

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Untersuchung von Chloridtransportprozessen
am Beispiel von ClC-2 und KCC2 Knockout
Mäusen**

vorgelegt von
Valentin Stein

1.11.2000

Referent: Prof. Ulf-Peter Hansen
Korreferent Prof. Thomas J. Jentsch
Tag der Mündlichen Prüfung: 11. Dezember 2000
Zum Druck genehmigt: Kiel, 20. Dezember 2000

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Wissenschaftliche Grundlagen	5
2.1	Zellulärer Transport	5
2.2	Transportproteine	7
2.2.1	Ionenkanäle	7
2.3	Transporter	20
2.3.1	Kationen-Chlorid-Kotransporter	21
2.4	Veränderung der intrazellulären Chloridkonzentration	23
2.5	Knockout Mausmodelle	25
3	Aufgabenstellung	27
4	Material und Methoden	29
4.1	Material	29
4.1.1	Chemikalien und Enzyme	29
4.1.2	Filmmaterial	29
4.1.3	Puffer, Lösungen und Medien	29
4.1.4	Bakterienstämme	30
4.1.5	Vektoren	30
4.2	Molekularbiologie und Biochemie	31
4.3	Präparation von Zellen	33
4.3.1	Präparation von Leydig-Zellen	33
4.3.2	Präparation von Sertoli-Zellen	34
4.3.3	Herstellung von akuten Rückenmarksschnitten	35
4.3.4	Histologie der Hoden	35
4.4	Bestimmung der Krampfschwelle	36
4.5	Blutabnahme für Hormonanalysen	36
4.6	Elektrophysiologie	36
4.6.1	patch clamp	36
4.6.2	Extrazelluläre Ableitungen an Nerven	38

5	Ergebnisse	41
5.1	Krampfanfälligkeit beider Knockout Mausmodelle	41
5.2	Analyse des KCC2 Knockouts	43
5.2.1	Erscheinungsbild	43
5.2.2	Reflex des Rückenmarks	45
5.2.3	Messungen an Motoneuronen	47
5.2.4	Funktionelle Untersuchung der Atmung	50
5.2.5	Lokalisation von KCC2 in Neuronen	51
5.2.6	Expression von Chloridtransportern im Rückenmark	52
5.3	Analyse des ClC-2 Knockouts	53
5.3.1	Überprüfung von vermuteten Funktion von ClC-2	54
5.3.2	Männliche Infertilität	55
5.3.3	Degeneration des Hodens bei <i>Clcn2</i> ^{-/-} Männchen	55
5.3.4	Untergang der Keimzellen und Leydig-Zell-Hyperplasie	58
5.3.5	Expression von Genen während der Spermatogenese	59
5.3.6	Elektrophysiologie an Sertoli- und Leydig-Zellen	60
5.3.7	Hormone	62
5.3.8	Lokalisation von ClC-2 im Hoden	63
5.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	64
6	Diskussion	67
6.1	Analyse physiologischer Mechanismen durch Mausmodelle	67
6.1.1	Bedeutung von Chloridtransportprozessen	69
6.1.2	In dieser Arbeit untersuchte Chloridtransporter	69
6.2	Analyse des KCC2 Knockouts	70
6.2.1	Übererregbarkeit der Motoneurone	71
6.2.2	Lokalisation von KCC2 in der Nähe von inhibitorischen Synapsen . .	73
6.2.3	Steuerung der Atmung	74
6.2.4	Vergleich der <i>Kcc2</i> ^{-/-} Maus mit der <i>spastic</i> Maus	75
6.3	Neuronale Chloridtransportprozesse und ihre Bedeutung	76
6.3.1	Regulation der Chloridkonzentration durch andere Chloridtransporter	76
6.3.2	Die neuronale Bedeutung von ClC-2	78
6.3.3	Bedeutung von GABA induzierten Depolarisationen für die neuronale Entwicklung	79
6.4	Analyse der <i>Clcn2</i> ^{-/-} Maus	81
6.4.1	Überprüfung von vermuteten ClC-2 Funktionen	81
6.4.2	Degeneration des Hodens	84
6.4.3	Gemeinsamkeit der Hoden- und Retinadegeneration	89
6.4.4	Funktion von ClC-2	89
7	Zusammenfassung	91

8	Ausblick	95
9	Kollaborationen	97
10	Veröffentlichungen	99

Abbildungsverzeichnis

2.1	Dendrogramm der CLC Familie	9
2.2	Elektrophysiologische Eigenschaften von ClC-2	11
2.3	Topologie des ClC Monomers	14
2.4	Topologie der ligandengesteuerten Chloridkanäle	16
2.5	Topologiemodell von CFTR	20
2.6	Dendrogramm der Kation-Chloridtransporter	22
2.7	Veränderung der Chloridkonzentration	24
2.8	Erzeugung von Knockout Mäusen	25
5.1	Krampfschwelle	42
5.2	Makroskopischer Phänotyp von <i>Kcc2^{-/-}</i>	44
5.3	Histologie von KCC2 am HE-Schnitt	44
5.4	EKG von <i>Kcc2^{-/-}</i>	45
5.5	Rückenmarksschema	45
5.6	Messung am Ischiasnerv	46
5.7	Perforated Patch Messungen an Motoneuronen	48
5.8	Respiratorische Aktivität	49
5.9	Lokalisation von KCC2	50
5.10	Elektronenmikroskopie	51
5.11	Expression von Chloridtransportern	52
5.12	RNAse Protection Assay für Chloridtransporter	53
5.13	Ansäuerung des Magens der <i>Clcn2^{-/-}</i> Tiere	54
5.14	Geschlechtsorgane des <i>Clcn2^{-/-}</i>	55
5.15	Histologische Analyse der postnatalen Hodenentwicklung	57
5.16	Immunhistologie mit GCNA1	58
5.17	Northern-Analyse der Keimzellentwicklung	60
5.18	Elektrophysiologie and Leydig- und Sertoli-Zellen	61
5.19	Immunhistologie für ClC-2	64
6.1	Flußdiagramm der Genanalyse	68
6.2	Transportprozesse in Magenepithel	83
6.3	Schematischer Aufbau eines Tubulus seminifer	85

Abbildungsverzeichnis

6.4	Spermatogenese	86
6.5	Funktion von ClC-2	90

Abkürzungen

A	Ampere	FSH	folikelstimulierendes Hormon
ACSF	artificial cerebrospinal fluid	GABA	γ -Aminobuttersäure
ATP	Adenosintriphosphat	h	Stunde
bp	Basenpaare	KCC	Kalium-Chloirdkotransporter
BSA	Bovine Serum Albumin	kD	Kilo Dalton
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	KO	Knockout
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	LB	Luria Broth
CFTR	Zystische Fibrose Transmembran Leitfähigkeitsregulator	LH	luteinisierendes Hormon
ClC-x	individueller Vertreter der CLC-Familie	MCS	multiple cloning site
DEPC	Diethylpyrocarbonat	MEM	Modified Eagle Medium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	min	Minute(n)
DMSO	Dimethylsulfoxid	o/n	over night
E18,5	Embryonaltag 18,5 (andere Tage entsprechend)	PBS	phosphate buffered saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PCR	polymerase chain reaction
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure	PKA	Protein Kinase A
EKG	Elektrokardiogramm	RNA	Ribonukleinsäure
FCS	Fötales Kälber Serum	RNAse	Ribonukelase
		RPA	RNase Protection Assay
		sec	Sekunde(n)
		SITS	4-Acetamido-4'-Isothiocyanostilbene-2,2'-Disulfon Säure

TTX	Tetrodotoxin
v/v	Volumen pro Volumen
V	Volt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Ionentransportprozesse spielen in allen Organismen eine wichtige Rolle. Durch sie werden Signale übertragen, der Stoffwechsel reguliert und viele physiologische Prozesse gesteuert. Es sind inzwischen zahlreiche Erbkrankheiten auf Mutationen in Genen für Ionenkanäle und Ionentransporter zurückgeführt worden (Ashcroft, 2000; Lehmann-Horn und Jurkat-Rott, 1999). Die Tatsache, daß ein defekter Ionentransport häufig zu einem Funktionsverlust eines oder mehrerer Organe führt, unterstreicht die Bedeutung der Ionentransportprozesse.

Eine besondere Rolle spielen die Chloridtransportprozesse, da Chlorid das am häufigsten vorkommende Anion in Säugerzellen ist. Ein Funktionsverlust des Zystischen-Fibrose-Leitfähigkeits-Regulator (CFTR) führt zu einer gestörten epithelialen Chloridsekretion, davon sind hauptsächlich die Lungen betroffen (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989). Die Zystische Fibrose ist eine der am weitesten verbreiteten Erbkrankheiten unter Kaukasiern (Mittel-europäern). Die kongenitale Myotonie ist auf einen Defekt in *CLCN1* zurückzuführen, ein spannungsgesteuerter Chloridkanal aus der CLC-Familie. CLC-1 ist an der Repolarisation der Muskelzellen beteiligt und stabilisiert das Membranpotential (Koch et al., 1992). Ebenso sind verschiedene Nierenerkrankungen auf Dysfunktionen im Chloridtransport zurückzuführen. Die Dent'sche Krankheit wird durch eine Mutation in *CLCN5* verursacht (Lloyd et al., 1996). Das Bartter-Syndroms wird durch Mutationen in verschiedenen Genen, die für Chloridtransporter kodieren, verursacht: *CLCNKB*, ebenfalls ein CLC-Chloridkanal, (Simon et al., 1997) und *SCL12A1*, dem Gen für den $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ Kotransporter (Simon et al., 1996a). In Mausmodellen für NKCC1 wurde gezeigt, daß ein Verlust der Funktion dieses Transporters zu einer schweren Innenohrdegeneration (Delpire et al., 1999) und männlicher Unfruchtbarkeit (Pace et al., 2000) führt. Eine besondere Rolle spielt die Chloridhomöostase in Neuronen. Während der Entwicklung verändert sich die intrazelluläre Chloridkonzentration und bestimmt, ob GABAerge und glyzinerge Synapsen exzitatorisch oder inhibitorisch wirken (Cherubini et al., 1991).

Allein aus den Expressionsmustern und den funktionellen Erkenntnissen ist es häufig schwierig, wenn nicht unmöglich, auf die Funktion eines Protein zu schließen. Die physiologische Funktion eines Proteins läßt sich gut untersuchen, wenn man Organismen, die dieses Protein nicht besitzen oder eine Fehlfunktion in diesem Protein haben, mit gesunden Organismen vergleicht. Insbesondere die Knockout-Technologie hat in den letzten Jahren die Möglichkeit eröffnet, die Funktionsweise bekannter Proteine im physiologischen Zusammenhang zu untersuchen. Aus dem Phänotyp der Knockout Maus kann man erkennen, in welchen

Organen das Protein eine wichtige Rolle spielt, wo die Funktion des Proteins limitierend ist und ob sie möglicherweise durch andere Proteine übernommen werden kann.

In dieser Arbeit sollen die physiologische Funktion der Chloridtransportproteine *ClC-2* und *KCC2* untersucht werden. Da deren physiologische Funktion bisher nicht genau bekannt ist wurden in unsere Arbeitsgruppe Knockout Mausmodelle hergestellt (Bösl et al., 2000; Hübner et al., 2000).

Der zu den *CLC*-Chloridkanälen gehörende *ClC-2* wird ubiquitär exprimiert (Thiemann et al., 1992), konnte aber in einigen Geweben relativ spezifisch nachgewiesen werden, darunter sind Gehirn, Lunge, Niere, Leber und Magen zu finden. Die *CLC*-Chloridkanalfamilie umfaßt neun verschiedene Gene in Säugern. Für einige dieser Kanäle ist die Funktion durch Analyse von Erbkrankheiten bekannt. *ClC-1* ist an der Repolarisation der Muskelzelle beteiligt und Veränderungen in diesem Gen führen zur kongenitalen Myotonie (Steinmeyer et al., 1991a; Koch et al., 1992). Mutationen in *CLCNKB* (Simon et al., 1997) und *CLCN5* (Fisher et al., 1995; Lloyd et al., 1996) sind die Ursache für das Bartter Syndrom oder die Dent'sche Krankheit, zwei Nierenerkrankungen. Über die physiologische Funktion der anderen Mitglieder der *CLC*-Familie ist bisher nichts bekannt, einige lassen sich bisher nicht funktionell untersuchen, da sie keine Kanäle in der Plasmamembran sind. Möglicherweise sind sie intrazelluläre Chloridkanäle, die in der Ansäuerung von Vesikeln eine Rolle spielen, indem sie für einen Ladungsausgleich sorgen.

ClC-2 ist ein einwärtsgerichteter Chloridkanal, der durch negative Membranpotentiale, sauren extrazellulären pH-Wert und Zellschwellung aktiviert werden kann. Aufgrund seines breiten Expressionsmusters und seiner biophysikalischen Eigenschaften wurden viele verschiedene Funktionen für diesen Chloridkanal diskutiert. So soll er in der Lungen-, Nieren- und Leberentwicklung eine Rolle spielen (Murray et al., 1995; Huber et al., 1998). Außerdem wird vermutet, daß er eine apikale Chloridleitfähigkeit in Magenepithelzellen darstellt, und dadurch an der Magensäuresekretion beteiligt ist (Malinowska et al., 1995). Diese Hypothesen sollen in der Analyse der *Clcn2*^{-/-} Maus überprüft werden.

Von beiden untersuchten Chloridtransportproteinen wurde eine Funktion in der Regulation der intraneuronalen Chloridkonzentration vermutet. Die Synaptische Inhibition durch *GABA_A*- und Glyzin-Rezeptoren hängt von einer niedrigen intrazellulären Chloridkonzentration ab. Im Unterschied zu dem exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat verändert sich die Wirkung der Neurotransmitter *GABA* und Glyzin während der Entwicklung, da zunächst das elektrochemische Chloridpotential positiver als das Ruhemembranpotential ist und erst während der Entwicklung unterhalb des Ruhemembranpotential sinkt.

Smith und Mitarbeiter zeigen in hippokampalen Pyramidenzellen eine spannungsaktivierte Chloridleitfähigkeit, die eine wichtige Rolle in der Modulation der neuronalen Inhibition durch *GABA* spielt (Smith et al., 1995). Diese Chloridleitfähigkeit hat die gleichen Aktivierungseigenschaften wie *ClC-2*, außerdem wurde *ClC-2* in den gleichen Neuronen nachgewiesen, in denen die Chloridleitfähigkeit gemessen wurde. Von diesen Beobachtungen ausgehend erwartete man, daß *ClC-2* einen Chloridkanal ist, der an der Regulation der Chloridkonzentration in Neuronen beteiligt ist (Smith et al., 1995; Staley et al., 1996).

Misgeld und Mitarbeiter zeigen, daß ein Furosemid-sensitiver Transportmechanismus den Chloridgradienten von Neuronen aufrechterhält (Misgeld et al., 1986); der ausschließlich neuronal exprimierte, furosemidsensitive Kalium-Chlorid-Kotransporter KCC2 (Payne et al., 1996) war daher ein guter Kandidat für diesen Transportmechanismus. KCC2 gehört in die Familie der Kationen-Chlorid-Kotransporter, die bisher vier Mitglieder zählt. In die gleiche Genfamilie gehören auch die $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ -Kotransporter (NKCC) und der Thiazid-sensitive Na^+/Cl^- -Kotransporter (NCC). Über die genaue Funktion der KCC-Transporter ist bisher wenig bekannt. KCC1 wird durch Zellschwellung aktiviert und man vermutet, daß er der Erythrozyten K^+/Cl^- -Kotransporter ist (Pellegrino et al., 1998).

2 Wissenschaftliche Grundlagen

2.1 Zellulärer Transport

Zellen sind von Membranen umgeben. Diese Membranen, deren Aufbau von Bakterien bis zu Säugern prinzipiell der gleiche ist, bestehen aus Lipiddoppelschichten. Die Lipide aller biologischer Membranen sind amphiphil, das bedeutet, daß sie aus einem hydrophilen und einem lipophilen Teil bestehen. Diese Moleküle bilden in wässriger Umgebung geordnete Strukturen aus, wobei die hydrophilen Teile sich dem Wasser zuwenden und die lipophilen Regionen untereinander Kontakt haben; es bilden sich Lipiddoppelschichten. Reine Lipiddoppelschichten sind für Ionen und polare Substanzen, wie Glukose und Aminosäuren, undurchlässig, während unpolare Gase, wie Sauerstoff und Kohlendioxid und einige kleine Moleküle durch sie diffundieren können.

Durch einen selektive Transport können Zellen ein spezielles Milieu und einen gerichteten Stoffwechsel aufbauen. Der selektive Transport wird durch Proteine ermöglicht, die in die etwa 5nm dicke Membran eingelagert sind. Diese Membranproteine haben ebenfalls amphiphile Eigenschaften. Dort, wo sie mit der Membran in Kontakt stehen, sind sie hydrophob, die Bereiche, die in das Zytoplasma und den Extrazellulärraum ragen, sind hydrophil.

Für den Transport existieren verschiedene Klassen von Proteinen. Man unterscheidet zwischen aktivem und passivem Transport. Beim passiven Transport bewegen sich die Substanzen aufgrund ihrer Konzentrationsgradienten, der aktive Transport erfolgt unter Energieaufwand gegen einen Konzentrationsgradienten. Im Fall von Ionen und geladenen Molekülen spielt neben dem Konzentrationsgradienten das elektrische Feld, das sich an der Zellmembran bildet, eine wichtige Rolle. Insgesamt entscheidet der elektrochemische Gradient darüber, ob eine Substanz passiv transportiert werden kann.

Die intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen sind sehr unterschiedlich. Sie werden durch aktive Pumpprozesse unter ATP-Hydrolyse aufrechterhalten. In der Plasmamembran von Tiern sorgt die Na^+/K^+ -ATPase für eine niedrige intrazelluläre Natrium- und eine hohe Kaliumkonzentration. Der hierdurch gewonnene Gradient stellt die Triebkraft für viele weitere Transportprozesse zu Verfügung.

Durch die asymmetrische Verteilung der Ionen bildet sich eine elektrische Potentialdifferenz an der Zellmembran. Diese läßt sich für den Fall, daß die Membran nur für eine einzelne Ionensorte permeabel ist, mit Hilfe der Nernst'schen Gleichung berechnen:

Ion	intrazellulär in mM	extrazellulär in mM	Gleichgewichtspotential in mV
Na ⁺	12	145	+67
K ⁺	140	4	-95
Ca ²⁺	10 ⁻⁴	1,8	+131
Cl ⁻	4 – 40	115	-90 – -30

Tabelle 2.1: Inonenkonzentrationen und Gleichgewichtspotentiale

$$\Delta\varphi_X = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{[X]_{\text{außen}}}{[X]_{\text{innen}}} \quad (2.1)$$

Hier steht R für die allgemeine Gaskonstante, T für die absolute Temperatur, F für die Faraday-Konstante und z für die Ladung des Ions X. Die Gleichung läßt sich für mehrere Ionensorten erweitern, wenn die unterschiedlichen Membranpermeabilitäten P der einzelnen Ionen bekannt sind. Die Goldmann-Hodgkin-Katz-Gleichung wird zur Beschreibung benutzt (Hodgkin et al., 1949), dabei wird angenommen, daß innerhalb der Membran das Potential gleichmäßig abfällt, also eine konstante Feldstärke herrscht:

$$E_{\text{Membran}} = \sum_X \Delta\varphi_X = \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{\sum P_K [K]_{\text{außen}} + P_A [A]_{\text{innen}}}{\sum P_K [K]_{\text{innen}} + P_A [A]_{\text{außen}}} \quad (2.2)$$

Diese Gleichung gilt nur für einwertige Kationen (K) und Anionen (A), so daß z = 1 ist.

Membranpotentiale sind in jedem Organismus unterschiedlich, das Zellinnere ist in Ruhe aber immer negativ gegenüber dem Zelläußeren. Bei Pflanzen werden teilweise Membranpotentiale von weniger als -200mV erreicht.

Organismus	Art	Zelltyp	Ruhepotential in mV
Bakterien	Bacillus subtilis		-60 – -75
Pflanzen	Acetabularia	Stielzelle	-140 – -200
	Mimose	Parenchymzelle	-160
	Elodea	Blattparenchymzelle	-280
Invertebraten	Helix	Riesenneuron	-53
	Hirudo	glatte Muskelzelle	-27
Vertebraten	Ratte	Speicheldrüsenzelle	-28
	Katze	spinales Motoneuron	-60 – 80

Tabelle 2.2: Ruhemembranpotentiale in verschiedenen Zelltypen

2.2 Transportproteine

Die erste Klasse von Transportproteinen stellen die ATP-getriebenen Pumpen dar, sie werden auch ATPasen genannt. Sie benutzen die Energie, die bei der ATP-Hydrolyse frei wird, um Ionen gegen einen Konzentrationsgradienten über eine Membran zu transportieren. Sie sorgen für die geringe Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentration in fast allen Zellen.

Ionenkanäle bilden die zweite Klasse von Transportproteinen. Sie erlauben die passive Diffusion von Ionen durch die Membran. Wie der Name schon sagt bilden sie einen Kanal durch die Lipiddoppelschicht, die sogenannte Pore.

Das Öffnen dieser Pore kann unter anderem durch das Membranpotential, eine Volumenänderung der Zelle, der pH-Wert oder die Bindung von Liganden gesteuert werden. Man teilt daher die Kanäle in Klassen ein und unterscheidet beispielsweise spannungsabhängige und ligandengesteuerte Ionenkanäle. Man unterscheidet weiterhin zwischen Kationen- und Anionenkanälen. Durch ein Selektivitätsfilter sind viele Ionenkanäle spezifisch für eine Ionensorte.

Die dritte Klasse von Transportproteinen bilden die Transporter im engeren Sinn. Sie koppeln den Transport von Molekülen an einen Gradienten eines anderen Moleküls oder Ions. Ihre Transportrate ist geringer als die von Ionenkanälen. Sie besitzen keine Pore wie Ionenkanäle, durch die die Ionen diffundieren könne, sondern transportieren durch eine Konformationsänderung des Proteins die Substanzen über die Membran.

2.2.1 Ionenkanäle

2.2.1.1 Kationenkanäle

Zu Beginn der elektrophysiologischen Forschung hat man sich im wesentlichen mit Kationenkanälen beschäftigt. Die grundlegenden Arbeiten zum Aktionspotential und der Reizweiterleitung im Nerven gehen auf Untersuchungen von Natrium- und Kaliumkanälen zurück, die abhängig vom Membranpotential öffnen und schließen (Hodgkin et al., 1949). Erst in den 80er Jahren gelang die Klonierung des ersten Natriumkanals (Noda et al., 1984). Die Klonierung eines Kalziumkanals (Tanabe et al., 1987) und eines Kaliumkanals (Kamb et al., 1987; Papazian et al., 1987; Pongs et al., 1988) folgte kurze Zeit später. Diese Kationenkanäle gehören zu einer Genfamilie, die sich wahrscheinlich aus einem gemeinsamen Vorläuferkanal entwickelt hat.

Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle sind alle nach dem gleichen Prinzip aufgebaut. Der Kanal wird durch vier Monomere mit jeweils sechs Transmembrandomänen gebildet. Eine haarnadelförmige Schleife, die sogenannte *P-loop*, taucht von der extrazellulären Seite in die Plasmamembran ein und bildet die Kanalpore und das Selektivitätsfilter. Man führt das spannungsabhängige Schalten auf eine Bewegung der vierten Transmembrandomäne (S4) zurück. Die vierte Transmembrandomäne enthält zahlreiche positiv geladene Aminosäuren, die im elektrischen Feld der Membran bewegt werden. Dadurch besitzt der Kanal einen intrinsischen Spannungssensor.

Spannungsgesteuerte Natrium- und Kalziumkanäle besitzen den selben prinzipiellen Aufbau, allerdings sind hier die vier Untereinheiten im selben Protein kovalent miteinander verknüpft.

Darüberhinaus wurden zahlreiche andere Kationenkanäle kloniert, die sich von der prinzipiellen Struktur nur wenig unterscheiden. Die Monomere der sogenannten einwärtsgerichtenden Kaliumkanäle, wie ROMK (Ho et al., 1993), bestehen aus der P-loop und zwei flankierenden Transmembrandomänen. Die Familie der TWIK-Kanäle besteht aus einer Verdopplung diese Motivs (Lesage et al., 1996). Bei der Familie der TOK-Kanäle ist das Motiv eines spannungsabhängigen Kaliumkanals mit dem eines einwärtsgerichtenden Kaliumkanals fusioniert (Ketchum et al., 1995).

2.2.1.2 Chloridkanäle

Chloridkanäle wurden in Membranen fast aller Säugerzellen nachgewiesen. Da Chlorid das häufigste Anion in Säugerzellen ist, erfüllt es wichtige physiologische Funktionen, zum Beispiel die Stabilisierung des Membranpotentials in erregbaren Zellen wie Neuronen und Muskelzellen (z. B. $ClC-1$) (Steinmeyer et al., 1991b) oder sind selbst an der Signaltransduktion beteiligt. Weiterhin spielt es eine wichtige Rolle bei der pH-Wert- und Volumenregulation, und hat eine wichtige Funktion für den transepithelialen Transport. Neben der Familie der ClC -Chloridkanäle, den $GABA_A$ - und Glyzin-Rezeptoren gibt es noch viele andere Chloridkanäle, die elektrophysiologisch gut untersucht sind, deren genetische Struktur aber bisher unbekannt ist. Außerdem wird für viele klonierte Transportproteine, z.B. $pICln$ oder Phopholemman (Krapivinsky et al., 1994; Moorman et al., 1992) eine Chloridkanalaktivität diskutiert, diese konnte in den meisten Fällen aber nicht überzeugend gezeigt werden.

Bei den klonierten Chloridkanälen unterscheidet man die folgenden drei Klassen:

- spannungsabhängige Chloridkanäle der ClC -Familie
- ligandengesteuerte Glyzin- und $GABA_A$ -Rezeptoren
- den nukleotidabhängigen Zystische-Fibrose-Transmembran-Leitfähigkeits-Regulator

Im Gegensatz zu Kationenkanälen ist die Funktionsweise von Chloridkanälen noch nicht besonders gut aufgeklärt. Bislang ist es nicht gelungen die Porenregion der ClC -Kanäle und von $CFTR$ zu identifizieren oder die dreidimensionale Struktur zu entschlüsseln.

2.2.1.3 Die Familie der ClC -Chloridkanäle

Durch Expressionklonierung wurde 1990 das erste Mitglied der ClC -Familie aus dem elektrischen Organ des Rochens *Torpedo marmorata* identifiziert (Jentsch et al., 1990). Mittlerweile konnte in Säugern neun verschiedene ClC -Gene identifiziert werden (Jentsch et al., 1999), darüberhinaus wurden sie auch in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Schriever et al.,

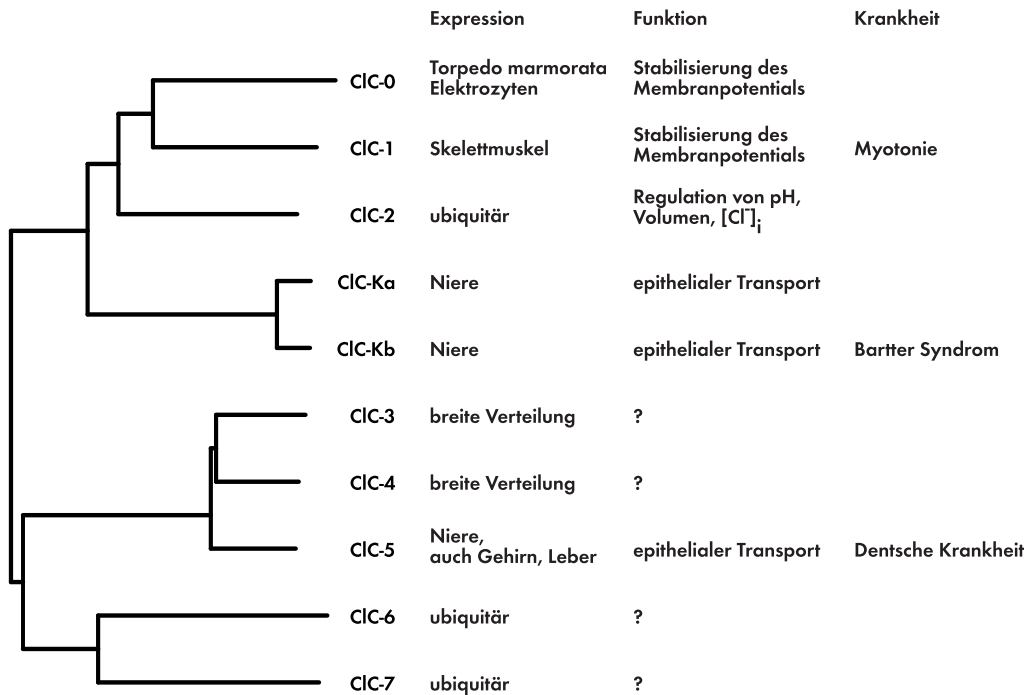


Abb. 2.1: Dendrogramm der CLC Familie in Vertebraten. Durch die Abstufungen in der Sequenzhomologie lassen sie sich in drei Unterfamilien einteilen. Die Homologie dieser Unterfamilien ist geringer als 30%. Neben der Expression sind, soweit bekannt, noch Funktion und assoziierte Krankheiten angegeben. Die Länge der horizontalen Linien gibt ungefähr den Homologieunterschied an. Das Dendrogramm wurde mit CLUSTALX (NCBI, USA) erstellt (Thompson et al., 1997).

1999), in Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* und in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen (Greene et al., 1993; Hechenberger et al., 1996). Auch Eubakterien wie *Escheria coli* (Fujita et al., 1994) und Archebakterien wie *Mehanococcus janaschii* (Bult et al., 1996) haben CLC-Gene.

CLC-1, der Muskelchloridkanal Das erste Gen der CLC-Familie in Säugern wurde in Muskelzellen gefunden (Steinmeyer et al., 1991b). Dort war eine hohe Chloridleitfähigkeit beschrieben worden (Bretag, 1987). Die elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften von CLC-1 stimmten mit den für den Muskel bekannten Chloridleitfähigkeiten gut überein. Dieser Kanal sorgt für die Repolarisation der Muskelzelle und stabilisiert das Membranpotential. Mutationen in diesem Gen führen zu verschiedenen Formen der Myotonie. Bei Menschen unterscheidet man die autosomal dominant vererbte *Thomsen's Myotonie* und die rezessiv vererbte *Becker Myotonie*. Der Phänotyp der ADR-Maus konnte ebenfalls auf eine Mutation im *CICN-1* Gen zurückgeführt werden. (Steinmeyer et al., 1991a; Koch et al., 1992). Die-

se Mutationen haben starke Auswirkungen auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des heterolog exprimierten Proteins. Die meisten dominanten Mutationen verschieben die spannungsabhängige Öffnung des Kanals zu positiven Potentialen (Pusch et al., 1995b), während die rezessiv vererbten Mutationen zu einem Funktionsverlust oder zu einer starken Reduktion der Chloridleitfähigkeit führen (Meyer-Kleine et al., 1995; Wollnik et al., 1997).

ClC-2 wird ubiquitär exprimiert ClC-2 wurde aufgrund seiner Homologie zu ClC-1 aus einer Rattengehirn-cDNA Bibliothek kloniert (Thiemann et al., 1992). ClC-2 ist ubiquitär exprimiert. Der offene Leserahmen kodiert für ein Protein mit 907 Aminosäuren und einer relativen Molmasse von 99kD. Es wird vermutet, daß ClC-2 wie ClC-1 und ClC-0 funktionelle Homooligomere bildet. Neben der Rattenisoform wurde inzwischen auch die des Menschen (Cid et al., 1995), des Kaninchens (Furukawa et al., 1995; Malinowska et al., 1995) und der Maus (Joo et al., 1999) kloniert.

Das für ClC-2 kodierende Gen wurde beim Menschen auf Chromosom 3 (3q27) lokalisiert (Protopopov et al., 1996). Bisher konnte keine Erbkrankheit in dieser Region lokalisiert werden, die man mit einer Mutation in *Clcn2* erklären könnte.

ClC-2 wird nicht nur im Gehirn und Herz exprimiert, er konnte durch Northern-Blot Analyse (Cid et al., 1995; Thiemann et al., 1992) und RT-PCR (Furukawa et al., 1995) bisher in allen untersuchten Geweben und Kulturzelllinien nachgewiesen werden. Es wird daher angenommen, daß dieser ubiquitär exprimierte Chloridkanal eine wichtige Grundfunktion (*Housekeeping*-Funktion) in allen Zellen besitzt.

In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß ClC-2 in einigen Geweben relativ spezifisch exprimiert wird. Durch in situ Hybridisierungen konnte ClC-2 in Pyramidenzellen des Hippokampus, aber nicht in Zellen des Gyrus dentatus nachgewiesen werden (Smith et al., 1995). Durch immunhistochemische Untersuchungen wurde ClC-2 in der apikalen Membran des Lungenepithels lokalisiert (Murray et al., 1995), dort findet man auch den CFTR-Chloridkanal. Andere Untersuchungen zeigen eine spezifische Expression von ClC-2 in der Niere (Murray et al., 1996; Obermüller et al., 1998), und der apikalen Membran des HCl sezernierenden Magenepithels (Malinowska et al., 1995).

Auf diesen Ergebnissen basierend wurde viel über die physiologische Funktion von ClC-2 spekuliert. So soll er in der Lungen- (Murray et al., 1995) und Nierenentwicklung (Huber et al., 1998) eine wichtige Rolle spielen. Es wird vermutet, daß die Magensäuresekretion durch ClC-2 reguliert wird (Malinowska et al., 1995). Darüberhinaus könnte ClC-2 an der Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration von Neuronen beteiligt sein (Staley et al., 1996).

Durch heterologe Expression von ClC-2 cRNA in *Xenopus* Oozyten und in Säugertierzellen wird eine hyperpolarisationsaktivierte Chloridleitfähigkeit induziert. Bei Membranpotentialen negativer als -60 mV aktiviert der Strom langsam und sättigt nach 20 bis 30 Sekunden. ClC-2 ist einwärtsgleichrichtend, die Chloridionen strömen leichter aus der Zelle, als bei umgepolter Membran in sie hinein. Man spricht hier von einwärtsgleichrichtend, da man sich auf den resultierenden elektrischen Strom bezieht. Der elektrische Strom ist als Bewe-

gung von positiven Ladungen definiert. Ändert man das Membranpotential in einem Schritt von negativen Potentialen, bei den ClC-2 aktiviert, zum positiveren Spannungen als dem Ruhemembranpotential, deaktiviert der Kanal innerhalb von einigen Sekunden. Im Bereich physiologischer Spannungen, d.h. positiver als -60 mV, nimmt die Leitfähigkeit sehr stark ab (Abb. 2.2). Der Amino-Terminus von ClC-2 enthält eine Domäne, die für das Schalten des Kanals erforderlich ist. Eine Deletion dieser Domäne führt zu einem sofort öffnenden Kanal. Mutationen in der intrazellulären Schleife zwischen der siebten und achten Transmembran-

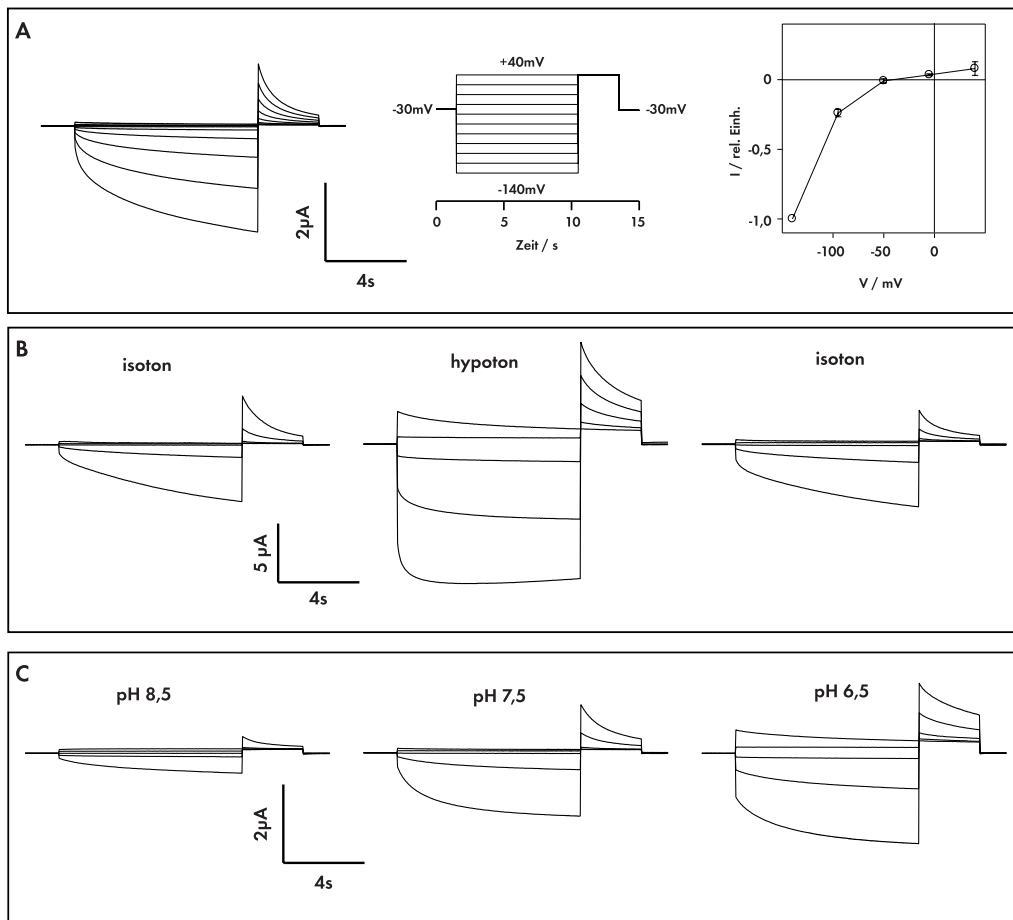


Abb. 2.2: **A**, ClC-2 lässt sich durch Hyperpolarisation der Membran aktivieren, charakteristisch ist die langsame Kinetik. Die einwärtsgerichtete Charakteristik ist gut zu erkennen. **B**, ClC-2 ist schwellungsaktiviert. Nach 15 bis 20 Minuten in hypotonem Medium nimmt die Leitfähigkeit dramatisch zu, die Kinetik ändert sich ebenfalls. Dieser Effekt ist vollkommen reversibel. **C**, Bei alkalischem pH-Wert nimmt der maximale Strom ab, wobei bei saurem extrazellulären pH-Wert ClC-2 aktiviert wird. Die Daten wurden teilweise zu Beginn der Arbeit selbst gemessen, die pH-Wert Abhängigkeit ist von Jordt und Jentsch, 1997 übernommen worden.

domäne führen ebenfalls zu einem sofort öffnenden Kanal. Daher nimmt man an, daß dort die Bindungsstelle für diese Domäne liegt (Jordt und Jentsch, 1997). In Analogie zu den *Shaker* Kaliumkanälen wurde hier ein *Ball und Kette*-Modell vorgeschlagen (Gründer et al., 1992). Die Ionenselektivität von ClC-2 entspricht der Ionenselektivität von ClC-0 und ClC-1 mit : $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$. Bislang sind keine spezifischen Inhibitoren für ClC-2 bekannt. Auch durch hohe Konzentrationen (1mM) von SITS, DIDS oder 9AC wird ClC-2 nur teilweise blockiert. Die Einzelkanalleitfähigkeit beträgt 3 pS (Weinreich und Jentsch, 2000b). Dieser Wert liegt nahe an der Auflösungsgrenze der patch clamp Methode.

ClC-2 kann in *Xenopus* Oozyten außer durch Hyperpolarisation der Membran durch ein hypotones extrazelluläres Medium aktiviert werden (Gründer et al., 1992) (Abb. 2.2 B). Senkt man die Osmolarität des extrazellulären Mediums von 225mosm auf 105mosm, schwellen die Zellen an. Nach etwa 15 Minuten in hypotemem Medium beobachtet man eine deutlich schnelleren Anstieg der Ströme über den gesamten Spannungsbereich. Die Leitfähigkeit bei physiologischen Potentialen ist ebenfalls deutlich erhöht. Die Volumenaktivierung ist vollkommen reversibel.

Darüber hinaus läßt sich ClC-2 durch sauren extrazellulären pH-Wert aktivieren (Jordt und Jentsch, 1997). Senkt man den pH-Wert auf pH6,5, nehmen die Ströme zu, die zu Beginn der Aktivierung zu beobachten sind. Die Aktivierung erfolgt schon beim Ruhemembranpotential (Abb. 2.2 C). Erhöht man den pH-Wert auf pH8 bis pH8,5 nimmt der Strom deutlich ab. Möglicherweise verschiebt sich die Spannungsabhängigkeit des Schaltens von ClC-2 mit dem pH-Wert.

Die nierenspezifischen ClC-K Kanäle Die eng verwandten ClC-K Proteine werden nahezu ausschließlich in der Niere exprimiert. Es wurden bisher zwei Isoformen identifiziert, ClC-Ka und ClC-Kb beim Menschen und ClC-K1 und ClC-K2 bei der Ratte (Kieferle et al., 1994; Uchida et al., 1993; Adachi et al., 1994). Da die Proteine zu mehr als 90% homolog zueinander sind, kann man anhand der Sequenz nicht sagen, welchem ClC-K des Menschen welcher ClC-K einer anderen Spezies entspricht; anhand der Funktionen ist wahrscheinlich ClC-Ka ClC-K1 und ClC-Kb ClC-K2 zuzuordnen. Mutationen im *CLCNKB* Gen führen zu einer Form des Bartter Syndroms (Simon et al., 1997), die Deletion des *CLCNK1* Gens in der Maus löst einen nierenbedingten Diabetes insipidus aus (Matsumura et al., 1999). Beide Nierenerkrankungen können durch einen Verlust des transepithelialen Chloridtransports erklärt werden. Die Expression von ClC-K1 in *Xenopus* Oozyten führt zu auswärtsgerichteten Strömen, die durch einen sauren extrazellulären pH-Wert inhibiert werden. Eine Reduktion der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration inhibiert den Strom. Die Ionenselektivität ist $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^-$ (Adachi et al., 1994; Waldegger und Jentsch, 2000). Inwiefern die Expression der anderen ClC-K-Kanäle ebenfalls zu meßbaren Strömen führt, ist umstritten. Bisher hat nur eine Arbeitsgruppe Ströme beschrieben, die durch ClC-K2 hervorgerufen werden (Adachi et al., 1994). Jedoch führt die Expression einer Spleißvariante, der die zweite Transmembrandomäne fehlt, zu identischen Strömen. Möglicherweise induziert die Expression von ClC-K2 nur eine

endogene Chloridleitfähigkeit in *Xenopus* Oozyten (Waldegger und Jentsch, 2000).

Die zweite Unterfamilie ClC-3, ClC-4 und ClC-5 Die zweite Unterfamilie wird von ClC-3, ClC-4 und ClC-5 gebildet. Sie weisen eine breite Gewebeverteilung auf. ClC-3 (Kawasaki et al., 1994) wird als volumenaktivierter Chloridkanal diskutiert (Duan et al., 1997). Bisherige Untersuchungen ergaben jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Die Gruppen von Jentsch und Miller konnten bisher keine funktionelle Expression von ClC-3 beobachten. Andere Gruppen beschreiben jedoch einen auswärtsgerichteten Strom mit einer Ionenselektivität von $I^- > Cl^-$ (Duan et al., 1997; Fahlke et al., 1997b; Kawasaki et al., 1994; Kawasaki et al., 1995), der sich deutlich von den Strömen von ClC-4 und ClC-5 unterscheidet (Friedrich et al., 1999). Die von Duan vorgeschlagene Funktion als volumenaktivierter Chloridkanal (Duan et al., 1997) ist umstritten und die physiologische Bedeutung von ClC-3 unklar (Jentsch et al., 1999). Möglicherweise ist ClC-3 ähnlich wie ClC-5 ein intrazellulärer Chloridkanal, der bei der Ansäuerung von Vesikeln für den Ladungsausgleich sorgt. Unveröffentlichte Ergebnisse aus unserem Labor zeigen, daß ClC-3 eine Kanal in endosomalen Kompartimenten ist.

Über die Funktion von ClC-4 (Sakamoto et al., 1996) ist wenig bekannt. Die Eigenschaften des heterolog exprimierten Kanals stimmen mit denen von ClC-5 überein (Friedrich et al., 1999)

ClC-5 wird hauptsächlich in der Niere exprimiert und ist verantwortlich für die Dent'sche Krankheit, einer erblichen Nierenerkrankung, die zur Kalziurie und zum Ausscheiden von niedermolekularen Proteinen führt (Fisher et al., 1995; Lloyd et al., 1996). Die Mutationen verändern die elektrophysiologischen Eigenschaften heterolog exprimierter Kanäle stark (Lloyd et al., 1997; Günther et al., 1998). ClC-4 und ClC-5 sind auswärtsgerichtet und haben beide eine für CLC Kanäle typische Ionenselektivität von $Cl^- > I^-$. Obwohl ClC-5 sich gut mit Hilfe heterologer Expression elektrophysiologisch untersuchen läßt, ist er möglicherweise für den Ladungsausgleich in endozytotischen Vesikeln wichtig (Günther et al., 1998; Piwon et al., 2000).

ClC-6 und ClC-7: nicht funktionell exprimierbare Chloridkanäle ClC-6 und ClC-7 bilden die dritte CLC Unterfamilie. Beide werden ubiquitär exprimiert (Brandt und Jentsch, 1995). Über die Funktion von ClC-6 und ClC-7 ist bisher nichts bekannt. Bisher ist es nicht gelungen, diese Proteine funktionell zu untersuchen. Zum einen sind diese Kanäle möglicherweise in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert und gelangen daher nicht an die Plasmamembran; dies wird für den Hefekanal scClC (Hechenberger et al., 1996; Schwappach et al., 1998; Gaxiola et al., 1998) postuliert. Zum anderen könnten aber auch wichtige Untereinheiten für eine funktionelle Expression fehlen oder die Funktion wird nur in einem sehr speziellen physiologischen Zusammenhang erlangt. Über die Funktion von ClC-6 und ClC-7 ist bisher nichts publiziert worden.

