

Aus dem Institut für Humangenetik  
Zentrum für Frauen-, Kinder-, und Jugendmedizin  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Gal

# **Charakterisierung des Ionentransporters** *Slc4a11*

## **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Aus dem Fachbereich der Medizin der Universität Hamburg  
vorgelegt von

Annette Hofer aus Braunschweig  
Hamburg, 2007

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 28.07.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss: Der Vorsitzende: Prof. Dr. A. Gal

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. W. Hampe

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. A. Hübner

---

Meinen Eltern  
Meiner Großmutter  
Jan

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1. pH-Regulation	3
1.2. Die <i>SLC4A</i> -Genfamilie	3
1.3. Der NaBC1 – <i>SLC4A11</i>	6
1.4. Das Element Bor und seine Eigenschaften	8
1.5. Zielsetzung	9
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1. Material	11
2.2. Methoden	16
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>29</b>
3.1. <u>Klonierung der Volllänge-cDNA der Maus</u>	<u>29</u>
3.2. <u>Identifizierung von alternativen Spleißvarianten</u>	<u>31</u>
3.2.1. Exon 1a	35
3.2.2. Exon 3a	35
3.2.3. Exon 10a	35
3.2.4. <i>Splice-sites</i>	36
3.3. <u>Expressionsanalyse</u>	<u>38</u>
3.3.1. Northern Blot	38
3.3.2. In-Situ-Hybridisierung	40
3.3.2.1. Niere	41
3.3.2.2. Hoden	44
3.3.2.3. Nebenniere	46
3.3.2.4. Glandula submandibularis	47
3.3.2.5. Plazenta	47
3.3.2.6. Gehirn	49
3.4. <u>Klonierung eines Phagenklones</u>	<u>50</u>
3.5. <u>Planung eines Targeting-Vektors für ein Knock-Out-Konstrukt</u>	<u>50</u>
<b>4. Diskussion</b>	<b>54</b>
4.1. <u>Alternative Spleißvarianten</u>	<u>54</u>
4.2. <u>Expressionsanalyse</u>	<u>56</u>
4.2.1. Niere	57
4.2.2. Hoden	57
4.2.3. Nebenniere	57
4.2.4. Glandula submandibularis	58
4.2.5. Plazenta	58
4.2.6. Gehirn	59
4.3. <u>Interaktionen und mögliche Funktionen von Borat</u>	<u>59</u>
4.3.1. Interaktionen auf molekularer Ebene	59
4.3.2. Bor im Zellwachstumszyklus	59
4.3.3. Fragliche Beeinflussung von Tumorwachstum	60
4.3.4. Mögliche Rolle im Steroidhaushalt	61
4.3.5. Mutationen im <i>SLC4A11</i> -Gen im Zusammenhang mit kongenitaler Endotheldystrophie	62
4.4. <u>Strategie für einen konditionellen Knock-Out</u>	<u>63</u>
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>65</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>66</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>71</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>78</b>
<b>9. Lebenslauf</b>	<b>79</b>
<b>10. Erklärung nach §4 der Promotionsordnung</b>	<b>80</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. pH-Regulation

Der korrekte extra- und intrazelluläre pH ist für die Aufrechterhaltung der meisten Zellfunktionen essenziell (Alper, 2002, Review zur Übersicht). Unterschiedliche Puffersysteme sind an der Einstellung des pH beteiligt. Eine bedeutende Rolle nimmt dabei das  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  - System ein, da es ein „offenes System“ ist. Es kann in beiden Stoffwechselsituationen – Azidose und Alkalose – eine Regulation nach Außen erfolgen. Im Falle einer Azidose wird  $\text{CO}_2$  und damit Säureäquivalente durch die Lunge abgeatmet und Bikarbonat in der Niere rückresorbiert, im Falle einer Alkalose wird  $\text{HCO}_3^-$  als Basenäquivalent über die Niere ausgeschieden und  $\text{CO}_2$  in der Lunge retiniert.

Für die pH-Regulation haben die Mitglieder der *Solute Carrier 4A (SLC4A)* – Genfamilie eine große Bedeutung, da sie durch den transmembranösen Transport von Bikarbonat die Zellen ansäuern (*Anion Exchanger 1-3 (AE1-3)*) oder alkalinisieren können (*Electrogenic Natrium-Bicarbonate Cotransporter 1-2 (NCBE1-2)*, *Natrium-dependent Chloride-Bicarbonate Exchanger (NDCBE)*, *Electroneutral Natrium-Bicarbonate Cotransporter 1 (NCBn1)*, *Natrium-Chloride-Bicarbonate Exchanger (NCBE)*) (Romero *et al.*, 2004, Review zur Übersicht).

Die Bedeutung dieser Transporter wird durch Erkrankungen deutlich, die durch Funktionsverluste ihrer Gene verursacht werden. So führen Mutationen im *SLC4A1*-Gen (AE1) sowohl zu distal tubulären Azidosen als auch zu schweren Formen der Sphärozytose (Jarolim *et al.*, 1995; Tanphaichitr *et al.*, 1998; Cheidde *et al.*, 2003; Karet *et al.*, 1998). Ebenso konnten Mutationen im *SLC4A4* – Gen (NBCe1) nachgewiesen werden, die zu proximal renal tubulärer Azidose mit bilateralem Glaukom und mentaler Retardierung führen (Igarashi *et al.*, 2001).

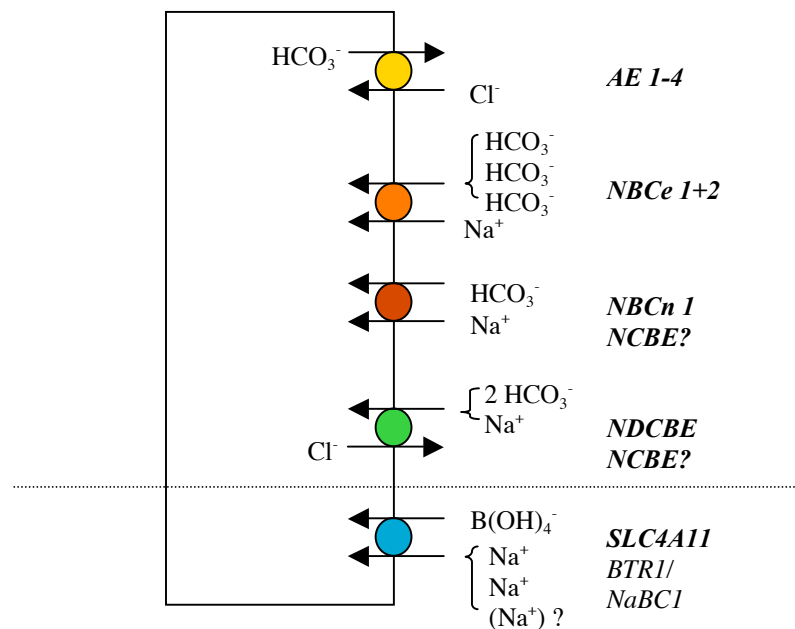
Wie man an diesen schwerwiegenden Krankheiten erkennen kann, nimmt die Regulation des intra- und extrazellulären pH eine essenzielle Bedeutung im Stoffwechsel ein und somit auch die Funktion der beteiligten Transporter.

### 1.2. Die *SLC4A*-Genfamilie

Die Proteine der *SLC4A*-Genfamilie sind integrale Membranproteine, die den transmembranösen Transport von Bikarbonat mit oder im Austausch gegen Chlorid- und/ oder Natrium-Ionen vermitteln. Damit sind sie sowohl an der Regulation des

intrazellulären pH als auch am Gasaustausch in der Lunge beteiligt (Romero *et al.*, 2004, Review zur Übersicht; Tanner MJ, 1993, Review zur Übersicht).

Die *SLC4A*-Genfamilie umfasst zehn Mitglieder, darunter vier  $\text{Na}^+$ -unabhängige Anionenaustauscher (AE1-3/ *SLC4A1-3*, AE4/ *SLC4A9*), die elektroneutral intrazelluläres Bikarbonat gegen extrazelluläres Chlorid austauschen und somit die Zellen azidifizieren (Romero *et al.*, 2004, Review zur Übersicht). Desweiteren gibt es zwei  $\text{Na}^+$ -abhängige Anionenaustauscher (NDCBE/ *SLC4A8*, NCBE/ *SLC4A10*) und drei elektrogene bzw. elektroneutrale  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  - Kotransporter (NBCe1/ *SLC4A4*, NBCe2/ *SLC4A5*, NBCn/ *SLC4A7*), die Zellen alkalinisieren. Das jüngste Mitglied der Familie ist *SLC4A11* (BTR1/ NaBC1) (Romero *et al.*, 2004, Review zur Übersicht).



**Abb. 1.1.:**

Nach Romero *et al.*, 2004 und Park *et al.*, 2004.: – Schematische Darstellung der Mitglieder der *SLC4A* – Genfamilie. Der Kasten symbolisiert eine Zelle.

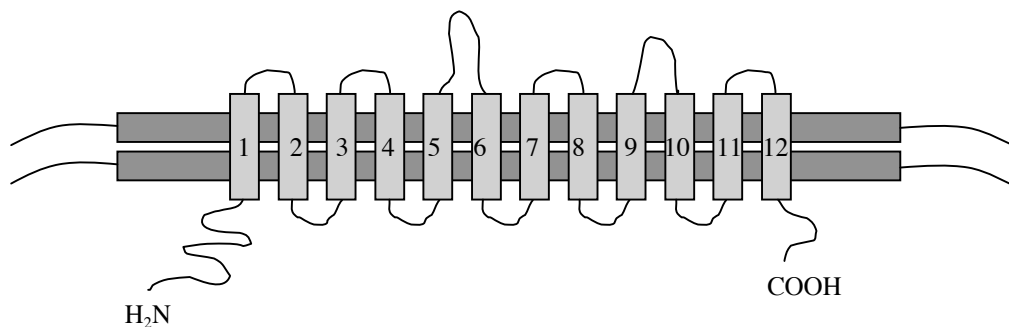
Eine interessante Eigenschaft der Gene der *SLC4A*-Familie ist das komplexe Transkriptionsverhalten. Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die Transkripte der Gene *SLC4A1-3* multipel alternativ gespleißt werden (Cox KH *et al.*, 1995; Linn SC *et al.*, 1992; Wang Z *et al.*, 1996). Dabei sind bei den alternativen Spleißvorgängen der mRNA die codierenden Bereiche für den C- oder N-Terminus der Proteine betroffen,

während die den Transmembrandomänen entsprechende Sequenz, meist unverändert bleibt (Morgans CW *et al.*; 1993, Stewart *et al.*, 2002).

So sind zum Beispiel der humane AE1 in der Niere und der im Erythrozyten Proteine alternativer Transkripte, unterschiedliche Promotoren sorgen für die unterschiedliche Expression der Gene (Romero *et al.*, 2004, Review zur Übersicht; Kollert-Jons *et al.*, 1993). Die Transkription von AE1 wird von drei verschiedenen Promotoren initiiert (P 1-3), wovon zwei erythrozytenspezifisch sind, während ein anderer sowohl die Expression von AE1 in der Niere als auch im Erythrozyten reguliert (Cox KH *et al.*, 1995). Der N-terminalen Sequenz der AE1-Subtypen wird eine Funktion in der subzellulären Lokalisation zugeschrieben (Cox KH *et al.*, 1995).

Für AE2 gibt es mindestens drei Isoformen, AE2a, AE2b und AE2c, die sich in ihrem N-Terminus unterscheiden und unterschiedliche Expressionsmuster zeigen. So ist der AE2a ubiquitär exprimiert, während die Expression von AE2b vorwiegend im Gastrointestinaltrakt, Leber und Niere nachweisbar ist. Die AE2c – Isoform ist spezifisch für den Magen (Wang *et al.*, 1996).

Der molekulare Aufbau der Proteine der *SLC4A* – Genfamilie zeigt deutliche Gemeinsamkeiten. Sie bestehen aus ca. 900 – 1250 Aminosäuren und weisen ein langes N-terminales intrazelluläres Ende und einen wesentlich kürzeren intrazellulären C-Terminus auf. Dazwischen durchspannen 10 – 14 Transmembrandomänen die Membran (Romero *et al.*, 2004, Review zur Übersicht; Zhu *et al.*, 2003).



**Abb. 1.2.:**  
Topologie-Modell der Mitglieder der *SLC4A*-Genfamilie

Die Mitglieder der *SLC4A* – Familie sind je nach Funktion in den verschiedensten Geweben exprimiert, so zum Beispiel AE1 unter anderem im Erythrozyten, wo er zum Gasaustausch in der Lunge beiträgt (*Hamburger Shift*), AE4 ausschließlich in der Niere, er dient wahrscheinlich der Regulation des intrazellulären pH, NDCBE im Gehirn, in den

Hoden, dem Ovar und der Niere, um hier nur einige Beispiele zu nennen (Romero *et al.*, 2004, Review zur Übersicht).

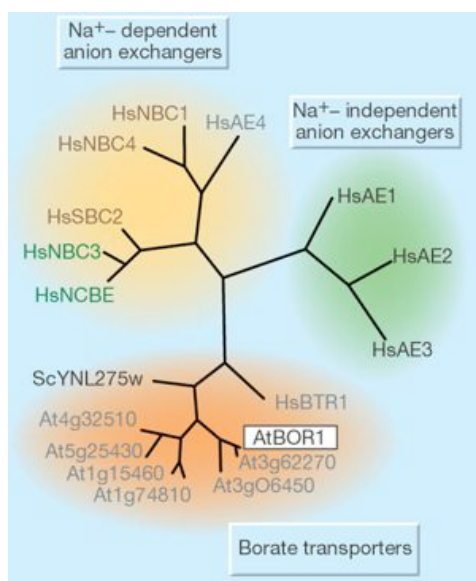
### 1.3. Der NaBC1 – *SLC4A11*

In der zu Beginn der Arbeit vorliegenden Literatur wurde *SLC4A11* als ein neues Mitglied der *SLC4A*-Genfamilie beschrieben. Es wurde vermutet, dass das Translationsprodukt auch die Eigenschaft eines Bikarbonat-Transporters hat, er erhielt deswegen die Bezeichnung BTR1 (*Bicarbonate Transporter Related Protein 1*) (Parker *et al.*, 2001).

Im Verlauf der Erstellung dieser Arbeit veröffentlichten Park *et al.* 2004 jedoch eine funktionelle Charakterisierung des BTR1, in der eine Transportfähigkeit für Borat im elektrogenen Symport mit Natrium nachgewiesen wurde, worauf eine Umbenennung in NaBC1 (*Natrium Borate Cotransporter 1*) vorgenommen wurde (Park *et al.*, 2004).

Schon 2002 haben Frommer *et al.* eine höhere phylogenetische Ähnlichkeit des NaBC1 (damals noch BTR1 genannt) mit dem AtBOR1 aus *Arabidopsis thaliana* als mit den Anionenaustauschern der *SLC4A*-Genfamilie festgestellt, was schon damals die Vermutung zuließ, BTR1/ NaBC1 könne ein Boratransporter sein. Zudem war bei Untersuchungen in *Xenopus* Oozyten keine eindeutige funktionelle Charakterisierung in Hinsicht auf Chlorid bzw. Bikarbonat – Transport möglich (Parker *et al.*, 2001).

Funktionelle Analysen der Arbeitsgruppe von Park konnten 2004 zeigen, dass der NaBC1 in Abwesenheit von Borat ( $\text{B(OH)}_4^-$ )  $\text{Na}^+$ ,  $\text{OH}^-$  und  $\text{H}^+$  transportiert, in Anwesenheit von Borat jedoch spannungsabhängig  $\text{Na}^+$  und  $\text{B(OH)}_4^-$  von extra- nach intrazellulär transportiert (Park *et al.*, 2004), s. Abb. 1.1..



**Abb. 1.3.:**

**Frommer *et al.*, 2002:** Phylogenetische Analyse des BTR1/ NaBC1

YNL275w - Hefe - Protein

HaBTR1 - humanes BTR1

Braun -  $\text{Na}^+$  - Bikarbonat Kotransporter

Grün -  $\text{Na}^+$ - abhängige Anionenaustauscher

Grau - Proteine mit unbekannter Funktion

Hs, human; Sc, yeast; At, Arabidopsis.



Um die Spezifität des Transporters für Borat zu überprüfen, wurde untersucht, inwieweit NaBC1 chemisch ähnliche Moleküle transportieren kann. Die Wahl fiel auf Arsenat, ein anderes Halbmetall mit einem Bor ähnlichen pKs-Wert von 9,23. Die Ergebnisse zeigten, dass der Transporter kein Arsenat transportieren kann, eine Spezifität für Borat ist jedoch damit noch nicht ausreichend bewiesen, da keine anderen Substrate untersucht wurden und nicht klar ist, welche Selektionskriterien für die Auswahl des Substrates vorliegen. Jedoch kann die Tatsache, dass dieses chemisch sehr ähnliche Element nicht befördert wird, als Hinweis für die Spezifität dienen.

Das Gen, welches für den NaBC1 codiert - *SLC4A11* - liegt beim Menschen auf dem kurzen Arm von Chromosom 20 (20p12) (Parker *et al.*, 2001) und bei der Maus auf Chromosom 2. Die Amplifikation und Klonierung der cDNA ist Parker *et al.* aus einer humanen cDNA – Nierenbank gelungen. Diese mRNA besteht aus einer 49 Nukleotiden langen 5'-UTR, einer 369 Nukleotiden langen 3'-UTR vor dem Poly-A-Schwanz und einer translatierten Sequenz von 2673 Nukleotiden, welche für ein Protein mit 891 Aminosäuren kodiert (Parker *et al.*, 2001). Durch Hydropathie-Analysen wurden 14 putative Transmembrandomänen beim Menschen vorhergesagt (Parker *et al.* 2001).

Die kodierende mRNA der Maus (XM\_194050.2), auf die sich die Untersuchungen in dieser Arbeit beziehen, umfasst 2475 Nukleotide, entsprechend einem Protein von 825 Aminosäuren. Datenbankanalysen sagen beim murinen NaBC1 elf Transmembrandomänen vorher, beginnend ab Exon 10 (Krogh *et al.*, 2001; Sonnhammer *et al.*, 1998). Dieses machte wiederum die Zuordnung in die Anionenaustauscher-Gruppe *SLC4A* plausibel, da alle Mitglieder 10-14 Transmembrandomänen besitzen.

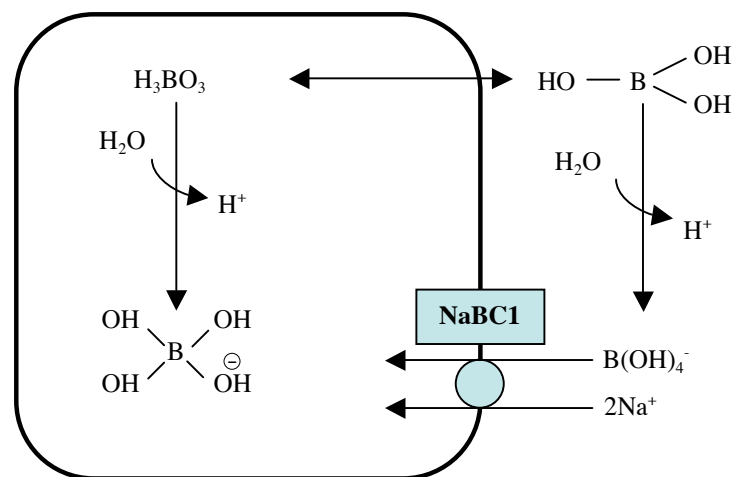
In Dot-Blot Analysen für menschliches Gewebe wurde eine starke Expression in der Niere, Schilddrüse, den Speicheldrüsen, Hoden und der Trachea festgestellt. Schwächere Signale fand man im Cerebellum, Ösophagus und Brustdrüse (Parker *et al.*, 2001). Park *et al.* fanden 2004 durch quantitative PCR eine ubiquitäre Expression. Immunopräzipitation und Western-Blot Analysen weisen auf eine Expression des Proteins in Niere, Parotis, Glandula submandibularis, Pankreas, Leber und Milz der Ratte hin. Die Immunhistochemie machte eine genauere Lokalisation in der Gl. submandibularis und der Niere möglich, wonach NaBC1 in der basolateralen Membran der Acini der Glandula submandibularis und der Nierentubuli exprimiert ist. Über alternative Spleißvarianten ist bisher nichts bekannt.

#### 1.4. Das Element Bor und seine Eigenschaften

Bor ist ein Halbmetall der III. Hauptgruppe, welches in der Natur praktisch nicht elementar vorkommt. Am häufigsten, obwohl im Vergleich mit anderen Elementen seiner Hauptgruppe immer noch relativ selten, kommt Bor als Borsäure und Mineral wie Borax (Natriumtetraborat) oder Ulexit vor.

Es spielt eine wichtige Rolle in der Pflanzenphysiologie, zum Beispiel als strukturbildende Substanz in der Zellwand (Blevins, Lukaszewski, 1998). Obwohl die Funktion von Bor für den Wirbeltierorganismus noch längst nicht hinreichend geklärt ist, deuten viele Untersuchungen auch hier auf eine essentielle Bedeutung im Stoffwechsel hin (Fort *et al.*, 2002; Rowe RI *et al.*, 1999; Lanoue L. *et al.*, 1998) (siehe Kap. 4.3).

Borsäure ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), die dominierende Form von Bor im Plasma, ist eine schwache Säure mit einem pKs-Wert von 9,25, die bei einem pH von 7,4 hauptsächlich als ungeladenes  $\text{H}_3\text{BO}_3$  vorliegt (Park *et al.* 2004). Aufgrund dieser Tatsache vermutete man jahrelang, dass Borat wegen seiner lipophilen Eigenschaft über die Plasmamembran diffundieren kann, ohne einen speziellen Kanal oder Transporter zu benötigen. Der berechnete Permeabilitätskoeffizient ( $8 \times 10^{-6} \text{ sec}^{-1}$ ) diente als Grundlage zu der Annahme, dass die Borataufnahme in die Zelle ein passiver Prozess sei, was jedoch weder in biologischen Systemen noch in künstlichen Membranen belegt wurde (Dordas, Brown, 2000). Weitere Theorien sind, dass Borsäure im Kotransport mit Wasser durch Aquaporine in die Zelle gelangt (Dordas, Chrispeels *et al.*, 2000).



**Abb. 1.4.:** nach Park *et al.*, 2004: Modell zur Rolle des NaBC1 in der Borathomöostase von tierischen Zellen  
 $\text{H}_3\text{BO}_3$  - Borsäure  
 $\text{B(OH)}_4^-$  - Borat

Takano *et al.* (2002) haben eine Pflanze charakterisiert (*Arabidopsis thaliana*), die defizient für einen Transporter (*AtBOR1*) ist. Diese Pflanze kann bei normalen Bor-Konzentration im Boden von 30  $\mu\text{M}$  wachsen, zeigt jedoch Infertilität, die erst bei Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  Bor nicht mehr nachzuweisen ist. Die Kontrollpflanze (Col-0 – ecotype Columbia wild type) zeigte auch bei bordefizientem Medium (3  $\mu\text{M}$ ) ausreichendes Wachstum. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass Bor nicht, wie bisher angenommen, durch passive Diffusion in die Zelle gelangt, sondern unter anderem durch diesen Transporter. Man nimmt an, dass Borat bei Pflanzen ein Bestandteil der Zellwand ist, indem es als Borat-Polysaccharid-Komplex Pectin-Polymere in Zellwänden vernetzt und so zur Integrität dieser beiträgt (Blevins, Lukaszewski, 1998).

Wie oben erwähnt, deuten viele Untersuchungen auch beim Menschen auf eine Bedeutung im Stoffwechsel hin (Fort *et al.*, 2002; Rowe RI *et al.*, 1999; Lanoue L. *et al.*, 1998) (siehe Kap. 4.3).

### 1.5. Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten zum einen Transkripte des *SLC4A11* in Bezug auf alternative Spleißvarianten untersucht werden, da bisher noch keine Daten zum alternativen Spleißverhalten vorliegen.

Von anderen Transportern der *SLC4A*-Familie weiß man, dass unterschiedliche Proteinisoformen durch alternative Spleißvarianten zum Teil verschiedenste Funktionen und Expressionsmuster bedingen. Vor diesem Hintergrund würde die Analyse von alternativen Transkripten erste Hinweise auf eine differenzierte Funktion und Expression geben. Als Methode zur Identifizierung alternativer Transkripte wurde die 5'RACE-PCR gewählt, da somit die Möglichkeit bestand, auch in der 5'-UTR nach Spleißvarianten zu suchen, da in diesem Bereich die Transkripte der *SLC4A*-Genfamilie gehäuft alternative Spleißvorgänge zeigen.

Zum anderen sollte die Expression im murinen Gewebe untersucht werden. Da zu Beginn der Arbeit noch keine funktionellen Daten zum NaBC1 veröffentlicht waren, sollte uns die Expressionsanalyse erste Hinweise auf eine Funktion im Vertebraten geben. Dies wurde auf RNA-Ebene sowohl mit Northern Blots als auch mit In-Situ-Hybridisierung untersucht. Somit konnten wir mittels des Northern Blots zunächst für eine relativ große Anzahl an Organen eine allgemeine Aussage zur Expression treffen, um dann anhand der Ergebnisse eine Auswahl der für die In-Situ-Hybridisierung geeigneten Organe zu treffen.

