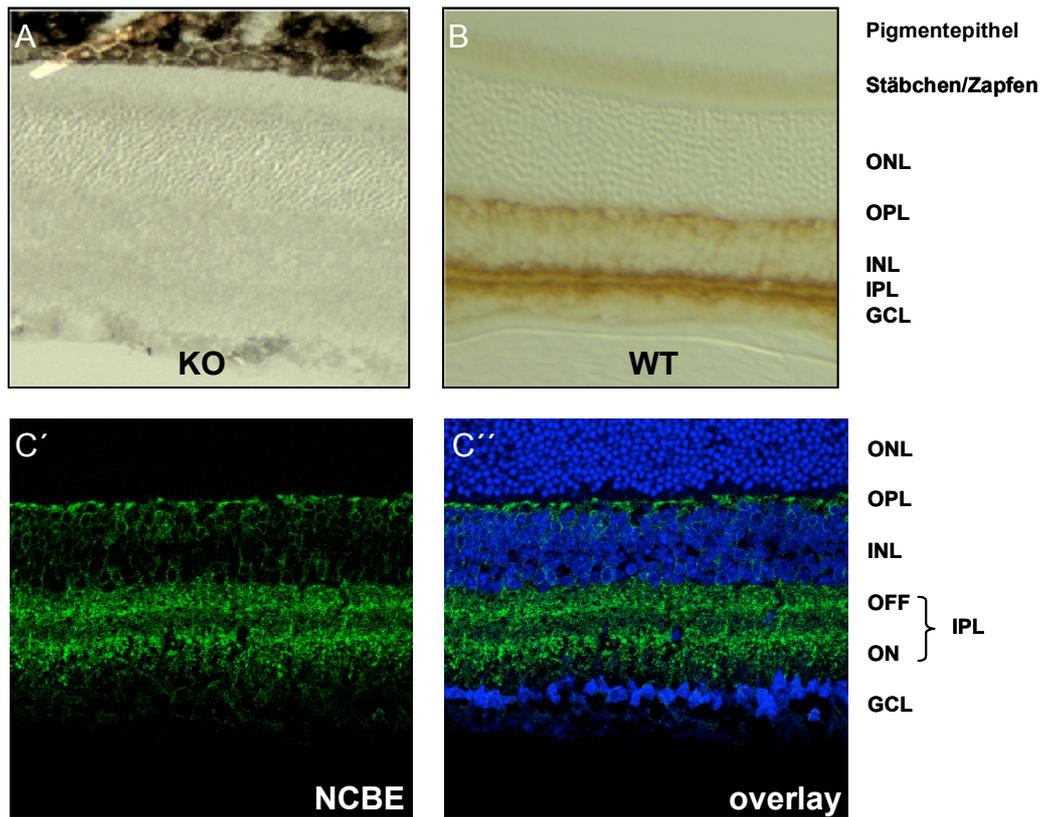


Abbildung 3.14: Immunhistologie des NCBE in der Maus-Retina. **(A)** DAB-Färbung des NCBE in der NCBE^{-/-}-Retina mit Pigmentepithel. **(B)** DAB-Färbung des NCBE in der Retina einer Wildtyp-Maus ohne Pigmentepithel. **(C)** Konfokale Aufnahme der Immunfluoreszenzfärbung von NCBE mit einer Zellkernfärbung durch TOTO3. ONL = Äußere Körnerschicht; OPL = Äußere plexiforme Schicht; INL = Innere Körnerschicht; IPL = Innere plexiforme Schicht; OFF = *Off-layer* der Inneren plexiformen Schicht; ON = *On-layer* der Inneren plexiformen Schicht; GCL = Ganglienzellschicht.

Mithilfe des generierten NCBE-Antiserums konnte die schon von einer anderen Arbeitsgruppe veröffentlichte basolaterale Lokalisation von NCBE im *Plexus choroideus* bestätigt werden. Die Abbildung 3.16 zeigt eine Immunfluoreszenzfärbung des NCBE im *Plexus choroideus* des lateralen Ventrikels eines sagittalen NCBE^{+/+}-Gehirnschnitts. Es war deutlich die zum Blut gewandte Seite des Epithels gefärbt. Immunfluoreszenzfärbungen von NCBE^{-/-}-Schnitten mit dem NCBE-Antiserum zeigten kein Hintergrundsignal im *Plexus choroideus*.

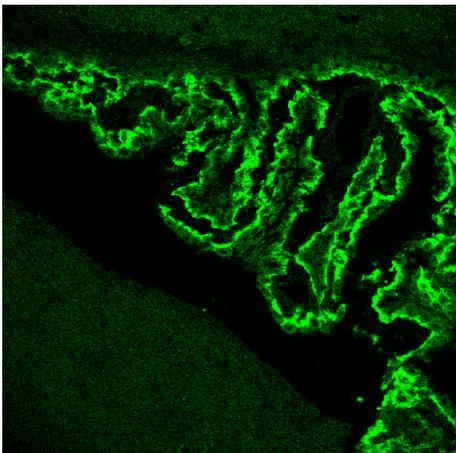


Abbildung 3.16: Immunfluoreszenz von NCBE im *Plexus choroideus* eines lateralen Ventrikels im sagittalen Gehirnschnitt einer Wildtyp-Maus.

Aufgrund der Immunfluoreszenzfärbungen der Gehirnschnitte wurde vermutet, dass NCBE ebenfalls in dendritischen Dornen vorhanden und somit direkt postsynaptisch lokalisiert ist. Um diese Annahme zu untermauern, wurden von Frau Dr. Schweizer (ZMNH, Hamburg) mit dem NCBE-Antiserum für die Elektronenmikroskopie geeignete DAB-Färbungen bei NCBE^{+/+}- und NCBE^{-/-}-Gehirnschnitten durchgeführt. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der CA3-Region des NCBE^{+/+}-Hippokampus war deutlich ein DAB-Niederschlag in Dendriten (siehe Abbildung 3.15 A und B), aber auch in zahlreichen dendritischen Dornen zu erkennen, wo besonders die postsynaptische Dichte (PSD) angefärbt wurde (siehe Abbildung 3.15 C bis F). In NCBE^{-/-}-Hippokampuschnitten war keine DAB-Färbung zu beobachten.

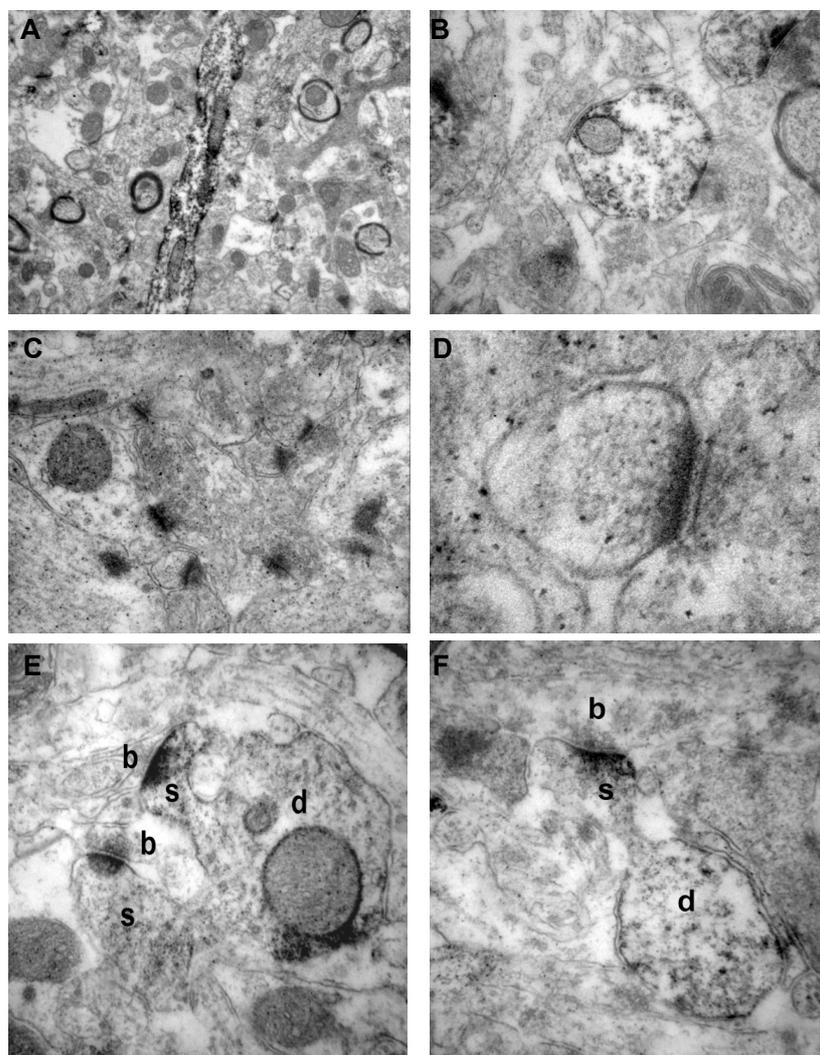


Abbildung 3.15: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer NCBE-spezifischen DAB-Färbung in der CA3-Region des Hippokampus einer Wildtyp-Maus. **(A)** 12000-fache Vergrößerung der DAB-Färbung eines längs angeschnittenen Dendriten und **(B)** eines quer angeschnittenen Dendriten. 30000-fache Vergrößerung. **(C)** DAB-Niederschlag in der PSD zahlreicher Synapsen. 30000-fache Vergrößerung. **(D)** 140000-fache Vergrößerung einer Synapse mit DAB-Färbung in der PSD. **(E und F)** Dendriten mit angeschnittenen dendritischen Dornen. 30000-fache Vergrößerung. Bildbeschriftung: b = Button; s = Postsynapse; d = Dendrit.

3.4 Erscheinungsbild der NCBE^{-/-}-Maus

Die Verpaarungen der heterozygot NCBE-defizienten Mäuse führten zu einer Anzahl von lebensfähigen NCBE^{-/-}-Mäusen, die dem MENDELSchen Spaltungsgesetz entsprach (siehe 3.1.1).

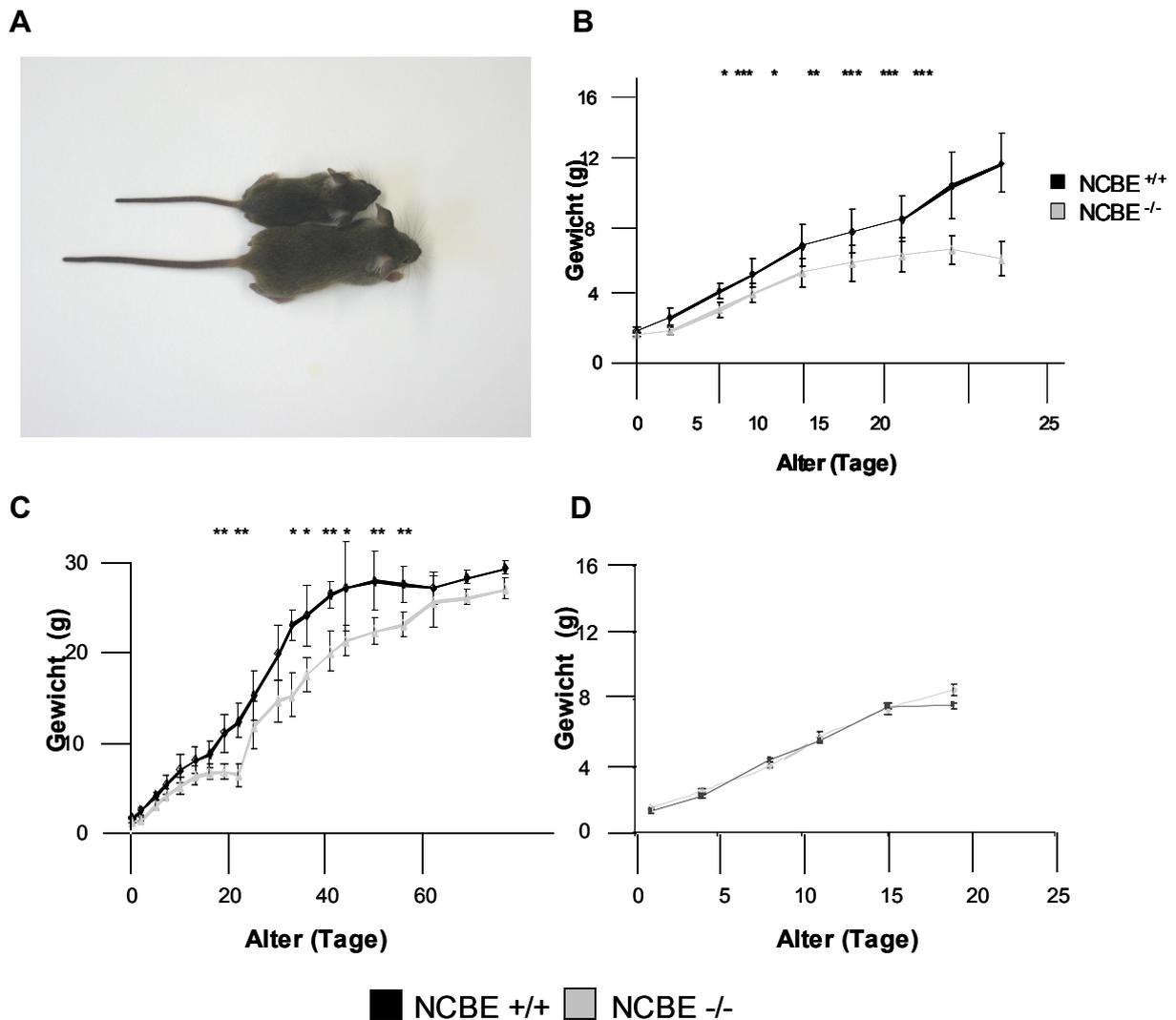


Abbildung 3.16: Äußeres Erscheinungsbild der NCBE^{-/-}-Maus im Alter von drei Wochen. **(A)** Der makroskopische Vergleich einer drei Wochen alten *Knockout*-Maus (oben) mit seinem Wildtyp-Geschwister (unten) zeigte einen deutlichen Größenunterschied. **(B)** Die Gewichtsanalyse juveniler Mäuse wies im gemischten Wurf eine signifikant langsamere Gewichtszunahme der NCBE^{-/-}-Mäuse nach. Kurz vor dem Absetzen vom Muttertier am 21. Tag kam es sogar zur Gewichtsreduktion bei NCBE^{-/-}-Mäusen. Angegeben ist das durchschnittliche Körpergewicht der Mäuse in den ersten drei Lebenswochen von 14 Wildtyp-Mäusen und 18 NCBE^{-/-}-Mäusen. **(C)** Für die Gewichtsanalyse adulter Mäuse wurden die Geschlechter unterschieden. Die NCBE^{-/-}-Mäuse (n = 9 je Genotyp) erholten sich schnell nach dem Absetzen. Ab Tag 60 war kein signifikanter Gewichtsunterschied mehr festzustellen. **(D)** Die Gewichtsanalyse der Nachkommen aus homozygoten NCBE^{+/+}- und NCBE^{-/-}-Verpaarungen zeigte identische Gewichtskurven von Wildtyp (n = 6) und NCBE-*Knockout* (n = 15). Die Fehlerbalken geben jeweils den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) wieder. Die statistische Signifikanz wurde mit einem T-test überprüft. p < 0,05 (*); p < 0,01 (**); p < 0,001 (***)

Das Geburtsgewicht der NCBE^{-/-}-Mäuse war normal, so dass kein schwerer embryonaler Phänotyp anzunehmen war. In den ersten drei Lebenswochen nahmen die NCBE^{-/-}-Mäuse im Mittel aber signifikant weniger Gewicht zu. In der dritten Lebenswoche war der Gewichtsunterschied in einem Wurf zwischen Wildtyp-Mäusen und homozygoten *Knockout*-Mäusen am höchsten (siehe Abbildung 3.16 A und B). Nach dem Absetzen am 21. Tag wurden die NCBE^{-/-}-Mäuse durch Zusatzfütterung mit Weichfutter versorgt und die Tiere erholten sich dann in der Regel schnell. Nach ca. zwei Monaten hatten die NCBE^{-/-}-Mäuse ein normales Körpergewicht erreicht und waren von den Wildtyp-Tieren nicht mehr zu unterscheiden (siehe Abbildung 3.16 C). Heterozygote NCBE-*Knockout*-Mäuse zeigten einen zu den Wildtyp-Mäusen identischen Gewichtsverlauf.

Homozygot NCBE-defiziente Mäuse waren fertil und versorgten ihren Nachwuchs. Die juvenilen Mäuse aus einem rein homozygot NCBE-defizienten Wurf ohne konkurrierende Wildtyp-Geschwister hatten kein Entwicklungsrückstand und zeigten eine normale Gewichtsentwicklung (siehe Abbildung 3.16 D).

Die NCBE-defizienten Mäuse wiesen eine leicht erhöhte Sterblichkeit in den ersten drei Lebenswochen auf, danach konnten viele *Knockout*-Mäuse aber ein Lebensalter von über zwei Jahren erreichen.

Generell schienen die Sinne der NCBE-defizienten Mäuse nicht beeinträchtigt zu sein. NCBE^{-/-}-Mäuse konnten hören und riechen, da sie auf Geräusche (Klatschen, Schlüsselklingeln) und Gerüche (Phenylacetat und Linalool) reagierten. Eine Blindheit der Mäuse konnte durch Elektroretinogramme ausgeschlossen werden, welche in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Rüther durchgeführt wurden (Charité, Berlin).

3.5 Morphologie des zentralen Nervensystems

Das NCBE^{-/-}-Gehirn unterschied sich makroskopisch nicht vom Gehirn einer Wildtyp-Maus. Zur genaueren Beurteilung der Morphologie wurden von Gehirnen drei bis sechs Monate alter Mäuse 10 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt (siehe 2.6.4) und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (siehe 2.6.5). In der lichtmikroskopischen Auswertung wurden keine Anomalien des Nervensystems entdeckt (siehe Abbildung 3.17). Allerdings schienen die Volumina der Ventrikel des NCBE^{-/-}-Gehirns stark verkleinert. In Abbildung 3.17 D ist das ungewöhnlich kleine Volumen des vierten Ventrikels im coronalen Schnitt des NCBE^{-/-}-Kleinhirns zu erkennen (siehe Pfeile).

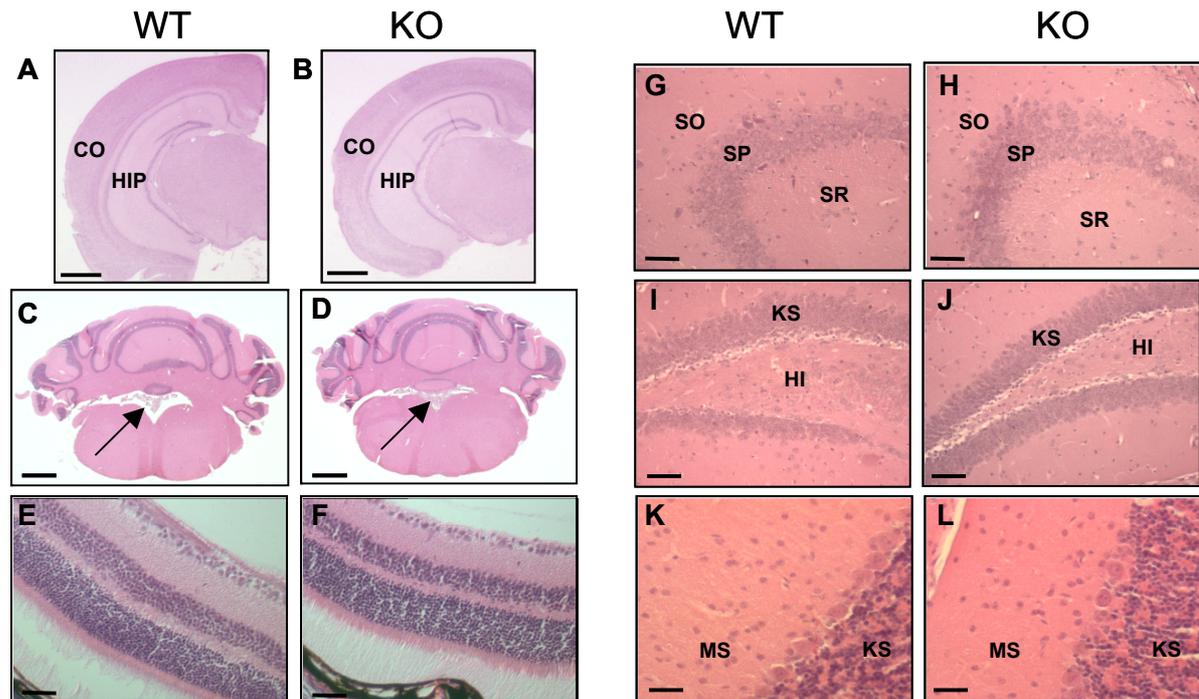


Abbildung 3.17: Histologische Analyse des NCBE^{-/-}-Gehirns. 10 µm dicke coronale Schnitte von verschiedenen Gehirnregionen einer drei Monate alten NCBE^{-/-}-Maus und einer Wildtyp-Maus mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. (A und B) Rechte Hemisphäre des Großhirns von Wildtyp und NCBE^{-/-}. (C und D) Kleinhirn von Wildtyp und NCBE^{-/-}. Die Pfeile markieren den vierten Ventrikel. Bei der *Knockout-Maus* schienen die Gehirnventrikel kleiner als beim Wildtyp zu sein. (E und F) Retina von Wildtyp und NCBE^{-/-}. (G und H) CA3-Region des Hippokampus von Wildtyp und NCBE^{-/-}. (I und J) Hilus des Gyrus dentatus von Wildtyp und NCBE^{-/-}. (K und L) Molekularschicht des Kleinhirns von Wildtyp und NCBE^{-/-}. Bildbeschriftung: WT = Wildtyp; KO = NCBE^{-/-}; CO = Cortex; HIP = Hippokampus; SO = Stratum oriens; SP = Stratum pyramidale; SR = Stratum radiens; KS = Körnerschicht; HI = Hilus; MS = Molekularschicht. Größenbalken: A, B, C, D = 1mm, E, F = 30µm, G, H, I, J = 60µm, K, L = 30µm.

