

Verteilung von $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern während der Ontogenese des auditorischen Hirnstamms der Ratte

vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Erlangung des akademischen Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Sandra Grill

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. S. Kins

1. Gutachter: Prof. Dr. E. Friauf

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Hoth

Kaiserslautern, 30.10.2009

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Kaiserslautern, den

Sandra Grill

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
TABELLENVERZEICHNIS.....	VI
1. ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2. EINLEITUNG.....	3
2.1 CALCIUM-HOMÖOSTASE.....	3
2.2 DIE CALCIUM/KATIONEN-ANTIPORTER-SUPERFAMILIE (CACA)	3
2.3 DIE NCX-FAMILIE	5
2.4 DIE NCKX-FAMILIE	8
2.5 DIE CCX-FAMILIE.....	11
2.6 CALCIUM IM AUDITORISCHEN HIRNSTAMM.....	12
2.7 DER AUDITORISCHE HIRNSTAMM DER RATTE	13
2.7.1 <i>Der CN</i>	14
2.7.2 <i>Der SOC</i>	15
2.7.3 <i>Der IC</i>	16
2.8 ONTOGENESE DES AUDITORISCHEN HIRNSTAMMS	17
2.9 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	18
3. MATERIAL UND METHODEN.....	19
3.1 VERWENDETE CHEMIKALIEN.....	19
3.2 PUFFER UND LÖSUNGEN	22
3.3 VERWENDETE ANTIKÖRPER.....	27
3.3.1 <i>Primäre Antikörper</i>	27
3.3.2 <i>Sekundäre Antikörper</i>	28
3.4 VERWENDETE PRIMER	29
3.5 VERSUCHSTIERE.....	30
3.6 IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON NCX1-3 UND NCKX2	30
3.6.1 <i>Transkardiale Perfusion</i>	30
3.6.2 <i>Anfertigung von Hirnschnitten</i>	31
3.6.3 <i>Antikörperfärbungen</i>	32
3.6.4 <i>Epifluoreszenzmikroskopie</i>	33
3.6.5 <i>Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie</i>	33
3.6.6 <i>Bestimmung des mittleren Durchmessers von Zellsomata</i>	34
3.7 UNTERSUCHUNG DER ANTIKÖRPERSPEZIFITÄT	35

3.7.1	<i>Subzelluläre Gewebefraktionierung</i>	35
3.7.2	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford</i>	36
3.7.3	<i>Western Blot</i>	36
3.8	GEWEBEPRÄPARATION ZUR UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION VON <i>NCX1-3</i> SOWIE <i>NCKX2-6</i> AUF BOTEN-RIBONUKLEINSÄURE (MESSENGER RIBONUCLEIC ACID, mRNA)-EBENE	38
3.9	RNA-ISOLIERUNG	39
3.9.1	<i>Qualitätsbestimmung der isolierten RNA</i>	40
3.9.2	<i>RNA Fällung</i>	43
3.10	REVERSE TRANSKRIPTION (RT).....	43
3.11	UNTERSUCHUNG DER GENEXPRESSION MITTELS PCR	44
3.12	QUANTITATIVE REAL-TIME PCR.....	45
4.	ERGEBNISSE	52
4.1	UNTERSUCHUNG DER ANTIKÖRPERSPEZIFITÄT	52
4.1.1	<i>Untersuchung der NCX1-Antikörperspezifität mittels Western Blot auf Mausgewebe</i> ...	52
4.1.2	<i>Untersuchung der NCX2-Antikörperspezifität mittels Western Blot auf Mausgewebe</i> ...	53
4.1.3	<i>Untersuchung der NCX3-Antikörperspezifität mittels Western Blot auf Mausgewebe</i> ...	55
4.1.4	<i>Vergleich der Antikörperbanden in Maus- und Rattengewebe</i>	56
4.1.5	<i>Zusammenfassung Western Blots</i>	58
4.2	IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON <i>NCX1-3</i> UND <i>NCKX2</i>	60
4.2.1	<i>Immunhistochemischer Nachweis von NCX1 bei P4</i>	60
4.2.2	<i>Immunhistochemischer Nachweis von NCX1 bei P60</i>	65
4.2.2.1	Bestimmung des mittleren Soma-Durchmessers	68
4.2.3	<i>Immunhistochemischer Nachweis von NCX2 bei P4</i>	70
4.2.3.1	Färbung mit dem NCX2-Antikörper von Alpha Diagnostics International.....	70
4.2.3.2	Bestimmung des mittleren Soma-Durchmessers	72
4.2.3.3	Färbung mit dem monoklonalen NCX2-Antikörper von Prof. Porzig.....	73
4.2.4	<i>Immunhistochemischer Nachweis von NCX2 bei P60</i>	75
4.2.4.1	Bestimmung des mittleren Soma-Durchmessers	77
4.2.5	<i>Immunhistochemischer Nachweis von NCX3 bei P4</i>	79
4.2.5.1	Färbung mit dem NCX3-Antikörper von Alpha Diagnostics International.....	79
4.2.5.2	Bestimmung des mittleren Soma-Durchmessers	81
4.2.5.3	Färbung mit dem NCX3-Antikörper von Prof. Philipson.....	82
4.2.6	<i>Immunhistochemischer Nachweis von NCX3 bei P60</i>	84
4.2.6.1	Färbung mit dem NCX3-Antikörper von Alpha Diagnostics International.....	84
4.2.6.2	Bestimmung des mittleren Soma-Durchmessers	86
4.2.6.3	Färbung mit dem NCX3-Antikörper von Prof. Philipson.....	87
4.2.7	<i>Zusammenfassung Antikörperspezifität</i>	89

4.2.8	<i>Immunhistochemischer Nachweis von NCKX2 bei P4</i>	90
4.2.8.1	Bestimmung des mittleren Soma-Durchmessers	92
4.2.9	<i>Immunhistochemischer Nachweis von NCKX2 bei P60</i>	94
4.2.10	<i>Zusammenfassung des immunhistochemischen Nachweises von NCX1-3 und NCKX2</i>	96
4.3	UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION VON NCX1-3 SOWIE NCKX2-6 AUF MRNA- EBENE	101
4.3.1	<i>RNA Isolierung</i>	101
4.3.2	<i>Untersuchung der Genexpression mittels PCR</i>	103
4.3.2.1	<i>ncx1</i>	103
4.3.2.2	<i>ncx2</i>	103
4.3.2.3	<i>ncx3</i>	103
4.3.2.4	<i>nckx2</i>	104
4.3.2.5	<i>nckx3</i>	104
4.3.2.6	<i>nckx4</i>	104
4.3.2.7	<i>nckx5</i>	105
4.3.2.8	<i>nckx6</i>	105
4.3.3	<i>Quantitative real-time PCR</i>	107
4.3.3.1	qRT-PCR für <i>gapdh</i> als Haushaltsgen	107
4.3.3.2	Relative differenzielle Regulation der <i>ncx-/nckx</i> -Genexpression in auditorischen Kernen zwischen P4 und P60	108
4.3.3.3	Relative differenzielle Regulation der <i>ncx-/nckx</i> -Genexpression bei P4	111
4.3.3.4	Relative differenzielle Regulation der <i>ncx-/nckx</i> -Genexpression bei P60	113
4.3.4	<i>Zusammenfassung und Vergleich von Gen- und Proteinexpression</i>	116
5.	DISKUSSION	119
5.1	UNTERSUCHUNG DER PROTEINEXPRESSION	119
5.1.1	<i>Subzelluläre Umverteilung der Proteinlokalisierung während der Ontogenese</i>	119
5.1.1.1	NCX- und NCKX2-Expressionsstudien aus der Literatur	120
5.1.1.2	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher im Neuropil	121
5.1.1.3	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher im unreifen Gehirn	123
5.1.1.4	Gegensätzliche Phänotypen der NCKX2-KO und NCX2-KO	124
5.1.2	<i>Vergleich mit dem Expressionsmuster anderer Ca²⁺-regulierender Proteine</i>	126
5.1.2.1	PMCA	126
5.1.2.2	Calbindin	128
5.1.2.3	Parvalbumin und Calretinin	132
5.1.2.4	Zusammenfassung: Ca ²⁺ -regulierende Proteine im auditorischen Hirnstamm	134
5.2	UNTERSUCHUNG DER GENEXPRESSION	135
5.2.1	<i>Spleißvarianten</i>	135

5.2.2	<i>Ontogenetische Regulation der ncx- und nckx-Transkription</i>	137
5.2.2.1	Höhe der Regulationsfaktoren	137
5.2.2.2	Verstärkte Transkription der <i>ncx</i> -Isoformen und verminderte Transkription der <i>nckx</i> -Isoformen im Verlauf der Ontogenese	138
5.2.2.3	Funktionelle Unterschiede zwischen den NCX- und NCKX-Isoformen	141
5.3	ANTIKÖRPERSPEZIFITÄT	146
5.3.1	<i>Untersuchung der Antikörperspezifität mittels Western Blot</i>	147
5.3.1.1	NCX1	148
5.3.1.2	NCX2	148
5.3.1.3	NCX3	150
5.3.1.4	NCKX2	153
5.3.2	<i>Untersuchung der Antikörperspezifität mittels IHC</i>	153
5.3.3	<i>Zusammenfassung Antikörperspezifität</i>	153
5.4	ZUSAMMENFASSUNG DER DISKUSSION	155
6.	LITERATURVERZEICHNIS	156
7.	ANHANG	172

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: PHYLOGENIE DER Ca^{2+} /KATIONEN-ANTIORTER (CACA)-SUPERFAMILIE	4
ABB. 2: TOPOLOGIE DER NCX-ISOFORMEN	6
ABB. 3: TOPOLOGIE DER NCKX-ISOFORMEN	9
ABB. 4: TOPOLOGIE VON NCKX6.....	12
ABB. 5: SCHEMATISCHER VERLAUF DER HÖRBAHN.....	14
ABB. 6: SCHEMATISCHE ANSICHT DES RATTENHIRNS MIT CN, SOC UND IC.....	16
ABB. 7: ZELLVERMESSUNG MIT DER „CELL IMAGING SOFTWARE FOR LIFE SCIENCE MICROSCOPY“	34
ABB. 8: GEWEBEPREPARATION IC UND SOC.....	39
ABB. 9: ELEKTROSPHEROGRAMM ISOLIERTER RNA AUS P4 IC- SOWIE P60 CN-GEWEBE.....	42
ABB. 10: BESTIMMUNG DER CYCLE THRESHOLD (CT)-WERTE MIT HILFE DER MYIQ-SOFTWARE.....	48
ABB. 11: BESTIMMUNG DER PRIMEREFFIZIENZ MIT HILFE DER MYIQ-SOFTWARE	50
ABB. 12: WESTERN BLOT ZUR UNTERSUCHUNG DER NCX1-ANTIKÖRPERSPEZIFITÄT	53
ABB. 13: WESTERN BLOTS ZUR UNTERSUCHUNG DER NCX2-ANTIKÖRPERSPEZIFITÄT	54
ABB. 14: WESTERN BLOTS ZUR UNTERSUCHUNG DER NCX3-ANTIKÖRPERSPEZIFITÄT	56
ABB. 15: WESTERN BLOTS AUF RATTENGEWEBE ZUR UNTERSUCHUNG DER NCX2- UND NCX3- ANTIKÖRPERSPEZIFITÄT.....	57
ABB. 16: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER CORONALSCHNITTE ZUR IMMUNHISTOCHEMISCHEN ANALYSE.....	61
ABB. 17: SCHEMATISCHER AUFBAU DER IHC-ABBILDUNG VON NCX1 BEI P4	62
ABB. 18: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON NCX1 IN CN UND SOC BEI P4.....	64
ABB. 19: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON NCX1 IM IC BEI P4.....	65
ABB. 20: SCHEMATISCHER AUFBAU DER IHC-ABBILDUNGEN ZU NCX2, NCX3 UND NCKX2.....	66
ABB. 21: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON NCX1 BEI P60	67
ABB. 22: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON NCX2 BEI P4	71
ABB. 23: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON NCX2 BEI P4 MITTELS MONOKLONALEN ANTIKÖRPERS	74
ABB. 24: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON NCX2 BEI P60	76
ABB. 25: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON NCX3 BEI P4	80
ABB. 26: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON NCX3 BEI P4 MITTELS DES ANTIKÖRPERS VON PROF. PHILIPSON	83
ABB. 27: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON NCX3 BEI P60	85
ABB. 28: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON NCX3 BEI P60 MITTELS DES ANTIKÖRPERS VON PROF. PHILIPSON	88
ABB. 29: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON NCKX2 BEI P4.....	91
ABB. 30: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON NCKX2 BEI P60.....	95
ABB. 31: GENEXPRESSIONSANALYSE VON <i>NCX1</i> , <i>NCX3</i> UND <i>NCKX2-6</i> MITTELS RT-PCR	106
ABB. 32: RELATIVE DIFFERENZIELLE REGULATION DER <i>NCX</i> -/ <i>NCKX</i> -GENEXPRESSION IN AUDITORISCHEN KERNEN ZWISCHEN P4 UND P60.....	110
ABB. 33: RELATIVE DIFFERENZIELLE REGULATION DER <i>NCX</i> -/ <i>NCKX</i> -GENEXPRESSION IN AUDITORISCHEN KERNEN BEI P4.....	112

ABB. 34: RELATIVE DIFFERENZIELLE REGULATION DER <i>NCX</i> -/ <i>NCKX</i> -GENEXPRESSION IN AUDITORISCHEN KERNEN BEI P60	115
ABB. 35: WESTERN BLOTS GEGEN NCX2 AUS DER LITERATUR.....	150
ABB. 36: WESTERN BLOTS GEGEN NCX3 AUS DER LITERATUR.....	152

Tabellenverzeichnis

TAB. 1: VERWENDETE PRIMÄRE ANTIKÖRPER	27
TAB. 2: VERWENDETE SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER	28
TAB. 3: VERWENDETE PRIMER.....	29
TAB. 4: IN DER PCR GETESTETE NCX2-PRIMER.....	30
TAB. 5: BESTIMMUNG DES MITTLEREN DURCHMESSERS NCX1-POSITIVER NEURONE IM DCN BEI P60.....	69
TAB. 6: BESTIMMUNG DES MITTLEREN DURCHMESSERS NCX2-POSITIVER NEURONE IM DCN BEI P4.....	72
TAB. 7: BESTIMMUNG DES MITTLEREN DURCHMESSERS NCX2-POSITIVER NEURONE IM DCN BEI P60.....	77
TAB. 8: BESTIMMUNG DES MITTLEREN DURCHMESSERS NCX3-POSITIVER NEURONE IM DCN BEI P4.....	81
TAB. 9: BESTIMMUNG DES MITTLEREN DURCHMESSERS NCX3-POSITIVER NEURONE IM DCN BEI P60.....	86
TAB. 10: BESTIMMUNG DES MITTLEREN DURCHMESSERS NCKX2-POSITIVER NEURONE IM DCN BEI P4.....	92
TAB. 11: ZUSAMMENFASSUNG DER NCX1-IR	97
TAB. 12: ZUSAMMENFASSUNG DER NCX2-IR	98
TAB. 13: ZUSAMMENFASSUNG DER NCX3-IR	99
TAB. 14: ZUSAMMENFASSUNG DER NCKX2-IR	100
TAB. 15: VERHÄLTNIS DES 28S rRNA-PEAKS ZUM 18S rRNA-PEAK IN DEN RNA-PROBEN	102
TAB. 16: QRT-PCR FÜR <i>GAPDH</i>	108
TAB. 17: RELATIVE REGULATIONSFAKTOREN DER <i>NCX</i> -/ <i>NCKX</i> -GENEXPRESSION ZWISCHEN P4 UND P60.....	109
TAB. 18: RELATIVE REGULATIONSFAKTOREN DER <i>NCX</i> -/ <i>NCKX</i> -GENEXPRESSION IN AUDITORISCHEN KERNEN BEI P4.....	113
TAB. 19: RELATIVE REGULATIONSFAKTOREN DER <i>NCX</i> -/ <i>NCKX</i> -GENEXPRESSION IN AUDITORISCHEN KERNEN BEI P60.....	116
TAB. 20: ZUSAMMENFASSUNG IHC UND GENEXPRESSIONSDATEN BEI P4.....	117
TAB. 21: ZUSAMMENFASSUNG IHC UND GENEXPRESSIONSDATEN BEI P60.....	118

1. Zusammenfassung

Die Homöostase der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist eine essenzielle Aufgabe in allen Zellen, da Ca^{2+} an diversen zellulären Prozessen beteiligt ist. Besonders Neurone des auditorischen Hirnstamms sind auf eine optimale Ca^{2+} -Regulation angewiesen, da ihr Überleben und ihre Entwicklung von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängen. Neben Ca^{2+} -bindenden Proteinen und Ca^{2+} -ATPasen sind besonders $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, welche sich in die Familien NCX (NCX1-3), NCKX (NCKX1-5) und CCX (NCKX6) gliedern, in vielen neuronalen und nicht-neuronalen Strukturen maßgeblich für die Ca^{2+} -Regulation verantwortlich.