Anschließend sollte ein Screening einer lambda-Phagenbank mit einer spezifischen Sonde helfen, einen geeigneten Klon genomischer DNA zur Generierung eines Knock-Out-Konstruktes zu finden. Zum Abschluss war geplant, eine Targeting-Strategie für das Konstrukt zu entwerfen, sodass die Funktion des NaBC1 in vivo untersucht werden kann.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Puffer, Medien und Lösungen

5 M NaCl	292,2 g NaCl ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 7,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
TAE x 50	2 M Tris Base 5,71 % Eisessig 50 mM EDTA
TE	20 mM Tris pH 7,5 1 mM EDTA
CTAB	5 % CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid) 0,5 M NaCl
Agarosegele	Je nach Gehalt des Gels entsprechend Agarosepulver von <i>Invitrogen</i> in 1 x TAE lösen und mit 2 $\mu$ l Ethidiumbromid/ 50 ml Gel versetzen
Auftragspuffer x 5 (für DNA)	40 % Sucrose 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylene X in TE
STET	8 % Sucrose 0,1 % Triton X 50 mM EDTA 50 mM Tris pH 8

SOC Medium	2 % Bacto-Trypton 0,5 % Bacto Hefe Extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl mit 5 N NaOH auf pH 7,0 einstellen - autoklavieren 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM Glukose
LB Medium	20 g <i>LB Broth Base</i> von <i>Invitrogen</i> Auf 1 l H <sub>2</sub> O - autoklavieren
Y-Broth	LB Medium 4 mM MgSO <sub>4</sub> 5 mM KCl
10 x MOPS	200 mM MOPS 50 mM NaAc 10 mM EDTA mit NaOH auf pH 7 einstellen
TFB 1	15% Glycerin 10 mM CaCl <sub>2</sub> 20 mM Kaliumacetat mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen 100 mM RbCl 50 mM MnCl <sub>2</sub>
TFB 2	15% Glycerin 10 mM MOPS 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM RbCl

Antibiotika	Ampicillin 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
20x SSC	175,3 g NaCl 88,2 g Tri-NaCitrat $2\text{H}_2\text{O}$ Endkonzentration 0,3 M
4 % PFA	40 g Paraformaldehyd ad 1000 ml $\text{H}_2\text{O}$ steril filtrieren
50x Denhardt's	5 g Ficoll 5 g PVP (Polyvinylpyrrolidone) 5 g BSA ad 500 $\text{H}_2\text{O}$ - steril filtrieren
3 M Na Acetat	408,1 g NaAcetat x 3 $\text{H}_2\text{O}$ ad 800 ml $\text{H}_2\text{O}$ pH 5,2 oder 7,0 mit Essigsäure einstellen, bis 1000 ml mit $\text{H}_2\text{O}$ auffüllen
DTT 1 M	1,54 g DTT ad 10 ml $\text{H}_2\text{O}$ (Molekulargewicht: 154,3 g)
Dextransulfat 50%	20 g Dextransulfat ad 40 ml $\text{H}_2\text{O}$
Hybridisierungs-Mix	4 x SSC 50 % Formamid 5 % Dextransulfat 0,5 mg/ ml single-strand DNA 0,25 mg/ ml <i>baker yeast</i> tRNA (Roche)

RNase A-Puffer	25 ml 5 M NaCl 500 $\mu$ l 0,5 M EDTA, pH 8,0 2,5 ml 1 M Tris, pH 8, ad 250 ml H <sub>2</sub> O
1 M Triethanolamin	185,65 g Triethalonamin-HCL ad 1000 ml H <sub>2</sub> O auf pH 8 einstellen mit 10M NaOH
Speed Hyb Mix II	7 Vol% SDS 10 Vol% PEG 20000 75 ml 20 x SSPE ad 1000 ml
20 x SSPE	175,3 g NaCl 27,6 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 7,4 g EDTA, mit 2 N NaOH auf pH 7,4 einstellen
SM-Puffer	0,5 % NaCl 20 mM MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 1 mM Tris pH 7,5 0,01 % Gelatine
10 % SDS	50 g SDS ad 500 ml H <sub>2</sub> O
Soft-Agar	LB-Medium 0,8 % Agarose
10 mM MgSO <sub>4</sub>	2,46 g MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
T2	25 % Polyethylene-Glycol (PEG 6000) 2,5 M NaCl



---

T3	50 mM Tris/ HCL 150 mM NaCl 30 mM EDTA, pH 7,7
T4	2% SDS
S3	3 M Na-Acetat, pH 5,2
L1	100 mM Tris/ H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 400 mM KCl, pH 6,3 15 % Ethanol
L2	100 mM Tris/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 900 mM KCl, pH 6,3 15% Ethanol
L3	100 mM Tris/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 1000 mM KCl, pH 6,3 15% Ethanol

## 2.2. Methoden

### cDNA-Synthese aus RNA

Es wurde die *SuperScript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase* von *Invitrogen* verwendet und nach Protokoll des Herstellers verfahren. Es wurden sowohl oligo-dt-Primer als auch random-Primer verwendet.

### Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde mit Taq-Polymerase oder Pfu-ultra-Polymerase (beide von *Stratagene*) nach folgendem Schema durchgeführt:

Ansatz:

- 5  $\mu$ l 10 x Polymerase-Puffer
- 1  $\mu$ l dNTPs (je 10  $\mu$ M) (*Invitrogen*)
- 1  $\mu$ l Template (ca. 100 ng)
- je 1  $\mu$ l Vor- und Rückprimer (10  $\mu$ M)
- 1  $\mu$ l DMSO (*Roth*)
- 3  $\mu$ l Polymerase
- 38  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Die PCR wurde in einem T-Gradientencycler von *Biometra* nach folgendem Protokoll ausgeführt:

1. 95°C 10 min.
2. 95°C 30 sec.
3. X°C 30 sec. (X°C = Annealing-Temperatur der Oligonukleotid-Primer, je nach Primerlänge und Zusammensetzung unterschiedlich)
4. 72°C 1 min./1000bp des zu amplifizierenden „Templates“ bei PCR mit Taq und ca. 1 min./500bp bei PCR mit Pfu-ultra  
→ zurück zu Schritt 2 ca. 24-34 x
5. 72°C 10 min. finale Extension
6. 4°C Kühlung der Produkte bis zur weiteren Verwendung

### Sequenzierung von PCR-Fragmenten

Zur Sequenzierung wurde eine Sequenzierungs-PCR nach der Didesoxymethode nach Sanger wie folgt angesetzt:

1 $\mu$ l Template

6 $\mu$ l BigDye (*ABI Prism Dye Terminator Kit*)

1 $\mu$ l Primer

12 $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Die PCR wurde anschließend nach folgenden Protokoll durchgeführt:

96°C 1 min.

96°C 10 sec.

50°C 10 sec.

60°C 4 min.

x 25

60°C 4 min.

Um das PCR-Produkt anschließend zu fällen, wurden 30 $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 5 $\mu$ l 3M NaAcetat und 100  $\mu$ l 100% Ethanol hinzugegeben, die Proben gut gevortext und 20 Min. bei 13.000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proben nochmals eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Überstandes wurde mit 250 $\mu$ l 70% Ethanol gewaschen, gevortext und 15 min. bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet nochmals eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand wiederum verworfen und das Pellet dann 30 min bei RT getrocknet. Die Sequenzierung wurde mit dem *ABI Prism 377 DNA Sequenzer* der Firma *PE Applied Biosystems (Weiterstadt)* durchgeführt.

### Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in Agarosegelen mit 1 x TAE als Laufpuffer. Diese waren je nach erwarteter Länge der Fragmente 1-2%ig und mit je 2  $\mu$ l Ethidiumbromid/ 50 ml Agarosegel versetzt. Die Proben wurden mit 5x Auftragspuffer versetzt, aufgetragen und bei 80 – 130 V aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht interpretiert und fotografiert, bei Bedarf wurden einzelne Banden ausgeschnitten und mit dem *QIAquick Gel extraction Kit* von *Quiagen* laut Angaben des Herstellers extrahiert.

### **Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmide**

Die Ligationen wurden mittels des T4-Ligase-Systems von *Roche* durchgeführt. Hierzu wurden Insert und Plasmid im Verhältnis 3:1 in 1x Ligase-Puffer und 1/10 Volumen T4-Ligase über Nacht bei 16°C inkubiert. Zur Einklonierung von PCR-Produkten wurde das Topo- bzw. pGEM-Teasy - Kit verwendet. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Bei mit Pfu-ultra amplifizierten Fragmenten musste erst noch über einen Zwischenschritt ein Adenosin-Überhang synthetisiert werden, da sowohl der Topo- als auch der pGEM-Teasy-Vektor einen Thymin-Überhang haben, um mittels Taq amplifizierte Fragmente aufzunehmen. Dazu wurde 35µl PCR-Fragment 30 Minuten mit 1µl Taq-Polymerase und 1µl dATP bei 72°C inkubiert.

### **Restriktionsverdau von Nukleinsäuren**

Es wurde den Angaben des Herstellers des jeweiligen Enzyms gefolgt (*New England Biolabs*).

### **Dephosphorylierung von DNA-Enden von Vektoren**

Ein 100 µl-Verdau eines beliebigen Vektors wurde mit 1 µl alkalischer Phosphatase und 20 µl 5fach-Puffer versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Angeschlossen wurde zur Inaktivierung der alkalischen Phosphatase ein zweiminütiger Inkubationsschritt bei 65°C. Zur Aufreinigung wurde die Lösung anschließend phenolisiert.

### **Phenolisieren**

Diese Methode findet Anwendung bei der Trennung von Proteinen und Nukleinsäuren. Verwendet wurden *Phase Lock* Gel-Säulen der Firma *Eppendorf*. Diese enthalten eine Gelmatrix, die die Trennung von wässrigen und organischen Anteilen eines Lösungsgemisches erlaubt. Zur Vorbereitung wurden die Säulen bei 13.000 rpm 60 Sekunden (sec.) zentrifugiert, sodass sich die Gelmatrix am Boden absetzte. Dann wurde eine Volumeneinheit (Vol.) des aufzureinigenden Ansatzes auf die Matrix gegeben, dazu ein Vol. eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) von *Sigma*. Beim Schwenken bildete sich eine milchige Suspension, welche 5 min. bei 13.000 rpm zentrifugiert wurde. Die Gelmatrix trennte zwei Phasen, eine wässrige, die die Nukleinsäuren enthielt und sich über der Matrix befand und eine organische, die Proteine und andere Verunreinigungen enthielt, die sich unter der Matrix befand. Auf die wässrige Phase wurde nun 1 Vol. eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) von *Sigma*

zugegeben und wiederum bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase, die sich wiederum oberhalb der Matrix befand, wurde in ein *Eppendorf* –Tube überführt. Zur Isolierung wurde die DNA mit 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2 Vol. 100% Ethanol gefällt und 10 min. bei RT mit 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet mit 1/3 Vol. 70% Ethanol gewaschen und anschließend 1 min. bei RT mit 13.000 rpm zentrifugiert. Nach erneutem Absaugen wurde das Pellet bei Raumluft getrocknet und anschließend in H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei –20°C.

### **Herstellung von kompetenten Bakterien**

Zunächst wurden Bakterien des Stammes *Escheria coli XL1 blue* auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden dann 6 einzelne Kolonien in je ein steriles Reagenzglas mit 2 ml Y-broth angeimpft und ca. 2 Stunden bei 37°C bei 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden die sechs Vorkulturen in einen Kolben mit 500 ml Y-broth umgefüllt und bis zu einer OD bei 600 nm von 0,3-0,5 wiederum bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde dann in 50 ml *Falcon*-Röhrchen aufgeteilt, drei Minuten auf Eis gestellt und 5 Minuten bei 4°C und 3000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Pellets in je 15 ml TFB1 resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 60 – 90 min. auf Eis wurde ein weiteres Mal bei 3000 rpm und 4°C pelletiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in je 2 ml TFB2 resuspendiert. Die Bakterien wurden nun in 200 µl Aliquots aufgeteilt, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei –80°C gelagert.

### **Transformation kompetenter Bakterien**

Verwendet wurde der Stamm *E.coli XL1 blue*. Zu 50 µl auf Eis aufgetauter Bakterien wurden 5 µl eines Ligationsansatzes hinzupipettiert und 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 5 min. auf 37°C erwärmt. Dann wurden 950 µl SOC – Medium hinzugegeben und der Transformationsansatz bei 37°C 30 min. unter Schütteln inkubiert. Bei der Transformation von DNA-Präparationen betrug die Menge der zu transformierenden DNA 0,5 µg. Zwischen 100 µl und 1 ml des Ansatzes wurden auf einer mit entsprechendem Antibiotikum angesetzten Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **Blau-Weiß-Selektion**

Die Blau-Weiß-Selektion wendet man an, um vor der DNA – Präparation aus den Bakterien schon einen Hinweis zu erhalten, ob das Insert in den transformierten Vektor einligiert wurde. Dazu wurden neben dem Transformationsansatz zusätzlich 35  $\mu$ l X-Gal (25mg/ml, gelöst in Dimethylformamid) und 35  $\mu$ l IPTG 0,1M auf der Agar-Platte ausgestrichen. pGEM-Teasy ist ein Beispiel für einen Vektor, mit dem eine Blau-Weiß-Selektion möglich ist. Er hat eine lacZ-Kassette, deren Genprodukt  $\beta$ -Galaktose in der Lage ist, Galaktose zu metabolisieren und einen blauen Farbstoff herzustellen. Am nächsten Tag waren auf der Platte blaue und weiße Klone zu erkennen, die weißen können die Galaktose (X-Gal) nicht mehr metabolisieren, weil das Insert im Vektor den Leserahmen so verschoben hat, dass die lacZ-Kassette nicht mehr In-Frame war und somit die  $\beta$ -Galaktosidase nicht mehr abgelesen wird. Somit waren diese Klone mit relativ großer Wahrscheinlichkeit positiv für das Insert. In dieser Arbeit wurde die Blau-Weiß-Selektion nur bei Ligationen mit dem pGEM-Teasy (*Promega*) verwendet.

### **Minipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Einzelne Kolonien transformierter Bakterien, die über Nacht gewachsen sind, wurden gepickt, in je 2,5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml dieser Kulturen in *Eppendorf*-Tubes umgefüllt und 5 Minuten bei 5000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Bakterienpellet in 200  $\mu$ l STET-Puffer + 0,2  $\mu$ l Lysozym unter Schütteln mit 1400 rpm gelöst. Anschließend wurden die Bakterien 2 Minuten bei 94°C inkubiert und dann 10 min. bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet – Zelltrümmer und denaturierte Proteine – wurde mit einem Zahnstocher entfernt. In jedes Tube wurde 10  $\mu$ l 5% CTAB hinzugegeben und wiederum bei 13.000 rpm 5 min. pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 300  $\mu$ l 1,2 M NaCl auf dem Schüttler bei 1000 rpm gelöst. Gefällt wurde dann mit 750  $\mu$ l 100% Ethanol, der Ansatz wurde kräftig geschüttelt und 10 min. bei 13.000 rpm zentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand abgesaugt, 1 ml 70% Ethanol zugegeben und nochmals eine Minute bei 13.000 rpm. pelletiert. Nach erneutem Absaugen wurde das Pellet im *Eppendorf Vakuum Concentrator* getrocknet und in 30  $\mu$ l H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **Maxipräparation**

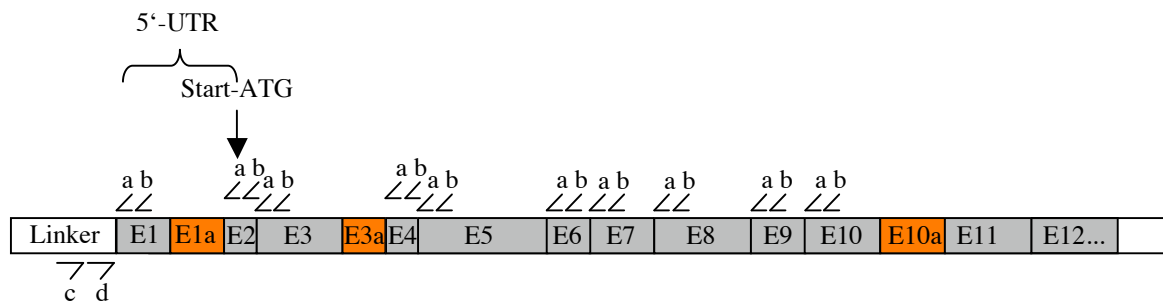
Zur Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde mit 1 ml eines Transformationsansatzes (s.o.) bzw. 500  $\mu$ l einer Mini-Kultur 100 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Präparation mit dem *Plasmid Maxi Kit (Quiagen)* durchgeführt und es wurde dabei nach den Angaben des Herstellers verfahren.

### **Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Verwendet wurde ein Photometer der Firma *Eppendorf* nach Angaben des Herstellers.

### **5'-RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA-Ends)**

Das Prinzip der 5'-RACE-PCR beruht auf der Grundlage einer normalen PCR, jedoch mit dem Unterschied, dass auch Bereiche im 5'-untranslatierten Bereich der cDNA erfasst werden können. Verwendet wurde das *First Choice<sup>TM</sup> RACE-Ready cDNA Kit* der Firma *Ambion*, es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. An die cDNAs sind jenseits des 5'-untranslatierten Bereiches sogenannte „Linker“ angebracht, Oligonukleotide mit bekannter Sequenz. Komplementär dazu werden 2 Primer mitgeliefert, ein äußerer und ein innerer Hin-Primer. Für die zu amplifizierende Sequenz werden zudem spezifische Rückprimer synthetisiert (s. Abb. 2.1.) Zunächst wurde eine erste PCR mit den Primern c und b durchgeführt, den äußeren Primern; dieser folgte eine erneute, sogenannte „nested-PCR“ mit den Primern d und a und dem ersten PCR-Produkt als „Template“. Somit wird in der Regel eine höhere Spezifität der Produkte erzielt. Die Produkte der „nested-PCR“ wurden nun in entsprechende Vektoren inkloniert und sequenziert, um somit eventuelle alternative Spleißvarianten zu identifizieren.



**Abb. 2.1.: Prinzip der RACE-PCR**

*E 1-11*: Exons (in etwa maßstabsgetreu)

*Linker*: bekannte Sequenz, die an das 5'-Ende der cDNA angehängt wurde

*a* – äußere Rück - Primer für 1. PCR

*b* – innere Rück - Primer für „nested-PCR“

*c* – äußerer Hin – Primer, der an die bekannte Sequenz des Linkers bindet

*d* – innerer Hin – Primer für „nested-PCR“, der an die bekannte Sequenz des Linkers bindet

(*c* und *d* sind im Kit enthalten, *a* und *b* wurden spezifisch synthetisiert (s. Anhang))

## Northern Blot

Verwendet wurden schon geblottete *multiple-tissue* Filter und kommerziell erworbene Filter mit muriner embryonaler Gesamt-RNA (*Clontech*). Für die Hybridisierung der Membranen wurde je nach Bedarf die entsprechende DNA-Sonde hergestellt. Die radioaktive Markierung erfolgte mittels des *Rediprime Labeling Kits* von *Amersham Bioscience*. Die benötigte DNA-Menge (2,5 – 25 ng) wurde bei 95°C für 5 min. denaturiert und anschließend 5 min. auf Eis gestellt. Nach kurzer Anzentrifugation wurde die DNA in das Reaktionstube gegeben. 5 µl Redivue [<sup>32</sup>P] dCTP von *Amersham Bioscience* wurden hinzugegeben, durch auf- und abpipettieren gut mit dem Inhalt des Tubes vermischt und der Ansatz für 10 min. bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte über die *Probe Quant G50 Micro Columns* der Firma *Amersham*. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren, um die gereinigte radioaktive Probe zu erhalten. Für die Hybridisierung wurde die RNA-Membran zunächst mit einer Mischung aus 10 ml Speed Hyb-Mix und 250 µl denaturierter Heringsspermien – DNA (10 mg/ml) (*Sigma*) in ein Hybridisierungsrohr gegeben und bei 65°C ca. 30 min. prähybridisiert. Währenddessen wurde die radioaktiv markierte DNA – Sonde und erneut 500 µl Heringsspermien – DNA pro Filter denaturiert, indem sie 5 min. bei 95°C gekocht und anschließend 10 min. auf Eis gekühlt wurden.



Eingesetzt wurden pro Membran ca. 500.000 – maximal 1.000.000 cpm. Die entsprechende Menge Sonde wurde nun mit 500  $\mu$ l Heringsspermien – DNA in 10 ml Speed Hyb-Mix gegeben. Nach Verwerfen der Prähybridisierungsflüssigkeit wurden die Filter über Nacht in einem Hybridisierungsrohr bei 65°C mit dem Sonden-Hybmix-Gemisch inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal je 20 Minuten mit 2 x SSC/ 0,1% SDS und 5 min. mit 0,1 x SSC/ 0,1% SDS bei 65°C gewaschen und danach in feuchtem Zustand in Haushaltsfolie eingepackt. Zur Kontrolle der Hybridisierung wurde der Filter zunächst für einige Stunden auf eine *Phosphoimaging* Platte (Fuji) gelegt, welche anschließend im Phosphoimager (*Fujifilm FLA 3000*) ausgelesen wurde. Anschließend erfolgte zur besseren Auflösung eine Autoradiographie mit konventionellen Röntgenfilmen (*Kodak BioMax MS*). Die Lagerung der Membran erfolgte feucht in Haushaltsfolie bei –80°C.

### **Präparation der Organe und Embryonen aus Wild-Typ-Mäusen**

Die Mäuse wurden zunächst durch CO<sub>2</sub>-Begasung getötet, anschließend wurde durch einen Sagittalschnitt das Abdomen eröffnet, sodass alle benötigten Organe entnommen werden konnten. Zur Präparation der Embryonen (E12, E15, E18) und der Mutterkuchen wurde schwangeren Mäuseweibchen zunächst der Uterus in toto entfernt, und die Embryonen anschließend in einer Petrischale mit 1 x PBS präpariert. Die Gewebe wurden sofort direkt auf Trockeneis gelegt und durchgefroren und anschließend in einem 50ml *Falcon*-Röhrchen bei –80°C bis zur Anfertigung der Schnitte gelagert.

### **Anfertigung und Fixation von Kryotom-Dünnschnitten für die In-situ-Hybridisierung**

Mit dem *MICROM HM560* wurden 16 $\mu$ m dicke Schnitte von den einzelnen Organen bzw. Embryonen angefertigt, die sofort auf *Histobond*-Objektträger der Firma *Marienfeld* aufgetragen wurden. Die Fixation der Schnitte erfolgte durch eine zehnminütige Inkubation in 4% Paraformaldehyd und anschließend zweimaliges Waschen für je 10 min in 1 x PBS. Nach ausreichendem Trocknen der Schnitte wurden diese bei –80°C gelagert.

### **Herstellung einer 35S-markierten Sonde für In-situ-Hybridisierung**

Die Sonden wurden aus dem pBluescript KSII mit entsprechenden Restriktionsenzymen über Nacht linearisiert, über ein Agarosegel aufgetrennt und phenolisiert, sodass ein Sense- und ein Antisense – Template zum Labeln zur Verfügung stand. Zur radioaktiven

Markierung der Sonde wurde das *Maxi Script Kit* von *Ambion* verwendet. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

3  $\mu\text{l}$  Template (= 1  $\mu\text{g}$  DNA)

je 1  $\mu\text{l}$  dATP, dCTP und dGTP

2  $\mu\text{l}$  10 x – Puffer

5  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O

5  $\mu\text{l}$  <sup>35</sup>S (*PerkinElmer*)

2  $\mu\text{l}$  T3-/ T7- Polymerase

Alle Inhalte des Ansatzes, bis auf das <sup>35</sup>S und das Template, sind Bestandteile des Kits.

Zum Polymerisieren der Nukleotide an das Template wurde die Sonde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurde die Aufreinigungssäule der Firma *Amersham* (*Amersham Probe Quant G50 Micro Columns*) mittels einminütiger Zentrifugation bei 3000 rpm von ihrer Transportflüssigkeit befreit. In ein neues 1,5 ml *Eppendorf*-Tube wurden 10  $\mu\text{l}$  1 M DTT (*Roche*), 10  $\mu\text{l}$  3M Na-Acetat (pH 5,2) und 5  $\mu\text{l}$  tRNA (250  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) vorgelegt, um die RNA aus der Säule aufzufangen und zu fällen. Das Volumen der gelabelten Probe wurde von 20  $\mu\text{l}$  auf 50  $\mu\text{l}$  mit 1 mM DTT aufgefüllt, auf die Säule gegeben und bei 3000 rpm 2 Minuten zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit 2 Volumen 100% Ethanol aufgefüllt und kurz auf Trockeneis inkubiert, bis die Flüssigkeit leicht viskös war. Anschließend wurde die Probe bei 14.000 rpm 20 Minuten zentrifugiert. Das Ethanol wurde abpipettiert, das Pellet mit 40  $\mu\text{l}$  1 M DTT versetzt und eine Stunde bei 55°C unter Schütteln gelöst. Währenddessen wurde der Hybridisierungs-Mix auf die gleiche Temperatur erwärmt und je 400  $\mu\text{l}$  zu der in DTT gelösten RNA gegeben. 1  $\mu\text{l}$  der gelösten Sonde wurde zu 10ml *Ready Safe* Szintillationsflüssigkeit der Firma *Beckman* gegeben und die counts per minute/  $\mu\text{l}$  (cpm) mit dem *Beckmann Coulter LS 2800* gemessen. Die Sonde wurde dann mit HybMix/ 10mM DTT auf 3.000 bis 5.000 cpm eingestellt.