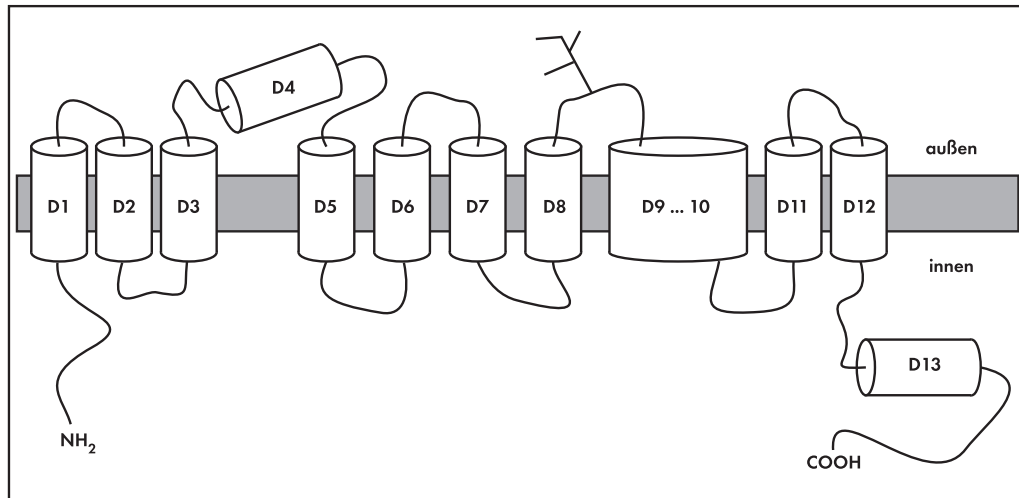


Abb. 2.3: Topologiemodell eines ClC-Monomers. Amino- und Karboxytermini liegen intrazellulär, die genaue Lokalisation der Transmembrandomäne D4 ist umstritten. Der Abschnitt zwischen D8 und D9 ist bei mehreren Mitgliedern der CLC-Familie glykosyliert und liegt daher außen.

Die Struktur der ClC Kanäle Die ClC-Kanäle besitzen zwölf Transmembrandomänen; die Amino- und Karboxytermini liegen zytoplasmatisch. Die Topologie wurde an ClC-1 durch Einfügen von Glykoliserungsstellen, dem Verdau mit Proteinasen und Messungen mit Zystein reaktiven Reagentien untersucht (Schmidt-Rose und Jentsch, 1997). Daraus ergab sich die in Abb. 2.3 dargestellte Topologie für das Monomer.

Das Auftreten dominanter Mutationen in ClC-1 war ein Hinweis, daß der Kanal als Heteromer auftritt. Zunächst wurde eine tetramere Struktur erwartet (Steinmeyer et al., 1994). Die Aufreinigung von ClC-0 Protein aus dem Elektrozyten des *Torpedo californica* lies jedoch eher eine dimere Struktur vermuten (Middleton et al., 1994). Die funktionelle Analyse künstlicher Konkamate unterstützte diese Vermutung sowohl für ClC-0 (Ludewig et al., 1996; Middleton et al., 1996), als auch für ClC-1 (Fahlke et al., 1997a; Saviane et al., 1999).

In Einzelkanaluntersuchungen wurde gezeigt, daß ClC-0 und ClC-1 ein einzigartiges Schaltverhalten besitzen. In ClC-0 Einzelkanalmessungen beobachtet man lange Ruhephasen, die durch kurze Phasen von Kanalaktivitäten, sogenannten *Bursts*, unterbrochen sind. Bei ClC-0 ist die Dauer zwischen den Bursts spannungsabhängig und nimmt mit zunehmender Hyperpolarisation ab. Dies wird als langsames Schalten bezeichnet und weist eine hohe Temperaturabhängigkeit auf (Pusch et al., 1997). Innerhalb der Bursts werden zwei Leitfähigkeitsstufen von jeweils etwa 8pS beobachtet. Dies kann durch zwei Zustände einer einzelnen Pore oder durch zwei unabhängige Poren erklärt werden. Konkamate, die zwei Untereinheiten mit unterschiedlichen Leitfähigkeiten besitzen, sind ein deutlicher Hinweis auf zwei getrennte Poren, wobei jede Pore durch ein Monomer gebildet wird (Ludewig et al., 1996).

Für ClC-1 ist diese Doppelporenstruktur ebenfalls gezeigt worden (Saviane et al., 1999). Die genaue Lage der Porenregion ist jedoch unbekannt. Sie wird im Bereich der Transmembrandomänen D2 und D3 vermutet, jedoch verändern auch Punktmutationen in anderen Bereichen die Eigenschaften der Pore (Weinreich und Jentsch, 2000a).

Spannungsabhängige Kationenkanäle besitzen einen intrinsischen Spannungssensor, der aus geladenen Aminosäureresten der amphiphatischen S4 Helix gebildet wird (Noda et al., 1984; Papazian et al., 1991). Die Bewegung dieser Helix im elektrischen Feld der Plasmamembran führt zum Öffnen des Kanals.

Die Spannungsabhängigkeit des schnellen Schaltens von ClC-0 verschiebt sich mit Abnahme der extrazellulären Chloridkonzentration zu positiveren Potentialen (Pusch et al., 1995a). Die Spannungsabhängigkeit wird auch beeinflusst, wenn man Chlorid gegen andere Anionen wie Bromid oder Nitrat austauscht. Die Anionenselektivität der Pore korreliert mit der Selektivität der Spannungsabhängigkeit. Außerdem führt die Mutation von Lysin an Position 519 zu Glutamat oder Glutamin (L519E, L519Q) zu einer Veränderung der Spannungsabhängigkeit, der Ionenselektivität und der Rektifikation der Pore. Diese Beobachtungen führten im Gegensatz zu den Kationenkanälen zu einem neuen Modell, in dem das permeierende Anion selbst der Spannungssensor ist. (Pusch et al., 1995a; Chen et al., 1996; Pusch et al., 1999). Das Anion bindet von außen an eine Bindestelle des Kanals. Das gebundene Anion bewegt sich im elektrischen Feld und erzeugt so eine Konformationsänderung, die zur Öffnung der Pore führt.

2.2.1.4 Ligandengesteuerte Chloridkanäle: GABA_A- und Glyzin-Rezeptoren

Inhibition an zentralen Synapsen wird durch GABA und Glyzin vermittelt. Die inhibitorische Wirkung der Neurotransmitter wird durch Öffnung eines Chloridkanals vermittelt, daher ist die inhibitorische Wirkung an das elektrochemische Chloridpotential gekoppelt (siehe Abschnitt 2.4). Die Regulation der intraneuronalen Chloridkonzentration soll in der Arbeit näher untersucht werden.

GABA-Rezeptoren γ -Aminobuttersäure (GABA) ist einer der wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter im ZNS von Wirbeltieren. GABA aktiviert drei verschiedene Rezeptorklassen, GABA_A-, GABA_B- und GABA_C-Rezeptoren. GABA_A-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Chloridkanäle. Sie werden durch GABA, Muscimol, und Isoguvazin aktiviert und durch Bicucullin und GABAzin inhibiert. GABA_B-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Ca²⁺- oder K⁺-Kanäle. Sie werden durch GABA und Baclofen aktiviert und durch Phaclofen und Saclofen inhibiert.

GABA_C-Rezeptoren bestehen aus verschiedenen Isoformen der ρ -Untereinheit und sind wie die GABA_A-Rezeptoren selber ein Chloridkanal. Sie werden durch GABA und einige GABA-Analoga aktiviert und durch Imidazol inhibiert. Sie reagieren nicht auf Bicucullin, Barbiturate, Benzodiazepine und Baclofen. Es wird auch diskutiert, ob GABA_C-Rezeptoren als besondere Klasse der GABA_A-Rezeptoren bezeichnet werden sollten (Barnard et al., 1998).

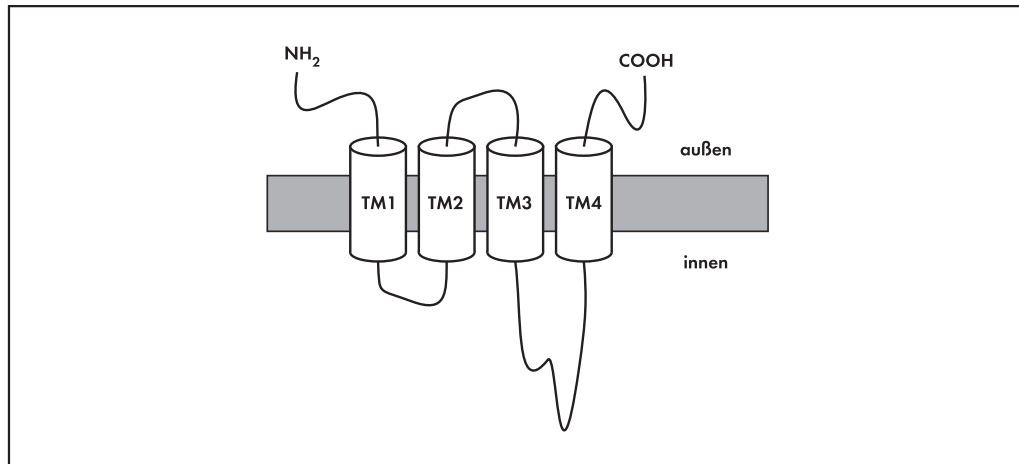


Abb. 2.4: Topologie einer Untereinheit der ligandengesteuerten Chloridkanäle. Amino- und Karboxytermini der Rezeptoruntereinheiten liegen extrazellulär. Der lange intrazelluläre Abschnitt zwischen TM3 und TM4 ist für die Bindung an Gephyrin wichtig und spielt damit für die Lokalisation eine wichtige Rolle.

GABA_A-Rezeptoren sind Anionenkanäle mit einer Permeabilitätssequenz von $SCN^- > I^- > Br^- > Cl^- \gg F^-$. Das Leitfähigkeitsverhältnis zwischen Cl^- zu HCO_3^- beträgt 1:5 (Bormann et al., 1987). GABA_A-Rezeptoren sind impermeabel für Kationen. Man beobachtet bei ihnen mehrere Leitfähigkeitsstufen, diese liegen im Bereich von 10 bis 45 pS.

Abhängig vom elektrochemischen Chloridpotential, führt das Öffnen von GABA_A-Rezeptor-Chloridkanälen zu einer Hyperpolarisation oder Depolarisation der Zelle. Dies ist in Abschnitt 2.4 genauer beschrieben.

GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten Der GABA_A-Rezeptor ist ein Transmembranprotein, das eine heterooligomere Struktur aufweist. Er wird im peripheren und zentralen Nervensystem exprimiert. Die Aminosäuresequenzen der Untereinheiten weisen eine Homologie von 20 bis 30 % zu anderen ligandengesteuerten Ionenkanälen auf, wie zum Beispiel dem nikotinischen Azetylcholin-Rezeptor, dem Glyzin-Rezeptor und dem 5-HT₃-Rezeptor. Es sind einige verschiedene Klassen von Untereinheiten mit jeweils eigenen Subtypen aus dem Gehirn von Säugern kloniert worden. Die Homologie zwischen den Untereinheiten beträgt etwa 30% und ungefähr 70% innerhalb der Subtypen. Man unterscheidet folgende Untereinheiten und Subtypen: $\alpha_1 - \alpha_6$, $\beta_1 - \beta_3$, $\gamma_1 - \gamma_3$, δ , ϵ , π und $\rho_1 - \rho_3$. Rezeptoren, die sich aus den verschiedenen Subtypen der ρ -Untereinheiten zusammensetzen, bezeichnet man als GABA_C-Rezeptoren. Sie sind zwar strukturell ein Teil der GABA_A-Rezeptorfamilie, ihre Pharmakologie unterscheidet sie jedoch stark von den GABA_A-Rezeptoren. Sie werden nur in der Retina exprimiert.

Topologie der GABA_A-Rezeptoren Jede Untereinheit besteht aus vier Transmembrandomänen, einer langen aminoterminalen Domäne von etwa 200 Aminosäuren und einem kurzen Karboxyterminus. Die GABA_A-Rezeptor β_3 -Untereinheit besitzt wie auch die β -Untereinheit des Glyzin-Rezeptors in der Schleife zwischen TM3 und TM4 ein Gephyrin-Binde Motiv. Durch Gephyrin wird die subzelluläre Lokalisation der GABA_A-Rezeptoren, die eine β_3 -Untereinheit enthalten, moduliert (Prior et al., 1992; Kirsch et al., 1995). Dies legt die Vermutung nahe, daß das Zusammenlagern von GABA_A-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran durch Gephyrin reguliert wird. Es bindet den Rezeptor an das subsynaptische Zytoskelett. Das Wort Gephyrin stammt von dem griechischen Wort für Brücke ab.

Der GABA_A-Rezeptor ist ein Multimer mit einer Molekülmasse von 230 – 270 kDa. Obwohl es bisher dafür keine direkten Beweise gibt, geht man davon aus, daß er in Analogie zu den Glyzin- und Acetylcholin-Rezeptoren aus fünf Untereinheiten besteht. Aus den vielen verschiedenen Untereinheiten mit ihren zahlreichen Subtypen ergibt sich eine große Zahl von möglichen Kombinationen, wobei man bisher nur eine begrenzte Zahl *in vivo* gefunden hat. Die meisten GABA_A-Rezeptoren bestehen aus einem einzelnen Typ von α -Untereinheit, einem Typ von β -Untereinheit und einer γ_2 -Untereinheit (McKernan et al., 1991; Benke et al., 1991). Dabei bestimmt die α -Untereinheit die unterschiedliche Affinität für allosterische Liganden der GABA_A-Rezeptoren. Die β -Untereinheit verstärkt die Expression funktioneller Kanäle und stellt eine wesentliche Komponente der Struktur dar. Die γ -Untereinheit wird für die Empfindlichkeit gegenüber Benzodiazepinen benötigt und vergrößert die Einzelkanalleitfähigkeit und Offenwahrscheinlichkeit.

Die übrigen Untereinheiten bilden keine Homomere, sondern können mit $\alpha\beta$ -Untereinheiten einen Rezeptor bilden. Die Rolle der δ -Untereinheit ist unklar, die ε -Untereinheit macht den Rezeptor unempfindlich gegenüber dem verstärkenden Effekt bestimmter Anaesthetika. Sie wird im Herz und in der Plazenta stark exprimiert (Davies et al., 1997).

Gewebeverteilung der GABA_A-Rezeptoren Die Gene, die für die GABA_A-Rezeptoruntereinheiten kodieren, werden unterschiedlich exprimiert, das hängt sowohl von der Entwicklung, als auch von dem Gewebe ab (Lüddens et al., 1995). Einige Zelltypen exprimieren fast alle Typen von GABA_A-Rezeptoren, während andere nur eine beschränkte Anzahl besitzen. Jedes der sechs Gene für die verschiedenen α -Untereinheiten hat ein eigenes Expressionsmuster im Gehirn, daher muß es auch sechs verschiedene GABA_A-Rezeptoren geben. Die α_1 -Untereinheit kommt am häufigsten vor und ist in fast allen Zellen zu finden. Sie tritt meist in Kombination mit der β_2 und der γ_2 -Untereinheit auf. Man nimmt an, daß der $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ Komplex der häufigste Typ der GABA_A-Rezeptoren im Gehirn ist. In Motoneuronen des Rückenmarks findet man meist die Kombination $\alpha_2\beta_3\gamma_2$. Die anderen Untereinheiten findet man in eingeschränkteren Bereichen. Beispielsweise kommt die α_6 Untereinheit nur in den Körnerzellen des Kleinhirns vor. In einigen Bereichen des Gehirns verändert sich die Zusammensetzung der GABA_A-Rezeptoren während der Entwicklung von embryonalen Typen zu adulten Typen der GABA_A-Rezeptoren. Teilweise werden GABA_A-Rezeptoren auch außerhalb

des ZNS gefunden. Man findet sie in den α -Zellen des Pankreas, wo sie eine wichtige Rolle in der Glukagon Ausschüttung spielen.

Glyzin-Rezeptoren Der primäre physiologische Agonist des Glyzin-Rezeptors ist Glyzin. Aber auch Taurin und β -Alanin haben eine agonistische Wirkung auf den Glyzin-Rezeptor. Alle drei Aminosäuren öffnen eine Anionenkanal, der eine Permeabilitätssequenz von $I^- > Br^- > Cl^-$ hat. Der Kanal hat mehrere verschiedene Leitfähigkeitszustände im Bereich von 10 bis 90 pS. Strychnin ist ein kompetitiver Antagonist des Glyzin-Rezeptors. Durch seine Bindung reduziert er die Aktivität der inhibitorischen Neuronen und erzeugt damit eine Übererregbarkeit, Muskelkrämpfe und Anfälle. Strychnin wurde jahrhundertlang als Rattengift verwendet.

Struktur der Glyzin-Rezeptoren Der Glyzin-Rezeptor im adulten Gehirn ist ein pentamerer Komplex von drei α - und zwei β -Untereinheiten, die ein Molekulargewicht von 48 (α) und 58 kD (β) haben. Wie die Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors bestehen die Untereinheiten des Glyzin-Rezeptors aus vier Transmembrandomänen, einem langen Aminoterminus und einem kurzen Karboxyterminus. An die Schleife zwischen TM3 und TM4 der β -Untereinheit bindet wie beim GABA_A-Rezeptor Gephyrin.

Die α - und β -Untereinheiten des Glyzin-Rezeptors sind etwa zu 35% homolog zu den Untereinheiten des nikotinischen Azetylcholin-Rezeptors und des GABA_A-Rezeptors. Bei Menschen sind bisher drei verschiedene Subtypen der α -Untereinheit bekannt (Maus vier).

Bei der heterologe Expression in *Xenopus* Oozyten bildet die α -Untereinheit einen funktionellen Kanal, der durch Glyzin, Taurin und β -Alanin geöffnet werden kann. Durch Strychnin und Picrotoxin wird er blockiert. Das zeigt, daß die α -Untereinheit sowohl die Agonisten-, als auch die Antagonisten-Bindestelle enthält. Die β -Untereinheit ist alleine nicht in der Lage funktionelle Kanäle zu bilden. Sie bindet weder Agonisten noch Antagonisten. Die Koexpression der α und β -Untereinheiten verstärkt die Ganzzellströme erheblich. Möglicherweise dient die β -Untereinheit dazu, daß der Rezeptor besser in die Membran eingebaut wird. Dabei spielt die Interaktion mit Gephyrin eine wichtige Rolle.

Expression der Glyzin-Rezeptoren Die Expression der α_1 - und α_2 -Untereinheiten wird während der Entwicklung reguliert. Die Expression der α_1 -Untereinheiten nimmt nach der Geburt zu und die der α_2 -Untereinheiten ab. Die Expression der α_3 -Untereinheiten nimmt ebenfalls nach der Geburt zu. Die neonatale Form des Glyzin-Rezeptors ist wahrscheinlich ein homopentamer Molekül aus α_2 -Untereinheiten, während die adulte Form hauptsächlich aus $\alpha_1\beta$ -Untereinheiten besteht.

Durch in situ Hybridisierungen hat man gezeigt, daß die α_1 -Untereinheit im Rückenmark, im Hirnstamm und im Kollikuls exprimiert wird, die α_2 -Untereinheit kommt im Hippokampus, der Kleinhirnrinde und dem Thalamus vor. Die β -Untereinheit kommt im gesamten Rückenmark und Gehirn vor.

Krankheiten durch Mutationen in den Rezeptoren Glyzin ist der hauptsächliche inhibitorische Neurotransmitter im Rückenmark. Daher führt ein Funktionsverlust zu einer Übererregbarkeit der Motoneurone und im folgenden zu Muskelkrämpfen und unkontrollierten Bewegungen. Bei Menschen führen Mutationen im Glyzin-Rezeptor zu Hyperekplexie. Dies ist eine autosomal dominant vererbte neurologische Krankheit, die durch Muskelkrämpfe aufgrund unerwarteter Reize charakterisiert wird. Daher wird sie im englischen auch *startle disease* genannt. Die Krankheit wird dominant vererbt, da mutierte Untereinheiten mit nicht mutierten Untereinheiten heteromere Glyzin-Rezeptoren bilden können. In betroffenen Patienten beobachtet man eine Zunahme der GABAergen Inhibition.

In Mäusen sind verschiedene Mutationen den Untereinheiten der Glyzin-Rezeptoren gefunden worden. Diese zeigen einen rezessiven Erbgang, sind aber mit der menschliche Form der Hyperekplexie vergleichbar. Die *spasmodic* Maus hat eine Punktmutationen in der α_1 -Untereinheit des Glyzin-Rezeptors (Saul et al., 1994). Dies erhöht die Konzentration von Glyzin, die zur halbmaximalen Aktivierung führt; dadurch leiden die Tiere an einem motorischen Tremor und Muskelkrämpfen. Der Phänotyp entwickelt sich zwei bis drei Wochen nach der Geburt. Zu diesem Zeitpunkt erreicht die Expression der α -Untereinheit auch ihr normales Niveau. Die *oscillator* Maus hat eine Mikrodeletion am Ende der dritten Transmembrandomäne der α_1 -Untereinheit des Glyzin-Rezeptors, die zu einer Verschiebung des Leserahmens führt und damit zu einem verkürzten Protein (Buckwalter et al., 1994). Der Phänotyp ist der *spasmodic* Maus sehr ähnlich. Die dritte Mausmutante ist die *spastic* Maus. Bei ihr ist die β_1 -Untereinheit des Glyzin-Rezeptors durch eine Transposoninsertion mutiert. Zur Geburt zeigt sie keinen Phänotyp. Dieser entwickelt sich etwa zwei Wochen nach der Geburt und zeigt sich in veränderten Bewegungsreflexen, Muskelkrämpfen und Tremor. Durch die Mutation in der β_1 -Untereinheit des Glyzin-Rezeptors kommt es zu einer stark verringerten Dichte der Glyzin-Rezeptoren im adulten Gehirn und Rückenmark. Die Transposoninsertion führt zum falschen Spleißen der mRNA, so daß in der *spastic* Maus weniger (> 10%) vollständige Transkripte nachgewiesen werden können. Der Beginn des *spastic* Phänotyps fällt wiederum mit der Expression der adulten α -Untereinheit des Glyzin-Rezeptors zusammen.

2.2.1.5 CFTR

Strukturell gehört der Zystische-Fibrose-Transmembran-Leitfähigkeits Regulator (CFTR) zur Familie der ABC-Transporter. Diese weisen ATP-Binde-Stellen auf, daher auch der Name ABC-Transporter (ATP-Binding-Cassette). CFTR ist jedoch ein spannungsunabhängiger Chloridkanal. Er wird in vorallem in epithelialen Organen wie dem Darm, der Lunge, dem Pankreas, den Reproduktionsorganen und den Schweißdrüsen gefunden. Das CFTR Protein hat insgesamt zwölf Transmembrandomänen, nach jeweils sechs Transmembrandomänen folgt eine ATP-Bindungsstelle. Nach den ersten sechs Transmembrandomänen folgt eine regulatorische Domäne, die sogenannte R-Domäne (Riordan et al., 1989). CFTR wird durch die Phosphorylierung der R-Domäne durch Protein Kinase A und die Bindung von ATP moduliert (Riordan et al., 1989; Cheng et al., 1991; Quinton und Reddy, 1992).

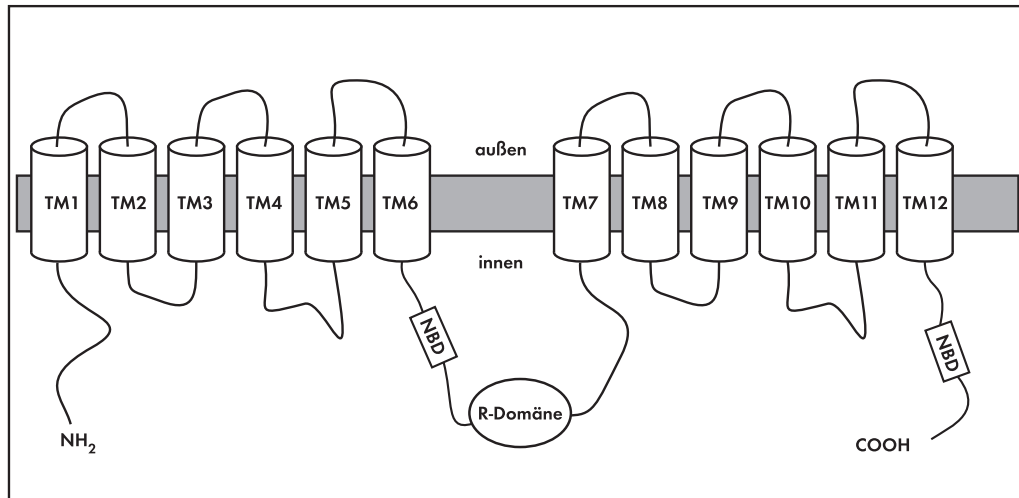


Abb. 2.5: Topologie von CFTR, CFTR hat zwölf Transmembrandomänen. In der Mitte befindet sich die Regulatorische Domäne. Nach je sechs Transmembrandomänen folgt eine Nukleotid-Binde-Domäne (NBD).

Mutationen im *CFTR*-Gen verursachen die Zystische Fibrose (CF), auch Mukoviszidose genannt. CF ist eine der häufigsten monogenen Erbkrankheiten unter Kauasiern (Mitteleuropäern). Der Funktionsverlust von CFTR führt zu einer gestörten epithelialen Chloridsekretion, wobei hauptsächlich die Lunge, Pankreas und der Darm Veränderungen in CF-Patienten verändert sind. Die häufigste Mutation ist die Deletion des Phenylalanins an Position 508. In diesem Fall wird das Protein im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten und gelangt dadurch in geringeren Mengen an die Plasmamembran (Lukacs et al., 1993; Welsh et al., 1993). Einige Mutationen führen zur Unfruchtbarkeit, dabei fehlt der Samenleiter oder ist stark eingengt.

Die Funktion von CFTR als Chloridkanal war lange umstritten. Durch die Homologie zu anderen ABC-Transportern wurde vermutet, daß CFTR als Transporter arbeitet und dadurch die Chloridpermeabilität der Membran reguliert. Durch Mutationen, die die Ionenselektivität und die Leitfähigkeit ändern, konnte gezeigt werden, daß es sich um einen Chloridkanal handelt (Anderson et al., 1991).

2.3 Transporter

Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , H^+ sind die einzigen Ionen, die direkt gegen einen Konzentrationsgradienten in eine oder aus einer Zelle transportiert werden. Dies geschieht unter Energieverbrauch, diese Energie wird durch die Hydrolyse von ATP zur Verfügung gestellt. Häufig müssen aber auch andere Ionen gegen einen Konzentrationsgradienten transportiert werden. Dazu benutzen

Transporter die Energie, die in den Konzentrationsgradienten anderer Ionen gespeichert ist. Sie koppeln den Transport einer Substanz beispielsweise an den energetisch bevorzugten Transport von Na^+ . Der Transport der Substanzen kann in die gleiche (Symport) oder entgegengesetzte Richtung (Antiport) laufen. Da Symporter und Antiporter häufig eine Substanz gegen einen Gradienten transportieren, bezeichnet man sie auch als sekundär aktive Transporter.

In den folgenden Abschnitten wird auf die Familie der Kationen-Chlorid-Kotransporter näher eingegangen, da sie für diese Arbeit eine wichtige Rolle spielen; die übrigen Transporter werden nicht näher betrachtet.

2.3.1 Kationen-Chlorid-Kotransporter

Der elektroneutrale Kotransport von Na^+ , K^+ und Cl^- wurde zuerst von Geck und Mitarbeitern in Ehrlich-Zellen beschrieben (Geck et al., 1980). Charakteristisch für diesen Transport ist die Empfindlichkeit gegenüber Schleifendiuretika (meist Bumetanid und Furosemid), eine Stöchiometrie von $1\text{Na}^+ : 1\text{K}^+ : 2\text{Cl}^-$ und die Abhängigkeit von allen drei transportierten Ionen. Diese Kriterien waren bei der Identifizierung des Bumetanid sensitiven Transporters in verschiedenen Zellen und Geweben sehr hilfreich (Kaplan et al., 1996). Der einwärtsgerichtete Na^+ - K^+ - 2Cl^- -Transport wird durch Zellschrumpfung aktiviert, was eine Funktion in der regulatorischen Volumenzunahme nahelegt (Hoffmann und Dunham, 1995). Im Gegensatz dazu aktiviert eine regulatorische Volumenabnahme einen auswärtsgerichteten Na^+ -unabhängigen K^+ - Cl^- -Kotransport, der nur schwach durch Bumetanid und Furosemid inhibiert wird (Lauf et al., 1992; Hoffmann und Dunham, 1995). Eine weitere Klasse der Kation-Chloridkotransporter stellt der Thiazid-sensitive Na^+ - Cl^- -Transporter dar. Er wird besonders im distalen Nierentubulus exprimiert (Costanzo, 1985). In den letzten Jahren ist die Klonierung dieser Kotransporter gelungen. In Abbildung 2.6 sind alle bisher klonierten Kationen-Chlorid-Transporter entsprechend ihrer Homologie in einem Dendrogramm dargestellt. Die Familie der Kationen-Chlorid-Kotransporter kann in zwei Hauptzweige unterteilt werden. Der eine enthält die nierenspezifischen Na^+ -gekoppelten Kotransporter und der andere die Kalium-Chlorid-Kotransporter. Alle Transporter besitzen in der Primärstruktur zwölf Transmembrandomänen sowie lange zytoplasmatische Amino- und Karboxytermini. Bisher ist wenig über die Struktur-Funktionsbeziehung der Kation-Chloridtransporter bekannt.

2.3.1.1 Kalium-Chlorid-Kotransporter KCC

Der elektroneutrale Transport von K^+ und Cl^- wurde in vielen Zellen, die an der Volumenregulation, dem transepithelialen Salztransport und in der Aufrechterhaltung von Cl^- Gradienten beteiligt sind, beobachtet. Er wurde zuerst als ein schwellungsaktivierter K^+ Ausstrom in Erythrozyten beschrieben (Lauf et al., 1992). Der Kotransport von K^+ und Cl^- ist von beiden transportierten Ionen abhängig; dabei ist der Transport unabhängig vom Membranpotential und bewirkt in der Regel einen Ausstrom von K^+ und Cl^- . KCCs sind durch Bumetanid und Furosemid blockierbar, wobei ihre Empfindlichkeit deutlich geringer ist als die der NKCCs

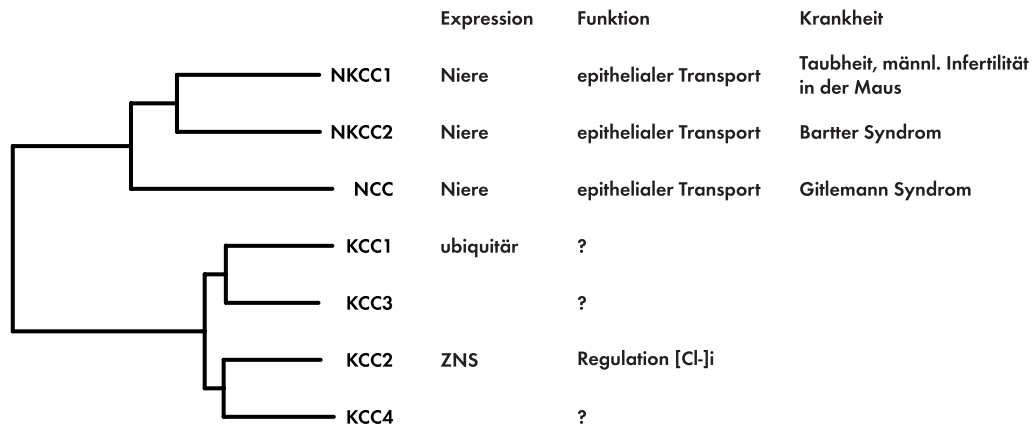


Abb. 2.6: Die elektroneutrale Kation-Chloridtransporter Familie. Sie besteht aus zwei Hauptzweigen. Die Länge der horizontalen Linien gibt ungefähr den Homologieunterschied an. Das Dendrogramm wurde mit CLUSTALX (NCBI, USA) erstellt (Thompson et al., 1997).

(Gillen et al., 1996; Payne et al., 1996).

Inzwischen wurden vier verschiedene KCCs kloniert. Sie sind alle homolog zu den anderen elektroneutralen Kation-Chlorid-Kotransportern (Abb. 2.6). Die heterologe Expression von KCC1 in HEK-293 Zellen führt zu einer chloridabhängigen, Furosemid-empfindlichen Transport von $^{86}\text{Rb}^+$, der durch Zellschwellung aktiviert wird (Gillen et al., 1996; Holtzman et al., 1998). KCC1 Transkripte konnten in Erythrozyten Zelllinien nachgewiesen werden, daher wird vermutet, daß KCC1 der Erythrozyten K^+-Cl^- -Kotransporter ist (Pellegrino et al., 1998). Darüberhinaus wird KCC1 aber auch in vielen anderen Geweben exprimiert. Im Gegensatz dazu ist die Expression von KCC2 auf Neuronen beschränkt (Payne et al., 1996; Clayton et al., 1998a). Für KCC2 wird daher eine wichtige Rolle für die Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration in Neuronen angenommen, die die Antwort auf inhibitorische Neurotransmitter beeinflusst (Clayton et al., 1998a; Rivera et al., 1999) (siehe Abschnitt 2.4). Rivera und Mitarbeiter konnten an kultivierten hippokampalen Neuronen zeigen, daß sich durch Inkubation mit KCC2-Antisense-RNA, die intraneuronale Chloridkonzentration erhöht. KCC3 hat ein etwas eingeschränkteres Expressionsmuster als KCC1 und KCC4, das auf Muskel, Gehirn, Herz und Niere beschränkt ist. KCC4 ist hauptsächlich auf Herz und Niere beschränkt.

Die physiologische Rolle von KCC3 und KCC4 ist bisher nicht weiter untersucht worden. KCC3 könnte wie KCC2 an der neuronalen Cl^- Homöostase beteiligt sein (Misgeld et al., 1986; Rivera et al., 1999; Clayton et al., 1998a). KCC1, KCC3 und KCC4 werden in der Niere exprimiert. Es gibt auch gute physiologische Hinweise, daß der K^+-Cl^- -Kotransport in einigen Abschnitten des Nephrons, wie dem proximalen Tubulus (Avison et al., 1988; Sasaki et al., 1988), dem dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (Amlal et al., 1994; Greger, 1985), dem distalen Tubulus (Ellison et al., 1985) und dem kortikalen Sammelrohr von Bedeutung ist (Wingo, 1989).

2.3.1.2 NKCC

Die beiden $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ Kotransporter NKCC1 und NKCC2 werden wegen ihrer Pharmakologie auch als BSC2 (NKCC1) und BSC1 (NKCC2) bezeichnet, dabei steht BSC für **B**umetanide **S**ensitive **C**otransporter. Im Gegensatz zu sekretorischen Epithelien, die generell einen basolateralen Bumetanid-sensitiven $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Transport besitzen, ist NKCC2 apikal lokalisiert und auf den dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife beschränkt (Mount et al., 1998). Dort spielt NKCC2 eine wichtige Rolle in der transzellulären Absorption von Na^+ und Cl^- . NKCC2 Mutationen sind für eine spezielle Form des Bartter Syndroms verantwortlich (Simon et al., 1996a), eine Nierenerkrankung, die durch Hyperkaliurie gekennzeichnet ist. Die Expression von NKCC1 konnte im Neuronen des ZNS nachgewiesen werden. Er kommt besonders häufig im Kleinhirn und im Stammhirn vor und wird auch im Plexus choroideus gefunden (Plotkin et al., 1997b). Außerdem wurde er in einigen Neuronen des Gehirns, in den Ganglien der dorsalen Wurzeln des Rückenmarks und in Neuronen des peripheren Nervensystems nachgewiesen (Plotkin et al., 1997b). Dort könnte er für den elektrochemischen Cl^- -Gradienten wichtig sein (Misgeld et al., 1986; Staley et al., 1996). Die Expression von NKCC1 im Gehirn ist zur Geburt hoch und verringert sich dann im weiteren Verlauf der Entwicklung (Plotkin et al., 1997a). Möglicherweise wird dadurch die intrazelluläre Chloridkonzentration beeinflusst. Da NKCC1 Chlorid in die Zelle transportiert, könnte durch eine geringere Expression ein Absinken der intrazellulären Chloridkonzentration indirekt erklärt werden (Mount et al., 1998). Siehe dazu auch Abschnitt 2.4.

2.3.1.3 NCC

Im distalen Tubulus der Niere wird die apikale Na^+ Aufnahme durch den Thiazid-sensitiven NCC (auch TSC) gewährleistet (Mount et al., 1997). Eine Mutation in dem Gen für NCC ist Ursache für das Gitelman Syndrom (Simon et al., 1996b). Diese autosomal rezessiv vererbte Nierenerkrankung führt zu einem Transportdefekt im distalen Tubulus der Niere und zu einem Verlust von Magnesium und Kalium über den Urin.

2.4 Veränderung der intrazellulären Chloridkonzentration

In frühen Entwicklungsstadien ist das elektrochemische Chloridpotential positiver als das Ruhemembranpotential, so daß es zu einem Efflux von Chlorid durch GABA_A - und Glyzin Rezeptoren kommt. Dadurch depolarisiert die Zelle und wird leichter erregbar. Später verändert sich die Chloridkonzentration, so daß es zu einem Influx von Chlorid kommt. Dies hat den gegenteiligen Effekt. Die Zelle hyperpolarisiert und die Erregbarkeit wird reduziert. Dadurch werden GABA und Glyzin zu inhibitorischen Neurotransmittern. In Abb. 2.7 ist dies schematisch dargestellt.

Warum sich das elektrochemische Potential von Chlorid während der Entwicklung ändert, ist nicht geklärt. In sich entwickelnden Neuronen des Kortex depolarisiert GABA soweit, daß

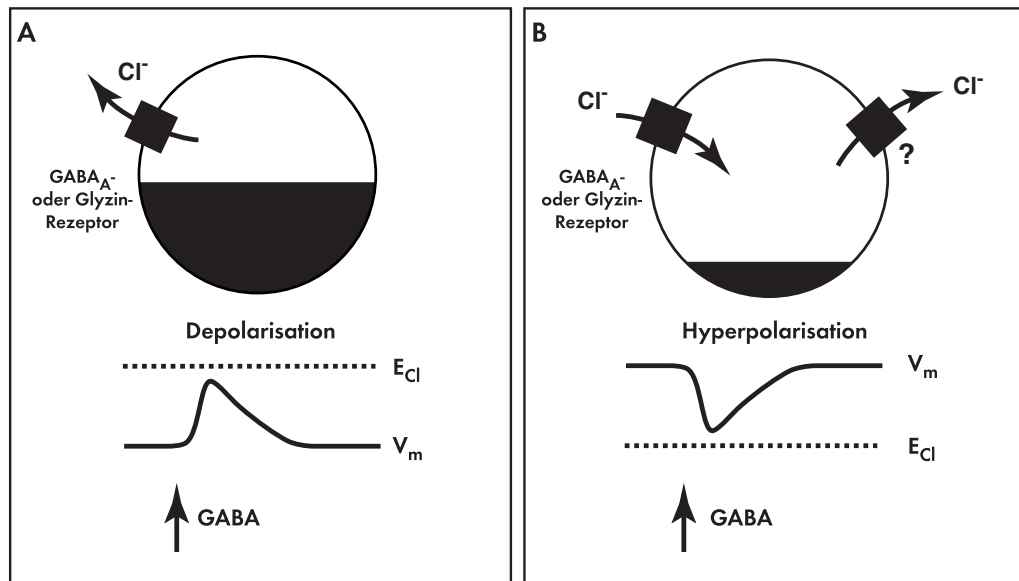


Abb. 2.7: Zu Beginn der Entwicklung ist das elektrochemische Potential von Chlorid (E_{Cl}) positiv relativ zum Ruhemembranpotential (V_m). Das Öffnen von Chloridkanälen durch GABA oder Glyzin depolarisiert die Zelle (**A**). Durch einen K^+ - Cl^- -Kotransporter wird verschoben das (E_{Cl}) so, daß es negativ relativ zum (V_m) ist. Jetzt hyperpolarisieren GABA und Glyzin die Zelle (**A**). (Nach Miles, 1999).

Kalzium in die Zelle gelangt. Die erhöhte Kalziumkonzentration kontrolliert die Genexpression und man vermutet, daß GABA so eine neurotrophe Wirkung haben könnte (Ben-Ari et al., 1989).

Zusätzlich zu der inhibitorischen Wirkung hat GABA manchmal eine exzitatorische Wirkung in adulten Tieren (Andersen et al., 1980; Staley et al., 1995). Die durch GABA ausgelöste Depolarisation wurde zuerst als Teil einer biphasischen hyperpolarisierenden-depolarisierenden Antwort in CA1 Pyramiden-Zellen beschrieben (Alger und Nicoll, 1979). Es wird vermutet, daß der depolarisierende Teil der GABA Antwort durch HCO_3^- getragen wird (Staley et al., 1995). Da GABA-Rezeptoren sowohl für Cl^- als auch für HCO_3^- permeabel sind (Kaila et al., 1993; Perkins und Wong, 1997), führt der Influx von Chlorid zu einer Hyperpolarisation, der Efflux von HCO_3^- zu einer Depolarisation. Das Permeabilitätsverhältnis von Cl^- zu HCO_3^- beträgt 5:1 (Bormann et al., 1987). Mit anhaltender Aktivierung nimmt der Cl^- -Influx ab (Thompson und Gähwiler, 1989). HCO_3^- steht in einem dynamischen Gleichgewicht mit CO_2 . Da die Zellmembran für CO_2 permeabel ist, wird die depolarisierende Wirkung von HCO_3^- aufrecht erhalten (Staley et al., 1995). Eine andere Möglichkeit ist, daß die Depolarisation durch einen anderen Kanal mit höherer Permeabilität für HCO_3^- ausgelöst wird und nicht auf eine Akkumulation von Cl^- zurückzuführen ist. (Perkins und Wong, 1996; Perkins, 1999).

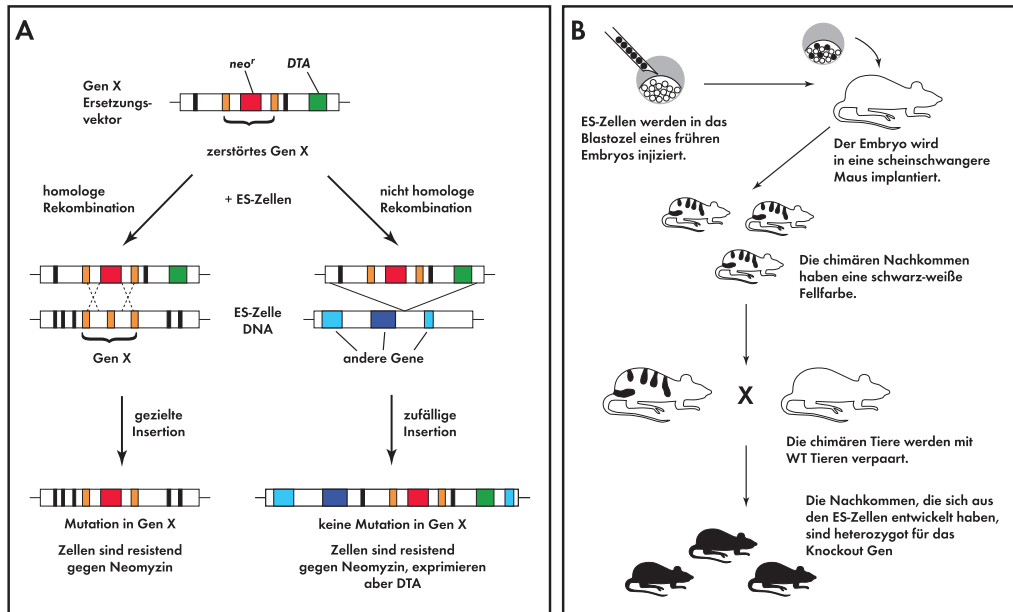


Abb. 2.8: **A**, Erzeugung des sogenannten Target-Vektors. Das Gen X wird durch Einfügen einer Neomycin Resistenz zerstört. Neomycin dient dabei als positiver Selektionsmarker. Zusätzlich enthält der Vektor einen negativen Selektionsmarker außerhalb des Gen. Bei homologer Rekombination wird das Gen in der ES-Zelle durch den Vektor ersetzt, dabei wird der negative Selektionsmarker entfernt. Insetiert der Vektor zufällig, exprimiert die Zellen beide Selektionsmarker, wobei der negative (hier Diphterintoxin A) die Zelle absterben lässt. **B**, Die ES-Zellen in denen das Gen homolog ersetzt wurde, werden in Blastozysten injiziert. Die Blastozysten werden einer scheinchwangeren Maus implantiert und man erhält chimäre Nachkommen, die aus den Zellen der Blastozyste und den Zellen, die sich von den ES-Zellen ableiten, abstammen. Wenn die Keimzellen der Chimären sich aus den ES-Zellen entwickelt haben, sind ihre Nachkommen heterozygot in dem deletierten Gen (nach Lodish et al., 1995).

2.5 Knockout Mausmodelle

Die funktionelle Untersuchung von bekannten Proteinen ist häufig nur im Zusammenhang eines Organismus möglich. Erst hier kommen alle Faktoren, die die Funktion des Proteins bestimmen, zusammen. In einigen Fällen konnte man die Funktion eines Proteins in Mutanten untersuchen. Durch die Knockout-Technologie ist es möglich, künstliche Mutanten herzustellen und damit gezielt bekannte Proteine zu untersuchen. Für die Untersuchungen dieser Arbeit standen zwei neu generierte Knockout Mausmodelle zu Verfügung, daher soll hier kurz erklärt werden wie Knockout Mäuse hergestellt werden.

Dazu wird zunächst ein Vektor erzeugt, der die genomische Sequenz des zu deletierenden Gens enthält. In diesen Vektor werden zwei verschiedene Selektionsmarker eingefügt. Einer ersetzt das Gen zum Teil und macht es damit funktionsunfähig. Er dient als positiver Se-

lektionsmarker, der zweite dient als negativer Selektionsmarker. Mit diesem Vektor werden embryonale Stammzellen transfiziert. Durch homologe Rekombination des Vektors mit dem Genom wird das zu untersuchende Gen ersetzt, diese Zellen können mit dem positiven Selektionsmarker identifiziert werden. In den Fällen, in denen der Vektor sich zufällig in das Genom eingebaut hat, wird auch der negative Selektionsmarker exprimiert. Dadurch sterben diese Zellen ab. Dies ist in Abb. 2.8 A dargestellt.

Im nächsten Schritt werden die ES-Zellen, in denen der Vektor homolog rekombiniert hat, in das Blastozool eines frühen Embryos injiziert. Diese Blastozysten werden dann in den Uterus einer scheinchwangeren Maus implantiert. Die Nachkommen werden als Chimären bezeichnet. Ihre Gewebe bestehen zum Teil aus den Zellen der Blastozyste und zum Teil aus den Zellen, die sich von den ES-Zellen ableiten. Diese Chimären werden nun mit Wildtyp Tieren verpaart. Wenn die Keimzellen der Chimären von den ES-Zellen abstammen, sind die Nachkommen dieser Verpaarung heterozygot für das deletierte Gen. Durch weitere Zucht können dann homozygote Tiere erzeugt werden. Dieser Teil der Erzeugung eines Knockout Tieres ist in Abb. 2.8 B dargestellt.

3 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die physiologische Funktion der beiden Chloridtransportproteine ClC-2 und KCC2 in Knockout Mausmodellen zu untersuchen. Über die physiologische Funktion dieser Proteine war vor dieser Arbeit nichts bekannt. Daher wurden in unserer Arbeitsgruppe Knockout Mausmodelle für diese Chloridtransporter hergestellt.