Noch deutlicher war das verkleinerte Volumen der Ventrikel in sagittalen Gehirnschnitten zu sehen (siehe Abbildung 3.18).

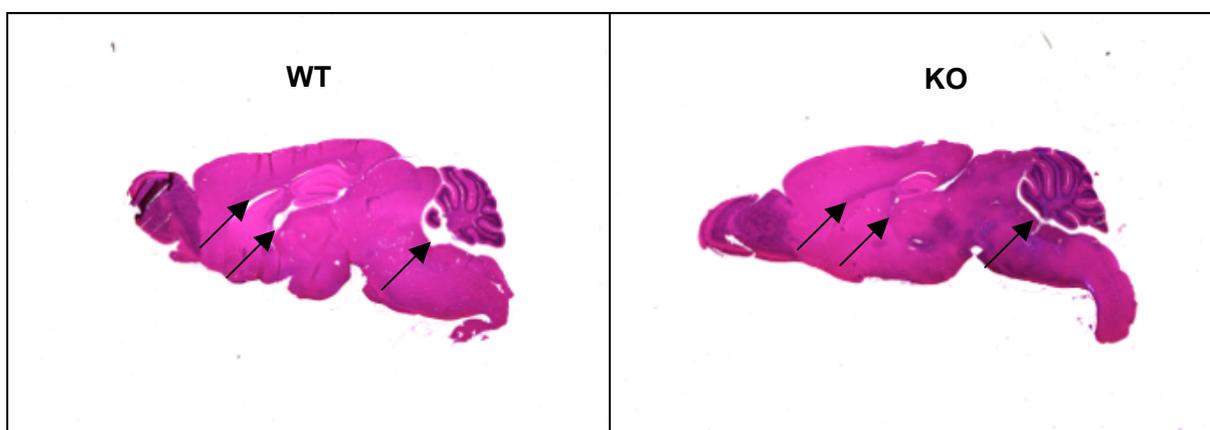


Abbildung 3.18: HE-Färbung 10 µm dicker sagittaler Gehirnschnitte einer drei Monate alten NCBE-*Knockout*-Maus (KO) und einer Wildtyp-Maus (WT). Die Pfeile markieren den lateralen und den vierten Ventrikel. Beim NCBE-*Knockout* waren die Ventrikel kleiner.

Die Ventrikelräume könnten bei der Perfusion der Mäuse (siehe 2.6.1) zusammengefallen oder beim Schneiden zusammengedrückt worden sein. Um Präparationsartefakte auszuschließen wurde in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Jaana Vesterinen (Universität Helsinki, Finnland) eine Kernspinresonanztomographie (NMRI) an NCBE^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Kontrolltieren durchgeführt. Die NMRI der Mausschädel bestätigte *in vivo* die verkleinerten Gehirnventrikel der NCBE-*Knockout*-Mäuse (siehe Abbildung 3.19).

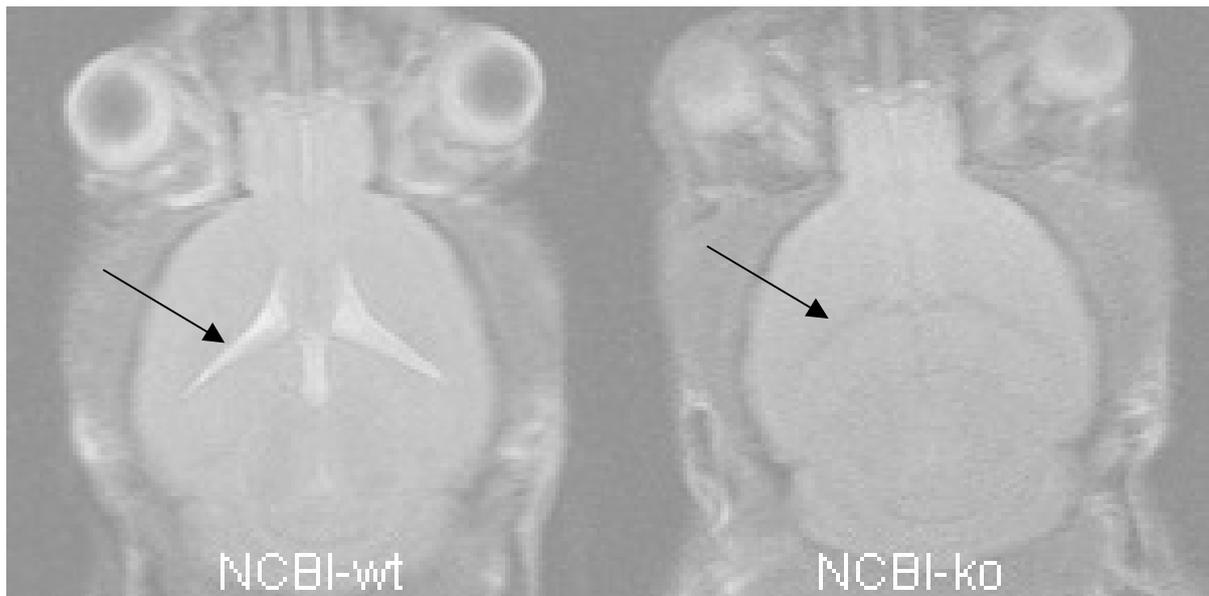


Abbildung 3.19: NMRI des Schädels einer NCBE-defizienten Maus. Die mit Liquor gefüllten Ventrikel erschienen im NMRI als helle Fläche. Beim NCBE-*Knockout* waren im NMRI keine hellen Flächen zu erkennen. Die Ventrikel der NCBE^{-/-}-Mäuse mussten erheblich kleinere Volumina als die Ventrikel der Wildtyp-Mäuse haben. Die Pfeile markieren einen lateralen Ventrikel.

3.6 Verhaltensversuche

Aufgrund der Expression von NCBE in Neuronen und der postsynaptischen Lokalisation (siehe 3.3) wurde bei der NCBE^{-/-}-Maus ein zentralnervöser Phänotyp erwartet, der sich in veränderten Verhaltensmustern widerspiegeln könnte. Durch standardisierte Verhaltensversuche sollten die lokomotorische Aktivität, Bewegungsmuster, einfache motorische Fähigkeiten sowie das Lernvermögen überprüft werden (siehe 2.9).

3.6.1 Aktivitätsbestimmung im „Actimot“-Versuch

Zur Bestimmung einer eventuell veränderten Aktivität der NCBE^{-/-}-Mäuse wurde der „Actimot“-Test durchgeführt (Siehe 2.9.3). Es wurden vier NCBE-*Knockout*-Tiere und sechs Wildtyp-Tiere getestet, die an eine Einzelkäfighaltung gewöhnt waren. Die Aktivitätsmessung erfolgte über elf Tage. Es zeigte sich weder ein signifikanter Unterschied in der Gesamtaktivität noch im Tag-Nacht-Rhythmus der Mäuse beider Genotypen (siehe Abbildung 3.20).

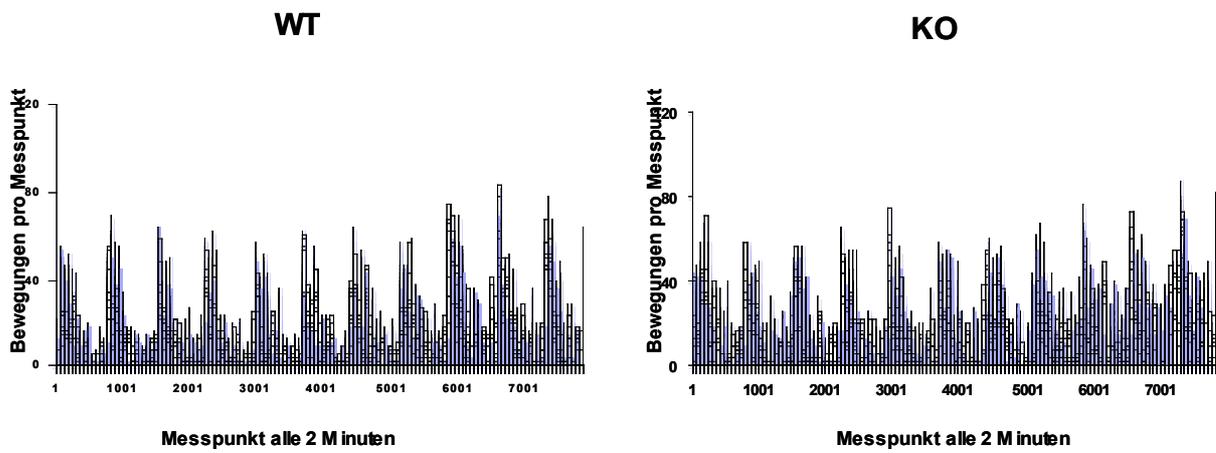


Abbildung 3.20: Aktivitätsmessung der NCBE^{-/-}-Mäuse in gewohnter Umgebung. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Aktivität aufgezeichnet werden. Die Messungen erfolgten durch einen Infrarot-Bewegungsmelder am Käfig. Die Messpunkte hatten ein Intervall von 120 Sekunden. Die Messfrequenz betrug ein Hertz.

3.6.2 Verhalten der NCBE^{-/-}-Mäuse im *Open Field-Test* und *Novel Object-Test*

Im *Open Field-Test* (siehe 2.9.1) wurden 13 männliche NCBE^{-/-}-Mäuse und 13 männliche Wildtyp-Mäuse mit einer unbekanntem Umgebung und anschließend mit einem fremden Objekt (siehe 2.9.2) konfrontiert. Die Versuchstiere zeigten anfangs eine normale Erregung und explorierten die neue Umgebung. Aufgrund von allmählicher Gewöhnung (Habituation) ließ die lokomotorische Aktivität der Wildtyp-Mäuse schnell nach. Auch an den beiden Folgetagen war eine stetige Abnahme des Explorationsverhaltens zu beobachten. Bei den NCBE^{-/-}-Mäusen war dagegen nach 10 Minuten (ab S3) am ersten und am gesamten zweiten Versuchstag eine signifikant ($p < 0,05$) erhöhte lokomotorische Aktivität aufgezeichnet worden, was auf eine langsamere Habituation an die neue Umgebung als bei den Wildtyp-Mäusen schließen ließ. Am dritten Versuchstag waren schließlich auch die NCBE^{-/-}-Mäuse an den *Open Field*-Käfig gewöhnt und die lokomotorische Exploration ging auf das Wildtyp-Niveau zurück (siehe Abbildung 3.21 A).

Nach dem dritten Versuchstag des *Open Field*-Tests wurden die Versuchstiere mit einem unbekanntem Gegenstand konfrontiert, indem eine 50 ml Schraubröhre in das Zentrum des *Open Field*-Käfigs gestellt wurde (*Novel Object*-Test). Die Mäuse beider Genotypen reagierten anfangs mit der Exploration des neuen Gegenstands, die bei den Wildtyp-Mäusen nach wenigen Minuten nachließ. Die NCBE-defizienten Mäuse zeigten erneut eine langsamere Gewöhnung an die neue Situation, was sich wieder nach 10 Minuten (ab S3) in einer höchst signifikant ($p < 0,001$) erhöhten Bewegungsaktivität äußerte (siehe Abbildung 3.21 B).

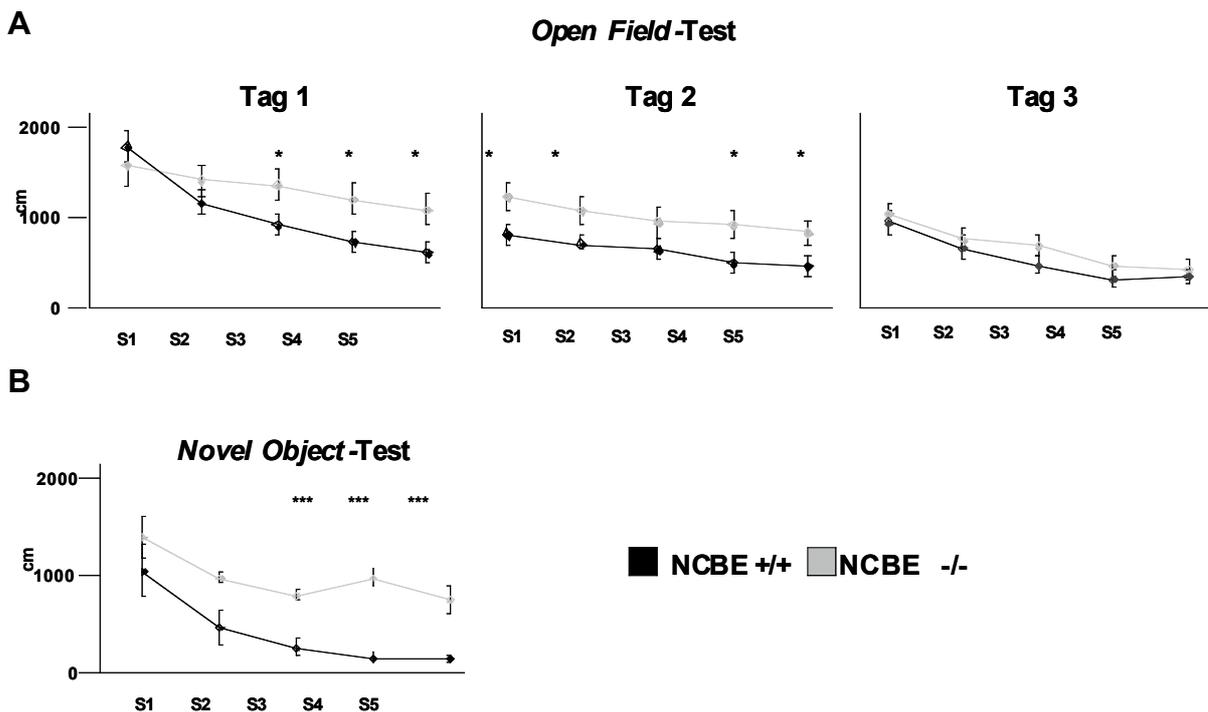


Abbildung 3.21: Lokomotion im *Open Field*-Test (**A**) und im *Novel Object*-Test (**B**). Pro Versuchstag wurden die Mäuse 25 Minuten in die Box gesetzt. Die Versuchsdauer wurde für die Auswertung pro Tag in 5-Minuten-Sitzungen (S1-S5) unterteilt. Die Fehlerbalken geben jeweils den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) wieder. Die statistische Signifikanz wurde mit einem T-test überprüft. $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)).

Ein weiterer untersuchter Parameter war die Aufenthaltsdauer im hell erleuchteten Zentrum der *Open Field*-Box. Mäuse meiden instinktiv die hell erleuchtete freie Fläche, daher deutet eine veränderte Aversion gegen die Zentralzone der *Open Field*-Box auf ein verändertes Angstverhalten der Mäuse hin. NCBE^{-/-}-Mäuse verweilten aber nicht signifikant länger oder kürzer als Wildtyp-Mäuse in der Mitte der Box und zeigten somit kein verändertes Angstverhalten.

3.6.3 Verhalten im *Elevated Plus Maze*

Für das *Elevated Plus Maze* (siehe 2.9.4) wurden dieselben Versuchstiere wie für den *Open Field*-Test verwendet (3.6.2). Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Aufenthaltsdauer auf den „offenen“ Armen oder in der Anzahl der Besuche der „offenen Arme“ im *Elevated Plus Maze* beobachtet werden (siehe Abbildung 3.22). Wie zuvor im *Open Field*-Test wurde bei den NCBE^{-/-}-Mäusen kein gestörtes Angstverhalten festgestellt.

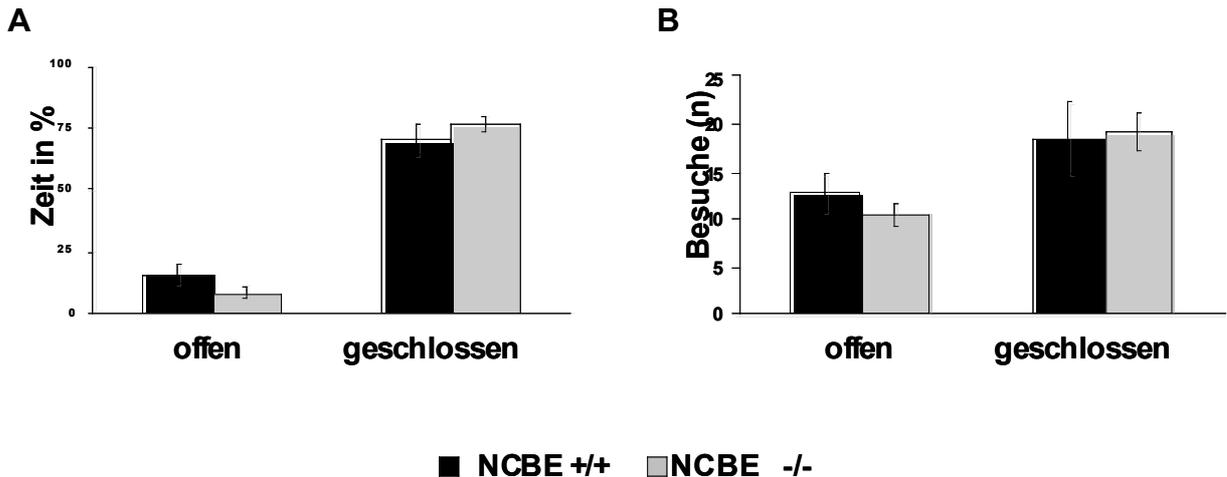


Abbildung 3.22: Verhalten im *Elevated Plus Maze*. **(A)** Mittelwert der Aufenthaltsdauer auf den „Armen“ in Prozent der Gesamtzeit und **(B)** Mittelwert der Anzahl der Besuche auf den „Armen“ des *Elevated Plus Maze*. Die Fehlerbalken geben jeweils den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) wieder. Offen: Die beiden „offenen Arme“; geschlossen: Die mit Wänden umschlossenen Arme.

3.6.4 Verhalten im *Dark-Light-Transitionstest*

Der *Dark-Light-Transitionstest* (siehe 2.9.5) wurde mit 13 männlichen NCBE^{-/-}-Mäusen und 15 männlichen Wildtyp-Geschwistertieren durchgeführt. Die Auswertung ergab eine hoch signifikant ($p < 0,01$) längere Aufenthaltsdauer der NCBE^{-/-}-Mäuse im hell erleuchteten Vorhof der Apparatur (siehe Abbildung 3.23). Im *Open Field*-Test (siehe 3.6.2) und im *Elevated Plus Maze* (siehe 3.6.3) konnte kein gestörtes Angstverhalten der NCBE^{-/-}-Mäuse festgestellt werden. Der signifikante Unterschied zu den Wildtyp-Mäusen im *Dark-Light-Transitionstest* beruhte daher vermutlich auf dem veränderten Explorationsverhalten (siehe *Open Field*-Test 3.6.2) der NCBE^{-/-}-Mäuse und nicht auf einem veränderten Angstverhalten.

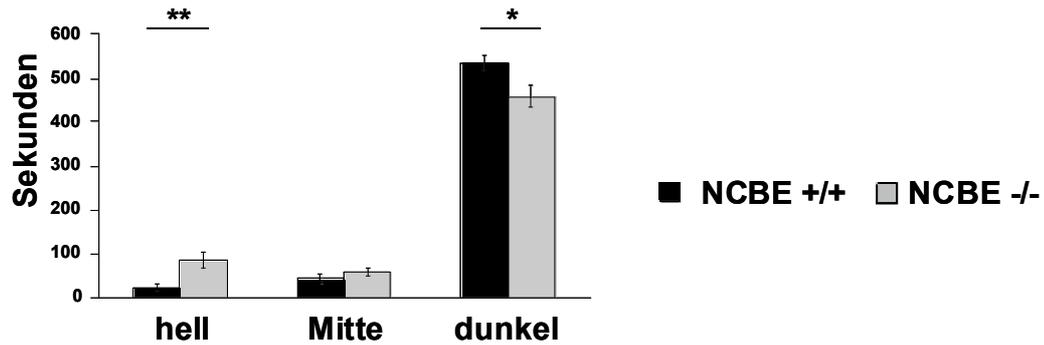


Abbildung 3.23: Statistische Auswertung des *Dark-Light*-Transitionstests. Das Diagramm zeigt die mittlere Verweildauer in den einzelnen Regionen der *Dark-Light*-Box.

Hell: Der hell erleuchtete weiße Vorhof; Mitte: Der Türbereich zwischen dem erleuchteten Vorhof und dem dunklen Gehäuse; dunkel: das unbeleuchtete, überdachte Gehäuse. Die Fehlerbalken geben jeweils den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) wieder. Die statistische Signifikanz wurde mit einem T-test überprüft. $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**).

3.6.5 „Rotarod“-Test

Die NCBE^{-/-}-Mäuse zeigten in den vorherigen Versuchen keine motorischen Auffälligkeiten, aber aufgrund der starken Expression des NCBE im Kleinhirn sollte die motorische Koordination und das motorische Lernen von NCBE^{-/-}-Mäusen im Rotarod-Test (siehe 2.9.7) genauer überprüft werden. Es wurden zehn NCBE-*Knockout*-Mäuse und elf Wildtyp-Geschwister-Tiere getestet. Beim Rotarod-Test war keine unterschiedliche Leistung in der motorischen Koordination zu erkennen. Die Leistung von NCBE^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Mäusen nahm auch in den folgenden Versuchen im gleichen Maße zu (siehe Abbildung 3.24).