### **In-situ-Hybridisierung**

Das Prinzip der In-situ-Hybridisierung ist die Inkubation von Gewebedünnschnitten mit einer radioaktiv markierten RNA-Antisense-Sonde, um RNA im Gewebe nachzuweisen.

Zur Synthetisierung der Sonde wurde das oben genannte Protokoll verwendet, die Schnitte wurden ebenfalls nach oben genanntem Protokoll angefertigt. Alle Inkubationsschritte in Flüssigkeiten wurden in Färbeschälchen der Firma *Roth* durchgeführt. Zunächst wurden

die Sonden getestet, indem wenige Schnitte, bei denen durch den vorher durchgeführten Northern Blot ein positives Signal zu erwarten war, jeweils mit der Sense- und Antisense-Sonde hybridisiert wurden. Als das Ergebnis wie erwartet ausfiel – kein Signal bei der Sense-Sonde und ein spezifisches Signal bei der Inkubation mit der Antisense-Sonde, wurden die restlichen Organschnitte hybridisiert. Die Schnitte wurden 3 min. in 0,1 M Triethanolamin inkubiert, danach 10 min. in 0,1 M Triethanolamin + 350  $\mu$ l Essigsäureanhydrid (*Sigma*). Anschließend wurde eine Inkubation in einer Alkohol-Reihe durchgeführt, jeweils 3 min. in 30%, 50%, 70%, 95% und 100% EtOH. Der 50%- und 70%ige Alkohol wurde in einer Flasche gesammelt, genauso wie der 95%- und 100%ige. Die Schnitte wurden an der Luft getrocknet, im Anschluss wurde die Sonde aufgetragen. Dazu wurden 95 – 100  $\mu$ l des Sonden-Hybmix-Gemisches halbmondförmig auf ein Deckgläschen aufgetragen und dann mit dem zu hybridisierenden Objektträger aufgenommen. Die Flüssigkeit sollte sich möglichst gleichmäßig und ohne Blasenbildung verteilen. Die Ränder des Deckgläschens wurden mit DPX (*Fluka*) versiegelt, die Objektträger ca. 1 Stunde bei RT trocknen gelassen und dann 18-24h bei 55°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der DPX-Rand vorsichtig mit einer Pinzette abgenommen und die Slides ca. 15 min. in 4 x SSC auf dem Schüttler inkubiert. Dann wurden die Slides aus dem Schälchen genommen, wobei die Deckgläschen sich von selber lösten. Die Slides wurden anschließend dreimal 10 min. in 4 x SSC gewaschen. Danach wurden die Objektträger für eine halbe Stunde in RNase-A-Puffer + 500 $\mu$ l RNase A (*Roche*) bei 37°C inkubiert. Es wurde dann eine SSC-Reihe durchgeführt, beginnend mit 2 x SSC, dann 1 x SSC, 0,5 x SSC, jeweils für 10 Minuten bei RT. Ein Schälchen mit 0,1 x SSC wurde vorher schon auf 55°C im Wärmeschrank erwärmt, dort wurden die Objektträger nochmals eine halbe Stunde inkubiert. Zum Abkühlen wurden die Objektträger 2 – 3 min. in 0,1 x SSC bei Raumtemperatur inkubiert. Die Alkoholgemische von Tag 1 (50% + 70% und 95% und 100%) wurden jetzt benutzt, um die Objektträger je 3 min. zu reinigen. Die Slides wurden an Raumluft getrocknet und dann in eine Filmkassette mit einem hochauflösenden Röntgenfilm (*Kodak BioMax MR*) eingelegt und je nach Signalstärke mehrere Tage belichtet. Zur Entwicklung wurde die *Optimax Typ TR* Entwicklermaschine der Firma *MS Laborgeräte* verwendet. Anschließend wurden einige Slides in *Kodak NTB-2 nuclear track emulsion* für 3 Monate gedippt, anschließend in *Kodak dektol* entwickelt und mit Giemsa (*Sigma*) gefärbt, um sie unter dem Hell- und Dunkelfeldmikroskop auszuwerten.

### „Screening“ einer Phagenbank auf einen genomischen NaBC1-Klon

Einzelne XL1-MRA P1 *Escheria coli* - Klone wurden von einer Kulturplatte wie für eine Minipräparation in 2,5 ml LB-Medium mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,2 % Maltose angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurden diese Vorkulturen in 100 ml LB-Medium mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,2 % Maltose angeimpft und ca. 4 Stunden bis zu einer optischen Dichte von 1 wachsen gelassen. Hatten sie diese erreicht, wurden sie bei 4°C und 2000 rpm 10 Minuten pelletiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert. Zur Ausplattierung wurden 450µl der Bakteriensuspension mit 5µl einer Maus-Lambda-Phagenbank infiziert und 30 min. bei 37°C und 800 rpm hochgeschüttelt. 450µl Bakteriensuspension für eine 14,5 cm LB-Agar-Platte wurden in 6 ml 45°C warmen Soft-Agar gegeben und auf LB-Agar-Platten ausplattiert. Die Platten wurden für ca. 12 Stunden bei 37°C inkubiert, bis man ca. 1 mm große Phagenplaques sehen konnte. Die Platten wurden dann 1-2 Stunden bei 4°C gekühlt. Anschließend mussten die Plaques zur weiteren Verarbeitung auf Filter aufgenommen werden. Dazu wurden in der ersten Runde des Screenings je Platte 2, in den darauffolgenden Runden je 1 Filter 2 Minuten auf die Platten gelegt und an drei Ecken eingeschnitten, sodass Filter später den Platten zuzuordnen waren. Dann wurden die Filter mit der DNA-Seite nach oben auf mit Denaturierungspuffer getränktes *Whatman*-Papier gegeben und zwei Minuten inkubiert. Anschließend wurde nach dem gleichen Prinzip 5 Minuten renaturiert. Die Filter wurden in 2 x SSC gewaschen, bis alle Filter fertig präpariert waren. Nachdem die Filter auf *Whatman*-Papier an der Luft getrocknet waren, wurden sie mit dem *UV-Stratalinker 2400* von *Stratagene* mittels UV-Licht gecrosslinkt, um die Nukleinsäuren an der Membran zu fixieren. Zum Hybridisieren wurde eine spezifische DNA-Sonde mit einer Länge von ca. 400 bp gewählt. Diese wurde mittels des *Rediprime II Random Prime Labelling System* von *Amersham Biosciences* nach Angaben des Herstellers markiert. Anschließend wurde die Sonde über eine *Probe Quant G50 Micro Colum* der Firma *Amersham Biosciences* aufgereinigt, wie schon oben für das S<sup>35</sup>-„Labelling“ beschrieben. Der Durchfluss wurde in einem Eppendorf Tube aufgefangen. Die Filter wurden in 2 x SSC bei Raumtemperatur einige Minuten inkubiert und dann je 6 – 7 Stück im Hybridisierungsrohr vorgelegt. In dieses Hybridisierungsrohr wurden je 10 ml Hybridisierungspuffer mit 500 µl denaturierter Heringsspermien-DNA gegeben, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Es wurde ca. 45 min. bei 68°C prähybridisiert. Anschließend wurde der Prähybridisierungs-Mix aus dem Rohr entfernt und der eigentliche Hybridisierungsmix zugefügt. Dieser bestand aus 10 ml Speed-Hyb II, 500µl

denaturierter Heringsspermien-DNA und 10  $\mu$ l denaturierter markierter Probe. Der Filter wurde mit dem Hybridisierungsmix über Nacht bei 68°C inkubiert und am nächsten Tag dreimal je zehn Minuten mit 2 x SSC, 0,1 % SDS gewaschen. Anschließend wurde ein *Kodak BioMax MS* 2-3 Tage exponiert und danach entwickelt. Durch die Markierung der Filter und Platten konnten nun Stellen auf dem Filter Phagenplaques auf den Platten genau zugeordnet diese ausgestochen werden. Die ausgestochenen Agar-Stückchen wurden dann über Nacht bei 4°C in je 1 ml SM-Puffer und 1  $\mu$ l Chloroform inkubiert. Diese Lösung, die die Phagen aus den lysierten Bakterien enthält, wurde am nächsten Tag 1:1500 mit SM-Puffer verdünnt. Dann wurden mit jeweils 1  $\mu$ l, 10  $\mu$ l und 100  $\mu$ l dieser Lösung 150  $\mu$ l XL1-MRA P2 *Escheria coli* angeimpft und 30 min. bei 37°C geschüttelt. Die hochgeschüttelten Bakterien wurden in 3 ml 45°C warmen Soft-Agar gegeben, schnell auf 10 cm-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Es wurden so viele „Runden“ mit jeweils entsprechenden Verdünnungen der Lysate wiederholt, bis man positive Signale auf den Autoradiogrammen sicher einzelnen koloniebildenden Klonen auf den Platten zuordnen konnte.

### **Präparation der Phagen**

Einzelne Kolonien wurden über Nacht bei 4°C in je 1ml SM-Puffer und  $\mu$ l Chloroform inkubiert. Mit den lysierten Bakterien wurden 450  $\mu$ l XL1-MRA P2 *Escheria coli* angeimpft, wie oben geschüttelt, und in Soft-Agar ausplattiert, wiederum auf große Platten. Es wurden 4 große Platten pro Klon angelegt. Am nächsten Tag wurden 12ml SM-Puffer direkt auf die Agar-Platte gegeben, um die Phagen aus den Bakterien zu lösen. Die Platten wurden 3-4 Stunden leicht geschüttelt, um danach die jeweils vier Ansätze der einzelnen Klone in 50ml Falcon-Tubes zu sammeln. Zu den lysierten Phagen wurden je 0,03 mg KCl/ ml Lysat dazugegeben und der pH der Lösung mit verdünnter Phosphorsäure auf 6,3 eingestellt. Die Lösung wurde bei 4000 rpm und 4°C 10 min. pelletiert und der Überstand in ein sauberes Zentrifugenröhrchen überführt; das Pellet wurde verworfen. (Alle folgenden Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.) Zu dem Überstand wurde 15 ml auf 4°C vorgekühlter T2-Puffer gegeben, vermischt und 60 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Phagen 10 min. bei 10.000 x g pelletiert, der Überstand wurde verworfen, das Pellet 3 min. bei RT getrocknet und anschließend mit 1,5 ml Puffer T3 resuspendiert. Nach Zugabe von 1,5 ml Puffer T4 wurde die Lösung vermischt, 10 min. bei 65°C und anschließend 5 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1,5 ml auf 4°C vorgekühlter S3-Puffer dazugegeben, kurz umgeschwenkt und dann 10 min. bei 10.000 x

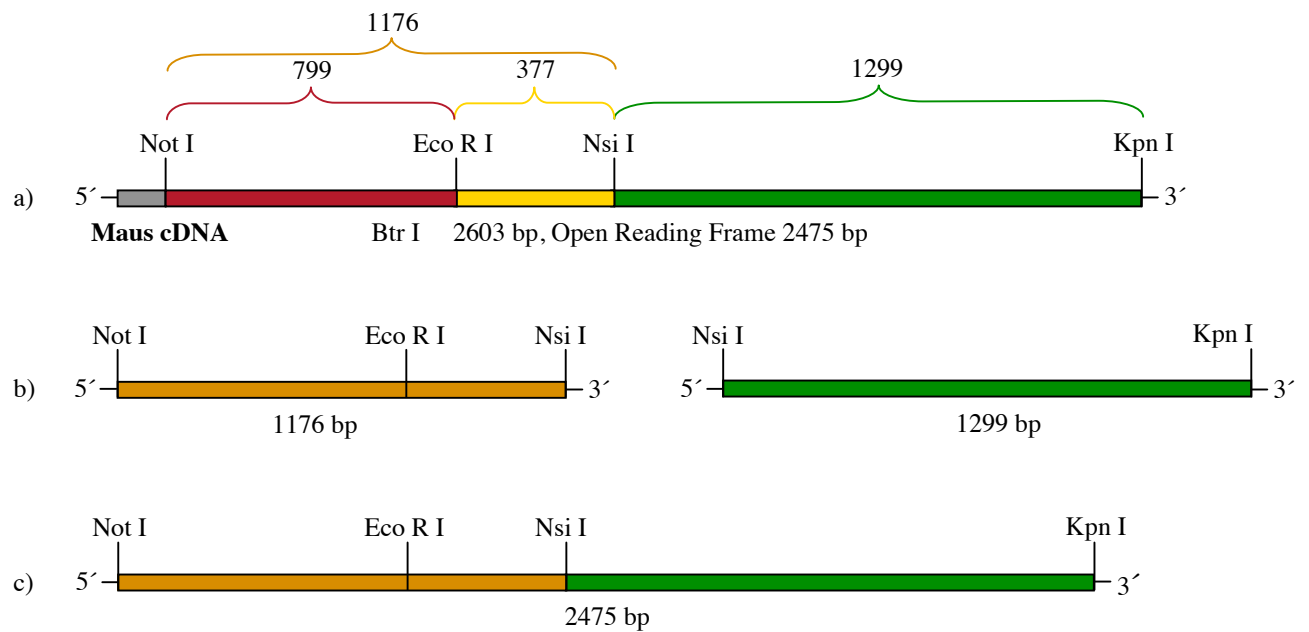
g pelletiert. Zur Isolation der lambda-Phagen-DNA wurden die Nucleobond-Säulen AX100 mit 3 ml L2-Puffer äquilibriert und dann der Überstand auf die Säulen aufgetragen. Nach zweimaligem Waschen mit je 2,5 ml Puffer L3 wurde die DNA mit zweimal 2,5 ml Puffer L5 eluiert. Zur Präzipitation wurde je Eluat 4 ml Isopropanol dazugegeben, bei RT 30-60 min. inkubiert und dann 30 min. bei  $>15.000 \times g$  pelletiert. Zum Waschen wurden 2 ml 70% Ethanol auf das Pellet gegeben und 10 min. bei  $15.000 \times g$  zentrifugiert. Das Ethanol wurde abgesaugt, das Pellet kurz getrocknet und in  $200 \mu\text{l}$  TE zur weiteren Verwendung aufgenommen. Die Inserts wurden dann in den pKsII mittels T4-Ligase ligiert und über ein Gel mittels NotI-Verdau identifizierte positive Klone mit den vektoreigenen Primern M13for und M13rev sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden anschließend unter Verwendung des Programmes *BLAST* des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* mit dem gesamten Maus-Genom abgeglichen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Klonierung der Volllänge-cDNA der Maus

Zunächst wurde aus muriner Nieren-RNA cDNA synthetisiert. Diese wurde dann mittels PCR mit für *Slc4A11* spezifisch synthetisierten Primern amplifiziert. Als Vorlage zur Synthetisierung der Primer diente die cDNA Sequenz mit der NCBI-Datenbank-Nummer XM\_194050.2. Da die Länge der kodierenden Sequenz der cDNA des *Slc4a11* 2475 Basenpaare beträgt, wurde die cDNA in mehreren Fragmenten amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass die einzeln amplifizierten Fragmente an beiden Enden jeweils eine Schnittstelle trugen, mit der sie untereinander und in Vektoren ligiert werden konnten. Es gelang, Fragment 799 (*NotI* – *EcoRI*), 1176 (*NotI* - *NsiI*), 1299 (*NsiI* - *KpnI*) und 377 (*EcoRI* - *NsiI*) zu amplifizieren. Abb. 3.1. zeigt die amplifizierten Fragmente, die Zahlen geben die Länge in Basenpaaren an. Die Fragmente 1176 und 1299 wurden jeweils in den pBluescript KSII (pKSII) inkloniert, sodass die Konstrukte pKSII/1176 und pKSII/1299 vorlagen. Nachdem durch Sequenzierung Fehler ausgeschlossen wurden und ein durchgehender Leserahmen zu erkennen war, wurden die beiden Fragmente mittels *NotI*/*NsiI* bzw. *NsiI*/*KpnI* aus dem pKS II Konstrukt ausgeschnitten. Diese beiden Fragmente wurden dann in den *NotI*/*KpnI* geschnittenen eukaryoten Expressionsvektor pCMV inkloniert. Von dort aus erfolgte eine Umklonierung des Volllängekonstruktes, wieder mittels *NotI* und *KpnI* in den pTLB, einen spezifischen Expressionsvektor für *Xenopus* Oozyten für eventuelle spätere Versuche.

Bei der Sequenzierung fiel auf, dass sich innerhalb des cDNA-Fragmentes 1176 eine unbekannte Sequenz befand, die in der bisher bekannten Sequenz als intronisch geführt wird – ein alternativ gespleißtes Exon, welches 10a genannt wurde, da es sich zwischen Exon 10 und 11 befindet – auf das im weiteren Verlauf dieser Arbeit noch genauer eingegangen wird. Es ist aber zu bemerken, dass alle Konstrukte, mit dem weitere Versuche gemacht wurden, dieses Exon tragen, da es uns nicht gelang, das Fragment 1176, welches wir für die Klonierung der Volllänge-cDNA benötigten, ohne dieses Exon zu amplifizieren. Obwohl sich die Länge der Fragmente dadurch verändert hat, wird im Weiteren die vorherige Nomenklatur (377 und 1176) beibehalten.



**Abb. 3.1.: Klonierungsstrategie der cDNA-Fragmente des murinen NaBC1.**

- Volllänge-cDNA des NaBC1 (*Slc4a11*), amplifiziert werden konnten die Fragmente 799, 1176, 1299 und 377.
- Über *NotI/NsiI* bzw. *NsiI/KpnI* wurden 1176 und 1299 jeweils einzeln in den pKSII ligiert.
- Aus dem pKSII wurden die beiden Fragmente ausgeschnitten und über *NotI/KpnI* in den pCMV kloniert, die beiden Fragmente untereinander wurden über die intrinsische *NsiI*-Schnittstelle ligiert.

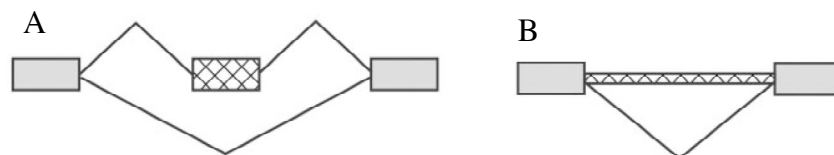


### 3.2 Identifizierung von alternativen Spleißvarianten

Als Vergleichssequenz für die RACE-PCR-Produkte wurde die cDNA - Sequenz mit der NCBI-Datenbank-Nummer XM\_194050.2 verwendet, angewandt wurde die Methode der 5'-RACE-PCR, wie oben beschrieben.

Als Vorwärts-Primer wurden die mitgelieferten Primer verwendet, die komplementär an den Linker der RACE-DNA binden, und als Rückwärts-Primer wurden Transkript-spezifische Primer synthetisiert (s. Anhang). Die inneren und äußeren Rückwärts-Primer liegen jeweils am 5'-Ende der Exons 1 – 10, sodass die Sequenz vom 5'-Ende bis zu Exon 10 analysiert werden konnte. Wie in der Einleitung beschrieben, werden die Transkripte der *SLC4A*-Genfamilie multipel alternativ gespleißt, vornehmlich im 5'-Bereich, entsprechend dem N-Terminus des Proteins. Daher fiel die Entscheidung, die Sequenz nur bis Exon 10 zu analysieren, da wir im Bereich der codierenden Sequenz der Transmembrandomänen (TMD), die ab Exon 10 beginnen, eine starke Konservierung erwarteten, da alternative Spleißereignisse durch eine veränderte Aminosäuresequenz die Fähigkeit, TMD zu bilden, eventuell einschränken würden. Die mittels RACE-PCR mit Taq-Polymerase amplifizierten Fragmente wurden zur Sequenzierung in Topo oder pGEM Teasy einkloniert.

Im Vergleich mit der veröffentlichten cDNA-Sequenz fielen in den sequenzierten RACE-Produkten zwei Fragmente auf, die intronischen Bereichen zugeordnet werden konnten – zwei vermutlich alternativ gespleißte Exons. Exon 1a befindet sich zwischen Exon 1 und 2 und hat eine Größe von 108 Basenpaaren, Exon 3a befindet sich zwischen Exon 3 und 4 und ist 87 Basenpaare groß. Während sich Exon 1 in der 5'-UTR-Region befindet, liegt Exon 3a im offenen Leserahmen der mRNA des NaBC1.



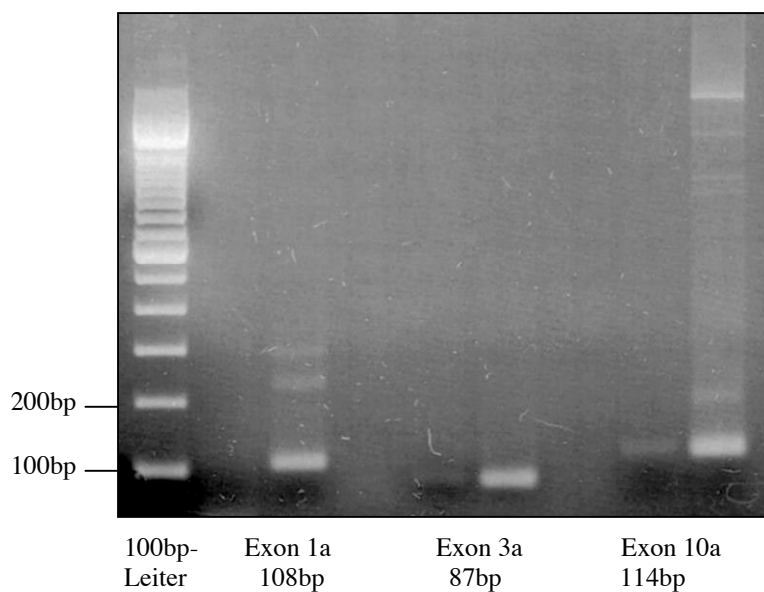
**Abb. 3.2.: Mechanismen des alternativen Spleißens (nach Black, 2003)**

A: ein Kassetten-Exon kann entweder in die mRNA eingespleißt werden oder nicht (in dieser Arbeit entspricht dies Exon 1a und 10a)

B: Eine Intronretention beinhaltet das fehlende Herausspleißen eines kompletten Introns zwischen zwei Exons (entspricht Exon 3a)

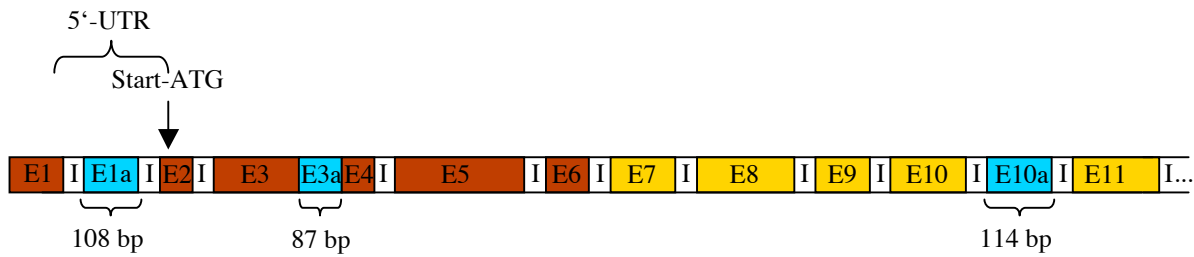
Bei der Sequenzierung der mittels PCR amplifizierten Fragmente 377 und 1176 des Volllänge-Klons (s. Abb. 3.1.) fiel, wie oben schon beschrieben, eine weitere Insertion gegenüber der veröffentlichten cDNA-Sequenz (XM\_194050.2) auf – ein weiteres alternativ gespleißtes Exon. Dieses Exon 10a befindet sich zwischen Exon 10 und 11, seine Größe beträgt 114 Basenpaare. Auch Exon 10a befindet sich im Open Reading Frame der mRNA. Weder Exon 3a noch 10a führen zu einer Leserahmenverschiebung, da sie aus einer durch drei teilbaren Anzahl Basen bestehen.

Zwischen Exon 1a und 10a und ihren dazugehörigen flankierenden konstitutiven Exons (1 und 2 bzw. 10 und 11) befinden sich nicht translatierte intronische Sequenzen, während Exon 3a der gesamten intronischen Sequenz zwischen Exon 3 und 4 entspricht, die eingespleißt wird.