Von beiden Chloridtransportproteinen wurde vermutet, daß sie an der Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration in Neuronen beteiligt sind. Da die synaptische Inhibition von der intraneuronalen Chloridkonzentration abhängt, erwartete man, daß die Tiere an einer neuronalen Übererregbarkeit leiden, die eventuell zu epileptischen Anfällen führt. In einem ersten Versuch war daher zu klären, ob die Tiere anders auf krampfauslösende Mittel reagieren als Kontrolltiere.

Falls die Tiere eine Übererregbarkeit zeigen, sollte mit der patch clamp Methode an akuten Gewebeschnitten die intrazelluläre Chloridkonzentration von Neuronen bestimmt werden. Mit dieser Technik ist es möglich an intakten Neuronen elektrophysiologische Untersuchungen durchzuführen. Da die Zusammensetzung des Zytosols nicht durch die Messung geändert werden durfte, wurde die sogenannte *perforated patch* Methode benutzt.

Bei der Analyse von Knockout Mäusen kann man in den wenigsten Fällen vorhersagen, in welchen Geweben ein Phänotyp zu erwarten ist und mit welchen Methoden dieser analysiert werden kann. In der ersten Analyse dieser Mäuse sollte deshalb zusätzlich das Organ mit dem Hauptphänotyp untersucht werden. Von diesem Hauptphänotyp ausgehend, sollte mit elektrophysiologischen Methoden die Funktion von ClC-2 und KCC2 analysiert werden und möglichst der Phänotyp erklärt werden. Aus den betroffenen Organen sollten Zellen isoliert werden und mit Hilfe der *patch clamp* Technik untersucht werden.

Da die Funktion eines Proteins wesentlich von seiner Lokalisation und seiner zeitlichen Expression abhängt, sollten die funktionellen Analysen durch histologische und molekularbiologische Methoden unterstützt werden.

Darüberhinaus war von ClC-2 vermutet worden, daß es in der Lungen- und Nierenentwicklung eine Rolle spielt. Es war auch in der Literatur beschrieben worden, daß ClC-2 eine Chloridleitfähigkeit in Magenepithelzellen darstellt. Diese Hypothesen sollten im Mausmodell überprüft werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien und Enzyme

Falls nicht anders angegeben, wurden sämtliche verwendeten Chemikalien von den Firmen Fluka, Life Technologies (ehemals Gibco BRL), Merck, Serva und Sigma in p.A. oder in reinst Qualität bezogen. Enzyme, Nukleinsäuren (Plasmide, Größenstandards) und Nukleosidtriphosphate wurden von den Firmen Boehringer Mannheim GmbH, Life Technologies, Invitrogen, New England Biolabs, MBI Fermentas, Pharmacia, Stratagene und Amersham bezogen. Oligonukleotide wurden bei MWG-Biotech oder Metabion synthetisiert.

Radioaktive Nukleotide wurden von den Firmen Amersham Bucheler oder DuPont bezogen.

4.1.2 Filmmaterial

Zur Abbildung von Agarosegelen wurden ein Digital-Videosystem der Firma Intas (Göttingen) verwendet. Zur Autoradiographie wurden Kodak X-OMAT AR-Röntgenfilme verwendet. Für histologische schwarz-weiß Aufnahmen wurden AGFA APX 100 oder Ilford PAN-F 50 Filme, für Farbaufnahmen wurden Kodak Elite 100 Filme verwendet.

Die schwarz-weiß Bilder wurden auf Ilford Fotopapier mit AGFA Entwickler entwickelt und zur späteren Verarbeitung mit einem UMAX 2000 Scanner digitalisiert. Farbdias wurden mit einem Nikon Scanner digitalisiert. Die Nachbearbeitung der digitalisierten Bilder geschah mit Photoshop 5.0 (Adobe) und Freehand 8.0 (Macromedia) oder Illustrator 8.0 (Adobe).

4.1.3 Puffer, Lösungen und Medien

ACSF 118mM NaCl, 1mM NaH₂PO₄, 25mM NaHCO₃, 3mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1,5 mM CaCl₂, pH 7,4 bei Begasung mit 95% CO₂ und 5% O₂

Bouin 150ml gesättigte Picrinsäure, 50ml 37% Formaldehyd, 10ml Eisessig

DNA-Ladepuffer 50% (v/v) Glycerol, 1mM EDTA, 0,1% (w/v) Xylencyanol in H₂O/DEPC

Hanks Solution	5,4 mM KCl, 0,3 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,4 mM KH ₂ PO ₄ , 4,2 mM NaHCO ₃ , 1,3 mM CaCl ₂ , 0,5 mM MgCl ₂ , 0,6 mM MgSO ₄ , 137 mM NaCl, 5,6 mM Glukose, pH 7,4
PBS	137 mM NaCl, 2,7mM KCl, 7,4mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5mM KH ₂ PO ₄
TAE	10mM Natriumazetat, 1mM Na ₂ EDTA, 40mM Tris/HCl, pH 8.0
LB-Medium	10g/l Bacto-Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 10g/l NaCl, pH 7,2
LB/Amp-Medium	LB-Medium mit 150 <i>µ</i> g/l Ampicillin
LB-Agar	LB-Medium mit 15g/l Agar
LB/Amp-Agar	LB-Agar mit 150 <i>µ</i> g/l Ampicillin
H₂O/DEPC	0,5ml Diethylpyrocarbonat in entionisiertem Wasser über Nacht bei 37°C inkubieren, anschließend autoklavieren
Karbogen	95% O ₂ / 5% CO ₂ (Messer Griesheim)

4.1.4 Bakterienstämme

Es wurden folgende Escheria coli K-12 Abkömmlinge verwendet:

XL1-Blue supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46thi, relA1, lac⁻

DH5α F⁻, φ80 dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF) U169, recA1, endA1, hsdR17 r_K⁻, m_K⁺, supE44, λ⁻, thi⁻1gyrA, relA1

4.1.5 Vektoren

pBlueskript Klonierungsvektor der Firma Stratagene mit Replikationsursprung zu Replikation in E. Coli, Ampicillinresistenz, T7- und T3-Promotoren für die cRNA-Synthese, LacZ-Gen zum Durchmustern von Transformanten nach dem Blau / Weiß-Kriterium

pCI-neo Vektor der Firma Promega zur Expression in Säugerkulturzellen. Die klonierten Gene stehen unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Ein Intron vor der MCS soll die Expression steigern. T7- und T3-Promotoren für die cRNA-Synthese. Ampicilin- und Neomyconresistenz.

pTLN Abkömmling des Vektors pSP64T (Krieg und Melton, 1984), der zur Expressionssteigerung die 5'- und 3' UTR des β-Globin-Gens aus *Xenopus laevis* enthält. Er wurde in der MCS modifiziert (Lorenz et al., 1996).

TOPO PCR2.1 Vektor der Firma Invitrogen zum direkten klonieren von PCR-Produkten.

4.2 Molekularbiologie und Biochemie

Präparation von Plasmid-DNA

Minipräparationen aus 2ml o/n-Kulturen wurden nach (Holmes und Quigley, 1981) nach (He et al., 1990) hergestellt. Größere Plasmidpräparationen (100ml, 500ml o/n-Kulturen) wurden mit Genomed-Säulen gemäß der Anweisung des Herstellers aufgereinigt. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch (Sambrook et al., 1989) bestimmt.

Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Elution von DNA-Banden aus Agarosegelen wurde das PCR-Elution Kit der Firma Boehringer verwendet.

Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte nach Standardvorschriften (Sambrook et al., 1989). Enzymmenge, Puffer und Reaktionsbedingungen wurden entsprechend der Herstellerangaben eingestellt.

Um die Selbstligation eines verdauten Vektors nach der Restriktion zu verhindern, erfolgte nach dem Restriktionsverdau eine Inkubation mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) für 30min bei 37°C. Die verdaute DNA wurde über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die Banden ausgeschnitten und aufgereinigt.

Ligation der DNA-Fragmente

DNA-Fragmente wurden mit T4-DNA-Ligase gemäß Herstellerangaben ligiert. Die Fragmente wurden in der Regel im molaren Verhältnis von 1:3 (Vektor/Fragment) eingesetzt. Die Reaktion erfolgte mit einer Inkubationsdauer von einer bis 24 Stunden bei 14°C bis 25°C.

Transformation

Die Transformation der Bakterien (XL1-Blue, DH5- α) erfolgte durch die Elektroporationsmethode mit dem Genpulser-system (Biorad). Elektrokompente Zelle wurden nach (Ausubel et al., 1991) hergestellt und bei -80°C gelagert. Die Elektroporation erfolgte bei $R = 400 \Omega$, $U = 2,5 \text{ kV}$, $C = 25 \mu\text{F}$ und einer Pulsdauer von 7,5 msec. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 1ml SOC-Medium aufgenommen, 30 min bei 37°C inkubiert und auf LB/Amp-Agarplatten ausgestrichen.

Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der DNA erfolgte nach dem Thermozyklusverfahren mit Taq-Polymerase und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Primer bzw. Terminatoren (Applied Biosy-

stems). Die Gelelektrophorese und Detektion wurde mit einem ABI377 Sequenzierer durchgeführt. Die Sequenzen wurden mit DNA-Star (Lasergene) analysiert.

Agarose Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA wurde 0,7 – 2,0% (w/v) Agarosegele verwendet. Als Laufpuffer wurde TAE eingesetzt. Bei der Herstellung der Gele wurde der Farbstoff Ethidiumbromid zugesetzt. Als Größenstandard diente die 1kB-Leiter von LifeTechnologies. Die Elektrophorese erfolgte in Flachbettkammern. Die Proben wurden mit 1/10 Volume DNA-Auftragspuffer versetzt und bei 5 bis 15V/cm aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele auf einem UV-Transilluminator bei 312nm mit einem Video-Dokumentationsystem (Intas) photographiert.

Polymerasekettenreaktion

Wenn nicht anders angegeben wurde für alle PCR-Anwendungen die thermostabile Pfu-Polymerase (Stratagene) oder die Long-Template Polymerase (Boehringer) verwendet. Beide zeichnen sich durch eine geringe Fehlerrate dank eine 3'Exonukleaseaktivität und niedriger Prozessivität aus (*Proofreading*). Die Länge betrug, wenn nicht anders angegeben 18 bis 24 Nukleotide. Alle PCR-Reaktionen wurden in Perkin Elmer oder Trio Therm (Biometra) PCR-Maschinen durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben wurde dabei folgender Ansatz verwendet:

5 μ l Puffer
 2 μ l dNTP
 2 μ l Primer 1
 2 μ l Primer 2
 100ng cDNA Template
 1 μ l Polymerase
 ad 50 μ l Wasser

Das Temperaturprogramm war standardmäßig:

Schritt	Temperatur	Zeit		
1	Denaturierung	94°C	5min	
2	Denaturierung	94°C	1min	
3	Primerbindung	55°C	30sec	} 30 mal
4	Extension	72°C	60sec/1kB	
5	Extension	72°C	5min	
6	Aufbewahrung	4°C	∞	

RT-PCR

Messenger-RNA wurde in komplementäre cDNA umgeschrieben, um diese als Matrize für PCR-Versuche verwenden zu können. Dazu wurde die Reverse Transkriptase SuperScriptII (LifeTechnologies) verwendet. Diese in E. coli aus dem pol-Gen des Moloney Maus-Leukämievirus hergestellte Transkriptase ist frei von RNaseH-Aktivität. Es wurden die Herstelleranweisungen befolgt.

Isolierung von Gesamt-RNA

Die gesamt-RNA wurde mit Trizol (LifeTechnologies) nach Herstellerangaben aus Hoden gewonnen.

Northern-Blot

Die Northern-Analysen wurden nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook et al., 1989). Alle verwendeten Lösungen, außer TRIS-Puffer, wurden mit DEPC-Wasser angesetzt, die Gefäße wurden entweder mit 0,1M NaOH behandelt oder bei 200°C im Ofen von RNA-sen befreit. Es wurde 10mg Gesamt-RNA pro Spur aufgetragen und durch Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Anschließend wurde die RNA auf eine Nitrozellulose Membran gebロットet.

Die Sonden für die Northern-Blot Analyse wurden mittels RT-PCR kloniert. Die Sonden wurden anschließend sequenziert. Für die Klonierung wurden folgende Primerpaare verwendet:

PRM1 GCC CTC TCT CGT CCA CTG AGT ATG
 TCC TGG GCA GAC CCG AAT GAG CTC
 Fragmentlänge: 285 bp

CCNA1 GTA CAG GAG GAC CTG TGG CCA GGA
 CCT GCT GAT GTG GCC AAT GAG CTT
 Fragmentlänge: 765 bp

PbP1 GTG CTG ACC AAT AGG ACA GGG TCT
 GCG ATG GAG AAC GGT AGA GCT TGC
 Fragmentlänge: 330 bp

4.3 Präparation von Zellen**4.3.1 Präparation von Leydig-Zellen**

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen an Leydig-Zellen und die Bestimmung der stimulierten Testosteronfreisetzung wurden Leydig-Zellen durch Dichtezentrifugation in einem Percoll-Gradienten isoliert (Schumacher et al., 1978)

Dazu wurde zunächst ein kontinuierlicher Percoll-Gradient gegossen. Zu Beginn wurde neuen Teile Percoll mit einem Teil zehnfach konzentrierter Earle's-Lösung gemischt. Diese Mischung wurde nun weiter mit isotoner Earle's-Lösung verdünnt und die entstehenden Verdünnungen wurden kontinuierlich vorsichtig in ein Zentrifugenröhrchen gepumpt. So entstand ein linearer Gradient von 0 – 90%.

Die Kapsel der Hoden wurde vorsichtig geöffnet und der Inhalt in Medium aufgenommen. Die Gewebefragmente wurden vorsichtig mit Hilfe einer 10ml Glaspipette homogenisiert. Anschließend wurden die Tubuli mit einem feinen Gewebe (Gardinenstoff) abfiltriert. Die übrigen Zellen wurden für 15min bei 300g abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die Zellen in neuem Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde vorsichtig auf einen Gradienten gegeben. Dabei wurden etwa 3ml auf jeden 40ml Gradienten geladen. Später wurden auch 10ml Gradienten verwendet, um die Menge an einzusetzenden Zellen zu verringern. Die Gradienten wurden für 20min bei 800g zentrifugiert, um starke Beschleunigungen zu vermeiden war dabei die Bremse abgestellt. Danach waren vier Banden in dem Gradienten zu erkennen. Die Phase mit Leydig-Zellen war etwa 20mm breit. Sie begann etwas oberhalb der Erythrozyten-Bande. Die Leydig-Zellen wurden vorsichtig mit Glasröhrchen in abgesaugt, dabei wurde die Öffnung des Glasröhrchen knapp oberhalb der entstehenden Phasengrenze geführt. Anschließend wurde die Leydig-Zellsuspension mit zwei bis drei Volumen Medium aufgefüllt und 15 min bei 300g zentrifugiert. Der Überstand enthielt 80 bis 90% reine Leydig-Zellen. Zusätzlich wurden die Leydig-Zellen nochmals mit Medium gewaschen, um letzte Reste von Percoll zu entfernen.

Die Leydig-Zellen wurden in folgendem Medium kultiviert: MEM mit 0.05% BSA, 4% FCS und 100mg/l Penicillin / Streptomycin Die gesamte Präparation fand bei Raumtemperatur statt, während des Zentrifugierens wurde nicht gekühlt.

4.3.2 Präparation von Sertoli-Zellen

Sertoli-Zellen wurden durch enzymatischen Verdau isoliert (Gorczyńska et al., 1994). Wie bei der Präparation der Leydig-Zellen wurden die Zellen dissoziiert und die Tubuli abfiltriert. Die Tubuli wurden dann in Medium aufgenommen (DMEM / HAMF12 1:1, 15mM Hepes, 1,2 g/l NaHCO₃, 20 mg/l Genatmyzin). Die Tubuli wurden in zwei Schritten verdaut. Im ersten Schritt enthielt das Medium zusätzlich 0,03% Kollagenase / Dispase und 0,003% Trypsininhibitor. Danach wurden die Tubuli mehrmals in Medium gewaschen und durch Sedimentation von anderen Zellen getrennt. Für den zweiten Verdau wurde dem Medium 0,03% Kollagenase zugegeben. Der Fortschritt des Verdaus wurde zwischendurch kontrolliert; in der Regel lag die Dauer des ersten Verdaus bei fünf bis zehn Minuten und bei 20 bei 30 Minuten für den zweiten.

4.3.3 Herstellung von akuten Rückenmarksschnitten

Für die funktionellen Untersuchungen an Motoneuronen wurden akute transversale Schnitte des Rückenmarks hergestellt. Dazu wurde 18,5 Tage alten Embryonen das Rückenmark durch eine Laminektomie entnommen. Dazu wurde von der Schädelbasis aus der Rückenmarkskanal vorsichtig mit feinen Augenscheren (Teufel) seitlich aufgetrennt und das Rückenmark entnommen (Suzue, 1984; Onimaru und Homma, 1987). Die Präparation fand in mit Karbogen begaster ACSF statt. Das Rückenmark wurde in 1% (w/v) Agarose in ACSF, die auf 37°C abgekühlt war, eingebettet. Ein etwa 7mm langes Stück wurde mit Sekundenkleber auf den Träger des Vibratoms (VT1000S, Leica) geklebt. Mit dem Vibratom wurden 300 bis 400nm dicke Schnitte hergestellt. Die Schnitte wurden in einem Becherglas das mit ACSF gefüllt war unter ständiger Begasung für mehrere Stunden bei 30°C aufbewahrt (Edwards et al., 1989).

4.3.4 Histologie der Hoden

Für immunhistologische wurden die Hoden über Nacht in Bouin fixiert, für eine bessere Fixation wurde die Kapsel des Hodens mit einer feinen Kanüle angestochen. Danach wurden die Hoden in Paraffin eingebettet und geschnitten. Für Semidünnschnitte wurden die Hoden mit 3,5% Glutaraldehyd in 0,05M NaPO₄-Puffer fixiert, in 1% OsO₄ nachfixiert und in Epon 812 eingebettet. Die Semidünnschnitte wurden mit Toluidin-Blau gefärbt.

Antikörper

Für die Lokalisation von CIC-2 wurde ein Antikörper gegen den extremen Kyrboxyterminus verwendet. Der Antikörper wurde gegen das CIC-2 Peptid HGLPREFGTPSDSDDKCQ in Kaninchen erzeugt. Das affinitätsgereinigte Serum erkennt eine Bande der erwarteten Größe in Western-Blots von transient mit CIC-2 transfizierten COS-7 Zellen; in nicht transfizierten Zellen erkennt er nur ein sehr schwaches Signal. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:50 verwendet.

Der GCNA1 Antikörper wurde von G. Enders zu Verfügung gestellt und in einer Verdünnung von 1:X eingesetzt (Enders und May, 1994).

Für die Identifizierung der Leydig-Zellen wurde ein Antikörper gegen das Zytrochrom P450 (Chemicon, AB #1244), dies wird in Hoden spezifisch von Leydig-Zellen exprimiert.

Färbung von Antikörpern

Für die Färbung der CIC-2 Antikörper wurde das ABC-Kit von Vectastain (Vector Laboratories) verwendet. Es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet.

4.4 Bestimmung der Krampfschwelle

Prichard und Mitarbeiter beschreiben eine Methode, um die Krampfschwelle vieler Tiere mit relativ geringem Aufwand zu bestimmen (Prichard et al., 1969). Dazu wurden die Tiere in eine gasdichte Kammer gesetzt und Flurothyl mit einer konstanten Rate auf ein Filterpapier getropft. Um die Tiere an die neue Umgebung zu gewöhnen wurde erst nach fünf Minuten mit dem eigentlichen Experiment begonnen. Die Zeit von Beginn der Flurothylzugabe bis zum Auftreten erster epileptiformer Aktivitäten wurde als erste Schwelle definiert, die Zeit bis anhaltende epileptische Anfälle beobachtet wurden als zweite Schwelle. Das Experiment wurde durch Öffnen der Kammer beendet; die Tiere erholten sich nach dem Versuch innerhalb weniger Minuten, danach verhielten sich die Tiere völlig normal.

Das Flurothyl wurde 1:100 mit reinem Ethanol verdünnt und mit einem Perfusor (Braun, Melsungen) mit einer Flußrate von 1,5ml / min auf ein Filterpapier getropft. Um eine gleichmäßige Verteilung des Flurothyls in der Kammer zu gewährleisten wurde die Luft mit einem kleinen Ventilator umgewälzt.

4.5 Blutabnahme für Hormonanalysen

Für die Serumanalysen wurde vier bis sechs Wochen alten Tieren unter Betäubung Blut aus der Vena cava inferior entnommen. Die Tiere wurden danach getötet. Nachdem das Blut geronnen ist, wurde es für 10 Minuten bei XXg zentrifugiert. Der Überstand wurde für die weiteren Untersuchungen in Aliquots zu 200 μ l bei -20°C eingefroren.

4.6 Elektrophysiologie

4.6.1 patch clamp

Für die patch clamp Versuche wurde ein AxoPatch 200A Verstärker (Axon, USA) verwendet. Die Daten wurden mit einem Analog-Digital Wandler (Digidata 1300, Axon) digitalisiert und mit pClamp 7.0 verarbeitet. Die analogen Daten wurden vor der Digitalisierung mit der halben Samplingfrequenz mit einem Tiefpaßfilter (FILTER) gefiltert.

patch Pipetten

Für die Messungen an Sertoli- und Leydig-Zellen wurde dünnwandiges Borsilikatglas (G150T, Clark Elektromedical) und für die Messungen an Motoneuronen dickwandiges Borsilikatglas (G150T, Clark Elektromedical) benutzt. Dazu stand ein vertikaler Puller (LM3A, List) und später ein horizontaler Puller (Seitz) zu Verfügung. Es wurde mit Pipettenwiderständen von 2 – 5 M Ω gearbeitet.

patch clamp an isolierten Leydig- und Sertoli-Zellen

Die elektrophysiologischen Untersuchungen an Sertoli- und Leydig-Zellen wurden mit der *whole cell* Methode durchgeführt (Hamill et al., 1981). Die stand ein Patchaufbau mit einem inversen Mikroskop (Nikon) zu Verfügung. Die Zellen konnten mit eine 20-fachen Vergrößerung gut identifiziert werden. Für die Manipulation der patch-Pipette wurden elektrische Mikromanipulatoren verwendet (Luigs & Neumann). Die Badlösung enthielt: 146mM CsCl, 2mM CaCl₂, 10mM Hepes, pH 7,4. Die Pipettenlösung enthielt 146 mM CsCl, 10mM Hepes, 5mM EGTA, pH 7,4. Die Messungen fanden bei Raumtemperatur statt.

patchen am akuten Gewebeschnitt

Für die direkten Messungen an Motoneuronen wurde die sogenannte *blow and seal* Technik benutzt (Stuart et al., 1993; Sakmann und Neher, 1995). Dabei wird die patch-Pipette mit einem Überdruck (30 – 50 cm H₂O) mit Hilfe der IR-DIC-Videomikroskopie (Dodt und Zieglgansberger, 1990) unter Sichtkontrolle in den Gewebeschnitt geführt. Durch den Überdruck wird die Oberfläche der Neuronen, an denen gemessen werden soll, von dem umgebenden Gewebe befreit. Dann kann die Pipette an die Membran des Neurons bewegt werden; durch Anlegen eines Unterdrucks (-3 – -10 cm H₂O) verbindet (*sealt*) die Zellmembran sich dicht mit der Öffnung der patch-Pipette.

Es wurde dabei ein aufrechtes Mikroskop (BX50WI, Olympus) mit einer zehnfachen Vergrößerung und einer 40fachen Vergrößerung benutzt. Für die optischen Kontrolle wurde eine Infrarot-Videokamera (VX44, PCO) eingesetzt. Für die Manipulation der patch-Pipette wurden elektrische Mikromanipulatoren verwendet (Luigs & Neumann).

Die Schnitte wurden ständig mit carbogen-begaster ACSF gespült. Die Motoneuronen wurde anhand ihrer Größe und ihrer Lage im Vorderhorn des Rückenmarks identifiziert; ihr Soma hatte einen Durchmesser von mehr als 20µm (Jonas et al., 1998).

Zur Aktivierung der GABA- und Glyzin-Rezeptoren wurde für 20 bis 30 Sekunden 1mM GABA oder Glyzin der Badlösung zugegeben. Der Badaustausch erfolgte innerhalb von zwei Sekunden. Unter Zugabe von Bicucullin (30mM) oder Strychnin (30mM) konnte keine Reaktion auf GABA bzw. Glyzin beobachtet werden. In der Regel wurde die Netzwerkaktivität durch Zugabe von 500nM TTX in die Badlösung blockiert. Nach etwa fünf Minuten war in diesen Fällen keine Aktionspotentiale mehr zu beobachten. Das Membranpotential wurde im current clamp Modus ($I = 0A$) gemessen. Als Maß für die intrazelluläre Chloridkonzentration wurde der Unterschied (ΔV) des Membranpotentials vor und nach Zugabe der Agonisten gebildet. Die Pipettenlösung enthielt: 140mM KCl, 2mM MgCl₂, 10mM Hepes 5mM EGTA, pH 7,4. Die Messungen fanden bei Raumtemperatur statt.

Gramicidin perforated patch

Um die intrazelluläre Chloridkonzentration nicht zu beeinflussen, wurde die *perforated-patch* Methode eingesetzt. Bei der *whole-cell* Methode verändert sich die Zusammensetzung des

Zytosols durch Austausch mit der Pipettenlösung, die wird bei der *perforated-patch* Methode verhindert. Dabei wird ein Ionophor in die Pipettenlösung gegeben. Allerdings bilden die häufig gebrauchten Ionophore, wie Amphotericin B und Nystatin, chloridpermeable Poren (Marty und Finkelstein, 1975; Horn und Marty, 1988). Im Gegensatz dazu bildet Gramacidin Poren, die ausschließlich für monovalente Kationen und kleine ungeladene Moleküle permeabel sind (Hladky und Haydon, 1972; Myers und Haydon, 1972). Damit ist es möglich patch-clamp Messungen durchzuführen, ohne die intrazelluläre Chloridkonzentration zu verändern (Kyrozis und Reichling, 1995).

Da Gramacidin sich schlecht in Wasser löst, wurde es zunächst in DMSO aufgenommen (10mg/ml) und dann in Pipettenlösung verdünnt (3 bis 5 $\mu\text{g/ml}$). Um ein Austreten der gramacidinhaltigen Lösung in das Bad zu verhindern, wurde die patch-Pipette zunächst von vorne mit normaler Pipettenlösung vorgefüllt und dann von hinten mit gramacidinhaltiger Lösung von hinten nachgefüllt. Nach Ausbildung eines *seals* sank der Zugangswiderstand innerhalb von zehn bis 30 Minuten auf etwa 50 bis 100 M Ω ab. Messungen in denen der Widerstand in dieser Zeit nicht weit genug abgesunken war, wurden verworfen.

4.6.2 Extrazelluläre Ableitungen an Nerven

Die Signale der extrazellulären Ableitungen wurden mit einem Differenzverstärker verstärkt und mit einem Analog-Digital Wandler digitalisiert. Der Differenzverstärker basiert auf einem integrierten Verstärker-IC (INA 110, BurrBrown).

Ableitung am Ischiasnerv und Präparation

Für die Messungen am Ischiasnerv wurden E18,5 Tiere durch Dekapitation getötet und ausgenommen. Der Ischiasnerv wurde vorsichtig freipräpariert; die Präparation fand in kalter mit Karbogen begaster ACSF statt. Eine ventrale Laminektomie sorgte dafür, daß das Rückenmark gut mit Sauerstoff versorgt wurde. Für die Messung und die Stimulation wurden mit 3M KCl gefüllte Mikroelektroden verwendet, die vorsichtig in den Nerv gestochen wurden. Die Elektroden waren an manuellen Mikromanipulatoren (Märzhauser) befestigt. Zur Stimulation stand ein Reizgenerator (A-M System) zu Verfügung. Die Reizdauer betrug 200ms und die Reizschwelle lag bei etwa 10V. Die Messungen fanden bei Raumtemperatur statt.

Ableitung an zervikalen Nervenwurzeln

Die Atmungsaktivität wurde an den zervikalen ventralen Nervenwurzeln eines isolierten Hirnstamm-Rückenmark Präparats vorgenommen. Das Hirnstamm-Rückenmark Präparat wurde wie beschrieben angefertigt (Suzue, 1984; Onimaru und Homma, 1987) und ständig mit Karbogen begaster ACSF gespült. Eine Nervenwurzel wurden in die Öffnung einer mit Badlösung gefüllten Glaspipette eingesaugt. Für die Manipulation der Elektrode wurde ein Mikromanipulator (Märzhauser) verwendet.

Elektrokardiogramm

Das EKG wurde bei E18,5 Tieren kurz nach der Geburt mit einem Differenzverstärker abgeleitet. Dabei wurde je eine Elektrode an den vorderen Extremitäten und die Referenzelektrode am Schwanz befestigt.

5 Ergebnisse

Die im folgenden beschriebenen Versuche zielten darauf ab, die Rolle der Kalium-Chlorid-Kotransporters KCC2 und des Chloridkanals ClC-2 im Organismus zu untersuchen. Dazu wurden in unserer Arbeitsgruppe Knockout Mausmodelle hergestellt (Bösl et al., 2000; Hübner et al., 2000). Während sich im Fall von KCC2 die vermutete Funktion in der Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration in Neuronen bestätigte, gab es dafür bei *Clcn2*^{-/-} Tieren keine Hinweise. Daher richtete sich das Interesse bei der Analyse der *Clcn2*^{-/-} Tiere auf den auf den Hauptphänotyp, die männliche Infertilität.

In einem ersten Experiment wurde untersucht, ob die *Clcn2*^{-/-} Tieren nicht doch einen neurologischen Phänotyp besitzen, der sich in einer stärkeren Krampfanfälligkeit zeigen sollte.

Kcc2^{-/-} Tiere waren nicht in der Lage zu atmen und zeigten eine ungewöhnliche, verkrampfte Haltung, was auf einen schwerwiegenden Defekt in der motorischen Kontrolle hinwies, der möglicherweise durch eine gestörte synaptische Inhibition bedingt ist. Im Gegensatz zu *Kcc2*^{-/-} Tieren zeigten *Clcn2*^{-/-} Tieren keinen direkt erkennbaren neuronalen Phänotyp. Sie fielen auch in groben Verhaltenstests nicht auf; es wurde bei diesen Tieren keine verstärkte Neigung zu epileptischen Anfällen beobachtet. Die männlichen *Clcn2*^{-/-} Tiere zeigten jedoch einen stark verkleinerten Hoden und waren infertil.

Da *Kcc2*^{-/-} Tiere einen erwartete neurologischen Phänotyp haben, der sich in der verkrampften Haltung zeigte wurden Messungen am Ischiasnerv, der die unteren Extremitäten innerviert, vorgenommen. In weiteren Experimenten wurde die intrazelluläre Chloridkonzentration in Motoneuronen bestimmt. Außerdem sollte geklärt werden, warum *Kcc2*^{-/-} Tiere nicht atmeten. In histologischen Untersuchungen sollte überprüft werden, wo KCC2 innerhalb der Neuronen exprimiert wird und ob andere Chloridtransporter an der Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration beteiligt sind.

Da die ClC-2 Tiere keinen neurologischen Phänotyp zeigten, wurde die Infertilität der *Clcn2*^{-/-} Männchen zunächst auf histologischer und molekularer Ebene untersucht. Durch funktionelle Messungen an Zellen, die für die Infertilität verantwortlich sein könnten, sollte die Funktion von ClC-2 analysiert werden.

5.1 Krampfanfälligkeit beider Knockout Mausmodelle

Von beiden untersuchten Chloridtransportern wurde vermutet, daß sie an der Regulation der intraneuronalen Chloridkonzentration beteiligt sind. Da die synaptische Inhibition von

der intraneuronalen Chloridkonzentration abhängig ist, wurde erwartet, daß die untersuchten Mausmodelle eine neuronale Übererregbarkeit zeigen. Da die *Kcc2*^{-/-} Tiere schon kurz nach der Geburt verstarben, wurden untersucht, ob die geringere Gendosis in heterozygoten Tieren zu einer Übererregbarkeit der Neuronen führt.

Prichard und Mitarbeiter beschreiben eine Methode, um die Krampfschwelle vieler Tiere mit relativ geringem Aufwand zu bestimmen (Prichard et al., 1969). Dazu wurden die Tiere in eine gasdichte Kammer gesetzt und Flurothyl mit einer konstanten Rate auf ein Filterpapier getropft, von dort verdunstet das schnell flüchtige Flurothyl. Die Zeit von Beginn der Flurothylzugabe bis zum Auftreten erster epileptiformer Aktivitäten wurde als erste Schwelle definiert, die Zeit bis anhaltende epileptische Anfälle beobachtet wurden als zweite Schwelle. Die ersten epileptiformen Aktivitäten zeigten sich in einzelnen Zuckungen des Kopfes und den vorderen Extremitäten, kurze Zeit später verloren die Tiere ihre aufrechte Haltung; damit war das Ende des Versuchs erreicht. Das Experiment wurde durch Öffnen der gasdichten Kammer beendet. Die Tiere erholten sich nach kurzer Zeit und zeigten auch später keine Auffälligkeiten.

Wenn ClC-2 wesentlich an der Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration beteiligt ist, sollte sich die in einer erhöhten Krampfanfälligkeit zeigen, da die synaptische Inhibition gestört ist. In dem Versuch wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen *Clcn2*^{-/-} Tieren und Kontrolltieren festgestellt (Abb. 5.1 A); es ist jedoch nach diesem Experiment nicht ausschließen, daß ClC-2 an einer subtilen Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration beteiligt ist. Dies wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter

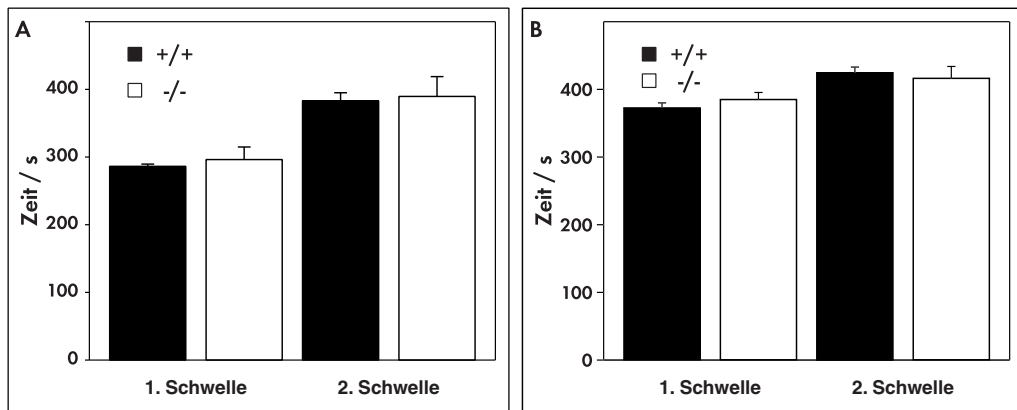


Abb. 5.1: Bestimmung der Krampfschwelle. **A**, Zwischen *Clcn2*^{-/-} Tieren (Weiße Balken) und *Clcn2*^{+/+} Tieren (Schwarze Balken) war kein signifikanter Unterschied in der Zeit bis zum Auftreten erster epileptiformer Aktivitäten (WT: 286 s ± 3 (n=5), KO: 297 s ± 19 (n=5)) und in der Zeit bis zu einem anhaltenden epileptischen Anfall (WT: 383 s ± 12 (n=5), KO: 390 s ± 29 (n=5)) zu erkennen. **B**, Zwischen *Kcc2*^{+/-} Tieren (Weiße Balken) und *Kcc2*^{+/+} Tieren (Schwarze Balken) war ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Zeit bis zum Auftreten erster epileptiformer Aktivitäten (WT: 373 s ± 8 (n=4), HET: 385 s ± 10 (n=4)) und in der Zeit bis zu einem anhaltenden epileptischen Anfall (WT: 425 s ± 8 (n=4), KO: 416 s ± 17 (n=4)) zu erkennen.

untersucht (siehe dazu auch Abschnitt 6.3.2).

Auch bei $Kcc2^{+/-}$ Tieren wurden keine signifikanten Unterschiede in der Krampfschwelle festgestellt (Abb. 5.1 B). Dies zeigt, daß die geringere Gendosis der $Kcc2^{+/-}$ Tiere nicht zu einer signifikanten Veränderung der Krampfanfälligkeit führt. Der geringere Unterschied zwischen der ersten und zweiten Krampfschwelle bei den KCC Tieren im Vergleich zu den ClC-2 Tieren könnte auf die unterschiedlichen genetischen Hintergründe der untersuchten Stämme zurückzuführen sein.

Flurothyl wurde bei der Suche nach neuen Inhalationsanästhetika entdeckt (Krantz et al., 1957). Die krampfauslösenden Eigenschaften von Flurothyl wurden klinisch als chemischer Ersatz für die Therapie mit elektrisch ausgelösten Krämpfen bei psychisch kranken Patienten verwendet. Inzwischen konnte gezeigt werden, daß Flurothyl eine antagonistische Wirkung an GABA_A-Rezeptoren besitzt (Krasowski, 2000).

5.2 Analyse des KCC2 Knockouts

5.2.1 Erscheinungsbild

Da die homozygoten Tiere ($Kcc2^{-/-}$) nicht in der Lage waren zu atmen, verstarben sie in den ersten 15 Minuten nach der Geburt. Daher wurden alle Untersuchungen an Embryonen 18,5 Tage nach der Befruchtung (E18,5) vorgenommen; dies ist kurz vor dem Zeitpunkt der natürlichen Geburt. Die Tiere wurden durch einen Kaiserschnitt geboren, $Kcc2^{+/+}$ und $Kcc2^{+/-}$ Tiere waren zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung voll lebensfähig. Im Uterus entwickelten sich die Tiere im erwarteten Mendelschen Verhältnis von einem viertel bei der Kreuzung von heterozygoten Tieren (32 $Kcc2^{-/-}$ von 127 Nachkommen). Wie eingangs schon erwähnt fiel die ungewöhnliche Haltung der $Kcc2^{-/-}$ Tiere auf, was auf einen schwerwiegenden Defekt in der motorischen Kontrolle hinwies (Abb. 5.2). Die $Kcc2^{-/-}$ Tiere bewegten sich nicht spontan und reagierten nur auf sehr starke mechanische Stimulation. Bei $Kcc2^{-/-}$ Tieren wurde keine Atmung beobachtet und der Schwimmtest der Lungen ergab, daß diese in $Kcc2^{-/-}$ Tieren nicht mit Luft gefüllt waren. Im Gegensatz zu den Lungen von Kontrolltieren sanken die der $Kcc2^{-/-}$ Tiere ab.

Weiterhin hatten alle $-/-$ Tiere einen Bauchwanddefekt (Abb. 5.2 und 5.3). Ein Defekt im Zwerchfell wurde durch eine Injektion eines Farbstoffes in den Pleuralraum ausgeschlossen. Abgesehen von der nicht entfalteten Lunge und dem Bauchwanddefekt konnten keine weiteren anatomischen oder histologischen Veränderungen festgestellt werden. Das Rückenmark und das Stammhirn waren morphologisch nicht auffällig.

Um ein Problem in der Erregungsfortleitung im Herzen als Todesursache der $Kcc2^{-/-}$ Tiere auszuschließen, wurde von einem $Kcc2^{+/+}$ und einem $Kcc2^{-/-}$ Tier Elektrokardiogramme (EKG) mit aufgezeichnet. Dabei wurden die Ableitelektroden an den vorderen Extremitäten und die Erdungselektrode am Schwanz der Tiere befestigt. Direkt nach der Geburt waren diese nicht zu unterscheiden. Etwa zehn Minuten nach der Geburt konnte in einem Kontrolltier ein regelmäßiges EKG aufgezeichnet werden, die Frequenz lag bei 200 Hz (Abb. 5.4 A). Zu

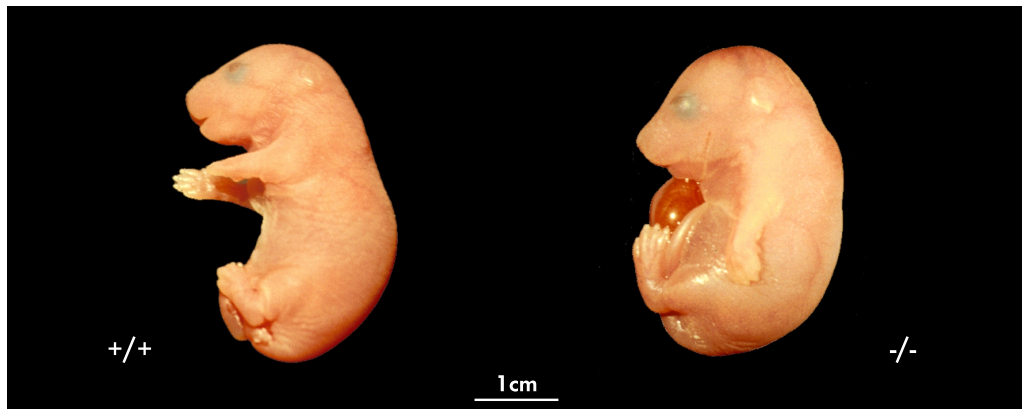


Abb. 5.2: Makroskopischer Phänotyp von $Kcc2^{-/-}$. Auffällig ist die ungewöhnliche Haltung der Extremitäten und der Bauchwanddefekt.

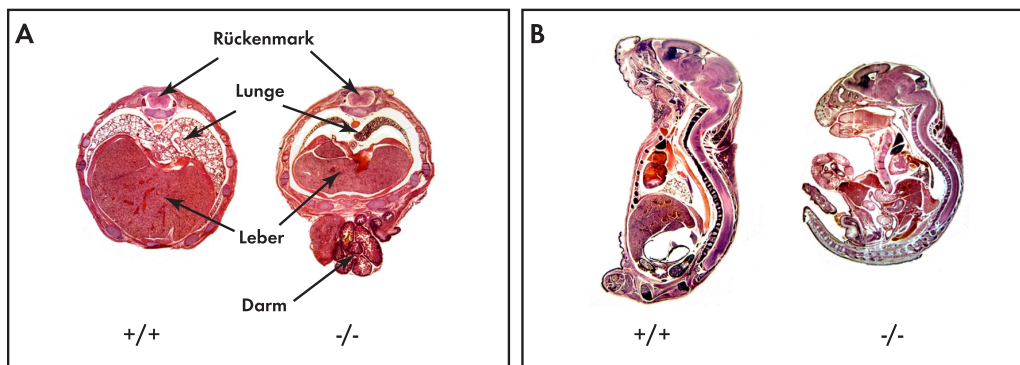


Abb. 5.3: Horizontaler (A) und medialer (B) Schnitt durch $Kcc2^{+/+}$ und $Kcc2^{-/-}$ Tiere. Die nicht entfaltete Lunge ist deutlich zu erkennen. Die Bauchdecke des $Kcc2^{-/-}$ Tieres ist nicht geschlossen. Unterschiede im Zentralnervensystem oder dem Skelettmuskel System konnten nicht gefunden werden.

diesem Zeitpunkt begann sich das EKG der $Kcc2^{-/-}$ Tiere zu verändern (Abb. 5.4 B). Im weiteren Verlauf nahm die Frequenz und Amplitude im $Kcc2^{-/-}$ ab, nach etwa 20min war nur noch ein sehr unregelmäßiger Rhythmus meßbar (Abb. 5.4 C). 45min nach der Geburt war im $Kcc2^{-/-}$ Tier kein EKG mehr ableitbar. Zum Vergleich wurde ein EKG bei einem Kontrolltier in sauerstofffreier Atmosphäre abgeleitet; der Verlauf in Frequenz und Amplitude war vergleichbar mit dem eines $Kcc2^{-/-}$ Tiers (Daten nicht gezeigt).

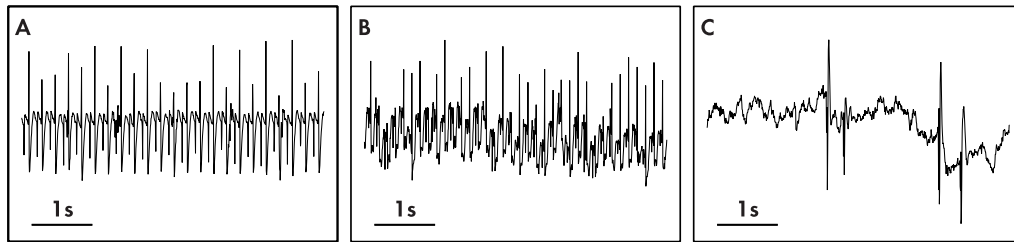


Abb. 5.4: Das EKG eines WT-Tiers zeigt zehn Minuten nach der Geburt einen regelmäßigen Rhythmus bei einer Frequenz von etwa 200 Hz (**A**). Zum gleichen Zeitpunkt beginnt sich das EKG eines $Kcc2^{-/-}$ Tiers zu verändern (**B**). Nach etwa 30 Minuten ist die Frequenz deutlich niedriger (etwa 0,5 Hz) und der Rhythmus sehr unregelmäßig (**C**).

5.2.2 Reflex des Rückenmarks

Wie oben schon erwähnt fiel bei den $Kcc2^{-/-}$ Tieren eine ungewöhnliche, verkrampfte Haltung auf. Es wird vermutet, daß KCC2 an der Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration beteiligt ist, dies könnte in $Kcc2^{-/-}$ Tieren dazu führen, daß die synaptische Inhibition gestört ist und es dadurch zu einer Übererregbarkeit der Motoneuronen kommt. Dies würde die verkrampfte Haltung der $Kcc2^{-/-}$ Tiere erklären.