In meiner Arbeit wurde die Verteilung von NCX1-3 sowie NCKX2-6 im *Nucleus cochlearis* (CN), superioren Olivenkomplex (SOC) und inferioren *Colliculus* (IC), welche Strukturen des auditorischen Hirnstamms darstellen, untersucht. Dies erfolgte auf Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid, mRNA)-Ebene qualitativ mittels reverser Transkription (RT) gefolgt von genspezifischer Polymerasekettenreaktion (PCR) sowie quantitativ mittels real-time PCR, auf Proteinebene qualitativ mittels Immunhistochemie. Um auch ontogenetische Aspekte der Ca^{2+} -Homöostase zu berücksichtigen, wurden Ratten in einem unreifen Entwicklungsstadium (P4) sowie junge adulte Ratten (P60) analysiert. Damit stellt diese Arbeit die erste Untersuchung der NCX- und NCKX-Isoformen in der Entwicklung des auditorischen Systems eines Vertebraten dar. Zudem wurde die Genexpression von *nckx5* zum ersten Mal in einem spezifischen Areal des Gehirns und in einem unreifen Entwicklungsstadium untersucht.

Die Genexpression aller untersuchten *ncx*- und *nckx*-Isoformen wurde mittels RT-PCR in beiden Entwicklungsstadien in CN, SOC und IC nachgewiesen. Die Ergebnisse weisen überraschenderweise auf neue, putative Spleißvarianten für *nckx4-6* hin. Besonders auffallend war bei den *ncx*-Isoformen eine im Verlauf der Entwicklung meist verstärkte Transkription, während die *nckx*-Isoformen in den meisten Fällen eine verminderte Transkription im adulten Tier zeigten. *nckx5* wurde als einzige *nckx*-Isoform im Laufe der Entwicklung (in CN und IC) hochreguliert. Unterschiede in der ontogenetischen Regulation finden sich demnach eher zwischen den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher-Familien als zwischen den einzelnen Isoformen. Auch zwischen den auditorischen Hirnstammstrukturen wurden quantitative Unterschiede in der Genexpression der *ncx*- und *nckx*-Isoformen detektiert, was auf unterschiedliche Anforderungen dieser Strukturen an die Ca^{2+} -Regulation hinweist. Die Vergleiche der

verschiedenen auditorischen Strukturen innerhalb einer Altersstufe ergaben kleinere Unterschiede als der Vergleich der beiden Altersstufen.

Mittels Immunhistochemie zeigt meine Arbeit zum ersten Mal eine entwicklungsabhängige Umverteilung der Austauscher. Während die Isoformen bei P4 hauptsächlich im Neuropil lokalisiert waren, zeigte sich im Gegensatz dazu bei P60 eine verstärkte Immunfluoreszenz innerhalb der Somata. Ausnahme war hier NCKX2, welcher im CN auch bei P60 hauptsächlich im Neuropil exprimiert wurde. Die Expression von NCX1-3 und NCKX2 im Neuropil junger auditorischer Hirnstammneurone legt eine Ca^{2+} -regulierende Funktion im Bereich dendritischer Synapsen nahe. Die Synapsen befinden sich in diesem Alter noch in einem unreifen Zustand, so dass die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher einen maßgeblichen Einfluss auf die synaptische Plastizität ausüben können.

Abschließend deutet die Verteilung der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher darauf hin, dass alle NCX- und NCKX-Isoformen, im Zusammenspiel mit weiteren Ca^{2+} -regulierenden Proteinen, an der Ca^{2+} -Homöostase in den Strukturen des auditorischen Hirnstamms beteiligt sind.

2. Einleitung

2.1 Calcium-Homöostase

Die Regulation der intrazellulären Calcium (Ca^{2+})-Homöostase ist eine essenzielle Aufgabe in allen Zellen, da Ca^{2+} in vielen zellulären Prozessen involviert ist, beispielsweise als second messenger in Signalkaskaden sowie in der Transmitterausschüttung.

In Neuronen kann ein durch die depolarisierende Wirkung von Transmittern ausgelöster Ca^{2+} -Einstrom vielseitige Auswirkungen haben (Lipton und Kater, 1989). Er beeinflusst die morphologische Differenzierung (Ben-Ari *et al.*, 1994; Ben-Ari, 2002), die Synapsenbildung (Ben-Ari *et al.*, 1997; Cherubini *et al.*, 1998; Kirsch und Betz, 1998), reguliert die Neurogenese (Maric *et al.*, 2001) und bewirkt Langzeitpotenzierung (LTP) bzw. Langzeitdepression (LTD; (Artola und Singer, 1993; Augustine *et al.*, 2003; Malenka und Bear, 2004) siehe auch 5.1.1.4). Besonders Strukturen des auditorischen Hirnstamms zeigen eine starke Abhängigkeit von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (2.6).

Zur Regulation der Ca^{2+} -Homöostase dienen sowohl Ca^{2+} -bindende Proteine wie Calbindin (Bredderman und Wasserman, 1974a), Calretinin (Arai *et al.*, 1991a) und Parvalbumin (Heizmann, 1984) als auch Ca^{2+} -Kanäle (Berridge *et al.*, 2003) und Ca^{2+} -transportierende Proteine wie die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPasen (Schatzmann, 1966b; Carafoli, 1991a; Carafoli, 1992a) oder $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (Lytton, 2007).

2.2 Die Calcium/Kationen-Antiporter-Superfamilie (CaCA)

Die in meiner Arbeit untersuchten $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher gehören zur Superfamilie der Ca^{2+} /Kationen-Antiporter (Ca^{2+} /cation antiporter, CaCA). Die CaCA-Superfamilie gliedert sich in fünf Familien (Abb. 1): die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, NCX, siehe 2.3), die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - K^+ -Austauscher (NCKX, siehe 2.4), die Ca^{2+} /Kationen-Austauscher (Ca^{2+} /cation exchanger, CCX, siehe 2.5), die in Bakterien, Pflanzen, Pilzen und Protozoen vorkommenden Ca^{2+} /Anionen-Austauscher (Ca^{2+} /anion exchanger, CAX) sowie die bakterielle YRGB-Familie, benannt nach dem aus *Escherichia coli* klonierten *yrgb*-Gen (Ruknudin und Schulze, 2002). In Säugetieren kommen ausschließlich NCX, NCKX sowie

CCX vor (Cai und Lytton, 2004b; Lytton, 2007). Deren Verteilung im auditorischen Hirnstamm wurde bisher noch nicht untersucht.

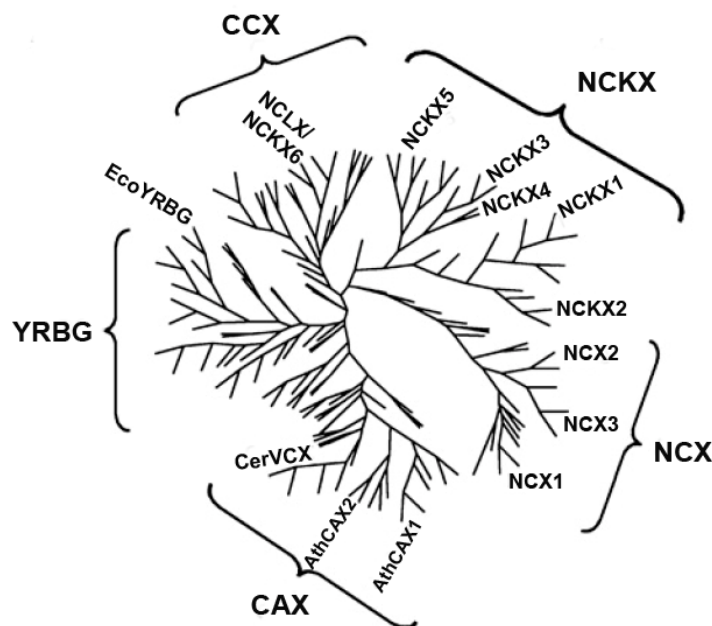


Abb. 1: Phylogenie der Ca^{2+} /Kationen-Antiporter (CaCA)-Superfamilie

Die CaCA-Superfamilie beinhaltet fünf Familien, von denen die NCX, NCKX und CCX in Säugetieren vorkommen. Die aufgeführten Isoformen stellen repräsentative Vertreter der Familien dar: EcoYRGB = YRGB-Protein aus *Escherichia coli*; CerVCX = vakuolärer $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Austauscher aus *Saccharomyces cerevisiae*; AthCAX1/2 = $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Austauscher aus *Arabidopsis thaliana*. Unbeschriftete Äste stellen homologe Proteine verschiedener Spezies dar, auf weitere Beschriftungen (Cai und Lytton, 2004b) wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Abbildung verändert aus Lytton (2007)

Die CaCA-Superfamilie wird durch das Vorhandensein zweier konservierter Aminosäuremotive, der sog. α -repeats, charakterisiert (Schwarz und Benzer, 1997). Mutationsexperimente zeigten, dass Regionen innerhalb dieser α -repeats essenziell für die Transportfunktion von NCX1 (Nicoll *et al.*, 1996a; Iwamoto *et al.*, 2000) und NCKX2 (Winkfein *et al.*, 2003; Shibukawa *et al.*, 2007) sind. Aufgrund der bisherigen Experimente wird davon ausgegangen, dass die beiden α -repeats die Ionen-Bindetasche der Austauscher bilden. Außerhalb dieser α -repeats sind die Ähnlichkeiten in den Aminosäuresequenzen zwischen den verschiedenen Familien recht gering (Lytton, 2007).

Innerhalb der CaCA-Superfamilie weisen alle Familien eine ähnliche Membrantopologie aus zwei Clustern hydrophober putativer Transmembrandomänen (TMD) auf, welche durch einen großen intrazellulären Loop verbunden sind (Cai und Lytton, 2004b) siehe Abb. 2-4). Dieser intrazelluläre Loop enthält diverse regulatorische Regionen, auf die bei der Beschreibung der einzelnen Familien näher eingegangen wird.

2.3 Die NCX-Familie

Die NCX-Familie oder SLC (solute carrier) 8-Genfamilie besteht aus den drei Isoformen NCX1 (Nicoll *et al.*, 1990), NCX2 (Li *et al.*, 1994) und NCX3 (Nicoll *et al.*, 1996b), für die jeweils eigene Gene kodieren. Kürzlich wurde im Zebrafisch eine weitere NCX-Isoform, NCX4, nachgewiesen (Marshall *et al.*, 2005; On *et al.*, 2009). Dieses Gen kommt jedoch ausschließlich in Knochenfischen, Amphibien und Reptilien vor und hat kein Homolog in Säugetieren.

NCX1-3 zeigen über die gesamte Aminosäuresequenz einen hohen Grad an Übereinstimmung, weswegen strukturelle und funktionelle Erkenntnisse, welche meist an NCX1 gewonnen wurden, auch auf NCX2 und NCX3 übertragen werden. NCX-Isoformen exportieren ein Ca^{2+} im Austausch für drei Na^{+} , können ihre Transportrichtung aber, abhängig von den Konzentrationen der transportierten Ionen sowie vom Membranpotenzial, umkehren (Blaustein und Lederer, 1999). So konnte eine funktionelle Verbindung von NCX und dem „transienten Rezeptorpotenzial“ (transient receptor potential, TRP) Kanal TRPC3 in kultivierten menschlichen Nierenzellen, welche TRPC3 überexprimieren (Rosker *et al.*, 2004) sowie zwischen NCX und TRPC6 in glatten Muskelzellen der Aorta (Poburko *et al.*, 2007; Lemos *et al.*, 2007) nachgewiesen werden. Dabei führt ein Na^{+} -Einstrom durch die aktivierten TRPC-Kanäle zu einer Depolarisation sowie zu einer lokalen Erhöhung der intrazellulären Na^{+} -Konzentration, wodurch nahe gelegene NCX ihre Transportrichtung umkehren und einen Ca^{2+} -Einstrom bewirken. Eine Umkehr der NCX wird ebenfalls unter ischämischen Bedingungen im *Cortex* vermutet, da es bei Ischämie zu einem Mangel an ATP kommt und daraufhin die $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase den Na^{+} -Gradienten nicht mehr aufrecht erhalten kann (Pignataro *et al.*, 2004m). Im Myokard konnte eine Umkehr von NCX1 demonstriert werden (Bers, 2002).

Die Membrantopologie der NCX-Isoformen ist in Abb. 2 dargestellt. Der N-Terminus agiert als Signalpeptid und wird co- oder posttranslational entfernt (Durkin *et al.*, 1991; Furman *et al.*, 1995), so dass der N-Terminus des reifen Proteins extrazellulär liegt (Hryshko *et al.*, 1993). An den N-terminalen hydrophoben Cluster aus fünf TMDs, welcher einen der beiden für die CaCA-Superfamilie charakteristischen α -repeats enthält, schließt sich der lange cytoplasmatische Loop an. Der darauf folgende C-terminale Cluster besteht aus vier TMDs und beinhaltet den zweiten α -repeat (Abb. 2). Der C-Terminus liegt intrazellulär (Nicoll *et al.*, 1999).

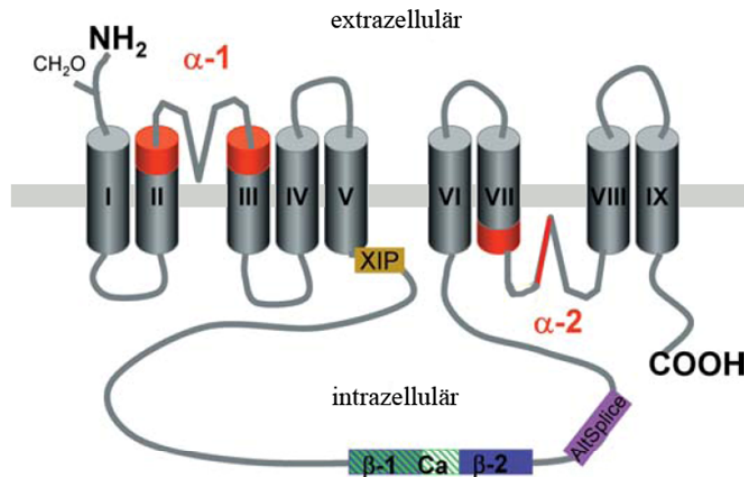


Abb. 2: Topologie der NCX-Isoformen

Die NCX-Isoformen besitzen neun Transmembrandomänen (I-IX), verbunden über einen großen cytoplasmatischen Loop, welcher zahlreiche regulatorische Regionen beinhaltet (siehe Text). Der N-Terminus liegt extrazellulär, der C-Terminus intrazellulär. Die beiden für die CaCA-Superfamilie charakteristischen α -repeats (α -1 und α -2) sind in rot dargestellt, die Ca^{2+} -bindende Domäne 1 (CBD1, Details siehe Text) ist grün schraffiert; AltSplice = Region für alternatives Spleißen; Abbildung verändert aus Quednau *et al.* (2004)

Der große cytoplasmatische Loop von NCX1 beinhaltet diverse regulatorische Regionen. Die N-terminale Seite dieses Loops enthält die sog. XIP (exchanger inhibitory peptide, Austauscher inhibierendes Peptid)-Region (Abb. 2), benannt nach einem exogenen Peptid, welches durch Bindung an dieses Motiv die Funktion von NCX1 inhibiert (Nicoll *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1991). Bei hohen Konzentrationen an intrazellulärem Na^+ führt die Bindung von Na^+ an diese XIP-Region zur sog. Na^+ -abhängigen Inaktivierung des Austauschers (Hilgemann *et al.*, 1992). Diese Na^+ -Bindung wird durch Anlagerung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) an die XIP-Region eliminiert, so dass PIP_2 eine aktivierende Wirkung auf NCX1 hat. Die Na^+ -abhängige Inaktivierung kann u.a. durch Adenosintriphosphat (ATP, wahrscheinlich über die Produktion von PIP_2) sowie über eine Erhöhung des pH-Wertes eliminiert werden (Hilgemann und Ball, 1996; He *et al.*, 2000). Zudem führen Phosphorylierungen der Isoformen zur Erhöhung der Affinität für die transportierten Ionen sowie zur Verminderung der Na^+ -abhängigen Inaktivierung (Annunziato *et al.*, 2004b). Jede der Isoformen besitzt unterschiedliche Phosphorylierungsstellen.