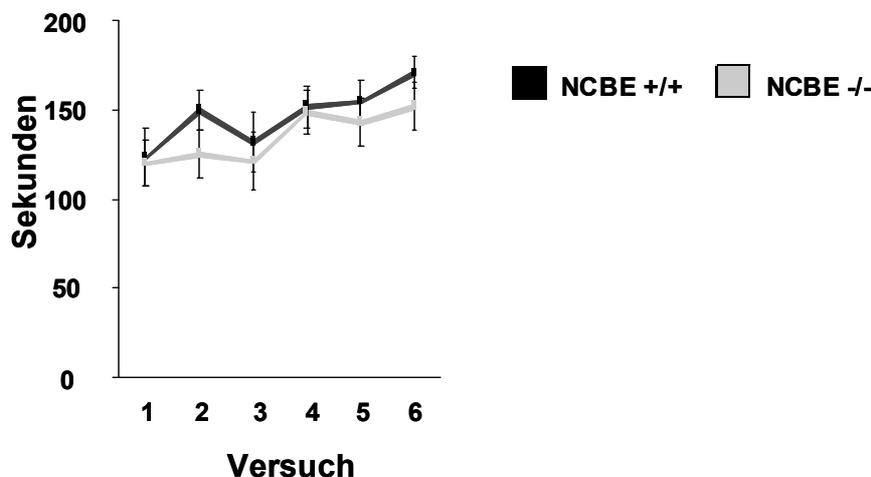


Abbildung 3.24: Statistische Auswertung des Rotarod-Tests. Im Diagramm sind die Mittelwerte der Zeit bis zum Sturz dargestellt. Die Versuche 1 bis 3 fanden am ersten und die Versuche 4 bis 6 am zweiten Versuchstag statt. Die Fehlerbalken geben jeweils den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) wieder.

3.6.6 Hot Plate-Test

Um eventuelle sensorimotorische Defizite der NCBE^{-/-}-Mäuse aufzudecken, wurde der *Hot Plate*-Test ausgewählt (siehe 2.9.6). Die fünf NCBE^{-/-}-Mäuse zeigten normale Verhaltensweisen und hatten auch keine längere Reaktionszeit als die fünf Wildtyp-Kontrolltiere (siehe Abbildung 3.25).

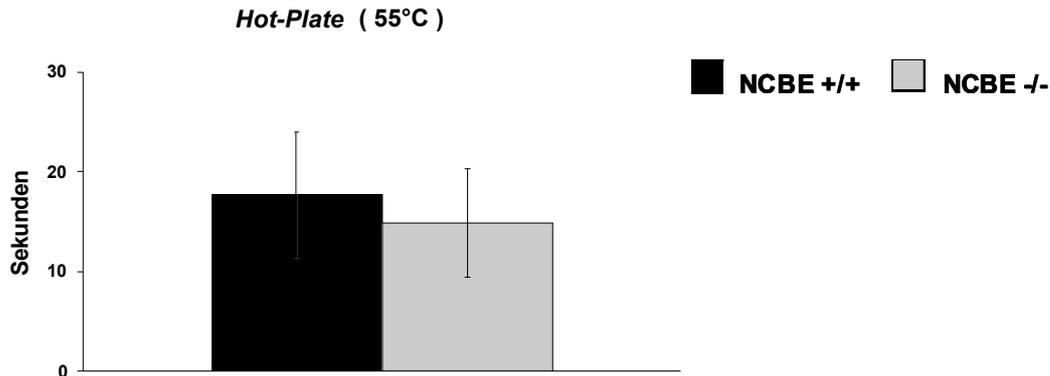


Abbildung 3.25: Statistische Auswertung des *Hot Plate*-Tests. Mittelwert der Reaktionszeit bis zum ersten ruckartigen Wegziehen der Pfoten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

3.6.7 MORRIS Water Maze

Der MORRIS *Water Maze*-Test ist ein Paradigma zur Untersuchung des Hippokampus-abhängigen räumlichen Lernens. Tiere mit einer Läsion im Bereich des Hippokampus sind nicht in der Lage, die Position der versteckten Plattform zu erlernen. Da NCBE im Hippokampus exprimiert wird, sollte das räumliche Lernen der NCBE^{-/-}-Mäuse im MORRIS *Water Maze* geprüft werden (siehe 2.9.8). Dazu wurden 13 männliche NCBE-*Knockout*-Mäuse und 12 Wildtyp-Mäuse gleichen Alters und gleichen Geschlechts ausgewählt. In der Trainingsphase wurden die Versuchstiere drei Tage lang auf die Position der Plattform im vierten Quadranten des Beckens konditioniert. Der Lernerfolg wurde durch die benötigte Zeit bis zur rettenden Plattform definiert. Die Mäuse beider Genotypen zeigten räumliches Lernen, wobei die *Knockout*-Tiere stets länger bis zur Plattform brauchten als die Wildtyp-Mäuse (siehe Abbildung 3.26 A). Der Unterschied war aber nicht statistisch signifikant.

Am vierten Versuchstag wurde die Plattform aus dem Becken entfernt und die Zeit gemessen, die das Versuchstier mit der Suche nach der Plattform im vierten Quadranten des Beckens verbrachte (Testphase). Die Gruppen beider Genotypen zeigten eine starke Konditionierung und suchten im ersten Durchlauf ca. 75 % der Gesamtzeit im vierten Quadranten nach der Plattform. In den weiteren Durchläufen nahm die Konditionierung ab (siehe Abbildung 3.26 B), die NCBE^{-/-}-Mäuse zeigten dabei stets die gleiche Beharrlichkeit

bei der Suche nach der Plattform wie die Wildtyp-Kontrolltiere. Es konnte somit kein Unterschied in der räumlichen Lernleistung von NCBE^{-/-}-Mäusen zu Wildtyp-Mäusen festgestellt werden.

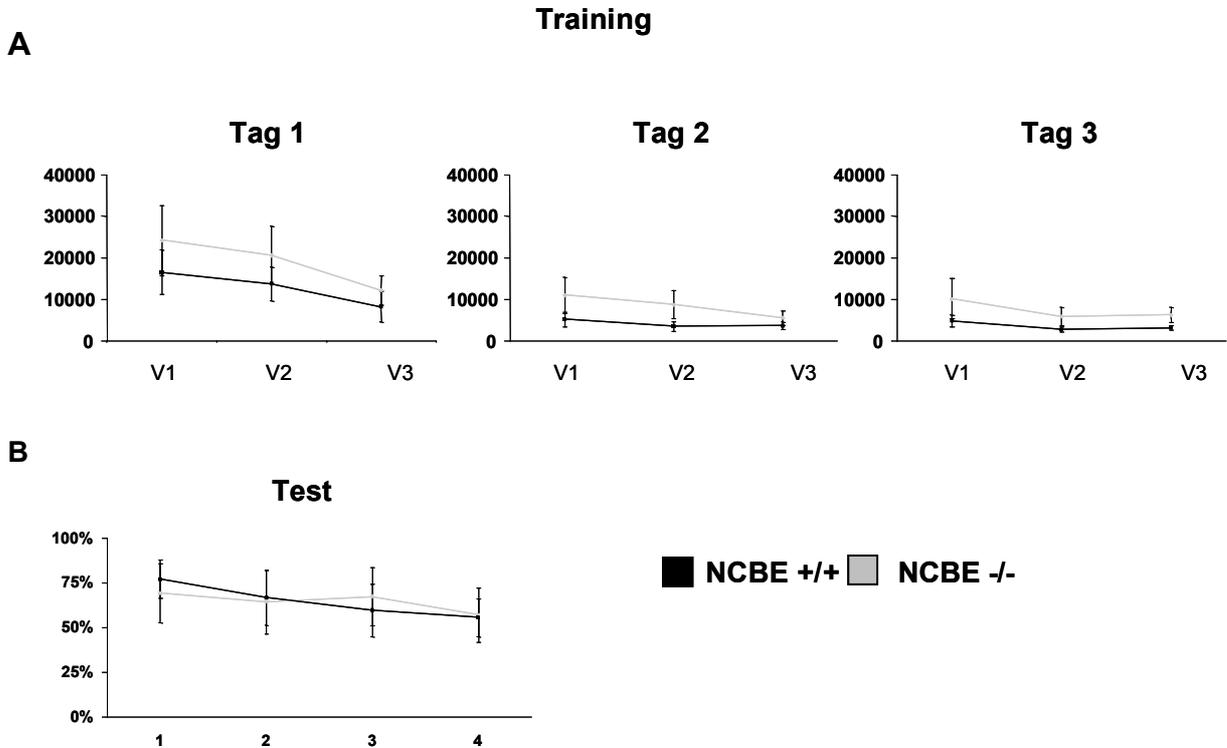


Abbildung 3.26: Statistische Auswertung des MORRIS *Water Maze*. **(A)** Trainingsphase des MORRIS *Water Maze*. In der Trainingsphase wurden die Mäuse pro Versuch von jeder Seite ins Becken gesetzt, so dass vom Versuchstier pro Versuch viermal die Plattform gefunden werden musste. Die Zeit der vier Anläufe pro Versuch wurde für jede Maus gemittelt. Im Diagramm sind die Mittelwerte der drei Versuche (V1 bis V3) pro Tag in Millisekunden dargestellt. **(B)** Mittlere prozentuale Zeit im trainierten Quadranten des Beckens in der Testphase des MORRIS *Water Maze*. Die Mäuse wurden von jeder Seite einmal ins Becken gesetzt (Test 1 bis 4). Die Fehlerbalken geben jeweils den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) wieder.

3.7 Bestimmung der Krampfschwelle

Die intraperitoneale Injektion von Pentylentetrazol (PTZ) und Pilocarpin (siehe 2.10) erbrachte signifikante Unterschiede in der Krampfschwelle zwischen NCBE^{-/-}-Mäusen und den Kontrollen. Die NCBE-defizienten Tiere hatten eine signifikant ($p < 0,05$) geringere Inzidenz für generalisierte klonisch-tonische Anfälle bei 40 und 60 mg/kg PTZ (siehe Abbildung 3.27 A und C). Bei einer Dosis von 40 mg/kg PTZ hatte keine NCBE-*Knockout*-Maus generalisierte tonisch-klonische Anfälle durchlebt, während noch 36,4% der Wildtyp-Kontrolltiere generalisierte Krämpfe entwickelten (siehe Abbildung 3.27 A). Außerdem war bei 40 mg/kg PTZ die Latenz bis zu den ersten myoklonischen Krämpfen bei den NCBE^{-/-}-Tieren

signifikant ($p < 0,05$) erhöht (siehe Abbildung 3.27 B). Bei einer Steigerung der Dosis auf 60 mg/kg PTZ war die Latenz zu sehr verkürzt, so dass kein signifikanter Unterschied mehr festzustellen war (siehe Abbildung 3.27 D). Die Wildtyp-Tiere schienen insgesamt heftiger zu krampfen als NCBE^{-/-}-Tiere. Dieser subjektive Eindruck wurde untermauert durch eine höchst signifikant ($p < 0,001$) verminderte Mortalität der *Knockout*-Tiere bei 60 mg/kg PTZ und eine hoch signifikant ($p < 0,01$) erhöhte Mortalität bei 350 mg/kg Pilocarpin (siehe Abbildung 3.27 E und F). Von insgesamt 16 NCBE-*Knockout*-Mäusen, denen 60 mg/kg PTZ und fünf NCBE-*Knockout*-Mäusen, denen 350 mg/kg Pilocarpin injiziert worden war, war keine Maus verstorben. Die Wildtyp-Mäuse hatten eine Mortalität von 50% bzw. 71,4%. Heterozygote NCBE-*Knockout*-Mäuse unterscheiden sich in der Krampfschwelle nicht von den Kontrolltieren.

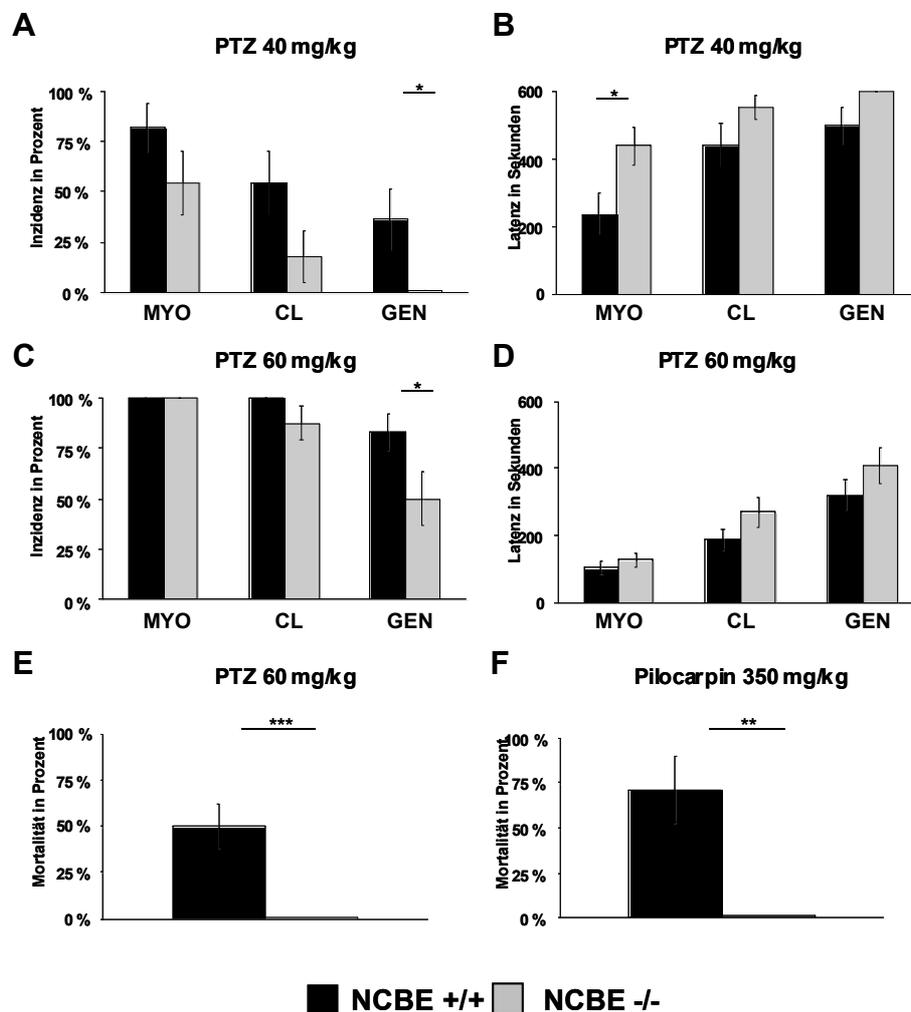


Abbildung 3.27: Krampfschwellenbestimmung der NCBE^{-/-}-Maus. (A) Inzidenz der Krampfstadien bei 40 mg/kg PTZ. (B) Latenz der Krampfstadien bei 40 mg/kg PTZ. (C) Inzidenz der Krampfstadien bei 60 mg/kg PTZ. (D) Latenz der Krampfstadien bei 60 mg/kg PTZ. (E) Mortalität bei 60 mg/kg PTZ. (F) Mortalität bei 350 mg/kg Pilocarpin. In den Diagrammen sind stets die Mittelwerte dargestellt. Die Fehlerbalken geben jeweils den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) wieder. Die statistische Signifikanz wurde mit einem T-test überprüft. $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)

3.8 Expression von Chlorid-Transportern und pH-Regulatoren im NCBE-Knockout

Um eventuelle Kompensationen durch Gene aufzuklären, welche wie NCBE ebenfalls am Chlorid-Transport oder an der pH-Regulation im ZNS beteiligt sind, wurde die Expression dieser Gene im NCBE-Knockout mithilfe der quantitativen Real-Time PCR (siehe 2.3.14) überprüft. Für die untersuchten Gene konnte im Vergleich zum Wildtyp keine veränderte Expression festgestellt werden (siehe Abbildung 3.28). Im NCBE-Knockout wurde im Vergleich zum Wildtyp nur noch 16,9% der NCBE-mRNS nachgewiesen.

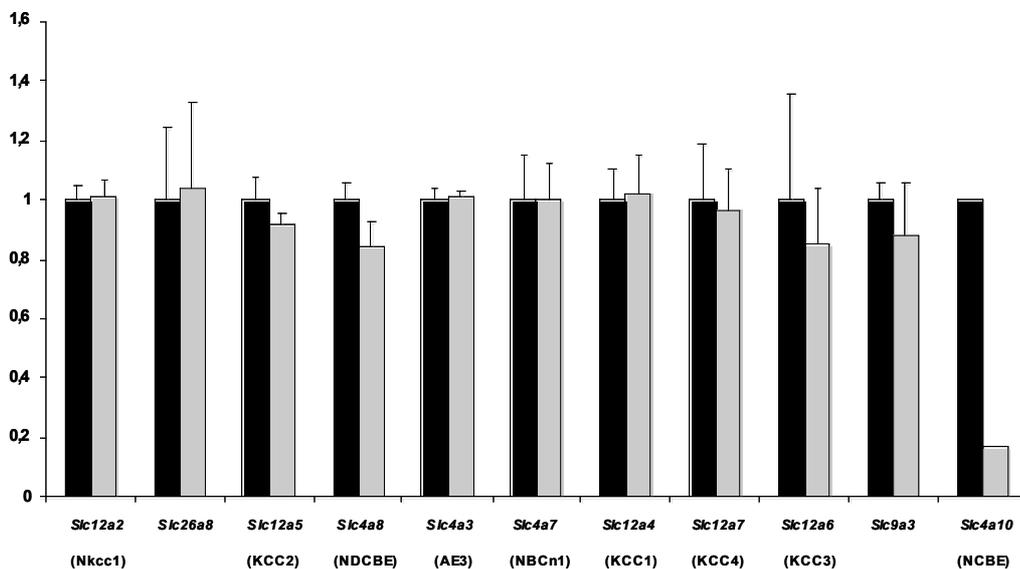


Abbildung 3.28: Expression der Gene im NCBE-Knockout, welche im Chlorid-Transport oder in der pH-Regulation des ZNS involviert sind. Durch die quantitative PCR konnten keine veränderten Expressionslevel in der RNS-Präparation des gesamten NCBE-Knockout-Gehirns festgestellt werden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

3.9 Alternative Spleißvariante des NCBE in *Mus musculus*

Von NCBE sind bei *Rattus norvegicus* zwei alternative Spleißvarianten rb1NCBE (*accession number* AF439856) und rb2NCBE (*accession number* AF439855) beschrieben worden (GIFFARD *et al.*, 2003). Rb1NCBE ist homolog zur veröffentlichten Sequenz (*accession number* NM_033552) von *Mus musculus* mit einem Stop-Codon im Exon 26. Der Spleißvariante rb2NCBE fehlt das Exon 26, so dass ein alternatives Stop-Codon im Exon 27 genutzt wird. Dies führt zu einem längeren Protein, welches am C-Terminus eine PDZ-Domäne enthält. Um aufzuklären, ob diese Spleißvariante auch in *Mus musculus* vorkommt,

wurde von Dr. Ingo Kurth die Maus-cDNS (siehe 2.3.13) des Bereichs um Exon 26 mit den Primern (GTGGATAATCAAAGTTTCGAGAGCTG) und (TCATAGACAAGTCTCCCTGTCA-ACGC) amplifiziert (siehe 2.3.7), in pCR[®]4-TOPO[®] kloniert (siehe 2.3.15) und sequenziert (siehe 2.3.8). In *Mus musculus* konnten beide Spleißvarianten nachgewiesen werden. Abbildung 3.29 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der gefundenen Sequenzen.

NCBE-cDNS-Sequenzen:

CTAAAAGCTCCCCTTCTTAATCACTCTAGAAGCTGATTCCCCAAAGCAAT **NCBE**
CTAAAAGC-----AAT **NCBE+PDZ**

GAAAGCCGAAAGGAGAAGAAAGCTGACTCAGGGAAAGGCGTTGACAGG **NCBE**
GAAAGCCGAAAGGAGAAGAAAGCTGACTCAGGGAAAGGCGTTGACAGG **NCBE+PDZ**

GAGACTTGTCTATGACTTGATCTTCAA **NCBE**
GAGACTTGTCTATTGACTTGATCTTCAA **NCBE+PDZ**

NCBE-Protein-Sequenzen:

SKTAMWGNLLVTADNSKEKESRFPSKSSPS **NCBE**
SKTAMWGNLLVTADNSKEKESRFPSKSNESRKEKKADSGKGVDRETCL **NCBE+PDZ**

Abbildung 3.29: Nukleotid- und Aminosäuresequenz der NCBE-Spleißvarianten von *Mus musculus*. Das Stop-Codon in der NCBE-Sequenz fehlte in der NCBE+PDZ-Sequenz, was zu einer Verlängerung der C-terminalen Aminosäuresequenz um 18 Aminosäuren in der NCBE+PDZ-Spleißvariante führte. Die Extension enthielt eine Protein Kinase C- und eine Caseinkinase 2-Erkennungssequenz (unterstrichen), sowie eine PDZ-Domäne (fett gedruckt). Die Stop-Codons sind fett gedruckt und unterstrichen markiert.

3.10 Intrazelluläre pH-Messung

Bei der optischen Messung des intrazellulären pH-Werts (siehe 2.11) mit dem pH-abhängigen Fluoreszenzfarbstoff BCECF-AM (Molecular Probes, Eugene, USA) konnte an vitalen Gehirnschnitten von NCBE^{-/-}-Mäusen kein veränderter intrazellulärer pH-Wert festgestellt werden. Der Ruhe-pH (*steady state pH*) lag bei den sieben NCBE^{-/-}-Mäusen bei 6,94 ± 0,04 und bei den sieben Wildtyp-Kontrollen bei 6,98 ± 0,04.

Jedoch nach Zugabe von 50 µM 5-(N-Ethyl-N-Isopropyl)-Amilorid (EIPA), welches die schnelle pH-Regulation durch die Natrium-Protonen-Austauscher hemmen sollte und einer drei Minuten lang erzeugten Azidose durch 20 mM NH₄Cl (Ammoniumpuls) erfolgte im

Stratum pyramidale der CA3-Region des Hippokampus in vitalen Hirnschnitten der NCBE-*Knockout*-Mäuse eine signifikant ($p < 0,01$) langsamere Rückregulation des intrazellulären pH zum Normalwert. Abbildung 3.30 A zeigt eine repräsentative Kurve einer pH-Messung von Wildtyp und NCBE-*Knockout* nach einem Ammoniumpuls. Das Diagramm (siehe Abbildung 3.30 B) stellt den Mittelwert der Steigung des pHi nach einem Ammoniumpuls dar. Die Steigung errechnete sich aus der Geschwindigkeit der pHi-Rückregulation ab dem tiefsten pH-Wert der Azidose bis 10 Minuten danach.