Es wurde untersucht ob, an Nerven, die die Extremitäten innervieren, eine erhöhte spon-

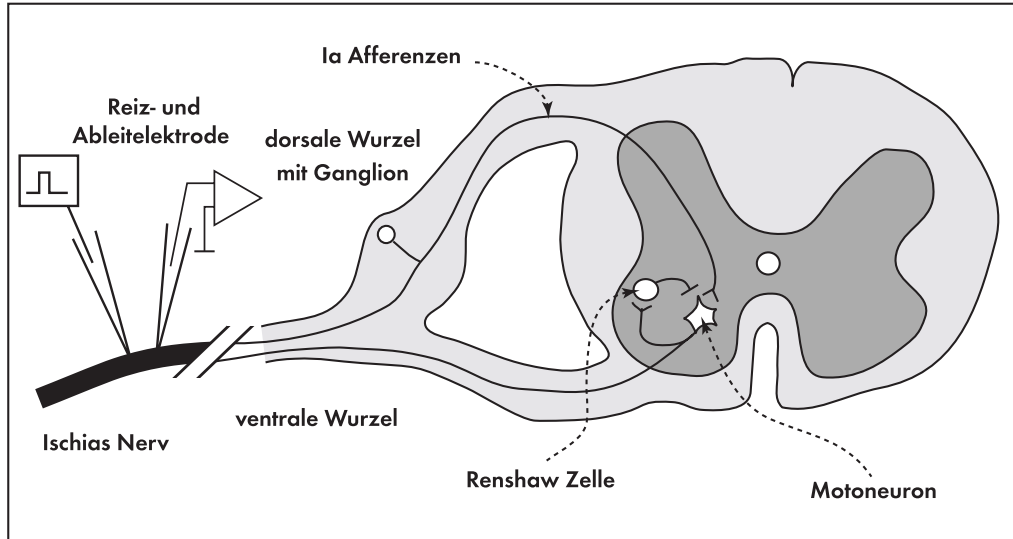


Abb. 5.5: Schematische Darstellung des Reflexbogens im Rückenmark, bestehend aus sensibler dorsaler Wurzel, Renshaw-Zelle, Motoneuron mit ventraler Wurzel. In den freipräparierten Ischiasnerv wurde eine mit 3M KCl gefüllte Reiz- und eine Ableitelektrode gestochen.

tane Aktivität zu beobachten ist. Im zweiten Schritt wurde die Antwort der Rückenmarkschaltkreise auf einen Reiz untersucht. Die Messungen wurden am Ischiasnerv vorgenommen, da der Ischiasnerv anatomisch gut definiert ist und sowohl propriozeptive Fasern, die in das Rückenmark führen, als auch Efferenzen der Motoneurone enthält, die verschiedene Muskelgruppen in den hinteren Extremitäten innervieren. In diesem System hat man die Möglichkeit, an einem Nerv gleichzeitig stimulieren und ableiten zu können. Der Reiz wird durch die Neurone des Rückenmarks verarbeitet. Dazu wurde der anatomisch gut definierte Ischiasnerv so präpariert, daß seine Verbindung zum Rückenmark nicht verletzt wurde. In den Ischiasnerv wurde dann eine mit 3M KCl gefüllte Ableitelektrode und eine Stimulationselektrode gestochen. In Abbildung 5.5 ist dies schematisch dargestellt.

In $Kcc2^{-/-}$ Tieren wurden zahlreiche gruppierte Aktivitäten und spontane Aktionspotentiale beobachtet (Abb. 5.6 A, rechte Spur). In Kontrolltieren waren dagegen nur selten

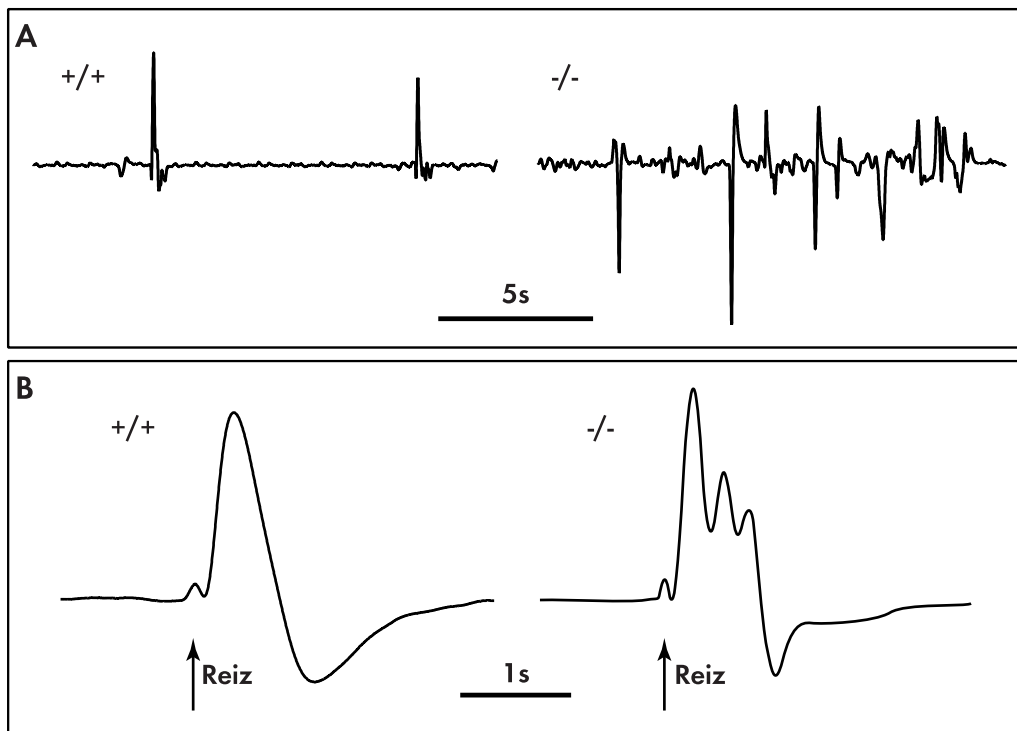


Abb. 5.6: Extrazelluläre Ableitungen am Ischiasnerv. In Kontrolltieren waren wenige Aktionspotentiale zu beobachten. **A**, In Kontrolltieren wurden spontane Aktionspotentiale beobachtet. Der Ischiasnerv der $Kcc2^{-/-}$ Tiere zeigte dagegen eine starke spontane Aktivität. **B**, Auf elektrische Stimulation des Ischiasnervs zeigte sich eine monophasische Antwort in Kontrolltieren, in $Kcc2^{-/-}$ Tieren wurde dagegen eine polyphasische Antwort beobachtet, die sich auf die fehlenden synaptische Inhibition zurückführen läßt. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt des Reizes an, seine Amplitude lag bei etwa 10V.

einzelne Aktionspotentiale zu beobachten, die gruppierten, ungeordneten Aktivitäten fehlten völlig (Abb. 5.6 A, linke Spur).

Weiterhin wurde die Antwort des Rückenmarks auf elektrische Reize des Ischiasnerven gemessen. Da der Ischiasnerv auch afferente Fasern enthielt, konnte im selben Nerv stimuliert und abgeleitet werden. Der Reiz gelangte über afferente Fasern und über das Hinterhorn ins Rückenmark. Hier wurde der Reiz über Synapsen auf die Motoneurone des Vorderhorns weitergeleitet und gelangte schließlich über die efferenten Fasern zurück in den Ischiasnerv. Dabei spielt der inhibitorische Regulationsmechanismus der Renshaw-Zellen eine wichtige Rolle. Da die Ia Fasern eine niedrige Reizschwelle haben, kann der monosynaptische Reflex, der durch GABAerge und glyzinerge Interneurone moduliert wird, untersucht werden (Schneider und Fyffe, 1992; Lloyd, 1943), in dem die Reizstärke langsam erhöht wird, bis erste Antworten registriert werden. Die Reizschwelle lag bei beiden Genotypen bei ungefähr 10 V. In fünf Kontrolltieren wurde eine monophasische Antwort auf einen Reiz von 200 ms Dauer beobachtet (Abb. 5.6 B, linke Spur). Dagegen wurden in fünf *Kcc2*^{-/-} Tieren polyphasische Antworten gemessen (Abb. 5.6 B, rechte Spur). Die polyphasischen Antworten unterschieden sich darüberhinaus von Stimulus zu Stimulus in Form und Phase. Teilweise löste ein Stimulus in *Kcc2*^{-/-} Tieren eine Salve von Aktionspotentialen aus. Die Ergebnisse waren den Messungen an der *spastic* Maus ähnlich (Biscoe und Duchon, 1986). Die *spastic* Maus besitzt eine Mutation im Glyzin-Rezeptor, dadurch verliert der inhibitorische Neurotransmitter Glyzin seine Wirkung. Das führt zu einer Übererregbarkeit der Motoneuronen, die in der *Kcc2*^{-/-} Maus durch eine erhöhte intrazelluläre Chloridkonzentration erklärt werden könnte.

5.2.3 Messungen an Motoneuronen

Durch die Messungen am Ischiasnerven ist gezeigt worden, daß *Kcc2*^{-/-} Tieren die Motoneuronen übererregbar sind. In Messungen an Motoneuronen sollte im folgenden Experiment untersucht werden, ob die intraneuronale Chloridkonzentration in *Kcc2*^{-/-} Tieren erhöht ist. Dies würde die fehlende synaptische Inhibition der Motoneurone erklären.

Um das Chloridpotential zu bestimmen, wurde zu erst das Ruhemembranpotential (V_{Ruhe}) gemessen. Durch Gabe von GABA oder Glyzin in die Badlösung wurden die entsprechenden Rezeptoren aktiviert. Dadurch bekommt die Membran eine hohe Chloridleitfähigkeit und das Membranpotential entspricht annähernd dem Chloridgleichgewichtspotential ($V_{\text{E}_{\text{Cl}^-}}$). Die Differenz zwischen diese Potentialen ist damit ein Maß für die intrazelluläre Chloridkonzentration. Um den Einfluß durch andere Ionen auszuschließen wurden Natriumkanäle mit Tetrodotoxin, Kalziumkanäle mit Lantan und Kaliumkanäle mit Caesium blockiert.

$$\Delta V = V_{\text{Ruhe}} - V_{\text{E}_{\text{Cl}^-}} \quad (5.1)$$

Während der Entwicklung verändert sich die intrazelluläre Chloridkonzentration. Anfangs ist das elektrochemische Potential so hoch, daß es bei einer Aktivierung von GABA- oder Glyzin-Rezeptoren zu einer Depolarisation der Zellmembran kommt, da Chloridionen das Zellinnere verlassen. In der weiteren Entwicklung sinkt das elektrochemische Potential von

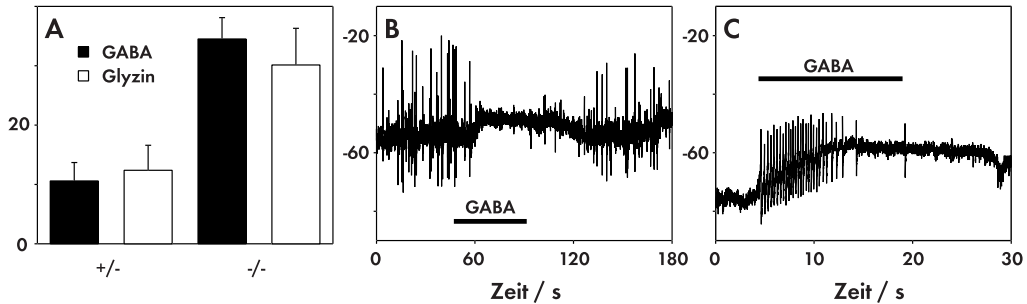


Abb. 5.7: Elektrophysiologische Untersuchungen an Motoneuronen. Das Membranpotential wurde im Null-Strom Modus mit Hilfe der perforated Patch Methode gemessen. **A**, Die Depolarisation in Gegenwart von GABA oder Glyzin war in $Kcc2^{-/-}$ Tieren signifikant größer. **B**, In TTX-freien Messungen inhibierte GABA Aktionspotentiale in Kontrolltieren. **C**, Die starke Depolarisation löste in $Kcc2^{-/-}$ Tieren Aktionspotentiale aus.

Chlorid unter das Ruhemembranpotential. Bei einer Aktivierung von GABA- oder Glyzin-Rezeptoren gelangt Chlorid dann in die Zelle und die Membran wird hyperpolarisiert (siehe Abschnitt 2.4). Es gab Hinweise, daß KCC2 an der Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration während der Entwicklung beteiligt ist (Rivera et al., 1999). KCC2 transportiert normalerweise Chlorid aus der Zelle und kann so die intrazelluläre Chloridkonzentration der Neurone während der Entwicklung senken.

Um die synaptischen Verbindungen der Motoneurone nicht zu verletzen wurden $350\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte des Rückenmarks angefertigt. Mit Hilfe der Infrarot-Videomikroskopie wurde unter Sichtkontrolle die patch-Pipette mit einem Überdruck in den Gewebeschnitt geführt. Durch den Überdruck werden die Neuronen vom umgebenden Gewebe befreit, danach kann die Pipette auf die Membran des Neurons geführt werden (Stuart et al., 1993). Durch einen leichten Unterdruck, der an die Pipette gelegt wird, verbindet sich die Zellmembran elektrisch dicht mit der Pipette.

Mit der patch-clamp Technik ist es möglich, das Membranpotential von kleinen Zellen zu messen, allerdings diffundiert die Pipettenlösung bei der sogenannten *whole-cell* Methode in die Zelle. Dadurch wird die Ionenzusammensetzung in der Zelle geändert. Da die intrazelluläre Chloridkonzentration bestimmt werden sollte, mußte verhindert werden, daß das Zytoplasma durch die Pipettenlösung dialysiert wird. Dies erreicht man mit der sogenannten *perforated-patch* Methode, bei der ein Ionophor in die Pipettenlösung gegeben wird. Allerdings bilden häufig gebrauchte Ionophore wie Amphotericin B und Nystatin chloridpermeable Poren (Marty und Finkelstein, 1975; Horn und Marty, 1988). Im Gegensatz dazu bildet Gramacidin Poren, die ausschließlich für monovalente Kationen und kleine ungeladene Moleküle permeabel sind (Hladky und Haydon, 1972; Myers und Haydon, 1972). Damit ist es möglich patch-clamp Messungen durchzuführen, ohne die intrazelluläre Chloridkonzentration zu verändern (Kyrozis und Reichling, 1995).

Mit dieser Methode wurde die Reaktion von GABA und Glyzin auf Motoneurone des Rückenmarks bei E18,5 Tieren gemessen. Dabei wurden zunächst durch Zugabe von 500nM Tetrodotoxin (TTX) die Natriumkanäle blockiert, um eine Depolarisation aufgrund eines Natriumeinstroms zu verhindern. Dann wurden für 30 Sekunden mit 100 μ M GABA oder Glyzin in der Badlösung die entsprechenden Rezeptoren aktiviert.

In $Kcc2^{-/-}$ Tieren depolarisierten die Motoneurone in Gegenwart von GABA ($\Delta V = 35,5$ mV \pm 3,6; n = 11) und Glyzin ($\Delta V = 30,1$ mV \pm 6,2; n = 5). Kontrolltiere reagierten signifikant schwächer auf GABA ($\Delta V = 10,6$ mV \pm 3,1; n = 11) und Glyzin ($\Delta V = 12,4$ mV \pm 3,6; n = 5) (Abb. 5.7 A). In einigen Fällen war in Kontrolltieren das elektrochemische Chloridpotential unterhalb des Ruhemembranpotentials, so daß die Motoneurone hyperpolarisierten. In Gegenwart des GABA-Rezeptorblockers Bicucullin (100 μ M) konnte keine Depolarisation der Neurone beobachtet werden, das gleiche galt für den Glyzin-Rezeptorblocker Strychnin. In Messungen, bei denen kein TTX in die Badlösung gegeben wurde, konnte GABA in Motoneuronen von Kontrolltieren Aktionspotentiale inhibieren (Abb. 5.7 B). In Neuronen von $Kcc2^{-/-}$ Tieren konnte GABA durch die starke Depolarisation Aktionspotentiale auslösen (Abb. 5.7 B). Dies zeigte, daß in Kontrolltieren GABA eine inhibitorische Wirkung hatte. Durch das

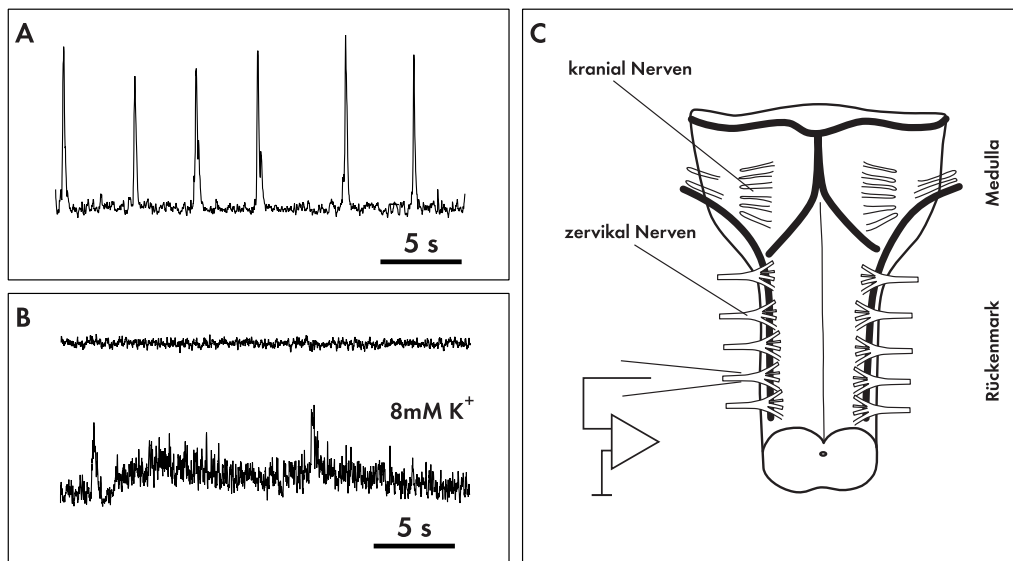


Abb. 5.8: Extrazelluläre Ableitung an den ventralen zervikalen Nervenwurzeln. **A**, In Kontrolltieren konnte ein regelmäßiger Rhythmus abgeleitet werden. **B**, $Kcc2^{-/-}$ Tiere zeigten jedoch unter normalen Bedingungen keine rhythmische Aktivität (obere Spur). Unter einer erhöhten Kaliumkonzentration von 8mM konnte eine verlangsamte Aktivität gemessen werden (untere Spur). **C**, ventrale Ansicht Darstellung eines Hirnstamm-Rückenmarkpräparats mit zervikalen Nervenwurzeln. Zum Ableiten der Aktivität wurde eine Nervenwurzel in eine mit Badlösung gefüllte Glaselektrode eingesaugt.

Öffnen der Chloridkanäle kommt es zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit der Membran, so daß exzitatorische Ströme kurzgeschlossen werden. Dadurch wird eine weitere Depolarisation der Membran verhindert.

5.2.4 Funktionelle Untersuchung der Atmung

Die Atmung wird durch das im Stammhirn liegende Atemzentrum gesteuert. Die für die Atmung wichtigen Muskeln werden unter anderem durch die Zervikalnerven versorgt. Um festzustellen warum die *Kcc2*^{-/-} Tiere nicht atmeten, wurde die extrazelluläre Aktivität von den zervikalen ventralen Nervenwurzeln abgeleitet, die die Axone der rhythmisch aktiven Motoneurone enthalten (Suzue, 1984; Onimaru und Homma, 1987). Dazu wurde der Hirnstamm und das Rückenmark aus E18,5 Tieren präpariert und ständig mit künstlicher Rückenmarksflüssigkeit (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) überspült, die mit Karbogen (95% O₂ / 5% CO₂) begast war. Die Nervenwurzeln wurden in eine Glaselektrode eingesaugt und die elektrischen Signale

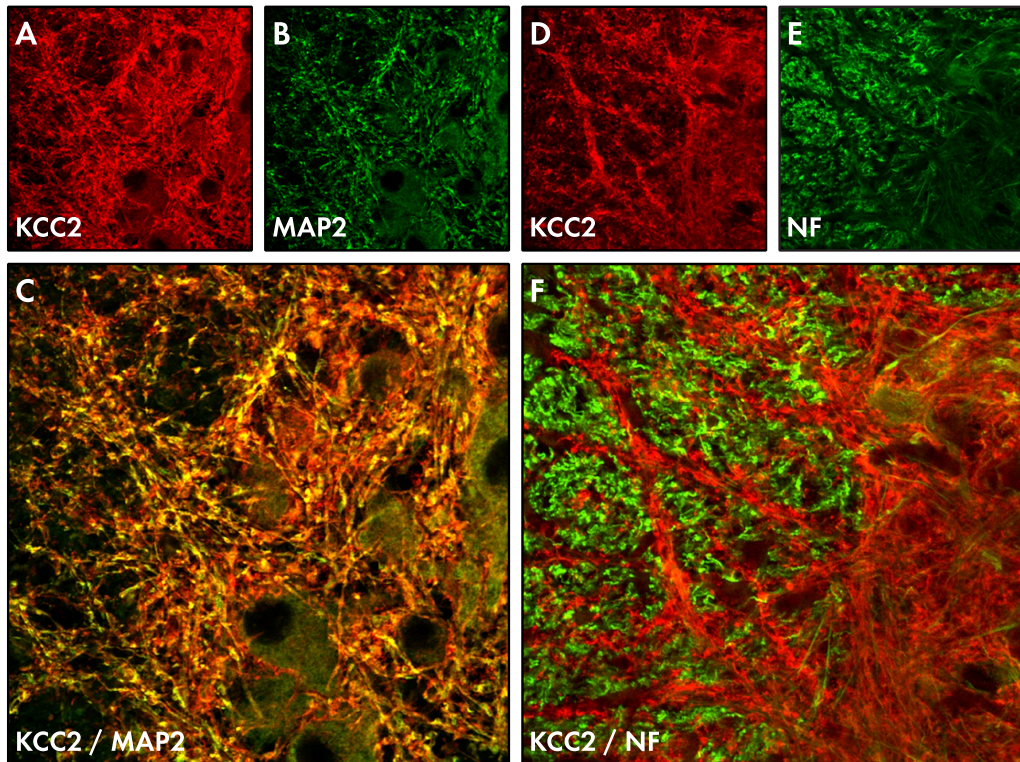


Abb. 5.9: Expression des KCC2 Proteins im Rückenmark von E18,5 Tieren. Die Bilder zeigen Motoneurone im ventralen Horn des Rückenmarks, die in ein Netzwerk von Axonen und Dendriten eingebettet sind. Die Immunfluoreszenz zeigte, daß KCC2 (rot) mit dem dendritischen Marker MAP2 (grün) (A bis C), aber nicht mit dem axonalen Marker NF (grün) (D bis F) kolokalisiert.

mit einem Differenzverstärker verstärkt, das ist in (Abb. 5.8 C) schematisch dargestellt. In Kontrolltieren ($n = 5$) (Abb. 5.8 A) konnte ein regelmäßiger Rhythmus abgeleitet werden, *Kcc2*^{-/-} Tiere ($n = 4$) zeigten jedoch unter normalen Bedingungen keine rhythmische Aktivität (Abb. 5.8 B, obere Spur). Durch Erhöhung der Kaliumkonzentration in der Badlösung von 3mM auf 8mM konnte ein unregelmäßiger und deutlich langsamerer Rhythmus beobachtet werden. Dies zeigt, daß das Hirnstamm-Rückenmarkspräparat vital war und die Messungen nicht an einem toten Präparat durchgeführt wurden.

5.2.5 Lokalisation von *KCC2* in Neuronen

Die Funktion eines Proteins hängt wesentlich von seiner Lokalisation ab, daher wurde zusätzlich zu den funktionellen Messungen in immunhistochemischen Färbungen die Lokalisation von *KCC2* untersucht. In Doppelimmunfluoreszenzen wurde untersucht, ob *KCC2* in Dendriten oder Axonen exprimiert wird. Dabei diente ein Antikörper gegen das Myelin assoziierte Protein 2 (MAP2) als dendritischer Marker und ein Antikörper gegen Neurofilament als axonaler Marker. MAP2 und *KCC2* zeigten eine gute Übereinstimmung (Abb. 5.9 A bis C), während in Doppelfärbungen mit NF keine Überlagerung festgestellt werden konnte (Abb. 5.9 D bis F). Die dendritische Lokalisation von *KCC2* paßt gut mit seiner Funktion zusammen.

Die dendritische Lokalisation wurde in der Elektronenmikroskopie bestätigt. *KCC2* wurde dabei mit einem mit Goldpartikeln gekoppelter Sekundärantikörper detektiert. Es waren nur Signale in der Membran eines Dendriten zu erkennen, in Axonen konnte keine Expression von *KCC2* festgestellt werden (Abb. 5.10 A). In einer höheren Auflösung war erkennbar, daß *KCC2* in der Nähe inhibitorischer Synapsen, die sich durch ovale Vesikel von exzitatorischen Synapsen unterscheiden, lokalisiert war (Abb. 5.10 B).

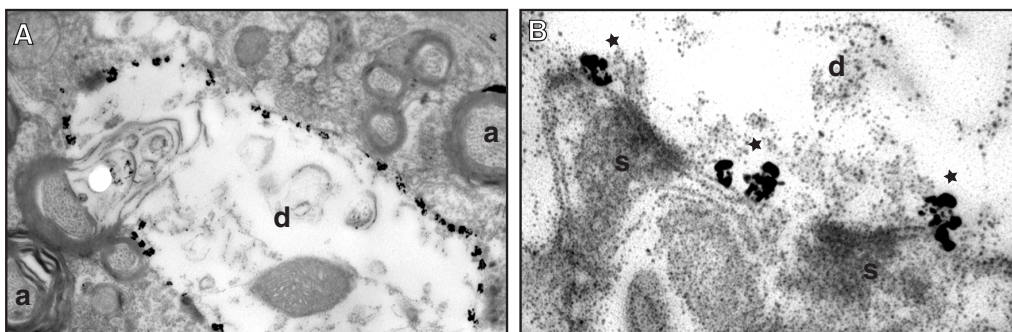


Abb. 5.10: Lokalisation von *KCC2*. **A**, mit einem goldmarkierten Zweitantikörper konnte *KCC2* in der Membran eines Dendriten (d) nachgewiesen werden. In Axonen (a) ist kein Signal zu erkennen. **B**, In einer höheren Auflösung wurde *KCC2* (Sternchen) in der Nähe inhibitorischer Synapsen (s) nachgewiesen. (Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Hübner und Dr. Schweizer, ZMNH, Hamburg angefertigt.)

5.2.6 Expression von Chloridtransportern im Rückenmark

Um ein genaueres Bild über die Expression von KCC2 und seine Rolle in der Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration zu gewinnen, wurde die Expression von anderen Chloridtransportern im Rückenmark an den embryonalen Entwicklungstagen E12,5 und E18,5 mittels in situ Hybridisierung verglichen (Abb. 5.11). KCC1 besitzt eine *Housekeeping*-Funktion innerhalb der KCC Transporterfamilie, da er ubiquitär exprimiert wird (Gillen et al., 1996). Aus Northern-Analysen ist bekannt, daß KCC3 in wenigen Geweben exprimiert wird; er kommt auch im ZNS vor (Mount et al., 1999). Da NKCC2 (Haas und Forbush, 1998) und KCC4 (Mount et al., 1999) nicht besonders stark im ZNS exprimiert werden, wurden sie nicht weiter untersucht. Zusätzlich wurde CLC-2 mit in den Vergleich eingeschlossen, da vermutet wird, daß die intrazelluläre Chloridkonzentration durch CLC-2 beeinflussen werden kann (Staley et al., 1996).

KCC2 war am embryonalen Entwicklungstag 12,5 (E12,5) sehr stark im ventralen Horn des Rückenmarks exprimiert; dort befinden sich die Motoneurone (Wentworth, 1984). KCC2 Transkripte konnten nicht in den Spinalganglien nachgewiesen werden (Abb. 5.11 A). CLC-2, KCC1 und KCC3 Transkripte wurden diffus im Rückenmark und in den Spinalganglien nachgewiesen (Abb. 5.11 B, C und E). Transkripte von NKCC1 wurden nur in wenigen Zellen des Rückenmarks und der Spinalganglien nachgewiesen (Abb. 5.11 D). Zum Zeitpunkt der Geburt (E18,5) waren KCC2 Transkripte im gesamten Rückenmark nachzuweisen (Abb. 5.11 F). Im Gegensatz dazu hatten die Signale der anderen Transporter im Vergleich zu E12,5 abgenommen (Abb. 5.11 G bis J).

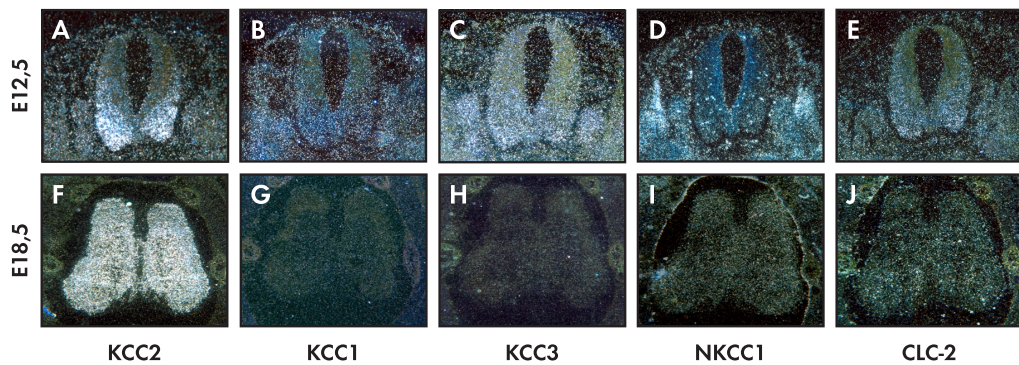


Abb. 5.11: Expression von KCC2, KCC1, KCC3, NKCC1 und CLC-2 im Rückenmark. Dunkelfeld-Aufnahmen von E12,5 (A bis E) und E18,5 (F bis J) Rückenmark-Serienschnitten. Die Signale erschienen in Weiß. KCC2 war an E12,5 stark im ventralen Horn exprimiert (A). KCC1 (B), KCC3 (C) und CLC-2 waren diffus an E12,5 im ganzen Rückenmark exprimiert. An E18,5 (F bis J) war die Expression von KCC2 im ganzen Rückenmark sehr hoch. NKCC1 war in einzelnen Neuronen zu erkennen (I) (Die in situ Hybridisierung wurde von Dr. C. Hübner und Dr. I. Hermans-Borgmeyer, ZMNH durchgeführt.)

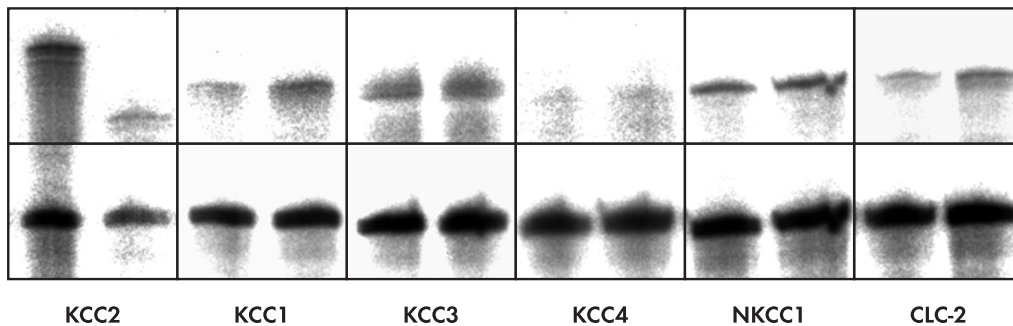


Abb. 5.12: Quantifizierung der Transkriptmengen im RNase Protection Assay: Vergleich zwischen Wildtyp (jeweils links) und *Kcc2*^{-/-} Tieren (jeweils rechts) von KCC1, KCC2, KCC3, KCC4, NKCC1 und CLC-2. Die obere Reihe zeigt die Banden der Transporter, die untere Reihe die Bande der Aktinkontrolle. Im *Kcc2*^{-/-} wurde ein kürzeres Fragment gefunden, da das fünfte Exon fehlte. Die Transkriptmengen von KCC3, KCC4, NKCC1 und CLC-2 war in Wildtyp und *Kcc2*^{-/-} Tieren unverändert. Die Expression von KCC1 war in *Kcc2*^{-/-} um etwa 50% erhöht. (Der RPA wurde in Zusammenarbeit mit Dr. C. Hübner und Dr. I. Hermans-Borgmeyer, ZMNH durchgeführt.)

Um festzustellen, ob einer der untersuchten Chloridtransporter durch das Ausschalten von KCC2 beeinflusst wird, wurde in einem RNase Protection Assay (RPA) die Transkriptmengen quantifiziert (Abb. 5.12). Dazu wurde RNA aus dem Rückenmark von E18,5 *Kcc2*^{-/-} Tieren präpariert und je 20 µg mit entsprechenden Sonden hybridisiert und anschließend mit RNase behandelt. Die Bereiche der RNA, die durch mit den Sonden hybridisiert haben, sind vor der RNase geschützt. Zur Quantifizierung wurden die RNA-Proben zusätzlich mit einer Aktin Sonde hybridisiert. Um die Transkriptmengen miteinander zu vergleichen wurden die Intensitäten der einzelnen Banden auf die der korrespondierenden Aktin Bande (Abb. 5.12 untere Reihe) normiert. In *Kcc2*^{-/-} Tieren war die Transkriptmenge von KCC1 um etwa 50% erhöht. Die Transkriptmengen der anderen untersuchten Chloridtransporter war in den *Kcc2*^{-/-} Tieren im Vergleich zu *Kcc2*^{+/+} Tieren unverändert.

5.3 Analyse des *ClC-2* Knockouts

Da bisher über die physiologische Funktion von *ClC-2* nichts bekannt war, wurde in unsere Arbeitsgruppe ein Knockout Mausmodell hergestellt. Wie oben schon erwähnt, wird vermutet, daß *ClC-2* ebenfalls an der Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration in Neuronen beteiligt ist (Staley et al., 1996; Smith et al., 1995). Die *Clcn2*^{-/-} Tiere zeigten jedoch keinen direkt erkennbaren neuronalen Phänotyp, ihre Krampfanfälligkeit war auch nicht verändert (siehe Abschnitt 5.1). Allerdings sind die männlichen *Clcn2*^{-/-} Tiere infertil. Außerdem sind die *ClC-2* Tiere aufgrund einer progressiven Photorezeptordegeneration blind. In der Literatur werden verschiedene Funktionen für *ClC-2* vorgeschlagen, die zunächst überprüft wurden. In

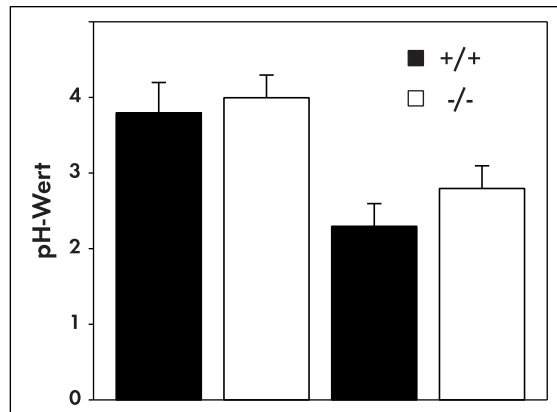


Abb. 5.13: A, Behandlung mit Histamin erniedrigte den pH-Wert von $\text{pH } 3,8 \pm 0,4$ auf $\text{pH } 2,8 \pm 0,3$ in WT Mäusen ($n = 5$) und von $\text{pH } 4,0 \pm 0,3$ auf $\text{pH } 2,3 \pm 0,3$ ($n = 5$) in $\text{Clcn2}^{-/-}$ Mäusen.

der ersten Analyse wurde die Infertilität der $\text{Clcn2}^{-/-}$ Männchen genauer untersucht. Der Retinaphänotyp wird zur Zeit von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe analysiert.

5.3.1 Überprüfung von vermuteten Funktion von ClC-2

Obwohl für ClC-2 eine wichtige Rolle in der Lungenentwicklung (Murray et al., 1995) und der Niere (Huber et al., 1998) vermutet wird, konnten keine histologischen Veränderungen in diesen Geweben nachgewiesen werden.

Das Magenepithel sezerniert HCl, indem die $\text{H}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ intrazelluläre Protonen gegen Kaliumionen austauscht. Dies führt zu einer Senkung des extrazellulären pH-Werts. Das Kalium verläßt die Zelle wieder durch einen Kaliumkanal, so daß in der Summe ein Transport in das Magenlumen von positiven Ladungen entsteht. Dieser Strom wird durch einen Chloridstrom kompensiert. Tatsächlich konnte in mehreren Arbeiten Kalium- und Chloridkanäle in den Zellen des Magenepithels nachgewiesen werden (Kajita et al., 1995). Malinowska und Mitarbeiter vermuten, daß ClC-2 diese Chloridleitfähigkeit darstellt (Malinowska et al., 1995).

Daher wurde untersucht, ob in $\text{Clcn2}^{-/-}$ Tieren die Magensäuresekretion verändert ist. Durch Histamin kann die Produktion von Magensäure stimuliert werden. Den Tieren wurde subkutan Histamin ($2\mu\text{g}$ pro g Körpergewicht) oder PBS gespritzt, nach 15 Minuten der Magen entnommen und der pH-Wert des Mageninhalts bestimmt (Schultheis et al., 1998).

Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Ansäuerung zwischen $\text{Clcn2}^{-/-}$ und $\text{Clcn2}^{+/+}$ Tieren festgestellt (Abb. 5.13).

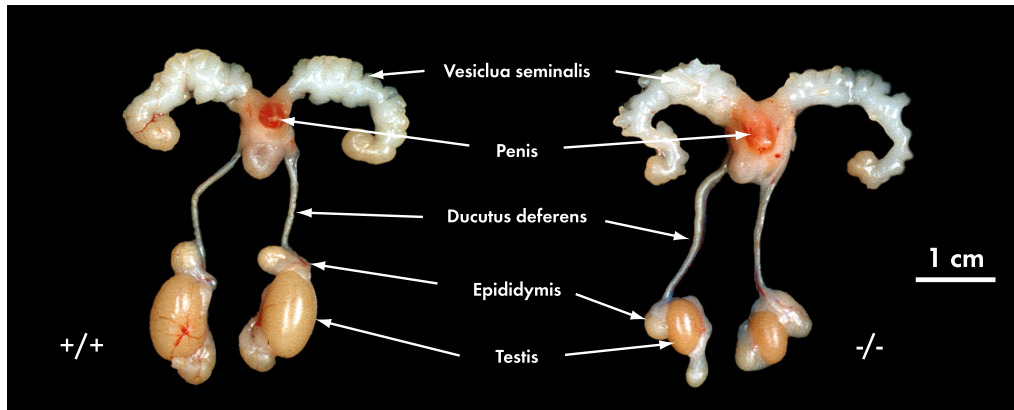


Abb. 5.14: Die Geschlechtsorgane des *Clcn2*^{-/-} geben den ersten Hinweis auf die Infertilität. Links ist das normal entwickelte Geschlechtsorgan eines adulten WT Männchens dargestellt, rechts das eines gleichaltrigen *Clcn2*^{-/-} Männchens. Der Hoden des *Clcn2*^{-/-} Tiers ist ungefähr 50 - 70 % kleiner als der eines WT Tiers. Die Nebenhoden und die Samenblasen sind dagegen in ihrer Größe normal entwickelt. Auch der Samenleiter zeigt keine sichtbare Veränderung.

5.3.2 Männliche Infertilität

Obwohl *Clcn2*^{-/-} Männchen ein normales Kopulationsverhalten besaßen und einen Vaginalpfropf erzeugten, waren sie nicht in der Lage, Nachkommen zu zeugen. Heterozygote (*Clcn2*^{+/-}) Männchen und homozygote (*Clcn2*^{-/-}) Weibchen waren dagegen fruchtbar.

Zunächst wurde die Anatomie der Geschlechtsorgane adulter Männchen untersucht. Dabei fiel auf, daß die Hoden von *Clcn2*^{-/-} Männchen deutlich kleiner waren als die von *Clcn2*^{+/+} und *Clcn2*^{+/-} Männchen. Die Größe war etwa auf die Hälfte bis ein Drittel reduziert (Abb. 5.14). Die Größe des Nebenhodens und der Samenblase waren unverändert. Die Entwicklung des Hodens veränderte sich bei *Clcn2*^{-/-} Männchen etwa drei Wochen nach der Geburt. Dieser Zeitpunkt entspricht dem Beginn der Pubertät bei Mäusen.

Die endgültige Reifung der Spermien findet im Nebenhoden (Epididymis) statt. Im Gegensatz zu *Clcn2*^{+/+} und *Clcn2*^{+/-} Männchen enthielt der Nebenhoden von *Clcn2*^{-/-} Männchen keine reifen Spermien. Damit war die männliche Infertilität der *Clcn2*^{-/-} Tiere zu erklären. Die Geschlechtsorgane der Weibchen waren nicht auffällig; da die Weibchen fertil waren, wurden sie in diesem Zusammenhang nicht weiter untersucht.

5.3.3 Degeneration des Hodens bei *Clcn2*^{-/-} Männchen

Durch die makroskopische anatomische Analyse kam besonders der Hoden selbst als Ursache für die Infertilität der *Clcn2*^{-/-} Männchen in Frage. Daher wurde eine genaue histologische

Untersuchung dieses Gewebes vorgenommen. Es wurde die Entwicklung von *Clcn2*^{+/+} Tieren (Abb. 5.15 A bis E) und *Clcn2*^{-/-} Mäusen (Abb. 5.15 F bis J) im Alter von einer, zwei, drei, vier und zehn Wochen verglichen.

Die wichtigsten Zellen des Hodens sind Sertoli-, Leydig- und Keimzellen. Der Hoden enthält viele Samenkanäle (Tubuli seminiferi), in denen die Spermatogenese stattfindet. Die Sertoli-Zellen kleiden die Tubuli seminiferi aus. Sie bilden eine zusammenhängende Schicht und bauen die Blut-Hodenschranke auf, die von *tight junctions* gebildet wird. Dadurch entsteht ein basales und ein adluminales Kompartiment. In lokal erweiterten Interzellularräumen fassen Sertoli-Zellen die verschiedenen, langsam zum Lumen der Samenkanälchen vorrückenden Keimzellen zwischen sich. Dabei finden sich die Spermatogonien und frühe Stadien der Spermatozyten I im basalen Kompartiment. Die übrigen Formen im adluminalen Kompartiment. Die Sertoli-Zellen versorgen die eingelagerten Keimzellen mit Nährstoffen, außerdem sezernieren sie eine Flüssigkeit, mit der die Spermatozoen aus den Tubuli seminiferi in den Nebenhoden gespült werden. Zwischen den Tubuli befinden sich die Leydig-Zellen. Sie produzieren Andosterone, besonders Testosteron. Die Anatomie der Tubuli seminiferi und der Verlauf der Keimzellreifung ist in der Diskussion eingehend beschrieben (siehe Abschnitt 6.4.2.1).

Eine Woche nach der Geburt war kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen zu erkennen (Abb. 5.15 A und F). In beiden Fällen waren Tubuli zu erkennen, die noch kein Lumen gebildet hatten. Das Keimepithel hatte sich noch nicht entwickelt. Die Tubuli enthielten viele Spermatogonien. Nur eine Woche später begann sich das Keimepithel zu entwickeln. Die Tubuli der +/+ Tiere enthielten zwischen den Sertoli-Zellen basal Spermatogonien und adluminal einige Spermatozyten I. Die Tubuli hatten ein kleines Lumen (Abb. 5.15 B). Im Gegensatz dazu begann in *Clcn2*^{-/-} Tieren die Degeneration der Keimzellen. Das sich entwickelnde Keimepithel war disorganisiert. Der Tubulus wies zentral kleine Hohlräume auf (Abb. 5.15 G). Zu diesem Zeitpunkt waren in *Clcn2*^{-/-} Tieren noch Spermatogonien und Spermatozyten I vorhanden. Im Alter von drei Wochen hatten sich diese Lumina in +/+ Tieren vergrößert, das Keimepithel hatte sich weiterentwickelt und die Spermatogonien begannen sich zu teilen. Neben Sertoli-Zellen waren zahlreiche Spermatozyten I vorhanden (Abb. 5.15 C). Im Tubulus der drei Wochen alten *Clcn2*^{-/-} Maus dominierten Sertoli-Zellen. Die Spermatozyten I ballten sich zu sogenannten Riesenzellen zusammen (Abb. 5.15 H, Pfeil). Im basalen Bereich des Keimepithels fiel auf, daß auch die Spermatogonien von der Degeneration betroffen waren (Abb. 5.15 H). Es hatte sich kein Lumen gebildet. In der vierten Woche nach der Geburt hatte der Durchmesser der Tubuli in +/+ und +/- Tieren auf etwa $\approx 170\mu\text{m}$ zugenommen; es waren Spermatogonien, Spermatozyten und unreife, rundkernige Spermatisden vorhanden (Abb. 5.15 D). Im Gegensatz zu den *Clcn2*^{-/-} Tieren war das Lumen gut ausgebildet. Die Tubuli der -/- Tiere waren deutlich kleiner ($\approx 110\mu\text{m}$ Durchmesser). Sie waren hauptsächlich durch Sertoli-Zellen ausgefüllt (Abb. 5.15 I). Die Fortsätze der Sertoli-Zellen hatten begonnen sich parallel anzuordnen. Es waren nur noch vereinzelte Spermatogonien vorhanden und die Tubuli enthielten nur noch wenige Riesenzellen degenerierender Spermatozyten I (Abb. 5.15 I, Pfeil). Zehn Wochen nach der Geburt hatte sich in den +/+ Tieren ein normales Keimepithel

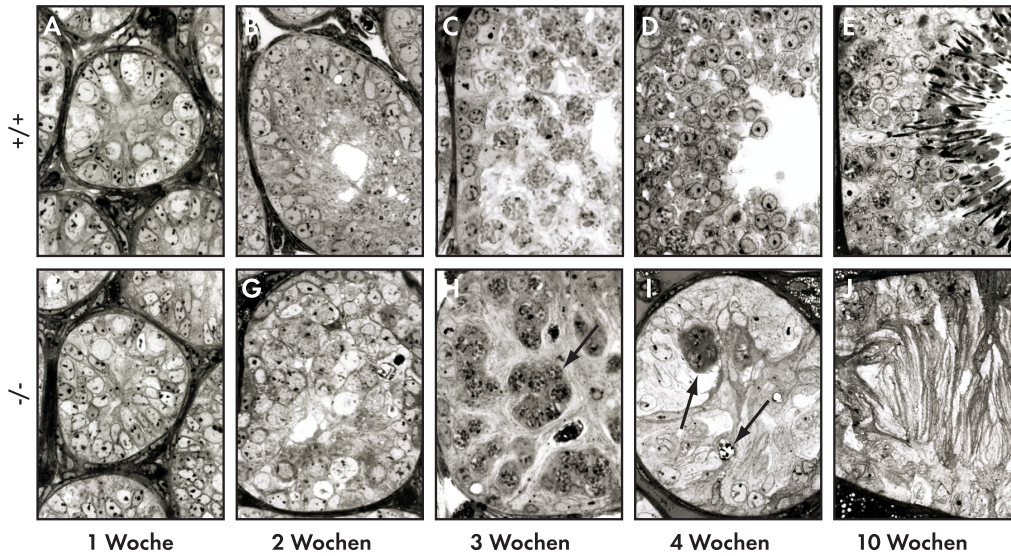


Abb. 5.15: Histologische Analyse der postnatalen Hodenentwicklung. Hoden-Schnitte von WT (A bis E) und *Clcn2*^{-/-} Tieren (F bis J) im Alter von einer, zwei, drei, vier und zehn Wochen. Die normale Entwicklung hin zur völlig ausgereiften Spermatogenese ist bei *Clcn2*^{-/-} Tieren gestört. Zwei Wochen nach der Geburt war das Keimepithel in *Clcn2*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT Tieren verändert (G), es entwickelte sich kein Lumen. Ansammlungen von degenerierten Spermatozyten (Pfeil) waren bei *Clcn2*^{-/-} Tieren im Alter von drei und vier Wochen zu sehen (H und I). In der weiteren Entwicklung verschwanden die Spermatozyten und auch die Spermato gonien. Zehn Wochen nach der Geburt waren die Tubuli vollständig mit morphologisch stark veränderten Sertoli-Zellen ausgefüllt (J). (Diese Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Prof. A. Holstein, Anatomisches Institut, Universität Hamburg erhoben.)

gebildet. Es waren Keimzellen in allen Reifestadien vorhanden (Abb. 5.15 E). Die Spermien waren gut zu erkennen. Das Keimepithel der *Clcn2*^{-/-} Tiere war dagegen völlig degeneriert und der Durchmesser der Tubuli seminiferi stark verkleinert. Die Tubuli waren ausschließlich mit morphologisch veränderten Sertoli-Zellen ausgefüllt, deren apikale Fortsätze sich parallel aneinander gelagert hatten. Es waren keine Keimzellen mehr vorhanden (Abb. 5.15 J).