Der große cytoplasmatische Loop beinhaltet des Weiteren zwei sog. β -repeats (β -1 und β -2), von denen jeder, zusammen mit der jeweils flankierenden Region, eine Ca^{2+} -bindende Domäne (CBD) bildet (Nicoll *et al.*, 2006; Hilge *et al.*, 2006; Hilge *et al.*, 2007) Abb. 2). Die Bindung von Ca^{2+} an die erste dieser Domänen (CBD1) führt zu einer

Konformationsänderung der NCX-Isoformen, welche die Austauscher aktiviert (Ca^{2+} -abhängige Regulation).

Zudem enthält der cytoplasmatische Loop eine Region, in der alternatives Spleißen stattfindet (Annunziato *et al.*, 2004a). Bei NCX1 beinhaltet diese Region sechs Exons (A-F). Um ein offenes Leseraster zu erhalten, müssen Spleißvarianten entweder Exon A oder Exon B enthalten. Erregbare Zellen, wie Neurone und Muskelzellen, exprimieren Spleißvarianten mit Exon A, nicht erregbare Zellen exprimieren Exon B-enthaltende Spleißvarianten (Lee *et al.*, 1994). Bisher wurden 12 verschiedene solcher Spleißvarianten detektiert, welche auch parallel in einer Zelle vorkommen können (He *et al.*, 1998a). NCX1 besitzt zudem eine weitere Region für alternatives Spleißen am 5'untranslatierten Ende, in der drei verschiedene Promotoren für gewebespezifische Spleißvarianten verantwortlich sind. Dies dient wahrscheinlich der unabhängigen Regulation der NCX1-Expression nach gewebespezifischen Anforderungen (Nicholas *et al.*, 1998). Auch für NCX3 wurde alternatives Spleißen innerhalb des cytoplasmatischen Loops gezeigt, von NCX2 wurden bisher noch keine Spleißvarianten detektiert (Quednau *et al.*, 1997).

Das NCX1-Protein (Ratte) besteht aus 970 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 110 kDa (Nicoll *et al.*, 1990). NCX2 besteht aus 921 Aminosäuren, welche zu 65% identisch mit NCX1 sind. Das Molekulargewicht von NCX2 liegt bei 102 kDa (Li *et al.*, 1994; Pignataro *et al.*, 2004l). NCX3 besteht aus 927 Aminosäuren, welche zu 73% mit der Aminosäuresequenz von NCX1 und zu 75% mit der von NCX2 übereinstimmen. Das Molekulargewicht von NCX3 liegt bei 105 kDa (Nicoll *et al.*, 1996b; Pignataro *et al.*, 2004k). Während NCX1 eine ubiquitäre Expression zeigt, werden NCX2 und NCX3 hauptsächlich in Gehirn und Skelettmuskel exprimiert (Nicoll *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1994; Nicoll *et al.*, 1996b). Dabei zeigen zahlreiche Gehirnregionen eine abundante Expression aller drei Isoformen, beispielsweise der *Bulbus olfactorius*, verschiedene Bereiche des cerebralen *Cortex*, des *Hippocampus*, der *Amygdala* und der Basalganglien, verschiedene Bereiche des *Thalamus* und *Hypothalamus* sowie sämtliche Schichten des *Cerebellums* (Papa *et al.*, 2003). Im Hirnstamm wurden die NCX-Isoformen in der *Substantia nigra*, der Retikularformation, den Raphe-Kernen und den *Nuclei pontis* nachgewiesen. Die Lokalisation der NCX-Isoformen überlappt zum Teil, teilweise zeigen die Isoformen auch ein differenzielles Expressionsmuster (Papa *et al.*, 2003). Die Expression der NCX im auditorischen System wurde bisher noch nicht analysiert.

Zu allen drei Isoformen gibt es mittlerweile Knockout (KO)-Tiere. Während globale KOs von NCX1 aufgrund einer mangelnden Entwicklung des kardiovaskulären Systems embryonal letal sind (Wakimoto *et al.*, 2000), überleben Tiere, in denen NCX1 gezielt in den Kardiomyozyten ausgeschaltet wurde, bis ins Erwachsenenalter mit annähernd normaler Herzfunktion (Goldhaber *et al.*, 2003; Henderson *et al.*, 2004; Pott *et al.*, 2004), obwohl NCX1 die vorherrschende Isoform im Herz darstellt. Diese konditionellen KO-Tiere adaptieren, indem sie durch Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle die ventrikulären Aktionspotenziale (APs) verkürzen und so den Ca^{2+} -Einstrom vermindern. Somit können auch Ca^{2+} -exportierende Proteine mit geringerer Kapazität, wie die Ca^{2+} -ATPasen (siehe 5.1.2.1), die Ca^{2+} -Homöostase aufrechterhalten (Pott *et al.*, 2007).

Globale KOs für NCX2 zeigen ein besseres Abschneiden in verschiedenen Lern- und Gedächtnistests, im *Hippocampus* wurden eine erhöhte synaptische Plastizität, verstärkte LTP sowie verminderte Langzeitdepression LTD gemessen (Jeon *et al.*, 2003) siehe auch 5.1.1.4). NCX3-KO-Tiere zeigen motorische Defekte wie eine Nekrose der Skelettmuskelfasern und eine gestörte neuromuskuläre Transmission (Sokolow *et al.*, 2004).

2.4 Die NCKX-Familie

Die NCKX-Familie oder SLC24-Genfamilie der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{-K}^+$ -Austauscher besteht mittlerweile aus den fünf Mitgliedern NCKX1-5, NCKX6 wurde einer eigenen Familie, der CCX-Familie (siehe 2.5), zugeordnet (Lytton, 2007).

NCKX-Isoformen exportieren höchstwahrscheinlich ein Ca^{2+} und ein K^+ im Austausch für vier Na^+ , zumindest für NCKX2 konnte diese Stöchiometrie nachgewiesen werden (Dong *et al.*, 2001). Auch hier ist die Transportrichtung theoretisch abhängig von den Konzentrationen der transportierten Ionen und dem Membranpotenzial, wobei die Transportstöchiometrie eine Umkehr der NCKX im Vergleich zu den NCX erschwert. Unter physiologischen Bedingungen wurde eine Umkehr der Transportrichtung bei NCKX-Isoformen noch nicht nachgewiesen. Durch die zusätzliche Kopplung an den K^+ -Gradienten sind NCKX in der Lage, Ca^{2+} auch bei vermindertem Na^+ -Gradienten effizient zu exportieren (Lee *et al.*, 2002).

Die Membrantopologie der NCKX-Familie ist in Abb. 3 dargestellt. NCKX-Isoformen besitzen elf TMDs. Eine N-terminale hydrophobe Sequenz dient als Signalpeptid und wird abgespalten (Kang und Schnetkamp, 2003), wodurch der N-Terminus wie bei den NCX-Isoformen extrazellulär liegt. Der N-terminale hydrophobe Cluster besteht aus fünf TMDs und ist, wie bei den NCX, über einen großen intrazellulären Loop mit dem zweiten

hydrophoben Cluster verbunden. Der C-Terminus der NCKX-Isoformen liegt, im Gegensatz zu den NCX-Isoformen, extrazellulär (Cai *et al.*, 2002; Kinjo *et al.*, 2003). Es wird vermutet, dass dies eine Rolle bei den unterschiedlichen Ionenspezifikationen von NCX und NCKX spielt (Lytton, 2007). Auch die NCKX-Isoformen besitzen die für die CaCA-Superfamilie charakteristischen α -repeats, einen in jedem der hydrophoben Cluster (Abb. 3).

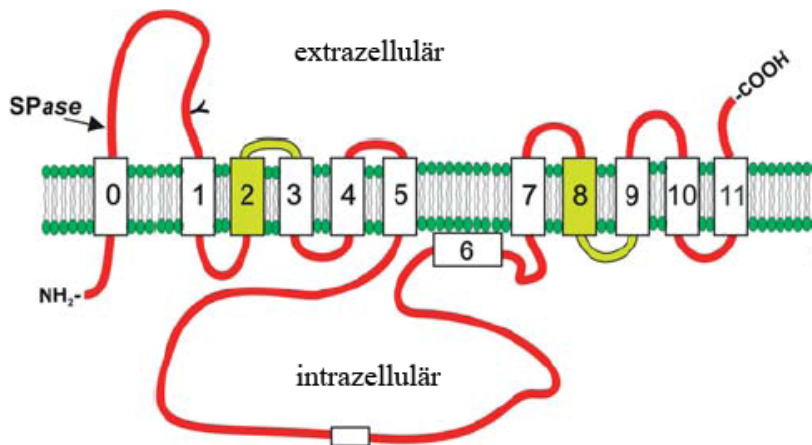


Abb. 3: Topologie der NCKX-Isoformen

Die NCKX-Isoformen besitzen elf Transmembrandomänen (1-11), verbunden über einen großen cytoplasmatischen Loop. Das N-terminale Signalpeptid wird durch eine Signalpeptidase (SPase) entfernt, so dass sowohl der N- als auch der C-Terminus extrazellulär liegen. Die für die CaCA-Superfamilie charakteristischen α -repeats sind in gelb dargestellt. Der weiße Balken im cytoplasmatischen Loop stellt eine Region für alternatives Spleißen dar, wie sie für NCKX2-4 nachgewiesen wurde. Abbildung verändert aus Schnetkamp (2004)

Im Gegensatz zu den NCX-Isoformen teilen die NCKX-Isoformen wenige Sequenzähnlichkeiten innerhalb des großen cytoplasmatischen Loops (Lytton, 2007). Eine dem XIP-Motiv von NCX1 entsprechende Region konnte für die NCKX-Isoformen nicht nachgewiesen werden. NCKX1 und NCKX2 zeigen ein mögliches Phosphorylierungsmotiv für die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase (Tsoi *et al.*, 1998). Zudem könnte der cytoplasmatische Loop eine Rolle bei der Oligomerisierung spielen (Cai *et al.*, 2002). So wurde für NCKX1 (Schwarzer *et al.*, 1997) sowie NCKX2 (Cai *et al.*, 2002) gezeigt, dass diese dimerisieren können. Eine Disulfidbrücke zwischen den Monomeren reduziert dabei die Transportaktivität. NCKX2 zeigte zudem eine Na^{+} -abhängige Inaktivierung, die auch schon für die NCX-Isoformen beschrieben wurde (Altimimi und Schnetkamp, 2007). Alternatives Spleißen innerhalb des großen cytoplasmatischen Loops wurde bisher für NCKX2-4 nachgewiesen (Kraev *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Schnetkamp, 2004). Alles in allem ist

jedoch über die Regulation der NCKX-Isoformen bisher noch weit weniger bekannt als über die der NCX-Familie.

NCKX1 ist mit 1216 Aminosäuren und 132 kDa (220 kDa durch starke Glykosylierung) ungewöhnlich groß im Vergleich zu den anderen NCKX-Isoformen (Lytton, 2007). NCKX2 besteht aus 670 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa (Tsoi *et al.*, 1998), NCKX3 hat 644 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von ca. 70 kDa (Kraev *et al.*, 2001). NCKX4 besteht aus 605 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa (Li *et al.*, 2002), während NCKX5 aus 500 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von ca. 55 kDa besitzt (Lamason *et al.*, 2005). NCKX1 und NCKX2 stimmen, wie NCKX3 und NCKX4, jeweils zu ca. 60% in ihrer Aminosäuresequenz überein. Zwischen den Paaren liegt die Übereinstimmung nur bei ca. 40% (Lytton, 2007). Die Aminosäuresequenz von NCKX5 stimmt zu 42% mit der der anderen NCKX-Isoformen überein (Lamason *et al.*, 2005), wobei eine etwas nähere Verwandtschaft zu NCKX3 und NCKX4 besteht (Lytton, 2007).

NCKX1 zeigt von allen Isoformen die spezifischste Expression, diese Isoform wird ausschließlich in den Stäbchen-Fotorezeptoren der Retina sowie in Blutplättchen exprimiert (Nicoll *et al.*, 1990) und wurde daher in meiner Arbeit nicht weiter untersucht.

NCKX2-4 werden dagegen in den meisten Gewebetypen und auch in den meisten Gehirnregionen exprimiert (Lytton *et al.*, 2002): Eine Transkription der Isoformen in *Cortex*, *Cerebellum* und Hirnstamm wurde mittels Northern Blot nachgewiesen. *In situ* Hybridisierungen zeigten für *nckx2* eine Genexpression über sämtliche Gehirnareale. Eine besonders starke Transkription wurde in den tiefen Schichten des *Cortex*, den Pyramidenzellen der CA3-Region im *Hippocampus*, in verschiedenen Kernen des Thalamus, in den *Nuclei pontis* sowie in der Molekularschicht des *Cerebellums* detektiert (Lytton *et al.*, 2002). Dagegen wird *nckx3* selektiv in der Schicht IV des *Cortex*, den Pyramidenzellen der CA1-Region des *Hippocampus*, der Molekularschicht des *Cerebellums* sowie in verschiedenen Kernen des Thalamus transkribiert (Lytton *et al.*, 2002). *nckx4* zeigt, wie *nckx2*, eine weit verbreitete Genexpression, besonders stark wird diese Isoform in Neuronen des *Gyrus dentatus* sowie in der CA1- und CA3-Region des *Hippocampus*, in der Körnerschicht des *Cerebellums* sowie im *Bulbus olfaktorius* transkribiert (Lytton *et al.*, 2002). NCKX5 stellt die bisher am wenigsten charakterisierte Isoform dar, mRNA wurde hauptsächlich in der Retina sowie in der Haut detektiert, eine geringere Transkription konnte jedoch auch in weiteren Geweben wie auch dem Gehirn (Gesamthirnprobe) nachgewiesen werden (Lamason *et al.*, 2005). Eine physiologische Rolle für NCKX5 wurde bisher nur für

die Pigmentierung der Haut nachgewiesen (Lamason *et al.*, 2005). Die Proteinexpression von NCKX5 im Gehirn wurde bisher noch nicht untersucht.

KO-Tiere wurden bisher nur für NCKX2 generiert (Li *et al.*, 2006). Diese zeigen, im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen NCX2-KO, ein verschlechtertes motorisches Lernen und schneiden schlechter in Gedächtnistests ab. Im *Hippocampus* wurden eine verminderte LTP und verstärkte LTD gemessen (Li *et al.*, 2006). Diese KOs werden unter 5.1.1.4 detaillierter beschrieben und diskutiert.

2.5 Die CCX-Familie

Die CCX-Familie besteht in Säugetieren nur aus einem einzigen Mitglied, NCKX6 (Cai und Lytton, 2004a). NCKX6 ist in der Lage, Na^+ durch Li^+ zu substituieren und auf diese Weise einen K^+ -unabhängigen $\text{Li}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch durchzuführen (Palty *et al.*, 2004; Lytton, 2007). Aufgrund dieser einzigartigen Transportaktivität wurde NCKX6 von Palty *et al.* (2004) als sog. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - Li^+ -Austauscher (NCLX) bezeichnet. Lytton (2007) gründete für NCKX6/NCLX eine eigenständige Kationen/ Ca^{2+} -Austauscher Familie (CCX) innerhalb der CaCA-Superfamilie (Abb. 1).