**Abb. 3.3.: RACE – PCR – Produkte**

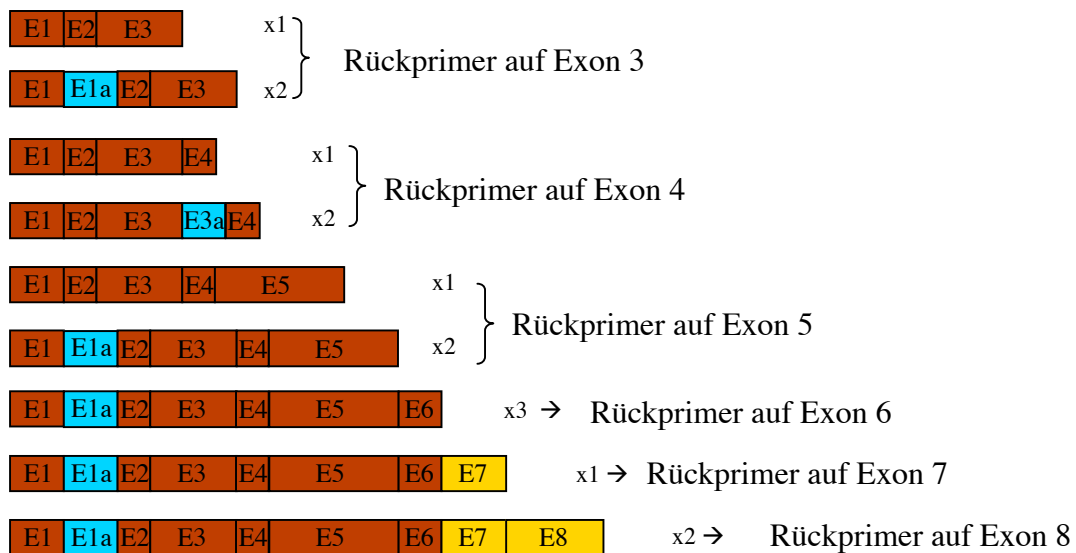
Amplifizierung der alternativen Exons aus den RACE – PCR-Produkten mit spezifischen Primern (s. Anhang) Als Template wurden für die Amplifikation von Exon 1a und 3a RACE-PCR-Produkte verwendet und für Exon 10a das Volllänge-Fragment 377

**Abb. 3.4.: Alternative Exons**

E: Exon

I: Intron (nicht maßstabsgetreu)

Eine Übersicht der mittels RACE-PCR gefundenen Transkripte gibt Abb. 3.5..

**Abb. 3.5.: Sequenzierte RACE-PCR-Produkte**

E: Exon 1 – 8 (in etwa maßstabsgetreu dargestellt)

x1-3: Anzahl der sequenzierten Klone mit entsprechender Sequenz

Die farbige Darstellung der Exons symbolisiert die Zugehörigkeit zu den amplifizierten Abschnitten (rot: 799, gelb: 377; blau: alternative Exons)

Exon 1a wurde in insgesamt zehn und Exon 3a in zwei von insgesamt 15 sequenzierten Klonen gefunden. In sechs von uns sequenzierten Klonen 377 und in beiden von uns sequenzierten Klonen 1176 fanden wir in allen Fällen das alternative Exon 10a.

Die im Laufe der Erstellung dieser Arbeit neu veröffentlichte Sequenz mit der Accession Number XM\_194050.3 enthält Exon 1a und 10a als konstitutiv exprimierte Exons.

Wie man an der Abbildung 3.5. erkennt, fanden wir jedoch sowohl Klone mit einem eingespleißten Exon 1a, als auch Klone ohne dieses Exon, insofern ist die konstitutionelle Expression fraglich. In unseren Ergebnissen können wir zeigen, dass zumindest in der Niere alternative Transkripte, mit und ohne Exon 1a, vorliegen.

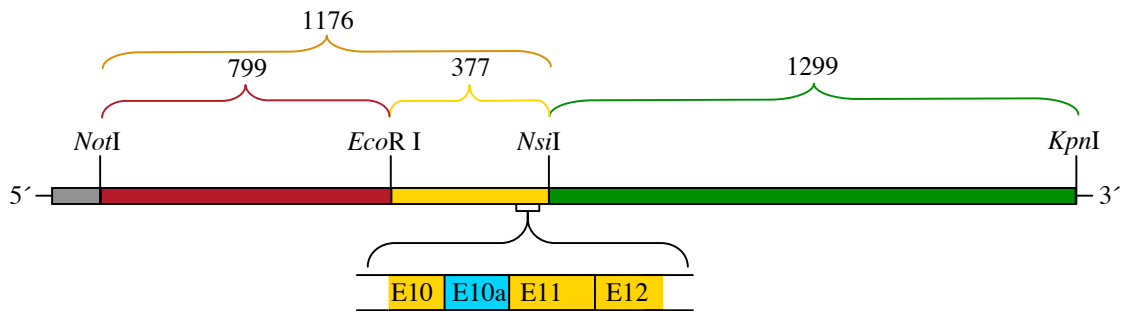


Abb. 3.6.: Exon 10a im Fragment 377

Somit sequenzierten wir drei alternativ gespleißte Exons, Exon 1a in der 5'-UTR und Exon 3a und 10a im offenen Leserahmen der mRNA des NaBC1 (s. Abb 3.4.).

#### Exon 1a – 108bp

5' – agGC CCA TCC TCC CGT GCG CCT TTC TTT GCA CAA ACA TCT CGG  
 ATA GTA CCT CCA ATC TCT GTG TAC TGC ACA CCC ACT CTA CCC CTT  
 CTT TCC GGC ATC GCA GGA CAC Ggt – 3'

#### Exon 3a – 87bp

5' – CT GGT ATG GGG ATG GTA GAT GGC CCC CTG CTC TGC TGA GGA GCC  
 E3 Gly Met Gly Met Val Asp Gly Pro Leu Leu Cys STOP Gly Ala  
 CTG AGA GGG TGG GAC AGC CTG CTG AGC TCT CTT CCC ACT CCT TTA GA– 3'  
 Leu Arg Gly Trp Asp Ser Leu Leu Ser Ser Leu Pro Thr Pro Leu E4

#### Exon 10a – 114bp

5' – agAT GTG CAG AAG ACC ATA GCT GGA CAG AGC ATC GGA GGC CTC TTG  
 Val Gin Lys Thr Ile Ala Gly Gin Ser Ile Gly Gly Leu Leu  
 TAT GCA CTG TTC TCT GGG CAG CCC CTG GTG ATA CTG TTG ACA ACC GCA  
 Tyr Ala Leu Phe Ser Gly Gin Pro Leu Val Ile Leu Leu Thr Thr Ala  
 CCC CTG GCC ATC TAC ACC CAG Ggt – 3'  
 Pro Leu Ala Ile Tyr Thr Gin

Abb. 3.7: Sequenzen der alternativen Exons

E3/E4 bzw. E10/11: Sequenzen der Exone 3/4, bzw. 10/11

### 3.2.1. Exon 1a

Exon 1a liegt in der 5'-untranslatierten Region, enthält jedoch kein alternatives Start-ATG. Aus diesem Grund wird es mit großer Wahrscheinlichkeit nicht translatiert. Datenbankanalysen ergaben in dieser Region keine Promotorsequenzen (Krogh *et al.*, 2001; Sonnhammer *et al.*, 1998), eine Störung oder Beeinflussung der Transkription durch dieses Exon kann jedoch aufgrund weiterer möglicherweise einflussnehmenden Faktoren nicht beurteilt werden. Die einzige Besonderheit ist, dass ein in der Literatur diskutiertes (Prats H *et al.*, 1989) alternatives Startcodon (**CTG**) an zwei Positionen in Exon 1a vorkommt. Sollte eines dieser alternativen Startcodons bei der Translation des NaBC1 verwendet werden, würde es jedoch bald zu einem frühzeitigem Stop der Proteinbiosynthese durch zwei durch die Leserahmenverschiebung neu entstandene Stopcodons, jeweils beide in Exon 3, kommen.

Insofern ist die Benutzung dieses alternativen Startcodons zur Synthese eines neuen funktionellen Proteins unwahrscheinlich.

### 3.2.2. Exon 3a

In Exon 3a befindet sich ein Stopcodon (TGA), welches beim Einspleißen zu einem stark verkürzten Protein führen würde. Die Translation würde weit vor dem Beginn der an der TMD-Bildung beteiligten Sequenzen abbrechen, das zu erwartende Protein bestünde aus lediglich 243 Aminosäuren. Insofern ist kein funktionsfähiges Protein zu erwarten.

### 3.2.3. Exon 10a

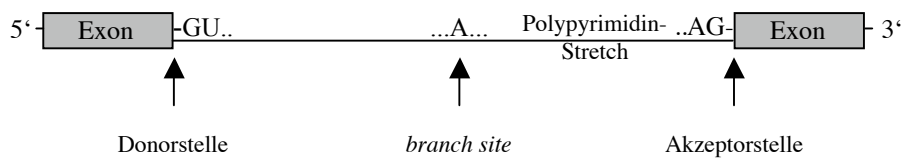
Laut einer Computeranalyse der Proteinsequenz des NaBC1 codiert Exon 10a für einen Aminosäurebereich, der an der Bildung der 2. TMD beteiligt ist (Krogh *et al.*, 2001; Sonnhammer *et al.* 1998). Im Bereich der Transmembrandomänen ist ein alternatives Spleißgeschehen eher unwahrscheinlich, da durch die veränderte Aminosäuresequenz die Topologie verändert und somit die Fähigkeit zur TMD-Bildung beeinflusst wird.

Beim Vergleich mit der neu veröffentlichten cDNA-Sequenz mit der NCBI-Datenbanknummer XM\_194050.3 fällt, wie oben beschrieben, auf, dass sowohl Exon 1a als auch 10a als konstitutive Exone in der Sequenz erscheinen. Bei Exon 10a, welches auch in unseren Versuchen in jedem analysierten Klon gefunden wurde, ist diese Vermutung als wahrscheinlich anzusehen, somit erklärt sich auch das Auftreten innerhalb der Transmembrandomäne.

### 3.2.4. Splice-sites

Zur *splice-site* gehören im Allgemeinen vier hoch konservierte Elemente: Ein GU-Dinukleotid am 5'-Ende des Introns, ein AG-Dinukleotid am 3'-Ende und die sogenannte *branch site*, der durch einen Polypyrimidin-„Stretch“ – eine Sequenz, die zum überwiegenden Teil aus Pyrimidinen besteht – von dem terminalen AG getrennt ist (Black, 2003). (s.a. Abb. 3.8.)

Das Splicing läuft in drei Schritten ab. Zunächst wird an der Donorstelle, der 5'-wärts gelegenen Exon-Intron-Grenze, gespalten, dann erfolgt eine Lassobildung unter Verbindung des G der Donorstelle und dem A der *branch site*, zuletzt wird an der 3'-wärts gelegenen Akzeptorstelle gespalten, das Intron als Lasso freigesetzt und die Exone zusammengefügt (Black, 2003).



**Abb. 3.8. Charakteristika der Splice – Site**  
Nach Black, 2003

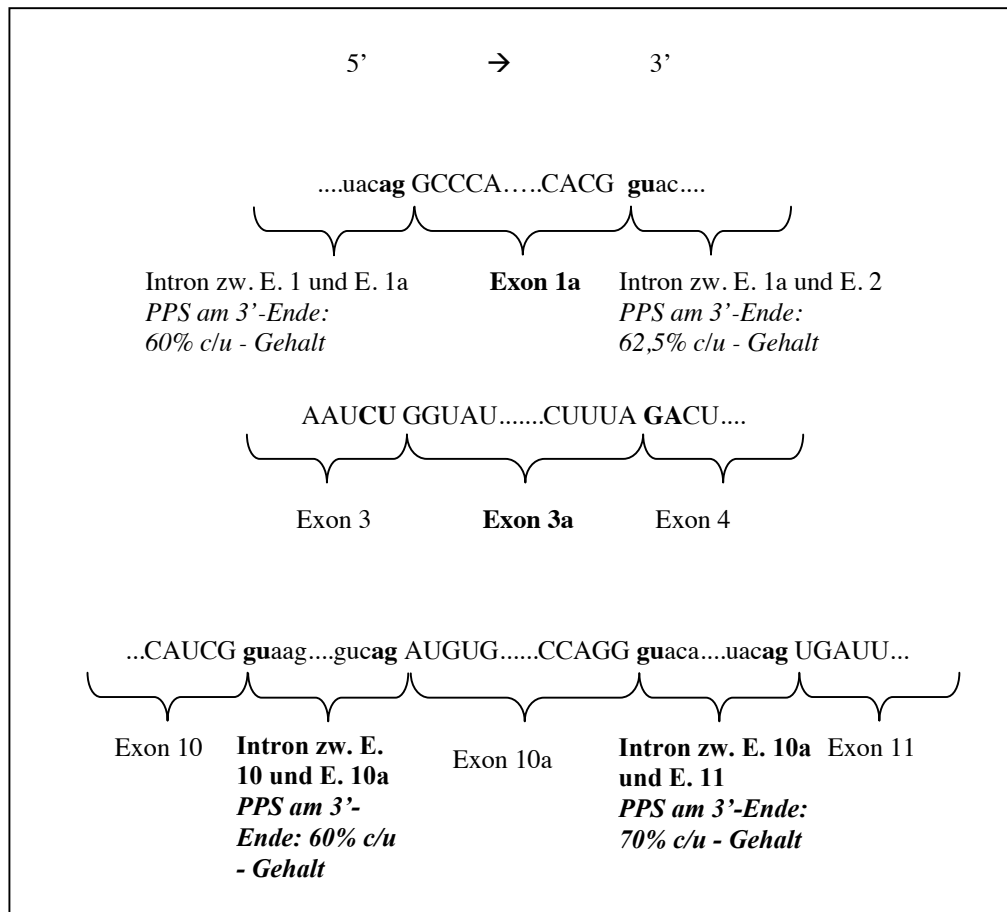
Bei Betrachtung der *splice sites* der hier beschriebenen alternativen Exons erkennt man, dass die zwischen Exon 1a bzw. 10a und ihren flankierenden konstitutiven Exons liegenden neu gebildeten Introns die charakteristischen Merkmale einer *splice site* tragen.

Die Introns um Exon 1a und 10a tragen die hochkonservierten Nukleotidkombinationen GT am 5'- und AG am 3'- Ende, entsprechend GU auf mRNA-Ebene.

Bei Exon 3a, welches durch eine komplette Intron-Retention zwischen Exon 3 und 4 entsteht, fällt auf, dass die nicht benutzten Spleißstellen keine konservierten Dinukleotidkombinationen aufweisen. Dadurch lässt sich auch das „Übergehen“ dieser Spleißstellen und somit das Auftreten von Exon 3a erklären.

Die Untersuchung des Polypyrimidin-Stretches (PPS) beschränkte sich in dieser Arbeit auf die 40 Basen 5'-wärts der Donorstelle, da sich die ideale Stelle für das 3'-AG der *splice site* innerhalb von 19-23 Basen in 3'-Richtung der *branch site* befinden soll (Chua K, 2001). Der Cytosin – Uracil – Gehalt der intronischen Sequenz im vermuteten Polypyrimidinstretch der Exons ist in Abb. 3.9. dargestellt. Auffällig ist der höhere c/u –

Gehalt 5'-wärts der konstitutiven Exons 2 und 11 im Gegensatz zu den vorhergehenden alternativen 1a und 10a; jedoch ist auch dieses in der Literatur beschrieben – alternativ gespleißte Exons haben in ihrem Polypyrimidin-Stretch einen niedrigeren Anteil an Pyrimidin-Basen (Stamm *et al.*, 2000).



**Abb. 3.9. Splice Sites der alternativen Exons**  
 PPS – Polypyrimidinstretch

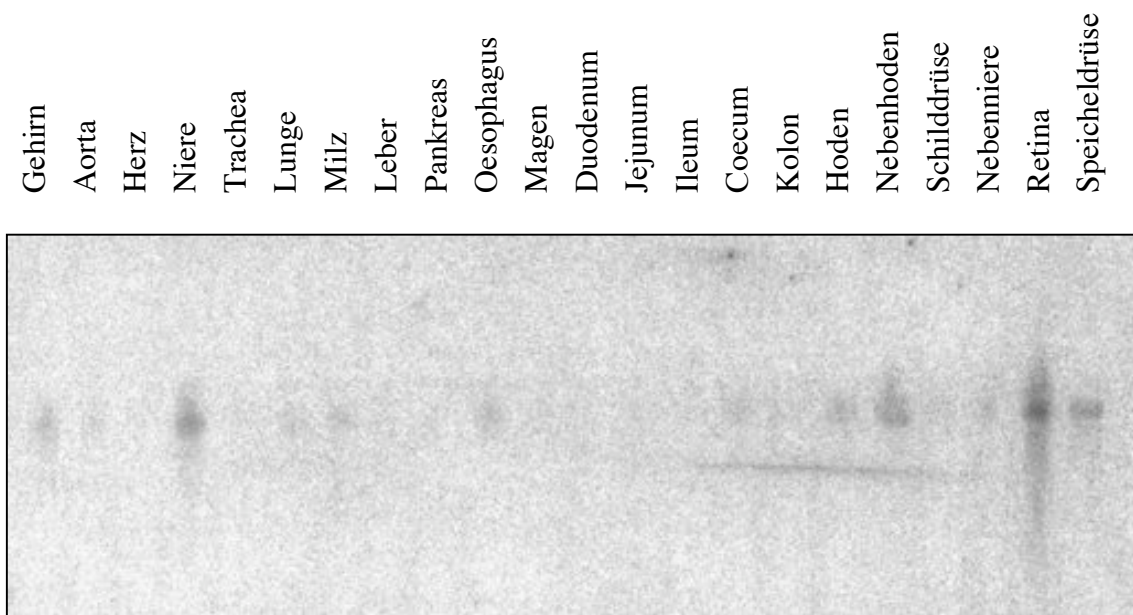
### 3.3 Expressionsanalyse

#### 3.3.1 Northern Blot

Zur Expressionsanalyse wurde ein im Vorfeld dieser Arbeit von Dr. S. Hentschke bereits hergestellter *multiple tissue* Northern-Blot Filter und ein kommerziell erwerblicher Blot-Filter mit Gesamt-RNA aus Maus-Embryonen verwendet und  $^{35}\text{S}$ -In-Situ-Hybridisierungen durchgeführt.

Der „*multiple tissue*“ Northern Blot zeigt eine deutliche Expression des Gens im Gehirn, der Niere, dem Nebenhoden, der Retina und der Speicheldrüse, sowie eine schwache, nahezu ubiquitäre Bande. Als Sonde wurde das Fragment 1299 verwendet.

Es fällt auf, dass im Magen-Darm-Trakt mittels Northern-Blot keine Expression nachzuweisen ist.

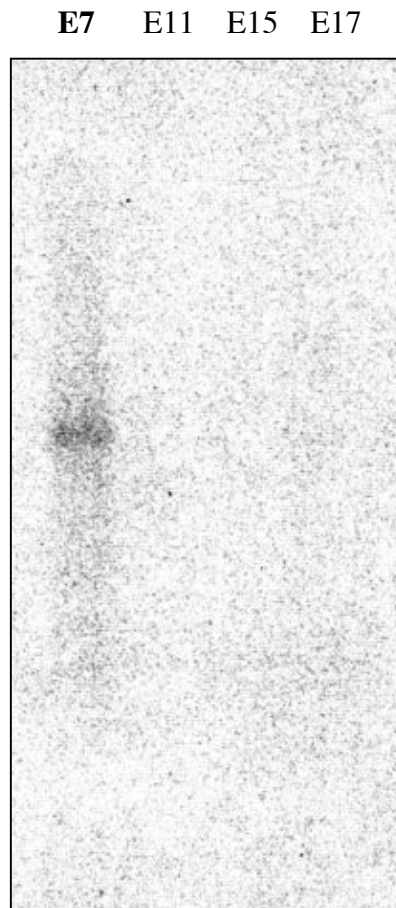


**Abb. 3.10.: *multiple tissue* Northern Blot**

Äquivalente Mengen RNA ( $10\mu\text{g}$ ) wurden aufgetragen, als Sonde diente das Fragment 1299 der cDNA des NaBC1 (s.o.)

Ein anschließend durchgeführter Northern Blot mit Gesamt-RNA aus Maus-Embryonen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien zeigt ein deutliches Signal am Tag 7 post conceptionem (E7), welches jedoch schon ab Tag 11 und in den darauffolgenden Stadien nicht mehr sichtbar ist.





**Abb. 3.11.: Northern Blot mit RNA aus Embryonen**

Ein gekaufter Filter (*Clontech*) mit Gesamt-RNA aus Maus-Embryonen wurde mit dem Fragment 1299 als Sonde inkubiert.

### 3.3.2 In-Situ-Hybridisierung

Aufbauend auf die Ergebnisse auf Gesamt-RNA-Ebene erfolgte eine In-Situ-Hybridisierung mit einer  $^{35}\text{S}$ -markierten Sonde auf Organschnitten von Wildtyp-Mäusen, um eine genauere Expressionsanalyse durchführen zu können. Verwendet wurde eine RNA-Sonde mit der Sequenz von Pos. 129 der cDNA (Start-ATG) bis Pos. 474 (als Sequenzvorlage wurde XM\_194050.2 verwendet, s. Anhang). In einer Datenbanksuche bei NCBI (Altschul SF *et al.*, 1990, Altschul SF *et al.*, 1997) erschien nur der NaBC1 als passendes Komplement, insofern ist mit hoher Sicherheit von einer Spezifität der Sonde auszugehen.

Da keine passenden Schnittstellen vorhanden waren, um die Sonde direkt aus der cDNA auszuschneiden, wurde das Fragment mittels PCR amplifiziert. Spezifische Primer wurden so synthetisiert, dass das Produkt nach Amplifikation am 5'-Ende eine *NotI*- und am 3'-Ende eine *SalI*-Schnittstelle trug (s. Anhang). Somit konnte das Fragment 129-474 über diese Schnittstellen in den pKSII einkloniert und anschließend über die vektoreigenen Schnittstellen *NotI* und *KpnI* linearisiert werden. Anschließend wurde die Sonde wie oben beschrieben linearisiert und radioaktiv markiert, sodass eine Sense-Probe (mit *KpnI* linearisiert) und eine Antisense-Probe (mit *NotI* linearisiert) zur Verfügung stand. Die Wahl der Organe, die mittels In-Situ-Hybridisierung genauer untersucht werden sollten, fiel durch die Signale im Northern Blot auf Niere, Nebenniere, Gl. submandibularis, Gehirn, Auge, Embryonen verschiedener Stadien (E12, E15, P0) und Mutterkuchen von Embryonen von Tag 12 und 15, da diese das Signal erklären könnten. Nach der Hybridisierung wurde zunächst ein Autoradiogramm erstellt, um dann Schnitte, die ein vielversprechendes Signal zeigten, mittels Photoemulsion genauer betrachten zu können. Die Belichtungszeit für alle hier dargestellten Autoradiogramme betrug 9 Tage bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Die in Photoemulsion inkubierten Schnitte wurden nach drei Monaten entwickelt, unter einem Dunkelfeldmikroskop beurteilt und mit einer *Canon Powershot 5,3* fotografiert. Stellen auf den Organschnitten, an denen die radioaktiv markierte Sonde gebunden hat, binden die Photoemulsion als elementares Silber, welches sich im Dunkelfeld hell darstellt (s. Abb. 3.14. ff).

Aufgrund der schlechten Qualität einiger In-Situ-Hybridisierungen wurde in dieser Arbeit darauf verzichtet, das Auge und die Embryonalschnitte darzustellen.

## 3.3.2.1. Niere

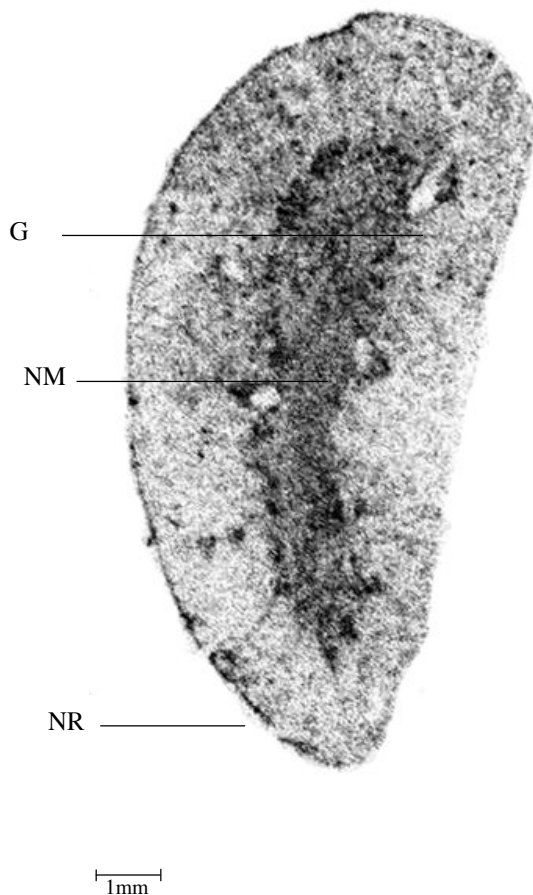


Abb. 3.12.