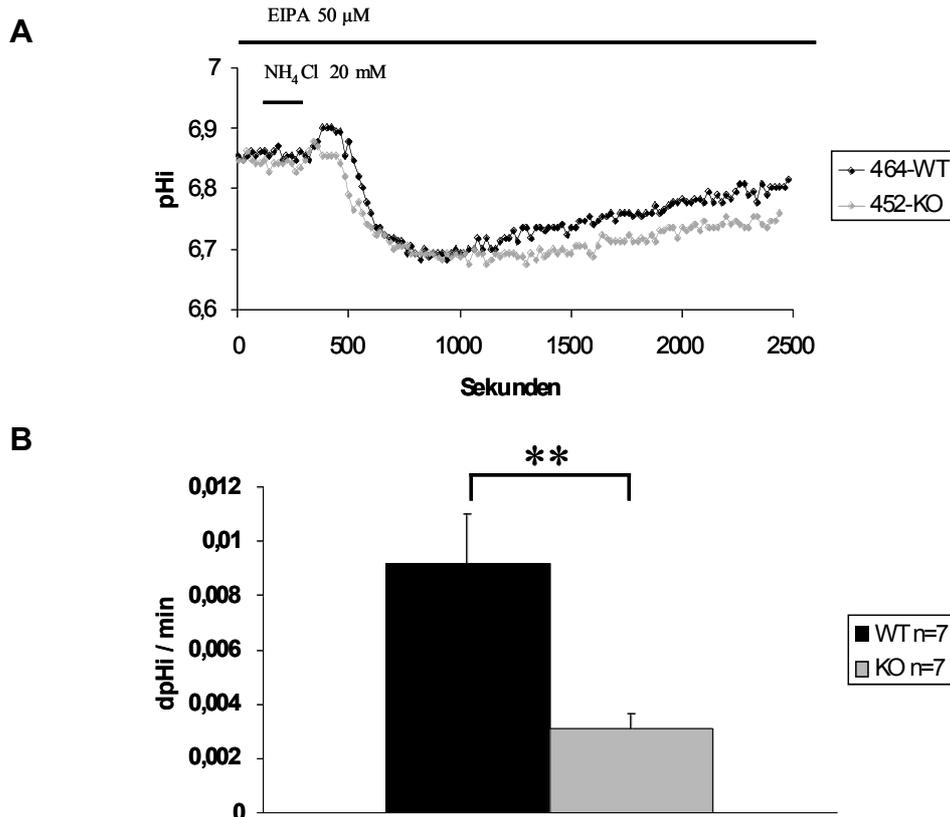


Abbildung 3.30: pHi-Messung in vitalen Hippokampusschnitten. **(A)** Repräsentative Kurve nach einem Ammoniumpuls. Der pHi im *Stratum pyramidale* der NCBE-*Knockout*-Maus wurde langsamer als beim Schnitt des Wildtyp-Kontrolltiers zurückreguliert. **(B)** Diagramm der mittleren Steigung des pHi von sieben NCBE-*Knockout*-Hirnschnitten und sieben Wildtyp-Hirnschnitten nach einem Ammoniumpuls. Während der gesamten Messung wurden 50 µM EIPA hinzugefügt. Die Fehlerbalken geben jeweils den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) wieder. Die statistische Signifikanz wurde mit einem T-test überprüft. $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**).

4 Diskussion

4.1 Die Generierung der NCBE^{-/-}-Maus

Durch die Einführung einer Deletion im NCBE/*Slc4a10*-Gen wurde ein NCBE-defizientes Mausmodell hergestellt. Diese gezielte Genmutation wurde durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen erreicht. Die nachfolgende Injektion der manipulierten ES-Zellen in Blastozysten ergab Keimbahnchimären, die das mutierte Allel an ihre Nachkommen weitergaben. Durch die Verpaarung dieser Tiere wurden homozygot NCBE-defiziente Mäuse erzeugt. Die Auswirkungen der homologen Rekombination wurden in den erzeugten NCBE^{-/-}-Mäusen auf DNS-, RNS- und Protein-Ebene charakterisiert. Die Southern Blot-Analyse der genomischen DNS bestätigte, dass die beabsichtigte homologe Rekombination stattgefunden hatte. Durch Northern Blot- und Western Blot-Analysen konnte die Abwesenheit der NCBE-mRNS und des NCBE-Proteins in den NCBE^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden.

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Mausmodell handelt es sich um einen totalen NCBE-*Knockout*. Die genspezifische Modifikation wurde also weder auf ein bestimmtes Gewebe beschränkt, noch einer zeitlichen Regulierbarkeit unterstellt.

Für eventuell nachfolgende Studien wurde zusätzlich ein konditionaler NCBE-*Knockout* generiert. In diesem konditionalen NCBE-*Knockout*-Mausmodell ist das Exon 12 des *Slc4a10*-Gens, welches im konstitutiven *Knockout* deletiert ist, durch loxP-Sequenzabschnitte flankiert. Mäuse mit einem derart manipulierten *Slc4a10*-Genlocus können mit transgenen Mäusen gekreuzt werden, die ein *Cre*-Rekombinase-Gen unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors tragen. In den gekreuzten Nachkommen würde die gewebespezifisch exprimierte *Cre*-Rekombinase dann das zwischen den loxP-Sequenzen liegende Genfragment deletieren.

NCBE wird im gesamten Zentralnervensystem der Maus schon ab Tag E12,5 der Embryonalentwicklung exprimiert. Die Expression nimmt in der Embryonalentwicklung bis Tag E18,5 zu (HÜBNER *et al.*, 2004). Die konstitutive Inaktivierung des NCBE/*Slc4a10*-Gens im hier erzeugten Modell könnte somit schon zu Auswirkungen in der pränatalen Entwicklung der Mäuse führen. Es konnten aber keine Auffälligkeiten in der embryonalen Entwicklung festgestellt werden. Aus der Verpaarung heterozygoter Tiere gingen homozygote NCBE^{-/-}-Nachkommen entsprechend der MENDELSchen Regeln hervor, bei denen zum Zeitpunkt der Geburt kein offensichtlicher Unterschied im Vergleich zu ihren Geschwistern erkennbar war.

4.2 Die Lokalisation des NCBE

Durch die Arbeiten von WANG *et al.* (2000), GIFFARD *et al.* (2003) und HÜBNER *et al.* (2004) war die Expression des NCBE auf mRNA-Ebene im zentralen und peripheren Nervensystem sowie in nicht neuronalen Geweben wie im *Plexus choroideus*, Dura, Magen, Zwölffingerdarm, Ileum, Hoden und Niere nachgewiesen worden. Auf Proteinebene war bisher nur die Lokalisation des NCBE im *Plexus choroideus* der Ratte (*Rattus norvegicus*; LINNÉ, 1758) und im Menschen beschrieben worden (BOUZINOVA *et al.*, 2005; PRAETORIUS *et al.*, 2003; PRAETORIUS und NIELSEN, 2006).

Durch den generierten anti-NCBE-Antikörper war es möglich die Lokalisation von NCBE durch immunhistochemische Untersuchungen zu analysieren, deren Spezifität durch die vorhandenen NCBE-*Knockout*-Kontrollen überprüft werden konnte. Es konnte kein NCBE-Protein in Magen, Zwölffingerdarm, Ileum und Hoden der Maus nachgewiesen werden. Die vermutete Lokalisation des NCBE in Astrozyten konnte ebenfalls durch Western Blot und Immunhistologie widerlegt werden. Bestätigen konnten wir dagegen die von BOUZINOVA *et al.* beschriebene basolaterale Lokalisation des NCBE im *Plexus choroideus*.

Ferner konnte durch den generierten Antikörper zum ersten Mal die breite Expression des NCBE im Zentralnervensystem durch Immunhistologie gezeigt und näher analysiert werden. So war die Lokalisation des NCBE-Proteins in den Pyramidenzellen des Hippokampus auf die CA3-Region beschränkt zu sein, wogegen Interneurone im gesamten Hippokampus NCBE exprimierten. Im Cortex, Thalamus, Hippokampus, Cerebellum und in der Retina wurde die Lokalisation des NCBE zum einen mit dem Soma von Neuronen und zum anderen mit deren Dendriten assoziiert. Besonders auffällig war die starke Lokalisation von NCBE in der dendritischen Molekularschicht von Hippokampus und Cerebellum, welche nahezu frei von Zellkörpern sind. Durch den anti-NCBE-Antikörper war auch eine elektronenmikroskopische Analyse der Lokalisation des NCBE in Neuronen möglich. Es zeigte sich eine spezifische Lokalisation des NCBE-Proteins in der postsynaptischen Dichte der Dendritenstämme sowie der dendritischen Dornen der Neuronen.

Vom NCBE-Protein der Ratte existieren zwei Spleißvarianten rb1NCBE (*accession number* AF439856) und rb2NCBE (*accession number* AF439855), wovon das rb2NCBE-Protein mit einer C-terminalen PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1)-Domäne endet (GIFFARD *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2006). Die PDZ-Domäne wurde zuerst bei den namensgebenden Proteinen PSD-95, Dlg und ZO-1 identifiziert (HATA *et al.*, 1998). Es handelt sich hierbei um ein Protein-Protein Interaktions-Domäne, über welche der zytosolische C-Terminus von Ionenkanälen und Transport-proteinen gebunden wird (GEE *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 1995; NIETHAMMER *et al.*, 1996). Über Bindungsproteine mit PDZ-Erkennungsmotiv werden unter anderem Transporter in einem Proteinkomplex mit dem Aktin-Zytoskelett verankert. So verbinden das Epithel-

bindungsprotein EBP50 und Ezrin den Natrium-Protonen-Austauscher 3 (NHE3) über PDZ-Domänen mit dem Aktin-Zytoskelett (WEINMANN *et al.*, 2000). Aufgrund einer Kollokalisierung von rb2NCBE mit EBP50 in Zellkultur wird eine ähnliche Interaktion mit dem Zytoskelett auch für das NCBE-Protein in Epithelzellen vermutet (LEE *et al.*, 2006). Immunhistologische Studien der Spleißvarianten rb1NCBE und rb2NCBE im *Plexus choroideus* der Ratte zeigten aber, dass auch die Spleißvariante rb1NCBE ohne PDZ-Domäne an der basolateralen Seite des Epithels lokalisiert ist (PRAETORIUS und NIELSEN, 2006). Die PDZ-Domäne scheint somit nicht für die spezifische Lokalisation des NCBE im *Plexus choroideus* verantwortlich zu sein. Von Gerüstproteinen der postsynaptischen Dichte (z.B. PSD-95 und Shank) ist auch bekannt, dass sie über PDZ-Domänen einen Proteinkomplex bilden, der mit dem Aktin-Zytoskelett der Postsynapse verankert ist (IM *et al.*, 2003; KIM und SHENG, 2004; SHENG und KIM, 2000). Proteine mit PDZ-Domänen und Proteine mit PDZ-Motiven, welche die PDZ-Domänen erkennen, spielen somit eine wichtige Rolle für die synaptische Transmission und die synaptische Plastizität (BREDT, 1998; GARNER *et al.*, 2000; KORNAU *et al.*, 1997).

Es ist uns gelungen, durch Klonierung die NCBE-Spleißvariante mit PDZ-Domäne in der Maus nachzuweisen. Eventuell könnte NCBE mit der PDZ-Domäne über EBP50 oder andere Bindeproteine mit PDZ-Erkennungsmotiv einen Protein-Komplex bilden, welcher NCBE an das Aktin-Zytoskelett der Postsynapse bindet und somit für die für die konzentrierte Lokalisation in der Postsynapse von Neuronen verantwortlich ist.

Der generierte anti-NCBE-Antikörper erkennt ein gemeinsames N-terminales Epitop beider Spleißvarianten von NCBE und ist deshalb kein geeignetes Instrument zur Unterscheidung der Spleißvarianten. Zur Überprüfung der Bedeutung der PDZ-Domäne für die Lokalisation des NCBE *in vivo* müsste zusätzlich ein Antikörper generiert werden, der nur die NCBE-Spleißvariante ohne PDZ-Domäne erkennt.

Die Lokalisation in Neuronen weist auf eine wichtige Rolle des NCBE für die pH-Regulation der postsynaptischen Mikrodomänen von Neuronen hin. Somit könnte der NCBE die Aufrechterhaltung der Neurotransmission beeinflussen, da der korrekte pH-Wert für die synaptische Funktion unablässig ist (CHESLER und KAILA, 1992; KAILA und RANSOM, 1998; CHESLER, 2003). Der natriumabhängige Transport von Chlorid und Bikarbonat durch NCBE könnte ebenfalls wichtig für den Ionenhaushalt der Postsynapse sein.

Die starke Expression des NCBE im *Plexus choroideus* und basolaterale Lokalisation des Proteins deuten zusätzlich auf eine wichtige Funktion von NCBE bei der Liquorproduktion.

4.3 Erscheinungsbild der NCBE^{-/-}-Maus

Mäuse mit einer homozygoten Deletion im *Slc4a10*/NCBE-Gen waren generell lebensfähig und konnten ein normales Lebensalter von bis zu zwei Jahren erreichen. In den ersten Lebenswochen nahmen die NCBE^{-/-}-Tiere im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistern langsamer an Gewicht zu. Einige Tiere verstarben ohne Zufütterung mit Weichfutter. Die Tiere, welche die Krise überstanden, erholten sich jedoch schnell nach dem Absetzen vom Muttertier. Die adulten Tiere zeigten keine offensichtlichen Veränderungen. In Größe, Gewicht und Fertilität unterschieden sie sich nicht von Wildtyp-Mäusen. In rein homozygoten NCBE-*Knockout*-Würfen kam es dagegen in der Gewichtsentwicklung der Jungtiere zu keiner Krise und die Tiere nahmen genauso schnell an Gewicht zu wie Wildtyp-Mäuse aus der gleichen Mauslinie.

Kleinwuchs kann eine Folge mangelhafter Ernährung oder schlechter Gesundheit sein. Für das postnatale Wachstum sind aber auch Wachstumshormone (z. B. Somatotropin) verantwortlich (BINDER und RANKE, 1995). Wegweisend für die Diagnose eines Wachstumshormon-Mangelsyndroms ist eine Konstellation aus normaler Geburtslänge, verminderter Wachstumsgeschwindigkeit, proportioniertem Kleinwuchs sowie retardiertem Knochenalter.

Kleinwuchs in Folge hormoneller Veränderungen hätte einen dauerhaften Einfluss auf die Größe der NCBE^{-/-}-Mäuse und das Gewicht wäre bei adulten Tieren nicht kompensiert. Außerdem schien die Konkurrenz durch Wildtyp-Geschwistertiere Einfluss auf das Wachstum der NCBE^{-/-}-Mäuse zu haben. Daher vermuteten wir Änderungen im Verhalten der juvenilen NCBE^{-/-}-Mäuse als Ursache für das verzögerte Wachstum. Es wurden aber keine Untersuchungen des Hormonspiegels oder Versuche zum Verhalten juveniler NCBE-*Knockout*-Mäuse durchgeführt, so dass der Grund für die langsamere Gewichtszunahme im gemischten Wurf noch nicht aufgeklärt ist.

Die pH-Regulation hat in Neuronen eine zentrale Bedeutung. So entwickelt die NHE1-*Knockout*-Maus, der eine Isoform des Natrium-Protonen-Austauschers fehlt, Epilepsie und eine Neurodegeneration (BELL *et al.*, 1999). Die Wichtigkeit der Slc4-Genfamilie wird außerdem durch schwere Erkrankungen deutlich, welche durch Mutationen in SLC4A-Genen verursacht werden. So führen Mutationen im humanen SLC4A1-Gen zu Hämolyse (CHEIDDE *et al.*, 2003; JAROLIM *et al.*, 1995; KARET *et al.*, 1998; TANPHAICHITR *et al.*, 1998), Mutationen im humanen SLC4A4-Gen verursachen Augenfehlbildungen und Kleinwuchs (IGARASHI *et al.*, 1995) und Veränderungen im *Slc4a7*-Gen haben bei der Maus Blindheit und Taubheit zur Folge (BOK *et al.*, 2003).

Der Verlust der pH-Regulation durch den Chlorid-Bikarbonataustauscher NCBE schien dagegen einen sehr milden Phänotyp zu verursachen, so dass eine Kompensation des

NCBE-Verlustes durch andere Bikarbonat- und/oder Chloridtransporter vermutet wurde. Um eine eventuelle transkriptionelle Regulation durch andere neuronale Transporter zu überprüfen, wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR die Expression im NCBE^{-/-}-Gehirn von bekannten Bikarbonat- und Chloridtransportern überprüft. Zu den untersuchten Genen gehörten die Chlorid-Bikarbonataustauscher *Slc4a3*, *Slc4a4*, *Slc4a7*, *Slc4a8* und *Slc26a8*, der Natrium-Protonen-Austauscher *Slc9a3* sowie die Kalium-Chlorid-Kotransporter *Slc12a2*, *Slc12a4*, *Slc12a5*, *Slc12a6* und *Slc12a7*. Bei den untersuchten Genen konnte keine höhere oder niedrigere Expression im Gehirn der NCBE^{-/-}-Maus festgestellt werden, so dass eine Kompensation des Ionentransports durch einen veränderten Expressionslevel dieser Gene ausgeschlossen werden konnte.

Eine mögliche teilweise Kompensation der NCBE-Defizienz könnte aber auch auf eine veränderte Transporteraktivität zurückgeführt werden. *Slc4a8*/NDCBE ist sehr homolog zum *Slc4a10*/NCBE und auch ein natriumabhängiger Anionenaustauscher. Nicht veröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe von KOUGIOUMTZES *et al.* zeigen bei der Maus ein dem NCBE ähnliches Expressionsmuster von NDCBE im Gehirn und legen daher eine Kompensation der NCBE-Defizienz durch NDCBE nahe.

Die Herstellung eines Doppel-*Knockout* durch Kreuzung von NCBE^{-/-}-Mäusen mit NDCBE^{-/-}-Mäusen würde die Kompensation durch den NDCBE eliminieren und könnte weiter zur Aufklärung der physiologischen Bedeutung der neuronalen pH-Regulation beitragen.

Hierzu steht von KOUGIOUMTZES *et al.* eine NDCBE^{-/-}-Mauslinie zur Verfügung.

4.4 Morphologie des NCBE^{-/-}-Gehirns

Die histologische Analyse der Gehirne von drei bis sechs Monate alten NCBE^{-/-}-Mäusen ergab keine morphologischen Auffälligkeiten oder Neurodegenerationen. Auffallend waren jedoch stark verkleinerte Volumina der Hirnventrikel. Diese Vermutung konnte durch eine Kernspintomographie auch an lebenden NCBE^{-/-}-Mäusen bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung für die kleineren Ventrikel könnte ein verminderter Liquordruck sein.

Aufgrund der hohen Expression von NCBE im *Plexus choroideus* wurde schon eine Beteiligung des NCBE an der Liquorproduktion vermutet (BOUZINOVA *et al.*, 2005; PRAETORIUS und NIELSEN, 2006). Unsere immunhistologischen Untersuchungen bestätigten die basolaterale Lokalisation von NCBE im *Plexus choroideus* bei der Maus. Ferner konnten BOUZINOVA *et al.* 2005 zeigen, dass die natriumabhängige Bikarbonatzunahme im Epithel des *Plexus choroideus* durch 4,4'-Diisothiocyanat-stilben-2,2'-disulfonsäure (DIDS), ein Inhibitor für Chlorid-Bikarbonataustauscher wie der NCBE, gehemmt wird. Der Verlust des NCBE im *Plexus choroideus* hätte somit wahrscheinlich zur Folge, dass der

natriumabhängige Bikarbonattransport vom Blut in die Epithelzellen des *Plexus choroideus* gestört sein könnte, was wiederum die Sekretion von Liquor in die Ventrikel verringern würde. Abbildung 4.1 zeigt das von BOUZINOVA *et al.* publizierte Modell zur Liquorproduktion des *Plexus choroideus*.

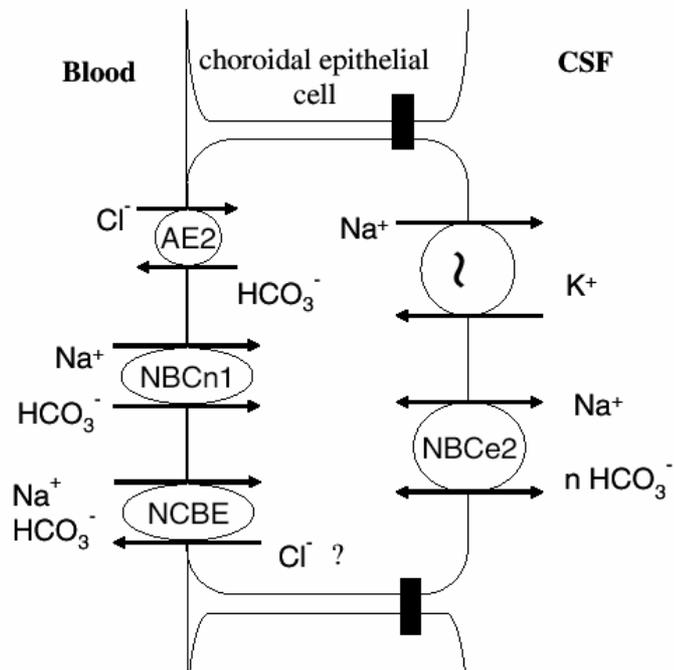


Abbildung 4.1: Modell zur Liquorproduktion von BOUZINOVA *et al.* (2005). Der NCBE ist basolateral lokalisiert und am natriumabhängigen Bikarbonattransport vom Blut ins Epithel beteiligt. Natrium und Bikarbonat werden wiederum durch den NBCe2 und der Na^+/K^+ -ATPase in die Gehirnventrikel transportiert. Das Wasser folgt dem osmotischen Gradienten passiv nach.

Der Liquor füllt alle Hohlräume des Gehirns aus. Damit schützt der Liquor das Gehirn vor Stößen und Erschütterungen. Außerdem enthält der Liquor wichtige Nährstoffe, womit er zur normalen Gehirnfunktion beiträgt (Ransom, 2005).