Das NCKX6-Protein ist 585 Aminosäuren lang, mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa (Cai und Lytton, 2004a). Ein Topologiemodell basierend auf den bisherigen Erkenntnissen ist in Abb. 4 dargestellt. Im Gegensatz zu den NCKX-Familienmitgliedern werden für NCKX6 sieben C-terminale TMDs vorhergesagt, die genaue Topologie ist noch nicht geklärt. *nckx6* wird ubiquitär in allen bisher untersuchten Geweben transkribiert (Cai und Lytton, 2004a): Northern Blots zeigten eine Expression in Herz, Thymus, Lunge, Magen, Darm, Hoden, Niere, Skelettmuskel und Gehirn. Neben einer Gesamthirn-Probe konnte *nckx6* auch im *cerebralen Cortex*, *Cerebellum* und Hirnstamm nachgewiesen werden. Die Expression im auditorischen Hirnstamm wurde, wie schon erwähnt, noch nicht untersucht.

Alternatives Spleißen wurde bisher inmitten des zweiten hydrophoben Clusters von NCKX6 nachgewiesen und führt zu einer Verschiebung des Leserasters (Cai und Lytton, 2004a). Dies hat die Zerstörung der letzten drei vorhergesagten TMDs zur Folge, welche durch einen langen C-terminalen Schwanz ersetzt werden. Auf diese Weise fehlt in der verkürzten Spleißvariante der zweite α -repeat (siehe 4.2.1 und 4.2.2).

Außerhalb der α -repeats hat die Aminosäuresequenz von NCKX6 kaum Ähnlichkeit zu den Mitgliedern der NCKX-Familie. Auch die α -repeats selbst sind überraschend divergent (62% Sequenzübereinstimmung mit den NCX- und NCKX-Isoformen). Zudem sind Aminosäuremotive der α -repeats, welche innerhalb der NCX- und NCKX-Isoformen konserviert und essenziell für die Transportfunktion sind, bei NCKX6 nicht konserviert. Es wird vermutet, dass dies für die außergewöhnliche Ionenspezifität von NCKX6 verantwortlich sein könnte (Cai und Lytton, 2004a).

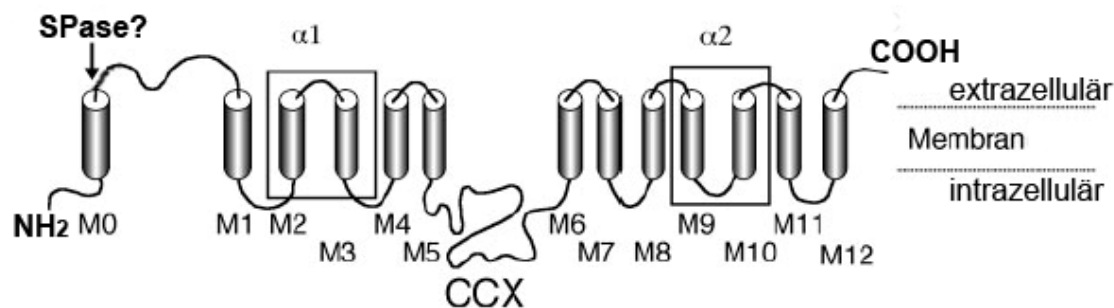


Abb. 4: Topologie von NCKX6

NCKX6 gehört zur CCX-Familie und besitzt 12 TMDs (M1-M12), verbunden über einen großen cytoplasmatischen Loop. Ein N-terminales Signalpeptid wird wahrscheinlich durch eine Signalpeptidase (SPase) abgespalten, so dass N- und C-Terminus extrazellulär liegen. Die beiden für die CaCA-Familie charakteristischen α -repeats ($\alpha 1$ und $\alpha 2$) sind eingerahmt. Abbildung verändert aus Cai und Lytton (2004b)

2.6 Calcium im auditorischen Hirnstamm

Diverse Studien haben gezeigt, dass die Entwicklung auditorischer Hirnstammstrukturen und das Überleben auditorischer Hirnstammneurone von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängen. So zeigten organotypische Kulturen des superioren Olivenkomplexes (2.7.2), wenn sie in einem Medium mit hoher K^+ -Konzentration gehalten wurden, eine dem *in-vivo* Zustand entsprechende Morphologie (Lohmann *et al.*, 1998). Diese Entwicklung wird durch die depolarisierende Wirkung der hohen extrazellulären K^+ -Konzentration (Zusatz von 25 mM KCl zum Standard-Zellkulturmedium, Zusammensetzung des Mediums siehe Lohmann *et al.*, 1998) erreicht, welche spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle öffnet. Hielt man die organotypischen Kulturen in Zellkulturmedium ohne Zugabe von KCl oder blockierte die spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle, starben viele Neurone der lateralen superioren Olive (LSO, siehe 2.7.2) ab und die verbleibenden zeigten nur wenige Projektionen vom medialen *Nucleus* des Trapezkörpers (medial *nucleus* of the trapezoid body, MNTB; (Lohmann *et al.*,

1998). Weitere Studien zeigten eine hohe sowie differenzielle und entwicklungsabhängig regulierte Expression Ca^{2+} -bindender Proteine im auditorischen Hirnstamm (5.1.2; (Friauf, 1993a; Friauf, 1994a; Lohmann und Friauf, 1996).

Die Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration spielt demnach eine essenzielle Rolle für die Entwicklung des auditorischen Hirnstamms und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher könnten maßgeblich zu dieser Ca^{2+} -Homöostase beitragen.

2.7 Der auditorische Hirnstamm der Ratte

Die Transduktion akustischer Signale findet in der *Cochlea* statt (Ashmore und Gale, 2000). Von dort werden elektrische Reize, welche das Schallereignis kodieren, über den auditorischen Nerv (AN) an die erste Station im auditorischen Hirnstamm, den *Nucleus cochlearis* (CN), weitergeleitet (Abb. 7). Neurone des CN projizieren u.a. bilateral in Teilgebiete des superioren Olivenkomplexes (superior olivary complex, SOC). Die Kerngebiete des SOC projizieren bilateral in den *Nucleus lemniscus lateralis* (NLL) sowie in den inferioren *Colliculus* (IC), zum Teil aber auch wieder zurück in die *Cochlea*. Vom IC werden die binaural eingehenden Informationen integriert und über den medialen geniculären *Nucleus* (medial geniculate body, MGB) in den primären auditorischen *Cortex* weitergeleitet (Webster *et al.*, 1992; Malmierca und Merchán, 2004; Caspary *et al.*, 2008).

Die Projektionen innerhalb der Hörbahn sind stets tonotop angeordnet, d.h. verschiedene Frequenzen werden in spezifischen Bereichen repräsentiert (Friauf und Kandler, 1993a; Friauf und Kandler, 1993b; Friauf und Lohmann, 1999; Rubel und Fritsch, 2002; Mauk und Buonomano, 2004; Kandler *et al.*, 2009). Diese Tonotopie findet man bereits entlang der Basilarmembran in der *Cochlea*, wo tiefe Frequenzen von Haarzellen nahe des Apex, hohe Frequenzen näher am ovalen Fenster transduziert werden. Auf die tonotope Anordnung in CN, SOC und IC wird in den folgenden Kapiteln kurz eingegangen.

In dieser Arbeit werden CN, SOC und IC auf die Verteilung von $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern untersucht, da für diese Gebiete, wie schon erwähnt (siehe 2.6), eine wichtige Rolle der Ca^{2+} -Regulation bereits durch diverse Studien gezeigt werden konnte.

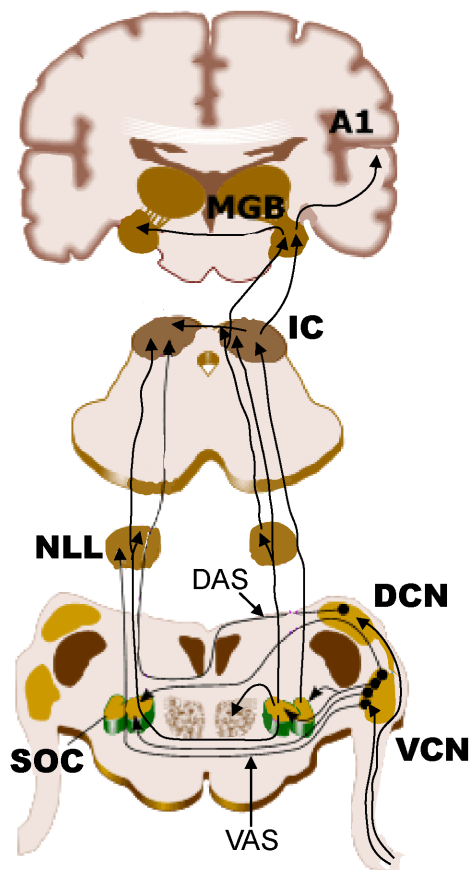


Abb. 5: Schematischer Verlauf der Hörbahn

Akustische Informationen gelangen über den auditorischen Nerv (AN) in den CN. Dieser projiziert bilateral in den SOC, welcher die Informationen u.a. an den IC weiterleitet. Der IC projiziert über den MGB in den primären auditorischen Cortex (A1). VAS = ventrale akustische Stria; DAS = dorsale akustische Stria; Abbildung verändert aus Silverstein *et al.* (1992)

2.7.1 Der CN

Der CN lässt sich in einen dorsalen (DCN) und einen ventralen (VCN) Bereich unterteilen, wobei der VCN wiederum in einen posterioren (PVCN) und einen anterioren (AVCN) Teil untergliedert ist (Webster und Trune, 1982). Neurone des Spiralganglions, deren Axone den auditorischen Nerv bilden, projizieren sowohl in den DCN als auch in den VCN. Im VCN bilden sie kelchartige Synapsen, die „endbulbs of Held“ genannt werden. Neurone des VCN leiten zeitliche und Intensitätsmerkmale der Schallwellen über die ventrale akustische Stria (VAS) bilateral in verschiedene Kerne des SOC (2.7.2), während der DCN über die dorsale akustische Stria (DAS) hauptsächlich kontralateral in NLL und IC projiziert (Ryugo und Willard, 1985; Friauf und Kandler, 1993a; Ryugo und Parks, 2003). Multipolare Neurone des VCN projizieren ebenfalls in den kontralateralen VCN (Doucet und Ryugo, 2006).

2.7.2 Der SOC

Der SOC ist nach dem CN die zweite zentrale Station der Hörbahn. Die Kerngebiete des SOC erhalten zum Teil binaurale Eingänge von beiden VCN (siehe folgender Text) sowie absteigende Projektionen von höheren Stationen des auditorischen Systems (Irvine, 1992; Schwartz, 1992a; Illing *et al.*, 2000; Yin, 2002). Im SOC lassen sich bei der Ratte sechs Kerngebiete unterscheiden (Abb. 6B, Abb. 8): die in Ratten S-förmige laterale superiore Olive (LSO), die mediale superiore Olive (MSO), der superiore paraoliväre *Nucleus* (SPN), der mediale *Nucleus* des Trapezkörpers (medial *nucleus* of the trapezoid body, MNTB) sowie der laterale und ventrale *Nucleus* des Trapezkörpers (LNTB bzw. VNTB). Während LSO, MSO, SPN und MNTB klar abgrenzbare Gebiete darstellen, sind der LNTB und VNTB weniger klar definierte Bereiche. Daher beschränkt sich diese Arbeit auf die Analyse von LSO, MSO, SPN und MNTB.

Der SOC ist an der Schalllokalisierung beteiligt. Dabei spielt die MSO eine Rolle bei der Detektion von interauralen Zeitunterschieden (McAlpine und Grothe, 2003; Grothe, 2003; Tollin, 2003a; Pecka *et al.*, 2008), während die LSO interaurale Pegelunterschiede detektiert (Stevens und Newman, 1936; Tollin, 2003b). Dazu erhält die LSO exzitatorische Eingänge vom ipsilateralen VCN, während der MTNB exzitatorische Eingänge vom kontralateralen VCN erhält. Der MNTB innerviert die (ipsilateral gelegene) LSO inhibitorisch (Spangler *et al.*, 1985; Thompson und Schofield, 2000). Somit wird die LSO von Schallwellen, welche auf das ipsilaterale Ohr fallen, erregt und von Schallwellen, die auf das kontralaterale Ohr fallen, gehemmt. Die Verrechnung dieser exzitatorischen und inhibitorischen Eingänge ermöglicht die Detektion von interauralen Pegelunterschieden. Die kelchförmige exzitatorische Synapse von VCN und kontralateralem MNTB wird als *Calyx* von Held bezeichnet und ist zu Übertragungsraten mit einer Frequenz von bis zu 600 Hz in der Lage (Wu und Kelly, 1993).

Wie die gesamte Hörbahn sind auch die Projektionen des SOC tonotop angeordnet. In LSO und MNTB werden hohe Frequenzen im medialen Bereich, tiefe Frequenzen im lateralen Bereich repräsentiert (Sommer *et al.*, 1993), während die MSO hohe Frequenzen ventral und tiefe Frequenzen dorsal repräsentiert (Guinan *et al.*, 1972; Sanes *et al.*, 1989).

SPN, LNTB und VNTB erhalten ebenfalls Eingänge vom CN. Des Weiteren sind die verschiedenen Kerngebiete des SOC untereinander durch zahlreiche Projektionen verknüpft (Thompson und Schofield, 2000). Der SOC sendet absteigende Projektionen an CN und *Cochlea*, während aufsteigende Projektionen bilateral an NLL und IC gehen (Illing *et al.*, 2000).

2.7.3 Der IC

Der IC lässt sich in einen zentralen *Nucleus* (central *nucleus* of the IC, ICc) sowie einen dorsalen *Cortex* (ICd) und einen externen *Cortex* (ICe; siehe Abb. 19A) untergliedern (Faye-Lund und Osen, 1985; Herbert *et al.*, 1991; Malmierca *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2001; Loftus *et al.*, 2008). Während der ICc aufsteigende Projektionen von CN und SOC erhält, terminieren in ICc und ICd hauptsächlich absteigende Bahnen aus dem auditorischen *Cortex*. Dabei werden tiefe Frequenzen dorsal, hohe Frequenzen ventral repräsentiert (Stiebler und Ehret, 1985; Brown und Liu, 1995). Neurone des ICc sind für die Weiterverarbeitung von Informationen zur Schalllokalisierung sowie für die Kodierung komplexer Kommunikationssignale verantwortlich (Pollak *et al.*, 2003; Caspary *et al.*, 2008).