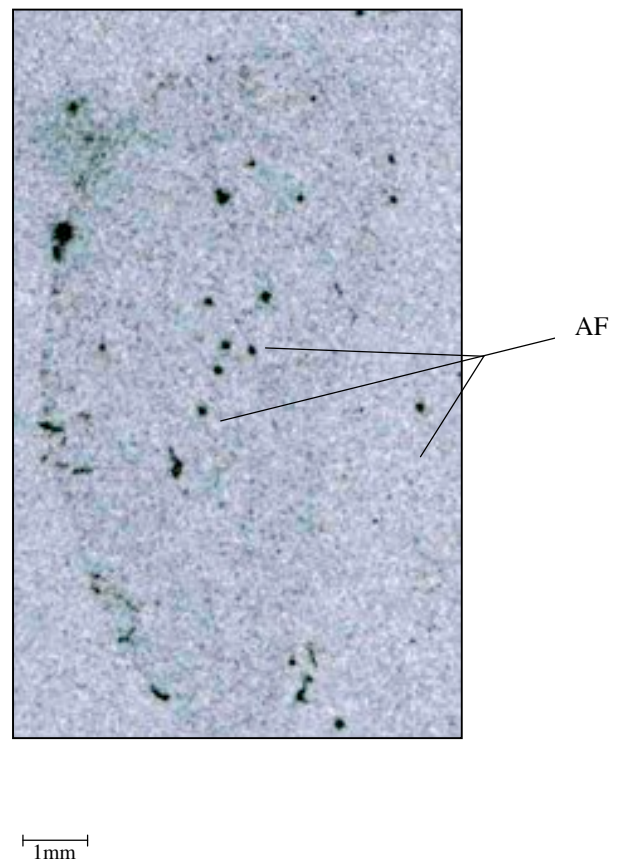


Abb. 3.13.

**Abb. 3.12. und 3.13.: Hybridisierung eines Wildtyp – Nierenschnittes mit Antisense- und Sense – Probe, Autoradiogramm**

Abb. 3.12.: Antisense – Probe, man erkennt ein deutliches Signal im Nierenmark; Abb. 3.13.: Sense – Kontrolle, man erkennt kein spezifisches Signal mehr, die geringe Anfärbung der gesamten Niere ist als unspezifischer Hintergrund zu bewerten.

NM: Nierenmark

NR: Nierenrinde

G: Gefäße

AF: Artefakte

Man erkennt in den Autoradiogrammen, dass die Sense-Sonde kein spezifisches Signal gibt, die Punkte auf den Schnitten lassen sich eindeutig als Artefakt identifizieren, da sie sowohl im Bereich des Nierenschnittes als auch in der Umgebung in gleicher Intensität zu erkennen sind und keiner Struktur zuzuordnen sind.

Auf den Autoradiogrammen sowie auf den gedippten Schnitten (Abb. 3.14. u. 3.15.) erkennt man ein deutliches Marksignal, das sich vom Rindenbereich abhebt. Vor allem in Abb. 3.15. kann man erkennen, dass im Bereich der Rinden-Mark-Grenze das Signal noch stärker ist als allgemein im Mark.

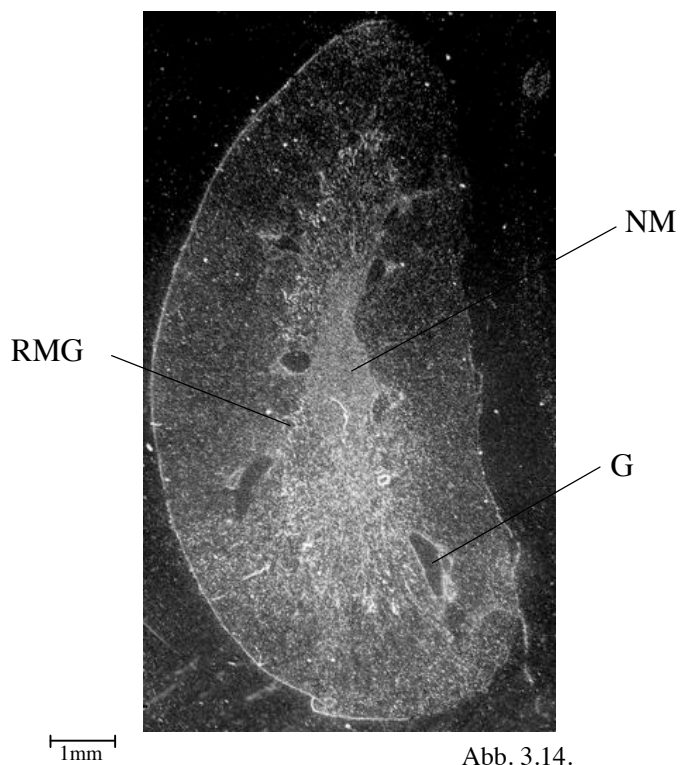


Abb. 3.14.

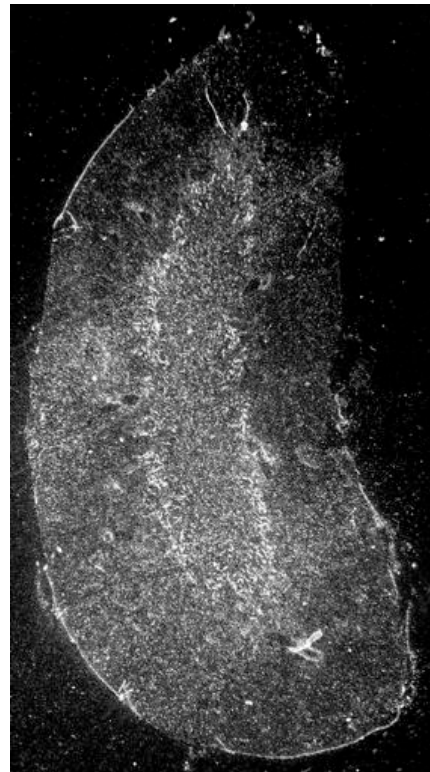


Abb. 3.15.

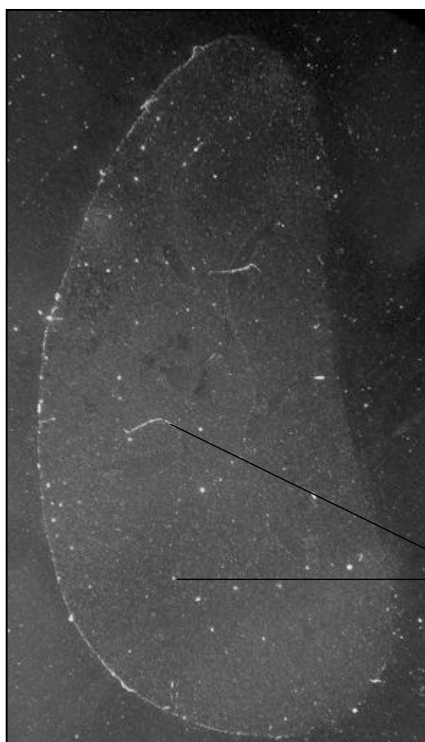
**Abb. 3.14. und 3.15.: Nieren sagittal**

*Dipping*

G: Gefäß

NM: Nierenmark

RMG: Rinden-Mark-Grenze



Als Kontrolle wurde auch ein Nierenschnitt mit einer Sense-Sonde hybridisiert und gedippt, um sicher zu sein, dass es sich um spezifische Signale handelt, welches sich hier bestätigt, da man nur ein allgemeines Hintergrundsignal erkennt.

Die mit AF gekennzeichneten Signale lassen sich als Artefakte deuten, da sie sich keiner Struktur zuordnen lassen.

AF

**Abb. 3.16: Niere**, inkubiert mit der Sense-Sonde, *Dipping*

AF: Artefakt

Desweiteren kann man auf den Abb. 3.14. u. 3.15. einen hellen Randsaum der Gefäße erkennen, der auf den Antisense-Schnitten nicht deutlich zu erkennen ist (s.a. Abb. 3.17. und 3.18.).

Auf Grund der hohen digitalen Vergrößerung ist die Auflösung der Abbildungen 3.17. und 3.18. schlechter als die der anderen Bilder.

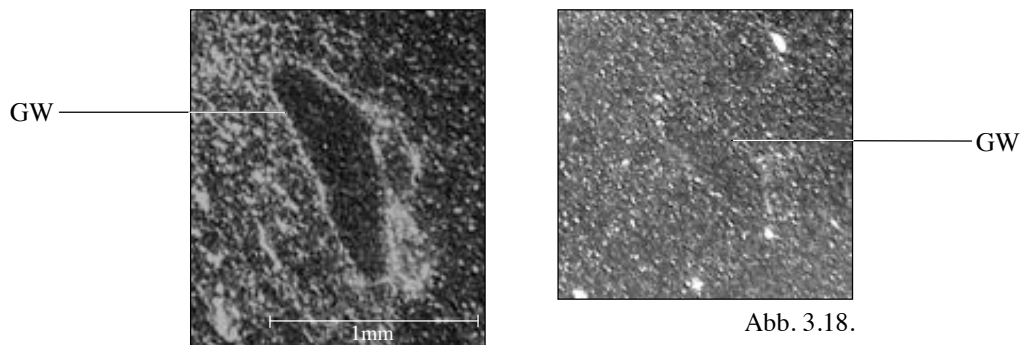


Abb. 3.17.

Abb. 3.18.

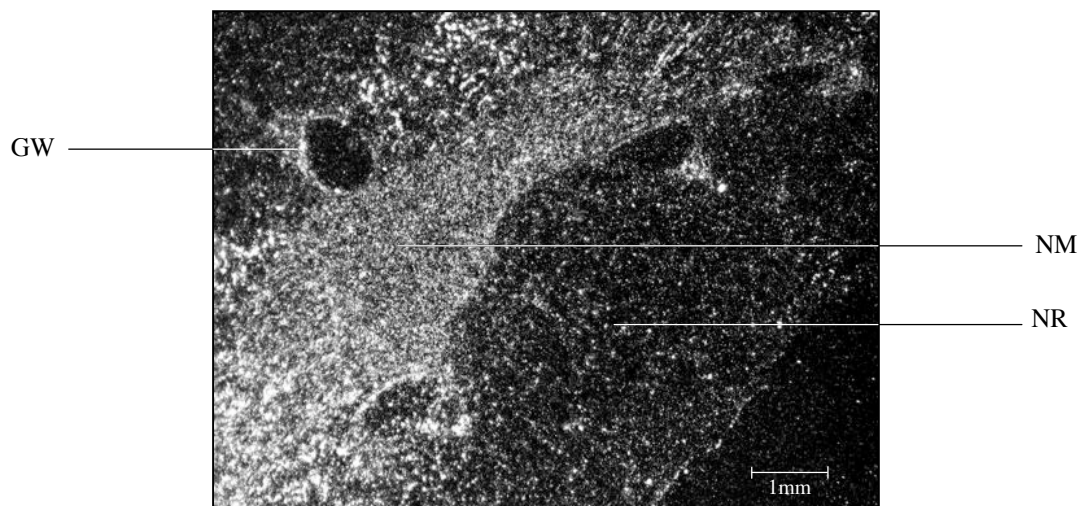
**Abb. 3.17.: Nierengefäß, Antisense *Dipping***

Nierengefäß, inkubiert mit der Antisense-Sonde, man erkennt ein Signal in der Gefäßwand

**Abb. 3.18.: Nierengefäß, Sense *Dipping***

Das Signal aus Abb. 3.16. ist hier nicht zu erkennen

GW: Gefäßwand

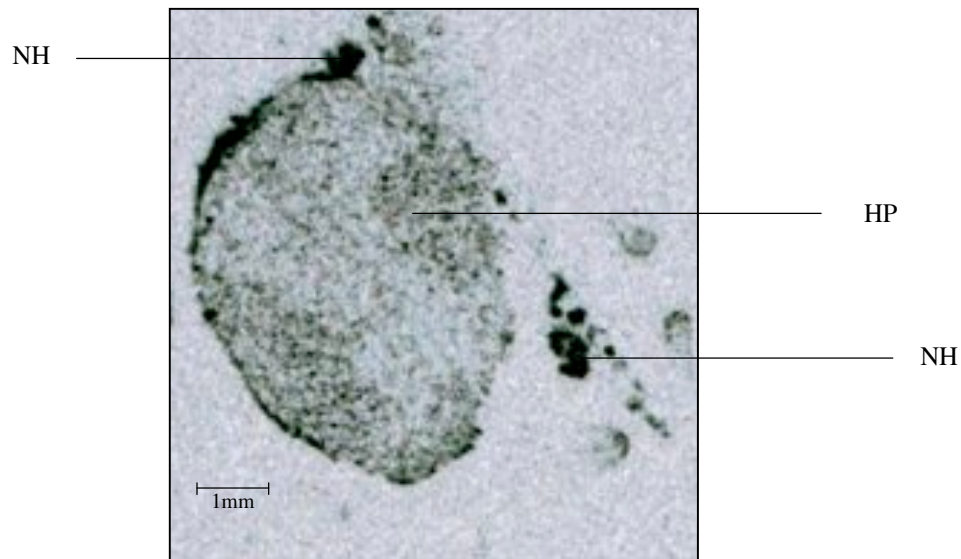


**Abb. 3.19.: Vergrößerung der Rinden-Mark-Grenze der Niere; *Dipping***

GW: Gefäßwand, NM: Nierenmark, NR: Nierenrinde

In der Vergrößerung der Rinden-Mark-Grenze kann man noch deutlicher die Abgrenzung zwischen Nierenmark und -rinde erkennen.

### 3.3.2.2. Hoden

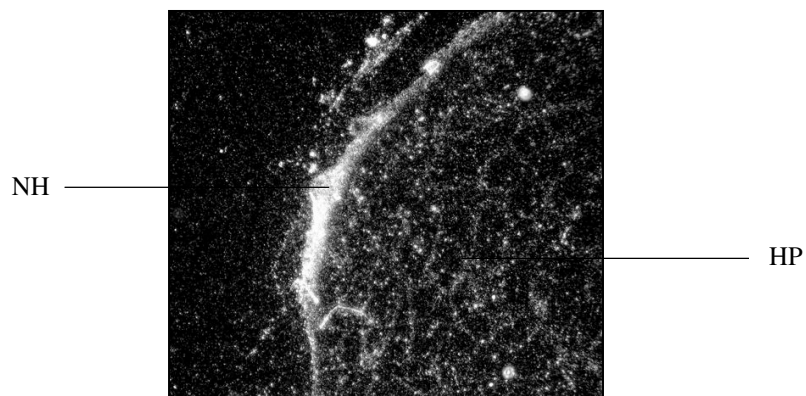


**Abb. 3.20.: Hoden, Autoradiogramm**  
HP: Hodenparenchym  
NH: Nebenhoden

Im Hoden erkennt man ein homogenes Signal im Hodenparenchym und ein deutlich stärkeres in den Strukturen, die dem Hoden direkt anliegen. Randständige Strukturen sind immer mit Vorsicht zu interpretieren, da die Gefahr der Artefaktbildung dort am größten ist.

Aufgrund der anatomischen Verhältnisse ist es jedoch möglich, dass es sich bei diesen signalstarken Strukturen entweder um den Nebenhoden oder das Skrotum handelt.

Die Zuordnung dieser signalstarken Struktur zum Nebenhoden würde auch zu den Resultaten des Northern Blots passen, in dem man in der Bande der Nebenhoden-RNA das stärkste Signal sieht.



**Abb. 3.21.: Hoden**  
Vergrößerung der Randzone des Hodens

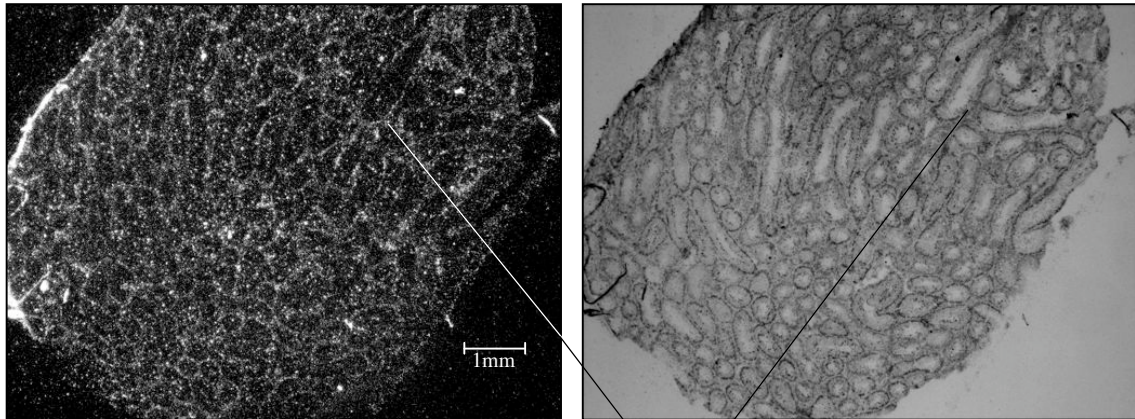


Abb. 3.22a.

Abb. 3.22b.

BG

**Abb. 3.22a.:** Hoden, *Dipping* , im Dunkelfeld fotografiert

**Abb. 3.22b.:** Hoden, *Dipping* , im Hellfeld fotografiert

BG: Bindegewebe

Ein identischer Hodenquerschnitt wurde nach dem Dipping im Dunkel- und Hellfeld fotografiert, sodass eine Zuordnung zu den histologischen Strukturen möglich ist. Man erkennt im Dunkelfeld eine netzartige Struktur, die dem Hodeninterstitium zuzuordnen ist. In Abb. 3.23a., einer Aufnahme im Dunkelfeld mit stärkerer Beleuchtung, erkennt man zusätzlich zu den Silber-Signalen schwach die mit Giemsa gefärbten Strukturen. Wenn man Abb. 3.22a. bis Abb. 3.23b. betrachtet, so kann man deutlich erkennen, dass die Signale im Gewebe zwischen den Tubuli am stärksten sind.

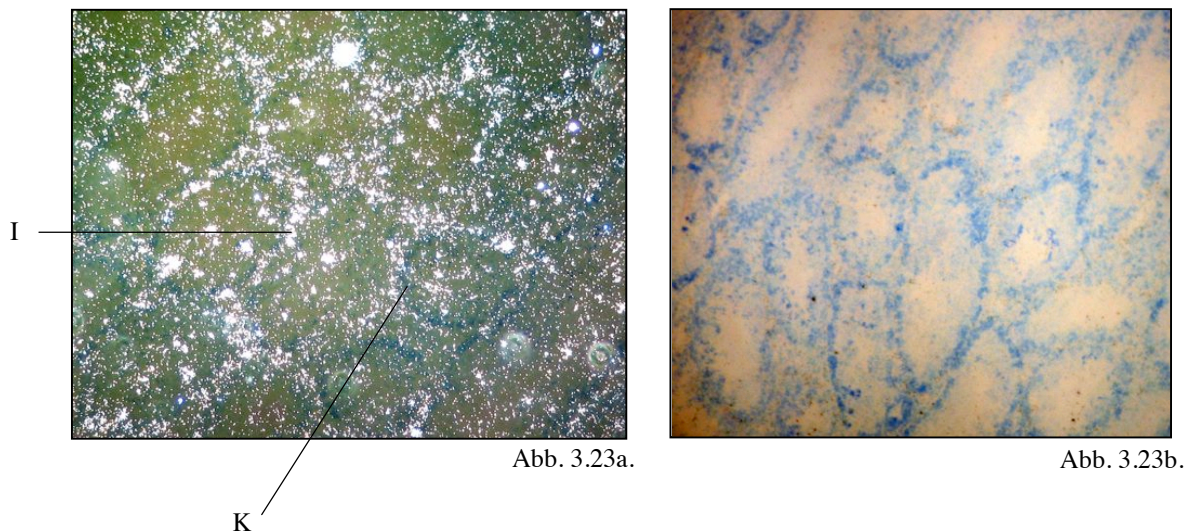


Abb. 3.23a.

Abb. 3.23b.

K

**Abb. 3.23a.:** Hoden, *Dipping* , im Dunkelfeld fotografiert

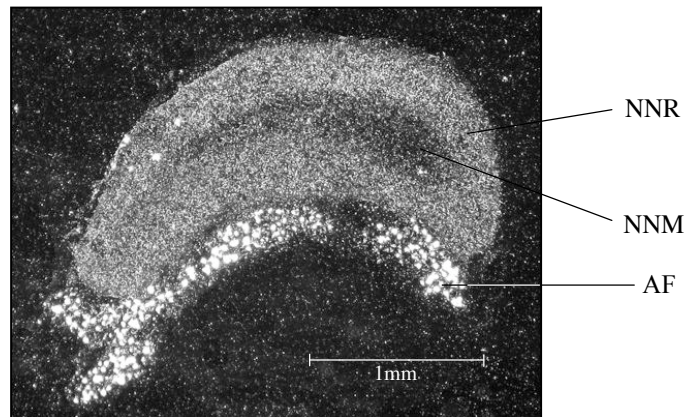
**Abb. 3.23b.:** Hoden, *Dipping* , im Hellfeld fotografiert

I: Intestitium

K: Keimepithel

3,6fach vergrößert im Vergleich auf Abb. 3.22. a + b

### 3.3.2.3. Nebenniere



**Abb. 3.24.: Nebenniere, Dipping**

NNM: Nebennierenmark

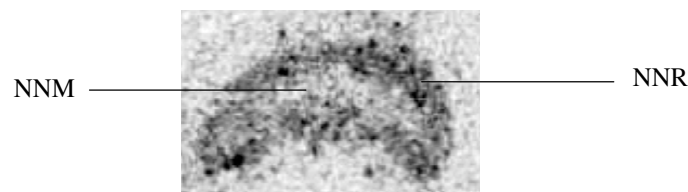
NNR: Nebennierenrinde

AF: Artefakt/ Fettzellen

In der Nebenniere ist eine deutliche Abgrenzung zwischen dem signalfreien Mark und der signalgebenden Rinde zu erkennen.

Eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Zonen der Rinde ist nicht möglich.

Die in Abb. 3.24. zu erkennenden hellen Signale am unteren Rand des Organs sind als Artefakte zu beurteilen, da in den Autoradiogrammen keine solch stark signalgebenden Strukturen zu sehen sind (s. Abb. 3.25.). In der Alkoholreihe wird das Fett aus den Fettvakuolen der Fettzellen der Glissonschen Kapsel gewaschen, sodass diese „leeren“ Zellen im Dunkelfeldmikroskop das Licht stark brechen.



**Abb. 3.25.: Nebenniere, Autoradiogramm**

NNM: Nebennierenmark

NNR: Nebennierenrinde



### 3.3.2.4. Glandula submandibularis

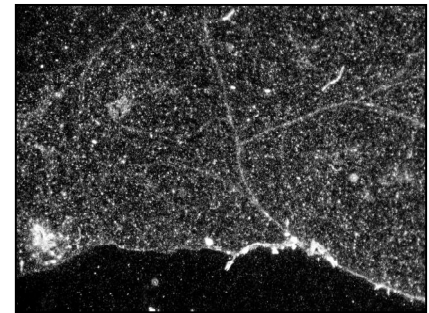
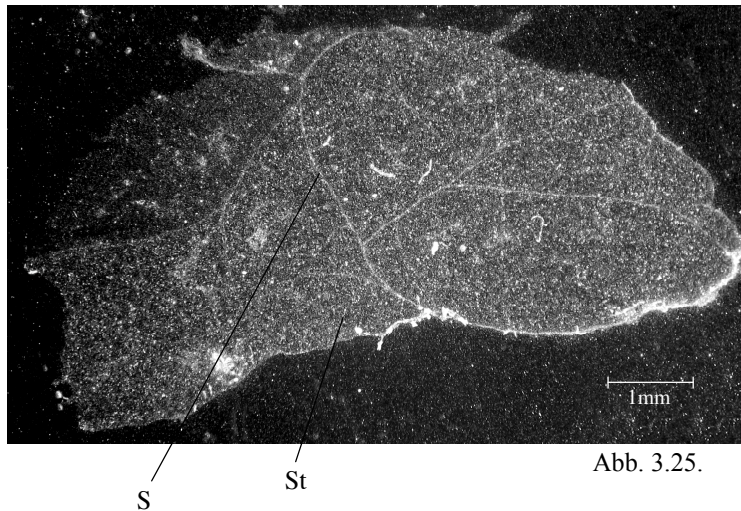


Abb. 3.25a.

Abb. 3.25.

#### Abb. 3.26a. + 3.26b.: Glandula submandibularis, *Dipping*

S: Septum

St: Stroma

Abb. 3.26b: 1,6fach vergrößert im Vergleich zu Abb. 3.26a.

In der Glandula submandibularis kann man eine gleichmäßige Signalstärke im Drüsenparenchym erkennen, eine Zuordnung zu Acini oder Ausführungsgängen ist nicht möglich. In den Dippings erkennt man deutlich die septale Einteilung der Drüse, es zeigt sich eine etwas stärkere Signalgebung im Bindegewebe.