Nach einer Rückenmarkspunktion kann es bei Patienten zum Liquorunterdruck-Syndrom kommen. Die Patienten klagen über Symptome wie Übelkeit und starke, lageabhängige Kopfschmerzen. Ebenso können Verletzungen der Dura zum Liquorverlust und damit zur spontanen intrakraniellen Hypotension führen. Die Symptome des Syndroms zeigen die Wichtigkeit des korrekten Liquordrucks für das Wohlbefinden. Bei den bekannten Ursachen für das Liquorunterdruck-Syndrom handelt es sich aber meistens um Verletzungen der Dura. Zustände verminderter Liquorproduktion oder erhöhter Liquorabsorption als Ursachen für eine intrakranielle Hypotension sind eher spekulativ und sicher sehr selten. Bisher sind auch keine genetischen Faktoren für Liquorunterdruck beschrieben worden, und es wird vermutet,

dass es beim Menschen keine genetischen Faktoren für das Liquorunterdruck-Syndrom gibt (FISHMAN, 1994).

Um eine mögliche Ursache für die verkleinerten Hirnventrikel aufzuklären, stehen daher noch Messungen der Transportrate von Epithelzellen des *Plexus choroideus* von NCBE^{-/-}-Mäusen aus. Dazu könnten Epithelzellen des *Plexus choroideus* NCBE-defizienter Mäuse kultiviert werden und die Bikarbonat-Aufnahme der Zellen durch intrazelluläre pH-Messung mit dem pH-sensitiven Farbstoff BCECF indirekt bestimmt werden (BOUZINOVA *et al.*, 2005).

Die morphologische Untersuchungen sind noch nicht abgeschlossen. Eine gestörte pH-Regulation könnte starke Azidosen oder Alkalosen hervorrufen, wodurch Zellen geschädigt werden könnten. So verursacht der Verlust des Natrium-Protonen-Austauschers NHE1 in der Maus eine Neurodegeneration. Bei sechs Monate alten NCBE^{-/-}-Mäusen konnte bisher keine Neurodegeneration beobachtet werden. Es ist denkbar, dass eine Neurodegeneration erst bei älteren Tieren auftritt. Aus diesem Grund sollten, sobald ausreichend Mäuse zur Verfügung stehen, noch histologische Untersuchungen an 18 bis 24 Monate alten NCBE^{-/-}-Mäusen durchgeführt werden.

4.5 Verhalten der NCBE^{-/-}-Mäuse

Verhaltensversuche hängen von vielen Faktoren ab. So sollten alle Versuchstiere unter den gleichen Bedingungen gehalten werden. Ein weiterer wichtiger Faktor ist der genetische Hintergrund. Zum Beispiel schneiden Mäuse vom Stamm Sv129 im MORRIS *Water Maze*-Test schlechter ab als C57/Bl6-Mäuse (CRAWLEY *et al.*, 1997). Als Standard bei Verhaltensversuchen gilt es Geschwisterpaare zu verwenden. Dies ist besonders wichtig, wenn die Mauslinie noch nicht ausreichend zurückgekreuzt wurde. Die Rückkreuzung der NCBE-defizienten Mäuse auf C57/Bl6 befand sich zum Zeitpunkt der Versuche in der dritten Generation. Von einem reinen Hintergrund geht man ab der zehnten Generation der Rückkreuzung aus (MARKEL *et al.*, 1997).

Aufgrund der neuronalen Expression des NCBE wurde das Verhalten der NCBE^{-/-}-Mäuse in einer Reihe von basalen Standardtests für *Knockout*-Mauslinien zum Angst- und Lernverhalten durchgeführt. Die Standardtests setzen normale sensorische Fähigkeiten voraus. Wegen der Expression von NCBE in der Retina konnte aber eine Blindheit bei NCBE^{-/-}-Mäusen nicht ausgeschlossen werden, da Bikarbonattransporter für die Sehfähigkeit eine Rolle spielen. So führt eine Mutation des Bikarbonattransporters SLC4A4/NBCE1 beim Menschen zu Augenfehlbildungen (IGARASHI *et al.*, 1999). Daher wurde vor den

Verhaltenstests die Sehfähigkeit einiger NCBE^{-/-}-Mäuse durch Elektroretinogramme überprüft. Dadurch konnte eine Fehlinterpretation der Verhaltensversuche durch eine eventuelle Blindheit der NCBE^{-/-}-Mäuse ausgeschlossen werden.

Zu den Standardtests gehörten Verhaltenstests wie der Actimot-Test, in dem die lokomotorische Grundaktivität der NCBE^{-/-}-Mäuse getestet werden sollte. Mit dem *Open Field*-Test, dem *Novel Object Exploration*-Test, dem *Elevated Plus Maze*-Test und dem *Dark-Light*-Transitionstest wurde das explorative Verhalten der NCBE^{-/-}-Mäuse untersucht. Außerdem können durch diese Versuche Unterschiede im Angstverhalten der Mäuse aufgedeckt werden. Mit dem *MORRIS Water Maze*-Test wurde die Fähigkeit der Mäuse getestet, sich anhand des Raumes zu orientieren. Der Test kann ebenfalls einen Hinweis auf Veränderungen des Hippokampus und damit auf Lerndefizite geben. Aufgrund der starken Expression im Kleinhirn sollte durch den Rotarod-Test auch die motorischen Fähigkeiten der NCBE^{-/-}-Mäuse geprüft werden. Mit dem *Hot Plate*-Test wurde die sensorimotorische Leistung der NCBE^{-/-}-Mäuse kontrolliert.

Im *Open Field*-Test, im *Novel Object*-Test und im *Dark-Light*-Transitionstest zeigten die NCBE^{-/-}-Mäuse ein signifikant längeres Explorationsverhalten als die Wildtyp-Geschwister-tiere, was auf eine langsamere Habituation der *Knockout*-Mäuse schließen ließ. Den Begriff der Habituation führte THORPE 1944 in die verhaltensbiologische Terminologie ein und beschrieb damit eine Aktivität des Zentralnervensystems, die dazu führt, dass angeborene Antworten auf andauernde, schwache Reize abnehmen. Die Habituation stellt somit ein Lernprozess dar, auf bestimmte Reize nicht mehr „unnützlich“ zu reagieren, da der Stimulus keine relevante Bedeutung hat. Im *Open Field*-Test wird der Reiz durch die unbekannte Umgebung ausgelöst, der bei der Maus Explorationsverhalten auslöst. Das Explorationsverhalten äußert sich zum Teil in lokomotorischer Aktivität, die im *Open Field*-Test protokolliert wurde. Bei den NCBE^{-/-}-Mäusen dauerte die lokomotorische Aktivität länger an als bei den Wildtyp-Kontrolltieren. Am dritten Versuchstag waren die Mäuse beider Genotypen an den *Open Field*-Käfig habituiert, so dass nach der letzten Messung des *Open Field*-Tests der *Novel Object*-Test beginnen konnte. Hierzu wurde eine 50 ml Schraubrohre in das Zentrum der *Open Field*-Box gestellt, welche für die Mäuse einen erneuten Reiz darstellte und erneutes Explorationsverhalten bei den Versuchstieren beider Genotypen auslöste. Bei den NCBE^{-/-}-Mäusen setzte die Habituation aber wieder signifikant später als bei den Wildtyp-Kontrolltieren ein. Die vermehrte lokomotorische Aktivität der NCBE^{-/-}-Mäuse im *Dark-Light*-Transitionstest kann ebenfalls auf eine längere Habituationszeit als bei den Wildtyp-Mäusen zurückgeführt werden.

Im *MORRIS Water Maze*-Test war zwar kein signifikanter Unterschied im Lernverhalten von NCBE^{-/-}-Mäusen zu den Wildtyp-Kontrolltieren zu erkennen, die *Knockout*-Mäuse benötigten

aber stets mehr Zeit als die Wildtyp-Mäuse, um die versteckte Plattform im Wasserbecken zu finden.

Ratten, denen der Hippokampus entfernt oder zerstört worden war, zeigten keine Habituation im *Open Field*-Test. (COUTUREAU *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 1970) und neigten zu Hyperaktivität. Es existieren auch Mausmodelle wie die *UbCK-Knockout*-Maus und die *Kreatin-Kinase B-Knockout*-Maus, welche eine langsamere Habituation an fremde Umgebungen und schlechteres Lernverhalten im *MORRIS Water Maze* demonstrieren. Die Mäuse haben vermutlich wegen Energiemangels eine schlechtere Neurotransmission und eine daraus resultierende Veränderung der Morphologie im Hippokampus mit verbreiterten Moosfasern der Körnerzellen des *Gyrus dentatus* (JOST *et al.*, 2002; STREIJGER *et al.*, 2004).

Die längere Habituationszeit der *NCBE^{-/-}*-Mäuse an fremde Reize kann möglicherweise auf ein schlechteres nicht assoziatives Lernvermögen zurückgeführt werden. Der Unterschied im *MORRIS Water Maze* war nicht signifikant, deutete aber auf ein schlechteres Lernvermögen der *NCBE-Knockout*-Mäuse hin. Die *NCBE^{-/-}*-Mäuse demonstrierten in den Verhaltenstests ein langsames hippocampales Lernvermögen als Wildtyp-Mäuse, entwickelten aber ein räumliches Gedächtnis.

4.6 Neuronale Erregbarkeit NCBE-defizienter Mäuse

Es wird vermutet, dass eine veränderte pH-Regulation in Neuronen zu Epilepsie führen kann. So verursacht der spontane Verlust des Natrium-Protonen-Austauscher NHE1 bei der Maus Epilepsie (BELL *et al.*, 1999) und eine Defizienz des Chlorid-Bikarbonat-Austauschers AE3 bei der Maus eine erhöhte neuronale Erregbarkeit, welche die *AE3-Knockout*-Mäuse anfälliger für konvulsive Substanzen macht (HENTSCHKE *et al.*, 2006). Beim Menschen liegt das *SLC4a3/AE3*-Gen auf einem bekannten Locus für idiopathische Epilepsie (SANDER *et al.*, 2000). Ferner konnte ein Polymorphismus im humanen *SLC4A3/AE3*-Gen mit idiopathischer generalisierter Epilepsie assoziiert werden, welcher zu einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Aspartatsäure an der Position 867 im kodierenden Bereich des *SLC4A3/AE3*-Gens führt (SANDER, 2002).

Die oben genannten Veröffentlichungen und ein beschriebener Epilepsie-Locus, welcher das humane *SLC4A10/NCBE*-Gen beinhaltet (LOPES-CENDES *et al.*, 2000), legten nahe, dass auch *NCBE* eine Rolle für idiopathische Epilepsie spielen könnte. Spontane Krampfanfälle wurden bei *NCBE^{-/-}*-Mäusen nicht beobachtet. Um die zerebrale Krampfbereitschaft der *NCBE^{-/-}*-Mäuse zu untersuchen, wurde daher die Krampfschwelle durch die epileptogenen Substanzen Pentylentetrazol (PTZ) und Pilocarpin bestimmt.

PTZ induziert in vielen Bereichen des Zentralnervensystems epileptische Aktivität (PURPURA *et al.*, 1972; SPECKMANN, 1986) und wurde daher in der Epilepsieforschung oft als Substanz zur Auslösung von Epilepsie verwendet (PURPURA *et al.*, 1972; SPECKMANN, 1986; WHITE *et al.*, 1995). Weiterhin gibt es standardisierte Testverfahren zum Nachweis antiepileptisch wirksamer Pharmaka, in denen epileptische Aktivität durch PTZ ausgelöst wird (LEVY *et al.*, 2002; WHITE *et al.*, 1995).

PTZ wird vielfach als γ -Aminobuttersäure (GABA)-Antagonist betrachtet (DELGADO-ESCUATA *et al.*, 1999). MICHOLSON und LOTHMANN entdeckten 1992, dass PTZ auch in einem sehr frühen Entwicklungsstadium des Nervensystems der Ratte (*Rattus norvegicus*) epileptische Aktivität induzieren kann, obwohl in diesem Entwicklungsstadium GABA paradoxerweise exzitatorisch wirkt (HÜBNER *et al.*, 2001). Ein GABA-Antagonist müsste in diesem Fall aber eine Inhibition bewirken. PTZ kann also nicht lediglich als GABA-Antagonist wirken, sondern scheint in allen Entwicklungsstadien hemmende synaptische Potentiale auf bisher nicht verstandene Weise zu unterdrücken und so zu epileptischen Aktivitäten zu führen.

Zur Kontrolle der PTZ-Daten wurden mittels des Cholinergikums Pilocarpin Krämpfe bei NCBE^{-/-}-Mäusen induziert. Das Pilocarpin-Modell ist ein in der Epilepsieforschung sehr häufig verwendetes Tiermodell, da es die Untersuchung der klinischen, morphologischen und physiologischen Grundlagen sowohl des epileptischen Einzelanfalls und *Status epilepticus*, als auch in der Entstehung eines chronischen Anfallsleidens ermöglicht. Im Tiermodell vermitteln M1-Muskarin-Rezeptoren die konvulsive Wirkung des Pilocarpins. Cholinerge Mechanismen sind für die Krampfinduktion relevant. So geht die Entwicklung der epileptischen Aktivität mit einer Freisetzung von Acetylcholin im Cortex und Hippokampus einher (WASTERLAIN *et al.*, 1986). Im Liquor von Patienten mit häufigen epileptischen Anfällen konnten erhöhte Acetylcholin-Konzentrationen nachgewiesen werden. Dagegen können Antagonisten des Acetylcholins die Entstehung von Krampfanfällen verhindern. (WANG *et al.*, 2005). Acetylcholin verstärkt die NMDA-Rezeptor-vermittelten Ionenströme und scheint während des Anfalls die Wirkung des Glutamats zu verstärken, welches für die Dauerdepolarisierung von Neuronen während des epileptischen Anfalls verantwortlich ist.

Das Pilocarpin-Modell beruht somit auf einem anderen Wirkungsmechanismus als das PTZ-Modell und eignete sich damit als Kontrolle zur Bestimmung der Krampfschwelle bei NCBE^{-/-}-Mäusen.

Mit PTZ sowie mit Pilocarpin konnte bei den NCBE^{-/-}-Mäusen eine höhere Krampfschwelle als bei den Wildtyp-Geschwistertieren festgestellt werden. Bei den NCBE^{-/-}-Mäusen war nicht nur die Latenz bis zum epileptischen Anfall erhöht, sondern bei der eingesetzten Dosis von PTZ oder Pilocarpin trat kein Todesfall auf, während 50 % bzw. 71,4 % der Wildtyp-kontrolltiere durch generalisiert klonisch-tonische Anfälle verstarben.

4.7 Mögliche Ursachen einer erhöhten Krampfschwelle bei NCBE^{-/-}-Mäusen

Der GABA_A-Rezeptor ist ein ligandengesteuerter Kanal, welcher für Anionen durchlässig ist. Unter physiologischen Bedingungen handelt es sich dabei um Chlorid und Bikarbonat (KAILA, 1994). Die Bikarbonatkonzentration ist intrazellulär höher als extrazellulär, so dass die Öffnung des GABA_A-Rezeptors ein Ausstrom von Bikarbonat zur Folge hat, während Chlorid in die Zelle strömt (KAILA und VOIPIO, 1987; KAILA *et al.*, 1992). Die postsynaptische GABA-Antwort beruht somit auf einer Differenz von Ein- und Ausstrom von Anionen (siehe Abbildung 4.2).

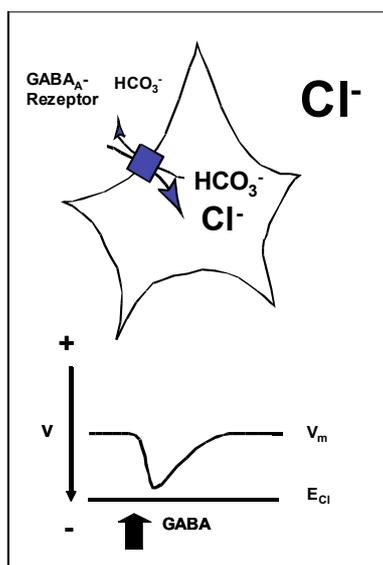


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der postsynaptischen GABA-Antwort. Es kommt zu einem gradientenabhängigen Ein- oder Ausstrom von Chlorid und Bikarbonat. Die postsynaptische Polarisation ergibt sich aus der Differenz der Anionenbewegung.

Der natriumabhängige Chlorid-Bikarbonataustauscher NCBE transportiert Bikarbonat in die Zelle. Bei Hemmung oder Verlust des NCBE könnte die intrazelluläre Bikarbonatkonzentration leicht erhöht sein. Die GABA-Antwort hätte somit einen geringeren Bikarbonatausstrom und damit eine höhere postsynaptische Hyperpolarisation zur Folge. Gerade in Mikrodomänen, wie z.B. in den dendritischen Dornen, wo der NCBE lokalisiert ist, könnte dieser Effekt noch verstärkt sein.

Viele Arbeiten haben an hippocampalen Gehirnschnitten gezeigt, dass die postsynaptische Antwort nach Stimulation des GABA_A-Rezeptors paradoxerweise depolarisierend statt hyperpolarisierend sein kann (ALGER und NICOLL, 1982; AVOLI und PERREAULT, 1987; BENARI *et al.*, 1989; GROVER *et al.*, 1993; LAMSA und KAILA, 1997; STALEY und MODY, 1992; STALEY *et al.*, 1995; TAIRA *et al.*, 1997; XIE und SMART, 1991). Es wird vermutet, dass es bei starker neuronaler Aktivität zum Zusammenbruch des Chloridgradienten kommen kann und kein hyperpolarisierender Chlorideinstrom in die Postsynapse erfolgen würde, während der fortwährende Bikarbonatausstrom durch den GABA_A-Rezeptor die Postsynapse depolarisieren würde. Eine GABAerge Depolarisation hätte im Hippokampus eine lang

andauernde Exzitation und Synchronisation der Pyramidenzellen zur Folge (STALEY *et al.*, 1995; TAIRA *et al.*, 1997), welche vielleicht eine Ursache für epileptiforme Aktivität sein könnte (AVOLI *et al.*, 1996; HIGASHIMA *et al.*, 1996; LOUVEL *et al.*, 1994; TAIRA *et al.*, 1995). Eine erniedrigte intrazelluläre Bikarbonatkonzentration hätte wahrscheinlich eine niedrigere GABAerge Depolarisation bei epileptischer Aktivität zur Folge (siehe Abbildung 4.3). Die erhöhte Krampfschwelle der NCBE^{-/-}-Mäuse könnte somit auf eine erniedrigte postsynaptische Bikarbonatkonzentration beruhen.

Die Bedeutung der intrazellulären Bikarbonatkonzentration für die GABAerge Depolarisation wird durch die Aktivität der Carboanhydrase VII (CA VII) deutlich. CA VII katalysiert in Neuronen die Reaktion von H₂O und CO₂ zu Bikarbonat und trägt dadurch entscheidend zur intrazellulären Bikarbonatkonzentration bei. So können in der CA1-Region des Hippokampus einer Ratte erst mit Beginn der CA VII-Expression ab dem 12. postnatalen Tag typische Bikarbonat-abhängige GABAerge Depolarisationen nach hochfrequenter Stimulation abgeleitet werden (RIVERA *et al.*, 2005; RUUSUVUORI *et al.*, 2004). Carboanhydrase-Hemmern unterdrücken dagegen die epileptische Aktivität (VULLO *et al.*, 2004). Ferner ist bei der *Slc4a3/AE3-Knockout*-Maus eine erniedrigte Krampfschwelle festgestellt worden (HENTSCHKE *et al.*, 2006). Der Anionenaustauscher 3 (AE3) transportiert unter physiologischen Bedingungen Bikarbonat aus der Zelle und ist daher möglicherweise ein Gegenspieler des NCBE. Die erniedrigte Krampfschwelle der AE3-*Knockout*-Maus könnte somit auf eine erhöhte intrazelluläre Bikarbonatkonzentration beruhen (HENTSCHKE *et al.*, 2006). Allerdings gibt es bisher keine histologische Untersuchung zur Lokalisation von AE3.

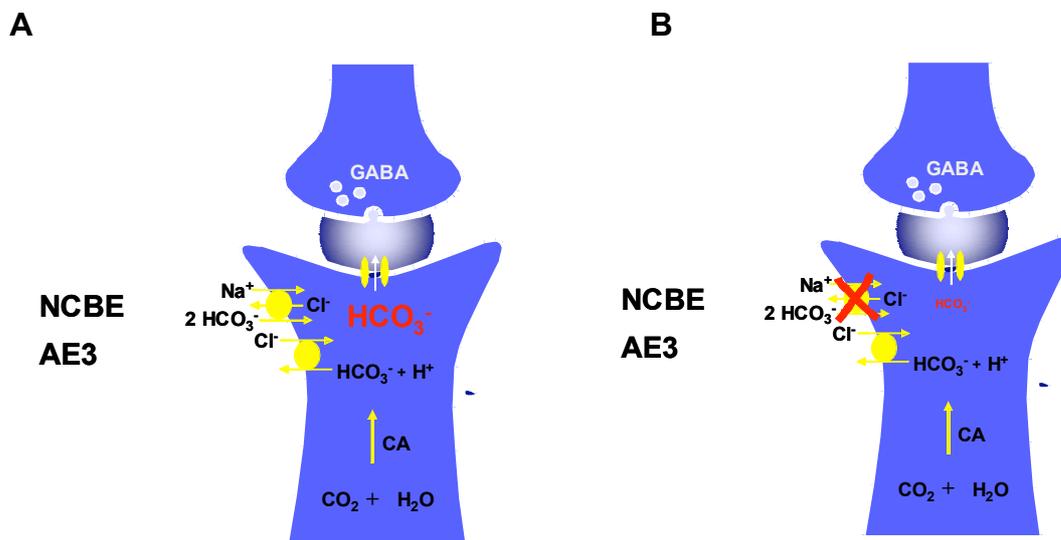


Abbildung 4.3: Modell der postsynaptischen Depolarisation durch GABA bei epileptischer Aktivität. Bei Zusammenbruch des Chloridgradienten ist der Ausstrom von Bikarbonat entscheidend für die GABA-Wirkung. Es kommt zur GABAergen postsynaptischen Depolarisation. **(A)** Im Wildtyp ist die intrazelluläre Bikarbonatkonzentration normal. **(B)** Im NCBE-*Knockout* ist die Bikarbonat-konzentration in der Postsynapse erniedrigt. Durch den gesenkten Bikarbonat-Gradienten ist bei epileptischer Aktivität die GABAerge Depolarisation erniedrigt.