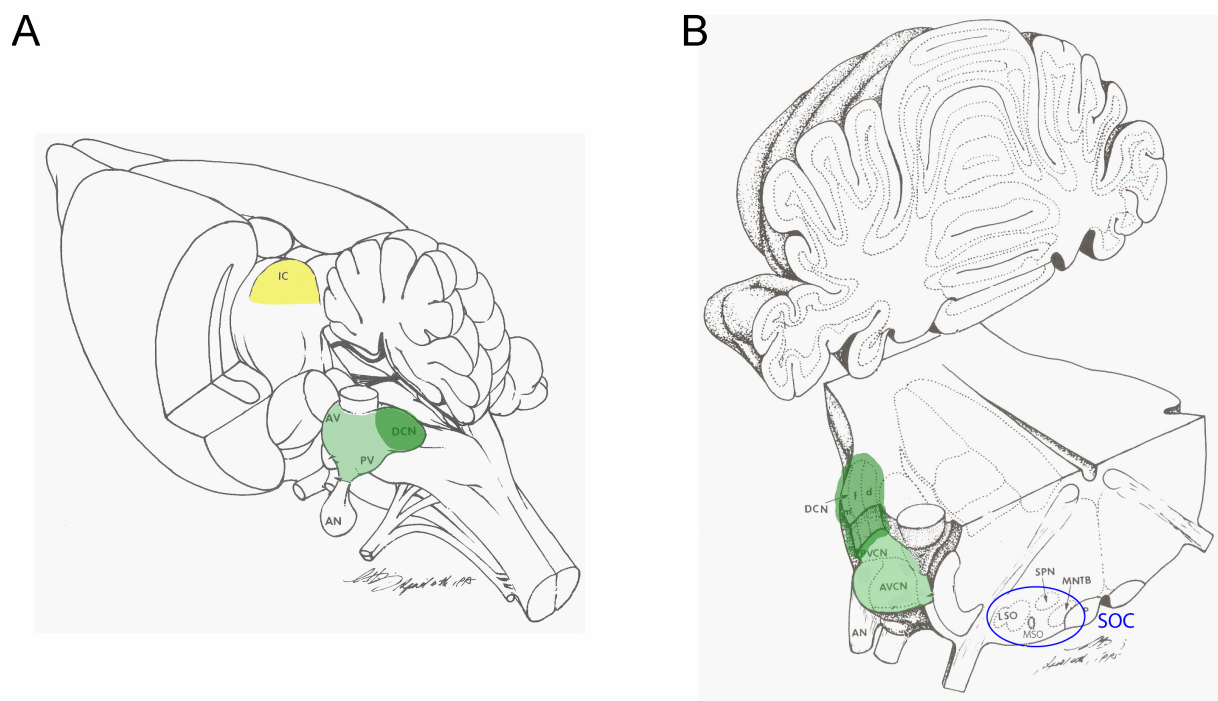


Abb. 6: Schematische Ansicht des Rattenhirns mit CN, SOC und IC

(A) Schematische Ansicht des gesamten Rattenhirns von lateral-caudal. Die linke Hemisphäre des *Cerebellums* sowie caudale Teile der linken corticalen Hemisphäre fehlen, um den Blick auf CN (hellgrün) und IC (gelb) zu ermöglichen. AV = AVCN; PV = PVCN (B) Schematischer Coronalchnitt durch *Cerebellum* und Hirnstamm mit DCN (dunkelgrün), VCN (hellgrün) sowie SOC. Das *Cerebellum* wurde angehoben, um den Blick auf die darunter liegenden Hirnstamm-Strukturen zu ermöglichen. Ansicht von lateral-rostral; Abbildungen verändert aus Godfrey *et al.* (2000)

2.8 Ontogenese des auditorischen Hirnstamms

Wie schon eingangs erwähnt (2.1) spielt Ca^{2+} eine wichtige Rolle als second messenger, auch für die Entwicklung von Neuronen. So wird durch Ca^{2+} u.a. die Synapsenbildung sowie die synaptische Plastizität beeinflusst (Artola und Singer, 1993; Ben-Ari *et al.*, 1997; Cherubini *et al.*, 1998; Kirsch und Betz, 1998; Augustine *et al.*, 2003; Malenka und Bear, 2004). Neurone des auditorischen Hirnstamms sind für ihre Entwicklung in besonderem Maße auf eine optimale Ca^{2+} -Regulation angewiesen (2.6).

Im Laufe der Ontogenese verändern Neurone des auditorischen Hirnstamms stetig ihre molekulare Ausstattung (Illing *et al.*, 2000). So zeigten Neurone des SOC u.a. neonatal eine hohe Expression des mit neuronalem Wachstum und Plastizität assoziierten Proteins GAP-43 (Illing *et al.*, 1999), veränderten im Laufe der Entwicklung ihr Repertoire an Glutamatrezeptoren (Caicedo *et al.*, 1998; Caicedo und Eybalin, 1999) und zeigten eine transiente Expression Ca^{2+} -bindender Proteine (Friauf, 1993b; Friauf, 1994b; Lohmann und Friauf, 1996). Mit dem Hörbeginn, welcher bei Ratten zwischen Postnataltag (P) 11 und 13 liegt (Uziel *et al.*, 1981), beeinflusst auch die sensorische Aktivität die Entwicklung auditorischer Hirnregionen. Tiere, die durch Deprivation oder genetische Mutationen, welche zu Taubheit führen, ohne sensorischen Eingang aufwachsen, zeigen diverse Fehlentwicklungen im zentralen auditorischen System (zum Überblick: (Illing *et al.*, 2000). Auch altersbedingte Veränderungen (bei Ratten im Alter von 2-3 Jahren) wurden im auditorischen Hirnstamm der Ratte nachgewiesen (Casparly *et al.*, 2008).

Die Chlorid-Homöostase und damit die inhibitorische Transmission auditorischer Hirnstammneurone ist in frühen postnatalen Stadien ebenfalls noch in einem unreifen Zustand. Die meisten auditorischen Hirnstammkerne befinden sich in frühen postnatalen Stadien noch vor dem sog. Depolarisations-/Hyperpolarisations-Wechsel (D/H-Wechsel, siehe 5.1.1.3), d.h. im adulten Tier inhibitorisch wirkende Transmitter, wie γ -Aminobuttersäure (γ -aminobutyric acid, GABA) und Glycin, wirken noch depolarisierend (Cherubini *et al.*, 1990a; Luhmann und Prince, 1991; Kandler und Friauf, 1995a). Dieser D/H-Wechsel findet in den Kernen des SOC zu unterschiedlichen Zeiten statt: Bei SPN-Neuronen zwischen Embryonaltag (E) 18-P1, bei LSO-Neuronen zwischen P5-8, bei MSO-Neuronen zwischen P5-9, bei MNTB-Neuronen erst zwischen P10-12 (Kandler und Friauf, 1995b; Ehrlich *et al.*, 1999; Lohrke *et al.*, 2005). Die frühe depolarisierende Wirkung der Transmitter wiederum führt zu einem Ca^{2+} -Einstrom über spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle sowie N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren, der vielseitige Auswirkungen auf die neuronale Entwicklung hat (Leinekugel *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 1998).

Im Laufe der Entwicklung werden demnach auch unterschiedliche Anforderungen an die Ca^{2+} -Homöostase gestellt, weswegen in meiner Arbeit auditorische Hirnstammstrukturen in einem unreifen (P4) sowie einem adulten reifen (P60) Stadium analysiert werden.

2.9 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen meiner Arbeit sollte die Verteilung von NCX1-3 und NCKX2-6 in CN, SOC und IC und damit deren Beitrag zur Ca^{2+} -Regulation im auditorischen Hirnstamm der Ratte untersucht werden. Um auch ontogenetische Aspekte der Ca^{2+} -Regulation zu berücksichtigen, wurden Ratten im Alter von P4, also in einem unreifen Entwicklungsstadium, sowie junge adulte Ratten im Alter von P60 analysiert.

Zunächst sollte die Proteinexpression von NCX1-3 sowie von NCKX2 in CN, SOC und IC mittels Immunhistochemie untersucht werden. Dies sollte eine Aussage über die Expressionsmuster in den Teilkerngebieten von CN, SOC und IC sowie über die subzelluläre Verteilung der Austauscher ermöglichen.

Des Weiteren sollte die Genexpression von *ncx1-3* und *nckx2-6* in CN, SOC und IC mittels reverser Transkription, gefolgt von genspezifischer PCR, untersucht werden. Auf diese Weise ist auch eine Aussage über die Verteilung von *nckx3-6*, gegen die zum Zeitpunkt dieser Arbeit keine Antikörper erhältlich waren, möglich.

Um die Genexpression auch quantitativ zu erfassen, sollten die relativen Genexpressionslevel in den auditorischen Hirnstammstrukturen mittels real-time PCR verglichen werden. Dabei sollten die relativen Expressionslevel der Isoformen sowohl in den einzelnen Hirnstammstrukturen zwischen P4 und P60 verglichen werden als auch innerhalb einer Altersstufe zwischen den verschiedenen Strukturen.

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet.

Chemikalie	Firma
Absolute QRT-PCR SYBR Green Fluorescein Mix	ABgene
Acrylamid	Carl Roth GmbH
Agarose	PeqLab
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH
Amphotericin B	PAA
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
Carbogengas	Air Liquide Deutschland GmbH
Chloroform	Merck
Chrom(III)-Kaliumsulfat	Merck
Coomassie Brillant Blau R-250	Sigma
Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dNTP)	Bioline
1,4-Diazobicyclo-(2,2,2)-Octan (DABCO)	ABgene
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH
Dithiotreitol (DTT)	Carl Roth GmbH
D-MEM (+4500mg/L Glukose +L-Glutamin -Pyruvat)	Invitrogen-Gibco
Essigsäure	Merck
Ethanol (EtOH)	Carl Roth GmbH
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH
Etidiumbromid	Sigma
F-12 Nutrient Mixture (Ham)	Invitrogen-Gibco
First strand buffer (5x)	Invitrogen
Fötale Kälberserum Gold (fetal calf serum, FCS)	PAA
Gelatine	Riedel-De Haen
Glucose	Carl Roth GmbH

Glycerin	Carl Roth GmbH
Glykogen	PeqLab
HEPES	Sigma
Iodacetamid	Fluka
Isopropanol	Carl Roth GmbH
Kaliumchlorid	Merck
Kynurensäure	Fluka
Lithiumchlorid	Carl Roth GmbH
Magermilchpulver	Lasana
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Methanol	Merck
Myo-Inositol	AppliChem
Natriumazid	Sigma
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH
Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS)	Carl Roth GmbH
Natriumhydrogencarbonat	AppliChem
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH
Natriumpyruvat	AppliChem
<i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid	Carl Roth GmbH
Nutridoma-CS (50x)	Roche Diagnostics
PageRuler Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas GmbH
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen-Gibco
Phenol	Carl Roth GmbH
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH
Polyvinylalkohol	Sigma
Proteaseinhibitor-Cocktail	Roche Diagnostics
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen
Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA)	Perbio
RNA 6000 Pico Chip Kit	Agilent
RNAlater	Ambion
RNase AWAY	Fluka
RNase-Free DNase Set	Qiagen

3. Material und Methoden

RNase-freies Wasser	Agilent
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit	Qiagen
Saccharose	AppliChem
SeeBlue [®] Plus2 Proteinmarker	Invitrogen
SUPERase-In	Ambion
SuperScript II Reverse Transkriptase	Invitrogen
<i>Taq</i> -Polymerase	Eigenherstellung
<i>N,N,N',N'</i> - Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH
Trichloroacetaldehydhydrat	Applichem
Tris	Carl Roth GmbH
Tris-hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH
Triton X-100	Fluka
Tween-20	Carl Roth GmbH
Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus	PerkinElmer Life Sciences
Xylencyanol	Carl Roth GmbH
Ziegenserum	Invitrogen-Gibco

3.2 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen sind in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet. Als Lösungsmittel diente deionisiertes Wasser, welches über Umkehrosiose in der hauseigenen Anlage der Technischen Universität Kaiserslautern hergestellt wurde.

Agarosegel-Probenpuffer

40 mM	Tris
20 mM	Essigsäure
1 mM	EDTA
40%	Glycerin
	Spur von Bromphenolblau oder Xylencyanol

Babyhamster-Nierenzellen (Baby Hamster Kidney, BHK)-Medium

44,5%	D-MEM
44,5%	F-12 Nutrient Mix
10%	FCS
1%	Penicilin/Streptomycin

Blocker-Lösung

3%	BSA
0,3%	Triton X-100
11%	Ziegenserum
130 mM	NaCl
7 mM	Na ₂ HPO ₄
3 mM	NaH ₂ PO ₄

Bradford-Reagenz

0,001%	Coomassie Brilliant Blau G-250
5%	Ethanol
10%	Phosphorsäure (85%)

Carrier-Lösung

1%	BSA
0,3%	Triton X-100
1%	Ziegenserum
130 mM	NaCl
7 mM	Na ₂ HPO ₄
3 mM	NaH ₂ PO ₄

dNTP-Mix

10 mM	dATP
10 mM	dCTP
10 mM	dGTP
10 mM	dTTP

Fixierlösung

4%	Paraformaldehyd
0,1 M	Phosphatpuffer

Fluoreszenz-Einbettmedium

30 g	Glycerin
0,5 mg	Phenol
12 g	Polyvinylalkohol
60 ml	0,1 M Tris
30 ml	deionisiertes Wasser
2,5% (w/v)	DABCO

Gelatine-Chromalaun-Lösung

1,250 g	Gelatine
0,125 g	Chrom (III)-Kaliumsulfat
500 ml	deionisiertes Wasser

Homogenisierungspuffer

250 mM	Saccharose
10 mM	Tris
10 mM	HEPES
1 mM	EDTA
1 Tablette/10 ml	Proteaseinhibitor-Cocktail

Hybridoma-Zellkulturmedium

39%	D-MEM
39%	F-12 Nutrient Mix
19,6%	FCS
1%	Nutridoma-CS
1%	Penicilin/Streptomycin
0,4%	Amphotericin B

Laemmli-Probenpuffer (5x)

312 mM	Tris-HCl, pH 6,8
10%	SDS
50%	Glycerin
50 mM	DTT
	Spuren von Bromphenolblau

Laemmli-Puffer

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
0,1%	SDS

PBS

130 mM	NaCl
7 mM	Na ₂ HPO ₄
3 mM	NaH ₂ PO ₄
	pH 7,4

Phosphatpuffer

0,1 M Na_2HPO_4
0,1 M NaH_2PO_4
pH 7,2

Präparationslösung 1x

20% 5x Präparationslösung
80% deionisiertes Wasser mit 2 mM CaCl_2 , 25 mM
 NaHCO_3 und 1mM Kynurensäure

Präparationslösung 5x

12,5 mM KCl
5 mM MgCl_2
6,25 mM NaH_2PO_4
10 mM Na-pyruvat
15 mM Myo-Inositol

Saccharoselösung 15% bzw. 30%

15% bzw. 30% Saccharose in PBS, pH 7,4

Sammelgel 5%

5% Acrylamid
0,13% *N, N'*-Methylenbisacrylamid
0,125 M Tris-HCl, pH 6,8
0,13% TEMED
0,075% Ammoniumperoxodisulfat

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

SB-Puffer

10 mM NaOH
pH 8,5 mit Borsäure einstellen

Tank-blotting-Puffer

2,5 mM Tris
19,2 mM Glycin
0,1% SDS
20% Methanol

Taq-Polymerase-PCR-Puffer 10x

200 mM Tris, pH 8,4
500 mM KCl
15 mM MgCl₂

TBS

20 mM Tris-HCl, pH 7,5
150 mM NaCl

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 mM EDTA

Trenngel 8%

8% Acrylamid
0,2% *N, N'*-Methylenbisacrylamid
0,39 M Tris-HCl, pH 8,8
0,1% SDS
0,2% TEMED
0,1% Ammoniumperoxodisulfat

Trenngelpuffer

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

TTBS

20 mM Tris-HCl, pH 7,5
150 mM NaCl
0,1% Tween-20

3.3 Verwendete Antikörper

3.3.1 Primäre Antikörper

Zur immunhistochemischen (IHC) Detektion sowie zur Analyse mittels Western Blot (WB) wurden die im Folgenden aufgeführten primären Antikörper verwendet (Tab. 1).

Tab. 1: Verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	eingesetzte Verdünnung		Inkubationszeit	
		IHC	WB	IHC	WB
rabbit-anti-NCX1 Antiserum (IgG) (Katalog: p11-13)	Swant (Bellinzona, Schweiz)	1:100	1:1000	18 h 4°C	2 h RT +18 h 4°C
rabbit-anti-NCX2 Antiserum (IgG) (Katalog: NCX21-S)	Alpha Diagnostics International (San Antonio, TX, USA)	1:20	1:1000	18 h 4°C	2 h RT +18 h 4°C
rabbit-anti-NCX3 Antiserum (IgG) (Katalog: NCX31-S)	Alpha Diagnostics International	1:20	1:1000	18 h 4°C	2h RT +18 h 4°C
rabbit-anti-NCKX2 (IgG) (Katalog: PA1-926)	ABR–Affinity BioReagents (Golden, CO, USA)	1:20	-	18 h 4°C	-
rabbit-anti-NCX3 (IgG)	Prof. K. Philipson UCLA School of Medicine, Los Angeles, CA, USA	1:500	1:5000	18 h 4°C	2 h RT +18 h 4°C
mouse-anti-NCX2 (IgM)	Prof. em. H. Porzig Universität Bern, Schweiz	1:20	1:100	18 h 4°C	2 h RT +18 h 4°C

Zur Generation des rabbit-anti-NCX1 wurde das gesamte NCX1-Protein verwendet und das spezifische Epitop nie bestimmt. Die rabbit-anti-NCX2 und rabbit anti-NCX3 von Alpha Diagnostics International wurden gegen N-terminale Peptide mit einer Größe von 22 Aminosäuren (NCX2) bzw. 20 Aminosäuren (NCX3) generiert. Bei NCX2 liegt dieses Peptid im Cytoplasma, bei NCX3 extrazellulär. Nähere Angaben wurden vom Hersteller nicht gemacht. Der rabbit-anti-NCKX2 von ABR wurde gegen ein synthetisches Peptid, welches die Aminosäuren 90-102 umfasst generiert. Zur Generation des rabbit-anti-NCX3 von Prof. Philipson sowie des mouse-anti-NCX2 von Prof. Porzig wurde jeweils der gesamten intrazellulären Loop des NCX3- bzw. NCX2-Proteins verwendet.