### 3.3.2.5. Plazenta

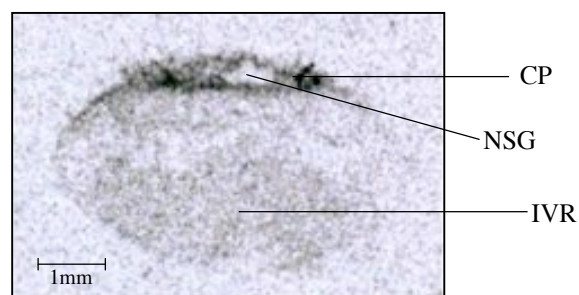


Abb. 3.27.

#### Abb. 3.27.: Plazenta eines 15 Tage alten Mäuse – Fetus

Autoradiogramm

IVR: Intervillöser Raum

NSG: Nabelschnurgefäße

CP: Chorionplatte

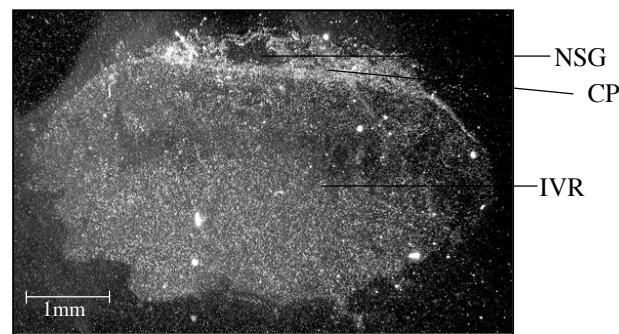


Abb. 3.28.

**Abb. 3.28. Plazenta eines 15 Tage alten Mäuse – Fetus;**

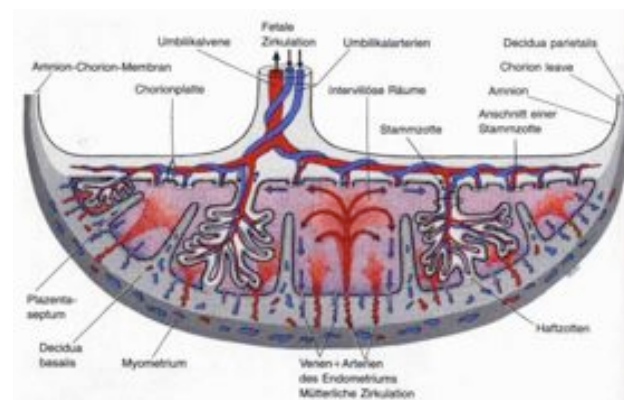
*Dipping*

IVR: Intervillöser Raum

NSG: Nabelschnurgefäße

CP: Chorionplatte

In dem Mutterkuchen ist ein deutliches, randständiges Signal zu erkennen, in dem ein kleiner Bereich ausgespart ist.

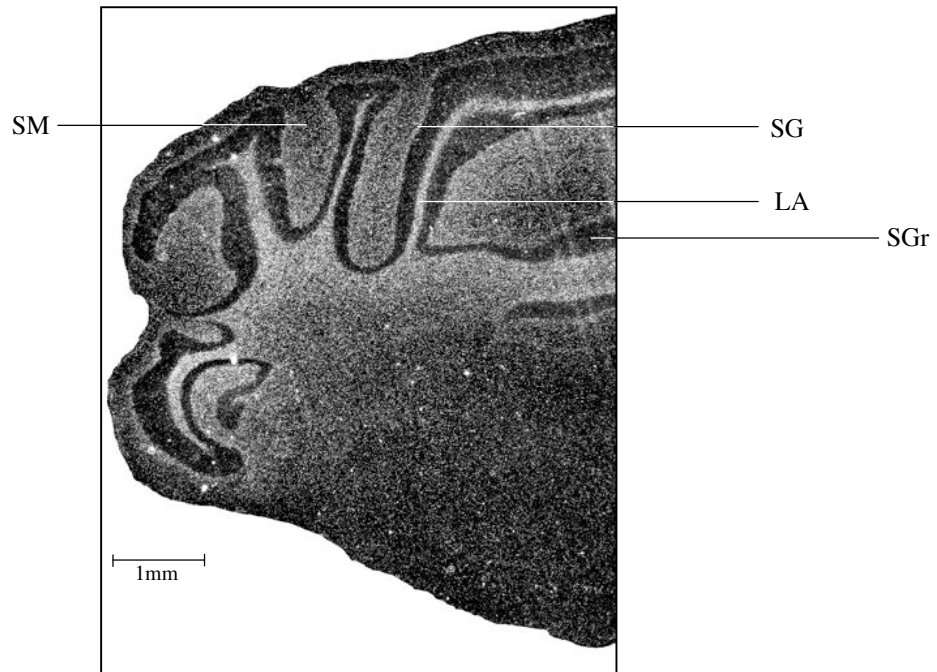


**Abb. 3.29.: Schematische Darstellung einer Plazenta**

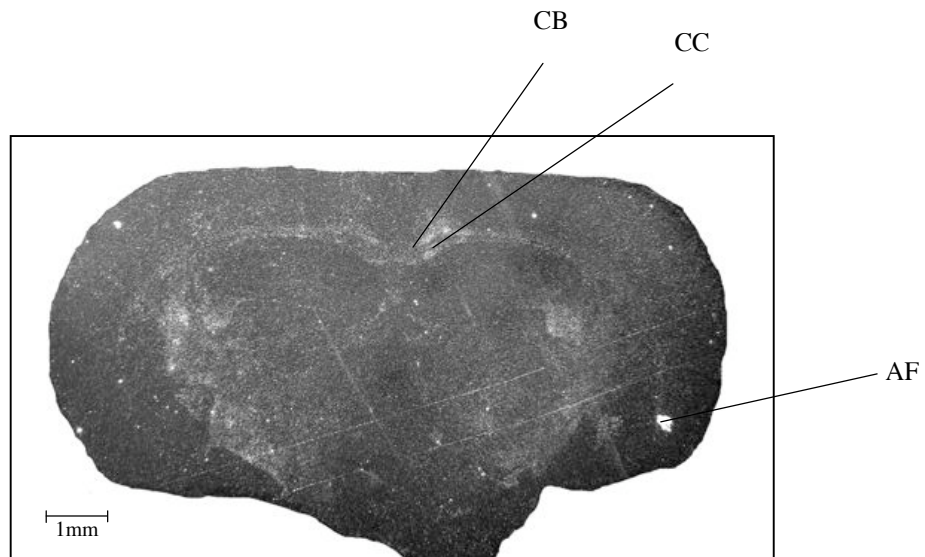
<http://www.merian.fr.bw.schule.de/mueller/Schueler/Fuchs/schwangerschaft.html>

Wenn man Abb. 3.29. zum Vergleich heranzieht, so ist es wahrscheinlich, dass es sich bei der signalgebenden Struktur um die Chorionplatte handelt und die ausgesparte Struktur die Nabelschnurgefäße sind, denn wie man an Abb. 3.17. – 3.19. erkennen kann, sieht man im Gefäßlumen kein Signal, jedoch sind die Gefäßwände signalgebend.

## 3.3.2.6. Gehirn



**Abb. 3.30.: Hirn**, Koronarschnitt durch das Cerebellum; *Dipping*  
 LA: Lamina alba (markhaltige Fasern)  
 SGr: Stratum granulosum (Körnerzellen)  
 SM: Stratum moleculare  
 SG: Stratum ganglionare (Purkinje-Zellen)



**Abb. 3.31.: Hirn**, Koronarschnitt durch das Telencephalon  
**Dipping**  
 CB: cingulum bundle  
 CC: Corpus callosum  
 AF: Artefakt

Im Cerebellum sieht man ein Signal in der Lamina alba, den Kommissurenbahnen und in der Purkinje-Zellschicht.

Im Telencephalon erkennt man ein diskretes, aber deutliches Signal im Corpus callosum und im Cingulus. Das Corpus callosum ist die größte Faserverbindung zwischen rechter und linker Hemisphere, der Cingulus verbindet den Gyrus cinguli, den Parietal- und Frontallappen mit dem Gyrus parahippocampus und Strukturen des Temporallappens, schafft somit eine Verbindung zwischen präfrontalem Cortex und Teilen des limbischen Systems (Braininfo, 2000). Zusammenfassend zum Großhirn lässt sich sagen, dass die graue Substanz, die die Neuronenkerne enthält, weniger signalgebend ist als große Kommissurenbahnen wie das Corpus callosum und der Cingulus. Jedoch kann man keine genauen Lokalisationsangaben machen.

Im Kleinhirn sieht man Signale in den Kommissurenbahnen, der Lamina alba und in der Purkinje-Zellschicht. Somit ist dies ein Ergebnis, welches sich bezüglich der histologischen Zuordnung der Signale zu Kommissurenbahnen, mit dem Großhirn deckt.

#### **3.4. Klonierung eines Phagenklones**

Wie in Kapitel 2 beschrieben, wurde eine lambda-Phagenbank auf genomische Fragmente des NaBC1 untersucht. Als Sonde wurde das Fragment 377 verwendet. In einer Datenbankrecherche (Altschul, SF *et al.*, 1990, Altschul SF *et al.*, 1997) wurde bei einem Vergleich der Sondensequenz mit dem Mausgenom nur der NaBC1 gefunden, so dass von einer hohen Spezifität ausgegangen werden kann.

Es konnten vier Klone präpariert werden und es gelang, zwei dieser Klone in den pBluescript KSII einzuklonieren. Nach der Sequenzierung wurde mittels einer *BLAST*-Recherche nach Homologien mit dem Mausgenom gesucht. Es stellte sich heraus, dass ein Phagenklon die genomische DNA des NaBC1 von Exon 1 bis Exon 15 einschließlich eines ca. 1kb großen Bereiches aus der 5'-UTR beinhaltet. Der zweite Klon entspricht der Sequenz von Exon 3 bis einschließlich eines ca. 4kb großen Bereiches aus der 3'-UTR.

Somit stehen nun zwei Klone zur Verfügung, die beide für die ersten Transmembrandomänen codieren, die laut Datenbankvorhersage ab Exon 10 beginnen, und somit ideal für die Generierung eines Knock-Out Konstruktes sind.

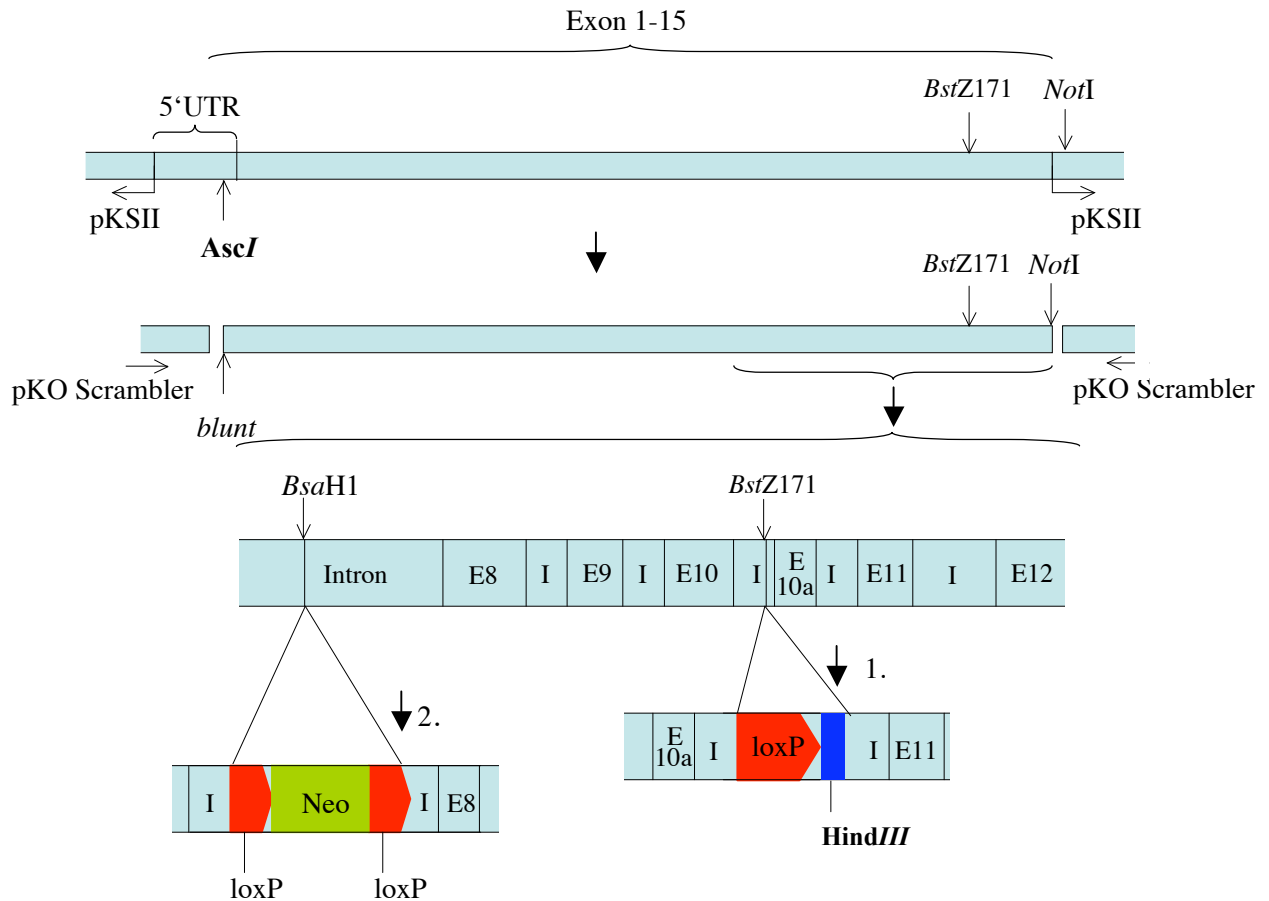
#### **3.5. Planung eines Targeting-Vektors für ein Knock-Out-Konstrukt**

Um ein geeignetes Knock-Out Konstrukt generieren zu können, ist es eine mögliche Strategie bei Transmembranproteinen, das Exon zu entfernen, welches an der ersten

Transmembrandomäne beteiligt ist, da man annimmt, dass dadurch die Topologie des Transporters soweit gestört wird, dass eine Insertion in die Membran und eine normale Funktion nicht mehr möglich ist. Im Fall des NaBC1 beginnen die Transmembrandomänen ab Exon 10 (Krogh *et al.*, 2001; Sonnhammer *et al.*, 1998). Um das Exon deletieren zu können, muss eine Schnittstelle im intronischen Bereich vor und nach dem Exon gewählt werden, die nicht gleichzeitig im Vektor oder an anderen Stellen des Klons schneidet. Aufgrund dieser Voraussetzungen war der Klon, der Exon 1 bis 15 beinhaltet günstiger zu klonieren.

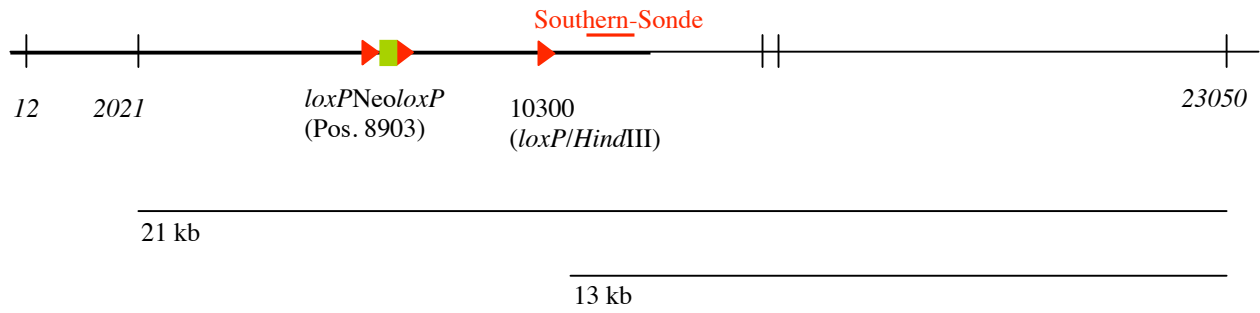
An Position 27 der genomischen DNA befindet sich eine *AscI* Schnittstelle, die in dem Konstrukt nur einmal schneidet und auch im pKS II nicht vorkommt. An dieser Stelle wird das Konstrukt geschnitten und das entstandene Fragment anschließend durch Inkubation mit einer Polynukleotidlösung und Polymerase ein Ende ohne Überhang (*blunt*) hergestellt. Im nächsten Schritt wird der Klon aus dem Vektor durch einen Verdau mit *NotI* herausgeschnitten. Der für die Transfektion der embryonalen Stammzellen benötigte Vektor pKO Scrambler wird mit *SmaI* und *NotI* aufgeschnitten, so dass das Fragment über eine *blunt* und eine *NotI*-Schnittstelle inkloniert werden kann. Über eine *BstZ171*-Schnittstelle an Position 10223, zwischen Exon 10 und 11, die wiederum nach dem Verdau durch Inkubation mit Nukleotiden zu einer *blunt*-Schnittstelle gemacht wird, wird die dritte loxP-Site zusammen mit einer *HindIII*-Schnittstelle inkloniert. Anschließend wird das Konstrukt an Position 8906 mit *BsaH1* geschnitten und mittels Nukleotiden aufgefüllt. Die aus einem vorhandenen Vektor mit zwei loxP-Sites flankierte Neo-Kassette wird durch das Restriktionsenzym *AscI* ausgeschnitten, aufgefüllt und in die *BsaH1*-Schnittstelle ligiert. Somit entsteht ein Konstrukt, welches vor Exon acht die loxP-Neo-loxP-Kassette trägt und zwischen Exon 10a und 11 die dritte loxP-Site mit der *BsiEI*-Schnittstelle, um später die positiven Klone zu identifizieren.

Dadurch wurde ein Konstrukt hergestellt, mit dem ein konditioneller Knockout der ersten Transmembrandomäne möglich ist. Durch die Cre-Rekombinase unter dem gewünschten zellspezifischen Promotor wird in der Maus das Stück zwischen den loxP-Sites herausgeschnitten, welches die Exons 8, 9, 10 und Teile des Exons 10a beinhaltet, insgesamt 446 Nukleotide, so dass es zusätzlich zur Deletion des für die erste Transmembrandomäne verantwortlichen Exon 10 zu einem Frameshift und somit mit ziemlicher Sicherheit zu einem Funktionsverlust des Proteins kommt.



**Abb. 3.32.:** Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für einen Konditionellen Knock-Out des NaBC1  
 Die Schnittstellen *AscI*, *BsaH1* und *BstZ171* sind in dem Konstrukt jeweils nur einmal vorhanden.  
 I: Intron; E: Exon, Neo: Neomycin-Resistenz

Für das Screening der embryonalen Zellen ist es nötig, mittels eines Restriktionsverdau herauszufinden, ob er gewünschte Klon in die Keimbahn integriert wurde. Dafür wird zusammen mit der dritten loxP-Site eine *HindIII*-Schnittstelle in die Sequenz gebracht. Zusammen mit der an Pos. 23050 3'-wärts gelegenen Schnittstelle kann somit mittels einer spezifischen Sonde im Southern-Blot anhand der Länge der Fragmente identifiziert werden, ob das Konstrukt integriert wurde (vgl. Abb. 3.33.). Durch den Verdau mit *HindIII* entstehen im Fall der erfolgreichen Integration zusätzlich zu dem 21 kb großen Fragment eines von 13 kb Länge.



**Abb. 3.33.:** Screening-Strategie:  
12, 2021, 23050: in der Sequenz vorhandene Schnittstellen  
loxP/HindIII: eingefügte Schnittstelle

## 4. Diskussion

### 4.1. Alternative Spleißvarianten.

Beim Menschen sind ca. 32.000 Gene bekannt (Modrek *et al.*, 2002), die für mehrere hunderttausend Proteine kodieren (Touriol *et al.*, 2003). Mechanismen, die für diese Vielfalt verantwortlich gemacht werden können, sind die alternative Benutzung von Promotoren, Translations-Startcodons oder auch alternatives Spleißen von mRNA.

Analysen von alternativen Spleißvorgängen haben ergeben, dass 40 – 60 % der Gene des menschlichen Genoms alternativen Spleißvorgängen unterliegen (Modrek *et al.*, 2002).

Da zu Beginn der Arbeit davon ausgegangen wurde, dass *SLC4A11* in die Genfamilie der Anionenaustauscher einzuordnen ist und bekannt ist, dass die mRNA vieler Mitglieder dieser Familie alternativ gespleißt wird (Romero *et al.*, 2004), wurde eine Untersuchung auf alternative Exons vorgenommen. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der cDNA-Sequenz (XM\_194050.2) verglichen. Identifiziert werden konnten drei alternative Exons (1a, 3a, 10a).

Exon 1a enthält zwei alternative Startcodons (CTG). Alternative Startcodons sind in der Literatur als weitere Mechanismen zur Entstehung der Proteinvialt beschrieben (Touriol *et al.*, 2003). Prats *et al.* beschrieben 1989 die Initiation der Translation einer Isoform eines Fibroblasten-Wachstumsfaktors (*human hepatoma-derived basic fibroblast growth factor*) von einem 5'-wärts des eigentlichen Start-ATGs gelegenen CTG. Wie oben beschrieben würde jedoch die Benutzung beider CTG durch die Leserahmenverschiebung zu jeweils neuen Stopcodons in Exon 3 führen. Eine Bedeutung in der Translationsregulation ist nicht eindeutig ersichtlich, jedoch mit den erhaltenen Ergebnissen auch nicht sicher auszuschließen.

Exon 3a enthält ein Stopcodon im offenen Leserahmen, das entstehende Protein wäre nur 243 Aminosäuren lang und somit wahrscheinlich nicht funktionsfähig. Als Hypothese bliebe demnach, dass das vorzeitige Stopcodon zur posttranskriptionalen Regulation durch Degradation von mRNA beitragen könnte (nonsense mediated mRNA decay – NMD). Durch Interaktion zwischen Proteinen und RNA-Sequenzen kommt es unter bestimmten Umständen zum Abbau von mRNA. Während der Prozessierung der prä-mRNA werden die Introns durch das Spleißosom herausgespleißt und 20 – 24 Nukleotide upstream der Exon-Verbindungsstellen ein Proteinkomplex, der sogenannte „Exon-junction“-Komplex,



gebunden. Dieser Komplex ermöglicht den Transport der mRNA aus dem Nukleus in das Zytoplasma und das Beibehalten der Genstruktur (Hillman RT *et al.*, 2004; Cuccurese *et al.*, 2005). In der ersten Runde der Translation werden von dem Ribosom alle Exon-junction Komplexe entfernt. Wenn das Ribosom am physiologischen Stopcodon angelangt ist, welchem per definitionem kein Exon-junction Komplex mehr folgt, wird die normale Translation eingeleitet (Hillman RT *et al.*, 2004, Cuccurese *et al.*, 2005). Sollte das Ribosom auf ein präterminales Stopcodon treffen, welchem noch mindestens ein Exon-junction Komplex 3'-wärts folgt, werden Mechanismen der mRNA-Degradation eingeleitet (Hillman RT *et al.*, 2004, Cuccurese *et al.*, 2005). Sinn dieser Regulation von mRNA-Expression ist unter anderem die Anpassung an verschiedene Stoffwechszustände wie zum Beispiel Stress, zytotoxische Drogen oder andere physiologische Ursachen, welche der raschen Herunterregulierung der Transkripte eines bestimmten Genes bedürfen, so zum Beispiel die Aktivierung des NMD durch TNF- $\alpha$  (Bevilacqua A *et al.*, 2003).

Nach Durchführung einer EST-Datenbank-Recherche (EST = *expressed sequence tags*) postulieren Lewis *et al.* 2003, dass ein Drittel der alternativen Transkripte präterminale Stopcodons enthalten und somit ein potenzielles Ziel des NMD ist. Ausgenommen wurden in dieser Recherche jedoch Intron-Retentionen, d.h. Spleißvorgänge, in denen vollständige Introne eingespleißt werden, da diese nicht von unvollständig prozessierten Transkripten zu unterscheiden sind. Exon 3a fällt jedoch in diese Kategorie, da das komplette Intron zwischen Exon 3 und 4 eingespleißt wurde. Insofern ist die postulierte Funktion des Exons im NMD durch Einspleißen des präterminalen Stopcodons allenfalls spekulativ.

Exon 10a ist nach unseren Ergebnissen als konstitutiv anzusehen, da es in allen analysierten Transkripten nachgewiesen wurde und zudem in der aktuellen Sequenz (XM\_194050.3) auch als konstitutiv geführt wird. Auch sind alternative Spleißvorgänge im Bereich von Transmembrandomänen unwahrscheinlich, da, wie oben erwähnt, die Fähigkeit zur TMD-Bildung gestört wäre.

## 4.2. Expressionsanalyse

In dieser Arbeit wurde die Expression auf RNA-Ebene mittels Northern Blot auf murinen Gewebeschnitten mit  $^{35}\text{S}$ -In-situ-Hybridisierung untersucht.