Der NCBE erhöht durch den Bikarbonattransport in die Postsynapse den intrazellulären pH. Die Notwendigkeit der pH-Regulation für Zellen ist unstrittig. So ist die Synthese organischer Säuren eine normale Konsequenz der Zellatmung und kann unreguliert zu einer Azidose führen. Bei Neuronen verursacht die elektrische Aktivität zusätzlich einen drastischen Abfall der intrazellulären Protonenkonzentration innerhalb von Sekunden (CHESLER, 2003). Die Veränderung des intrazellulären pH kann wiederum die Funktion von Enzymen und Ionenkanälen beeinflussen, was eine veränderte Neurotransmission zur Folge hat (CHESLER, 1990).

Beim NCBE-*Knockout* könnte die pH-Regulation gestört sein, so dass bei starker neuronaler Aktivität der pH abfallen und es zu einer postsynaptischen Azidose kommen würde. Es wurde gezeigt, dass eine Alkalose die neuronale Aktivität anregen kann. Eine Azidose scheint dagegen epileptische Aktivität zu hemmen (XIONG *et al.*, 2000). Die erhöhte Krampfschwelle der NCBE^{-/-}-Mäuse könnte somit auch auf eine gestörte pH-Regulation in der postsynaptischen Mikrodomäne zurückgeführt werden.

Einige Ergebnisse deuten auf eine reduzierte pH-Regulation in Neuronen NCBE-defizienter Mäuse hin. So konnten wir bereits an vitalen Hippokampusschnitten NCBE-defizienter Mäuse in der Zellkörperschicht der CA3-Pyramidenzellen eine langsamere pH-Regulation nach einer induzierten Azidose durch Ammoniumchlorid und gleichzeitiger Hemmung der Natrium-Protonen-Austauscher feststellen. Durch die immunhistologische Studie wurde allerdings eine verstärkte Lokalisation des NCBE in den Dendriten und Postsynapsen dieser Neurone festgestellt. Es ist daher zu vermuten, dass durch eine NCBE-Defizienz die pH-Regulation stärker in den Dendriten als in den Zellkörpern gestört ist. Eventuell könnte in den Dendriten NCBE-defizienter Mäuse ein veränderter intrazellulärer pH schon unter physiologischen Bedingungen ohne Hemmung der Natrium-Protonen-Austauscher durch Amiloride gemessen werden. Daher soll in Kooperation mit Professor Dr. Kai Kaila in Hippokampusschnitten von NCBE^{-/-}-Mäusen speziell die pH-Regulation in den Dendriten der CA3-Region untersucht werden. Ferner besteht dort die Möglichkeit zur Ableitung hippokampaler Feldpotentiale nach Auslösung epileptischer Aktivität mit 4-Aminopyridin (LAMSA und KAILA, 1997). Erste Experimente zur Ableitung der Feldpotentiale zeigten eine reduzierte epileptische Aktivität in den Hippokampusschnitten von NCBE^{-/-}-Mäusen nach einer zusätzlichen Ansäuerung durch Natriumpropionat. Die hippokampalen Ableitungen könnten die Hypothese der geringeren epileptischen Aktivität durch Ansäuerung der Neurone bei der NCBE^{-/-}-Maus untermauern.

Eine weitere Möglichkeit für die erhöhte Krampfschwelle der NCBE^{-/-}-Mäuse könnte eine gestörte Liquorproduktion sein (siehe oben). Im Liquor befinden sich essentielle Nährstoffe, sowie Natrium und Kalium. Der Liquor füllt alle interstitiellen Räume des Zentralnervensystems aus. Eine veränderte Natrium- und/oder Kaliumkonzentration des

Liquors hätte einen direkten Einfluss auf die Neurotransmission. Nährstoffmangel im Liquor könnte aber auch zu Mangelerscheinungen in Neuronen führen und hätte somit ebenfalls einen Einfluss auf die Krampfschwelle. Die Kreatin-Kinase-B-*Knockout*-Maus sowie die UbCK-*Knockout*-Maus haben eine erhöhte PTZ-induzierte Krampfschwelle aufgrund ATP-Mangels in Neuronen des Hippokampus (JOST *et al.*, 2002; STREIJGER *et al.*, 2004).

Da NCBE Chlorid aus der Zelle transportiert könnte die NCBE^{-/-}-Maus auch eine erhöhte intrazelluläre Chlorid-Konzentration haben. Dies hätte aber einen geringeren Chloridgradienten zur Folge und müsste eher eine reduzierte GABAerge Inhibition zur Folge und kann somit keine Erklärung für die erhöhte Krampfschwelle der NCBE^{-/-}-Mäuse liefern.

Die Analyse des NCBE-defizienten Mausmodells ist noch nicht abgeschlossen. Diese Arbeit zeigt aber die Bedeutung des Verlustes von NCBE für den Organismus und gibt erste Hinweise auf die Bedeutung der pH-Regulation durch NCBE für die neuronale Erregbarkeit. Die Ursachen der erhöhten Krampfschwelle der NCBE^{-/-}-Mäuse sind noch nicht im Detail verstanden. Das NCBE^{-/-}-Mausmodell könnte aber in Zukunft zum besseren Verständnis einiger Formen von idiopathischer Epilepsie beitragen. Die geringere epileptische Aktivität der NCBE^{-/-}-Mäuse macht den natriumabhängigen Chlorid-Bikarbonat-Austauscher NCBE eventuell auch zu einem interessanten Zielmolekül für einen medikamentösen Ansatz zur Behandlung von idiopathischer Epilepsie.

Außerdem könnte sich das NCBE^{-/-}-Mausmodell als hilfreiches Instrument zur Aufklärung der Liquorproduktion des *Plexus choroideus* erweisen.

5 Zusammenfassung

Die Anionenaustauscher der *Slc4a*-Genfamilie tauschen Bikarbonat gegen Chlorid aus. Sie sind somit an der zellulären pH-Regulation und am transepithelialen Ionentransport beteiligt. Ziel meiner Arbeit war es, die physiologische Funktion des natriumabhängigen Anionenaustauschers NCBE zu charakterisieren. Dazu wurde zunächst die Expression auf RNS- und Proteinebene untersucht. NCBE-Transkripte wurden über Northern-Analyse und *in situ* Hybridisierungen in Gehirn, Rückenmark und der Retina der Maus nachgewiesen. Zur Proteindetektion wurde ein polyklonaler Antikörper gegen NCBE hergestellt. Die immunhistologische und elektronenmikroskopische Analyse ergab eine Lokalisation von NCBE in Dendriten und in dendritischen Dornen von Neuronen. Im *Plexus choroideus* konnte die bereits bekannte basolaterale Lokalisation von NCBE bestätigt werden. Die ebenfalls beschriebene Expression von NCBE in Astrozyten konnte dagegen nicht bestätigt werden. Die Spezifität der immunhistologischen Untersuchungen konnte durch ein NCBE-defizientes Mausmodell bewiesen werden.

Die Disruption von NCBE konnte sowohl auf DNS-, RNS- und Proteinebene verifiziert werden. Die generierten *Knockout*-Mäuse wurden gemäß einer MENDELSchen Verteilung geboren. Sie waren lebensfähig, fielen aber in den ersten drei Lebenswochen im Gewicht gegenüber Wildtyp-Geschwistertieren zurück. Nach Absetzen vom Muttertier und Trennung von den Geschwistertieren erholten sich die NCBE-*Knockout*-Mäuse schnell. Adulte Tiere waren im Gewicht unauffällig und nicht offensichtlich von Wildtyp-Mäusen zu unterscheiden. Sie erreichten ein normales Alter von bis zu zwei Jahren.

In den Verhaltensversuchen zeigten NCBE-*Knockout*-Mäuse eine langsamere Habituation an unbekannte Reize, was auf ein vermindertes nicht assoziatives Lernvermögen der NCBE-*Knockout*-Mäuse schließen lässt. Das Lernverhalten im MORRIS *Water Maze* war hingegen nicht verändert. Da die neuronale pH-Regulation offensichtlich sehr wichtig für die neuronale Erregbarkeit ist, wurde die zerebrale Krampfbereitschaft der NCBE-defizienten Mäuse mithilfe konvulsiver Substanzen getestet, wobei eine signifikant erhöhte Krampfschwelle festgestellt wurde. Da bekannt ist, dass Azidosen epileptische Aktivität hemmen und Alkalosen die neuronale Aktivität steigern, könnte die erhöhte Krampfschwelle im NCBE-*Knockout* mit einer gestörten pH-Regulation zusammenhängen. Durch die Verwendung pH-sensitiver Farbstoffe konnte eine gestörte pH-Regulation in akuten Hippokampusschnitten von NCBE-*Knockout*-Mäusen nachgewiesen werden.

Bei der morphologischen Untersuchung des Gehirns von NCBE-*Knockout*-Mäusen fielen sehr kleine Hirnventrikel auf. Dies konnte kernspintomographisch auch *in vivo* bestätigt werden. Aufgrund der starken Expression von NCBE im *Plexus choroideus* ist eine wichtige Rolle von NCBE für die Liquorproduktion anzunehmen, was Gegenstand weiterer Untersuchungen sein wird.

Die Analyse des NCBE-*Knockout*-Mausmodells ist noch nicht abgeschlossen. Gegenstand weiterer Untersuchungen wird die elektrophysiologische Untersuchung der synaptischen Transmission an akuten Hippokampusschnitten sein. Wir erhoffen uns von diesen Untersuchungen Einblicke in die Bedeutung von Bikarbonat für die neuronale Signaltransduktion.

6 Literaturverzeichnis

- ADAM G., LÄUGER P., STARK G. (2003). Physikalische Chemie und Biophysik. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 4. Auflage.*
- ALBERTS B. (2002). Molecular biology of the cell. *Garland Science, New York, 4th edition.*
- ALGER B. E. und NICOLL R. A. (1982). Feed-forward dendritic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells studied in vitro. *J Physiol (Lond.)*, **328**, 105-23.
- ALPER S. L. (2002). Genetic diseases of acid-base transporters. *Annu Rev Physiol*, **64**, 899-923.
- AVOLI M., und PERREAULT P. A. (1987). GABAergic depolarizing potential in the hippocampus disclosed by the convulsant 4-aminopyridine. *Brain Res*, **400**, 191-5.
- AVOLI M., LOUVEL J., KURCEWICZ I., PUMAIN R., BARBAROSIE M. (1996). Extracellular free potassium and calcium during synchronous activity induced by 4-aminopyridine in the juvenile rat hippocampus. *J Physiol (Lond.)*, **493**, 707-17.
- BELL S. M., SCHREINER C. M., SCHULTHEIS P. J., MILLER M. L., EVANS R. L., VORHEES C. V., SHULL G. E., SCOTT W. J. (1999). Targeted disruption of the murine *Nhe1* locus induces ataxia, growth retardation, and seizures. *Am J Physiol*, **276** (4 Pt 1), C788-95.
- BEN-ARI Y., CHERUBINI E., CORRADETTI R., GAIARSA J.-L. (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol (Lond.)*, **416**, 303-25.
- BEVENSEE M. O., SCHMITT B. M., CHOI I., ROMERO M. F., BORON W. F. (2000). An electrogenic Na⁽⁺⁾-HCO⁽⁻⁾(3) cotransporter (NBC) with a novel COOH-terminus, cloned from rat brain. *Am J Physiol Cell Physiol*, **278** (6), C1200-11.
- BINDER G., RANKE M. B. (1995). Screening for Growth Hormone (GH) Gene Splice-Site Mutations in Sporadic Cases with severe Isolated GH Deficiency Using Ectopic Transcript Analysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **80**, 1247-52.

- BIRNBAUM H. C. und DOLY J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids. Res*, **3**, 1513-23.
- BOK D., GALBRAITH G., LOPEZ I., WOODRUF M., NUSINOWITZ S., BELTRANDELRIO H., HUANG W., ZHAO S., GESKE R., MONTGOMERY C., VAN SLIGTENHORST I., FRIDDLE C., PLATT K., SPARKS M. J., PUSHKIN A., ABDULADZE N., ISHIYAMA A., DUKKIPATI R., LIU W., KURTZ I. (2003). Blindness and auditory impairment caused by loss of the sodium bicarbonate cotransporter NBC3. *Nat Genet*, **34** (3), 313-9.
- BORON W. F. und DE WEER P. (1976). Intracellular pH transients in squid giant axons caused by CO₂, NH₃, and metabolic inhibitors. *J Gen Physiol*, **67** (1), 91-112.
- BORON W. F. und BOULPAEP E. L. (1983). Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander. Basolateral HCO₃⁻ transport. *J Gen Physiol*, **81** (1), 53-94.
- BOUZINOVA E. V., PRAETORIUS J., VIRKKI L. V., NIELSEN S., BORON W. F., AALKJAER C. (2005). Na⁺-dependent HCO₃⁻ uptake into the rat choroid plexus epithelium is partially DIDS sensitive. *Am J Physiol Cell Physiol*, **289** (6), C1448-56.
- BREDT D. S. (1998). Sorting out genes that regulate epithelial and neuronal polarity. *Cell*, **94**, 691-4.
- CAPECCHI, M. R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science*, **244** (4910), 1288-92.
- CHEIDDE L., VIEIRA T. C., LIMA P. R., SAAD S. T., HEILBERG I. P. (2003). A novel mutation in the anion exchanger 1 gene is associated with familial distal renal tubular acidosis and nephrocalcinosis. *Pediatrics*, **112**, 1361-67.
- CHESLER M. (1990). The regulation and modulation of pH in the nervous system. *Prog Neurobiol*, **34**, 401-27.
- CHESLER M. und KAILA K. (1992). Modulation of pH by neuronal activity. *Trends Neurosci*, **15** (10), 396-402.

-
- CHESLER M., (2003). Regulation and modulation of pH in the brain. *Physiol Rev*, **83** (4), 1183-221.
- COUTUREAU E., GALANI R., JARRARD L. E., AND CASSEL J. C. (2000). Selective lesions of the entorhinal cortex, the hippocampus, or the fimbria-fornix in rats: a comparison of effects on spontaneous and amphetamine-induced locomotion. *Exp Brain Res*, **131**, 381-92.
- CRAWLEY J. und GOODWIN F. K. (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav*, **13** (2), 167-70.
- CRAWLEY J. N., BELKNAP J. K., COLLINS A., CRABBE J. C., FRANKEL W., HENDERSON N., HITZEMANN R. J., MAXSON S. C., MINER L. L., SILVA A. J., WEHNER J. M., WYNSHAW-BORIS A., PAYLOR R. (1997). Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology (Berl)*, **132** (2), 107-24.
- DELGADO-ESCUETA A. V., WILSON W. A., OLSEN R. W., PORTER R. J. (1999). Advances in Neurology: Jasper's basic mechanisms of the epilepsies. *Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 3. Auflage*.
- FISHMAN A. R. (1994). Intracranial hypotension. *Neurology*, **44** (10), 1981-2.
- GARNER C. C., NASH J., HUGANIR R. L. (2000). PDZ domains in synapse assembly and signalling. *Trends Cell Biol*, **10**, 274-80.
- GEE S. H., MADHAVAN R., LEVINSON S. R., CALDWELL J. H., SEALOCK R., FRÖHNER S. C. (1998). Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *J Neurosci*, **18**, 128-37.
- GIFFARD R. D., LEE Y. S., OUYANG Y. B. MURPHY S. L., MONYER H. (2003). Two variants of the rat brain sodium-driven chloride bicarbonate exchanger (NCBE): developmental expression and addition of a PDZ motif. *Eur J Neurosci*, **18** (11), 2935-45.

- GROVER L. M., LAMBERT N. A., SCHWARTZKORN P. A., TEYLER T. J. (1993). Role of HCO_3^- ions in depolarizing GABA_A receptor-mediated responses in pyramidal cells of rat hippocampus. *J Neurophysiol*, **69**, 1541-55.
- GU H., ZOU Y. R., RAJEWSKI K. (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell*, **73** (6), 1155-64.
- HASTY P., RIVERA-PEREZ J., CHANG C., BRADLEY A. (1991). Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, **11**, 4509-17.
- HATA Y., NAKANISHI M., TAKAI Y. (1998). Synaptic PDZ domain-containing proteins. *Neurosci Res*, **32**, 1-7.
- HENTSCHE M., WIEMANN M., HENTSCHE S., KURTH I., HERMANS-BORGMAYER I., SEIDENBECHER T., JENTSCH T. J., GAL A., HÜBNER C. A. (2006). Mice with a targeted disruption of the $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger AE3 display a reduced seizure threshold. *Mol Cell Biol*, **26** (1), 182-91.
- HIGASHIMA M., KINOSHITA H., YAMAGUCHI H., KOSHINO Y. (1996). Activation of GABAergic function necessary for afterdischarge generation in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett*, **207**, 101-4.
- HILLE B. (1992). Ionic Channels of Excitable Membranes. *Sinauer Associates Inc., Publishers: Sunderland, Massachusetts, 2nd Edition*.
- HOESS R. H., ZIESE M., STERNBERG N. (1982). P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79** (11), 3398-402.
- HOESS R. H. und ABREMSKI K. (1984). Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81** (4), 1026-9.
- HÜBNER C. A., STEIN V., HERMANS-BORGMAYER I., MEYER T., BALLANYI K., JENTSCH T. J. (2001). Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron*, **30** (2), 515-24.

- HÜBNER C. A. und JENTSCH T. J. (2002). Ion channel diseases. *Hum Mol Genet*; **11** (20), 2435-45.
- HÜBNER C. A., HENTSCHKE M., JACOBS S., HERMANS-BORGMAYER I. (2004). Expression of the sodium-driven chloride bicarbonate exchanger NCBE during prenatal mouse development. *Gene Expr Patterns*, **5** (2), 219-23.
- IGARASHI T., INATOMI J., SEKINE T., CHA S. H., KANAI Y., KUNIMI M., TSUKAMOTO K., SATOH H., SHIMADZU M., TOZAWA F., MORI T., SHIOBARA M., SEKI G., ENDOU H. (1999). Mutations in SLC4A4 cause permanent isolated proximal renal tubular acidosis with ocular abnormalities. *Nat Genet*, **23**, 264-66.
- IM Y. J., LEE J. H., PARK S. H., PARK S. J., RHO S. H., KANG G. B., KIM E., EOM S. H. (2003). Crystal structure of the Shank PDZ-ligand complex reveals a class I PDZ interaction and a novel PDZ-PDZ dimerization. *J Biol Chem*, **278** (48), 48099-104.
- JAENISCH, R. (1988). Transgenic animals. *Science*, **240** (4858), 1468-74.
- JAROLIM P., RUBIN H. L., BRABEC V., CHROBAK L., ZOLOTAREV A. S., ALPER S. L., BRUGNARA C., WICHTERLE H., PALEK J. (1995). Mutations of conserved arginines in the membrane domain of erythroid band 3 lead to a decrease in membrane-associated band 3 and to the phenotype of hereditary spherocytosis. *Blood*, **85**, 634-40.
- JOST C. R., VAN DER ZEE C. E. E. M., IN 'T ZANDT H. J. A., OERLEMANS F., VERHEIJ M., STREIJGER F., FRANSEN F., HEERSCHAP A., COOLS A. R., WIERINGA B. (2002). Creatine kinase B-driven energy transfer in the brain is important for habituation and spatial learning behaviour, mossy fibre size and determination of seizure susceptibility. *Eur J Neurosci*, **15**, 1692-706.
- KAILA K. und VOIPIO J. (1987). Postsynaptic fall in intracellular pH induced by GABA-activated bicarbonate conductance. *Nature*, **330**, 163-5.
- KAILA K., PAALASMAA P., TAIRA T., VOIPIO J. (1992). pH transients due to monosynaptic activation of GABA_A receptors in rat hippocampal slices. *Neuroreport*, **3**, 105-8.

- KAILA K., (1994). Ionic basis of GABA_A receptor channel function in the nervous system. *Prog Neurobiol*, **42**, 489-537.
- KAILA K. und RANSOM B. R. (1998). pH and brain function. *Wiley-Liss, New York*.
- KARET F. E., GAINZA F. J., GYORY A. Z., UNWIN R. J., WRONG O., TANNER M. J., NAYIR A., ALPAY H., SANTOS F., HULTON S. A., BAKKALOGLU A., OZEN S., CUNNINGHAM M. J., DI PIETRO A., WALKER W. G., LIFTON R. P. (1998). Mutations in the chloride-bicarbonate exchanger gene AE1 cause autosomal dominant but not autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6337-42.
- KILBY N. J., SNAITH M. R., MURRAY J. A. (1993). Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet*, **9** (12), 413-21.
- KIM C., CHOI H., KIM J. K., CHANG H. K., PARK R. S., AND KANG I. Y. (1970). General behavioral activity and its component patterns in hippocampectomized rats. *Brain Res*, **19**, 379-94.
- KIM E., NIETHAMMER M., ROTHSCHILD A., JAN Y. N., SHENG M. (1995). Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature*, **378**, 85-8.
- KIM E., SHENG M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci*, **5** (10), 771-81.
- KOPITO R. R., LEE B. S., SIMMONS D. M., LINDSEY A. E., MORGANS C. W., SCHNEIDER K. (1989). Regulation of intracellular pH by a neuronal homolog of the erythrocyte anion exchanger. *Cell*, **59**, 927-37.
- KORNAU H. C., SEEBURG P. H., KENNEDY M. B. (1997). Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins. *Curr Opin Neurobiol*, **7**, 368-73.
- KÜHN R., SCHWENK F., AGUET M., RAJEWSKI K. (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science*, **269** (5229), 1427-9.