3.3.2 Sekundäre Antikörper

Der sekundäre Antikörper bindet an die Spezies-spezifische F_c-Region des primären Antikörpers. Die Konjugation des sekundären Antikörpers mit fluoreszierenden Farbstoffen ermöglicht die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe. Die in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper sind in Tab. 2 aufgelistet.

Tab. 2: Verwendete sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	eingesetzte Verdünnung	Inkubationszeit
goat-anti-rabbit-IgG-AlexaFluor488	Invitrogen - Molecular Probes (Karlsruhe)	1:1000	90 min bei RT
goat-anti-mouse-IgM-AlexaFluor488	Invitrogen - Molecular Probes	1:1000	90 min bei RT
donkey-anti-rabbit-IgG-HRP	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)	1:20000	60 min bei RT
sheep-anti-mouse-IgG-HRP	Thermo Fisher Scientific	1:5000	60 min bei RT
goat-anti-mouse-IgM-HRP	Thermo Fisher Scientific	1:5000	60 min bei RT

HRP = horseradish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase

3.4 Verwendete Primer

Die verwendeten Vorwärts (for)- und Rückwärts (rev)- Primer (Tab. 3) wurden von der Firma Biomers (Ulm) synthetisiert und in einer Konzentration von 20 pmol/μl (in TE-Puffer) in die Polymerasekettenreaktion (PCR) bzw. quantitative real-time PCR (qRT-PCR) eingesetzt.

Tab. 3: Verwendete Primer

Primer	Sequenz von 5' nach 3'	Produktlänge	Effizienz in qRT-PCR
m-NCX1-377for	AATGGAGAGACCACCAAGAC	504 bp	98,0%
m-NCX1-880rev	TTGGAAGCTGGTCTGTCTCC		
m-NCX2-1931for	GGATAGCAGAGATGGGCAAGC	204 bp	99,2%
m-NCX2-2134rev	CATCCTCATCCTCCTCCTCGC		
m-NCX3-988for	CAGACTGCAAGGAGGGTGTC	339 bp	99,4%
m-NCX3-1326rev	AATCACCAGCAATGAACCCG		
m-NCKX2-349for	CAGAGGAGAAGCCAGTGATGTGACG	535 bp	96,0%
m-NCKX2-883rev	GAAGGACACATCCCGAAAG		
m-NCKX3-556for	GTCGTGGCTCTTTCTTCCTG	476 bp	---
m-NCKX3-1031rev	GCCCTGCTGTTTATC		
m-NCKX4-1914for	GCAAAAGGCGACAAGGCTAAG	222 bp	95,5%
m-NCKX4-2135rev	GGAAAGTGATGCCCATGATGACA		
m-NCKX5-517for	TGTCCTGCTGCTGTGTTTTGAC	162 bp	100,6%
m-NCKX5-678rev	CTTGACTGGCGACGAATGTAGA		
m-NCKX6-852for	TGTGGTCACGGTCATCATCTGC	299 bp	95,9%
m-NCKX6-1150rev	GCAGCAACAAGA ACTCCACAGG		
m-GAPDH-29for	AGACAGCCGCATCTTCTTGTC	207 bp	96,3%
m-GAPDH-235rev	CTTGCCGTGGGTAGAGTCATA		

Die Effizienz der Primer wurde wie unter 3.12 beschrieben ermittelt; für NCKX3 konnte aufgrund von der Entstehung von mehreren PCR-Produkten (s. 3.12) keine qRT-PCR durchgeführt werden; rn = rattus norvegicus

Da die zur qRT-PCR verwendeten Primer für NCX2 in der nach 3.11 durchgeführten PCR keine Produktbanden zeigten, wurden weitere Primerpaare getestet (Tab. 4).

Tab. 4: In der PCR getestete NCX2-Primer

Primer	Sequenz von 5' nach 3'	Produktlänge
m-NCX2-1455for	GCGTGTGGGCGATGCTCA	529 bp
m-NCX2-1983rev	GACCTCGAGGCGACAGTTC	
m-NCX2-2261for	TCTGCATCCTGGTCATTGGTCTGC	338 bp
m-NCX2-2261for	TCTGCTCCTGGTCATTGGTCTGC	

3.5 Versuchstiere

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Versuchstieren handelte es sich um Sprague-Dawley Ratten beiderlei Geschlechts aus der Zucht des Tierhauses der Technischen Universität Kaiserslautern. Die Tiere wurden in einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus mit Futter und Wasser *ad libitum* gehalten. Tierzucht sowie Experimente wurden unter Beachtung der regional gültigen Tierschutzbestimmungen durchgeführt.

3.6 Immunhistochemischer Nachweis von NCX1-3 und NCKX2

3.6.1 Transkardiale Perfusion

Die Tiere wurden zunächst mit 7%iger Chloralhydrat-Lösung letal narkotisiert. Zu diesem Zweck wurden 700 mg Chloralhydrat pro Kilogramm Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Sobald das Tier keine Reflexe mehr auf Schmerzreize zeigte, wurde das Herz freigelegt und eine Kanüle mit 0,3 mm (P4) bzw. 0,8 mm (P60) Durchmesser in den linken Ventrikel eingeführt. Das rechte Atrium wurde eröffnet und sämtliches Blut mit kalter PBS aus dem Kreislauf gespült. Zur Perfusion wurden eine Schlauchpumpe (VC-360, Ismatec, Wertheim-Mondfeld) sowie ein Silikonschlauch mit einem Innendurchmesser von 2,5 mm (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) verwendet. Um sämtliches Blut aus dem Kreislauf auszuspülen wurden ca. 50 ml PBS mit einer Geschwindigkeit von 0,4-0,5 (P4) bzw. 0,6-0,7 (P60) durch das Kreislaufsystem gepumpt. Bei den Angaben zur Geschwindigkeit handelt es sich um

willkürliche Einheiten der Schlauchpumpe. Sobald austretendes PBS kein Blut mehr enthielt bzw. spätestens nach 8 min wurde durch dasselbe Schlauchsystem 4% PFA als Fixativ durch den Kreislauf des Tieres gepumpt. Die Geschwindigkeit betrug 0,4-0,5 (P4) bzw. 0,6-0,7 (P60), so dass das Fixativ möglichst schnell im Kreislaufsystem verteilt wurde und somit der *in vivo* Zustand des Gewebes bestmöglichst erhalten werden konnte. Mit dieser Geschwindigkeit wurde 15 min lang perfundiert. Um auch eine Diffusion in distalere Gewebe zu gewährleisten, wurde anschließend für weitere 45 min mit einer Geschwindigkeit von 0,1-0,2 fixiert. Das Gehirn wurde im Anschluss an die Perfusion aus dem Schädel präpariert und zur Nachfixierung bei Raumtemperatur (RT) für 1 h in 4% PFA inkubiert. Daraufhin wurde das Gehirn als Gefrierschutz in 30%ige Saccharoselösung überführt und darin vor dem Schneiden für mindestens 20 h belassen.

3.6.2 Anfertigung von Hirnschnitten

Von den zu untersuchenden Gehirnbereichen wurden mit Hilfe eines Gefrierschlittenmicrotoms (HM 400R, Microm, Waldorf) transversale, 30 µm dicke Schnitte angefertigt. Dazu wurde zunächst ein transversaler Schnitt etwas caudal der *Bulbi olfactorii* durchgeführt, um eine gerade Fläche zu erhalten, mit der das Gehirn auf dem Schneideblock des Microtoms aufgesetzt werden konnte. Die Reste des Rückenmarks wurden entfernt. Der Schneideblock des Microtoms wurde vor Aufsetzen des Gehirns auf -45 °C gekühlt und das Gehirn anschließend mit 30%iger Saccharoselösung ummantelt. Letzteres diente dem mechanischen Schutz des Gewebes beim Schneiden. Die Schnitte wurden daraufhin bei einer Schneideblocktemperatur von -30 °C in dorsal nach ventraler Schnittrichtung mit manuellem Vortrieb der Klinge angefertigt.

Für die NCX- und NCKX-Färbungen wurden die Gehirne in vier Teilsereien geschnitten, so dass alle vier Antikörperfärbungen an einem Gehirn durchgeführt werden konnten. Der Abstand zwischen zwei Schnitten einer Teilserei betrug somit 120 µm. Die Schnitte wurden in 15%iger Saccharoselösung gesammelt und anschließend bei RT unter Schütteln dreimal für je 7 min in PBS gewaschen, um überschüssige Saccharose- und PFA-Lösung zu entfernen.

3.6.3 Antikörperfärbungen

Die Antikörperfärbungen wurden nach der sog. „Free-floating-Methode“ durchgeführt. Dabei werden die Schnitte während der Wasch- und Färbeschritte in den Lösungen frei beweglich inkubiert. Die Waschschrte erfolgten in 6-Well Platten (TPP, Trasadingen, Schweiz) mit je ca. 8 ml PBS, die Inkubationsschritte in den Antikörperlösungen in 12-Well Platten (TPP), jeweils unter leichtem Schütteln. Nach zuvor (3.6.1) beschriebenem dreimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte für 1 h bei RT in Blockerlösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen und das Gewebe durch enthaltenes Triton-X-100 zu permeabilisieren. Anschließend wurden die primären Antikörper in entsprechender Konzentration zugegeben (Tab. 1) und für ca. 18 h bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte in 1 ml Carrierlösung überführt, welcher der entsprechende sekundäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 zugefügt wurde (Tab. 2). Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT. Die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten sekundären Antikörper wurden jeweils so gewählt, dass sie gegen Immunglobuline der Klasse G bzw. M aus der Spezies, aus welcher der primäre Antikörper stammte, gerichtet sind. Die Detektion der Antigene erfolgte demnach durch spätere Detektion der Fluoreszenz der sekundären Antikörper. Um ungebundene sekundäre Antikörper zu entfernen, wurden die Schnitte nach der Inkubation viermal für jeweils 7 min in PBS gewaschen und anschließend auf mit Gelatine-Chromalaun beschichtete Objektträger aufgezogen. Das Eindeckeln erfolgte nach dem Trocknen der Schnitte mit Fluoreszenz-Einbettmedium, welches zum Schutz vor Ausbleichen der Fluoreszenz das anti-Fading Reagenz DABCO enthielt.

Um die Spezifität der verwendeten Antikörper von Alpha Diagnostics International gegen NCX2 und NCX3 zu untersuchen, wurden unter gleichen Bedingungen ebenfalls Färbungen mit einem monoklonalen NCX2-Antikörper (Thurneysen *et al.*, 2002) sowie mit einem im Labor von Prof. Philipson hergestellten polyklonalen NCX3-Antikörper (Thurneysen *et al.*, 2002) durchgeführt (Tab. 1; s. 3.7). Diese Färbungen erfolgten nur auf einer kleinen Auswahl an Gehirnschnitten, so dass nicht alle auditorischen Hirnstammstrukturen analysiert wurden.

3.6.4 Epifluoreszenzmikroskopie

Ein Teil der Antikörperfärbungen wurde mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops (Axioskop 2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen) ausgewertet, ein weiterer Teil der Auswertung erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (3.6.5). Aufnahmen erfolgten mit 5x Objektiv (Zeiss Plan-Neofluar 5x/0,15), 10x Objektiv (Zeiss Plan-Neofluar 10x/0,3), 20x Objektiv (Zeiss Plan-Neofluar 20x/0,5) oder 40x Objektiv (Zeiss Plan-Neofluar 40x/0,75). Zur Anregung diente eine Quecksilber-Kurzbogenlampe (HBO 103 W/2, Osram GmbH, München), in deren Strahlengang ein Fluoreszenzfiltersatz (Filtersatz 15, Carl Zeiss) für die spezifische Anregung der an die sekundären Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe sorgte. Mit Hilfe eines Langpassfilters wurde das emittierte Licht auf Wellenlängen über 590 nm begrenzt und an Kamera oder Okular weitergeleitet. Die spektrale Trennung der Filter erfolgte über einen Strahlenteiler bei 580 nm. Zur Dokumentation diente eine Kamera des Typs ORCA HR (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Hersching am Ammersee) sowie die Software AnalySIS 3.0 (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster). Die Aufnahmen wurden mit Hilfe der LSM Image Browser Software 4.0 (Carl Zeiss) bearbeitet. Abbildungen wurden mit Adobe Illustrator CS2 (Adobe Systems GmbH, München) erstellt und in ihrer finalen Version mit einem Canon 1180 Drucker (Canon Deutschland, Krefeld) ausgedruckt.

Aufgrund der starken Hintergrundfärbung erfolgte keine Quantifizierung der Immunfluoreszenz. Unterschiede in der Färbintensität wurden rein subjektiv bestimmt. So wurde eine Färbung, die subjektiv deutlich als überdurchschnittlich intensiv im Vergleich zu allen gefärbten Strukturen erschien, als „stark“ bezeichnet. Eine Färbung, die deutlich schwächer als der Durchschnitt erschien, galt als „schwach“.

3.6.5 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Neben der Epifluoreszenzmikroskopie erfolgte die Auswertung zum Teil auch mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss) und der zugehörigen LSM 5 Software (Carl Zeiss). Übersichtsaufnahmen wurden mit einem 10x Objektiv (Zeiss Plan-Neofluar 10x/0,3), Detailaufnahmen mit einem 40x Ölimmersionsobjektiv (Zeiss Plan-Neofluar 40x/1,3 oil) gemacht. Die Lochblende wurde so eingestellt, dass die Dicke der optischen Schnitte unter Verwendung des 10x Objektivs weniger als 19 μm , bei Verwendung

des 40x Objektivs weniger als 1 μm betrug. Die Auflösung der Aufnahmen lag bei 1024x1024 Pixeln.

Der AlexaFluor488 Farbstoff wurde mittels eines Argon-Lasers, welcher Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm emittierte, angeregt. Über einen Hauptfarbenteiler (488/543 nm) wurde das Licht auf das auszuwertende Objekt gelenkt, so dass Anregungs- und Emissionswellenlängen getrennt wurden. Das von der Probe emittierte Licht mit einem Emissionsmaximum von 519 nm wurde durch einen 545 nm Nebenfärbenteiler geleitet. Der von diesem reflektierte Teil des Lichtes ($< 545 \text{ nm}$) gelangte daraufhin über einen 505-550 nm Bandpassfilter zum Detektor.

3.6.6 Bestimmung des mittleren Durchmessers von Zellsomata

Um den Zelltyp einiger immunreaktiver Zellen im DCN näher zu bestimmen, wurde deren mittlerer Durchmesser ermittelt. Dies erfolgte mit der von Kane *et al.* (1981) verwendete Formel:

$$D = \frac{b+l}{2} \quad \text{mit } D = \text{mittlerer Durchmesser; } b = \text{Breite der Zelle; } l = \text{Länge} \quad \text{Formel 1}$$

Dazu wurden die gefärbten Somata mit Hilfe der „Cell Imaging Software for Life Science Microscopy“ (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH) digital vergrößert und in ihrer Länge und Breite vermessen. Zur Bestimmung der Zell-Länge wurde eine Messlinie entlang der längsten Achse durch das Soma gelegt, die Breite wurde im rechten Winkel dazu gemessen (Abb. 7). Mittelwert und Standardabweichung der auf diese Weise berechneten mittleren Zelldurchmesser wurden mit Hilfe von Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) berechnet (siehe Tab. 5-10).