Zusammenfassend ergab die histologische Analyse, daß *Clcn2*^{-/-} Tiere eine Degeneration der Keimzellen aufwies, die in der zweiten Woche nach der Geburt begann. Die Keimzellen der *Clcn2*^{-/-} Tiere erreichten nur das Stadium der Spermatozyten I. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Spermatozyten I noch synaptonemale Komplexe bildeten. Danach ballten sie sich zu Riesenzellen zusammen und starben ab.

5.3.4 Untergang der Keimzellen und Leydig-Zell-Hyperplasie

Um die Entwicklung der Keimzellen weiter zu verfolgen, wurde ein Antikörper gegen das keimzellspezifische nukleäre Antigen (Germ cell specific nuclear antigen, GCNA1) (Enders und May, 1994) verwendet. Es wird in Spermatogonien und frühen Spermatozyten exprimiert. Die Expression nimmt in reiferen Keimzellen ab und ist in Spermatischen nicht nachzuweisen. In zwei Wochen alten *Clcn2*^{-/-} Tieren war sowohl die Anzahl als auch die Verteilung von Keimzellen vergleichbar mit *Clcn2*^{+/-} Tieren (Abb. 5.16 A und F). Die Keimzellen waren in einem breiten Band am Rand der Tubuli zu finden. Im Alter von drei Wochen war die Anzahl an GCNA1-positiven Zellen im Vergleich zu *Clcn2*^{+/-} Tieren deutlich reduziert. In einigen Tubuli waren kaum noch Keimzellen vorhanden. In WT Tieren sind die GCNA1-positiven Keimzellen ringförmig am Rand der Tubuli angeordnet, wobei im Tubulusinneren keine GCNA1-positiven Zellen zu finden waren (Abb. 5.16 B und G). Diese Entwicklung setzte sich weiter fort. In vier Wochen alten Tieren konnten nur noch vereinzelte GCNA1-

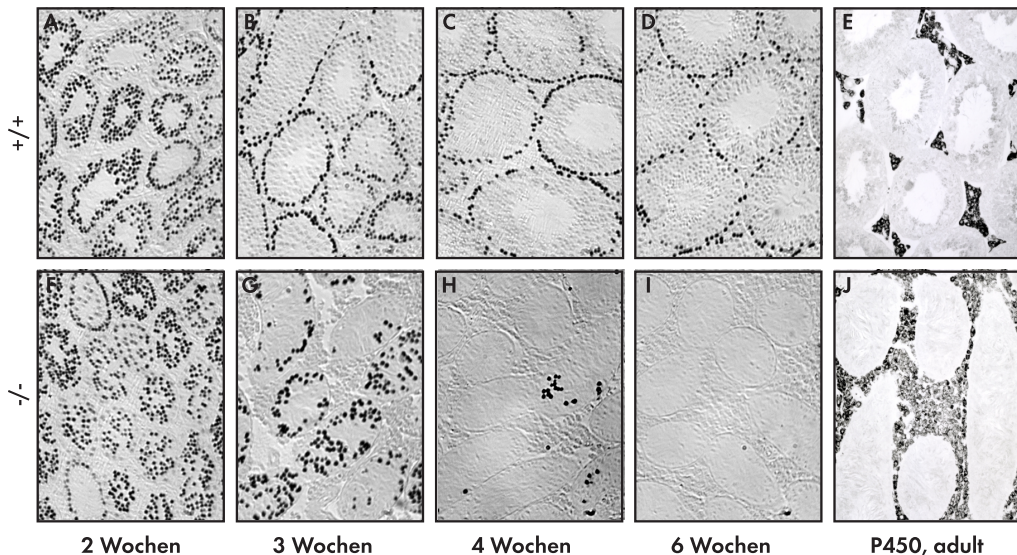


Abb. 5.16: Die Entwicklung der Keimzelledegeneration wurden mit dem GCNA1 Antikörper verfolgt. In +/- Tieren war die Entwicklung des Keimepithels gut zu erkennen (A bis D). Die GCNA1-positiven Zellen ordneten sich während der Hodenentwicklung ringförmig am Rand der Tubuli an. Während bei zwei Wochen alten Tieren fast kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen zu erkennen war (A und F), war in den folgenden Wochen eine fortschreitende Degeneration der Keimzellen in -/- Tieren (F bis I) zu beobachten. Im Alter von sechs Wochen waren diese nicht mehr nachzuweisen (I). Neben der Degeneration der Keimzellen war eine Leydig-Zellen Hyperplasie in *Clcn2*^{-/-} Tieren zu beobachten. Die Leydig-Zellen wurden mit einem Antikörper gegen Zytochrom P450 gefärbt. In den Hoden der +/- Tiere waren nur kleine Bereiche zwischen den Tubuli mit Leydig-Zellen gefüllt (E). In -/- Tieren dagegen waren größere Bereiche von Leydig-Zellen vorhanden (J).

positive Zellen gefunden werden (Abb. 5.16 H), während in +/- Tieren GCNA1 positive Zellen am Rand aller Tubuli vorhanden waren (Abb. 5.16 C). Im Alter von sechs Wochen war die Entwicklung des Hodens in +/- Tieren abgeschlossen; man konnte Keimzellen in frühen Reifestadien in allen Tubuli finden (Abb. 5.16 D). Dagegen waren in den Tubuli der *Clcn2*^{-/-} Tiere keine GCNA1-positiven Zellen mehr nachzuweisen (Abb. 5.16 H). Neben den beschriebenen Veränderungen in den Tubuli seminiferi von *Clcn2*^{-/-} Männchen wiesen diese noch eine Leydig-Zell-Hyperplasie auf. Unter einer Hyperplasie versteht man die Vermehrung einer spezifischen Zellart. Mit einem Antikörper gegen Zytochrom P450 wurden die Leydig-Zellen spezifisch gefärbt (Abb. 5.16 E und J). In *Clcn2*^{-/-} Tieren waren deutlich mehr Leydig-Zellen zwischen den Tubuli zu erkennen. Dieses Phänomen tritt häufig bei Störungen in der Hodenentwicklung auf. Es war schwierig zu entscheiden, ob es sich um eine relative oder absolute Hyperplasie handelte, da auf der einen Seite die Tubuli aufgrund des fehlenden Lumens weniger Raum einnahmen und auf der anderen Seite das Volumen des gesamten Hodens deutlich verringert war.

5.3.5 Expression von Genen während der Spermatogenese

Die histologischen Untersuchungen legten die Vermutung nahe, daß in *Clcn2*^{-/-} Tieren die Keimzellen nicht das Stadium der Spermatozyten II erreichen. Um den Endpunkt der Keimzellentwicklung in *Clcn2*^{-/-} Tieren genauer beurteilen zu können, wurde die Expression verschiedener während der Spermatogenese exprimierter Gene durch eine Northern-Analyse untersucht. Dazu wurden Sonden für Protamin 1, das keimzellspezifischen Zyklin *Ccna1* und Proacrosin-Bindeprotein durch RT-PCR kloniert. Um den Zeitverlauf der Expression untersuchen zu können wurde von zwei, drei, vier und sechs Wochen alten *Clcn2*^{+/-} und *Clcn2*^{-/-} Tieren gesamt RNA aus Hoden isoliert.

Die cRNA für Protamin 1 wird in postmeiotischen runden Spermatiden transkribiert, wobei die Proteinexpression erst später stattfindet (Kleene et al., 1984). Die ersten *Prm1* Transkripte konnten drei Wochen nach der Geburt in +/- Tieren nachgewiesen werden. Mit der weiteren Keimzellreifung nahm die Menge an Transkripten weiter zu. In *Clcn2*^{-/-} Tieren konnte zu keinem Zeitpunkt Transkripte für *Prm1* nachgewiesen werden (Abb. 5.17). Das keimzellspezifische Zyklin (*Ccna1*) wird in pachytänen Spermatozyten exprimiert. Seine Expression ist in Mäusen auf die Keimzellen beschränkt (Sweeney et al., 1996). Es ist für den Übergang in die erste mitotische Teilung notwendig. Knockout Mäuse für *Ccna1* (*Ccna1*^{-/-}) sind infertil, da die Keimzellreifung vor der ersten mitotischen Teilung endet. Weibliche *Ccna1*^{-/-} Tiere sind normal fruchtbar. (Liu et al., 1998). *Ccna1* Transkripte wurde ab der dritten Woche nach der Geburt in *Clcn2*^{+/-} Tieren nachgewiesen, konnte in *Clcn2*^{-/-} Tieren jedoch zu keinem Zeitpunkt die Expression von *Ccna1*^{-/-} nachgewiesen werden (Abb. 5.17). Das Proacrosin-Bindeprotein (*Pbp*) wird wie *Ccna1* in pachytänen Spermatozyten gebildet (Nantel et al., 1996); auch hier konnten keine Transkripte in *Clcn2*^{-/-} Tieren nachgewiesen werden (Abb. 5.17).

Diese Ergebnisse aus der Northern-Analyse waren konsistent mit den histologischen Daten. In *Clcn2*^{-/-} Tieren erreichten die Keimzellen nur das Stadium der Spermatozyten I.

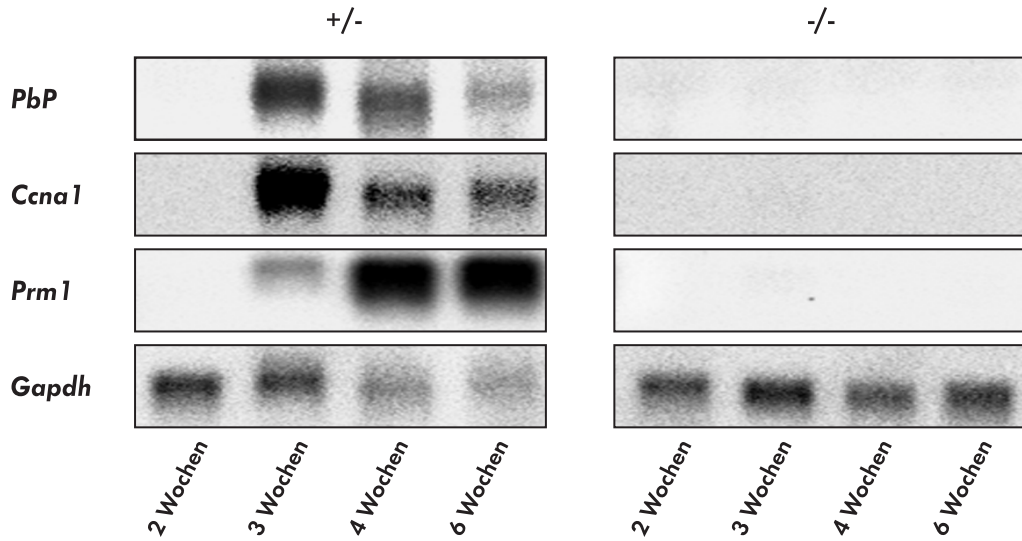


Abb. 5.17: Expression von Keimzellmarkern in $Clcn2^{+/-}$ und $Clcn2^{-/-}$ Tieren während der Entwicklung. Es wurde im Northern Blot ($\approx 10\mu\text{g}$ RNA pro Spur) die Expression von Proacrosin Binde Protein (*PbP*), ein Keimzell spezifisches Zyklin (*Ccna1*) und Protamin 1 (*Prm1*) zu den Zeitpunkten zwei, drei, vier und sechs Wochen nach Geburt untersucht. Die Ladekontrolle *GAPDH* zeigt, daß in den Spuren von vier und sechs Wochen alten $Clcn2^{+/-}$ Tieren etwas weniger RNA geladen wurde, das erklärt die etwas schwächeren Banden in diesen Spuren. Keiner dieser Marker wurde in der Hoden-RNA von $Clcn2^{-/-}$ Tieren gefunden.

Zusätzlich konnte in der Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden, daß sie synaptonemale Komplexe bildeten.

5.3.6 Elektrophysiologie an Sertoli- und Leydig-Zellen

Prinzipiell kommen drei Zelltypen als Ursache für die Infertilität in Frage. Die Keimzellen selbst können geschädigt sein und daher absterben, die Sertoli-Zellen, die die Keimzellen versorgen, können in ihrer Funktion beeinträchtigt sein. Es ist auch denkbar, daß die Testosteron produzierenden Leydig-Zellen nicht in der Lage sind, ihre Funktion aufrechtzuerhalten.

Durch die histologischen Untersuchungen kommen besonders die Sertoli-Zellen als Ursache für die Infertilität in Betracht. Um die Funktion von ClC-2 im Hoden zu verstehen, war es wichtig herauszufinden, ob ClC-2 in Sertoli- und Leydig-Zellen funktionell exprimiert wird. In Sertoli-Zellen könnte ClC-2 am transepithelialen Transport beteiligt sein. Von Noulin und Mitarbeitern wird ein hyperpolarisationsaktivierter Chloridstrom in Leydig-Zellen beschrieben, der an der Regulation der Testosteronsekretion beteiligt sein soll (Noulin und Joffre, 1993; Noulin et al., 1996) (siehe auch Abschnitt 6.4.2.3).

Mit der patch clamp Methode wurde untersucht, ob Leydig- und Sertoli-Zellen eine hyperpolarisationsaktivierte Chloridleitfähigkeit besitzen. Durch den Vergleich mit Zellen aus

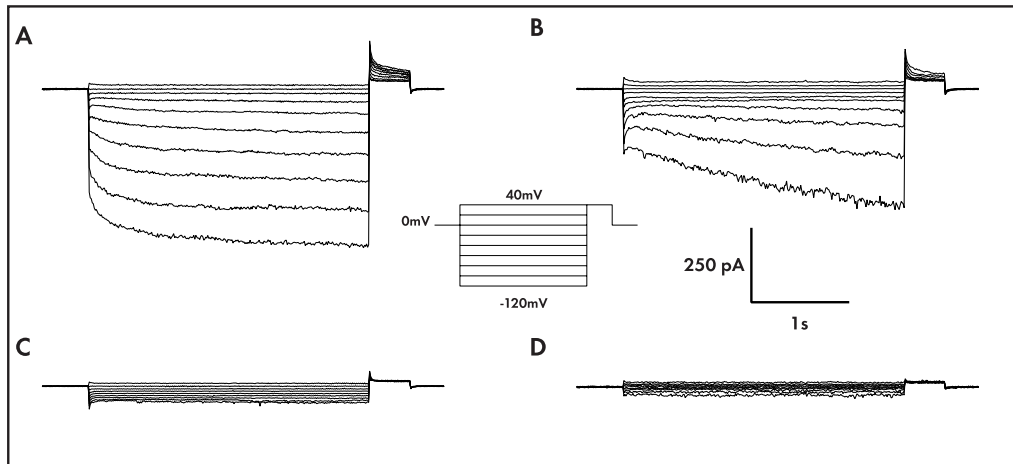


Abb. 5.18: Einwärtsgerichtete Chloridströme in Leydig und Sertoli-Zellen werden durch *ClC-2* vermittelt. In Leydig-Zellen von *Clcn2*^{+/+} Tieren war ein hyperpolarisationsaktivierter Chloridstrom zu messen (**A**), das gleiche galt für Sertoli-Zellen (**B**). Dieser fehlte sowohl in Leydig-Zellen (**C**), als auch in Sertoli-Zellen (**D**) von *Clcn2*^{-/-} Tieren. Das Inset in der Mitte zeigt das verwendete Pulsprotokoll.

Clcn2^{-/-} Tieren, konnte überprüft werden, ob eine solche Leitfähigkeit auf *ClC-2* zurückzuführen ist.

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden Leydig- und Sertoli-Zellen von *Clcn2*^{-/-} Tieren und *Clcn2*^{+/+} Tieren isoliert. Dazu wurde die Hodenkapsel geöffnet und die Zellen vorsichtig durch Einsaugen in eine Pipette dissoziiert. Die Tubuli wurden in einem feinen Netz von den anderen Zellen getrennt. Diese Zellsuspension wurde dann auf einen kontinuierlichen Percoll-Gradienten geladen, und nach 30 Minuten Zentrifugation hatten sich die Leydig-Zellen in einer Bande oberhalb der Erythrozyten gesammelt. Danach konnten die Leydig-Zellen für zwei bis drei Tage bei 37°C in Kultur gehalten werden (Schumacher et al., 1978). Die Sertoli-Zellen wurden durch Verdau der Tubuli isoliert. Dazu wurden die gefilterten Tubuli für 30 Minuten bei 32°C in einem Medium mit 0,03% Kollagenase / Dispase geschüttelt. Durch vorsichtige Zentrifugation wurden die Sertoli-Zellen aufgereinigt (Gorzynska et al., 1994) und konnten danach zwei bis drei Tage bei 32°C in Kultur gehalten werden.

In patch-clamp Messungen wurden sowohl in Leydig- als auch in Sertoli-Zellen von *Clcn2*^{+/+} und *Clcn2*^{+/-} Tieren ein hyperpolarisationsaktivierter Strom beobachtet (n = 15) (Abb. 5.18 A und C). Bad- und Pipettenlösung enthielten gleiche Chloridkonzentrationen. Um Kationenströme zu blockieren, enthielt die Pipette Cäsium. Die Zellmembran wurde für 2,5 Sekunden auf Spannungen von +40mV bis -120mV geklemmt, nach jedem Puls folgte ein Testpuls von 0,5 Sekunden und +40mV. Zwischen den Pulsen wurde die Zellmembran auf einem Haltepotential von 0mV geklemmt (siehe Abb. 5.18). Dies entspricht dem Standard-

protokoll für ClC-2. Die Kinetik der gemessenen Ströme stimmte mit der in heterologen Expressionssystemen gemessenen Kinetik überein (siehe Abb. 2.2). Charakteristisch für einen ClC-2 Strom ist die langsame Aktivierung bei Membranpotentialen negativer als -40mV. Die unterschiedliche Kinetik zu Beginn der Pulse beobachtet man auch bei transfizierten Zellen. Die gemessenen Ströme hatten eine Ionenselektivität von $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$ (Daten nicht gezeigt). Diese Ionenselektivität unterscheidet ClC-2 von anderen hyperpolarisationsaktivierten Strömen. In Abschnitt 2.2.1.3 sind die elektrophysiologischen Eigenschaften von ClC-2 ausführlich dargestellt. Da weder in Leydig- noch in Sertoli-Zellen von *Clcn2*^{-/-} Tieren ein hyperpolarisationsaktivierter Chloridstrom gemessen wurde, sind die in Kontrolltieren gemessenen Ströme eindeutig auf ClC-2 zurückzuführen.

5.3.7 Hormone

Wie schon erwähnt wird von Noulin und Mitarbeitern ein hyperpolarisationsaktivierter Chloridstrom in Leydig-Zellen beschrieben, der an der Regulation der Testosteronsekretion beteiligt sein soll (Noulin und Joffre, 1993; Noulin et al., 1996). In Leydig-Zellen konnte ClC-2 funktionell nachgewiesen werden.

Für die Degeneration der Keimzellen kam auch eine hormonelle Dysfunktion als Ursache in Frage, daher wurde die Hormonproduktion der Tiere untersucht. Für die Keimzellreifung ist das von den Leydig-Zellen gebildete Testosteron besonders wichtig. Da Testosteron von den Leydig-Zellen aus Progesteron gebildet wird, wurden beide Hormone untersucht. Als nicht androgenes Steroidhormon wurde zusätzlich Corticosteron untersucht. Es wird in der Nebenniere gebildet. Von der Hypophyse werden die für die Fortpflanzung wichtigen Hormone LH (luteinisierendes Hormon) und FSH (follikelstimulierendes Hormon) gebildet. LH regt die Produktion von Testosteron an. FSH hat bei männlichen Tieren wahrscheinlich keine Wirkung. Um die Hormonwerte im Serum zu untersuchen, wurde zehn Männchen und Weibchen jeden Genotyps Blut entnommen. Die Tiere waren zwischen vier und fünf Wochen alt. Um eine tagesabhängige Schwankung der Hormone auszuschließen, wurde das Blut immer zwischen 10:00 Uhr und 11:00 Uhr abgenommen. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 5.1 dargestellt. Als Fehler ist der Standardfehler angegeben. Die Serumwerte der Hormone zeigen eine große Schwankung, daher ergab die weitere statistische Analyse keine signifikanten Unterschiede (t-Test: $P > 10\%$) der Hormone zwischen den einzelnen Genotypen, auch wenn die Mittelwerte sich unterscheiden.

Aus der Literatur war bekannt, daß die durch das LH induzierte Testosteronsekretion von Leydig-Zellen unter anderem durch Chloridkanal Inhibitoren beeinflusst wird (Choi und Cooke, 1990). Es wurde spekuliert, daß ein hyperpolarisationsaktivierter Chloridstrom in Leydig-Zellen eine wichtige Rolle in der Signalübertragung, die zur Testosteron Sekretion führt, spielt (Noulin und Joffre, 1993). Dies ist in der Diskussion ausführlich dargestellt (Abschnitt 6.4.2.3). Durch elektrophysiologische Messungen konnte gezeigt werden, daß es in Leydig-Zellen einen hyperpolarisationsaktivierten Chloridstrom gibt, der durch ClC-2 vermittelt wird (Abb. 5.18). Neben den Serumwerten (Tab. 5.1) wurde auch die Testosteron Sekretion an iso-

Hormon	+/+	+/-	-/-
Testosteron bei Männchen	6,9 ± 2,3	6,1 ± 1,8	3,5 ± 1,0
Progesteron bei Männchen	4,8 ± 1,2	1,7 ± 0,5	2,9 ± 0,7
Corticosteron bei Männchen	213 ± 36	126 ± 34	326 ± 60
LH	66,5 ± 7,7 (9)	63,7 ± 5,1 (14)	82,1 ± 6,3 (19)
FSH	1,1 ± 0,5 (9)	1,4 ± 0,3 (14)	0,8 ± 0,2 (19)
Testosteron bei Weibchen	< 0,1	0,1 ± 0,4	0,1 ± 0,3
Corticosteron bei Weibchen	149 ± 38	212 ± 22	271 ± 62

Tabelle 5.1: Hormonwerte von drei bis vier Wochen alten Tieren. Testosteron, Progesteron und Corticosteron wurde bei je 10 Tieren bestimmt. Alle Werte zeigten keine signifikanten Unterschiede. Testosteron war bei Weibchen an der Nachweisgrenze. Alle Werte sind in ng/ml angegeben. Die Hormone wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Mukhopadyay, Institut für Hormonforschung, Hamburg gemessen.

lierten Leydig-Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen mit Choriogonadotropin (Human Chorionic Gonadotropin, HCG) oder 8-bromo-cAMP stimuliert und der Testosteron Gehalt im Überstand mittels eines Radio-Immuno Assays bestimmt. Auch hier war kein Unterschied zwischen *Clcn2*^{-/-} und *Clcn2*^{+/+} Tieren festzustellen.

5.3.8 Lokalisation von CIC-2 im Hoden

Um die Funktion von CIC-2 im Hoden genauer eingrenzen zu können, wurde die Lokalisation von CIC-2 mit einem Antikörper untersucht. Dazu wurden Hoden fixiert, in Paraffin eingebettet und 10µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen CIC-2 inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte mit einem Biotin gekoppelten Sekundärantikörper gegen inkubiert. Dann wird ein Avidin-Enzymkomplex hinzugegeben. Im letzten Schritt wird dieser Komplex mit einem Substrat für das Enzym sichtbar gemacht (Hsu et al., 1983).

In Hoden von zwei Wochen alten Wildtyp Tieren wurde CIC-2 in allen Tubuli nachgewiesen (Abb. 5.19 A). Da in gleichaltrigen *Clcn2*^{-/-} Tieren kein Signal zu erkennen war, ist die Färbung spezifisch für CIC-2 (Abb. 5.19 B).

In adulten Wildtyp Tieren konnte CIC-2 nur innerhalb der Tubuli in äußeren Bereich des Keimepithels gefunden werden (Abb. 5.19 C). In einer stärkeren Vergrößerung war zu erkennen, daß CIC-2 in der Plasmamembran von Sertoli-Zellen exprimiert wird. Er konnte an den Kontaktstellen von Sertoli-Zellen und Spermatozyten lokalisiert werden (Abb. 5.19 D). Das Protein wurde sowohl basal als auch adluminal der Blut-Hodenschranke nachgewiesen. Durch die Lokalisation in der Nähe der Keimzellen, ist anzunehmen, daß CIC-2 in der Ionenhomöostase der schmalen Spalten zwischen Sertoli-Zellen und Keimzellen eine Rolle spielt. Ebenso könnte CIC-2 an der Sezernierung der Tubulusflüssigkeit beteiligt sein. Im Gegensatz zu den elektrophysiologischen Daten konnte in Leydig-Zellen kein Signal nachge-

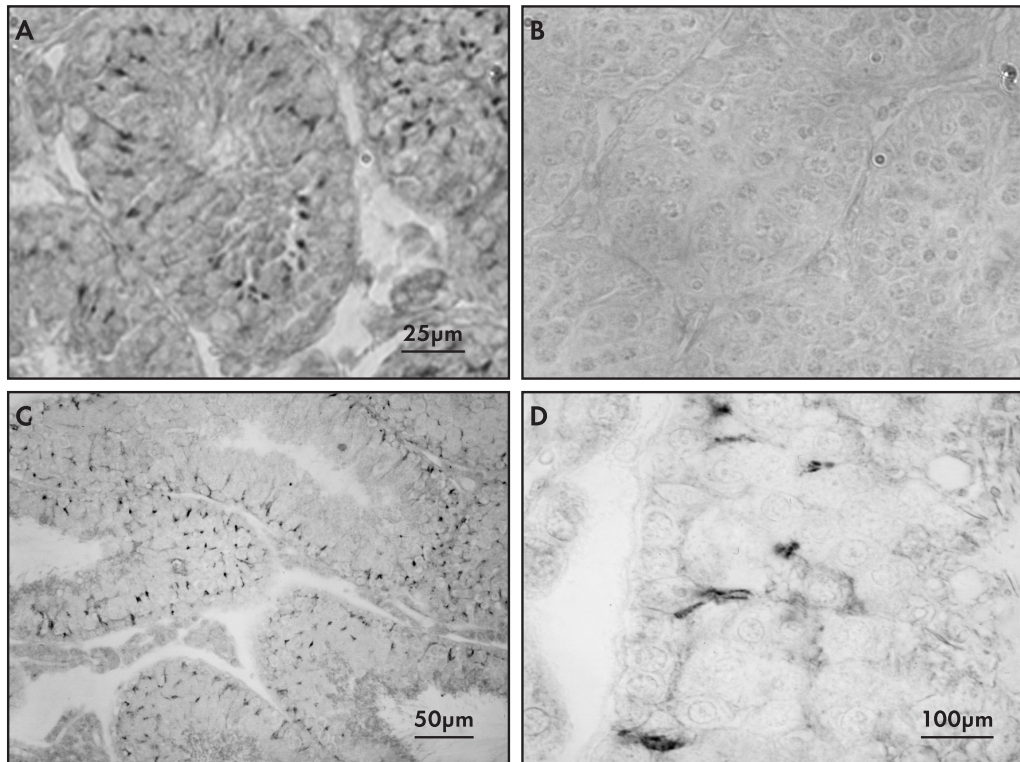


Abb. 5.19: Lokalisation von ClC-2 innerhalb des Hodens. Im zwei Wochen alten +/+ Tier wurde ClC-2 innerhalb der Tubuli gefunden (A), in gleichaltrigen -/- Tieren war kein ClC-2 vorhanden (B). In adulten +/+ Tieren war ClC-2 am Rand der Tubuli zu finden (C), dabei konnte ClC-2 in der Plasmamembran von Sertoli-Zellen nachgewiesen werden (D). Im Gegensatz zu den elektrophysiologischen Messungen wurde keine ClC-2 Expression in Leydig-Zellen gefunden.

wiesen werden, was eine niedrigere Expression oder gleichmäßigere Verteilung des Proteins in Leydig-Zellen vermuten ließ.

5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Analysen der Mausmodelle für KCC2 und ClC-2 haben zu folgenden Erkenntnissen geführt:

- KCC2 ist an der Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration in Neuronen beteiligt.
- Funktionelle Messungen an Motoneuronen zeigen, daß diese in $Kcc2^{-/-}$ Tieren übererregbar sind.

- KCC2 wird in Dendriten exprimiert und konnte nicht in Axonen nachgewiesen werden. Die Expression in der Nähe inhibitorischer Synapsen unterstreicht die Rolle von KCC2 in der inhibitorischen synaptischen Übertragung.
- Entgegen der Vermutung spielt ClC-2 keine wesentliche Rolle in der Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration in Neuronen.
- Der Verlust von ClC-2 führt zu einer vollständigen Degeneration der Keimzellen.
- Keimzellen erreichen nur frühe Stadien der Spermatozyten I.
- Keimzelldegeneration hat keine hormonelle Ursache.
- ClC-2 konnte in der Membran von Sertoli-Zellen lokalisiert werden.
- patch clamp Messungen an Sertoli-Zellen zeigen, daß ClC-2 dort funktionell exprimiert wird.
- Eine Funktion von ClC-2 in der Lungen- und Nierenentwicklung konnte nicht bestätigt werden, ClC-2 spielt auch für die Magensäuresekretion keine Rolle.

6 Diskussion

6.1 Analyse physiologischer Mechanismen durch Mausmodelle

Die grundlegende Frage biologischer und physiologischer Forschung ist: Was ist die Funktion eines Proteins im Organismus? In den letzten Jahren sind immer mehr Proteine kloniert worden, und inzwischen ist es gelungen, das gesamte Genom des Menschen zu sequenzieren. Dies ist jedoch nur der erste Schritt in dem Verständnis physiologische Prozesse auf molekularer Ebene. In vielen Fällen ist die Funktion von Genprodukten nur im Detail bekannt. Durch Experimente mit transfizierten Zellen kann man die Funktionsweise der Proteine studieren. Insbesondere lassen sich Ionenkanäle gut funktionell untersuchen, da sie durch den Transport von Ladungen einen meßbaren Strom erzeugen. Durch Mutationen kann man auf zellulärer Ebene einen Einblick in die Funktion des Proteins gewinnen. Es ist damit möglich, Struktur-Funktions Beziehungen aufzuklären. Durch verschiedene zellbiologische Methoden gewinnt man zusätzliche Erkenntnisse über ihre subzelluläre Lokalisation. Außerdem ist es möglich zu untersuchen, in welchen Organen das Protein vorkommt. Die Information, in welchen Geweben diese Genprodukte eine wichtige physiologische Funktion besitzen, fehlt jedoch.

Die Funktion eines Proteins im Organismus kann untersucht werden, wenn man das Protein entfernt. Man findet in der Natur Organismen, in denen die Geninformation verändert oder zerstört ist. Solche Änderungen in der DNA-Sequenz nennt man *Mutationen*; sie können zu einem Verlust des kodierten Proteins führen oder seine Struktur und Funktion verändern. Die betroffenen Organismen, sogenannte *Mutanten*, unterscheiden sich im Verhalten, der äußeren Erscheinung, der Physiologie oder anderen Eigenschaften von dem normalen, Nicht-Mutanten, Organismus. Man kann durch Vergleich spezifischer DNA-Sequenzen, die anormalen Eigenschaften mit einem Unterschied in der Expression, Struktur oder Funktion eines Proteins korrelieren. Andererseits kann man aber auch spezifische Mutationen in klonierte Gene einfügen, um dann das Genom in Organismen, beispielsweise Hefen oder Mäusen, zu verändern und so die Funktion eines bestimmten, bekannten Gens untersuchen. In Abbildung 6.1 sind die beiden Wege zur Analyse der physiologischen Funktion eines Protein schematisch dargestellt.

Allein aus den Expressionsmustern und den funktionellen Erkenntnissen ist es häufig schwierig, wenn nicht unmöglich, auf die Funktion eines Protein zu schließen. Insbesondere die Knockout Technologie in der Maus hat in den letzten Jahren die Möglichkeit eröffnet, die Funktionsweise bekannter Proteine im physiologischen Zusammenhang zu untersuchen. Die

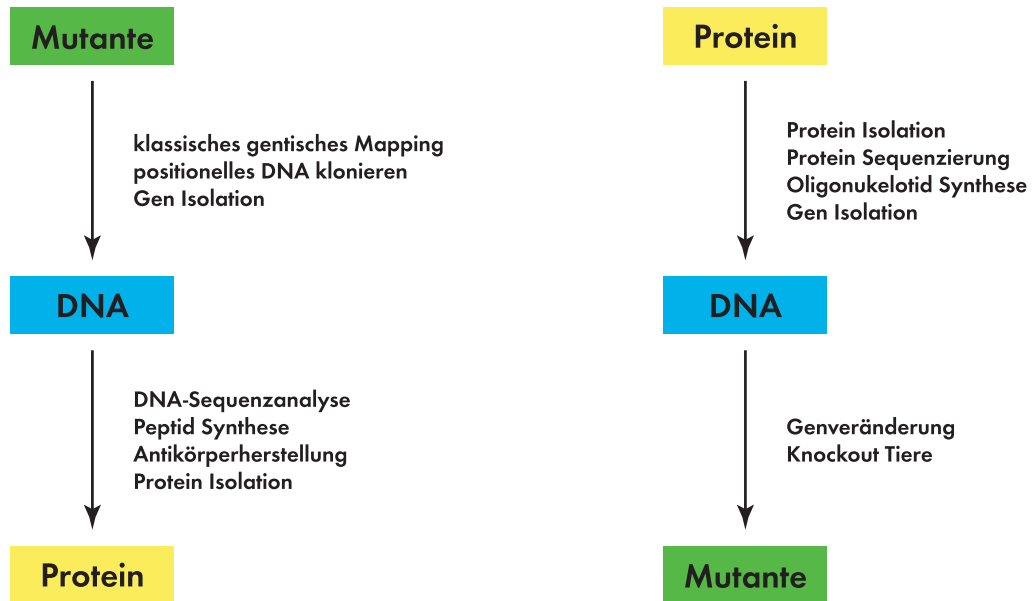


Abb. 6.1: Das Flußdiagramm faßt zwei verschiedene Ansätze zur Klärung der Funktion eines speziellen Proteins zusammen. **A**, Mutationen die Veränderungen in der Struktur oder Funktion eines Proteins hervorrufen, können zu Defekten in Organismen führen. Mit verschiedenen genetischen Ansätzen kann man die entsprechende, fehlerhafte DNA isolieren und dann das zugehörige Protein untersuchen. **B**, Im anderen Fall geht man von einem Protein aus und kloniert die entsprechende DNA-Sequenz. In dieser kann man nun Veränderungen vornehmen und dann in Organismen einführen. (Nach Molecular Cell Biology, Herausgeber Harvey Lodish)

Knockout-Technologie ist näher in Abschnitt 2.5 beschrieben. Aus dem Phänotyp der Knockout Maus zeigt sich, in welchen Organen das Protein eine wichtige Rolle spielt. In einigen Fällen führt jedoch das Verändern des Genoms nicht notwendigerweise zu einem Phänotyp. Möglicherweise ist die Funktion des Protein nicht unbedingt notwendig oder limitierend. Manche Proteine können überlappende Funktionen haben, so daß die Funktion eines Proteins durch ein anderes übernommen werden kann. Beispielsweise zeigt der Knockout für Myoglobin überraschenderweise keine wesentlichen Veränderungen. Myoglobin ist ein zytoplasmatisches Protein, daß in Kardiomyozyten und in sauerstoffabhängig arbeitenden Skelettmuskelzellen gebildet wird und dort für den Transport von Sauerstoff in die Mitochondrien sorgt. Die Myoglobin Knockout Tiere zeigten jedoch eine vergleichbare Ausdauer bei körperlichen Anstrengungen. In isolierten Herz- und Muskelpräparaten wurde kein Unterschied in der Muskelkontraktion im Vergleich zu Kontrolltieren beobachtet. Daher wird angenommen, daß die Funktion von Myoglobin nicht der Transport von Sauerstoff in die Mitochondrien ist oder sein Funktion durch andere Proteine übernommen wird (Garry et al., 2000). Dies Beispiel zeigt, daß man die physiologische Funktion eines Proteins nur im Zusammenhang im

Organismus untersuchen kann, da nur hier alle Faktoren vorhanden sind, die die tatsächliche Funktion der untersuchten Proteins beeinflussen.

6.1.1 Bedeutung von Chloridtransportprozessen

Chloridionen spielen in vielen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Da Chlorid das häufigste Anion in Säugerzellen ist, erfüllt es wichtige physiologische Funktionen, zum Beispiel die Stabilisierung des Membranpotentials in erregbaren Zellen wie Neuronen und Muskelzellen (z. B. *ClC-1*) (Steinmeyer et al., 1991b) oder ist selbst an der Signaltransduktion beteiligt. Weiterhin spielt es eine wichtige Rolle bei der pH-Wert- und Volumenregulation, und hat eine wichtige Funktion für den transepithelialen Transport. In Neuronen vermittelt es die synaptische Inhibition.

Es gibt einige menschliche Erbkrankheiten, die auf einen Defekt der Chloridhomöostase zurückzuführen sind. Am weitesten verbreitet unter Mitteleuropäern ist die Zystische Fibrose (CF). Der Funktionsverlust von CFTR führt zu einer gestörten epithelialen Chloridsekretion, wobei hauptsächlich die Lunge betroffen ist (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989). Die kongenitale Myotonie ist auf einen Defekt im *CLCN1* zurückzuführen. Er ist an der Repolarisation der Muskelzellen beteiligt und stabilisiert das Membranpotential (Koch et al., 1992). Ebenso sind verschiedene Nierenerkrankungen auf Dysfunktionen im Chloridtransport zurückzuführen. Die Dent'sche Krankheit wird durch eine Mutation in *CLCN5* verursacht (Lloyd et al., 1996). Das Bartter-Syndrom wird durch Mutationen in verschiedenen Genen, die für Chloridtransporter kodieren, verursacht: *CLCN-KB*, ebenfalls ein *ClC*-Chloridkanal, (Simon et al., 1997) und *SCL12A1*, dem Gen für den $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ Kotransporter (Simon et al., 1996a). In Mausmodellen für *NKCC1* wurde gezeigt, daß ein Verlust der Funktion dieses Transporters zu einer schweren Innenohrdegeneration (Delpire et al., 1999) und männlicher Unfruchtbarkeit (Pace et al., 2000) führt. Eine besondere Rolle spielt die Chloridhomöostase in Neuronen. Während der Entwicklung verändert sich die intrazelluläre Chloridkonzentration und bestimmt, ob GABAerge und glyzinerge Synapsen exzitatorisch oder inhibitorisch wirken (Cherubini et al., 1991) (siehe Abschnitt 2.4).

6.1.2 In dieser Arbeit untersuchte Chloridtransporter

Sowohl von *ClC-2* als auch von *KCC2* ist erwartet worden, daß sie an der Regulation der intraneuronalen Chloridkonzentration beteiligt sind. Für die Untersuchung der physiologischen Bedeutung dieser beiden Chloridtransporter wurden in unserer Arbeitsgruppe Knockout Mausmodelle hergestellt (Bösl et al., 2000; Hübner et al., 2000).

Smith und Mitarbeiter zeigen in hippokampalen Pyramidenzellen eine spannungsaktivierbare Chloridleitfähigkeit, die eine wichtige Rolle in der Modulation der neuronalen Inhibition durch GABA spielt (Smith et al., 1995). Diese Chloridleitfähigkeit hat die gleichen Aktivierungseigenschaften wie *ClC-2*. *ClC-2* wurde in den gleichen Neuronen, in denen die Chloridleitfähigkeit gemessen wurde, nachgewiesen. Von diesen Beobachtungen ausgehend erwartete

man, daß CIC-2 die molekulare Basis für einen Chloridkanal ist, der an der Regulation der Chloridkonzentration in Neuronen beteiligt ist (Smith et al., 1995; Staley et al., 1996). Außerdem war schon lange die Beteiligung eines Chlorid-Kotransporters an der Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration postuliert worden (Misgeld et al., 1986; Kaila, 1994). Der ausschließlich neuronal exprimierte Kalium-Chlorid Kotransporter KCC2 (Payne et al., 1996) war daher ebenfalls ein guter Kandidat, an der Regelung der intrazellulären Chloridkonzentration beteiligt zu sein.

Die Analyse der *Kcc2*^{-/-} Maus zeigte, daß KCC2 an der Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration in Neuronen beteiligt ist. Dies war von CIC-2 ebenfalls erwartet worden, die *Clcn2*^{-/-} Tiere zeigten jedoch keinen auffälligen neuronalen Phänotyp. Die Infertilität der *Clcn2*^{-/-} Tiere läßt vermuten, daß CIC-2 am transepithelialen Transport beteiligt ist.

In der Diskussion wird zunächst auf die Analyse des KCC2 Knockout eingegangen und die Bedeutung von Chloridtransportprozessen in Neuronen diskutiert. Im folgenden wird der CIC-2 Knockout näher besprochen, dabei steht die Analyse der Hodendegeneration im Vordergrund.

6.2 Analyse des KCC2 Knockouts

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß KCC2 an der Regulation der intraneuronalen Chloridkonzentration beteiligt ist und dadurch die synaptische Inhibition durch GABA und Glyzin beeinflusst. In Motoneuronen von neonatalen *Kcc2*^{-/-} Tieren konnten durch GABA Aktionspotentiale ausgelöst werden, während in Kontrolltieren GABA das Auslösen von Aktionspotentialen verhinderte.

Im Unterschied zu beispielsweise Glutamat, das immer exzitatorisch wirkt, ändert sich die Wirkung von GABA und Glyzin während der Entwicklung von exzitatorisch zu inhibitorisch. Es wurde schon lange diskutiert, daß ein Chlorid-Kotransporter an der Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration beteiligt sein muß (Misgeld et al., 1986; Kaila, 1994). Für die Regulation kommen mehrere aktive Mechanismen in Frage, der Na⁺-K⁺-Cl⁻ (NKCC) und der K⁺-Cl⁻ Kotransporter (KCC) und der Na⁺-abhängige Cl⁻-HCO₃⁻ Austauschere.

KCC2 wird ausschließlich im Zentralnervensystem exprimiert (Payne et al., 1996) und koppelt den Transport von Chlorid an den Kaliumgradienten, der durch die Na⁺-K⁺-ATPase erzeugt wird. Wie alle Kalium-Chlorid Kotransporter wird K⁺ und Cl⁻ im Verhältnis 1:1, elektroneutral, aus der Zelle transportiert. Es wurde vermutet, daß KCC2 eine entscheidende Rolle in der Regulation der intraneuronalen Chloridkonzentration spielt. Antisense-Experimente an kultivierten Hippokampusneuronen zeigen, daß die Inhibition von KCC2 zu einer Verschiebung des Umkehrpotentials der GABA_A-Rezeptor Antwort führt (Rivera et al., 1999). Dies konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal im physiologischen Zusammenhang eines Tieres gezeigt werden.

6.2.1 Übererregbarkeit der Motoneurone

Die ungewöhnliche Haltung der Extremitäten und die Tatsache, daß die $Kcc2^{-/-}$ Tiere nur auf sehr starke mechanische Reize reagierten, legten die Vermutung nahe, daß durch die Deletion des $Kcc2$ Gens die Regulation der Motoneurone im Rückenmark gestört war. Das Rückenmark ist ein komplexes System von Neuronen, die sensorische, motorische und autonome Funktionen haben. Man unterscheidet drei Hauptgruppen von Neuronen im Rückenmark:

1. Neurone mit Zellkörpern außerhalb des Rückenmarks, deren Axone Informationen an das Rückenmark leiten.
2. Neurone, deren Axone das Rückenmark verlassen und Muskel innervieren, sogenannte Motoneurone.
3. Neurone, deren Axone ausschließlich im Rückenmark enden oder in höhere Ebenen des ZNS projizieren, sogenannte Interneurone.

Die zentrale Frage war, ob durch KCC2 die intrazelluläre Chloridkonzentration während der Entwicklung beeinflußt wird. In Messungen an Motoneuronen von $Kcc2^{-/-}$ Tieren wurde gezeigt, daß die intrazelluläre Chloridkonzentration in $Kcc2^{-/-}$ Tieren höher war als in Kontrolltieren. Durch die erhöhte Chloridkonzentration wird die GABAerge und glyzinerge synaptische Inhibition gestört und es kommt zu einer Übererregbarkeit der Neuronen (siehe dazu auch Abschnitt 2.4).

Zunächst wurde untersucht, ob Nerven, die die Extremitäten innervieren eine erhöhte Aktivität zeigen. An der Steuerung der Antwort der α -Motoneurone auf externe Stimuli sind verschiedene Interneurone beteiligt. Dies schließt die Renshaw-Zellen, die von reziproken α -Motoneuronkollateralen aktiviert werden und über GABAerge und glyzinerge Transmission auf Motoneurone projizieren, mit ein (Schneider und Fyffe, 1992). Diese Rückkopplung wird nach ihrem Entdecker als Renshaw-Hemmung bezeichnet, das betreffende Interneuron als Renshaw-Zelle. Durch Gruppe Ia (primäre) Muskelspindel-Afferenzen sind die Muskeln direkt über exzitatorische Synapsen mit α -Motoneuronen verbunden. Darüberhinaus sind viele Interneurone und Motoneurone an der Kontrolle der Bewegung beteiligt. Sie regulieren die Spannung in den Muskeln und Reflexe auf sensorische Einflüssen.

Um die Inhibition der α -Motoneurone durch die Interneurone in der $Kcc2^{-/-}$ Maus zu untersuchen, wurde die extrazelluläre Aktivität des Ischiasnervs abgeleitet. Der Ischiasnerv enthält zum einen afferente Fasern von propriozeptiven Rezeptoren und efferente Fasern zu verschiedenen Muskeln der hinteren Extremitäten. Messungen am Ischiasnerv zeigten, daß die Inhibition der Motoneurone in $Kcc2^{-/-}$ Tieren gestört war (Abschnitt: 5.2.2). Im Gegensatz dazu war in Kontrolltieren keine derartige spontane Aktivität zu beobachten. Spontane Aktionspotentiale beobachtet wurden selten beobachtet.

Ia Afferenzen können aufgrund ihrer niedrigen Reizschwelle selektiv aktiviert werden, da die afferenten Fasern der Golgi-Sehnenorgane oder die Axone der α -Motoneurone erst mit

zunehmender Reizstärke stimuliert werden (Lloyd, 1943). Dadurch war es möglich, die rekurrente Inhibition isoliert durch Stimulation und Ableitung an dem selben Nerv zu untersuchen. In der $Kcc2^{-/-}$ Maus wurde ein polyphasisches Signal beobachtet, daß sich von Stimulation zu Stimulation veränderte. Teilweise wurde durch die Stimulation eine lang anhaltende (etwa 30 Sekunden) Aktivität beobachtet. Im Gegensatz dazu fand man in Kontrolltieren auf jede Stimulation die gleiche biphasische Antwort.