- LAEMMLI U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **277**, 680-5.
- LAKSO M., SAUER B., MOSINGER B. JR., LEE E. J., MANNING R. W., YU S. H., MULDER K. L. WESTPHAL H. (1992). Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89** (14), 6232-6.
- LAMSA K. und KAILA K. (1997). Ionic mechanisms of spontaneous GABAergic events in rat hippocampal slices exposed to 4-aminopyridine. *J Neurophysiol*, **78**, 2582-91.
- LEE Y. S., OUYANG Y. B., GIFFARD R. G. (2006). Regulation of the rat brain Na⁺-driven Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger involves protein kinase A and a multiprotein signaling complex. *FEBS Lett*, **580** (20), 4865-71.
- LEEM C. H., LAGADIC-GOSSMANN D., VAUGHAN-JONES R. D. (1999). Characterization of intracellular pH regulation in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol*, **517** (Pt 1), 159-80.
- LEHMANN-HORN F. und JURKAT-ROTT K. (1999). Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol Rev*, **4**, 1317-72.
- LEVY R. H., MATTSON R. H., MELDRUM B. S., PERUCCA E. (2002). Antiepileptic Drugs. *Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia*, 5. Auflage.
- LINDSEY A. E., SCHNEIDER K., SIMMONS D. M., BARON R., LEE B. S., KOPITO R. R. (1990). Functional expression and subcellular localization of an anion exchanger cloned from choroid plexus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 5278-82.
- LOPES-CENDES I., SCHEFFER I. E., BERKOVIC S. F., ROUSSEAU M., ANDERMANN E., ROULEAU G. A. (2000). A new locus for generalized epilepsy with febrile seizures plus maps to chromosome 2. *Am J Hum Genet*, **66** (2), 698-701.
- LOUVEL J., AVOLI M., KURCEWICZ I., PUMAIN R. (1994). Extracellular free potassium during synchronous activity induced by 4-aminopyridine in the juvenile rat hippocampus. *Neurosci Lett*, **167**, 97-100.

- MARKEL P., SHU P., EBELING C., CARLSON G. A., NAGLE D. L., SMUTKO J. S., MOORE K. J. (1997). Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nat Genet*, **17** (3), 280-4.
- MICHELSON H. B., LOTHMAN E. W. (1992). Ontogeny of epileptogenesis in the rat hippocampus: a study of the influence of GABAergic inhibition. *Brain Res Dev Brain Res*, **66**, 237-43.
- MORGANS C. W. und KOPITO R. R. (1993). Generation of truncated brain AE3 isoforms by alternate mRNA processing. *J Cell Sci*, **106** (Pt 4), 1275-82.
- MORRIS R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*, **11** (1), 47-60.
- NAGY A., ROSSANT J., NAGY R., ABRAMOW-NEWERLY W., RODER J. C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8424-8.
- NELSON D. L., COX M. M. (2000): *Lehninger Principles of Biochemistry*. *Palgrave Macmillan*, 3rd edition.
- NIETHAMMER M., KIM E., SHENG M. (1996). Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J Neurosci*, **16**, 2157-63.
- PARK M., LI Q., SHCHEYNIKOV N., ZENG W. MUALLEM S. (2004). NaBC1 is a ubiquitous electrogenic Na⁺ -coupled borate transporter essential for cellular boron homeostasis and cell growth and proliferation. *Mol Cell*, **16** (3), 331-41.
- PRAETORIUS J., NEJSUM L. N., NIELSEN S. (2003). A SCL4A10 gene product maps selectively to the basolateral plasma membrane of choroid plexus epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **286** (3), C601-10.
- PRAETORIUS J. und NIELSEN S. (2006). Distribution of sodium transporters and aquaporin-1 in the human choroid plexus. *Am J Physiol Cell Physiol*, **291** (1), C59-67.

- PURPURA D. P., PENRY J. K., TOWER D. B., WOODBURY D. M., WALTER R. D. (1972). Experimental Models of Epilepsy. *Raven Press, New York*.
- RANSOM B. R. (2005). The neuronal microenvironment. *Medical Physiology edited by BORON W. F. und BOULPAEP E. L. Philadelphia, PA: Elsevier*, 399-420.
- REDISH A. D. UND TOURETZKY D. S. (1998). The role of the hippocampus in solving the Morris water maze. *Neural Comput*, **10** (1), 73-111.
- RIVERA C., VOIPIO J., KAILA K. (2004). Two developmental switches in GABAergic signalling: the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CA VII. *J Physiol*, **562** (Pt 1), 27-36.
- ROMERO M. F., HENRY M. F., NELSON S., HARTE P. J., DILLON A. K., SCIORTINO C. M. (2000). Cloning and characterization of a Na⁺-driven anion exchanger (NDAE1). A new bicarbonate transporter. *J Biol Chem*, **275** (32), 24552-9.
- ROMERO M. F., FULTON C. M., BORON W. F. (2004). The SLC4 family of HCO₃⁻ transporters. *Pflugers Arch*, **447** (5), 495-509.
- RUUSUVUORI E., LI H., HUTTU K., PALVA J. M., SMIRNOV S., RIVERA C., KAILA K., VOIPIO J. (2004). Carbonic anhydrase isoform VII acts as a molecular switch in the development of synchronous gamma-frequency firing of hippocampal CA1 pyramidal cells. *J Neurosci*, **24** (11), 2699-707.
- SANDER T., SCHULZ H., SAAR K., GENNARO E., RIGGIO M. C., BIANCHI A., ZARA F., LUNA D., BULTEAU C., KAMINSKA A., VILLE D., CIEUTA C., PICARD F., PRUD'HOMME J. F., BATE L., SUNDQUIST A., GARDINER R. M., JANSSEN G. A., DE HAAN G. J., KASTELEIJN-NOLST-TRENITE D. G., BADER A., LINDHOUT D., RIESS O., WIENKER T. F., JANZ D., REIS A. (2000). Genome search for susceptibility loci of common idiopathic generalised epilepsies. *Hum Mol Genet*, **9** (10), 1465-72.
- SANDER T., TOLIAT M. R., HEILS A., LESCHIK G., BECKER C., RUSCHENDORF F., ROHDE K., MUNDLOS S., NURNBERG P. (2002). Association of the 867Asp variant of the human anion exchanger 3 gene with common subtypes of idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsy Res*, **51**, 249-55.

- SANGER F., MILKIN S., COULSON A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-67.
- SCHUCHMANN S., SCHMITZ D., RIVERA C., VANHATALO S., SALMEN B., MACKIE K., SIPILA S. T., VOIPIO J., KAILA K. (2006). Experimental febrile seizures are precipitated by a hyperthermia-induced respiratory alkalosis. *Nat Med*, **12** (7), 817-23.
- SCHWIENING C. J. und BORON W. F. (1994). Regulation of intracellular pH in pyramidal neurones from the rat hippocampus by Na(+)-dependent Cl(-)-HCO₃⁻ exchange. *J Physiol*, **475** (1), 59-67.
- SHENG M., KIM E. (2000). The Shank family of scaffold proteins. *J Cell Sci*, **113** (Pt 11), 1851-6.
- SINGER S. J. und NICHOLSON G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175** (23), 720-31.
- SOLEIMANI M. und BURNHAM, C. E. (2001). Na⁺:HCO₃⁻ cotransporters (NBC): cloning and characterization. *J Membr Biol*, **183**, 71-84.
- STALEY K. J. und MODY I. (1992). Shunting of excitatory input to dentate gyrus granule cells by a depolarizing GABA_A receptor-mediated postsynaptic conductance. *J Neurophysiol*, **68**, 197-212.
- STALEY K. J., SOLDI B. L., PROCTOR W. R. (1995). Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABA_A receptors. *Science*, **269**, 977-81.
- STREIJGER F., JOST C. R., OERLEMANS F., ELLENBROEK B. A., COOLS A. R., WIERINGA B., VAN DER ZEE C. E. E. M. (2004). Mice lacking the UbCK isoform of creatine kinase reveal slower spatial learning acquisition, diminished exploration and habituation, and reduced acoustic startle reflex responses. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **256/257**, 305-18.
- SPECKMANN E. J. (1986). Experimentelle Epilepsieforschung. Erträge der Forschung. *Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt*.

- TAIRA T., LAMSA K., KAILA K. (1995). Long-lasting facilitation of excitatory transmission induced by stimulation of a monosynaptic inhibitory pathway in the rat hippocampal slice. *Soc Neurosci Abstr*, **21**, 434-5.
- TAIRA T., LAMSA K., KAILA K. (1997). Post-tetanic excitation mediated by GABAA receptors in rat CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol*, **78**, 2213-8.
- TANPHAICHITR V. S., SUMBOONNANONDA A., IDEGUCHI H., SHAYAKUL C., BRUGNARA C., TAKAO M., VEERAKUL G. and ALPER S. L. (1998). Novel AE1 mutations in recessive distal renal tubular acidosis. Loss-of-function is rescued by glycophorin A. *J Clin Invest*, **102**, 2173-9.
- VAUGHAN-JONES R. D., SPITZER K. W. (2002). Role of bicarbonate in the regulation of intracellular pH in the mammalian ventricular myocyte. *Biochem Cell Biol*, **80** (5), 579-96.
- VULLO D., VOIPIO J., INNOCENTI A., RIVERA C., RANKI H., SCOZZAFAVA A., KAILA K., SUPURAN C. T. (2005). Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the human cytosolic isozyme VII with aromatic and heterocyclic sulfonamides. *Bioorg Med Chem Lett*, **15** (4), 971-6.
- WANG C. Z., YANO H., NAGASHIMA K., SEINO S. (2000). The Na⁺-driven Cl⁻/HCO₃⁻-exchanger. Cloning, tissue distribution, and functional characterization. *J Biol Chem*, **275** (45), 35486-90.
- WANG Y. A., ZHOU W. X., LI J. X., LIU Y. Q., YUE Y. J., ZHENG J. Q., LIU K. L., RUAN J. X. (2005). Anticonvulsant effects of phencyclone hydrochloride and other anticholinergic drugs in soman poisoning: neurochemical mechanisms. *Life Sci*, **78** (2), 210-23.
- WASTERLAIN C. G., FARBER D. B., FAIRCHILD M. D. (1986). Synaptic mechanisms in the kindled epileptic focus: a speculative synthesis. In: DELGADO-ESCUETA A. V., WARD A. A. JR., WOODBURY D. M., PORTER R. J.. *Advances in Neurology, New York: Raven Press*, 411-33.
- WEINMANN E. J., STEPLOCK D., DONOWITZ M., SHENOLIKAR S. (2000). NHERF associations with sodium-hydrogen exchanger isoform (NHE3) and ezrin are essential for cAMP-mediated phosphorylation and inhibition of NHE3. *Biochemistry*, **39**, 6123-29.

-
- WHITE H. S., JOHNSON M., WOLF H. H., KUPFERBERG H. J. (1995). The early identification of anticonvulsant activity: role of the maximal electroshock and subcutaneous pentylenetetrazol seizure models. *Ital J Neurol Sci*, **16**, 73-7.
- WOOLFE G., MAC DONALD A. D. (1944). The evaluation of the analgesic action of Pethidine hydrochloride (Demerol). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy*, **80**, 300-7.
- XIE X. und SMART T. G. (1991). A physiological role for endogenous zinc in rat hippocampal synaptic neurotransmission. *Nature*, **349**, 521-4.
- XIONG Z. Q., SAGGAU P., STRINGER J. L., (2000). Activity-dependent intracellular acidification correlates with the duration of seizure activity. *J Neurosci*, **20** (4), 1290-6.
- ZHANG D., KIYATKIN A., BOLIN J. T., LOW P. S. (2000). Crystallographic structure and functional interpretation of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3. *Blood*, **96** (9), 2925-33.
- ZHU Q., LEE D. W., CASEY J. R. (2003). Novel topology in C-terminal region of the human plasma membrane anion exchanger, AE1. *J Biol Chem*, **278**, 3112–20.
- ZOU Y. R., MULLER W., GU H., AND RAJEWSKY K. (1994). Cre-loxP-mediated gene replacement: a mouse strain producing humanized antibodies. *Curr Biol*, **4**, 1099-103.

7 Anhang

7.1 Aminosäuresequenzvergleich der murinen Slc4-Genfamilie

Aminosäuresequenzvergleich der murinen Bikarbonattransporter *Slc4a1/AE1*, *Slc4a2/AE2*, *Slc4a3/AE3*, *Slc4a4/NBCe1*, *Slc4a5/NBCe2*, *Slc4a7/NBCn1*, *Slc4a8/NDCBE*, *Slc4a9/AE4* und *Slc4a10/NBCe*. Das Alignment wurde mit der im Internet frei zugänglichen Software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>) durchgeführt. Die homologen Sequenzabschnitte sind je nach Konservierung mit einem Stern, Doppelpunkt oder Punkt gekennzeichnet. Die in rot dargestellten Aminosäuren der *Slc4a10*-Sequenz zeigen das gewählte Epitop für den generierten polyklonalen anti-NBCe-Antikörper.

```

Slc4a8      -----
Slc4a10    -----
Slc4a7      -----
Slc4a4      -----
Slc4a5      -----
Slc4a9      -----
Slc4a1      -----
Slc4a2      MSSAPRRPASGADSL-HTPEPELSLPGTPGFPEQEDELRTLGVERFEEILQEAGSRGGE 59
Slc4a3      MANGVI PPPGGASPLPQVRVPLEEPLGPDVVEEDDDLGKTLAVSRFGDLISKTPAWDPE 60

Slc4a8      -----
Slc4a10    -----
Slc4a7      -----
Slc4a4      -----
Slc4a5      -----
Slc4a9      -----
Slc4a1      -----M 1
Slc4a2      EPGRSYGEEDFEYHRQSSHHIHHP LSTHLPDARRRKTPOGPRKPRR-----PGASPT 114
Slc4a3      KPSRSYSERDFEFHRHTSHHTHHPLSARLPPPHKLRPPPTSARHTRRKRKKEKTSAPPS 120

Slc4a8      -MPAGSNEPDGVLSYQRPDEEAVVDQGGTSTILNIHYEKE-----ELEGHRTLYVGV 52
Slc4a10    MEIKDQGAQMEPLLPTRNDEEAVVDRGGTRSILKTHFEKE-----DLEGHRTLFIGVH 53
Slc4a7      MEADGAGEQMRPLLTRGPDEEAVVDLGKTSSTVNTKFEKE-----ELESHRAYVGVH 53
Slc4a4      -----MEDEAVLDRGASFLKHVCDEE-----EVEGHHTIYIGVH 34
Slc4a5      -----MKVEEKAGVKKLEPTS YRRRH-----PEQDFPSIHIGFP 34
Slc4a9      -----MK 2
Slc4a1      GDMRDHEE-----VLEIPDRDSEEE-----LENIIGQIAYRDLT 35
Slc4a2      GETPTIEE-----GEEDEEEASEAEGFRAPPQQPSATTTPSAVQFFLQEDEGAERKPERT 169
Slc4a3      EGTPIIQEEGGAGAE EEEEEEEEEEGESEAEVPELPPGP-----PQKAKFSIGSDEDD 174

Slc4a8      MPLG-RQSHRHRTHGQKHR----- 71
Slc4a10    VPLGGRKSHRRHRHRGHKHR----- 73
Slc4a7      VPFS-KESRRRHKHRGHKHH----- 72
Slc4a4      VPKSYRRRRRHKRKAGHKE----- 53
Slc4a5      VPGYSQRKSDSKGHLSGLQRVQ----- 56
Slc4a9      LPGQDFESSDAHENAHS----- 21
Slc4a1      IPVTEMQDP--EALP----- 48
Slc4a2      SPSPTQTTPHQEAA PRASKGAQTGLVEEMVAVASATAGDDGGAAGRPLTKAQPGRHSY 229
Slc4a3      SPGLPVKAPCAKALPSVG-----LQSDQSPQRS GSSPSPRARASRISTEKSRPWSPSA 227
*

```

Slc4a8 -----RRGGRGKGASQGEGLAALAH----- 93
Slc4a10 -----KRDR--ERDSGLEDGRESPSFD----- 93
Slc4a7 -----HRRRK-DKSDKEDGRESPSYD----- 93
Slc4a4 -----KKEKERISENYSKSDVVENADES-----S 77
Slc4a5 -----WSLQPKSQDLAGPDGKASSLGG-----S 82
Slc4a9 -----EPDSGLPGPGLNGPSGIDIG----- 42
Slc4a1 -----TEQTATD-YVPSSTS----- 62
Slc4a2 NLQERRRIGSMTGVEQALLP-RVPTDESEAQTLATADLDMKSHRFEDVPGVRRHLVRKN 288
Slc4a3 SYDLRERLCPGSLGNPGPEQRPVPTDEAEAQMLGSADLDDMKSHRLEDNPGVRRHLVKKP 287

.

Slc4a8 -----TPSQRVQFILGTEED-EEHVPHELFTELDEICMK-EGEDAWEKETARWLKF 142
Slc4a10 -----TPSQRVQFILGTEEDDEEHLPHDLFTELDEICWR-EGEDAWEKRETARWLKF 143
Slc4a7 -----TPSQRVQFILGTEEDDEEHIHDLFTEMDEL CYR-DGEEYEWKETARWLKF 143
Slc4a4 SSILKPLISPAAEIRFILG--EEDDSPAPPQLFTELDELLAV-DGQEMEWKETARWIKF 134
Slc4a5 VDFTKRIRSPAEEQLQDILG--EEDAPN-PTLFTEMDT-LQH-DGDQMEWKESARWIKF 137
Slc4a9 -----ESQVSKDPLLFIQNLNELLGW-P-QALEWRETGRWLLF 77
Slc4a1 -----TPHPSS-----GQVYVELQELMMDQRNQELQWVEAAHWIGL 98
Slc4a2 A--KGSTQAAREGREPGPTPRARPRAPHKPHEVFVELNELLLD-KNQEPQWRETARWIKF 345
Slc4a3 SRIQGGRGSPSGLAPILRRKKKKKLDRRPHEVFVELNELMLD-RSQEPHWRETARWIKF 346
: : : : : . * * : : : :

Slc4a8 EEDVEDGGERWSKPYVATLSLHSLFELRSCILNGTVLLDMRASSIEEISDLILDQOELLR 202
Slc4a10 EEDVEDGGERWSKPYVATLSLHSLFELRSCILNGTVLLDMHANTIEEIAMVLDQOVSSG 203
Slc4a7 EEDVEDGGDRWSKPYVATLSLHSLFELRSCILNGTVMLDMRSTLDEIADMVLDNMIASG 203
Slc4a4 EEKVEQGERWSKPHVATLSLHSLFELRSCILNGTVMLDMRSTLDEIADMVLDNMIASG 194
Slc4a5 EEKVEEGGERWSKPHVSTLSLHSLFELRSCILNGTVMLDMRSTLDEIADMVLDNMIASG 197
Slc4a9 EEKLDMGAGRWSAPHVPTLELPSLQKLRSLLAEGIVLLDCAQSLLELVEQVVS----GE 133
Slc4a1 EENLRED-GVWGRPHLSYLTFSWLELQKVFVSKGTFLLGLAETSLAGVANHLDCFIYED 157
Slc4a2 EEDVEEETERWGKPHVASLSFRSLELRRTLAHGAVLLDLDQQTLPVGHVQVVEQVWISD 405
Slc4a3 EEDVEEETERWGKPHVASLSFRSLELRRTIAQGAALLDLEQTTLPVGHVQVVEQVWISD 406
* * . : * . * : : . * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

Slc4a8 DLSDSVRVKVVREALLKKHHHQNERRRNLIPIVRSFAEVGKKQSDPHSMDR-DGQTVSPQ 261
Slc4a10 QLNEDVRRHVHEALMKQHQQKLANRIPIVRSFADIGKKQSEPNMMDKNAGQVVSPO 263
Slc4a7 QLDDSIRENVREALLKRHHHQNEKRFTSRIPLVRSFADIGKKHSDPHLLER-NGILASPQ 262
Slc4a4 LLKPDLDKDVITYTLRKRHRHTKK-----SNLRSLADIGKTVSSASRMFS-NPDNGSPA 247
Slc4a5 LLRPELRERVSIVLLRKRHRHTKK-----PIHRSFADIGKSVSTNRSSA-RSPSAGPT 250
Slc4a9 SLSPELRGQLQALLLQRPQHHTQ-----MGIRPCRES-----NAFRKAS-RDE----- 176
Slc4a1 QIRPQDREELLRALLLKRSHAED-----LGNLEGVKPAVLTRSG-GASEP 201
Slc4a2 QIKAEDRANVLRALLKHSHPDEKEF-SFPRNISAGSLGSLGHHHAQGTESDPHVTEP 464
Slc4a3 QIRPEDRASVLRLLKHSHPNDDKDSGFFPRNPSSSVNSVLGNHHTPSPHGPDAVPT 466
: . : : * : : * .