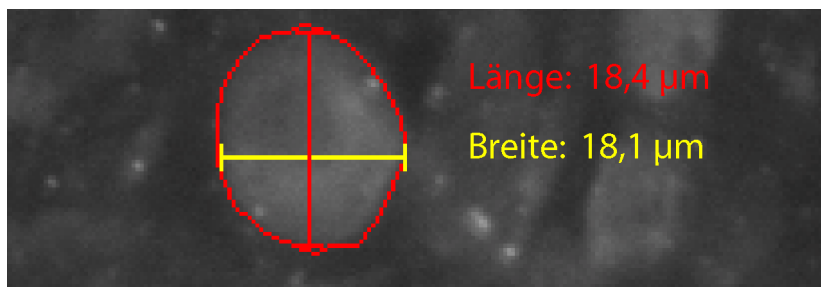


Abb. 7: Zellvermessung mit der „Cell Imaging Software for Life Science Microscopy“

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt des DCN im Alter von P4 mit immunreaktiven Signalen für NCX2. Immunreaktive Zellsomata wurden unter digitaler Vergrößerung umrandet und Länge (rot) sowie Breite (gelb) zur Verwendung in Formel 1 ermittelt.

3.7 Untersuchung der Antikörperspezifität

Die Spezifität der zur immunhistochemischen Detektion verwendeten Antikörper gegen NCX1 (Swant) sowie NCX2 und NCX3 (Alpha Diagnostics International) wurde mit Hilfe von Western Blots getestet. Als Negativkontrolle für die gegen NCX1 und NCX2 gerichteten Antikörper dienten BHK-Zellen, welche endogen keine NCX-Proteine exprimieren (Linck *et al.*, 1998). Sie wurden mir freundlicherweise von Prof. em. Porzig (Universität Bern, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Als Negativkontrolle für NCX3 wurden in flüssigem Stickstoff gefrorene KO-Gehirne (P30) verwendet (Sokolow *et al.*, 2004), welche mir freundlicherweise von Prof. Annunziato (Università degli Studi di Napoli - Federico II, Neapel, Italien) zur Verfügung gestellt wurden. Als Positivkontrolle diente das Gehirn einer P30 Wildtyp (WT)-Maus. Da die IHC auf Rattengewebe erfolgte, wurden ebenfalls Western Blots mit Rattengewebe durchgeführt. Zum weiteren Vergleich der Bandenmuster wurden zusätzlich Western Blots mit Antikörpern, welche gegen andere Epitope der NCX2- und NCX3-Proteine gerichtet sind, durchgeführt. Der verwendete monoklonale mouse-anti-NCX2-Antikörper (Thurneysen *et al.*, 2002) stammt ebenfalls von Prof. em. Porzig, während der polyklonale rabbit-anti-NCX3-Antikörper (Thurneysen *et al.*, 2002) freundlicherweise von Prof. K. Philipson (UCLA School of Medicine, LA, Kalifornien, USA) zur Verfügung gestellt wurde.

3.7.1 Subzelluläre Gewebefraktionierung

Zunächst wurden die Gewebe bzw. Zellen homogenisiert und anschließend fraktioniert (Williams *et al.*, 1999a), um so neben dem Homogenat auch Fraktionen zu erhalten, in denen Cytoplasmabestandteile bzw. Plasmamembranbestandteile angereichert sind. Dazu wurden WT- und NCX3-KO-Gehirne bei 4 °C in 5 ml Homogenisierungspuffer 10 s bei 23500 rpm homogenisiert (Micra D-8, Art Labortechnik, Müllheim). Die aus einer 25 cm² Zellkultur-Flasche (TPP) geernteten BHK-Zellen wurden in 1 ml Homogenisierungspuffer 50 s bei 23500 rpm homogenisiert. Eine Probe der jeweiligen Homogenate wurde bei -20 °C gelagert, der Rest wurde bei 7000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5417R) und 4 °C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das resultierende Pellet in 1 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert und erneut bei 7000 rpm 10 min zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden anschließend für 30 min bei 20000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der aus diesem Schritt resultierende Überstand stellt die mit Cytoplasmabestandteilen angereicherte Fraktion dar und wurde bei -20 °C gelagert. Das Pellet, welches die mit Membranbestandteilen angereicherte

Fraktion darstellt (Williams *et al.*, 1999b), wurde in 200 µl (Gehirngewebe) bzw. 50 µl (BHK-Zellen) Homogenisierungspuffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung ebenfalls bei -20 °C gelagert.

3.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Um die im Homogenat bzw. in den einzelnen Fraktionen enthaltene Proteinmenge zu berechnen, wurde die Proteinkonzentration nach Bradford (1976) bestimmt. Der im verwendeten Bradford-Reagenz enthaltene Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blau R-250 ändert nach Komplexbildung mit Proteinen sein Absorptionsspektrum. Das Absorptionsmaximum der freien Form liegt bei 471 nm, das der komplexierten Form bei 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm kann daher als Maß für den Proteingehalt einer Probe verwendet werden.

Um den Proteingehalt der Proben zu bestimmen, wurde eine Kalibriergerade mit 0 µg, 2 µg, 5 µg, 10 µg, 15 µg und 20 µg des als Standard verwendeten Proteins BSA erstellt. Von den Hirngewebeproben wurde 1 µl je Fraktion sowie 1 µl einer 1:10 Verdünnung der Fraktionen eingesetzt. Von den Fraktionen der BHK-Zellen wurden unverdünnt 1 µl und 5 µl sowie 1 µl einer 1:10 Verdünnung eingesetzt. Die Volumina sämtlicher Ansätze wurden jeweils auf 50 µl mit deionisiertem Wasser aufgefüllt und mit 500 µl Bradford-Reagenz versetzt. Nach 10-minütigem Schütteln bei RT wurde die Absorption bei 595 nm gemessen (Multiscan EX, Thermo Labsystems, Dreieich) und anhand der Geradengleichung zur erstellten Kalibriergerade die Proteinmenge errechnet.

3.7.3 Western Blot

Die Proteine wurden zunächst mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennt (Shapiro *et al.*, 1967; Weber und Osborn, 1969a; Weber und Osborn, 1969b). Während der Polymerisierung bildet Acrylamid mit *N,N'*-Methylenbisacrylamid ein Netzwerk, dessen Porengröße mit der Acrylamidkonzentration korreliert.

SDS bindet als anionisches Detergenz Proteine in einem konstanten Masse zu Ladungsverhältnis von 1,4 g SDS/g Protein und überdeckt damit deren Eigenladung. Die SDS-Proteinkomplexe wandern aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld zur Anode, kleinere Proteine wandern dabei schneller und damit weiter als große.

Zum Gießen der Gele dienten 8 cm x 10 cm große Platten der Firma Bio-Rad (Hercules, Kalifornien, USA). Die Gele wurden nach dem von Laemmli (1970) beschriebenen System

gegossen. Als Sammelgel zur Vortrennung und Konzentrierung der Proben diente stets ein Gel mit 5% Polyacrylamid, das Trenngel enthielt 8% Polyacrylamid.

Die Proteinproben (je 30 µg) wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 0,35 Volumenteilen 5x Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 40 °C inkubiert. Um später das relative Molekulargewicht der Proteinbanden abschätzen zu können, wurde ein vorgefärbter Proteinmarker (SeeBlue Plus2, Invitrogen, Karlsruhe bzw. PageRuler Prestained Protein Ladder Plus, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) parallel aufgetrennt. Die Trennung der Proben erfolgte in einer Bio-Rad MINI-Protean 3 Elektrophoresekammer.

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) übertragen. Auf dieser konnten sie dann mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Der Western Blot wurde nach dem Tank-blotting-Verfahren (Towbin *et al.*, 1979) durchgeführt. Dazu wurde auf das SDS-Polyacrylamidgel, über welches die Proteinproben aufgetrennt wurden, eine PVDF-Membran aufgelegt, welche zuvor zur besseren Bindung von Proteinen für 30 s mit 100% Methanol benetzt wurde. Gel und Membran wurden mit in Tank-blotting-Puffer getränkten Filterpapieren und Schwämmen umgeben und in eine ebenfalls mit Tank-blotting-Puffer gefüllte Tank-blotting-Apparatur (Mini-Kompakt-Elektroblotting-System-Apparatur, Biostep GmbH, Jahnsdorf) gelegt. Zum Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran wurde ein Strom von 380 mA mit der Anode auf Seite der Membran für 1 h angelegt.

Die Membran wurde nach erfolgtem Proteintransfer unter Schütteln zunächst 2 h bei RT, anschließend für ca. 18 h bei 4 °C mit dem primären Antikörper in 5% Magermilch in TTBS inkubiert (Tab. 1). Nach viermaligem Waschen mit TTBS innerhalb von 10 min wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper unter Schütteln für 1 h bei RT inkubiert (Tab. 2). Anschließend wurde die Membran wie zuvor gewaschen. Zur Detektion waren die sekundären Antikörper mit Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) konjugiert, welche die verwendeten Chemilumineszenzreagenzien (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus *Enhanced Luminol Reagent* und *Oxidizing Reagent* von PerkinElmer Life Sciences, Waltham, Massachusetts, USA) umsetzt (Gross und Sizer, 1959). Das bei dieser Reaktion emittierte Licht wurde mit Hilfe einer VersaDoc Imaging System-Kammer (Model 3000) von Bio-Rad detektiert. Zur Detektion wurden je 600 µl beider Reagenzien vermischt und für 1 min auf der Membran inkubiert. Überschüssige Lösung wurde anschließend entfernt.

3.8 Gewebepräparation zur Untersuchung der Expression von *ncx1-3* sowie *nckx2-6* auf Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid, mRNA)-Ebene

Da nur Antikörper gegen NCX1-3 sowie NCKX2 erhältlich waren, wurde die Verteilung von NCKX3-6 ausschließlich auf mRNA-Ebene untersucht. Zu diesem Zweck musste zunächst Gewebe der zu analysierenden Hirnregionen CN, SOC und IC präpariert werden. Tiere im Alter von P4 wurden dazu ohne Betäubung dekapitiert, Tieren im Alter von P60 wurde zunächst eine letale Dosis Chloralhydrat (700 mg/kg Körpergewicht) injiziert. Der Kopf wurde direkt in eiskalte Präparationslösung, welche auf einem Block aus gefrorener Präparationslösung stand, überführt. Die Präparationslösung wurde zuvor für mindestens 30 min mit Carbogengas (95% O₂, 5% CO₂; Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf) begast. Das Gehirn wurde schnellstmöglich frei präpariert und mit feinen Pinzetten wurden *Dura mater*, *Pia mater* und *Arachnoidea mater* von Hirnstamm und Mittelhirn entfernt. Während der gesamten Präparation verblieb das Gehirn in einer Schale mit eiskalter Präparationslösung.

Im Anschluss an die Entfernung der Hirnhäute wurden zunächst die IC unter visueller Kontrolle mit einem Skalpell abgetrennt. Dazu erfolgten Schnitte in dorso-ventraler Richtung sowohl rostral als auch caudal der IC, welche die IC von den *Colliculi superiores* sowie vom *Cerebellum* trennten. Das *Cerebellum* wurde an den *Pedunculi cerebellaris* vom Hirnstamm getrennt und als Kontrollgewebe für die PCR (s. 3.11) ebenfalls zur späteren RNA-Isolierung verwendet. Daraufhin lagen die IC frei und konnten ebenfalls abgetrennt werden.

Der CN wurde an beiden Seiten des Gehirns unter Verwendung eines Binokulars vom Hirnstamm abgetrennt. Zur Isolierung des SOC wurden 300 µm dicke transversale Hirnstammschnitte angefertigt. Dazu wurden zunächst Reste des Rückenmarks sowie Hirnregionen rostral der *Pons* entfernt. Der verbleibende Hirnstamm wurde mit rostraler Seite nach unten mit Cyanacrylat-Klebstoff auf den Probenteller eines Vibrationsmikrotoms (VT 1000S, Leica, Bensheim) geklebt. Der Probenteller mit Präparat wurde anschließend auf einer magnetischen Halterung in der Präparationsschale des Mikrotoms angebracht und die Schale mit eiskalter Präparationslösung gefüllt. Die 300 µm dicken Schnitte wurden mit höchster Vibrationsgeschwindigkeit und geringer Vortriebsgeschwindigkeit unter optischer Kontrolle von lateral nach lateral angefertigt. Die Schnitte wurden in mit Carbogen begaste Präparationslösung überführt und schließlich der Bereich des SOC mit einem Skalpell unter

visueller Kontrolle mit Hilfe eines Binokulars herausgeschnitten (Abb. 8). Als weitere Kontrollgewebe (s. 3.11) wurden Herz und Leber einiger Tiere ebenfalls herauspräpariert.

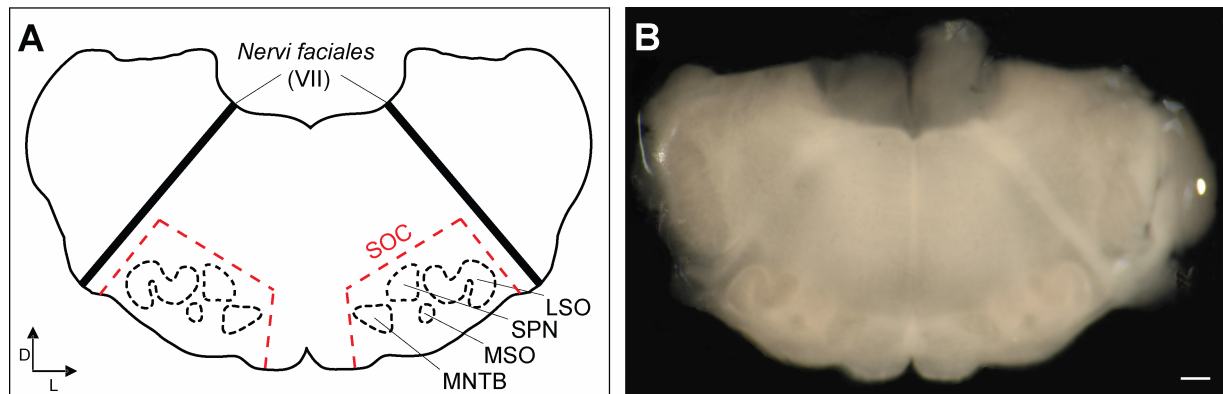


Abb. 8: Gewebepräparation IC und SOC

Schematische Darstellung (A) und Gewebepräparat (B) eines transversalen Hirnstammschnitts auf Höhe des SOC bei P25. Der SOC wurde entlang der roten gestrichelten Linie ausgeschnitten; Größenbalken = 650 μm ; Abbildung verändert aus Ehmann *et al.* (2008).

Zur Stabilisierung der RNA wurden sämtliche Gewebe direkt nach der Präparation in das Fünffache ihres Eigenvolumens an *RNAlater* (Ambion/Applied Biosystems, Austin, Texas) überführt und für ca. 24 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde überstehendes *RNAlater* abgenommen und die Gewebe bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.9 RNA-Isolierung

Die Isolierung der gesamten RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Lipid Tissue Mini Kits (Qiagen, Hilden). Zur Homogenisierung des lipidreichen Hirngewebes wurde QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) verwendet. Während der gesamten Arbeitsschritte wurde auf RNase-freies Arbeiten geachtet. So wurden der Homogenisator (Micra D-8, Art Labortechnik, Müllheim) sowie verwendete Pinzetten gründlich mit RNase AWAY (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) gesäubert und ausschließlich RNase-freie Reaktionsgefäße verwendet. Sofern nicht anders beschrieben, erfolgten sämtliche Schritte bei RT. Zur Isolierung von RNA aus IC-Gewebe wurden sowohl bei P4 als auch P60 die beiden IC eines Tieres eingesetzt. CN- und SOC-Gewebe wurde aufgrund der geringen Gewebemengen bei P4 von 4-6 Tieren, bei P60 von 4 Tieren gesammelt. Zur Kontrolle der *ncx*- und *nckx*-Expression wurde auch aus *Cerebellum*, Herz und Leber RNA isoliert. Bei beiden Altersstufen wurden ein *Cerebellum*, ein Herz sowie 50 mg Leber eingesetzt.