Eine erhöhte Aktivität der Motoneurone, wie sie im Ischiasnerv beobachtet wurde, und der damit erhöhte Muskeltonus erklärt die abnormale Haltung der $Kcc2^{-/-}$ Tiere (Abb. 5.2). Die polyphasische Antwort im Rückenmark der $Kcc2^{-/-}$ Maus kann durch die Überlagerung von asynchronen Aktionspotentialen, die auf den Verlust der GABAergen und glyzineren Inhibitorischen Kontrolle der α -Motoneurone zurückzuführen sind, erklärt werden. Wenn die intrazelluläre Chloridkonzentration in den Motoneuronen so hoch ist, daß es bei einer Aktivierung der GABA und Glyzin-Rezeptoren zu einem Ausstrom von Chlorid kommt und damit zu einer Depolarisation, werden die Motoneurone nicht in ihrer Aktivität gehemmt. Die erhöhte spontane Aktivität und die polyphasischen Antworten des Ischiasnervs in $Kcc2^{-/-}$ Tieren zeigte eine starke Ähnlichkeit mit Messungen am Ischiasnerv der *spastic* Maus (Biscoe und Duchon, 1986). Dies wird Abschnitt 6.2.4 daher näher betrachtet.

Aufgrund der Messungen am Ischiasnerv wurden die Reaktion der Motoneurone auf die inhibitorischen Neurotransmitter GABA und Glyzin untersucht. Da die intrazelluläre Chloridkonzentration durch die Messung nicht beeinflusst werden durfte, wurde mit der *perforated-patch* Methode gemessen (siehe Abschnitt 5.2.3).

In Messungen, in denen die neuronale Aktivität durch TTX blockiert wurde, konnte gezeigt werden, daß Neuronen von $Kcc2^{-/-}$ Tieren signifikant stärker depolarisierten als die von Kontrolltieren (Abschnitt: 5.2.3). In $Kcc2^{-/-}$ Tieren war die intrazelluläre Chloridkonzentration damit deutlich höher als in Kontrolltieren. Dies bestätigt die Vermutung, daß durch KCC2 die intrazelluläre Chloridkonzentration reguliert wird. Die Werte für Kontrolltiere stimmen gut mit Werten für neonatale Ratten überein (Wu et al., 1992); für die Maus sind in der Literatur keine Werte zu finden.

In Messungen, bei denen die neuronale Aktivität nicht durch TTX blockiert wurde, wurde beobachtet, daß GABA in Neuronen von Kontrolltieren die Generierung von Aktionspotentialen unterdrückte und in Motoneuronen von $Kcc2^{-/-}$ Tieren in der Lage war, Aktionspotentiale auszulösen (Abb. 5.7 B). In Kontrolltieren hatten GABA und Glyzin ihre inhibitorische Wirkung schon erreicht, was offensichtlich für die Kontrolle der Motorik von entscheidender Bedeutung ist. Die höhere intrazelluläre Chloridkonzentration in Motoneuronen von $Kcc2^{-/-}$ Tieren und das Auslösen von Aktionspotentialen durch GABA erklärt die in den Messungen am Ischiasnerv beobachteten Unterschiede in der rekurrenten Inhibition.

Obwohl die Neurone in Kontrolltieren in Gegenwart von GABA und Glyzin depolarisierten, wirkten diese Neurotransmitter inhibitorisch. Dies kann durch die starke Zunahme der Membranleitfähigkeit erklärt werden. Durch die Zunahme der Chloridleitfähigkeit werden einwärtsgerichtete, exzitatorische Ströme kurzgeschlossen, so daß es nicht zu einer weiteren Depolarisation kommt und Aktionspotentiale ausgelöst werden können (Gao und Ziskind-

Conhaim, 1995). Eine weitere Möglichkeit für die verringerte Erregbarkeit ist die Inaktivierung der spannungsgesteuerten Natriumkanäle während der Depolarisation durch GABA und Glyzin (Zhang und Jackson, 1993), da spannungsgesteuerte Natriumkanäle ab einem bestimmten depolarisierten Membranpotential inaktivieren und damit keine Leitfähigkeit mehr besitzen. Allerdings konnte in der Arbeit von Gao (1995) gezeigt werden, daß durch eine Depolarisation nur die Amplitude der Aktionspotentiale reduziert wird, aber nicht das Auslösen von Aktionspotentialen an sich verhindert wird (Gao und Ziskind-Conhaim, 1995).

Eine durch GABA oder Glyzin ausgelöste Depolarisation könnte durch den Ausstrom anderer Anionen durch die entsprechenden Rezeptoren getragen sein, wenn das Gleichgewichtspotential dieser Anionen positiver als das Ruhemembranpotential ist (Bormann et al., 1987); dies ist für HCO_3^- der Fall. GABA_A -Rezeptoren besitzen eine geringe (5:1) Leitfähigkeit für HCO_3^- . Daher führt man in sich entwickelnden hippokampalen und reifen kortikalen Neuronen die GABA-aktivierten Ströme auf einen Efflux von HCO_3^- zurück (Kaila et al., 1993; Zhang et al., 1991). Die Beobachtung, daß in differenzierenden Motoneuronen die Amplitude der durch GABA vermittelten Depolarisation größer ist als die durch Glyzin (Wu et al., 1992), gibt Anlaß zu der Vermutung, daß die GABA_A -Rezeptoren in undifferenzierten Neuronen eine größere Leitfähigkeit für HCO_3^- besitzen (Bormann et al., 1987). Andererseits konnten Gao und Mitarbeiter zeigen, daß GABA-aktivierte Ströme hauptsächlich Cl^- spezifisch sind und die Bewegung von HCO_3^- nicht zu einem meßbaren Anionenstrom beiträgt (Gao und Ziskind-Conhaim, 1995). Die Depolarisation durch GABA in adulten Neuronen ist nicht verstanden. Perkins vermutet, daß ein weiterer GABA-Rezeptor dafür verantwortlich sein könnte, der eine höhere Permeabilität für HCO_3^- besitzt (Perkins, 1999).

Die Neurone depolarisierten nicht signifikant unterschiedlich in Gegenwart von GABA oder Glyzin (Abb. 5.7 A), so daß anscheinend die Permeabilität der GABA_A -Rezeptoren für HCO_3^- keinen signifikanten Beitrag zur Depolarisation lieferte. Andernfalls hätten die durch GABA ausgelöste Depolarisation größer als die durch Glyzin ausgelöste Depolarisation ausfallen müssen, da zusätzlich zu Cl^- noch HCO_3^- zu der Depolarisation beitragen würde.

6.2.2 Lokalisation von KCC2 in der Nähe von inhibitorischen Synapsen

Der Einfluß von KCC2 auf die neuronale Erregbarkeit kann ganz wesentlich von der Lokalisation abhängen. In immunhistochemischen Untersuchungen wurde KCC2 ausschließlich in Dendriten und der Plasmamembran der Motoneuronsomata nachgewiesen. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen war deutlich zu erkennen, daß KCC2 in Dendriten, aber nicht in Axonen vorkam. Außerdem war eine Ansammlung von KCC2 Protein an inhibitorischen Synapsen zu erkennen (Abb. 5.10). In anderen Arbeiten wurde KCC2 zusammen mit GABA_A -Rezeptoren in der Körnerzellschicht im Rattenkleinhirn kolokalisiert (Williams et al., 1999).

Durch die Aktivierung von Chloridleitfähigkeiten kommt es zu einer Akkumulation von Chlorid. Allerdings ist bisher nicht genau bekannt, welche Auswirkungen die Chloridakkumulation auf die neuronale Erregbarkeit hat. Untersuchungen mit einem chloridsensitiven

Farbstoff haben ergeben, daß die transiente Zunahme der intrazellulären Chloridkonzentration die entsprechenden Ströme teilweise um einige Sekunden überdauert (Kuner und Augustine, 2000). Die nachfolgenden GABAergen Ströme fallen dadurch kleiner aus. Daher ist die GABAerge synaptische Inhibition von der Häufigkeit abhängig, mit der sie benutzt wird (Wong und Watkins, 1982; Thompson und Gähwiler, 1989). Dies wird auch als *fading* bezeichnet.

Damit nach der Akkumulation von Chlorid wieder eine chloridabhängige synaptische Inhibition stattfinden kann, muß die intrazelluläre Chloridkonzentration wieder gesenkt werden. Die Lokalisation von KCC2 in der Nähe von inhibitorischen Synapsen legt die Vermutung nahe, das KCC2 lokal für einen Transport von Chlorid aus der Zelle sorgt. KCC2 könnte aufgrund der Nähe zu den synaptischen Spalten sehr schnell die intrazelluläre Chloridkonzentration an den Stellen senken, an denen die Inhibition ausgelöst wird.

6.2.3 Steuerung der Atmung

Da die $Kcc2^{-/-}$ Tiere nicht in der Lage waren zu atmen, wurde die respiratorische Aktivität untersucht. Die rhythmische Aktivität der Atemmuskulatur wird durch das Atemzentrum gesteuert. Das Atemzentrum befindet sich in der *Medulla oblongata*; das respiratorische Netzwerk wurde im sogenannten PreBötzinger Komplex lokalisiert (Smith et al., 1991).

Die Funktion des Atemzentrums bleibt *in vitro* erhalten und kann an einer Hirnstamm-Rückenmark Präparation untersucht werden (Suzue, 1984). Durch Ableiten der elektrischen Aktivität an zervikalen Nervenwurzeln, die Axone der rhythmisch aktiven Motoneurone enthalten, konnte die Funktion des Atemzentrums überprüft werden. Hier zeigte sich, daß die Steuerung der Atemmuskulatur in $Kcc2^{-/-}$ Tieren gestört war (siehe Abschnitt 5.2.4).

Es ist schwierig, den genauen Einfluß der synaptischen Inhibition auf den Atemrhythmus zu erklären, da die Rhythmogenese als solche noch nicht verstanden ist (Koshiya und Smith, 1999; Rekling und Feldman, 1998). Die Frage ist, wie der Rhythmus durch ein Netzwerk aus Schrittmacher-Neuronen generiert wird. In diesem Netzwerk spielen sowohl exzitatorische als auch inhibitorische synaptische Übertragungen eine Rolle. Der Atemrhythmus kann an verschiedenen Stellen gestört sein, da vom Atemzentrum wiederum Motoneurone gesteuert werden, die die Atemmuskulatur innervieren. Die Tatsache, daß die $Kcc2^{-/-}$ Tiere nicht atmen, kann zwei Ursachen haben. Zum einen kann es an einem direkten Versagen der Rhythmogenese im Atemzentrum liegen, zum anderen kann auch die Steuerung der Atemmuskulatur durch die entsprechenden Motoneurone gestört sein.

Da für das KCC2 Knockout Mausmodell gezeigt werden konnte, daß die Cl^{-} -abhängige Hemmung der Neuronen im Rückenmark gestört ist, könnte dies auch in der Kontrolle der Atmung von Bedeutung sein. Ramirez und Mitarbeiter zeigen, daß die synaptische Inhibition durch GABA und Glyzin für die Rhythmogenese wichtig ist (Ramirez et al., 1996). Untersuchungen an isolierten Hirnstamm-Rückenmark Präparaten von neonatalen Ratten zeigen aber, daß der Atemrhythmus nach der Blockade der GABAergen und glyzineren Inhibition nicht gestört wird (Feldman und Smith, 1989; Onimaru et al., 1990). Dies kann nicht durch ein Mangel an funktionellen GABA- und Glyzin-Rezeptoren erklärt werden (Onima-

ru et al., 1990; Ballanyi et al., 1999). Daraus könnte man folgern, daß die chloridabhängige Hemmung für die Generierung des Atemrhythmus keine große Rolle spielt. Inwieweit eine chloridabhängige Hemmung in der Rhythmogenese eine Funktion hat, konnte bisher nicht endgültig geklärt werden, da andererseits mit patch clamp Messungen gezeigt wurde, daß die inhibitorische postsynaptischen Potentiale (IPSP) in Neuronen des Atemzentrums von neonatalen Ratten hyperpolarisierend sind. In Fällen, in denen die Chloridkonzentration durch die Patchpipette erhöht wurde, kam es zu einer Depolarisation der Neurone (Onimaru et al., 1996; Brockhaus und Ballanyi, 1998). Möglicherweise bietet das *Kcc2*^{-/-} Mausmodell die Möglichkeit, den Einfluß der chloridabhängigen synaptischen Inhibition auf die Rhythmogenese im Atemzentrum näher zu untersuchen.

6.2.4 Vergleich der *Kcc2*^{-/-} Maus mit der *spastic* Maus

Die polyphasischen Antworten, die bei der Ableitung der spontanen Aktivität im Ischiasnerv der *Kcc2*^{-/-} Tiere beobachtet wurden, ähneln stark den Messungen an der *spastic* Maus. Messungen an Neuronen im Rückenmark der *spastic* Maus zeigen, daß eine monosynaptische Antwort typischerweise von einer starken Depolarisation gefolgt wird, wodurch Aktionspotentiale ausgelöst werden (Biscoe und Duchon, 1986). Messungen an Kontrolltieren mit hohen Chloridkonzentrationen in der Meßpipette führten zu ähnlichen Ergebnissen (Biscoe und Duchon, 1986), dies entspricht der Situation in den *Kcc2*^{-/-} Tieren.

Die *spastic* Maus leidet unter Muskelspasmen und hat kann sich während eines Anfalls nicht bewegen. Inzwischen konnte gezeigt werden, daß der Phänotyp der *spastic* Maus auf eine Transposon-Insertion in Intron 5 des Gens, das für die β -Untereinheit des Glyzin-Rezeptors kodiert, zurückzuführen ist (Mülhardt et al., 1994). Aufgrund dieser *nonsense* Mutation kommt es zu einer falschen gespleißten mRNA der β -Untereinheit des Glyzin-Rezeptors. In der *spastic* Maus kann weniger als 10% des vollständigen Transkripts nachgewiesen werden. Da der Phänotyp der *spastic* Maus sich erst zwei Wochen nach der Geburt entwickelt, ist sie im Gegensatz zur *Kcc2*^{-/-} Maus nicht perinatal letal. Zu diesem Zeitpunkt ändert sich die Zusammensetzung der Glyzin-Rezeptoren von α_2 zu α_1 -Untereinheiten. Durch transgene Expression einer funktionellen β -Untereinheit kann der WT-Phänotyp wiederhergestellt werden (Hartenstein et al., 1996). Neben der *spastic* Maus gibt es mit der *spasmodic* und der *oscillator* Maus noch zwei weitere Mausmutanten mit einem defekten Glyzin-Rezeptor; beide haben Mutationen in der α_1 -Untereinheit des Glyzin-Rezeptors (Betz et al., 1999). Die Phänotypen der Glyzin-Rezeptor-Mutanten ähneln einander sehr.

Durch das Fehlen eines funktionellen Glyzin-Rezeptors in der *spastic* Maus ist die glyzinerge Inhibition vermindert, so daß es zu einer Übererregbarkeit im Rückenmark kommt (Rajendra und Schofield, 1995). Die Übererregbarkeit hat einen höheren Muskeltonus zur Folge, der zu Krämpfen in der Muskulatur führt. Durch Substanzen, die die inhibitorische Wirkung der GABA_A-Rezeptoren verstärken, können die Muskeln in *spastic* Mäusen entspannt werden (Biscoe und Fry, 1982). Dies zeigt, daß eine nicht ausreichende synaptische Inhibition zu schwerwiegenden Defekten in der motorischen Kontrolle führt.

Die erhöhte intrazelluläre Chloridkonzentration in den Neuronen der *Kcc2^{-/-}* Maus führt dazu, daß die synaptische Inhibition stark gestört ist. Erstaunlicherweise unterscheiden sich die *spastic* Maus und die *Kcc2^{-/-}* Maus nur sehr wenig, wenn man die Messungen an Neuronen im Rückenmark vergleicht. Bei der *spastic* Maus fehlt durch die Mutation ein funktioneller Glyzin-Rezeptor, so daß die glyzinerge Inhibition gestört ist, während die GABAerge Inhibition erhalten ist. Dagegen führt GABA bei Neuronen der *Kcc2^{-/-}* in TTX freien Messungen zu einer so starken Depolarisation, daß Aktionspotentiale ausgelöst werden. Daher würde man annehmen, daß die *Kcc2^{-/-}* Maus einen sehr viel stärkeren Phänotyp zeigt, der sich auch in einer stärkeren spontanen Aktivität des Ischiasnervs zeigen würde. Die synaptische Inhibition ist aber allein durch das Fehlen eines funktionellen Glyzin-Rezeptors in der *spastic* Maus so stark gestört, daß eine weitere Störung der synaptischen Inhibition zu keiner Zunahme der spontanen Aktivität führt.

6.3 Neuronale Chloridtransportprozesse und ihre Bedeutung

In den funktionellen Untersuchungen der *Kcc2^{-/-}* Maus konnte zum ersten Mal im physiologischen Zusammenhang gezeigt werden, daß KCC2 die intraneuronale Chloridkonzentration reguliert. Die Lokalisation von KCC2 in der Nähe von inhibitorischen Synapsen unterstreicht die wichtige Funktion von KCC2 in diesem Zusammenhang.

Für die Regulation kommen aber auch noch andere Chloridtransporter in Frage. In den folgenden Abschnitten soll daher die Rolle anderer Chloridtransporter diskutiert werden. In diesem Zusammenhang wird auch eine mögliche neuronale Funktion von ClC-2 diskutiert. Die *Clcn2^{-/-}* Maus zeigte zwar keine auffälligen neurologischen Veränderungen, Man kann jedoch aufgrund der groben neurologischen Analyse nicht ausschließen, daß ClC-2 an einer subtilen Regulation der intraneuronalen Chloridkonzentration beteiligt ist. Außerdem soll diskutiert werden, welche Bedeutung die durch GABA und Glyzin ausgelösten Depolarisationen in der Entwicklung von Neuronen haben.

6.3.1 Regulation der Chloridkonzentration durch andere Chloridtransporter

An der Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration könnten neben dem hier untersuchten KCC2 noch andere Chloridtransporter oder Ionenkanäle beteiligt sein. Besonders interessant sind hier die $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ -Kotransporter (NKCC), die übrigen $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$ -Kotransporter und der $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ -Kotransporter (NCC). Durch NCC und die NKCCs wird normalerweise die Chloridkonzentration erhöht und durch die KCCs erniedrigt. Wie oben schon diskutiert, könnte auch ClC-2 an der Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration beteiligt sein. Dieser Kanal öffnet bei negativen Membranpotentialen und könnte damit die intrazelluläre Chloridkonzentration in die Nähe des Ruhemembranpotentials halten (Staley et al., 1996). Die Rolle von ClC-2 in Neuronen wird ausführlich in Abschnitt 6.3.2 diskutiert.

Neben KCC2 sind drei weitere Mitglieder der KCC Genfamilie bekannt. KCC1 wird in allen Geweben exprimiert (Gillen et al., 1996); ihm wird dadurch eine allgemeine Funktion

zugeordnet. KCC3 wird in vorwiegend in der Niere, im Herz und im Gehirn exprimiert (Race et al., 1999). KCC4 wurde in Herz und Niere nachgewiesen, im Gehirn kommt er jedoch kaum vor (Mount et al., 1999).

Um die Beteiligung der anderen Chloridtransporter an der Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration besser beurteilen zu können, wurden die Expressionsmuster von KCC1, KCC2, KCC3, NKCC1 und ClC-2 in in situ Hybridisierungen untersucht (Abb. 5.11). Da NKCC2, NCC und KCC4 nicht signifikant im ZNS exprimiert werden, kommen sie nicht für die Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration in Frage.

Die Expression von KCC2 im Rückenmark beginnt im Unterschied zu den entwicklungs-geschichtlich jüngeren Teilen des ZNS zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Embryonal-entwicklung. Im Neokortex der Ratte wurde die maximale Expression zwischen zwei und drei Wochen nach der Geburt erreicht; von diesem Zeitpunkt an blieb sie dann stabil (Clayton et al., 1998a). In Motoneuronen der Maus wurde KCC2 schon am Embryonaltag E12,5 nachgewiesen. Die Expression nahm in der folgenden Entwicklung weiter zu und erreichte ihr Plateau an E18,5 (Abb 5.2.6). KCC2 kann zu diesem Zeitpunkt noch nicht seine volle Funktion entfaltet haben, da das elektrochemische Chloridpotential zu diesem Zeitpunkt noch positiver als das Ruhemembranpotential ist. Zum Tag der Geburt war die Chloridkonzentration in *Kcc2^{-/-}* Tieren jedoch signifikant höher als in Kontrolltieren. Im quantitativen Vergleich der Transkriptmengen der untersuchten Chloridtransporter zeigte nur KCC1 eine um etwa 50% erhöhte Expression. Die Funktion von KCC2 konnte dadurch nicht kompensiert werden. Dies unterstreicht die besondere Funktion von KCC2 in Neuronen.

Die anderen Transporter und ClC-2 waren diffus im gesamten Rückenmark exprimiert, wobei KCC3 und NKCC1 besonders in den spinalen Ganglien vorkam. Die mögliche Funktion von ClC-2 in neuronalen Geweben ist oben schon diskutiert worden. Es wurde gezeigt, daß die Menge an ClC-2 RNA im Rattenhirn von E15 bis P3 zunimmt und danach konstant bleibt (Clayton et al., 1998b), dort wurde das Rückenmark nicht untersucht. Zusammen mit dem Expressionsmuster im Rückenmark, deuten die Beobachtungen an der *Clcn2^{-/-}* Maus darauf hin, daß ClC-2 keine allgemeine Schlüsselstellung für Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration einnimmt. Es ist jedoch denkbar, daß später in der Entwicklung ClC-2 in anderen Regionen des ZNS eine subtile regulatorische Funktion übernimmt.

NKCC1 koppelt den Transport von Chlorid an den Na⁺-Gradienten und arbeitet damit normalerweise in die entgegengesetzte Richtung der KCCs. In vitro Experimente haben gezeigt, daß ein Furosemid-sensitiver Kotransport, wie der durch NKCC1, die Chloridkonzentration in Neuronen erhöhen könnte (LoTurco et al., 1995). Daher wird vermutet, daß die Veränderung der intrazellulären Chloridkonzentration durch eine Veränderung der Expression von NKCC1 zurückführen ist (Plotkin et al., 1997b; Clayton et al., 1998a). In der in situ Hybridisierung konnte jedoch gezeigt werden, daß NKCC1 an E12,5 nur in wenigen Neuronen exprimiert wird, während KCC2 zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Expression im Vorderhorn aufwies, die in der Entwicklung noch weiter zunahm. Aufgrund der Expressionsmuster ist es unwahrscheinlich, daß NKCC1 dem Efflux von Chlorid durch KCC2 entgegenwirkt und so zu einer Veränderung der intraneuronalen Chloridkonzentration beiträgt.

Die Funktion von KCC2 könnte in $Kcc2^{-/-}$ Tieren durch andere Transporter zum Teil kompensiert werden, daher wurden die Transkriptmengen verschiedener Chloridtransporter in einem *RNAse protection assay* quantifiziert. Nur für KCC1 war eine Zunahme der mRNA zu verzeichnen. Dies unterstreicht die besondere Funktion von KCC2 in Neuronen.

6.3.2 Die neuronale Bedeutung von ClC-2

Da ClC-2 relativ spezifisch im Gehirn exprimiert wird (Smith et al., 1995; Thiemann et al., 1992), wird vermutet, daß ClC-2 dort eine wichtige regulatorische Funktion besitzt. Dies konnte in $Clcn2^{-/-}$ Tieren nicht bestätigt werden. Da dies aber eine der am besten untersuchten Hypothesen für ClC-2 war, soll an dieser Stelle eine mögliche Funktion von ClC-2 im Gehirn diskutiert werden.

Aufgrund seiner Kanaleigenschaften könnte ClC-2 in neuronalen Geweben zwei verschiedene Funktionen haben. Zum einen ist es denkbar, daß er an der Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration in Neuronen beteiligt ist, in dem er die intrazelluläre Chloridkonzentration an des Ruhemembranpotential klemmt. Zum anderen könnte ClC-2 wegen seiner von extrazellulären pH-Wert abhängigen Aktivierung (Jordt und Jentsch, 1997) eine Funktion in der Regulation des extrazellulären pH-Werts haben.

Da ClC-2 am Ruhemembranpotential teilweise geöffnet ist, könnte eine Akkumulation von Chlorid über das Gleichgewicht hinaus verhindert werden und damit die inhibitorische Wirkung von GABA und Glyzin erhalten bleiben (siehe dazu Abschnitt 2.4). Staley und Mitarbeiter haben eine Korrelation zwischen der Expression von ClC-2, dem damit verbundenem einwärtsgerichteten Strom und der inhibitorischen Wirkung von GABA gezeigt (Staley et al., 1996). Weiterhin zeigen sie, daß die Expression von ClC-2 in Ganglien der dorsalen Wurzel des Rückenmarks die intraneuronale Chloridkonzentration so ändert, daß die GABA-Antwort inhibitorisch wird (Staley et al., 1996). In Neuronen der oberen zervikalen Ganglien (superior cervical Ganglia, SCG) wird ebenfalls ein hyperpolarisationsaktivierter Chloridstrom mit ähnlichen Eigenschaften wie ClC-2 beschrieben (Clark et al., 1998). Daher wurde in $Clcn2^{-/-}$ Tieren in weiten Regionen des Zentralnervensystems eine teilweise exzitatorische Reaktion durch GABA und Glyzin erwartet, welche zu epileptischen Anfällen führen könnte.

Es wurden jedoch keine spontanen Anfälle bei $Clcn2^{-/-}$ Tieren beobachtet. Daher wurde untersucht, ob die Tiere empfindlicher auf das krampfauslösende Mittel Flurothyl reagieren. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen $Clcn2^{-/-}$ und $Clcn2^{+/+}$ Tieren festgestellt werden (siehe Abschnitt 5.1). Die schließt nicht aus, daß ClC-2 an einer subtilen Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration in Neuronen oder des pH-Werts im Gehirn beteiligt ist. Möglicherweise kommt die Funktion von ClC-2 nur in speziellen Neuronen oder unter besonderen äußeren Einflüssen zur Geltung.

Die Regulation des pH-Werts spielt eine ebenso wichtige Rolle. In vielen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die neuronale Aktivität zu einer schnellen Änderungen es extrazellulären pH-Werts um mehrere Zehntel pH-Einheiten führen kann (Chesler und Kaila, 1992). Bei synchroner neuronaler Aktivität kommt es zunächst zu einer extrazellulären Alkalisierung,

der eine längere Azidierung folgt. Man nimmt an, daß die relativ kleinen, lokalen pH-Wert Änderungen einen Einfluß auf die synaptische Transmission haben, da postsynaptische Rezeptoren empfindlich gegenüber pH-Wert Änderungen reagieren. Die Amplitude inhibitorischer Chloridströme durch GABA_A-Rezeptoren wird durch extrazelluläre Protonen verstärkt, während exzitatorische Ströme durch NMDA-Rezeptoren bei alkalischem pH-Wert zunehmen. Das bedeutet, daß eine Azidierung zu einer Senkung der neuronalen Erregbarkeit führt und eine Alkalisierung zu einer Verstärkung der neuronalen Erregbarkeit. Eine zerebrale Azidose kann bis zum Koma führen, eine Alkalose kann epileptische Erregungszustände auslösen.

Aufgrund dieser Beobachtungen konnte zwar eine übergeordnete Rolle von ClC-2 in der Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration oder des extrazellulären pH-Werts nicht bestätigt werden, dennoch ist es möglich, daß ClC-2 eine regulatorische Funktion in neuronalen Geweben hat.

Während der Entwicklung könnte ClC-2 die intrazellulären Chloridkonzentration zum Gleichgewicht verschieben. Später könnte ClC-2 die Auslenkung der intrazellulären Chloridkonzentration von einem Gleichgewichtszustand beeinflussen und damit die intrazelluläre Chloridkonzentration stabilisieren. In Neuronen, die durch GABA inhibiert werden, kommt es durch die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren zu einem Einstrom von Chlorid und damit zu einer Hyperpolarisation der Membran. Hier könnte ClC-2, der bei negativen Potentialen aktiviert wird (siehe Abschnitt 2.2.1.3), für den nachfolgenden Ausstrom von Chlorid sorgen, damit das Neuron wieder durch GABA inhibiert werden kann. Denkbar ist auch, daß die Funktion von ClC-2 in neuronalen Bereichen zum Tragen kommt, die zunächst keine offensichtliche Auswirkung auf das Tier haben. In dieser Arbeit wurden nur sehr oberflächliche Test der neuronalen Beteiligung von ClC-2 durchgeführt. Daher ist an dieser Stelle schwierig zu beurteilen, welche Funktion ClC-2 in Neuronen hat und unter welchen physiologischen Bedingungen diese Funktion benötigt wird.

6.3.3 Bedeutung von GABA induzierten Depolarisationen für die neuronale Entwicklung

Die Bedeutung der exzitatorischen Wirkung von GABA und Glyzin ist bisher nicht geklärt. Es wird vermutet, daß GABA während der Entwicklung zunächst eine neurotrophe Funktion besitzt und erst später seine inhibitorische Wirkung in den Vordergrund tritt. (Lauder, 1993; Ziskind-Conhaim, 1998). Ein Beispiel, um die Hypothese zu unterstützen, ist die Expression von GABA und GABA-Rezeptoren in postmitotischen undifferenzierten spinalen Neuronen vor dem Beginn der Synaptogenese (Ma et al., 1992; Walton et al., 1993; Antal et al., 1994).

Es wurde postuliert, daß die GABA-induzierten Depolarisationen eine spezifische, transiente Funktion während der neonatalen Entwicklung haben. Zum Beispiel könnten sie die Schwelle für die neuronale Erregbarkeit senken und dadurch eine aktivitätsabhängige Differenzierung der Neuronen beeinflussen. Es wurde gezeigt, daß im sich entwickelnden Rückenmark aktivitätsabhängige Mechanismen die Bildung von Synapsen regulieren (Nelson et al., 1989), die Entwicklung der elektrischen Eigenschaften von Motoneuronen erleichtern

(Xie und Ziskind-Conhaim, 1995) und die Expression von sogenannten *immediate early genes* regulieren (Sheng et al., 1993). Ein Mechanismus könnte die Aktivierung von spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen sein, die zu einem Einstrom von Ca^{2+} führt und damit die Ca^{2+} -Konzentration vorübergehend erhöhen würde. Eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration dient als wichtiges Signal für die frühe Neuronen Differenzierung (Sivilotti und Nistri, 1991; Ziskind-Conhaim, 1998). Eine andere Möglichkeit ist die Regulation des intrazellulären pH durch eine HCO_3^- -Permeabilität der GABA-Rezeptoren. In einigen Neuronen des reifen ZNS ist die GABAerge postsynaptische Inhibition mit einem signifikanten Ausstrom von HCO_3^- durch GABA_A-Kanäle gekoppelt. Daher wird vermutet, daß GABA an der Modulation des neuronalen pH-Werts beteiligt ist. Tatsächlich führt der GABA-aktivierte HCO_3^- Ausstrom zu einer extrazellulären Alkalisierung; die pH-Wert Änderungen liegen dabei im Bereich von einigen zehntel pH-Einheiten, solche Änderungen können einen deutlichen Effekt auf neuronale Ionenkanäle und damit die Erregbarkeit der Membran haben (Ziskind-Conhaim, 1998).

Die Hypothese, daß GABA zu Beginn der Entwicklung als exzitatorischer Neurotransmitter wirkt, sollte jedoch vorsichtig diskutiert werden. Neben seiner depolarisierenden Wirkung verhindert GABA das spontane Auftreten von Aktionspotentialen, dies wurde in den Messungen an Motoneuronen der *Kcc2^{+/+}* Tiere deutlich. Die inhibitorische Wirkung in diesem Fall kann durch das Kurzschließen einwärtsgerichteter, erregender Ströme durch die starke Zunahme der Chloridleitfähigkeit erklärt werden (Gao und Ziskind-Conhaim, 1995). Außerdem ist eine Inhibition der synaptischen Aktivität durch das teilweise Inaktivieren von spannungsabhängigen Natriumkanälen während der GABA-induzierten Depolarisation denkbar (Zhang und Jackson, 1993).

Neben den Effekten, die die synaptische Inhibition betreffen, gibt es noch andere Möglichkeiten, die Bedeutung der depolarisierenden Wirkung von GABA während der Entwicklung zu erklären. Es wurde gezeigt, daß sich die glutamaterge synaptische Transmission ebenfalls während der Entwicklung signifikant ändert. Die wichtigste Beobachtung ist, daß die glutamaterge Transmission zu Beginn ausschließlich durch NMDA-Rezeptoren vermittelt wird (Durand et al., 1996; Wu et al., 1996; Liao und Malinow, 1996; Isaac et al., 1997). NMDA-Rezeptoren werden spannungsabhängig durch Mg^{2+} blockiert, dieser Mechanismus ist in neonatalen Hippokampusneuronen genauso effektiv ist wie in differenzierten, adulten Neuronen (Strecker et al., 1994; Khazipov et al., 1995). Erst durch eine Depolarisation kann diese Blockade aufgehoben werden, dies geschieht in reifen Neuronen durch Aktivierung der AMPA-Rezeptoren, die aber zu einem frühen Zeitpunkt der Entwicklung noch nicht an der synaptischen Transmission beteiligt sind. Möglicherweise wird der Mg^{2+} -Block der NMDA-Rezeptoren in sich entwickelnden Neuronen durch die durch GABA vermittelte Depolarisation (Staley et al., 1995). Dies wurde während physiologischer Aktivität, sogenannter *giant depolarising potentials* (GDPs), im neonatalen Hippokampus beobachtet. (Ben-Ari et al., 1989; Khazipov et al., 1995; Leinekugel et al., 1997). Die synchrone neuronale Aktivität der GDPs und die damit verbundene intrazelluläre Ca^{2+} Oszillationen sind in vielen Teilen des zentralen und peripheren Nervensystems gefunden worden (Ben-Ari et al., 1989; Spitzer et al., 1995; Yuste et al., 1995; Feller et al., 1996; Mooney et al., 1996; Christie et al., 1989; Wong et al., 1993).

Sie scheinen ein fundamentaler Bestandteil sich entwickelnder Gehirnstrukturen zu sein. Im embryonalen Rückenmark werden Änderungen in der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration für die Expression von GABA_A -Rezeptoren und K^+ -Kanäle benötigt (Ben-Ari et al., 1997).

Die Bedeutung für die neuronale Entwicklung, besonders im Hippokampus und im Kortex, konnte in dem *Kcc2*^{-/-} Mausmodell nicht untersucht werden, da diese Strukturen erst nach der Geburt ausreifen. Histologische Untersuchungen des Hirnstamms und des Rückenmarks ergaben jedoch keine deutlich veränderten Befunde im neonatalen *Kcc2*^{-/-} Tier.

6.4 Analyse der *Clcn2*^{-/-} Maus

Die physiologische Funktion von ClC-2 war bisher nicht genauer bekannt, daher wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Knockout Mausmodell für ClC-2 hergestellt. Das Ziel der Arbeit war, mit diesem Mausmodell die Funktion von ClC-2 zu untersuchen. Die vermutete wichtige neuronale Funktion von ClC-2 konnte nicht bestätigt werden. Auch andere vermutete Funktionen von ClC-2 konnten mit dem Mausmodell ausgeschlossen werden.

Es zeigte sich aber eine dramatische Veränderung des Hodens, wodurch die *Clcn2*^{-/-} Männchen infertil sind. Diese Keimzelldegeneration wurde zunächst eingehend histologisch untersucht. Mit patch clamp Messungen konnte gezeigt werden, daß ClC-2 funktionell in Sertoli-Zellen exprimiert wird. Zusammen mit der Lokalisation von ClC-2 in der Membran von Sertoli-Zellen wird daher eine Funktion von ClC-2 im transepithelialen Transport vorgeschlagen.

6.4.1 Überprüfung von vermuteten ClC-2 Funktionen

ClC-2 wurde durch Durchmustern von cDNA-Bibliotheken aus dem Gehirn und dem Herz der Ratte in Homologie zu ClC-1 kloniert (Thiemann et al., 1992). Inzwischen sind auch die Isoformen des Menschen (Cid et al., 1995), Kaninchens (Furukawa et al., 1995; Malinowska et al., 1995) und der Maus (Joo et al., 1999) kloniert worden. *CLCN2* wurde beim Menschen auf Chromosom 3 (3q27) (Protopopov et al., 1996) lokalisiert. In dieser genomischen Region konnte bisher keine Erbkrankheit gefunden werden, für die ClC-2 verantwortlich sein könnte. Die elektrophysiologischen Eigenschaften von ClC-2 sind in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben.

In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß ClC-2 in einigen Geweben relativ spezifisch exprimiert wird. Durch immunhistochemische Untersuchungen wurde ClC-2 in der apikalen Membran des Lungenepithels lokalisiert (Murray et al., 1995), dort findet man auch den CFTR-Chloridkanal. Andere Untersuchungen zeigen eine spezifische Expression von ClC-2 in der Niere (Murray et al., 1996; Obermüller et al., 1998), und der apikalen Membran des HCl sekretierenden Magenepithels (Malinowska et al., 1995). Diese Hypothesen wurden mit der *Clcn2*^{-/-} Maus überprüft.

6.4.1.1 Beteiligung von ClC-2 an der Magensäuresekretion

In den Untersuchungen in Abschnitt 5.3.1 ergab sich kein Hinweis auf eine Beteiligung von ClC-2 an der Magensäuresekretion, obwohl dies in der Literatur berichtet wird (Malinowska et al., 1995). Daher wird an dieser Stelle diese Literatur diskutiert nach den Ursachen möglicher Abweichungen gesucht.

Das Magenepithel sezerniert HCl, indem die H^+K^+ -ATPase intrazelluläre Protonen gegen Kaliumionen austauscht. Dies führt zu einer Senkung des extrazellulären pH-Werts. Das Kalium verläßt die Zelle wieder durch einen Kaliumkanal, so daß in der Summe ein Transport in das Magenlumen von positiven Ladungen entsteht. Dieser Strom wird durch einen Chloridstrom kompensiert. Tatsächlich konnte in mehreren Arbeiten Kalium- und Chloridkanäle in den Zellen des Magenepithels nachgewiesen werden (Kajita et al., 1995). Abbildung 6.2 zeigt schematisch die an der Magensäuresekretion beteiligten Iontentrporter.

Da ClC-2 durch sauren extrazellulären pH aktiviert wird, könnte er der an der HCl Sezernierung beteiligte Chloridkanal sein. Malinowska und Mitarbeiter behaupten, daß eine Variante von ClC-2, als ClC-2G (G für gastrisch) bezeichnet, maßgeblich an der Magensäuresekretion beteiligt ist (Malinowska et al., 1995). ClC-2G wurde aus cDNA, die aus dem Kaninchenmagen gewonnen wurde, kloniert und ist zu 93% homolog zu der Rattenisoform von ClC-2. Der von Malinowska beschriebene ClC-2G weist einige fundamentale Unterschiede zur Rattenisoform von ClC-2 auf. Bis dahin gab es keinen Hinweis darauf, daß es eine magenspezifische Isoform gibt. Die einzige Evidenz dafür, daß ClC-2G die magenspezifische Variante ist, ist eine positive Northern-Blot Analyse, die aber nur mit Magen RNA durchgeführt wurde. Die elektrophysiologischen Eigenschaften von ClC-2G wurden nicht in der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme in *Xenopus* Oozyten untersucht, sondern es wurden Membranvesikel in einer Lipiddoppelschicht rekonstituiert. Dabei wurde bei extrem sauren pH-Werten (pH 3,0) gemessen. Seine Ionenselektivität ist erstaunlicherweise $I^- > Cl^- > NO_3^-$, dies widerspricht grundlegend der für ClC-2 beschriebenen Ionenselektivität von $Cl^- > Br^- > I^-$ (Thiemann et al., 1992; Gründer et al., 1992; Staley et al., 1996). Allerdings ist dies die Ionenselektivität der Chloridleitfähigkeit im Magenepithel (Kajita et al., 1995) Im folgenden wurde gezeigt, daß diese cDNA nicht magenspezifisch exprimiert ist, sondern die Sequenz des Spezieshomologs von ClC-2 im Kaninchens ist citeFurukawa:1995. Vermutlich handelt es sich bei dem rekonstituierten ClC-2G um ein Artefakt, denn nur so läßt sich die veränderte Ionenselektivität erklären.

Die Magensäuresekretion kann von Histamin durch einen 3',5'-zyklisches Adenosin Monophosphat vermittelten Mechanismus stimuliert werden (Chew et al., 1980). Es wurden jedoch keine Unterschiede in der Histamin-induzierten Ansäuerung des Magens zwischen Kontrolltieren und *Clcn2*^{-/-} Mäusen festgestellt (Abschnitt 5.3.1). Daher ist auszuschließen, daß ClC-2 die hauptsächliche Chloridleitfähigkeit in der apikalen Membran der Zellen der Magenschleimhaut darstellt, die für die HCl Sekretion erforderlich ist.

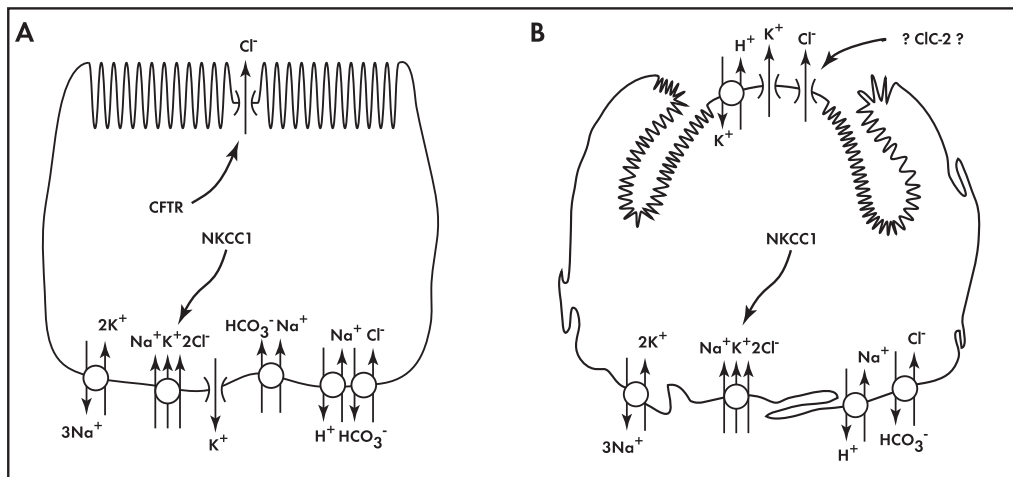


Abb. 6.2: Transporter die für die Ionensekretion im gastrointestinalen Trakt benötigt werden. **A,** Eine cAMP-stimulierte Sekretion von Cl^- (und möglicherweise HCO_3^-) wird in intestinalen Epithelzellen durch CFTR vermittelt. Na^+ , K^+ und Cl^- über die basolaterale durch NKCC1 Membran aufgenommen. Die Na^+/K^+ -ATPase sorgt für einen Na^+ Ausstrom und erzeugt dadurch ein elektrisches Potential, das für die Anionensekretion benötigt wird. Ein basolateraler Kaliumkanal führt das Kalium wieder zurück. Zusätzlich werden an der basolateralen Membran durch den gekoppelten Na^+/H^+ und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austausch oder durch $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Koprotransport Anionen und Na^+ aufgenommen. **B,** Sekretion von H^+ , K^+ und Cl^- über die apikale Membran der Belegzellen wird durch die H^+/K^+ -ATPase, einem K^+ -Kanal und einem Cl^- -Kanal vermittelt. Der basolaterale $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher sorgt für eine Cl^- Aufnahme die für die HCl Sekretion benötigt wird. NKCC1 und der gekoppelte Na^+/H^+ und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austausch vermittelt die Aufnahme von Na^+ die als Triebkraft für die Na^+/K^+ -ATPase benötigt wird. Zusätzlich wird dadurch Cl^- aufgenommen, das für die KCl Sekretion benötigt wird. Sowohl die Na^+/K^+ -ATPase, als auch NKCC1 könne die Aufnahme von K^+ für die Sekretion leisten. (Nach Shull et al., 2000)

6.4.1.2 Die Rolle von ClC-2 in der Lungen- und Nierenentwicklung

In der *Clcn2*^{-/-} Maus konnte man keinen Unterschied in der Lungen- und Nierenentwicklung feststellen. Dies steht im Widerspruch zur Literatur und wird daher hier diskutiert.

Eine aktive Chloridsekretion und damit eine Flüssigkeitsekretion durch das Epithel der Atemwege ist entscheidend für die Entwicklung der Lungen (Alcorn et al., 1977; McCray et al., 1992a). Die diesem Chloridtransport zu Grunde liegenden Mechanismen und die molekularen Strukturen der vermutlich beteiligten Chloridkanäle sind weitgehend unbekannt. In fetalen Lungen ist der Ionentransport durch eine Chloridsekretion bestimmt, wobei in postnatalen Atemwegen die Absorption von Natrium eine größere Rolle spielt (Cotton et al., 1988; Zeitlin et al., 1988). Es wurden einige Chloridleitfähigkeiten aus der Lunge von Säugetieren charakterisiert. Besonders wichtig war die Klonierung des cAMP abhängigen CFTR-Chloridkanals

(Riordan et al., 1989). CFTR wird in der fetalen Lunge exprimiert, jedoch hängt die Chloridsekretion und die Lungenentwicklung nicht von diesem cAMP regulierten Chloridkanal, der bei CF mutiert ist, ab (McCray et al., 1992b). In der adulten CFTR Knockout Maus sind die Lungen nicht betroffen, da der Transport durch einen Ca^{2+} -aktivierten Chloridkanal erhöht ist (O'Neal et al., 1993). Murray und Mitarbeiter haben gezeigt, daß ClC-2 in der fetalen Lunge relativ stark exprimiert wird und perinatal seine Expression abnimmt. Sie spekulierten, daß ClC-2 zu der Chloridsekretion während der fetalen Lungenentwicklung beiträgt (Murray et al., 1995). Es wurde weiter überlegt, ob ClC-2 die Funktion des CFTR Chloridkanals in Patienten, die an Mukoviszidose erkrankt sind, übernehmen könnte. In *Clcn2*^{-/-} Tieren wurden keine Anzeichen für eine Störung in der Lungenentwicklung gefunden. Daher konnte eine wichtige Rolle allein von ClC-2 in der Lungenentwicklung im Mausmodell nicht bestätigt werden. Möglicherweise kann aber die Funktion von ClC-2 in der Lunge durch andere Chloridtransporter übernommen werden. Um die Bedeutung für die Lungenentwicklung näher zu untersuchen, ist es nötig, durch Kreuzung der entsprechenden Knockout-Linien einen Doppel-Knockout für *Cftr* und *Clcn2* zu erzeugen.