Slc4a8 SATN-LEVKN-----GVNCEHSPVDLSKVDLHFMKKIPTGAEASNVLVGE 305
Slc4a10 SAPACAENKN-----DVSRENSTVDFSKVDLHFMKKIPPGAEASNVLVGE 308
Slc4a7 SAPGNLDNSKSGEM-----KNGSGGSRENSTVDFSKVDMNFMRKIPTGAEASNVLVGE 316
Slc4a4 MTHR-----NLTSSSLNDISDKPEKQDLKKNKFMKKLPRDAEASNVLVGE 291
Slc4a5 LHHSTEDLRIRQSTSYGHLCHAQSRSMNDISHTPNTDQRKNKFMKKIPKDSEASNVLVGE 310
Slc4a9 -----DAPLKHQ--NPLRQKLPAGAEAAVVLAGE 203
Slc4a1 LLP--HQPSLETQLYCG-----QAEGGSEGPSTSGT-----LKI PPDSETTLVLVGR 246
Slc4a2 LIG--GVPETRELVDRER--ELPPPAPPAGITRSKSKHELKLEKI PENAEATVVLVGC 519
Slc4a3 MADDQGEPAPLWPHDPDA--KEKPLHMPGGDGHGK--SLKLEKI PEDAEATVVLVGC 521
* * . : : : : * . *

Slc4a8 VDTLDRPIVAFVRLSPAVLLSGLTEVPIPTRFLFILLGPGVKGQYHEIGRSMATIMTDE 365
Slc4a10 LEFLDRAVVAFVRLSPAVLLQGLAEVPIPSRFLFILLGPLGKQYHEIGRSIATLMTDE 368
Slc4a7 VDFLERPIIAFVRLAPAVLLSGLTEVVPVTRFLFILLGPGKAPQYHEIGRSIATLMTDE 376
Slc4a4 VDFLDTPPIAFVRLQAVMLGALTEVVPVTRFLFILLGPGKAKS YHEIGRAIATLMSDE 351
Slc4a5 VDFLDQPFIAFVRLAQSSMLGGVTEVVPVTRFLFILLGPGSRAKSYNEIGRAIATLMDVDD 370
Slc4a9 LGFLEQPLGAFVRLRNPIVLEPLTEMILPSRFFCLLLGPPTLGRSYHEMGRAAAVLLSDP 263
Slc4a1 ANFLEKPVLG FVRLKEAVPLED-LVLPPEVPGFLLVLLGPEAPHVDYTLGRAAATLMTER 305
Slc4a2 VEFLSRPTMAFVRLREAVELDAVLEVPVVRFLFLLGPPSSANMDYHEIGRSIATLMSDK 579
Slc4a3 VPFLEQPAAFVRLSEAVLLESVLEVPVVRFLFVMLGPSHTSTDYHEIGRSIATLMSDK 581
* . . . * * * . * : * * : : * * * . * : : * * : : : :

Slc4a8 IFHDVAYKAKERDDLLAGIDEFLDQVTVLPPGEWDPSIRIEPPKNVPSQEKRK-----M 419
Slc4a10 VFHDVAYKAKDRNDLVSGIDEFLDQVTVLPPGEWDPSIRIEPPKNVPSQEKRK-----I 422
Slc4a7 IFHDVAYKAKDRNDLLSGIDEFLDQVTVLPPGEWDPSIRIEPPKSVPSQEKRK-----I 430
Slc4a4 VFHDIAYKAKDRHDLIAGIDEFLDEIVLPPGEWDPAIRIEPPKSLPSSDKRK--NMYSG 409
Slc4a5 LFSDVAYKARNREDLIAGVDEFLDEIVLPPGEWDPNIRIEPPKVPKVPADKDK--SVFSL 428
Slc4a9 QFQWSVRRASHLPDLLAALDAFLQEVETALPPGRWDRRTARIPPPKYLPKQHKRFPKQLQEV 323
Slc4a1 VFRITASMAHNREELLSLESFLDCSLVLPPTDAPSEKALLNLVLPVQKELLRRR----- 359
Slc4a2 QFHEAAYLADERDDLLTAINAFDCSVVLPPEVQGEELLRSVAHFQRMKLRKREE--QGR 638
Slc4a3 LFHEAAYQADDRQDLLGAISEFLDGSIVIPPEVEGRDLLRSVAAFQRELLRKRREREQT 641
* . * . :*: :. :*: :. :*: : . :

Slc4a8 PGVPNGNVCHIEPE-----PHGG--HSG-----PELERTGRLFG 451
Slc4a10 PAVPNGTAAHGEAE-----PHGG--HSG-----PELQRTGRIFG 454
Slc4a7 PVFNGSAAMSVDP-----PKEDDHAG-----PELQRTGRLFG 464
Slc4a4 GENVQMNGDTPHDG-----GHGGGGHGD-----CEELQRTGRFCG 444
Slc4a5 AELGQMNGSVGRSGASAGGGGSGGGGAGGSGAGGGGSGNEAEMPAMHEIGEELIWTGRFFG 488
Slc4a9 TSLSRQSAALAEDEK-----HHHGPHTP-----IPELQRTGRLFG 357
Slc4a1 YLPSPAKDPD-NLYNTLDLNG-----GKGGPGDED-----DPLRRTGRIFG 399
Slc4a2 LLPPGAGLEPKSAQDKALLQM-----VEVAGAAED-----DPLRRTGRPF 679
Slc4a3 KVEMTTRGGYAAPGKELSLEM-----GGSEATSED-----DPLQRTGSVFG 682
* * *

Slc4a8 GLVLVDVKKRKPWYWSYRDALSLQCLASFLFLYCACMSPVITFGGLLGEATEGRISAIES 511
Slc4a10 GLMLDIKRRKAPFFWSDFRDAFSLQCLASFLFLYCACMSPVITFGGLLGEATEGRISAIES 514
Slc4a7 GLILDIKRRKAPFFLSDFKDALSLQCLASILFLYCACMSPVITFGGLLGEATEGRISAIES 524
Slc4a4 GLIKDIKRRKAPFFASDFYDALNIQALSAILFIYLATVTNAITFGGLLGDATDNMQGVLES 504
Slc4a5 GLRLDVKKRKLWFPSPDFYDGFHQSI SAVLFIYLGCI TNAITFGGLLGDATDNYQGVME 548
Slc4a9 GLIQDVRRKACWYTSDFLDALHPQCFSAVFYIYLATVTNAITFGGLLGDATDNYQGVLES 417
Slc4a1 GLIRDVRRRYPHYLSDFRDALDPQCLAAVIFIFIYFAALSPAIVTFGGLLGEKTRNLGMVSEL 459
Slc4a2 GLIRDVRRRYPHYPSDLRDALHPCVAAVLFIFIYFAALSPAIVTFGGLLGEKTKDLIGVSEL 739
Slc4a3 GLVRDVRRRYPHYPSDLRDALHPCVAAVLFIFIYFAALSPAIVTFGGLLGEKTEGLMGMVSEL 742
** *::: : ** *.: * :.:* . :. :*****: * . . *

Slc4a8 LFGASMTGIAYS LFAGQPLTILGSTGVPVLF EKILFKFC KDYALS YLSLRALIGLWTAFL 571
Slc4a10 LFGASMTGIAYS LFAGQPLTILGSTGVPVLF EKILFKFC KEYGLS YLSLRASIGLWTATL 574
Slc4a7 LFGASLTGIAYS LFAGQPLTILGSTGVPVLF EKILFKFC RDYHLS YLSLRTSIGLWTSFL 584
Slc4a4 FLGTAVSGAIFCLFAGQPLTILSSTGVPVLFERLLFNFSKDNDFYLEFRLWIGLRS AFL 564
Slc4a5 FLGTAMAGSLFCLFSGQPLIILSSTGPILIFEKLLFDFSKANGLDYMEFRLWIGLHSAIQ 608
Slc4a9 FLGTAVAGAAFLMAGQPLTILSSTGVPVLFERLLFSFRDYSLDYLPFRLWVGIWVA AF 477
Slc4a1 LISTAVQGILFALLGAQPLLVGFSGPLLVFEEAFFSFCESNNLEYIVGRAWIGFWL ILL 519
Slc4a2 IMSTALQGVVFCLLGAQPLLVIGFSGPLLVFEEAFFSFCSSNELEYLVGRVWIGFWLVFL 799
Slc4a3 IVSTAVLGVLFSLLAGAQPLLVGFSGPLLVFEEAFFKFCRAQDLEYLTGRVWVGLWLVVF 802
.:*::* :.*:.** :. :*:*:* .*. :.*: * :*:

Slc4a8 CIVLVATDASSLVCYITRFTEEFASLICIIIFIYEAEIKLIHLAETYPIHMHSQLDHLSL 631
Slc4a10 CIIIVATDASSLVCYITRFTEEFASLICIIIFIYEAEIKLFELSETYPINMHNDLELLTQ 634
Slc4a7 CIVLVATDASSLVCYITRFTEEFALICIIIFIYEAEIKLFHLGEIYAFNMHNNLDELTS 644
Slc4a4 CLILVATDASFLVQYFTRFTEEGFPSLISFIFIYDAFKKMIKLADYYPINSDFKVGYNTH 624
Slc4a5 CLILVATDASFI IKYITRFTEEGFSTLISFIFIYDAIKKMIGAFKYYPINTDFKPD SIT 668
Slc4a9 CLALVATEASLLVRYFTRFTEEGFCALISLIFIYDAMGKMLNLRAYPIQ---RPG-SSA 533
Slc4a1 VMLVVAFEGSFLVQYISRYTQEIFSFSLISLIFIYETFSKLIKIFQDYPLQ----- 569
Slc4a2 ALLMVALEGSFLVRFVSRFTQEIFAFSLISLIFIYETFYKLIKIFQEHPLHGCSGSDSEA 859
Slc4a3 VLALVAAEGSFLVRYISPFTQEIFAFSLISLIFIYETFHKLYKVFTHEPLLPFYPPDEALE 862
: :** :.* :. :. :*:* * **:*:*:* :* :. :

Slc4a8 YYCRCVLPE----NPNNH-----TLQYWKDHNILAAE-----VNWANLTVSECQEM 673
Slc4a10 YSCNCMEPH----SPSND-----TLKEWRESNLSASD-----I IWGNLTVSECRSL 676
Slc4a7 YTCVCAEPS----NPSNE-----TLELWKRKNITAYS-----VSWGNTLVSECKTF 686
Slc4a4 FSCACLPDPVNLVSND-----TTLAPEDLPTISSTDMYHNVTDFWAYLSKKECVKY 677
Slc4a5 YKCECVAPDVTNTTVND-----SALLVPNT-NMSVYTPLNLTALDWSLLSKKECLSY 720
Slc4a9 YGCFQYPGTGGNTSEWT-----SAKDKDTEILSVPLVN-----ASFLPPECIRQ 581
Slc4a1 -----QTYAPVVMKP-----KPQGP----- 584
Slc4a2 GSSSSSNMTWATTILVDPDNSSASGQSGQEKPRG----- 892
Slc4a3 TGLELNSSALPPTTEGPP-----GPRN----- 883

Slc4a8 HGEFMGSACGHHGYPYTPDVLFWSCILFFATFIVSSTLKTFKTSRYFPTRVRSMSVDFAVF 733
Slc4a10 HGEYVGRACGHHGHPYVPDVLFWSVILFFSTVTMSATLKQFKTSRYFP TKVRSIVSDFAVF 736
Slc4a7 HGMFVGSACGPHGYPYVPDVLFWCVLFFFTFFLSSFLKQFKTKRYFPTTKVRSITISDFAVF 746
Slc4a4 GGKLVGNCC---DFVPDITLMSFILFLGTYTSSMAMKKFKTSRYFPTTARKLISDFAI I 733
Slc4a5 GGRLLGSSC---QFVFDLALMSFILFFGTYSMTLTLKKFKFSRYFPTKVRTLVADFSIV 776
Slc4a9 GGHPPLGPSC---HTVPDIAFFSLLFFTSFLCAIALKHKNRFRFPVVRKVLGDFSSV 637
Slc4a1 -----VPNTALFSLVLMAGTFLLAMTLRKFKNSTYFPGKLRRVIGDFGVP 629
Slc4a2 -----QPNTALLSLVLMAGTFFIAFFLRKFKNSRFFPGRIRRVIGDFGVP 937
Slc4a3 -----QPNTALLSLILMLGTFLIAFFLRKFRNSRFLGGKARRIIGDFGIP 928
* : . . : * : : : : : : : * : . * .

Slc4a8 LTIFTMVLDLFLIG-VPSPKLQVPNVFKPTRDD-RGWFINPIGPN---PWWTVIAAI IPA 788
Slc4a10 LTILCMVLIDYAIG-IPSPKLQVPSVFKPTIYD-RGWVFTPLGPN---PWWTIIAAI IPA 791
Slc4a7 LTIVIMVAIDYLVG-IPSPKLHVPEKFEPTDPS-RGWII SPLGDN---PWWTLLIAAVPA 801
Slc4a4 LSILIFGVIDALVG-VDTPKLIVPSEFKPTSPN-RGWVFPFPGEN---PWWVCLAAAI PA 788
Slc4a5 FSILLFCGIDACFG-LQTPKLHVNVIKPTRPD-RGWVVPFPGN---PWWVYPASILPA 831
Slc4a9 LAILLGCGLDAFLG-LATPKLLVPTFKPTLSG-RGWLVSPFGAN---PWWLSVAAALPA 692
Slc4a1 ISILIMVLVDSFIKGTYTQKLSVPDGLKVSNSARGWVIHPLGLYRLFPTWMMFASVLP 689
Slc4a2 IAILIMVLVDYSIEDTYTQKLSVPSGFSVTAPDKRGWVINPLGEKTPFPVMMVASLLPA 997
Slc4a3 ISILVMVLVDYSITDITYTQKLTVP TGLSVTSPHKRTWFI PPLGSARFPFPWMMVAAAVPA 988
: * . : * . : * * * * : . : * * . : * * : * * : * * : * *

Slc4a8 LLCTILIFMDQQITAVIINRKEHKLKKGCGYHLDLLMVAVMLGVCSIMGLPWVFAATVLS 848
Slc4a10 LLCTILIFMDQQITAVIINRKEHKLKKGCGYHLDLLMVAVMLGVCSIMGLPWVFAATVLS 851
Slc4a7 LLCTILIFMDQQITAVIINRKEHKLKKGAGYHLDLLMVGVMGLGVCSIMGLPWVFAATVLS 861
Slc4a4 LLVTILIFMDQQITAVIVNRKEHKLQKAGYHLDLFWVAIILMVICSLMALPWVFAATVIS 848
Slc4a5 LLVTILIFMDQQITAVIVNRKENKLRKAAGYHLDLFWVGIILMALCSFMGLPWVFAATVIS 891
Slc4a9 LLLSILIFMDQQITAVILNRAEYRLQKAGFHLDFCVAVLMLF T SALGLPWVVSATVIS 752
Slc4a1 LLVFILIFLESQITTLIVSKPERKMIKSGGFHLDLLLVGMGGVAALFGLPWLSATTVRS 749
Slc4a2 LVFVILIFMETQITTLIISKKERLQKSGGFHLDLLLVAMGGICALFGLPWLAATVRS 1057
Slc4a3 LVLVILIFMETQITALIVSKARLLKSGGFHLDLLLVIGSLGGLCLGLFGLPWLAATVRS 1048
: * * * * : * * : * * : : : * . * : * * : : : . . : * * : * * *

Slc4a8 ITHVNSLKLESECSAPGEQPKFLGIREQRVTGLMIFVLMGCSVFM TAVLKFIPMPVLYGV 908
Slc4a10 ITHVNSLKLESECSAPGEQPKFLGIREQRVTGLMIFILMGSSVFM T SILKFIPMPVLYGV 911
Slc4a7 ISHVNSLKVESECSAPGEQPKFLGIREQRVTGLMIFILMGLSVFM T SVLKFIPMPVLYGV 921
Slc4a4 IAHIDSLKMETETSAPGEQPKFLGVREQRVTGLVLLLTGLSVFM A PILKFIPMPVLYGV 908
Slc4a5 IAHIDSLKMETETSAPGEQPKFLGVREQRVTGVMVFILTGISVFL APILKYIPMPVLYGV 951
Slc4a9 LAHIDSLRRESKACIPGEAPNFLGIREQRVTGLVVFVLTGVSI FLAPVLKVF----- 804
Slc4a1 VTHANALTVMGKASGPGAAAQIQEVKEQRISGLLVSVLVGLSILMEPILSRIPLAVLFGI 809
Slc4a2 VTHANALTVMSKAVAPGDKPKIQEVKEQRVTGLLVALLVGLSMVI GDLRQIPLAVLFGI 1117
Slc4a3 VTHVNALTVMRTAIAPGDKPKIQEVREQRVTGVLIASLVGLSIVMGAVLRRIP LAVLFGI 1108
: * : * * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * *

Slc4a8 FLYMGVSSLQGIQFFDRILKLFMPAKHQPDFIYLRHVPLRKVHLFTLVQLTCLVLLWVIK 968
Slc4a10 FLYMGASSLQGIQFFDRILKLFMPAKHQPDFIYLRHVPLRKVHLFTVIQMSCLGLLWIK 971
Slc4a7 FLYMGVSSLQGIQFFDRILKLFMPAKHQPDFIYLRHVPLRWVHLFTLVQLTCLVLLWVIK 981
Slc4a4 FLYMGVASLNGVQFMDRLKLLMLPKHQPDFIYLRHVPLRRVHLFTLVQLVCLALLWILK 968
Slc4a5 FLYMGVASLNGIQFWRCKLFLMPAKHQPDHAFRLHVPLRRIHLFTLVQILCLALLWILK 1011
Slc4a9 -----KRVQLLLMPRKHQPDMLLLRHVPLSRVHLFTAIQLACLGLLWVVK 849
Slc4a1 FLYMGVTSLSGIQFFDRILLLFKPKYHPDVPFVKRVKTWRMHLFTGIQIICLAVLWVVK 869
Slc4a2 FLYMGVTSLNGIQFYERLHLLMLPKHHPDVTYVKKVRTMRMHLFTALQLLCLALLWAVM 1177
Slc4a3 FLYMGVTSLSGIQLSQRLLLIFMPAKHHPQPYVTKVKTWRMHLFTCIQLGCIALLWVVK 1168
: : : : : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * *

Slc4a8 ASPAAIVFPMVLALVFVR-KVMDLFCFSKRELSWLDLMPESKKKKLDDAKKKEEEEEAEK 1027
Slc4a10 VSRAAIVFPMVLALVFVR-KLMDLFTKRELSWLDLMPESKKKKLEDAEKEEEQSMLA 1030
Slc4a7 ASAAAVFPMVLALVFVR-KLMDLFCFKRELSWLDLMPESKKKKEDDKKKKEKEEAER 1040
Slc4a4 STVAAIIFPVMI LALVAVR-KGMDYLF SQHDLSFLDDVIPEKDKKKKEDEKKKKKKKGS 1027
Slc4a5 STMAAIIFPVMI LGLIIVR-RLDLIFS QHDLAWINILPEKEK--KESDRKKRRKEVHE 1068
Slc4a9 STPAAIVFPLMLLGLVAIR-KALEWVFSQELLWLDELMPEEEE--TIPENRSEPEHLFS 906
Slc4a1 STPASLALPFVLIITVPLRRLIPLIFRELELQCLDGDDAKVTFDEENGLDEYDEVMPV 929
Slc4a2 STASLAFPFILITVPLRMVLTTRIFTEREMKCLDANEAEVDFCEBGVDEYNEMPMV 1237
Slc4a3 STASLAFPFLLLTVPLRRLPLRFQDRELQALDSEDARWSGRVQRAAHACVTCRMVP 1228
: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

Slc4a8	ML--DIGGDKFPLESRKLLSSPGKSSSFRCDPSEINISDEMPKTTVWKALSINSGNTKEK	1085
Slc4a10	ME--DEGTVQLPLEG-----HYRDDPSVINISDEMSKTAMWGNLLVTADNSKEK	1077
Slc4a7	MLQDDEDTVHLPFERGSLQLQIPVKTLKYSIDPSVVNISDEMAKTAQWKALSMNTENAKVT	1100
Slc4a4	DSDNDDSDC-----PYSEKVPSIKIPMDIMEQQPFLSDNKPLDRERSS	1070
Slc4a5	NTDKE-----PQFLPPSVVKIPMEGIPSDP-QNGIHCVGRKRSS	1106
Slc4a9	GNDESESEL-----MYQKAPPEINISVN-----	929
Slc4a1	-----	
Slc4a2	-----	
Slc4a3	LRDPTLAIHRP-----	1239
Slc4a8	-SPFN-----	1089
Slc4a10	ESRFPSKSSPS-----	1088
Slc4a7	RPNTSPEKPVSVTINFEDEPSKKYMDAETSL	1131
Slc4a4	TFLERHTSC-----	1079
Slc4a5	SWSHSL-----	1112
Slc4a9	-----	
Slc4a1	-----	
Slc4a2	-----	
Slc4a3	-----	

* = Die Aminosäuren sind an dieser Position für alle Sequenzen identisch.

⋮ = An dieser Position kam es, entsprechend der nachfolgenden Einteilung der Aminosäuren, zu konservierten Aminosäureaustauschen:

Aminosäuren	AVFPMILW:	Klein + hydrophob,
Aminosäuren	DE:	Sauer,
Aminosäuren	RHK:	Basisch,
Aminosäuren	STYHCNGQ:	Hydroxyl + Amine + Basisch.

▪ = An dieser Position fanden semi-konservierte Aminosäureaustausche statt.

Rot = Epitop des anti-NCBE-Antikörpers.

7.2 Veröffentlichungen

HÜBNER C. A., HENTSCHKE M., JACOBS S., HERMANS-BORGMAYER I. (2004). Expression of the sodium-driven chloride bicarbonate exchanger NCBE during prenatal mouse development. *Gene Expr Patterns*, **5** (2), 219-23.

7.3 Danksagung

Ich bedanke mich bei Christian Hübner für die Überlassung eines sehr vielversprechenden Projektes und für die Möglichkeit zur Anfertigung einer Doktorarbeit. Besonders bedanke ich mich für seine ständige Unterstützung in Rat und Tat.

Beim gesamten Graduiertenkolleg 336 und vor allem bei Herrn Professor Seitz bedanke ich mich für die gute Atmosphäre und für die Hilfsbereitschaft ohne viel Bürokratie.

Ich danke Herrn Professor Gal für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für seine Unterstützung.

Ich danke allen Mitarbeitern der Humangenetik für eine nette Zusammenarbeit. Besonders bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe Hübner für eine tolle Unterstützung und für das gute Arbeitsklima. Ich möchte besonders Alexandra Kougioumtzes, Ingo Kurth, Moritz Hentschke, Christopher Hennings und Jana Schroth danken, die mir bei vielen Problemen und Fragen geholfen haben.

Michaela Schweizer und Irm Hermans-Borgmeyer möchte ich ebenfalls für die nette Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft danken.

Ich möchte auch Martin Wiemann für die Möglichkeit zur pH-Messung, sowie Herrn H. Jahn für die Verhaltensversuche, Herrn K. Rüter für das ERG, Frau Vesterinen für die Kernspintomographie, Herrn Kaila für eine fruchtbare Kooperation und den Tierpflegern für die gute Zusammenarbeit danken.

Für die Begutachtung meiner Dissertation möchte ich Thorsten Burmester danken.

Das Erstellen dieser Arbeit wäre ohne die Unterstützung meiner Freunde und meiner Familie niemals möglich gewesen. Vielen Dank.

Meine größte Stütze war und ist meine Freundin Andrea. Vielen Dank, dass Du den Schritt mit mir nach Hamburg gewagt hast.