Im Northern Blot erkennt man die stärksten Signale im Gehirn, in der Niere, im Hoden und Nebenhoden, in der Retina und in der Speicheldrüse. Im Northern Blot mit Gesamt-RNA aus Mausembryonen ist eine Expression am Tag 7 der Entwicklung zu sehen, die an den darauffolgenden dargestellten Tagen 11, 15 und 17 vollständig verschwunden ist. Eine mögliche Erklärung für dieses Expressionsmuster in den verschiedenen Embryonalstadien ist, dass bei der Präparation der Embryonen-RNA von Tag 7 für die Filter plazentare RNA mitverarbeitet wurde. Nach Rücksprache mit *Clontech*, dem Hersteller des Filters, schließt man auch dort eine im Produktionsvorgang der Filter entstandene Verunreinigung der frühen Embryonen mit plazentarer RNA nicht aus. Mit abschließender Sicherheit kann jedoch dieses nicht postuliert werden, da es uns nicht möglich war, Embryonen von Tag 7 post conceptionem zu präparieren und In Situ Hybridisierungen durchzuführen. Es ist demnach auch möglich, dass die Expression von NaBC1 in frühen Embryonalstadien hoch ist und in späteren Stadien herunterreguliert wird.

In der Analyse der Expression in den einzelnen Organen fällt auf, dass der NaBC1 scheinbar nicht im Gastrointestinaltrakt exprimiert wird, allein im Ösophagus und im Coecum erkennt man ein schwaches Signal. Hier stellt sich die Frage, wie Borat resorbiert wird, und man kann zu zwei Schlüssen kommen. Entweder reicht im Magen-Darm-Trakt die Diffusionsfähigkeit aus, um ausreichend resorbiert zu werden, oder es gibt noch weitere, nicht identifizierte Borattransporter, die spezifisch für die Resorption im Gastrointestinaltrakt sorgen (Park *et al.*, 2004). Wahrscheinlicher ist die Möglichkeit weiterer Borattransporter, da, wie in dieser Arbeit beschrieben wurde, Borat viele wichtige Stoffwechselwege beeinflussen kann. Angaben über die Menge des täglich vom Menschen aufgenommenen Bors schwanken zwischen 0,3 – 41 mg pro Tag (Naghii MR *et al.*, 1993). Dies liegt an der Vielzahl der analytischen Methoden, an unterschiedlichen Bodenkonzentration und somit unterschiedlichen Konzentrationen in Pflanzen (Naghii MR *et al.*, 1993), an dem Gehalt im Trinkwasser, individuellen Essgewohnheiten und Vorlieben und auch daran, dass Bor in vielen Medikamenten zu einem nicht unerheblichen Anteil vorhanden ist (Hunt CD *et al.*, 1991). Hauptnahrungsquellen für Bor sind Nüsse, Trockenfrüchte, frisches Obst und Gemüse (Naghii MR *et al.*, 1996). Auch wenn Borsäure in geringen Mengen über die Zellmembran diffundieren kann (s. Abb. 1.4.), ist es

unwahrscheinlich, dass dieser Mechanismus für eine optimale Versorgung des Körpers ausreichend ist (vgl. Takano *et al.*, 2002).

#### 4.2.1. Niere

In der Niere erkennt man ein Signal im Mark, welches sich im Randbereich, an der Grenze zur Rinde, noch etwas deutlicher darstellt. Histologisch entspräche dies dem Außenstreifen des Nierenmarkes. Auffällig ist die relativ starke Expression in Blutgefäßen der Niere, die schon früher beschrieben wurde (Park *et al.*, 2004). Korrelieren könnte dies mit der im Vergleich starken Expression im Bereich der Rinden-Mark-Grenze, wo die Arteriae arcuatae verlaufen.

Borat wird fast ausschließlich renal ausgeschieden (Hunt *et al.*, 1998; Jansen *et al.*, 1984; Kent and McChance, 1941), wobei eine tubuläre Reabsorption bei niedrigen Plasmakonzentrationen anzunehmen ist (Usuda K *et al.*, 1998; Pahl *et al.*, 2001). Im distalen Tubulus herrscht eine hohe Aktivität der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, sodass transzellulär ein hoher Natriumgradient vom Lumen zur Blutseite entsteht. Diesen Gradienten könnte der NaBC1 ausnutzen, um im Symport Borat zu reabsorbieren, so wie es auch mit Chlorid funktioniert. Jedoch beschreiben Park *et al.* 2004 in ihrer Arbeit die Lokalisation des NaBC1 auf der basolateralen Seite der Tubuluszellen und sehen die Funktion eher in der Aufrechterhaltung der Borhomöostase des Zytoplasmas als in der Reabsorption aus dem Tubuluslumen. Die Resorptionsfunktion sprechen sie einem anderen, noch nicht identifizierten Transporter zu.

#### 4.2.2. Hoden

Im Hoden findet sich eine Expression im intertubulären Stroma, korrelierend mit der Lokalisation der Leydig-Zwischenzellen, die Testosteron und Östrogen produzieren (Lambard S *et al.*, 2005). Insofern ist es naheliegend, dass sich in den Leydig-Zellen ein Borattransporter befindet, da es in der Literatur Hinweise auf eine Beeinflussung des Östrogen- und Testosteronhaushaltes durch Borat gibt (Nielsen FH, 1994; Naghii MR *et al.*, 1997, Sheng MH *et al.*, 2001), s. 4.3.4..

#### 4.2.3. Nebenniere

Bei Betrachtung der hybridisierten Schnitte lässt sich keine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Zonen treffen, man kann nur sagen, dass die Adrenalin und Noradrenalin produzierenden Zellen des Markes den NaBC1 offensichtlich nicht exprimieren. Genauso

wie im Hoden lässt sich also auch hier eine Korrelation der Expression von NaBC1 und Steroidhormon produzierenden Zellen feststellen. Die Beeinflussung des Östrogen- bzw. Testosteronhaushaltes (Nielsen FH, 1994; Naghii MR *et al.*, 1997, Armstrong TA *et al.*, 2001 Sheng MH *et al.*, 2001) gibt Anlass zur Annahme, dass Bor nicht nur die intrazelluläre Homöostase reguliert, sondern eventuell auch auf die Bildung der Hormone Einfluss nimmt.

#### **4.2.4. Glandula submandibularis**

In der Glandula submandibularis kann man ein relativ homogenes Signal erkennen, eine genaue Zuordnung zu Acini oder Ausführungsgängen kann nicht vorgenommen werden. Eine Expression in der basolateralen Membran der Acini, nachgewiesen durch Immunfluoreszenz, ist in der Literatur beschrieben (Park *et al.*, 2004), kann hier jedoch weder bestätigt noch widerlegt werden, da keine ausreichende Auflösung mit der In-Situ-Hybridisierung erreicht werden konnte.

#### **4.2.5. Plazenta**

Bei Versuchen, Krallenfroschlarven unter niedrigen Boratkonzentrationen aufzuziehen, wurde eine im Vergleich mit der unter ausreichender Boratsupplementierung aufgezogenen Kontrollgruppe eine höhere Anzahl nekrotischer Eier, eine erhöhte Anzahl abnormaler Gastrulationen und eine niedrigere Zellzahl im mittleren Blastula-Stadium beobachtet. 96 Stunden nach der Befruchtung zeigte keine der Larven von Borat defizienten Eltern eine normale Entwicklung (Fort *et al.*, 2002),

Versuche mit Zebrafischen zeigten eine signifikante positive Korrelation des Überlebens der Embryonen in Abhängigkeit von der Boratkonzentration im Wasser. Von Eiern, die in Wasser mit einem äußerst niedrigen Boratgehalt ( $0,1 \pm 0 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) gehalten wurden, überlebten zum Zeitpunkt zehn Tage nach der Befruchtung nur 8% im Gegensatz zu den Eiern im Wasser mit zugefügtem Borat ( $44,9 \pm 1,7 \mu\text{mol l}^{-1}$ ), von denen ca. 65% zu diesem Zeitpunkt noch lebten (Rowe RI *et al.*, 1999).

In Versuchen mit Ratten wurde deutlich, dass ein Boratmangel die frühe embryonale Entwicklung behindert. Eine Exposition des Muttertieres gegenüber einer Nahrung mit reduziertem Boratgehalt führte bei entnommenen Zweizell-Embryonen zu einer reduzierten Blastozysten-Formation, einer Reduktion der Blastozysten-Zellzahl und einer erhöhten Anzahl von degenerierten Embryonen im Gegensatz zur Kontrollgruppe, die adäquate Boratkonzentrationen supplementiert bekam (Lanoue L. *et al.*, 1998).

Embryonen, bzw. Eier von Müttern, die eine boratreduzierte Ernährung bekamen, zeigten deutliche Degenerationen. In den von uns hybridisierten Placentae ist das deutlichste Signal im Bereich der Chorionplatte zu erkennen, dem Bereich also, in dem die Nabelschnurgefäße sich schon gebildet haben und zur bzw. von der Nabelschnur wegziehen. Hier ist eine Transporterfunktion jedoch nicht sinnvoll, da der mütterlich-embryonale Stoffaustausch im intervillösen Raum stattfindet, dem Raum also, in dem kein Signal zu erkennen ist. Das Expressionsmuster passt jedoch zu dem in der Niere, in der die stärkste Expression in Gefäßwänden nachgewiesen werden konnte.

#### **4.2.6. Gehirn**

Im Hirn lässt sich eine Expression in den großen Kommissurenbahnen wie dem Corpus callosum und dem Cingulus im Telencephalon und der Lamina alba im Cerebellum darstellen. Dieses Signal korreliert mit der Lokalisation von Glia, in den großen Kommissurenbahnen vornehmlich Oligodendrozyten, die für eine Ausbildung der Markscheiden der Nervenfasern verantwortlich sind. Die Vermutung liegt nahe, dass der NaBC1 an der Borhomöostase der Gliazellen oder, durch die Oligodendrozyten, der Nervenzellen beteiligt ist, es gibt in der Literatur bisher jedoch keine Hinweise auf eine Beeinflussung der Neuronen oder der Gliazellen durch Bor.

### **4.3. Interaktionen und mögliche Funktionen von Borat**

#### **4.3.1. Interaktionen auf molekularer Ebene**

Auf molekularer Ebene werden verschiedene Funktionen in der Literatur diskutiert. Borsäure könnte unter physiologischen Bedingungen mit einer Aminogruppe oder mit bis zu vier Hydroxylgruppen reagieren und Komplexe bilden. Mögliche Liganden wären somit Pyridin- (NAD<sup>+</sup>- oder NADP-) oder Flavin- (FAD-) Nukleotide und Serinproteasen (Hunt CD, 1998). Mit den Serinproteasen reagiert Borsäure entweder über die Imidazolgruppe des Histidin oder mit der Hydroxylgruppe des Serinrestes, beides Bestandteile des katalytischen Zentrums des Enzyms (Hunt CD, 1998).

#### **4.3.2. Bor im Zellwachstumszyklus**

Versuche der Arbeitsgruppe Park *et al.* mit HEK 293- und HeLa-Zellen zeigen, dass Borkonzentrationen im Bereich von 0,1 bis 0,5 mM im Medium stark mitogen wirken (Park *et al.*, 2004). Diese mitogen und proliferativ wirkende Funktion wurde auf eine

Aktivierung des *Mitogen-Activated-Protein-Kinase-Pathway* (MAP-Kinase-Weges) zurückgeführt, da höhere Konzentrationen zu einer schnelleren Phosphorylierung der *Mitogen-activated or extracellular signal-regulated protein kinase* (MEK) und damit auch der *Extracellular signal-regulated kinase* (ERK) führen und somit diese Kinasen in ihren aktiven Zustand überführen. In Konzentrationen über 1 mM im Medium hemmt Bor jedoch das Zellwachstum (Park *et al.*, 2004). Die Rolle des NaBC1 im Zellwachstumszyklus wurde durch *Knockdown*-Experimente mit RNA – Interferenz (siRNA) gezeigt. Durch die spezifische Herunterregulierung der Konzentration der codierenden mRNA von NaBC1 wurde das Zellwachstum von HEK 293 und HeLa – Zellen signifikant reduziert (Park *et al.*, 2004).

#### **4.3.3. Fragliche Beeinflussung von Tumorwachstum**

Die Rolle von Borsäure im Zusammenhang mit Serinproteasen, speziell mit dem Prostata Spezifischen Antigen (PSA) wird in der Literatur diskutiert (Gallardo-Williams MT *et al.*, 2004). PSA wurde mit einem fluoreszierenden Substrat inkubiert und man konnte feststellen, dass die zusätzliche Gabe von Borsäure die proteolytische Aktivität gegenüber verschiedenen Substraten herabsetzt (Gallardo-Williams MT *et al.*, 2004).

PSA ist ein etablierter Marker für die benigne Prostatahyperplasie und das Prostatakarzinom. Weniger bekannt ist die Tatsache, dass ein erhöhter PSA-Spiegel eventuell auch ursächlich für Prostatakrebs sein könnte. Man vermutet, dass PSA in seiner Funktion als Serinprotease das Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3), an welches 90% der Insulin-like growth factors (IGFs) binden, spaltet und dadurch höhere Serumspiegel an freiem IGF-1 induziert (Gallardo-Williams MT *et al.*, 2004; Grimberg A *et al.*, 2000). IGF-1 wiederum steht in der Diskussion, Tumorwachstum zu beschleunigen und über verschiedene Mechanismen einen Beitrag zur Karzinogenese zu leisten (Grimberg A *et al.*, 2000). Infolgedessen postulieren Gallardo-Williams MT *et al.*, dass Borsäure die Aktivität von PSA hemmen und somit letztlich zu einer Abnahme von freiem IGF-1 und damit auch des Tumorwachstums führen kann.

Nacktmäuse, denen humane Prostata-Karzinom Zellen (LNCaP) subkutan implantiert wurden, wurden mit unterschiedlichem Borgehalt im Futter ernährt (0 mgB/kgKG/Tag; 1,7 mgB/kgKG/Tag; 9,0 mgB/kgKG/Tag). Die Gruppe, die 1,7 mgB/kgKG/Tag erhielt, hatte den größten Vorteil, denn die Tumorgröße war im Gegensatz zu der Kontrollgruppe um 38% vermindert und das Serum PSA war im Vergleich um 88,6% reduziert. Die Gruppe mit dem höheren Borgehalt in ihrer Nahrung zeigte auch eine deutliche, jedoch nicht so

ausgeprägte Reaktion auf die Borzufuhr. Die Tumoren der Bor-supplementierten Tiere zeigten zudem eine geringere Anzahl Mitosen im Tumorgewebe, und die Expression von IGF-1 war lokal im Tumor reduziert (Gallardo-Williams MT *et al.*, 2004).

Ähnliche Ergebnisse, jedoch aus Experimenten mit Zelllinien, veröffentlichten Barranco *et al.* 2004. Prostatakrebszelllinien (DU-145, LNCaP und PC-3) wurden in Medien mit unterschiedlichen Konzentrationen an Borsäure kultiviert. DU-145 und LNCaP reagierten auf steigende Konzentrationen von Borsäure im Medium (bis zu 1000  $\mu\text{M}$ ) mit einer Proliferationsreduktion von 98% bzw. 77%. Das Wachstum der Zelllinie PC-3 wurde bei gleicher Konzentration um 52% reduziert. Die Effekte auf die DU-145-Zelllinie lassen sich jedoch nicht durch die Inhibition von PSA erklären, da diese Zelllinie kein PSA exprimiert. Postuliert wird eine Bildung von Nukleotid-Borat-Komplexen unter Beteiligung der Ribose der Nukleinsäuren, welche die Funktion oder die Nutzung der Nukleotide verändert (Barranco *et al.*, 2004). Die These der Proliferationshemmung bei Prostatakarzinomen wird von weiteren Studien gestützt. In einer amerikanischen Querschnittsstudie wurde eine negative Korrelation zwischen Boraufnahme und dem Risiko, an Prostatakrebs zu erkranken, beobachtet. Diese Studie bezog sich allerdings nur auf 95 Krebspatienten und 8720 männliche Kontrollpersonen und ist somit auf Grund der geringen Anzahl der betroffenen Teilnehmer vorsichtig zu interpretieren (Cui Y *et al.*, 2004).

#### 4.3.4. Mögliche Rolle im Steroidhaushalt

In der Literatur wird eine Beeinflussung des Calciumhaushaltes durch boratabhängige Anhebung des Plasma-Östrogenspiegels postuliert (Nielsen FH, 1994; Naghii MR *et al.*, 1997). 18 gesunde männliche Patienten wurden 4 Wochen mit einer täglichen Dosis von 10 mg Borat supplementiert, und man stellte fest, dass die Plasma-Östradiol-Konzentration signifikant anstieg (Naghii MR *et al.*, 1997).

Versuche mit ovariectomierten Ratten zeigten, dass eine Substitution mit Borsäure und 17-Östradiol einen synergistischen Effekt auf den Knochenstoffwechsel hat, die Absorption von Calcium, Magnesium und Phosphor und die Retention und somit auch die Plasmaspiegel von Calcium und Magnesium werden erhöht (Sheng MH *et al.*, 2001).

In Experimenten mit kastrierten männlichen Schweinen, die mit 5 mg/kg oder 15 mg/kg Natriumborat ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ) supplementiert wurden, stellte man eine Erhöhung der Knochenelastizität der Fibula bei unveränderten Calcium-, und Phosphor-Serumspiegeln fest (Armstrong TA *et al.*, 2001). Die unveränderten Serumspiegel von Calcium und Phosphor lassen sich erklären, denn Sheng *et al.* haben 2001 gezeigt, dass diese Parameter

nur von Borat in Kombination mit Östradiol verändert werden können. Wie oben beschrieben waren die Schweine kastriert und somit nicht mehr in der Lage, Östrogene und Testosterone in den Testes zu produzieren. Man kann nach diesen Versuchen annehmen, dass die Knochenmineralisierung von Borat alleine beeinflusst werden kann, sich die Mineralhomöostase jedoch nur in Synergie mit Östrogenen verändert (Armstrong TA *et al.*, 2001; Sheng MH *et al.*, 2001).

Desweiteren wurden in Versuchen mit adulten Krallenfröschen, die unter bordefizienten Bedingungen aufgezogen wurden, einige morphologische Veränderungen deutlich. So konnte bei weiblichen Fröschen eine Atrophie der Ovarien, eine Nekrose der Oozyten und eine unvollständige Oozytenreifung beobachtet werden. Bei den Männchen fiel eine Verminderung des Hodengewichts und eine geringere Spermienzahl auf (Fort *et al.*, 2002). Auch dies spricht dafür, dass Bor eine Funktion im Testosteronstoffwechsel einnimmt und eventuell auch die Morphologie der Geschlechtsorgane beeinflusst. Insofern ist die Lokalisation im interstitiellen Hodengewebe in den Leydig-Zellen, die durch ihre Testosteronproduktion zur Spermienreifung beitragen als plausibel zu interpretieren. Die Nebenhoden dienen der Motilitätserlangung der Spermien, und auch hier könnte Borat zusammen mit Testosteron zur Reifung beitragen. Interessant wäre eine Expressionsanalyse in den weiblichen Gonaden, da, wenn die oben angestellten Vermutungen richtig sind, auf Grund der höheren Konzentration und Produktion von Östrogenen eine noch stärkere Expression zu erwarten wäre. Zumindest in der *UniGene*-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* findet man bei der Suche nach NaBC1-exprimierenden Organen das Ovar.

#### **4.3.5 Mutationen im *SLC4A11*-Gen im Zusammenhang mit kongenitaler Endotheldystrophie**

Kürzlich wurde ein Zusammenhang zwischen Mutationen im *SLC4A11*-Gen und der kongenitalen, autosomal rezessiv vererbten, endothelialen Dystrophie Typ 2 (CHED2) beschrieben und in einer weiteren Veröffentlichung bestätigt (Vithana *et al.*, 2006; Jiao *et al.*, 2006). Die CHED ist eine erbliche, bilaterale korneale Dystrophie, charakterisiert durch korneale Trübung und Nystagmus, welche phänotypisch der Fuchs'schen Endotheldystrophie ähnelt (Vithana *et al.*, 2006).

Untersuchungen des *SLC4A11*-Gens in zehn Familien mit CHED zeigten sieben verschiedene Mutationen, die entweder durch Blockierung des Membran-Targetings oder über Nonsense-Mediated Decay zu einem Funktionsverlust des Gens führen. Außerdem



konnte die Expression von *Slc4a11* in der Kornea von Mäusen am 18. Entwicklungstag nachgewiesen werden, ein Entwicklungszeitpunkt, der äquivalent zum 5. Gestationsmonat im Menschen ist, in dem sich die CHED entwickelt (Vithana *et al.*, 2006). Daraufhin wurden HEK-293 Zellen mit den Mutanten transfiziert und festgestellt, dass die veränderten Proteine im endoplasmatischen Retikulum akkumulierten und dort degradiert wurden, keine der mutierten Proteine erreichte die Zellmembran (Vithana *et al.*, 2006). Postuliert wird von Vithana *et al.*, dass *SLC4A11* eine Funktion in der Formation des Endothels haben könnte und der Funktionsverlust zu Zelltod und sekundär zu einem kornealen Ödem führt.

Desweiteren sind mehrere Mutationen bekannt, die über Leserahmenverschiebungen mit Entstehung von Stopcodons zum Krankheitsbild des Harboyan-Syndromes (Korneale Dystrophie und sensorische Taubheit) führen (Desir *et al.*, 2007). Postulierte Mechanismen für die Pathogenese dieser Erkrankung könnten ein Effekt auf die Zellproliferation, z.B. über die boratabhängige Beeinflussung des MAP-Kinase-Wegs (Park *et al.*, 2004) sein, oder den in Abwesenheit von Borat stattfindenden Transport von Na<sup>+</sup> und OH<sup>-</sup>, der zur Homöostase der Zellen des Innenohres beiträgt (Desir *et al.*, 2007).

Somit geben diese ersten Veröffentlichungen Anhalt für weitere funktionelle Analysen, um die Bedeutung von NaBC1 im menschlichen Organismus zu klären.

Wie im Ergebnisteil berichtet, wurde in dieser Arbeit eine Expression in Gefäßen der Niere dargestellt, passend zu früheren Veröffentlichungen, die auch eine Expression in Gefäßen darstellen konnten (Park *et al.*, 2004), eine genaue Lokalisation zu einer bestimmten Zellschicht war jedoch nicht möglich.

Zusammen mit der oben genannten Veröffentlichung (Vithana *et al.*, 2006) könnte man die Vermutung anstellen, dass es sich bei der Expression auch um Endothelzellen handelt und der NaBC1 in der Niere nicht nur durch seine Expression in den Tubuli, sondern auch durch die vasale Expression zur Regulation des Boratstoffwechsels beiträgt.

#### **4.4. Strategie für einen konditionellen Knock-Out**

Aufgrund der bislang noch weitgehend ungeklärten Rolle des NaBC1 im menschlichen oder murinen Organismus, wäre eine weitergehende Funktionsanalyse höchst interessant. Um die Funktion eines Proteins gut beurteilen zu können, eignet sich die Generierung einer *Knock-Out* Maus. Die durch den Funktionsverlust des Gens entstehenden Symptome können Rückschlüsse auf die eigentliche Funktion geben.

Zunächst muss die Entscheidung getroffen werden, ob man das Gen konstitutiv, das heißt in allen Zellen der Maus, oder mittels eines konditionellen *Knock-Outs* in spezifischen Zelltypen ausschalten möchte. Aufgrund der Tatsache, dass man bei unter bordefizienten Bedingungen aufgezogenen Ratten deutliche Schäden der Embryogenese beobachten konnte (Lanoue L. *et al.*, 1998), scheint die Generierung eines konditionellen *Knock-Outs* erfolgversprechender. Ein Vorschlag für die Konstruktion eines Targeting-Vektors findet sich in Kap. 3.5. Das Prinzip ist die zellspezifische Ausschaltung des Genes durch das Rekombinationssystem des Bakteriophagen P1 mit der Cre-Rekombinase und der Zielsequenz loxP (Knippers, 2006). Die auszuschaltende Sequenz wird durch zwei loxP-Sites flankiert und eine transgene Maus hergestellt. Dann verwendet man eine andere Mauslinie, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des gewünschten zellspezifischen Promotors exprimiert. Durch Kreuzung dieser beiden Mauslinien kann somit ein gezielter zelltypspezifischer Knock-out erreicht werden, da die Cre-Rekombinase die Sequenz zwischen den loxP-Sites nur in den gewünschten Zellen herausschneidet, und somit können dann organspezifische Funktionen besser untersucht werden.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die murine Volllänge-cDNA des NaBC1 kloniert, erstmals alternative Spleißvarianten im *Slc4a11* – Gen der Maus nachgewiesen, eine Expressionsanalyse auf RNA-Ebene durchgeführt, ein genomischer Klon für ein *Knock-Out*-Konstrukt identifiziert und eine Strategie für einen Targeting-Vektor entwickelt.

Mittels 5'-RACE-PCR wurden zwei alternative Exons identifiziert, Exon 1a und 3a. Exon 1a befindet sich vor der codierenden Region, enthält aber kein alternatives Start-ATG und wird somit nicht translatiert. Um Aussagen über eine Beeinflussung der Transkription zu treffen, fehlen weitere funktionelle Daten. Exon 3a, zwischen Exon 3 und 4, enthält ein Stopcodon, und codiert somit wahrscheinlich nicht für ein funktionsfähiges Protein.