Eine ähnliche Rolle wurde ClC-2 im Zusammenhang mit der Entwicklung des Nierenepithels zugewiesen (Huber et al., 1998). ClC-2 wurde im S3 Segment im proximalen Tubulus der Niere lokalisiert (Murray et al., 1996; Obermüller et al., 1998). Allein aus der frühen Expression wurde geschlossen, daß ClC-2 eine Schlüsselrolle in der embryonalen Nierenentwicklung hat. Huber und Mitarbeiter weisen ClC-2 mittels single cell RT-PCR in embryonalen Nierenepithelzellen nach, allerdings gelingt dies nur bei acht von 57 Zellen.

Die Nieren des *Clcn2*^{-/-} weisen keine erkennbaren anatomischen und histologischen Veränderungen auf. Daher kann man annehmen, daß ClC-2 für die Nierenentwicklung keine entscheidende Rolle spielt.

6.4.2 Degeneration des Hodens

Das Ausschalten von ClC-2 hatte einen dramatischen Effekt auf die Entwicklung des Hodens, ein Organ mit sehr spezialisierten Zellen. Die Keimzellreifung fand nur in jungen Tieren und nur bis zur Meiose I statt, danach degenerierten die Keimzellen der Tiere völlig. Sechs Wochen nach der Geburt waren nicht nur alle Spermatozyten, sondern auch alle Spermato gonien abgestorben und die Tubuli Seminiferi völlig mit Sertoli-Zellen ausgefüllt.

6.4.2.1 Aufbau eines Tubulus seminifer

Abbildung 6.3 zeigt schematisch den Aufbau eines Tubulus seminifer und den Aufbau des Keimepithels. Die Spermatogenese erfolgt im Keimepithel. Sie geht von den Spermatogonien aus, die der Basallamina der Tubuli seminiferi anliegen. Durch mitotische differentielle Zellteilung erfolgt die Vermehrung der Spermatogonien. Man unterscheidet Typ A und Typ B Spermatogonien, wobei A-Spermatogonien als Stammzellen gelten und B-Spermatogonien als der weiterentwickelte Zelltyp. Die B-Spermatogonien sind die Ausgangszellen für die fol-

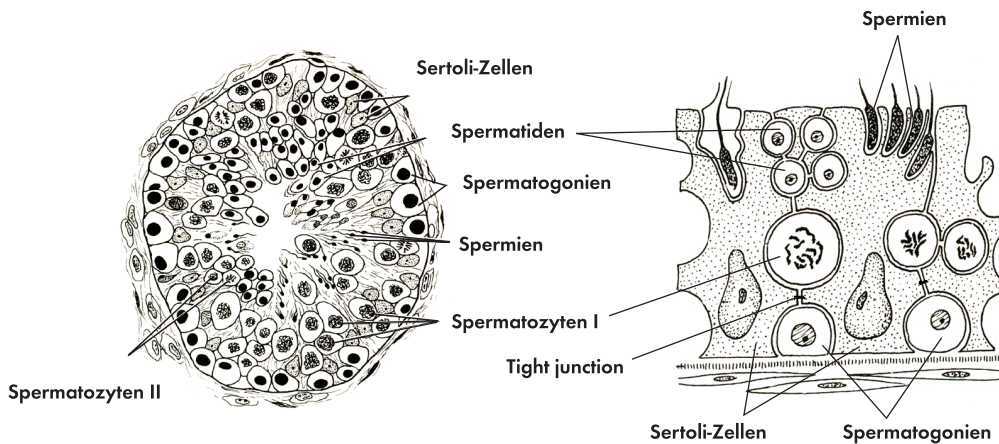


Abb. 6.3: Links ist ein histologischer Schnitt durch ein Tubulus seminifer dargestellt. Die rechte Abbildung zeigt schematisch den Aufbau des Keimepithels. (Nach Benninghoff und Goertler, 1979)

gende Zellvermehrung durch Meiose und die anschließende Umwandlung in Spermien. Aus den B-Spermatogonien entwickeln sich die Spermatozyten I. Nachdem sie alle Phasen der meiotischen Prophase durchlaufen haben, teilen sie sich zu Spermatozyten II. Dabei wird der Chromosomensatz auf die Hälfte reduziert. In einer unmittelbar folgenden zweiten meiotischen Zellteilung wird die 2nDNA auf 1nDNA vermindert, da die Synthesephase ausbleibt. Die entstandenen Zellen werden Spermatiden genannt, sie besitzen einen haploiden Chromosomensatz. Die Entwicklung von der Spermatogonie zum reifen Spermium dauert bei Mäusen 35 Tage (Sassone-Corsi, 1997).

Die Spermatogenese wird maßgeblich durch die Sertoli-Zellen unterstützt. Sie haben zum einen die Aufgabe, die heranreifenden Spermatozyten mit wichtigen Metaboliten zu versorgen, unter anderem mit Laktat, das die Spermatozyten für ihren Stoffwechsel benötigen (Jutte et al., 1982). Sie werden daher auch Ammenzellen der Spermatogenese genannt. Die zweite wichtige Funktion ist das Ausbilden der Blut-Hodenschranke. Die Blut-Hodenschranke wird von *tight junctions* zwischen benachbarten Sertoli-Zellen gebildet. Dabei entsteht ein basales und ein adluminales Kompartiment. In lokalen Interzellulärräumen lagern sich die verschiedenen Reifestadien der Keimzellen ein. Die Spermatogonien und Spermatozyten I befinden sich bis zur leptotänen Phase der Meiose auf der basalen Seite der Blut-Hodenschranke, die späteren Stadien auf der adluminalen Seite. Die Zellen auf der basalen Seite haben direkten Zugang zu Substanzen im lymphatische System, das die Tubuli umgibt, und dadurch einen indirekten Zugang zu Substanzen des Gefäßsystems. Die Passage der Blut-Hodenschranke erfolgt wie durch eine Schleuse, die im übrigen dicht ist und einen Transport von schädigenden hochmolekularen Substanzen in beide Richtungen verhindert (Waites und Gladwell, 1982). Darüberhinaus sezernieren die Sertoli-Zellen eine Flüssigkeit, das Spermplasma, mit der die Spermatozoen

aus den Tubuli seminiferi in den Nebenhoden transportiert werden.

6.4.2.2 Gründe für die Hodendegeneration

Die histologischen Untersuchungen ergaben, daß die Spermatogonien und Spermatozyten schon in der dritten Woche nach der Geburt zu degenerieren begannen und schon eine Woche später fast völlig verschwunden waren. Durch die Analyse während der meiotischen Zellteilung exprimierter Gene konnte näher bestimmt werden, zu welchem Zeitpunkt der Keimzellreifung die Degeneration begann. Protamin wird erst nach Abschluß der Meiose exprimiert (Nantel et al., 1996). Zyklin A1 und Proacrosin-Bindeprotein werden während der Meiose gebildet, wobei die Zyklin A1 mRNA deutlich in der späten pachytänen Phase der Meiose ansteigt und nach Abschluß der meiotischen Zellteilung nicht mehr nachgewiesen werden kann (Sweeney et al., 1996). In *Cln2^{-/-}* Tieren konnte keines dieser Gene nachgewiesen werden. Das bedeutete, daß die Keimzellen das pachytäne Stadium der ersten Meiose nicht erreichten. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus den histologischen Untersuchungen überein, da dort keine späteren Stadien als Spermatozyten I gefunden wurden. Die Keimzellen bildeten noch synaptonemale Komplexe aus; danach ballten die Keimzellen sich Riesenzellen zusammen und starben ab. In dem Alter als die Degeneration der Keimzellen begann, bildet sich auch die Blut-Hodenschranke (Waites und Gladwell, 1982; Byers et al., 1991). Die Spermatozyten gelangen nach der frühen leptöänen Phase auf die adluminal Seite der Blut-Hodenschranke (Russell, 1977; Russell, 1978).

Die genaue Ursache für die Hodendegeneration konnte nicht geklärt werden. Im Prinzip kommen drei Zelltypen für die Keimzelldegeneration in Frage. Die Keimzellen selbst können betroffen sein. Die Testosteron produzierenden Leydig-Zellen können Ursache für die Degene-

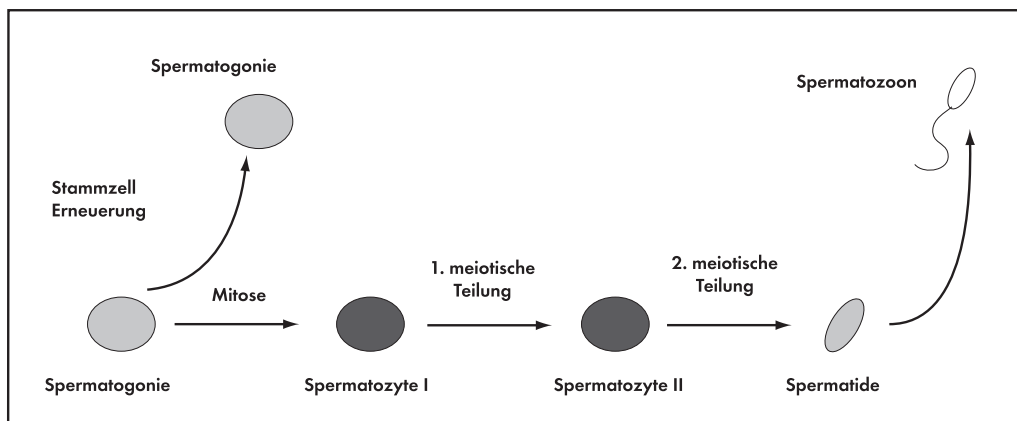


Abb. 6.4: Die Teilung von männlichen Keimzellen. Die meisten Spermatogonien proliferieren, um einen Pool von undifferenzierten Stammzellen zu erhalten. Wenige Spermatogonien entwickeln sich zu Spermien (nach Sassone-Corsi, 1997)

ration sein. Durch die Lokalisation von ClC-2 in den Sertoli-Zellen und die morphologische Veränderung dieser Zellen ist es jedoch wahrscheinlich, daß der transepitheliale Transport der Sertoli-Zellen gestört ist und es dadurch zu der Keimzelledegeneration kommt.

Die Sertoli-Zellen zeigten starke morphologische Veränderungen. Möglicherweise waren die Sertoli-Zellen in ihrer Funktion stark gestört. Da kein Lumen in den Tubuli seminiferi entstand, ist es denkbar, daß ClC-2 an der Sekretion der Tubulusflüssigkeit beteiligt ist. Mit einer zehnfach höheren Kaliumkonzentration als das Plasma weist die Flüssigkeit in den Tubuli seminiferi eine einzigartige Zusammensetzung auf. Die Aufrechterhaltung dieser ungewöhnlichen Zusammensetzung hängt wahrscheinlich von der Anwesenheit von Keimzellen ab (Waites und Gladwell, 1982). Über die Mechanismen, die zur Entstehung der Tubulusflüssigkeit beitragen, ist wenig bekannt. Von Hinton und Setchell wurde ein Modell vorgeschlagen, daß K^+ durch eine Pumpe, möglicherweise durch eine Na^+-K^+ -ATPase, aktiv von Sertoli-Zellen aus dem Interstitium aufgenommen wird (Hinton und Setchell, 1978). Das Kalium verläßt entlang des Konzentrationsgradienten die Sertoli-Zelle auf der adluminalen Seite. ClC-2 könnte in dem komplexen Vorgang der Sekretion der Tubulusflüssigkeit eine wichtige Rolle spielen, in dem es für einen Ladungsausgleich im Lumen sorgt und damit den elektrochemischen Gradienten für K^+ aufrechterhält.

Pace und Mitarbeiter vermuten, daß in der NKCC1 Knockout Maus die Sekretion der Tubulusflüssigkeit gestört ist und dies der Grund für die beobachtet männliche Infertilität ist (Pace et al., 2000). Allerdings konnte NKCC1 nur basolateral lokalisiert werden, daher muß man hier von einem indirekten Mechanismus ausgehen.

In der Immunhistologie (Abb. 5.19) konnte gezeigt werden, daß ClC-2 in der Nähe von Keimzellen exprimiert wird. Dort könnte das Gleichgewicht der Ionenzusammensetzung in den engen Spalten zwischen Sertoli- und Keimzellen gestört sein. Sertoli-Zellen stehen in engem Kontakt mit den reifenden Keimzellen; daher könnte ClC-2 neben der Sekretion der Tubulusflüssigkeit auch an Transportprozessen von Nährstoffen beteiligt sein. Sertoli-Zellen versorgen die Spermatozyten mit Laktat. Der Transport von Laktat wird durch einen H^+ -Laktat-Kotransporter vermittelt (Halestrap und Price, 1999). Da sich durch den Kotransport von Protonen der pH-Wert sowohl in den Sertoli-Zellen als auch in dem schmalen Spalt zwischen Sertoli- und Keimzellen ändert, ist eine wirksame pH-Wert-Regulation erforderlich. ClC-2 öffnet bei extrazellulärer Ansäuerung (Jordt und Jentsch, 1997) und könnte damit für ein Gleichgewicht in der Cl^- -Konzentration sorgen, das benötigt wird, um den Transport von HCO_3^- über den HCO_3^-/Cl^- -Austauscher aufrecht zu erhalten (siehe dazu auch Abschnitt 6.4.4).

Bisher war es nicht möglich, diese Hypothesen durch Experimente zu untermauern. Aus technischen Gründen konnte der pH-Wert innerhalb der sehr schmalen Spalten zwischen Sertoli- und Keimzellen nicht bestimmt werden. Da von den *Clcn2*^{-/-} Mäusen keine Tubulusflüssigkeit gebildet wurde, konnte die Ionenkonzentration dort nicht bestimmt werden.

6.4.2.3 Einfluß von ClC-2 auf den Hormonhaushalt

Es ist auch eine hormonelle Dysfunktion als Ursache für die Infertilität denkbar, da die Keimzellreifung durch Sexualhormone gesteuert wird. Die Sexualhormone LH (luteinisierendes Hormon) und FSH (follikelstimulierendes Hormon) werden in der Hypophyse gebildet und beeinflussen die Gonaden. Sie bewirken in beiden Geschlechtern die Bildung der Gonaden und regen die Ausschüttung anderer Sexualhormone an. In Leydig-Zellen wird das testikuläre Androgen Testosteron gebildet; es ist im Hoden für die normale Spermatogenese wichtig.

Es ist bekannt, daß die Steroidbiosynthese in Leydig-Zellen durch das luteinisierende Hormon (LH) oder das humane Chorionic Gonadotropin (hCG) über einen 3,5-zyklisches AMP (cAMP) vermittelten Mechanismus stimuliert wird (Cooke et al., 1992). Darüberhinaus wurde gezeigt, daß andere *second messenger* Systeme wie Arachnidonsäure und ihre Metaboliten, Kalzium und der Efflux von Chloridionen (Choi und Cooke, 1990) eine Rolle spielen. Der Chloridkanalblocker SITS (4-acetamido-4'-isothiocyanatostilbene- 2,2'-disulphonic acid) inhibierte die LH-stimulierte Steroidbiosynthese bei niedrigen (bis 1 ng/ml), aber nicht bei hohen (100 ng/ml) LH Konzentrationen. Außerdem wurde die durch cAMP und Froskolin stimulierte Steroidbiosynthese nicht durch SITS beeinflusst. Geringere extrazelluläre Chloridkonzentrationen verstärkten die Steroidbiosynthese bei geringen, aber nicht bei maximalen Dosen von LH. Daher wird angenommen, daß die bei niedrigen LH Konzentrationen die Steroidbiosynthese von Chloridkanälen abhängt und bei hohen LH Konzentrationen durch cAMP reguliert wird (Choi und Cooke, 1990)

In patch clamp Experimenten konnte in Leydig-Zellen und Sertoli-Zellen von *Clcn2*^{+/+} Tieren ein hyperpolarisationsaktivierter Chloridstrom gemessen werden. Da der Strom in *Clcn2*^{-/-} Tieren nicht vorhanden war und seine Eigenschaften gut mit denen von ClC-2 übereinstimmten, ist davon auszugehen, daß dieser Strom durch ClC-2 vermittelt wird (siehe Abschnitt 5.3.6).

Von Noulin und Mitarbeitern wird ein hyperpolarisationsaktivierter Chloridstrom in Leydig-Zellen beschrieben (Noulin und Joffre, 1993; Noulin et al., 1996). Diese Chloridleitfähigkeit weist zwar einige Ähnlichkeiten mit den Eigenschaften von ClC-2 auf; so ist er ebenfalls schwellungsaktiviert, jedoch im Gegensatz zum heterolog exprimierten ClC-2 sensitiv gegen cAMP. Außerdem werden die dort beschriebenen Ströme, anders als bei ClC-2, durch 1mM SITS und 1mM DIDS blockiert.

Möglicherweise überlappen die in dieser Arbeit gefundenen und die von Noulin und Mitarbeitern beschriebenen Chloridleitfähigkeiten. Da aber die untersuchten Sexualhormone im Serum und die durch hCG oder 8-bromo-cAMP induzierte Testosteron-Sekretion an isolierten Leydig-Zellen in *Clcn2*^{-/-} Tieren nicht signifikant verändert waren (siehe Abschnitt 5.3.7), konnte die Ursache für das Absterben der Keimzellen nicht durch eine fehlende Regulation der Chloridkonzentration in Leydig-Zellen erklärt werden.

6.4.2.4 Unfruchtbarkeit und Defekte in Genen von Ionentransportern

Unfruchtbarkeit wurde in Zusammenhang mit einigen anderen Ionenkanälen und Transportern beobachtet. In keinem dieser Fälle kam es aber zu einem völligen Verlust der Keimzellen. Eine Mutation in dem GIRK2 K⁺-Kanal führt in der *weaver* Maus zu männlicher Unfruchtbarkeit. Zusätzlich sterben Neurone im Kleinhirn der *weaver* Maus ab (Harrison und Roffler-Tarlov, 1998). Dies liegt an einer veränderten Ionenselektivität des mutierten Kanals. Mäuse, in denen das Gen für GIRK2 deletiert wurde, sind fruchtbar (Signorini et al., 1997). Männliche Patienten mit einer Mutation im Gen für CFTR sind ebenfalls unfruchtbar. In diesem Fall ist die Unfruchtbarkeit durch einen Defekt in den Nebenhoden und den Samenleitern bedingt (Wong, 1998). Mäuse mit einer CFTR-Mutation sind allerdings fruchtbar (Snouwaert et al., 1992). Hier zeigt sich, daß nicht alle physiologischen Erkenntnisse, die in Mausmodelle gewonnen werden, direkt auf den Menschen übertragbar sind.

In dem Na⁺-K⁺2Cl⁻-Kotransporter (NKCC1) Knockout Mausmodell, das mehrere Organdefekte hat, ist ebenfalls die Spermatogenese gestört (Pace et al., 2000). Hier scheint durch das Fehlen von NKCC1 die Produktion der Tubulusflüssigkeit gestört zu sein; allerdings ist in diesem Fall der Verlust der Keimzellen nicht vollständig.

6.4.3 Gemeinsamkeit der Hoden- und Retinadegeneration

Durch andere Mitarbeiter der Gruppe wurde zunächst in Verhaltensversuchen festgestellt daß die *Clcn2*^{-/-} Tiere blind sind (Bösl et al., 2000). Durch histologische Analysen konnte dies auf eine progressive Retinadegeneration zurückgeführt werden. Die genaue Ursache für die Degeneration der Photorezeptoren konnte nicht geklärt werden. Es wurde der transepitheliale Strom über Retina Pigment Epithel (RPE) in einer Ussing-Kammer gemessen. Dort ergab sich eine signifikante Reduktion der transepithelialen Spannung und des Kurzschlussstroms (Bösl et al., 2000).

Das RPE erfüllt im Auge eine vergleichbare Aufgabe wie die Sertoli-Zellen im Hoden. Sie bilden die Blut-Hirnschranke im Auge (Tserentsoodol et al., 1998) und versorgen die Photorezeptoren. Zwischen Photorezeptoren und Zellen des RPE bildet sich ein sehr schmaler Zwischenraum, der sogenannte subretinale Spalt. Ähnlich wie Sertoli-Zellen transportiert das RPE Flüssigkeit und Laktat (Zeuthen et al., 1996; Philp et al., 1998). Die Zellen des RPE phagozytieren die äußeren Segmente der Photorezeptoren.

Möglicherweise ist ClC-2 an der Regulation der Ionenhomöostase in den schmalen Spalten zwischen Photorezeptoren und RPE beteiligt, ähnlich wie in den Tubuli seminiferi. Wie in Abschnitt 6.4.2.2 diskutiert, ist auch das RPE an dem Transport von Laktat beteiligt.

6.4.4 Funktion von ClC-2

Durch die Analyse des Knockouts für *CLCN2* konnte die Funktion von ClC-2 im Organismus untersucht werden. Die vorher angenommene Beteiligung an der Lungen- und Nierenentwicklung konnte ebensowenig wie eine Funktion in der Magensäuresekretion bestätigt werden. Eine

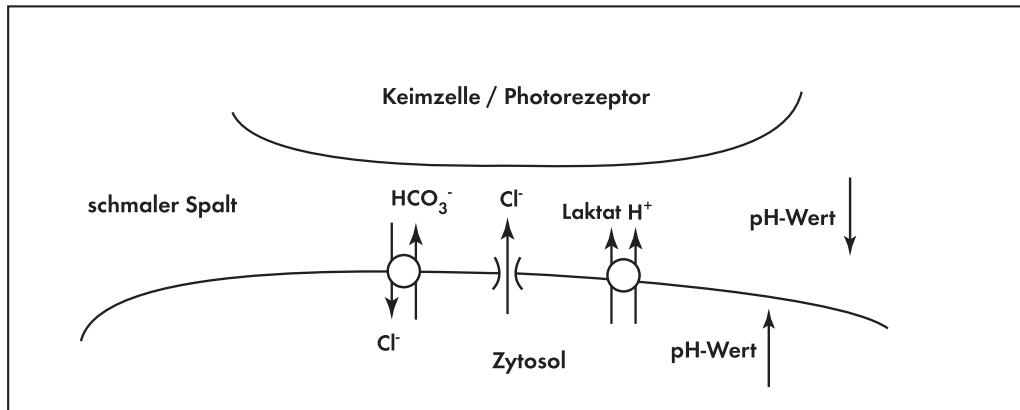


Abb. 6.5: ClC-2 könnte an der Regulation des pH-Werts in den schmalen Spalten zwischen Sertoli- und Keimzellen oder im subretinalen Spalt beteiligt sein.

eingehende Untersuchungen, ob ClC-2 an der Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration in Neuronen beteiligt ist, steht noch aus.

Die Hoden- und Retinadegeneration lassen vermuten, daß ClC-2 am transepithelialen Transport, an der Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase in den schmalen Spalten zwischen Sertoli- und Keimzellen und in dem subretinalen Spalt signifikant beteiligt ist. Durch die Messungen des transepithelialen Transports über das RPE wird diese Hypothese unterstützt (Bösl et al., 2000).

In den sehr schmalen Spalten könnte durch den den Kotransport von Protonen und Laktat der pH-Wert eine effektive Regulation erfordern. Durch den Kotransport von H^+ und Laktat sinkt der extrazelluläre pH-Wert. Um den pH-Wert nicht zu sauer werden zu lassen, wird durch den Anionenaustauscher intrazelluläres HCO_3^- gegen Cl^- ausgetauscht. Die Chloridionen können die Zelle wieder durch den bei saurem extrazellulärem pH-Wert aktivierten ClC-2 verlassen. Dies ist in Abb. 6.5 schematisch dargestellt.

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Funktion der beiden Chloridtransportproteine KCC2 und ClC-2 in Knockout Mausmodellen untersucht. Während ClC-2 ein ubiquitär exprimierter Chloridkanal ist (Thiemann et al., 1992), wird KCC2 ausschließlich in ZNS exprimiert (Payne et al., 1996).

Von beiden untersuchten Chloridtransportern wurde erwartet, daß sie eine wichtige Rolle in der Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration in Neuronen spielen. Für KCC2 konnte dies zum ersten Mal im physiologischen Zusammenhang bestätigt werden. In *Clcn2*^{-/-} Tieren wurde jedoch keine neurologische Veränderung beobachtet. Eine eingehende Untersuchung der neuronalen Funktion von ClC-2 steht jedoch noch aus, so daß eine subtile neuronale Funktion von ClC-2 nicht ausgeschlossen werden kann.

Daß ein Furosemid-sensitiver Kation-Chlorid-Kotransporter an der Regulation der intraneuronalen Chloridkonzentration beteiligt ist, wird schon lange vermutet (Misgeld et al., 1986). KCC2 war als ausschließlich neuronal exprimierter Transporter ein guter Kandidat. In dieser Arbeit konnte die wichtige Funktion von KCC2 für die Regulation der intraneuronalen Chloridkonzentration zum ersten mal im physiologischen Zusammenhang eines Tieres gezeigt werden. Die *Kcc2*^{-/-} Tiere waren nicht lebensfähig, da sie nicht atmeten. Ihre ungewöhnliche Haltung ließ auf einen schweren Defekt in der motorischen Kontrolle schließen. In einer Reihe von funktionellen Experimenten konnte gezeigt werden, daß die chloridabhängige Inhibition der Motoneurone in *Kcc2*^{-/-} Tieren gestört ist, da das elektrochemische Chloridpotential positiv gegenüber dem Ruhemembranpotential ist. Ableitungen am isolierten Ischiasnerv zeigen bei *Kcc2*^{-/-} Tieren eine starke spontane Aktivität; die Reizantwort ist in *Kcc2*^{-/-} Tieren im Gegensatz zu Kontrolltieren polyphasisch. In *patch clamp* Messung an Motoneuronen von *Kcc2*^{-/-} Tieren wurde gezeigt, daß diese eine erhöhte intraneuronale Chloridkonzentration haben. Daher führt die Aktivierung von GABA- und Glyzin-Rezeptoren zu einer signifikant stärkeren Depolarisation. In diesen Messungen konnte auch gezeigt werden, daß in Kontrolltieren Aktionspotentiale durch GABA unterdrückt werden, während in *Kcc2*^{-/-} Tieren die Depolarisation ausreichte, um Aktionspotentiale auszulösen.

In histologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß KCC2 nur in den Dendriten und Somata der Neuronen exprimiert wird. In der Elektronenmikroskopie konnte KCC2 in der Nähe inhibitorischer Synapsen lokalisiert werden. Die Lokalisation an inhibitorischen Synapsen paßt gut zu den funktionellen Ergebnissen und unterstreicht nochmal die wichtige Rolle von KCC2 in diesem Zusammenhang.

Die Ursache für das Versagen der Atmung der *Kcc2*^{-/-} Tiere konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht näher geklärt werden. Bisher ist nicht bekannt, wie der Atemrhythmus generiert wird, daher ist es schwierig, den Einfluß der chloridabhängigen Inhibition auf die Rhythmogenese im Atemzentrum zu erklären. Hier sind weitere Untersuchungen nötig, um zu klären, ob die Generierung des Rhythmus oder die Fortleitung der motorischen Impulse für die Atemmuskulatur gestört ist.

Um zu überprüfen, wieweit andere Chloridtransportern an der Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration beteiligt sind, wurde die Expression von KCC2 in Kontrolltieren und *Kcc2*^{-/-} Tieren mit der Expression anderer Chloridtransporter verglichen. In *in situ* Hybridisierungen von Rückenmarksschnitten, zu zwei Zeitpunkten während der embryonalen Entwicklung, konnte KCC2 Transkripte zunächst (E12,5) im Vorderhorn und später (E18,5) im gesamten Rückenmark nachgewiesen werden. Transkripte der anderen untersuchten Chloridtransporter konnte nur in geringeren Mengen und diffuser verteilt detektiert werden. Die Funktion von KCC2 wurde nicht durch andere Chloridtransporter kompensiert, der quantitative Vergleich der RNA-Mengen in einem RPA zeigte nur eine Zunahme der Expression von KCC1. Da NKCC1 Transkripte nur in einzelnen Neuronen des Rückenmarks und in den Spinalganglien nachzuweisen waren, ist eine wichtige Funktion von NKCC1 in der Regulation der intraneuronalen Chloridkonzentration unwahrscheinlich, die in diesem Zusammenhang diskutiert wurde.

Für ClC-2 war eine ähnliche Funktion erwartet worden (Smith et al., 1995; Staley et al., 1996), dies konnte aber nicht bestätigt werden. Überraschenderweise sind männliche *Clcn2*^{-/-} aufgrund einer Hodendegeneration infertil; sechs Wochen nach der Geburt sind in ihren Hoden keine Keimzellen mehr nachzuweisen. Darüberhinaus wurde von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe festgestellt, daß die *Clcn2*^{-/-} Tiere aufgrund einer schnell fortschreitenden Photorezeptordegeneration blind sind; diese beginnt etwa zwei Wochen nach der Geburt.

In der ersten Analyse der *Clcn2*^{-/-} Maus wurde daher der Hodenphänotyp untersucht. Die Spermatozyten erreichen die erste meiotische Zellteilung, danach ballen sie sich zu Riesenzellen zusammen und sterben ab. Kurz danach beginnen auch die Spermatogonien zu degenerieren. Der Beginn der Degeneration der Keimzellen fällt zeitlich mit der Ausbildung der Blut-Hodenschranke zusammen. An isolierten Sertoli- und Leydig-Zellen konnte mit der patch clamp Methode eine funktionelle ClC-2 Expression nachgewiesen werden. Obwohl angenommen wird, daß die Testosteronsekretion unter anderem von Chlorid reguliert wird, konnte eine hormonelle Dysfunktion der Leydig-Zellen als Ursache für die Keimzelldegeneration ausgeschlossen werden. Die Lokalisation von ClC-2 in der Plasmamembran von Sertoli-Zellen und der funktionelle Expression in diesen Zellen legen die Vermutung nahe, daß ClC-2 am transepithelialen Transport beteiligt ist.

Die Ähnlichkeit zwischen Keimepithel und Retina lassen vermuten, daß ClC-2 am transepithelialen Transport beteiligt ist und für die Regulation der Ionenhomöostase in kleinen Kompartimenten eine wichtige Rolle spielt. Beide Epithelien bilden eine Blut-Organschranke aus und versorgen die Keimzellen bzw. die Photorezeptoren mit wichtigen Nährstoffen, unter anderem mit Laktat. Laktat wird von einem Laktat-Protonen Kcotransporter transportiert, da-

durch kommt es zu einem Anstieg des extrazellulären pH-Werts. Der pH-Wert könnte durch einen Anionenaustauscher konstant gehalten werden. Das durch den Anionenaustauscher akkumulierte Chlorid kann die Zelle durch ClC-2 wieder verlassen. Dies ist eine Möglichkeit wie ClC-2 für eine notwendige Chloridsekretion in den schmalen Spalten zwischen Sertoli-Zellen und Keimzellen und zwischen RPE-Zellen und Photorezeptoren verantwortlich sein könnte. Von anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe wurde eine Veränderung des transepithelialen Stroms über das RPE der *Clcn2*^{-/-} Tiere festgestellt. Es sind aber noch weitere Untersuchungen notwendig, um herauszufinden wie ClC-2 an dem transepithelialen Transport beteiligt ist.

Neben der Analyse des Hauptphänotyps wurden einige Hypothesen der Funktion von ClC-2 überprüft. Im Vorfeld der Arbeit wurde durch Northern-Analyse gezeigt, daß ClC-2 in Gehirn, Magen, Lunge und Niere relativ spezifisch exprimiert wird (Malinowska et al., 1995; Murray et al., 1995; Murray et al., 1996; Obermüller et al., 1998). Wegen der relativ spezifischen Expression in Lunge und Niere wurde eine Funktion in der Entwicklung dieser Gewebe abgeleitet. Die Expression im Magen war Anlaß zur Vermutung, daß ClC-2 an der Magensäuresekretion beteiligt ist. Erstaunlicherweise zeigten die *Clcn2*^{-/-} Tiere in keinem dieser Gewebe einen auffälligen Phänotyp. Die Magensäuresekretion war nicht verändert, ebensowenig wurde ein Veränderung der Lunge oder der Niere beobachtet.

8 Ausblick

Die Analyse des Mausmodelle ist noch nicht abgeschlossen. Es wurden in beiden Mausmodellen zunächst die auffälligsten Veränderungen untersucht.

Da die *Kcc2*^{-/-} Mäuse schon kurz nach der Geburt starben, konnte die Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration nicht in phylogentisch jüngeren Bereichen des ZNS untersucht werden. Zur Zeit wird in der Arbeitsgruppe ein konditioneller *KCC2* Knockout hergestellt, damit ist es möglich, *KCC2* in ausgewählten Bereichen des ZNS auszuschalten.

Bisher ist nicht geklärt, die Störung der Atmung der *Kcc2*^{-/-} Tiere durch eine Fehlfunktion der Rhythmogenese im Atemzentrum selbst oder der Motoneurone begründet ist. Koshiya und Mitarbeiter zeigen durch Calcium Imaging, daß einzelne Neuronen in der Medulla oblongata eine rhythmische Aktivität aufweisen, die mit der Aktivität der Nervenwurzeln, die die Atemmuskulatur innervieren, synchronisiert ist (Koshiya und Smith, 1999). Mit dieser Methode könnte man untersuchen, ob eine rhythmische Aktivität von Neuronen im preBötzinger-Komplex zu beobachten ist. Dadurch erhält man möglicherweise einen genaueren Einblick in die Rhythmogenese und die Bedeutung der chloridabhängigen synaptischen Inhibition.

Kürzlich ist von Kuner und Augustine ein chloridsensitiver Farbstoff beschrieben worden, mit dem es möglich ist, die Chloridkonzentration nicht invasiv zu bestimmen (Kuner und Augustine, 2000). Dies ist eine elegante Methode den Einfluß von *KCC2* und von *ClC-2* auf die Chloridakkumulation in Neuronen zu untersuchen.

Die genaue Ursache für die Hodendegeneration der *Clcn2*^{-/-} Tiere konnte bisher nicht geklärt werden. Die erste Analyse der *Clcn2*^{-/-} Maus legt die Vermutung nahe, daß *ClC-2* am transepithelialen Transport beteiligt ist. Erste Messungen am RPE zeigen eine Veränderung des transepithelialen Transports. Die funktionelle Untersuchung des transepithelialen Transports des Keimepithels ist schwierig. Man kann versuchen Sertoli-Zellen auf Membranen polarisiert wachsen zu lassen und an diesem Epithel in vitro die Transportfunktion der Sertoli-Zellen untersuchen. Möglicherweise gelingt es, durch Messungen mit pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen oder Mikroelektroden den pH-Wert in Sertoli-Zellen oder RPE-Zellen zu bestimmen und damit eine Hinweis auf den Funktion von *ClC-2* zu erhalten. Durch transgene Expression von *ClC-2* in Sertoli-Zellen und RPE-Zellen soll versucht werden, die Degenerationen zu beheben. Eine erfolgreiche Wiederherstellung der Funktion der beiden Epithelien würde zeigen durch welche Zellen die Degeneration verursacht wird.

Es ist nicht auszuschließen, daß auch andere Organe, die ebenfalls eine starke Zell-Zell Interaktion haben, durch die Deletion von *Clcn2* verändert sind.

Weiterhin ist es nötig, die neuronale Beteiligung von ClC-2 genauer zu untersuchen. Mit dem Knockout kann die Frage beantwortet werden, ob der hyperpolarisationsaktivierte Chloridstrom, der in hippocampalen Neuronen beschrieben wurde, auf ClC-2 zurückzuführen ist. In weiteren Untersuchungen wäre zu klären, ob die inhibitorische Wirkung von Glyzin und GABA verändert ist. In diesem Zusammenhang ist auch die Kreuzung von *Clcn2*^{-/-} und *Kcc2*^{-/-} Mäusen interessant.

9 Kollaborationen

An dieser Stelle sind die Kollaborationen im einzelnen aufgeführt, die die Arbeit zum einen ermöglicht haben oder wichtige Informationen für die Analyse lieferten.

- Der *Cln2* Knockout wurde von Dr. M. Bösl und der *Kcc2* Knockout wurde von Dr. C. Hübner erzeugt. Sie habe sich auch um die Zucht der Tiere gekümmert.
- Herr Prof. A. Holstein hat bei der histologischen Analyse der Hodendegeneration geholfen. Die Semidünnschnitte sind in seinem Labor entstanden.
- Der RNAase Protection Assay und die in situ Hybridisierungen wurde zusammen mit Dr. I. Hermans-Borgmeyer und Dr. C. Hübner durchgeführt.
- Die Hormonewerte wurden im Labor von Dr. A. Mukhopadhyay, Institut für Hormonforschung, Hamburg und bei Prof. I. Huhtaniemie, Turku, Finnland bestimmt.
- Dr. M. Schweizer hat die Elektronenmikroskopie durchgeführt.

10 Veröffentlichungen

Neben den beschriebenen Untersuchungen wurde zu Beginn die Funktion von ClC-2 in heterologen Expressionssystemen untersucht. Es wurden Mutationen, die das Schaltverhalten von ClC-2 analysiert und untersucht wie das Schalten von der extrazellulären Chloridkonzentration abhängt. Die Ergebnisse sind veröffentlicht in:

Pusch, M., Jordt, S. E., Stein, V. und Jentsch, T. J. (1999). Chloride dependence of hyperpolarization-activated chloride channel gates. **Journal of Physiology (London)**, 515(Pt 2):341-353

In einer weiteren Studie wurde herausgefunden, daß der spannungsabhängige Kaliumkanal KCNQ2/KCNQ3 durch PKA moduliert wird. In der *inside-out* Konfiguration der patch clamp Technik wurde gezeigt, daß die katalytische Untereinheit von PKA den Strom, der durch KCNQ2/KCNQ3 heteromere Kaliumkanäle vermittelt wird, um etwa 30% erhöht. Mutationen in den Gene für von KCNQ2 und KNCQ3 führen zu einer kindlichen Epilepsieform. Die Ergebnisse sind veröffentlicht in

Schroeder, B. C., Kubisch, C., Stein, V. und Jentsch, T. J. (1998). Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. **Nature**, 396(6712):687-690

Teile der vorliegenden Disseration wurden mit dem Einverständnis der Betreuer sind zur Veröffentlichung eingereicht:

1. Bösl, M.R, Stein, V., Hübner, C., Zdebik, A., Jordt, S. E., Mukhopadhyay, A. K., Davidoff, M. S., Holstein, A. F. und Jentsch, T. J. (2000). Testicular and Retinal Degeneration in Mice defficient for the ClC-2 Chlorid Channel. **zur Veröffentlichung eingereicht bei EMBO**
2. Hübner, C., Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Meyer, T., Ballanyi, K. und Jentsch, T. J. (2000). Disruption of KCC2 reveals an essential role of KCl-cotransport in synaptic inhibition. **zur Veröffentlichung eingereicht bei Nature**



Literaturverzeichnis

- Adachi, S., Uchida, S., Ito, H., Hata, M., Hiroe, M., Marumo, F., und Sasaki, S. (1994). Two isoforms of a chloride channel predominantly expressed in thick ascending limb of Henle's loop and collecting ducts of rat kidney. **Journal of Biological Chemistry**, 269(26):17677-17683.
- Alcorn, D., Adamson, T. M., Lambert, T. F., Maloney, J. E., Ritchie, B. C., und Robinson, P. M. (1977). Morphological effects of chronic tracheal ligation and drainage in the fetal lamb lung. **Journal of Anatomie**, 123(3):649-660.
- Alger, B. E. und Nicoll, R. A. (1979). GABA-mediated biphasic inhibitory responses in hippocampus. **Nature**, 281(5729):315-317.
- Amlal, H., Paillard, M., und Bichara, M. (1994). Cl(-)-dependent NH₄⁺ transport mechanisms in medullary thick ascending limb cells. **American Journal of Physiology**, 267(6 Pt 1):C1607-1615.
- Andersen, P., Dingledine, R., Gjerstad, L., Langmoen, I. A., und Laursen, A. M. (1980). Two different responses of hippocampal pyramidal cells to application of gamma-amino butyric acid. **Journal of Physiology (London)**, 305:279-296.
- Anderson, M. P., Gregory, R. J., Thompson, S., Souza, D. W., Paul, S., Mulligan, R. C., Smith, A. E., und Welsh, M. J. (1991). Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. **Science**, 253(5016):202-205.
- Antal, M., Berki, A. C., Horvath, L., und O'Donovan, M. J. (1994). Developmental changes in the distribution of gamma-aminobutyric acid-immunoreactive neurons in the embryonic chick lumbosacral spinal cord. **Journal of Comparative Neurology**, 343(2):228-236.
- Ashcroft, F. M. (2000). **Ion Channels and Diseases**. Academic Press.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., und Smith, J. (1991). **Current protocols in molecular biology**. Greene Publishing and Wiley Interscience, New York.
- Avison, M. J., Gullans, S. R., Ogino, T., und Giebisch, G. (1988). Na⁺ and K⁺ fluxes stimulated by Na⁺-coupled glucose transport: evidence for a Ba²⁺-insensitive K⁺ efflux pathway in rabbit proximal tubules. **Journal of Membrane Biology**, 105(3):197-205.
- Ballanyi, K., Onimaru, H., und Homma, I. (1999). Respiratory network function in the isolated brainstem-spinal cord of newborn rats. **Progress in Neurobiology**, 59(6):583-634.
- Barnard, E. A., Skolnick, P., Olsen, R. W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A. N., und Langer, S. Z. (1998). International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. **Pharmacological Reviews**, 50(2):291-313.
- Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R., und Gaiarsa, J. L. (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. **Journal of Physiology (London)**, 416:303-325.
- Ben-Ari, Y., Khazipov, R., Leinekugel, X., Cailard, O., und Gaiarsa, J. L. (1997). GABA_A, NMDA and AMPA receptors: a develop-

- mentally regulated 'menage a trois'. *TINS*, 20(11):523-529.
- Benke, D., Mertens, S., Trzeciak, A., Gillissen, D., und Mohler, H. (1991). GABAA receptors display association of gamma 2-subunit with alpha 1- and beta 2/3-subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 266(7):4478-4483.
- Betz, H., Kuhse, J., Schmieden, V., Laube, B., Kirsch, J., und Harvey, R. J. (1999). Structure and functions of inhibitory and excitatory glycine receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 868:667-676.
- Biscoe, T. J. und Duchon, M. R. (1986). Synaptic physiology of spinal motoneurons of normal and spastic mice: an in vitro study. *Journal of Physiology (London)*, 379:275-292.
- Biscoe, T. J. und Fry, J. P. (1982). Some pharmacological studies on the spastic mouse. *British Journal of Pharmacology*, 75(1):23-35.
- Bormann, J., Hamill, O. P., und Sakmann, B. (1987). Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *Journal of Physiology (London)*, 385:243-286.
- Brandt, S. und Jentsch, T. J. (1995). ClC-6 and ClC-7 are two novel broadly expressed members of the CLC chloride channel family. *FEBS Letters*, 377(1):15-20.
- Bretag, A. H. (1987). Muscle chloride channels. *Physiological Reviews*, 67(2):618-724.
- Brockhaus, J. und Ballanyi, K. (1998). Synaptic inhibition in the isolated respiratory network of neonatal rats. *European Journal of Neuroscience*, 10(12):3823-3839.
- Bösl, M., Stein, V., Hübner, C., Jordt, S. E., Zdebik, A., Mukhopadhyay, A. K., Davidoff, M. S., Holstein, A. F., und Jentsch, T. J. (2000). Testicular and Retinal Degeneration in Mice deficient for the ClC-2 Chloride Channel. *Eingereicht bei EMBO*.
- Buckwalter, M. S., Cook, S. A., Davisson, M. T., White, W. F., und Camper, S. A. (1994). A frameshift mutation in the mouse alpha 1 glycine receptor gene (Gla1) results in progressive neurological symptoms and juvenile death. *Human Molecular Genetics*, 3(11):2025-2030.
- Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., Blake, J. A., FitzGerald, L. M., Clayton, R. A., Gocayne, J. D., Kerlavage, A. R., Dougherty, B. A., Tomb, J. F., Adams, M. D., Reich, C. I., Overbeek, R., Kirkness, E. F., Weinstock, K. G., Merrick, J. M., Glodek, A., Scott, J. L., Gehgagen, N. S. M., und Venter, J. C. (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*, 273(5278):1058-1073.
- Byers, S., Graham, R., Dai, H. N., und Hoxter, B. (1991). Development of Sertoli cell junctional specializations and the distribution of the tight-junction-associated protein ZO-1 in the mouse testis. *American Journal of Anatomy*, 191(1):35-47.
- Chen, G., Trombley, P. Q., und van den Pol, A. N. (1996). Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurones. *Journal of Physiology (London)*, 494(Pt 2):451-464.
- Cheng, S. H., Rich, D. P., Marshall, J., Gregory, R. J., Welsh, M. J., und Smith, A. E. (1991). Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell*, 66(5):1027-1036.
- Cherubini, E., Gaiarsa, J. L., und Ben-Ari, Y. (1991). GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *TINS*, 14(12):515-519.
- Chesler, M. und Kaila, K. (1992). Modulation of pH by neuronal activity. *TINS*, 15(10):396-402.
- Chew, C. S., Hersey, S. J., Sachs, G., und Berglinth, T. (1980). Histamine responsiveness of isolated gastric glands. *American Journal of Physiology*, 238(4):G312-320.
- Choi, M. S. und Cooke, B. A. (1990). Evidence for two independent pathways in the stimu-

- lation of steroidogenesis by luteinizing hormone involving chloride channels and cyclic AMP. **FEBS Letters**, 261(2):402-404.
- Christie, M. J., Williams, J. T., und North, R. A. (1989). Electrical coupling synchronizes subthreshold activity in locus coeruleus neurons in vitro from neonatal rats. **Journal of Neuroscience**, 9(10):3584-3589.
- Cid, L. P., Montrose-Rafizadeh, C., Smith, D. I., Guggino, W. B., und Cutting, G. R. (1995). Cloning of a putative human voltage-gated chloride channel (ClC-2) cDNA widely expressed in human tissues. **Human Molecular Genetics**, 4(3):407-413.
- Clark, S., Jordt, S. E., Jentsch, T. J., und Mathie, A. (1998). Characterization of the hyperpolarization-activated chloride current in dissociated rat sympathetic neurons. **Journal of Physiology (London)**, 506(Pt 3):665-678.
- Clayton, G. H., Owens, G. C., Wolff, J. S., und Smith, R. L. (1998a). Ontogeny of cation-Cl⁻ cotransporter expression in rat neocortex. **Developmental Brain Research**, 109(2):281-292.
- Clayton, G. H., Staley, K. J., Wilcox, C. L., Owens, G. C., und Smith, R. L. (1998b). Developmental expression of ClC-2 in the rat nervous system. **Developmental Brain Research**, 108(1-2):307-318.
- Cooke, B. A., Choi, M. C., Dirami, G., Lopez-Ruiz, M. P., und West, A. P. (1992). Control of steroidogenesis in Leydig cells. **Journal of Steroid Biochemistry**, 43(5):445-449.
- Costanzo, L. S. (1985). Localization of diuretic action in microperfused rat distal tubules: Ca and Na transport. **American Journal of Physiology**, 248(4 Pt 2):F527-535.
- Cotton, C. U., Boucher, R. C., und Gatzky, J. T. (1988). Bioelectric properties and ion transport across excised canine fetal and neonatal airways. **Journal of Applied Physiology**, 65(6):2367-2375.
- Davies, P. A., Hanna, M. C., Hales, T. G., und Kirkness, E. F. (1997). Insensitivity to anaesthetic agents conferred by a class of GABA(A) receptor subunit. **Nature**, 385(6619):820-823.
- Delpire, E., Lu, J., England, R., Dull, C., und Thorne, T. (1999). Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na⁺-K⁺-2Cl⁻ co-transporter. **Nature Genetics**, 22(2):192-195.
- Doty, H. U. und Zieglansberger, W. (1990). Visualizing unstained neurons in living brain slices by infrared DIC- videomicroscopy. **Brain Research**, 537(1-2):333-336.
- Duan, D., Winter, C., Cowley, S., Hume, J. R., und Horowitz, B. (1997). Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. **Nature**, 390(6658):417-421.
- Durand, G. M., Kovalchuk, Y., und Konnerth, A. (1996). Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. **Nature**, 381(6577):71-75.
- Edwards, F. A., Konnerth, A., Sakmann, B., und Takahashi, T. (1989). A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. **Pflügers Archiv**, 414(5):600-612.
- Ellison, D. H., Velazquez, H., und Wright, F. S. (1985). Stimulation of distal potassium secretion by low lumen chloride in the presence of barium. **American Journal of Physiology**, 248(5 Pt 2):F638-649.
- Enders, G. C. und May, J. J., n. (1994). Developmentally regulated expression of a mouse germ cell nuclear antigen examined from embryonic day 11 to adult in male and female mice. **Developmental Biology**, 163(2):331-340.
- Fahlke, C., Beck, C. L., und George, A. L., J. (1997a). A mutation in autosomal dominant myotonia congenita affects pore properties of the muscle chloride channel. **PNAS**, 94(6):2729-2734.

- Fahlke, C., Durr, C., und George, A. L. (1997b). Mechanism of ion permeation in skeletal muscle chloride channels. **Journal of General Physiology**, 110(5):551-564.
- Feldman, J. L. und Smith, J. C. (1989). Cellular mechanisms underlying modulation of breathing pattern in mammals. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 563:114-130.
- Feller, M. B., Wellis, D. P., Stellwagen, D., Werblin, F. S., und Shatz, C. J. (1996). Requirement for cholinergic synaptic transmission in the propagation of spontaneous retinal waves. **Science**, 272(5265):1182-1187.
- Fisher, S. E., van Bakel, I., Lloyd, S. E., Pearce, S. H., Thakker, R. V., und Craig, I. W. (1995). Cloning and characterization of CLCN5, the human kidney chloride channel gene implicated in Dent disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis). **Genomics**, 29(3):598-606.
- Friedrich, T., Breiderhoff, T., und Jentsch, T. J. (1999). Mutational analysis demonstrates that ClC-4 and ClC-5 directly mediate plasma membrane currents. **Journal of Biological Chemistry**, 274(2):896-902.
- Fujita, N., Mori, H., Yura, T., und Ishihama, A. (1994). Systematic sequencing of the Escherichia coli genome: analysis of the 2.4.4.1 min (110,917-193,643 bp) region. **Nucleic Acids Research**, 22(9):1637-1639.
- Furukawa, T., Horikawa, S., Terai, T., Ogura, T., Katayama, Y., und Hiraoka, M. (1995). Molecular cloning and characterization of a novel truncated form (ClC-2 beta) of ClC-2 alpha (ClC-2G) in rabbit heart. **FEBS Letters**, 375(1-2):56-62.
- Gao, B. X. und Ziskind-Conhaim, L. (1995). Development of glycine- and GABA-gated currents in rat spinal motoneurons. **Journal of Neurophysiology**, 74(1):113-121.
- Garry, D. J., Meeson, A., Yan, Z., und Williams, R. S. (2000). Life without myoglobin. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 57(6):896-898.
- Gaxiola, R. A., Yuan, D. S., Klausner, R. D., und Fink, G. R. (1998). The yeast ClC chloride channel functions in cation homeostasis. **PNAS**, 95(7):4046-4050.
- Geck, P., Pietrzyk, C., Burckhardt, B. C., Pfeiffer, B., und Heinz, E. (1980). Electrically silent cotransport on Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in Ehrlich cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 600(2):432-447.
- Gillen, C. M., Brill, S., Payne, J. A., und Forbush, B. I. (1996). Molecular cloning and functional expression of the K-Cl cotransporter from rabbit, rat, and human. A new member of the cation-chloride cotransporter family. **Journal of Biological Chemistry**, 271(27):16237-16244.
- Günther, W., Lüchow, A., Cluzeaud, F., Vandewalle, A., und Jentsch, T. J. (1998). ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. **PNAS**, 95(14):8075-8080.
- Gorczyńska, E., Spaliviero, J., und Handelsman, D. J. (1994). The relationship between 3',5'-cyclic adenosine monophosphate and calcium in mediating follicle-stimulating hormone signal transduction in Sertoli cells. **Endocrinology**, 134(1):293-300.
- Greene, J. R., Brown, N. H., DiDomenico, B. J., Kaplan, J., und Eide, D. J. (1993). The GEF1 gene of Saccharomyces cerevisiae encodes an integral membrane protein; mutations in which have effects on respiration and iron-limited growth. **Molecular and General Genetics**, 241(5-6):542-553.
- Greger, R. (1985). Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. **Physiological Reviews**, 65(3):760-797.
- Gründer, S., Thiemann, A., Pusch, M., und Jentsch, T. J. (1992). Regions involved in the opening of ClC-2 chloride channel by voltage and cell volume. **Nature**, 360(6406):759-762.

- Haas, M. und Forbush, B., r. (1998). The Na-K-Cl cotransporters. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, 30(2):161-172.
- Halestrap, A. P. und Price, N. T. (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. **Biochemical Journal**, 343 Pt 2:281-299.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., und Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. **Pflügers Archiv**, 391(2):85-100.
- Harrison, S. M. und Roffler-Tarlov, S. K. (1998). Cell death during development of testis and cerebellum in the mutant mouse weaver. **Developmental Biology**, 195(2):174-186.
- Hartenstein, B., Schenkel, J., Kuhse, J., Besenbeck, B., Kling, C., Becker, C. M., Betz, H., und Weiher, H. (1996). Low level expression of glycine receptor beta subunit transgene is sufficient for phenotype correction in spastic mice. **EMBO Journal**, 15(6):1275-1282.
- Hübner, C., Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Meyer, T., Ballanyi, K., und Jentsch, T. J. (2000). Disruption of KCC2 reveals an essential role of KCl-cotransport in synaptic inhibition. **Eingereicht bei Nature**.
- He, M., Wilde, A., und Kaderbhai, M. A. (1990). A simple single-step procedure for small-scale preparation of Escherichia coli plasmids. **Nucleic Acids Research**, 18(6):1660.
- Hechenberger, M., Schwappach, B., Fischer, W. N., Frommer, W. B., Jentsch, T. J., und Steinmeyer, K. (1996). A family of putative chloride channels from Arabidopsis and functional complementation of a yeast strain with a CLC gene disruption. **Journal of Biological Chemistry**, 271(52):33632-33638.
- Hinton, B. T. und Setchell, B. P. (1978). Fluid movement in the seminiferous tubules and the epididymal duct of the rat. **Journal of Physiology (London)**, 284:16P-17P.
- Hladky, S. B. und Haydon, D. A. (1972). Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A. I. Studies of the unit conductance channel. **Biochimica et Biophysica Acta**, 274(2):294-312.
- Ho, K., Nichols, C. G., Lederer, W. J., Lytton, J., Vassilev, P. M., Kanazirska, M. V., und Herbert, S. C. (1993). Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. **Nature**, 362(6415):31-38.
- Hodgkin, A., Huxley, A., und Katz, B. (1949). Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. **Archives des Sciences Physiologiques**, 3:129-150.
- Hoffmann, E. K. und Dunham, P. B. (1995). Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. **International Review of Cytology**, 161:173-262.
- Holmes, D. S. und Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. **Analytical Biochemistry**, 114(1):193-197.
- Holtzman, E. J., Kumar, S., Faaland, C. A., Warner, F., Logue, P. J., Erickson, S. J., Ricken, G., Waldman, J., und Dunham, P. B. (1998). Cloning, characterization, and gene organization of K-Cl cotransporter from pig and human kidney and C. elegans. **American Journal of Physiology**, 275(4 Pt 2):F550-564.
- Horn, R. und Marty, A. (1988). Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. **Journal of General Physiology**, 92(2):145-159.
- Hsu, S. M., Cossman, J., und Jaffe, E. S. (1983). A comparison of ABC, unlabeled antibody and conjugated immunohistochemical methods with monoclonal and polyclonal antibodies—an examination of germinal center of tonsils. **American Journal of Clinical Pathology**, 80(4):429-435.
- Huber, S., Schroppe, B., Kretzler, M., Schlondorff, D., und Horster, M. (1998). Single cell RT-PCR analysis of CLC-2 mRNA expression in ureteric bud tip. **American Journal of Physiology**, 274(5 Pt 2):F951-957.

-
- Isaac, J. T., Crair, M. C., Nicoll, R. A., and Malenka, R. C. (1997). Silent synapses during development of thalamocortical inputs. **Neuron**, 18(2):269-280.
- Jentsch, T. J., Friedrich, T., Schriever, A., and Yamada, H. (1999). The CLC chloride channel family. **Pflügers Archiv**, 437(6):783-795.
- Jentsch, T. J., Steinmeyer, K., and Schwarz, G. (1990). Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. **Nature**, 348(6301):510-514.
- Jonas, P., Bischofberger, J., and Sandkuhler, J. (1998). Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. **Science**, 281(5375):419-424.
- Joo, N. S., Clarke, L. L., Han, B. H., Forte, L. R., and Kim, H. D. (1999). Cloning of ClC-2 chloride channel from murine duodenum and its presence in CFTR knockout mice. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1446(3):431-437.
- Jordt, S. E. und Jentsch, T. J. (1997). Molecular dissection of gating in the ClC-2 chloride channel. **EMBO Journal**, 16(7):1582-1592.
- Jutte, N. H., Jansen, R., Grootegoed, J. A., Rommerts, F. F., Clausen, O. P., and van der Molen, H. J. (1982). Regulation of survival of rat pachytene spermatocytes by lactate supply from Sertoli cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, 65(2):431-438.
- Kaila, K. (1994). Ionic basis of GABA_A receptor channel function in the nervous system. **Progress in Neurobiology**, 42(4):489-537.
- Kaila, K., Voipio, J., Paalasmaa, P., Pasternack, M., and Deisz, R. A. (1993). The role of bicarbonate in GABA_A receptor-mediated IPSPs of rat neocortical neurones. **Journal of Physiology (London)**, 464:273-289.
- Kajita, H., Morishima, S., Shirakata, Y., Kotera, T., Ueda, S., Okuma, M., and Okada, Y. (1995). A mini Cl⁻ channel sensitive to external pH in the basolateral membrane of guinea-pig parietal cells. **Journal of Physiology (London)**, 488(Pt 1):57-64.
- Kamb, A., Iverson, L. E., and Tanouye, M. A. (1987). Molecular characterization of Shaker, a *Drosophila* gene that encodes a potassium channel. **Cell**, 50(3):405-413.
- Kaplan, M. R., Plotkin, M. D., Brown, D., Herbert, S. C., and Delpire, E. (1996). Expression of the mouse Na-K-2Cl cotransporter, mBSC2, in the terminal inner medullary collecting duct, the glomerular and extraglomerular mesangium, and the glomerular afferent arteriole. **Journal of Clinical Investigation**, 98(3):723-730.
- Kawasaki, M., Suzuki, M., Uchida, S., Sasaki, S., and Marumo, F. (1995). Stable and functional expression of the ClC-3 chloride channel in somatic cell lines. **Neuron**, 14(6):1285-1291.
- Kawasaki, M., Uchida, S., Monkawa, T., Miyawaki, A., Mikoshiba, K., Marumo, F., and Sasaki, S. (1994). Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells. **Neuron**, 12(3):597-604.
- Kerem, B., Rommens, J. M., Buchanan, J. A., Markiewicz, D., Cox, T. K., Chakravarti, A., Buchwald, M., and Tsui, L. C. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. **Science**, 245(4922):1073-1080.
- Ketchum, K. A., Joiner, W. J., Sellers, A. J., Kaczmarek, L. K., and Goldstein, S. A. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. **Nature**, 376(6542):690-695.
- Khazipov, R., Ragozzino, D., and Bregestovski, P. (1995). Kinetics and Mg²⁺ block of N-methyl-D-aspartate receptor channels during postnatal development of hippocampal CA3 pyramidal neurons. **Neuroscience**, 69(4):1057-1065.
- Kieferle, S., Fong, P., Bens, M., Vandewalle, A., and Jentsch, T. J. (1994). Two highly homologous members of the ClC chloride chan-

- nel family in both rat and human kidney. *PNAS*, 91(15):6943–6947.
- Kirsch, J., Kuhse, J., und Betz, H. (1995). Targeting of glycine receptor subunits to gephyrin-rich domains in transfected human embryonic kidney cells. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 6(5):450–461.
- Kleene, K. C., Distel, R. J., und Hecht, N. B. (1984). Translational regulation and deadenylation of a protamine mRNA during spermiogenesis in the mouse. *Developmental Biology*, 105(1):71–79.
- Koch, M. C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M., Zoll, B., Lehmann-Horn, F., Grzeschik, K. H., und Jentsch, T. J. (1992). The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science*, 257(5071):797–800.
- Koshiya, N. und Smith, J. C. (1999). Neuronal pacemaker for breathing visualized in vitro. *Nature*, 400(6742):360–363.
- Krantz, J. C., Truitt, E. B., Ling, A. S. C., und Speers, L. (1957). Anesthesia: Pharmacologic response to hexafluorodiethyl ether. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 121:363–368.
- Krapivinsky, G. B., Ackerman, M. J., Gordon, E. A., Krapivinsky, L. D., und Clapham, D. E. (1994). Molecular characterization of a swelling-induced chloride conductance regulatory protein, pICln. *Cell*, 76(3):439–448.
- Krasowski, M. D. (2000). Differential modulatory actions of the volatile convulsant flurothyl and its anesthetic isomer at inhibitory ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*, 39(7):1168–1183.
- Krieg, P. A. und Melton, D. A. (1984). Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Research*, 12(18):7057–7070.
- Kuner, T. und Augustine, G. J. (2000). Neurotechnique: A Genetically Encoded Ratiometric Indicator for Chloride: Capturing Chloride Transients in Cultured Hippocampal Neurons. *Neuron*, 27:447–459.
- Kyrozis, A. und Reichling, D. B. (1995). Perforated-patch recording with gramicidin avoids artifactual changes in intracellular chloride concentration. *Journal of Neuroscience Methods*, 57(1):27–35.
- Lauder, J. M. (1993). Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *TINS*, 16(6):233–240.
- Lauf, P. K., Bauer, J., Adragna, N. C., Fujise, H., Zade-Oppen, A. M., Ryu, K. H., und Delpire, E. (1992). Erythrocyte K-Cl cotransport: properties and regulation. *American Journal of Physiology*, 263(5 Pt 1):C917–932.
- Lüddens, H., Korpi, E. R., und Seeburg, P. H. (1995). GABAA/benzodiazepine receptor heterogeneity: neurophysiological implications. *Neuropharmacology*, 34(3):245–254.
- Lehmann-Horn, F. und Jurkat-Rott, K. (1999). Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiological Reviews*, 79(4):1317–1372.
- Leinekugel, X., Medina, I., Khalilov, I., Ben-Ari, Y., und Khazipov, R. (1997). Ca²⁺ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron*, 18(2):243–255.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., und Barhanin, J. (1996). TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO Journal*, 15(5):1004–1011.
- Liao, D. und Malinow, R. (1996). Deficiency in induction but not expression of LTP in hippocampal slices from young rats. *Learning and Memory*, 3(2-3):138–149.
- Liu, D., Matzuk, M. M., Sung, W. K., Guo, Q., Wang, P., und Wolgemuth, D. J. (1998). Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. *Nature Genetics*, 20(4):377–380.
- Lloyd, D. P. C. (1943). Conduction and synaptic transmission of reflex response to stretch

- in spinal cats. **Journal of Neurophysiology**, 6:317-326.
- Lloyd, S. E., Gunther, W., Pearce, S. H., Thomson, A., Bianchi, M. L., Bosio, M., Craig, I. W., Fisher, S. E., Scheinman, S. J., Wrong, O., Jentsch, T. J., und Thakker, R. V. (1997). Characterisation of renal chloride channel, CLCN5, mutations in hypercalciuric nephrolithiasis (kidney stones) disorders. **Human Molecular Genetics**, 6(8):1233-1239.
- Lloyd, S. E., Pearce, S. H., Fisher, S. E., Steinmeyer, K., Schwappach, B., Scheinman, S. J., Harding, B., Bolino, A., Devoto, M., Goodyer, P., Rigden, S. P., Wrong, O., Jentsch, T. J., Craig, I. W., und Thakker, R. V. (1996). A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. **Nature**, 379(6564):445-449.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., und Darnell, J. (1995). **Molecular Cell Biology**. Scientific American Books, 2nd edition.
- Lorenz, C., Pusch, M., und Jentsch, T. J. (1996). Heteromultimeric ClC Chloride Channels With Novel Properties. **PNAS**, 93:13362-13366.
- LoTurco, J. J., Owens, D. F., Heath, M. J., Davis, M. B., und Kriegstein, A. R. (1995). GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. **Neuron**, 15(6):1287-1298.
- Ludewig, U., Pusch, M., und Jentsch, T. J. (1996). Two physically distinct pores in the dimeric ClC-0 chloride channel. **Nature**, 383(6598):340-343.
- Lukacs, G. L., Chang, X. B., Bear, C., Kartner, N., Mohamed, A., Riordan, J. R., und Grinstein, S. (1993). The delta F508 mutation decreases the stability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the plasma membrane. Determination of functional half-lives on transfected cells. **Journal of Biological Chemistry**, 268(29):21592-21598.
- Ma, W., Behar, T., und Barker, J. L. (1992). Transient expression of GABA immunoreactivity in the developing rat spinal cord. **Journal of Comparative Neurology**, 325(2):271-290.
- Malinowska, D. H., Kupert, E. Y., Bahinski, A., Sherry, A. M., und Cuppoletti, J. (1995). Cloning, functional expression, and characterization of a PKA-activated gastric Cl⁻ channel. **American Journal of Physiology**, 268(1 Pt 1):C191-C200.
- Marty, A. und Finkelstein, A. (1975). Pores formed in lipid bilayer membranes by nystatin, Differences in its one-sided and two-sided action. **Journal of General Physiology**, 65(4):515-526.
- Matsumura, Y., Uchida, S., Kondo, Y., Miyazaki, H., Ko, S. B., Hayama, A., Morimoto, T., Liu, W., Arisawa, M., Sasaki, S., und Marumo, F. (1999). Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel. **Nature Genetics**, 21(1):95-98.
- McCray, P. B., J., Bettencourt, J. D., und Bastacky, J. (1992a). Developing bronchopulmonary epithelium of the human fetus secretes fluid. **American Journal of Physiology**, 262(3 Pt 1):L270-279.
- McCray, P. B., J., Reenstra, W. W., Louie, E., Johnson, J., Bettencourt, J. D., und Bastacky, J. (1992b). Expression of CFTR and presence of cAMP-mediated fluid secretion in human fetal lung. **American Journal of Physiology**, 262(4 Pt 1):L472-481.
- McKernan, R. M., Quirk, K., Prince, R., Cox, P. A., Gillard, N. P., Ragan, C. I., und Whiting, P. (1991). GABA_A receptor subtypes immunopurified from rat brain with alpha subunit-specific antibodies have unique pharmacological properties. **Neuron**, 7(4):667-676.
- Meyer-Kleine, C., Steinmeyer, K., Ricker, K., Jentsch, T. J., und Koch, M. C. (1995). Spectrum of mutations in the major human skeletal muscle chloride channel gene (CLCN1) leading to myotonia. **American Journal of Human Genetics**, 57(6):1325-1334.
- Middleton, R. E., Pheasant, D. J., und Miller, C.

- (1994). Purification, reconstitution, and subunit composition of a voltage-gated chloride channel from Torpedo electroplax. **Biochemistry**, 33(45):13189-13198.
- Middleton, R. E., Pheasant, D. J., und Miller, C. (1996). Homodimeric architecture of a ClC-type chloride ion channel [see comments]. **Nature**, 383(6598):337-340.
- Miles, R. (1999). Neurobiology, A homeostatic switch (News and Views). **Nature**, 397(6716):215-216.
- Misgeld, U., Deisz, R. A., Dodt, H. U., und Lux, H. D. (1986). The role of chloride transport in postsynaptic inhibition of hippocampal neurons. **Science**, 232(4756):1413-1415.
- Mülhardt, C., Fischer, M., Gass, P., Simon-Chazottes, D., Guenet, J. L., Kuhse, J., Betz, H., und Becker, C. M. (1994). The spastic mouse: aberrant splicing of glycine receptor beta subunit mRNA caused by intronic insertion of L1 element. **Neuron**, 13(4):1003-1015.
- Mooney, R., Penn, A. A., Gallego, R., und Shatz, C. J. (1996). Thalamic relay of spontaneous retinal activity prior to vision. **Neuron**, 17(5):863-874.
- Moorman, J. R., Palmer, C. J., John, J. E. d., Durieux, M. E., und Jones, L. R. (1992). Phospholemman expression induces a hyperpolarization-activated chloride current in *Xenopus* oocytes. **Journal of Biological Chemistry**, 267(21):14551-14554.
- Mount, D. B., Delpire, E., Gamba, G., Hall, A. E., Poch, E., Hoover, R. S., und Hebert, S. C. (1998). The electroneutral cation-chloride cotransporters. **Journal of Experimental Biology**, 201(Pt 14):2091-2102.
- Mount, D. B., Hoover, R. S., und Hebert, S. C. (1997). The molecular physiology of electroneutral cation-chloride cotransport. **Journal of Membrane Biology**, 158(3):177-186.
- Mount, D. B., Mercado, A., Song, L., Xu, J., George, A. L., J., Delpire, E., und Gamba, G. (1999). Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. **Journal of Biological Chemistry**, 274(23):16355-16362.
- Murray, C. B., Chu, S., und Zeitlin, P. L. (1996). Gestational and tissue-specific regulation of ClC-2 chloride channel expression. **American Journal of Physiology**, 271(5 Pt 1):L829-837.
- Murray, C. B., Morales, M. M., Flotte, T. R., McGrath-Morrow, S. A., Guggino, W. B., und Zeitlin, P. L. (1995). ClC-2: a developmentally dependent chloride channel expressed in the fetal lung and downregulated after birth. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 12(6):597-604.
- Myers, V. B. und Haydon, D. A. (1972). Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A. II. The ion selectivity. **Biochimica et Biophysica Acta**, 274(2):313-322.
- Nantel, F., Monaco, L., Foulkes, N. S., Masquillier, D., LeMeur, M., Henriksen, K., Dierich, A., Parvinen, M., und Sassone-Corsi, P. (1996). Spermiogenesis deficiency and germ-cell apoptosis in CREM-mutant mice. **Nature**, 380(6570):159-162.
- Nelson, P. G., Yu, C., Fields, R. D., und Neale, E. A. (1989). Synaptic connections in vitro: modulation of number and efficacy by electrical activity. **Science**, 244(4904):585-587.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., und et al. (1984). Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. **Nature**, 312(5990):121-127.
- Noulin, J. F., Fayolle-Julien, E., Desaphy, J. F., Poindessault, J. P., und Joffre, M. (1996). Swelling and cAMP on hyperpolarization-activated Cl⁻ conductance in rat Leydig cells. **American Journal of Physiology**, 271(1 Pt 1):C74-84.
- Noulin, J. F. und Joffre, M. (1993). Characterization and cyclic AMP-dependence of a hyperpolarization-activated chloride conductance in Leydig cells from mature rat

- testis. **Journal of Membrane Biology**, 133(1):1-15.
- Obermüller, N., Gretz, N., Kriz, W., Reilly, R. F., und Witzgall, R. (1998). The swelling-activated chloride channel ClC-2, the chloride channel ClC-3, and ClC-5, a chloride channel mutated in kidney stone disease, are expressed in distinct subpopulations of renal epithelial cells. **Journal of Clinical Investigations**, 101(3):635-642.
- O'Neal, W. K., Hastly, P., McCray, P. B., Jr., Casey, B., Rivera-Perez, J., Welsh, M. J., Beaudet, A. L., und Bradley, A. (1993). A severe phenotype in mice with a duplication of exon 3 in the cystic fibrosis locus. **Human Molecular Genetics**, 2(10):1561-1569.
- Onimaru, H., Arata, A., und Homma, I. (1990). Inhibitory synaptic inputs to the respiratory rhythm generator in the medulla isolated from newborn rats. **Pflügers Archiv**, 417(4):425-432.
- Onimaru, H., Ballanyi, K., und Richter, D. W. (1996). Calcium-dependent responses in neurons of the isolated respiratory network of newborn rats. **Journal of Physiology (London)**, 491(Pt 3):677-695.
- Onimaru, H. und Homma, I. (1987). Respiratory rhythm generator neurons in medulla of brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. **Brain Research**, 403(2):380-384.
- Pace, A. J., Lee, E., Athirakul, K., Coffman, T. M., O'Brien, D. A., und Koller, B. H. (2000). Failure of spermatogenesis in mouse lines deficient in the Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-2Cl⁽⁻⁾ cotransporter. **Journal of Clinical Investigations**, 105(4):441-450.
- Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Tempel, B. L., Jan, Y. N., und Jan, L. Y. (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. **Science**, 237(4816):749-753.
- Papazian, D. M., Timpe, L. C., Jan, Y. N., und Jan, L. Y. (1991). Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. **Nature**, 349(6307):305-310.
- Payne, J. A., Stevenson, T. J., und Donaldson, L. F. (1996). Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. **Journal of Biological Chemistry**, 271(27):16245-16252.
- Pellegrino, C. M., Rybicki, A. C., Musto, S., Nagel, R. L., und Schwartz, R. S. (1998). Molecular identification and expression of erythroid K:Cl cotransporter in human and mouse erythroleukemic cells. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, 24(1):31-40.
- Perkins, K. L. (1999). Cl⁻ accumulation does not account for the depolarizing phase of the synaptic GABA response in hippocampal pyramidal cells. **Journal of Neurophysiology**, 82(2):768-777.
- Perkins, K. L. und Wong, R. K. (1996). Ionic basis of the postsynaptic depolarizing GABA response in hippocampal pyramidal cells. **Journal of Neurophysiology**, 76(6):3886-3894.
- Perkins, K. L. und Wong, R. K. (1997). The depolarizing GABA response. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 75(5):516-519.
- Philp, N. J., Yoon, H., und Grollman, E. F. (1998). Monocarboxylate transporter MCT1 is located in the apical membrane and MCT3 in the basal membrane of rat RPE. **American Journal of Physiology**, 274(6 Pt 2):R1824-R1828.
- Piwon, N., Günther, W., Schwake, M., Bösl, M. R., und Jentsch, T. J. (2000). ClC-5 Cl⁻ channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. **Nature**, in press.
- Plotkin, M. D., Kaplan, M. R., Peterson, L. N., Gullans, S. R., Hebert, S. C., und Delpire, E. (1997a). Expression of the Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-2Cl⁻ cotransporter BSC2 in the nervous system. **American Journal of Physiology**, 272(1 Pt 1):C173-183.

- Plotkin, M. D., Snyder, E. Y., Hebert, S. C., and Delpire, E. (1997b). Expression of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: a possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain. **Journal of Neurobiology**, 33(6):781-795.
- Pongs, O., Kecskemethy, N., Muller, R., Krah-Jentgens, I., Baumann, A., Kiltz, H. H., Canal, I., Llamazares, S., and Ferrus, A. (1988). Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. **EMBO Journal**, 7(4):1087-1096.
- Prichard, J. W., Gallagher, B. B., and Glaser, G. H. (1969). Experimental seizure-threshold testing with fluorthyl. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 166(1):170-178.
- Prior, P., Schmitt, B., Grenningloh, G., Pribilla, I., Multhaup, G., Beyreuther, K., Maulet, Y., Werner, P., Langosch, D., Kirsch, J., and et al. (1992). Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. **Neuron**, 8(6):1161-1170.
- Protopopov, A. I., Gizatullin, R. Z., Vorobieva, N. V., Protopopova, M. V., Kiss, C., Kashuba, V. I., Klein, G., Kisselev, L. L., Graphodatsky, A. S., and Zabarovsky, E. R. (1996). Human chromosome 3: high-resolution fluorescence in situ hybridization mapping of 40 unique NotI linking clones homologous to genes and cDNAs. **Chromosome Research**, 4(6):443-447.
- Pusch, M., Jordt, S. E., Stein, V., and Jentsch, T. J. (1999). Chloride dependence of hyperpolarization-activated chloride channel gates. **Journal of Physiology (London)**, 515(Pt 2):341-353.
- Pusch, M., Ludewig, U., and Jentsch, T. J. (1997). Temperature dependence of fast and slow gating relaxations of ClC-0 chloride channels. **Journal of General Physiology**, 109(1):105-116.
- Pusch, M., Ludewig, U., Rehfeldt, A., and Jentsch, T. J. (1995a). Gating of the voltage-dependent chloride channel ClC-0 by the permeant anion. **Nature**, 373(6514):527-531.
- Pusch, M., Steinmeyer, K., Koch, M. C., and Jentsch, T. J. (1995b). Mutations in dominant human myotonia congenita drastically alter the voltage dependence of the ClC-1 chloride channel. **Neuron**, 15(6):1455-1463.
- Quinton, P. M. und Reddy, M. M. (1992). Control of CFTR chloride conductance by ATP levels through non-hydrolytic binding [see comments]. **Nature**, 360(6399):79-81.
- Race, J. E., Makhoulouf, F. N., Logue, P. J., Wilson, F. H., Dunham, P. B., and Holtzman, E. J. (1999). Molecular cloning and functional characterization of KCC3, a new K-Cl cotransporter. **American Journal of Physiology**, 277(6 Pt 1):C1210-1219.
- Rajendra, S. und Schofield, P. R. (1995). Molecular mechanisms of inherited startle syndromes. **TINS**, 18(2):80-82.
- Ramirez, J. M., Quellmalz, U. J., and Richter, D. W. (1996). Postnatal changes in the mammalian respiratory network as revealed by the transverse brainstem slice of mice. **Journal of Physiology (London)**, 491(Pt 3):799-812.
- Rekling, J. C. und Feldman, J. L. (1998). Pre-Botzinger complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. **Annual Reviews of Physiology**, 60:385-405.
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J. L., and et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. **Science**, 245(4922):1066-1073.
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., and Kaila, K. (1999). The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation [see comments]. **Nature**, 397(6716):251-255.

- Russell, L. (1977). Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. **American Journal of Anatomy**, 148(3):313-328.
- Russell, L. D. (1978). The blood-testis barrier and its formation relative to spermatocyte maturation in the adult rat: a lanthanum tracer study. **Anatomical Record**, 190(1):99-111.
- Sakamoto, H., Kawasaki, M., Uchida, S., Sasaki, S., and Marumo, F. (1996). Identification of a new outwardly rectifying Cl⁻ channel that belongs to a subfamily of the CLC Cl⁻ channels. **Journal of Biological Chemistry**, 271(17):10210-10216.
- Sakmann, B. und Neher, E. (1995). **Single Channel Recording**. 2 edition.
- Sambrook, J., Fritsch, E., und Maniatis, T. (1989). **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbour Press, 2. edition.
- Sasaki, S., Ishibashi, K., Yoshiyama, N., und Shiigai, T. (1988). KCl co-transport across the basolateral membrane of rabbit renal proximal straight tubules. **Journal of Clinical Investigations**, 81(1):194-199.
- Sassone-Corsi, P. (1997). Transcriptional checkpoints determining the fate of male germ cells. **Cell**, 88(2):163-166.
- Saul, B., Schmieden, V., Kling, C., Mulhardt, C., Gass, P., Kuhse, J., und Becker, C. M. (1994). Point mutation of glycine receptor alpha 1 subunit in the spasmodic mouse affects agonist responses. **FEBS Letters**, 350(1):71-76.
- Saviane, C., Conti, F., und Pusch, M. (1999). The muscle chloride channel CLC-1 has a double-barreled appearance that is differentially affected in dominant and recessive myotonia. **Journal of General Physiology**, 113(3):457-468.
- Schmidt-Rose, T. und Jentsch, T. J. (1997). Transmembrane topology of a CLC chloride channel. **PNAS**, 94(14):7633-7638.
- Schneider, S. P. und Fyffe, R. E. (1992). Involvement of GABA and glycine in recurrent inhibition of spinal motoneurons. **Journal of Neurophysiology**, 68(2):397-406.
- Schriever, A. M., Friedrich, T., Pusch, M., und Jentsch, T. J. (1999). CLC chloride channels in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Biological Chemistry**, 274(48):34238-34244.
- Schultheis, P. J., Clarke, L. L., Meneton, P., Harline, M., Boivin, G. P., Stemmermann, G., Duffy, J. J., Doetschman, T., Miller, M. L., und Shull, G. E. (1998). Targeted disruption of the murine Na⁺/H⁺ exchanger isoform 2 gene causes reduced viability of gastric parietal cells and loss of net acid secretion. **Journal of Clinical Investigation**, 101(6):1243-1253.
- Schumacher, M., Schafer, G., Holstein, A. F., und Hilz, H. (1978). Rapid isolation of mouse Leydig cells by centrifugation in Percoll density gradients with complete retention of morphological and biochemical integrity. **FEBS Letters**, 91(2):333-338.
- Schwappach, B., Stobrawa, S., Hechenberger, M., Steinmeyer, K., und Jentsch, T. J. (1998). Golgi localization and functionally important domains in the NH₂ and COOH terminus of the yeast CLC putative chloride channel Gef1p. **Journal of Biological Chemistry**, 273(24):15110-15118.
- Sheng, H. Z., Fields, R. D., und Nelson, P. G. (1993). Specific regulation of immediate early genes by patterned neuronal activity. **Journal of Neuroscience Research**, 35(5):459-467.
- Shull, G. E., Miller, M. L., und Schultheis, P. J. (2000). Lessons from genetically engineered animal models VIII. Absorption and secretion of ions in the gastrointestinal tract. **American Journal of Physiology**, 278(2):G185-190.
- Signorini, S., Liao, Y. J., Duncan, S. A., Jan, L. Y., und Stoffel, M. (1997). Normal cerebellar development but susceptibility to seizures in mice lacking G protein-coupled, inwardly rectifying K⁺ channel GIRK2. **PNAS**, 94(3):923-927.

-
- Simon, D. B., Bindra, R. S., Mansfield, T. A., Nelson-Williams, C., Mendonca, E., Stone, R., Schurman, S., Nayir, A., Alpay, H., Bakaloglu, A., Rodriguez-Soriano, J., Morales, J. M., Sanjad, S. A., Taylor, C. M., Pilz, D., Brem, A., Trachtman, H., Griswold, W., Richard, G. A., John, E., und Lifton, R. P. (1997). Mutations in the chloride channel gene, *CLCNKB*, cause Bartter's syndrome type III. **Nature Genetics**, 17(2):171-178.
- Simon, D. B., Karet, F. E., Hamdan, J. M., DiPietro, A., Sanjad, S. A., und Lifton, R. P. (1996a). Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter *NKCC2*. **Nature Genetics**, 13(2):183-188.
- Simon, D. B., Nelson-Williams, C., Bia, M. J., Ellison, D., Karet, F. E., Molina, A. M., Vaara, I., Iwata, F., Cushner, H. M., Koolen, M., Gainza, F. J., Gitleman, H. J., und Lifton, R. P. (1996b). Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. **Nature Genetics**, 12(1):24-30.
- Sivilotti, L. und Nistri, A. (1991). GABA receptor mechanisms in the central nervous system. **Progress in Neurobiology**, 36(1):35-92.
- Smith, J. C., Ellenberger, H. H., Ballanyi, K., Richter, D. W., und Feldman, J. L. (1991). Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. **Science**, 254(5032):726-729.
- Smith, R. L., Clayton, G. H., Wilcox, C. L., Escudero, K. W., und Staley, K. J. (1995). Differential expression of an inwardly rectifying chloride conductance in rat brain neurons: a potential mechanism for cell-specific modulation of postsynaptic inhibition. **Journal of Neuroscience**, 15(5 Pt 2):4057-4067.
- Snouwaert, J. N., Brigman, K. K., Latour, A. M., Malouf, N. N., Boucher, R. C., Smithies, O., und Koller, B. H. (1992). An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. **Science**, 257(5073):1083-1088.
- Spitzer, N. C., Olson, E., und Gu, X. (1995). Spontaneous calcium transients regulate neuronal plasticity in developing neurons. **Journal of Neurobiology**, 26(3):316-324.
- Staley, K., Smith, R., Schaack, J., Wilcox, C., und Jentsch, T. J. (1996). Alteration of GABA receptor function following gene transfer of the *CLC-2* chloride channel. **Neuron**, 17(3):543-551.
- Staley, K. J., Soldo, B. L., und Proctor, W. R. (1995). Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABA receptors. **Science**, 269(5226):977-981.
- Steinmeyer, K., Klocke, R., Ortland, C., Grone-meier, M., Jockusch, H., Gründer, S., und Jentsch, T. J. (1991a). Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice. **Nature**, 354(6351):304-308.
- Steinmeyer, K., Lorenz, C., Pusch, M., Koch, M. C., und Jentsch, T. J. (1994). Multimeric structure of *CLC-1* chloride channel revealed by mutations in dominant myotonia congenita (Thomsen). **EMBO Journal**, 13(4):737-743.
- Steinmeyer, K., Ortland, C., und Jentsch, T. J. (1991b). Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. **Nature**, 354(6351):301-304.
- Strecker, G. J., Jackson, M. B., und Dudek, F. E. (1994). Blockade of NMDA-activated channels by magnesium in the immature rat hippocampus. **Journal of Neurophysiology**, 72(4):1538-1548.
- Stuart, G. J., Dodt, H. U., und Sakmann, B. (1993). Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. **Pflügers Archiv**, 423(5-6):511-518.
- Suzue, T. (1984). Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat. **Journal of Physiology (London)**, 354:173-183.

- Sweeney, C., Murphy, M., Kubelka, M., Ravnik, S. E., Hawkins, C. F., Wolgemuth, D. J., and Carrington, M. (1996). A distinct cyclin A is expressed in germ cells in the mouse. **Development**, 122(1):53-64.
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T., und Numa, S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. **Nature**, 328(6128):313-318.
- Thiemann, A., Gründer, S., Pusch, M., und Jentsch, T. J. (1992). A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. **Nature**, 356(6364):57-60.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., und Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, 25(24):4876-4882.
- Thompson, S. M. und Gähwiler, B. H. (1989). Activity-dependent disinhibition. I. Repetitive stimulation reduces IPSP driving force and conductance in the hippocampus in vitro. **Journal of Neurophysiology**, 61(3):501-511.
- Tserentsoodol, N., Shin, B. C., Suzuki, T., und Takata, K. (1998). Colocalization of tight junction proteins, occludin and ZO-1, and glucose transporter GLUT1 in cells of the blood-ocular barrier in the mouse eye. **Histochemistry and Cell Biology**, 110(6):543-551.
- Uchida, S., Sasaki, S., Furukawa, T., Hiraoka, M., Imai, T., Hirata, Y., und Marumo, F. (1993). Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla [published erratum appears in J Biol Chem 1994 Jul 22;269(29):19192]. **Journal of Biological Chemistry**, 268(6):3821-3824.
- Waites, G. M. und Gladwell, R. T. (1982). Physiological significance of fluid secretion in the testis and blood- testis barrier. **Physiological Reviews**, 62(2):624-671.
- Waldegger, S. und Jentsch, T. J. (2000). Functional and structural analysis of ClC-K chloride channels involved in renal disease. **Journal of Biological Chemistry**, 275(32):24527-24533.
- Walton, M. K., Schaffner, A. E., und Barker, J. L. (1993). Sodium channels, GABAA receptors, and glutamate receptors develop sequentially on embryonic rat spinal cord cells. **Journal of Neuroscience**, 13(5):2068-2084.
- Weinreich, F. und Jentsch, T. J. (2000a). Neurological diseases caused by ion-channel mutations. **Current Opinion in Neurobiology**, 10(3):409-415.
- Weinreich, F. und Jentsch, T. J. (2000b). Pores formed by single subunits in mixed dimers of different CLC chloride channels. **Journal of Biological Chemistry**.
- Welsh, M. J., Denning, G. M., Ostedgaard, L. S., und Anderson, M. P. (1993). Dysfunction of CFTR bearing the delta F508 mutation. **Journal of Cell Science. Supplement**, 17:235-239.
- Wentworth, L. E. (1984). The development of the cervical spinal cord of the mouse embryo. I. A Golgi analysis of ventral root neuron differentiation. **Journal of Comparative Neurology**, 222(1):81-95.
- Williams, J. R., Sharp, J. W., Kumari, V. G., Wilson, M., und Payne, J. A. (1999). The neuron-specific K-Cl cotransporter, KCC2. Antibody development and initial characterization of the protein. **Journal of Biological Chemistry**, 274(18):12656-12664.
- Wingo, C. S. (1989). Reversible chloride-dependent potassium flux across the rabbit cortical collecting tubule. **American Journal of Physiology**, 256(4 Pt 2):F697-704.
- Wollnik, B., Kubisch, C., Steinmeyer, K., und Pusch, M. (1997). Identification of functionally important regions of the muscular

-
- chloride channel CIC-1 by analysis of recessive and dominant myotonic mutations. **Human Molecular Genetics**, 6(5):805-811.
- Wong, P. Y. (1998). CFTR gene and male fertility. **Molecular Human Reproduction**, 4(2):107-110.
- Wong, R. K. und Watkins, D. J. (1982). Cellular factors influencing GABA response in hippocampal pyramidal cells. **Journal of Neurophysiology**, 48(4):938-951.
- Wong, R. O., Meister, M., und Shatz, C. J. (1993). Transient period of correlated bursting activity during development of the mammalian retina. **Neuron**, 11(5):923-938.
- Wu, G., Malinow, R., und Cline, H. T. (1996). Maturation of a central glutamatergic synapse. **Science**, 274(5289):972-976.
- Wu, W. L., Ziskind-Conhaim, L., und Sweet, M. A. (1992). Early development of glycine- and GABA-mediated synapses in rat spinal cord. **Journal of Neuroscience**, 12(10):3935-3945.
- Xie, H. und Ziskind-Conhaim, L. (1995). Blocking Ca²⁺-dependent synaptic release delays motoneuron differentiation in the rat spinal cord. **Journal of Neuroscience**, 15(9):5900-5911.
- Yuste, R., Nelson, D. A., Rubin, W. W., und Katz, L. C. (1995). Neuronal domains in developing neocortex: mechanisms of coactivation. **Neuron**, 14(1):7-17.
- Zeitlin, P. L., Loughlin, G. M., und Guggino, W. B. (1988). Ion transport in cultured fetal and adult rabbit tracheal epithelia. **American Journal of Physiology**, 254(5 Pt 1):C691-698.
- Zeuthen, T., Hamann, S., und la Cour, M. (1996). Cotransport of H⁺, lactate and H₂O by membrane proteins in retinal pigment epithelium of bullfrog. **Journal of Physiology (London)**, 497(Pt 1):3-17.
- Zhang, L., Spigelman, I., und Carlen, P. L. (1991). Development of GABA-mediated, chloride-dependent inhibition in CA1 pyramidal neurons of immature rat hippocampal slices. **Journal of Physiology (London)**, 444:25-49.
- Zhang, S. J. und Jackson, M. B. (1993). GABA-activated chloride channels in secretory nerve endings. **Science**, 259(5094):531-534.
- Ziskind-Conhaim, L. (1998). Physiological functions of GABA-induced depolarizations in the developing rat spinal cord. **Perspectives on Developmental Neurobiology**, 5(2-3):279-287.



Lebenslauf

Zur Person

Name Valentin Stein

Geburtsdatum 20.09.1971

Geburtsort Paderborn

Familienstand ledig

Schulbildung

1982 Gymnasium Theodorianum

1991 Abitur 20.06.1991

Hochschulstudium

1991 Beginn des Physikstudiums an der Christian-Albrechts Universität zu Kiel

1993 Vordiplom mit Nebenfach Chemie

1996 Diplomprüfung in den Fächer:
Angewandte Physik (Systemtheorie)
Experimental Physik (Biophysik)
Theoretische Physik
Physiologie

1996 – 1997 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Prof. Hansen

April 1997 Diplom in Physik

seit August 1997 Arbeit als Wissenschaftlicher Angestellter am ZMNH, Arbeitsgruppe Prof. Jentsch

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Thomas Jentsch für die Aufgabenstellung dieser Arbeit danken. Seine stete Bereitschaft zu Diskussion wissenschaftlicher Fragen haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Die hervorragende Ausstattung des Labors hat ermöglicht, viele aufwendige Experimente in die Tat umzusetzen.

Weiterhin möchte ich mich bei Ulf-Peter Hansen bedanken, der während der Diplomarbeit den Grundstein zu dieser Arbeit gelegt hat und mein Fortschreiten während der ganzen Zeit mit Interesse verfolgt hat. Ganz besonders danke ich ihm dafür, daß er die Rolle des Doktorvaters übernommen hat.

Besonderer Dank gilt auch Christian Hübner und Michael Bösl, die die beiden analysierten Mausmodelle hergestellt haben. In diesem Zusammenhang sei auch Gudrun Weets herzlich gedankt. Sie hat wesentlich zu den histologischen Untersuchungen der *Clcn2*^{-/-} Maus beigetragen und unermüdlich deren Genotypen bestimmt.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Jentsch danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre. Trotz vieler dringender Projekte war immer Zeit sich gegenseitig zu helfen. Einige möchte ich an dieser Stelle namentlich erwähnen: Thomas Friedrich und Sven-Eric Jordt haben mir den Einstieg in die Arbeitsgruppe leicht gemacht. Thomas danke ich für die Einführung in die Elektrophysiologie und Molekularbiologie. Sven-Eric hat mir unwissendem Physiker mit viel Geduld die Geheimnisse von ClC-2 und der anderen Chloridkanäle erklärt. Die Zusammenarbeit mit Christian hat viel Spaß gemacht und ist hoffentlich auch von Erfolg gekrönt. Bei Björn Schroeder möchte ich mich als Benachbar für die langen Diskussionen bedanken.

Ich bedanke mich bei Dagmar, Christian, Frank und Thomas Uschkureit für das Korrekturlesen der Arbeit.

Ich danke auch Daks für ihre Mithilfe beim Bestellen von vielen Dingen. Ihr Schockoschrank hat über manche Unterzuckerung hinweggeholfen und damit zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Zum Schluß möchte ich mich bei meinen Eltern und allen meinen Freunden, die mich während der Zeit begleitet haben, bedanken.