Mit Hinblick auf bekannte Mutationen im *SLC4A11* – Gen, die durch Leserahmenverschiebungen zu vorzeitigen Stopcodons und zur Entstehung von kornealer endothelialer Dystrophie und dem Harboyan-Syndrom (Korneale Dystrophie und sensorische Taubheit) führen (Vithana *et al.*, 2006; Jiao *et al.*, 2006; Desir *et al.*, 2007), sind alternative Spleißereignisse im Hinblick auf dadurch eventuell hervorgerufene Veränderungen im Expressionsmuster oder in der Translation möglicherweise als Ursache ebenfalls in Betracht zu ziehen.

Zudem wurde die Expression von NaBC1 mittels Northern Blot auf RNA-Ebene im murinen Hoden, der Speicheldrüse, der Niere und Nebenniere, im Hirn, Nebenhoden und in der Retina nachgewiesen und mit <sup>35</sup>S-In-Situ-Hybridisierung genauer untersucht. Ein generierter polyklonaler Antikörper ergab leider auf Organschnitten keine Ergebnisse, sodass zur Expression auf Proteinebene keine Aussage getroffen werden kann.

Im Anschluss wurde eine lambda Phagen-Bank untersucht und es wurden mittels einer spezifischen Sonde zwei genomische Klone identifiziert. Mittels der in dieser Arbeit für eines der Konstrukte entwickelten Targeting-Strategie kann nun ein Konstrukt kloniert werden, um den vielen postulierten Funktionen von Borat in den verschiedenen Organismen auf den Grund zu gehen und die Rolle des NaBC1 in vivo zu untersuchen.

Zudem kann der Zusammenhang von einem Funktionsausfall des NaBC1 und der Entstehung kornealer Dystrophie im Tiermodell untersucht werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- Alper SL. (2002) Genetic diseases of acid-base transporters. *Annu Rev Physiol.* **64**, 899-923. Review.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402
- Armstrong TA, Spears JW. (2001) Effect of dietary boron on growth performance, calcium and phosphorus metabolism, and bone mechanical properties in growing barrows. *J Anim Sci.* 79(12):3120-7.
- Barranco WT, Eckhert CD. (2004), Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer Lett.* **216**, 21-9.
- Bevilacqua A, Ceriani MC, Capaccioli S, Nicolini A. (2003) Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *J Cell Physiol.* **195**, 356-72. Review.
- Black DL. (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem.* **72**, 291-336. Epub. Review.
- Blevins, D.G., Lukaszewski K.M. (1998). Boron in Plant Structure and Function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **49**, 481-500
- BrainInfo (2000), Neuroscience Division, National Primate Research Center, University of Washington, <http://braininfo.rprc.washington.edu>.
- Cheidde L, Vieira TC, Lima PR, Saad ST, Heilberg IP., (2003) A novel mutation in the anion exchanger 1 gene is associated with familial distal renal tubular acidosis and nephrocalcinosis. *Pediatrics.* 112, 1361-7.
- Chua K, Reed R, (2001) An upstream AG determines whether a downstream AG is selected during catalytic Stepp II of splicing. *Mol Cell Biol.* 21(5):1509-14
- Cox KH, Adair-Kirk TL, Cox JV. (1995) Four variant chicken erythroid AE1 anion exchangers. Role of the alternative N-terminal sequences in intracellular targeting in transfected human erythroleukemia cells. *J Biol Chem.* **270**, 19752-60.
- Cuccurese M, Russo G, Russo A, Pietropaolo C. (2005) Alternative Splicing and nonsense mediated mRNA decay regulate mammalian ribosomal gene expression *Nucleic Acid Res.*, **33**(18):5965-77.
- Cui Y, Winton MI, Zhang ZF, Rainey C, Marshall J, De Kernion JB, Eckhert CD. (2004) Dietary boron intake and prostate cancer risk. *Oncol Rep.*, **11**, 887-92.

- Desir J, Moya G, Reish O, Van Regemorter N, Deconinck H, David KL, Meire FM, Abramowicz M. (2007) Borate transporter SLC4A11 mutations cause both Harboyan syndrome and non-syndromic corneal endothelial dystrophy. *J Med Genet.* **12**; [Epub ahead of print]
- Dordas C, Brown PH. (2000). Permeability of boric acid across lipid bilayers and factors affecting it. *J Membr Biol.*, **175**, 95-105.
- Dordas C, Chrispeels MJ, Brown PH. (2000). Permeability and channel-mediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots. *Plant Physiol.* **124**, 1349-62.
- Fort DJ, Rogers RL, McLaughlin DW, Sellers CM, Schlekat CL. (2002). Impact of boron deficiency on *Xenopus laevis*: a summary of biological effects and potential biochemical roles. *Biol Trace Elem Res.* **90**, 117-142. Review.
- Frommer WB, von Wiren N. Plant biology: Ping-pong with boron. *Nature*, **420**, 282-83.
- Gallardo-Williams MT, Chapin RE, King PE, Moser GJ, Goldsworthy TL, Morrison JP, Maronpot RR. (2004) Boron supplementation inhibits the growth and local expression of IGF-1 in human prostate adenocarcinoma (LNCaP) tumors in nude mice. *Toxicol Pathol.*, **32**, 73-8.
- Grimberg A, Cohen P. (2000) Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *J Cell Physiol.* **183**, 1-9. Review.
- Hillman RT, Green RE, Brenner SE (2004) An unappreciated role for mRNA surveillance. *Genome Biol.*, **5**(2):R8, Epub 2004 Feb. 2
- Hunt CD. (1998) Regulation of enzymatic activity: one possible role of dietary boron in higher animals and humans. *Biol Trace Elem Res.*, **66**, 205-25. Review.
- Hunt CD, Shuler TR, Mullen LM. (1991) Concentration of boron and other elements in human foods and personal-care products. *J Am Diet Assoc.* **91**(5):558-68.
- Igarashi T, Inatomi J, Sekine T, Seki G, Shimadzu M, Tozawa F, Takeshima Y, Takumi T, Takahashi T, Yoshikawa N, Nakamura H, Endou H. (2001) Novel nonsense mutation in the Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter gene (SLC4A4) in a patient with permanent isolated proximal renal tubular acidosis and bilateral glaucoma. *J Am Soc Nephrol.* **12**, 713-8.
- Jansen JA, Andersen J, Schou JS. (1984) Boric acid single dose pharmacokinetics after intravenous administration to man. *Arch Toxicol.* **55**(1):64-7.
- Jarolim P, Rubin HL, Brabec V, Chrobak L, Zolotarev AS, Alper SL, 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.

- Jiao X, Sultana A, Garg P, Ramamurthy B, Vemuganti GK, Gangopadhyay N, Hejtmancik JF, Kannabiran C. (2006) Autosomal recessive corneal endothelial dystrophy (CHED2) is associated with mutations in SLC4A11. *J Med Genet.*; [Epub ahead of print]
- Karet FE, Gainza FJ, Gyory AZ, Unwin RJ, Wrong O, Tanner MJ, Nayir A, Alpay H, Santos F, Hulton SA, Bakkaloglu A, Ozen S, Cunningham MJ, di Pietro A, Walker WG, Lifton RP. (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.
- Kent NL, McCance RA. The absorption and excretion of 'minor' elements by man: Silver, gold, lithium, boron and vanadium. (1941) *Biochem J.* **35**(7):837-44.
- Knippers, Rolf; Molekulare Genetik, Thieme Verlag, 2006, S. 307, 517-519
- Kollert-Jons A, Wagner S, Hubner S, Appelhans H, Drenckhahn D. (1993) Anion exchanger 1 in human kidney and oncocyoma differs from erythroid AE1 in its NH2 terminus., *Am J Physiol.* **265**, F813-21.
- A. Krogh, B. Larsson, G. von Heijne, and E. L. L. Sonnhammer (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J Mol Biol.*, **305**, 567-80
- Lambard S, Silandre D, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bourguiba S, Carreau S. (2005) Aromatase in testis: Expression and role in male reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol.* [Epub ahead of print]; PMID: 16019206 [PubMed - as supplied by publisher]
- Lanoue L, Taubeneck MW, Muniz J, Hanna LA, Strong PL, Murray FJ, Nielsen FH, Hunt CD, Keen CL. (1998) Assessing the effects of low boron diets on embryonic and fetal development in rodents using in vitro and in vivo model systems. *Biol Trace Elem Res.* **66**, 271-98.
- Lewis BP, Green RE, Brenner SE (2003) Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **100**, 189-192
- Linn SC, Kudrycki KE, Shull GE. (1992) The predicted translation product of a cardiac AE3 mRNA contains an N terminus distinct from that of the brain AE3 Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-exchanger. Cloning of a cardiac AE3 cDNA, organization of the AE3 gene, and identification of an alternative transcription initiation site. *J Biol Chem.*, **267**, 7927-35.
- Modrek B, Lee C. (2002) A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet.*, **30**, 13-9.
- Morgans CW, Kopito RR. (1993) Generation of truncated brain AE3 isoforms by alternate mRNA processing. *J Cell Sci.*, **106**, 1275-82.

- Naghii MR, Samman S. (1993) The role of boron in nutrition and metabolism. *Prog Food Nutr Sci.* **17**(4): 331-49. Review.
- Naghii MR, Samman S. (1997) The effect of boron supplementation on its urinary excretion and selected cardiovascular risk factors in healthy male subjects. *Biol Trace Elem Res.* **56** (3):273-86.
- Naghii MR, Wall PM, Samman S. (1996) The boron content of selected foods and the estimation of its daily intake among free-living subjects. *J Am Coll Nutr.* **15**(6): 614-9.
- Nielsen FH. (1994) Biochemical and physiologic consequences of boron deprivation in humans. *Environ Health Perspect.* **102** Suppl 7: 59-63.
- Pahl MV, Culver BD, Strong PL, Murray FJ, Vaziri ND. (2001) The effect of pregnancy on renal clearance of boron in humans: a study based on normal dietary intake of boron. *Toxicol Sci.* **60**(2):252-6.
- 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**, 331-41.
- Parker MD, Ourmozdi EP, Tanner MJ. (2001) Human BTR1, a new bicarbonate transporter superfamily member and human AE4 from kidney. *Biochem Biophys Res Commun.*, **282**, 1103-09.
- Prats H, Kaghad M, Prats AC, Klagsbrun M, Lelias JM, Liauzun P, Chalon P, Tauber JP, Amalric F, Smith JA, et al. (1989) High molecular mass forms of basic fibroblasts growth factor are initiated by alternative CUG codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1836-1840
- Romero MF, Fulton CM, Boron WF., (2004) The SLC4 family of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporters. *Pflugers Arch.*, **447**, 495-509. Epub 2004 Jan 14. Review
- Rowe RI, Eckhart CD. (1999). Boron is required for zebrafish embryogenesis. *J Exp Biol.* , **202**, 1649-54.
- Sheng MH, Taper LJ, Veit H, Thomas EA, Ritchey SJ, Lau KH. (2001) Dietary boron supplementation enhances the effects of estrogen on bone mineral balance in ovariectomized rats. *Biol Trace Elem Res.* **81**(1):29-45.
- Sonnhammer EL, von Heijne G, Krogh A. (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.* **6**, 175-82.
- Stamm S, Zhu J, Nakai K, Stoilov P, Stoss O, Zhang MQ. (2000) An alternative-exon database and its statistical analysis. *DNA Cell Biol.*, **19**, 739-56.

- Stewart AK, Chernova MN, Shmukler BE, Wilhelm S, Alper SL. (2002) Regulation of AE2-mediated Cl<sup>-</sup> transport by intracellular or by extracellular pH requires highly conserved amino acid residues of the AE2 NH<sub>2</sub>-terminal cytoplasmic domain. *J Gen Physiol.*, **120**, 707-22.
- Takano J, Noguchi K, Yasumori M, Kobayashi M, Gajdos Z, Miwa K, Hayashi H, Yoneyama T, Fujiwara T. (2002) Arabidopsis boron transporter for xylem loading. *Nature*, **420**, 337-40.
- Tanner MJ. (1993) The major integral proteins of the human red cell. *Baillieres Clin Haematol.*, **6**, 333-56. Review.
- Tanphaichitr VS, Sumboonnanonda A, Ideguchi H, Shayakul C, Brugnara C, Takao M, Veerakul G, Alper SL. (1998) Novel AE1 mutations in recessive distal renal tubular acidosis. Loss-of-function is rescued by glycophorin A. *J Clin Invest.* **102**, 2173-9.
- Touriol C, Bornes S, Bonnal S, Audigier S, Prats H, Prats AC, Vagner S. (2003) Generation of protein isoform diversity by alternative initiation of translation at non-AUG codons. *Biol Cell.*, **95**, 169-78. Review.
- Usuda K, Kono K, Orita Y, Dote T, Iguchi K, Nishiura H, Tominaga M, Tagawa T, Goto E, Shirai Y. (1998) Serum and urinary boron levels in rats after single administration of sodium tetraborate. *Arch Toxicol.* **72**(8):468-74.
- Vithana EN, Morgan P, Sundaresan P, Ebenezer ND, Tan DT, Mohamed MD, Anand S, Khine KO, Venkataraman D, Yong VH, Salto-Tellez M, Venkatraman A, Guo K, Hemadevi B, Srinivasan M, Prajna V, Khine M, Casey JR, Inglehearn CF, Aung T. (2006) Mutations in sodium-borate cotransporter SLC4A11 cause recessive congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED2). *Nat Genet.*; 38(7):755-7. Epub 2006 Jun 11
- Wang Z, Schultheis PJ, Shull GE. (1996) Three N-terminal variants of the AE2 Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-exchanger are encoded by mRNAs transcribed from alternative promoters. *J Biol Chem.*, **271**, 7835-43.
- Zhu Q, Lee DW, Casey JR. (2003) Novel topology in C-terminal region of the human plasma membrane anion exchanger, AE1. *J Biol Chem.* **278**, 3112-20.



## 7. Anhang

### 7.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AE	<i>Anion Exchanger</i>
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
cDNA	<i>Complementary Desoxyribonukleid Acid</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Gl.	Glandula
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bikarbonat
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HeLa	Zervixkarzinom-Zellen von der Patientin <i>Helene Lacks</i>
IPDG	Isopropyl-1thio-β-D-Galactopyranosid
min.	Minute
mRNA	<i>Messenger Ribonukleid Acid</i>
Na <sup>+</sup>	Natrium
NBCe	<i>Electrogenic Natrium-Bicarbonate Cotransporter</i>
NBCn	<i>Electroneutral Natrium-Bicarbonate Cotransporter</i>
NCBE	<i>Natrium-Chloride-Bicarbonate Exchanger</i>
NDCBE	<i>Natrium-dependent Chloride-Bicarbonate Exchanger</i>
OD	Optische Dichte
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	Potentia hydrogenii
pKS	Negativer Zehnerlogarithmus der Säurekonstante
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SLC4A	<i>Solute carrier 4A</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TMD	Transmembrandomänen

---

tRNA	<i>Transport RNA</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
kgKG	Kilogramm Körpergewicht

## 7.2. Primer

### Volllänge-Klonierung Slc4a11:

*SLC4a11forBgIIINotI:*

5' – A AGA TCT GCG GCC GCC ATG TCA CAG AAT GAA CAC TGT CAG – 3'

*SLC4a11EcoRIfor:*

5' – ACA GAG GAA GAA TTC AAG GAG GCT – 3'

*SLC4a11EcoRIrev*

5' – AGC CTC CTT GAA TTC TTC CTC TGT – 3'

*SLC4a11NsiIrev*

5' – GGC CCG TCC ATG CAT AGA AGG CGT – 3'

*SLC4a11NsiIfor*

5' – ACG CCT TCT ATG CAT GGA CGG GCC – 3'

*SLC4a11revSalIKpnI*

5' – AGT CGA CGG TAC CTC AGG GCC TAT GCT CAG CAT CCA T – 3'

### Nachsequenzierung von Fragment 1299

*1299insideHin:*

5' – CAG TGC CAT GGG TCT TGG TTT CCT – 3'

*1299insideRück:*

5' – CAG TGA TAG GCA GTG CCC TTC ACC – 3'

### Spezifische Rückprimer der RACE-PCR

*Btr1-Inner1*

5' – CAG AGC AGT GCA GGG ACA CTC ACT – 3'

*BtrI-Outer1*

5' – GGC CTG GGA GGG ACT ACG AAG TTT – 3'

*BtrI-Inner2*

5' – TCT GTG ACA TGG CCC AAG GAC AGT – 3'

*BtrI-Outer2*

5' – CAC CGG AGT CCT GAC AGT GTT CAT – 3'

*BtrI-Inner3*

5' – TGA AGT ATC CCT GAG TGC CGG CTG – 3'

*BtrI-Outer3*

5' – CAA GGT TAT CCT CCA TGT TGT TCT – 3'

*BtrI-Inner4*

5' – GCC ACC CGT TGC AGC TTC TAA GTC – 3'

*BtrI-Outer4*

5' – GCG AGA GGT GTG TAA GAG CAC GCA – 3'

*BtrI-Inner5*

5' – CAA AGT TCT TCA ATT TCA GAT ACT – 3'

*BtrI-Outer5*

5' – CCC GGT GTG CAC GGA CCT CTT CCT – 3'

*BtrI-Inner6*

5' – ATG GTA TCT GAC AGC AGG TGG ACT – 3'

*BtrI-Outer6*

5' – CGG ACA GTG GCA GTG ACT CCC TGG – 3'

*BtrI-Inner7*

5' – TTC TGT AGG GTC TTC ATG GTA CAG – 3'

*BtrI-Outer7*

5' – AGG CGG CTG ATG CAC ACA TGC CGT – 3'

*BtrI-Inner8*

5' – TCC ATT GCA GTC TTG GTG CTT TTC – 3'

*BtrI-Outer8*

5' – ATG GTG GCA AAG GTG CGT GCC ACC – 3'

*BtrI-Inner9*

5' – AAA GTC CTT GCA TTT CGG GGG CTG – 3'

*BtrI-Outer9*

5' – CCA GAT GCC CTT TCC AAA AGG GAA – 3'

*BtrI-Inner10*

5' – GCT CTT GCT TTT CCC AAT GAT GCC – 3'

*BtrI-Outer10*

5' – TGT GGT GGT GAC ATA TTT GCC CAC – 3'

### **Amplifizierung der alternativen Exons**

*Exon1ahinNotI*

5' – AGG CGC GGC CGC GCC CAT CCT CCC GTG CGT – 3'

*Exon1ariückSall*

5' – AGC GGT CGA CCG TGT CCT GCG ATG CCG G – 3'

*Exon3ahinNotI*

5' – ACG AGC GGC CGC GGT ATG GGG ATG GTA GAT – 3'

*Exon3ariückSall*

5' – GCA GGT CGA CTA AAG GAG TGG GAA GAG A – 3'

*Exon10ahinNotI*

5' – AGT CGC GGC CGC ATG TGC AGA AGA CCA TAG – 3'

*Exon10ariückSalI*

5' – GCA CGT CGA CCC TGG GTG TAG ATG GCC A – 3'

### **Amplifizierung Sonde für In-Situ-Hybridisierung**

*SLC4a11forBgIIINotI:*

5' – A AGA TCT GCG GCC GCC ATG TCA CAG AAT GAA CAC TGT CAG – 3'

*129-474btrIrev*

5' – AGC GGT CGA CTC AGG ATG ATG CTG GCC TGG G – 3'

*Sequenzierprimer für pKS II, Topo und pGEM-Teasy*

*M13-forward*

5' – GTA AAA CGA CGG CCA G – 3'

*M13-reverse*

5' – CAG GAA ACA GCT ATG AC – 3'

*T7*

5' – AAT ACG ACT CAC TAT AG – 3'

*T3*

5' – ATT AAC CCT CAC TAA AG – 3'

### **Sequenzierung der Phagenklone**

*Nabc1-5'-UTR hin1*

5' – GGA GTT CCT CCA AGC – 3'

*Nabc1-5'-UTR hin2*

5' – AAC AGG CGC CCT CT – 3'

*Nabc1-5'-UTR hin3*

5' – AAA CTT CGT AGT CCC TCC CA – 3'

*Nabc1-5'-UTR-rev1*

5' – TAA AAG CTT GGA GGA ACT – 3'

*NaBC1-5'-UTR-rev2*

5' – ABC CAC TCC TTC CCA CTC – 3'

*Exon19for*

5' – GGA TGC TGA GCA TAG GCC – 3'

*AH4 weiter*

5' – ACC TCT TCC AGC TGA AGC – 3'

*5'-UTR-rev2*

5' – GGA GTT CCT CCA AGC – 3'

### 7.3. Sonden

#### **Sonde für In-Situ-Hybridisierung**

5' – ATG TCA CAG AAT GAA CAC TGT CAG GAC TCC GGT GAA TAC TTC TCA  
GCC GGC ACT CAG GGA TAC TTC AAG AAC AAC ATG GAG GAT AAC CTT  
GAA GTC CGG GAA GAC AGC CTA GGG GAT GAG GTC TTT GAC ACC GTC  
AAC TCC TCC ATT GTG TCT GGC GAG AGC ATC CGG TTT TTT GTC AAT GTC  
AAC CTT GAA GTG CAG CCC TCC AAA TCT GAC TTA GAA GCT GCA ACG GGT  
GGC TGC GTG CTC TTA CAC ACC TCT CGC AAG TAT CTG AAA TTG AGA ACT  
TTG AGG AAG AGG TCC GTG CAC ACC GGG ACC TGG ATG GCT TCC TGG  
CCC AGG CCA GCA TCA TCC TGA – 3'

#### **Sonde für den Phagen-Screen**

Fragment 377 KpnI/ NotI aus pKS II geschnitten

## 8. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Gal für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seinem Institut durchführen zu können.

Prof. Dr. med. Christian Hübner danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, ihm und Dr. med. Moritz Hentschke gebührt besonderer Dank für die Entwicklung der Fragestellung der Arbeit und die sehr gute Betreuung.

Insgesamt danke ich der ganzen AG Hübner; Alex, Jana, Irina, Arne, Ingo, Stefan, Cordula und Jessica, die Zeit im Labor war ein großer Spaß.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des ehemaligen Instituts für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie für die Benutzung des *Fujix*-Gerätes und bei Irm Hermanns-Borgmeyer für die Hilfe bei den In-Situ-Hybridisierungen.

Der Fritz-Carl-Kausch-Stiftung und dem Graduiertenkolleg 336 möchte ich danken, dass sie mir mein Studium und die Doktorarbeit finanziell ermöglicht haben.

Meinen Eltern, Christine und Diethardt Hofer danke ich für die immer dagewesene und bedingungslose Unterstützung und für das ein oder andere „ernste Wörtchen“ in schwierigen Situationen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Jan K. Hennigs, der mich durch seine Liebe und seinen Glauben an mich zu Leistungen motiviert, die ich nicht für möglich halten würde.

Ohne ihn wäre mein bisheriger Weg schwerer gewesen.



## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Annette Hofer
Anschrift	Eppendorfer Weg 56, 20259 Hamburg
Geboren	25.03.1981 in Braunschweig, Deutschland
Eltern	Christine Hofer, geb. Wack, Hausfrau Diethardt Hofer, Jurist
Familienstand	ledig

### Schulausbildung

1987 – 1993	Johann-Peter-Hebel-Grundschule in Berlin
1993 – 2000	Kranich-Gymnasium in Salzgitter, Abitur im Juni 2000
10/00 – 02/01	Auslandsaufenthalt in Nepal und Indien, Teilnahme an einem Internationalen Jugendprojekt

### Hochschulstudium

04/01 – 11/07	Studium der Medizin an der Universität Hamburg
11/07	Approbation als Ärztin

### Examina

04/03	Physikum, Note: 1,66
08/06	United States Medical License Exam, Step 2 CK
11/07	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 1,0

### Praktisches Jahr

08/06 – 12/06	<i>Chirurgie</i>	AK Altona, Hamburg und KEM Hospital, Bombay, Indien
12/06 – 04/07	<i>Tropenmedizin</i>	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
04/07 – 07/07	<i>Innere Medizin</i>	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

### Stipendien

04/01 – 03/07	Studienstipendium der Fritz-Carl-Kausch-Stiftung
01/05 – 04/05	Promotionsstipendium im Graduiertenkolleg 336; gefördert von der DFG und Freien Hansestadt Hamburg

### Andere Aktivitäten

05/02 – 08/06	Studentische Tätigkeit in der Praxis für Allgemeinmedizin Grabs/ Hinz
SS '02, WS '02/'03, WS '03/'04, WS '04/'05	Studentische Tutorein für die Erstsemester im Rahmen der Orientierungseinheit für Mediziner
WS '02/'03	Vorpräparandin im Präparierkurs für Mediziner
Fremdsprachen	Englisch, Französisch, Spanisch (Grundlagen)

## **10. Erklärung nach §4 der Promotionsordnung**

Ich versichere ausdrücklich, dass die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht wurden.

Ferner versichere ich, dass die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder ich mich anderweitig um eine Zulassung zur Promotion beworben habe.

Annette Hofer