Zunächst wurden die jeweiligen Gewebe in 1 ml QIAzol Lysis Reagent 10 s bei 23500 rpm homogenisiert und anschließend 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform und zwölfmaligem Invertieren wurde der Ansatz für 3 min bei RT inkubiert und im Anschluss 15 min bei 12000 \times g und 4 °C zentrifugiert (Heraeus Multifuge 1S-R, Thermo Fisher Scientific). Die obere, RNA-haltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen (Vol) RNase-freiem 70%igem EtOH (4 °C) versetzt, um während der nächsten Schritte eine optimale Bindung der RNA an die Membran der im RNeasy Lipid Tissue Mini Kit enthaltenen Säulchen zu gewährleisten. Von diesem Ansatz wurden aufgrund der begrenzten Ladekapazität bis zu 700 µl auf die Säulchen übertragen und für 15 s bei 15000 rpm und RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurde entsorgt und dieser Schritt mit dem restlichen Ansatz wiederholt. Die Säule wurde daraufhin mit 350 µl RW1 Puffer versetzt und bei 15000 rpm und RT 15s zentrifugiert. Um evtl. ebenfalls an die Säule gebundene Desoxyribonukleinsäuren (desoxyribonucleic acid, DNA) zu degradieren, wurden 10 µl DNase mit 70 µl RDD Puffer (beides RNase-Free DNase Set, Qiagen) direkt auf die Säule gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Säule nach Zugabe von weiteren 350 µl RW1 Puffer bei 15000 rpm 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und zum Waschen 500 µl RPE Puffer auf die Säule gegeben. Nach 15 s Zentrifugation bei 15000 rpm wurde der Durchfluss verworfen und es folgten zwei weitere Waschschritte mit 500 µl RPE Puffer und 2 min Zentrifugation bei 15000 rpm. Zum restlosen Entfernen des Puffers wurde die Säule im Anschluss 1 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Die Elution der gebundenen RNA erfolgte mit 40 µl RNase-freiem Wasser, welches direkt auf die Säule gegeben wurde. Nach 1 min Inkubation wurde 1 min bei 15000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss erneut auf die Säule gegeben und ein zweites Mal zentrifugiert. Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit Hilfe eines Nanodrop D-1000 UV-Vis Spectrophotometers (Peqlab, Erlangen) bestimmt und die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.9.1 Qualitätsbestimmung der isolierten RNA

Die Qualität der isolierten RNA wurde mit Hilfe eines Agilent 2100 Bioanalyzers (Agilent Technologies, Böblingen) überprüft. Dazu wurde das Agilent RNA 6000 Pico Kit entsprechend den Herstellerangaben verwendet und die RNA in einer Konzentration von ca. 1 ng/µl eingesetzt. Mit diesem Kit wird die zu untersuchende RNA mittels Kapillarelektrophorese in einer Gelmatrix aufgetrennt. Ein ebenfalls gleichzeitig aufgetrennter Größenstandard (RNA 6000 Pico Ladder, Agilent Technologies) erlaubte die Größenbestimmung der RNA-Banden. Vorteil dieser Methode ist, dass sehr kleine Mengen an

RNA (50-5000 pg/ μ l laut Herstellerangaben) in die Analyse eingesetzt werden können und die Messung durch etwaige Kontaminationen kaum beeinträchtigt wird (Imbeaud *et al.*, 2005).

Die Qualität der RNA wird unter anderem anhand der 18S und 28S ribosomalen RNA (rRNA)-Banden im Elektrospherogramm bestimmt. Abb. 9A zeigt repräsentativ das Elektrospherogramm isolierter RNA aus P4 IC-Gewebe, welche eine gute Qualität zeigte, wogegen in Abb. 9B ein Beispiel für RNA schlechter Qualität, welche nicht für die Analysen verwendet wurde, dargestellt ist.

Das Verhältnis der Breite des 28S Peaks zur Breite des 18S Peaks sollte optimalerweise 2,0 betragen. Allerdings ist dieser Wert in der Praxis kaum zu erreichen (Imbeaud *et al.*, 2005) und es können zudem noch weitere Kriterien zur Qualitätsbestimmung der RNA herangezogen werden. In dieser Arbeit wurden daher Werte von mindestens 1,3 als ausreichend erachtet. Diese Grenze wurde willkürlich gesetzt, da es RNA-Proben gab, die bei diesem Wert anhand der im Folgenden erläuterten Merkmale noch eine gute Qualität aufwiesen. So gibt die Basislinie des elektrophoretischen Diagramms einen Hinweis auf Degradation, sie sollte wie in Abb. 9A möglichst flach und ohne größere Ausschläge sein. Peaks im Verlauf der Basislinie, die unterhalb der 18S rRNA Bande liegen, deuten auf degradierte RNA hin (Abb. 9B). Ausnahme bildet der in Abb. 9A und B sichtbare Peak bei einer Retenca. 22 s. Dieser repräsentiert die 5S rRNA, welche bei der hier angewendeten Methode zur RNA-Isolierung ebenfalls angereichert wird. Eine hohe Basislinie mit Erhebungen zwischen den 18S und 28S Peaks deutet auf Verunreinigungen mit DNA hin (Abb. 9B). Die RNA in Abb. 9B zeigte zudem eine starke Degradation der 28S rRNA.

Zusammenfassend wurden ausschließlich RNA-Proben verwendet, deren 28S:18S Verhältnis mindestens 1,3 betrug und die kaum Degradation bzw. Verunreinigungen mit DNA zeigten.

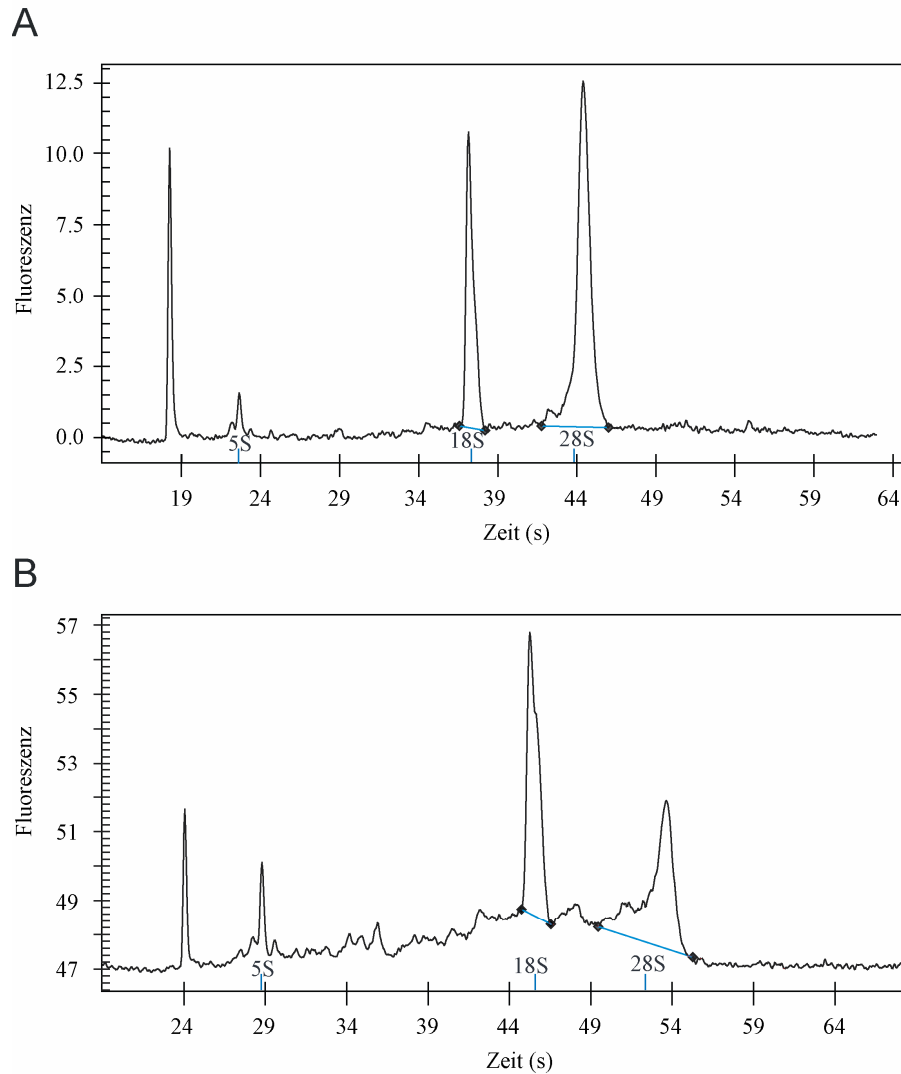


Abb. 9: Elektropherogramm isolierter RNA aus P4 IC- sowie P60 CN-Gewebe

Ein Kriterium zur Qualitätsbestimmung der isolierten RNA stellt das Verhältnis der Breite des 28S rRNA-Peaks zur Breite des 18S rRNA-Peaks dar (Details siehe Text). (A) Beispiel für RNA guter Qualität aus P4 IC-Gewebe. Das 28S:18S Verhältnis betrug 1,8 und insgesamt zeigte das Elektropherogramm eine flache Basislinie, wodurch Degradationen sowie Verunreinigungen mit DNA weitgehend ausgeschlossen werden konnten. Der Peak bei einer Retentionszeit von ca. 18 s gehört zu dem ebenfalls aufgetragenen Größenstandard, der Peak bei ca. 22 s stellt die 5S rRNA dar. (B) Beispiel für RNA schlechter Qualität aus P60 CN-Gewebe. Die Basislinie zeigte Degradation der RNA sowie Verunreinigungen mit DNA, auch die 28S rRNA war stark degradiert (Details siehe Text).

3.9.2 RNA Fällung

Da die Konzentration der isolierten RNA aus CN- und SOC-Gewebe sehr gering war (70-200 ng/µl bei P4) und in die reverse Transkription (3.10) maximal 13 µl RNA eingesetzt werden können, wurde die RNA gefällt. Um gleiche Bedingungen für alle Proben zu gewährleisten, wurde auch die RNA der restlichen Gewebe gefällt. Dazu wurden die gesamten RNA-Proben mit 1/20 Vol 8 M LiCl sowie 2,5 Vol 100% EtOH und 0,5 µl Glykogen für ca. 16 h bei -20 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 10000 \times g (Eppendorf Centrifuge 5417R) und 4 °C für 45 min, um die gefällte RNA zu pelletieren. Es folgte ein Waschschriff mit 500 µl 70% EtOH sowie Zentrifugation für 15 min bei 10000 \times g. Die Überstände wurden jeweils verworfen. Nach Verdunsten des restlichen EtOH wurde die gefällte RNA in 13 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

3.10 Reverse Transkription (RT)

Zur Herstellung der gewebespezifischen cDNA-Pools wurde die zuvor isolierte und gefällte RNA revers transkribiert ((2006)). In die Reaktion wurden 2580 ng RNA je Gewebe eingesetzt. Zur RT wurden sowohl Oligo (dT)₁₈ Primer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot), welche an das Poly-A 3'Ende eukaryotischer mRNA binden, als auch ein Gemisch zufälliger Hexamerprimer (p(dN)₆ Primer, MBI Fermentas), welche an verschiedene Sequenzen über die gesamte Länge der mRNA verteilt binden, verwendet.

Zunächst wurden die 2580 ng RNA mit 1 µl Oligo (dT)₁₈ Primer (0,5 µg/µl) und 1 µl p(dN)₆ Primer (0,2 µg/µl) 10 min bei 65 °C denaturiert. Nachdem der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert wurde, wurden:

- 5 µl 5x first strand Puffer
- 2 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 2 µl DTT (100 mM)
- 1 µl SUPERase-In RNase Inhibitor
- 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase (200 units)

hinzugefügt und der Ansatz auf 25 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Die RT erfolgte für 60 min bei 42 °C. Im Anschluss wurden die Proben für eine anschließende PCR mit 75 µl TE-Puffer bzw. Proben für die qRT-PCR mit 175 µl TE-Puffer versetzt.

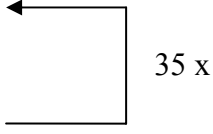
3.11 Untersuchung der Genexpression mittels PCR

Die Genexpression von *ncx1-3* sowie *nckx2-6* in CN, SOC und IC bei P4 und P60 wurde zunächst qualitativ mittels PCR (Saiki *et al.*, 1988) untersucht. Zur Kontrolle wurden zu beiden Altersstufen zusätzliche Gewebe untersucht (s. 3.8). Dabei handelte es sich um *Cerebellum*, in welchem die Transkription sämtlicher untersuchter Isoformen bereits nachgewiesen wurde (nachfolgende Quellenangaben für die Expression der einzelnen Isoformen in Leber gelten auch für *Cerebellum*), Herz, da *ncx1* die dort hauptsächlich exprimierte Isoform darstellt (Lee *et al.*, 1994; Nicoll *et al.*, 1996b; Lytton *et al.*, 2002) und Leber, da in Northern Blots die Expression von *ncx1* (Lee *et al.*, 1994; Nicoll *et al.*, 1996b; Lytton *et al.*, 2002), *ncx2* (Li *et al.*, 1994; Nicoll *et al.*, 1996b), *ncx3* (Nicoll *et al.*, 1996b) sowie *nckx2* (Nicoll *et al.*, 1996b; Tsoi *et al.*, 1998; Lytton *et al.*, 2002), *nckx3* (Kraev *et al.*, 2001; Lytton *et al.*, 2002) und *nckx4* (Lytton *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002) nur schwach bzw. gar nicht detektiert werden konnte. Die Transkription von *nckx5* wurde bisher mittels qRT-PCR im Gehirn (Gesamthirnprobe) sowie im Herz von Mäusen nachgewiesen (Lamason *et al.*, 2005). Northern Blots zeigten *nckx6*-Transkripte in Hirnstamm, *Cerebellum* und Herz (Cai und Lytton, 2004a), die Expression in Leber wurde bisher noch nicht untersucht.

Die verwendeten Primer sowie die resultierenden PCR-Produktgrößen sind Tab. 3 zu entnehmen. Als DNA-Matrize dienten die zuvor generierten cDNA-Pools der verschiedenen Gewebe. Zur Amplifikation wurde *Taq*-Polymerase (Eigenherstellung) verwendet. In die PCR eingesetzt wurden:

- 1 μ l cDNA
- 5 μ l *Taq*-Polymerase-PCR-Puffer 10x
- 1 μ l 50 mM MgCl₂
- 1 μ l dNTP-Mix (10 mM)
- 1 μ l Vorwärtsprimer (20 pmol/ μ l)
- 1 μ l Rückwärtsprimer (20 pmol/ μ l)
- 1 μ l *Taq*-Polymerase
- ad. 50 μ l H₂O

PCR:

- 94 °C 2 min
 - 94 °C 30 s
 - 60 °C 30 s
 - 72 °C 40 s
 - 72 °C 5 min
- 

Zur elektrophoretischen Trennung der DNA wurden Gele mit 1% Agarosegehalt verwendet. Agarose bildet in Gelen ein Netzwerk, dessen Porengröße vom Agarosegehalt abhängt. Bei der elektrophoretischen Trennung korrelieren Laufweite und Molekulargewicht der DNA. Die Visualisierung der separierten DNA erfolgte über Ethidiumbromid. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA, wodurch diese durch Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge von 320 nm (Fluoreszenzkammer TI 1, Biometra, Göttingen) detektiert werden kann ((2006)).

Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose zunächst in 1x SB-Puffer aufgeköcht, nach Abkühlen mit 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelschlitten mit Gelkamm gegossen. Die aufzutrennende DNA-Probe wurde mit 1/6 Volumenteil an Agarosegel-Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Nach Anlegen einer Spannung von 4 V/cm² wurde die negativ geladene DNA in Richtung der Anode beschleunigt, wobei eine Trennung nach dem Molekulargewicht erfolgte. Durch Vergleich mit einem parallel separierten DNA-Standard (mit *PstI* verdauter C11-Plasmid, Eigenherstellung) mit definierten Fragmentgrößen war eine Bestimmung der Bandengröße möglich.

3.12 Quantitative real-time PCR

Zur relativen Quantifizierung der *ncx*- und *nckx* -Genexpression in CN, SOC und IC wurden qRT-PCR Experimente durchgeführt. Die qRT-PCR stellt eine anerkannte und zuverlässige Methode dar, um gering abundante Genexpression zu quantifizieren (Pfaffl, 2001). Vorteile liegen in ihrer hohen Sensitivität sowie ihrem großen dynamischen Bereich (Wilhelm und Pingoud, 2003). Die qRT-PCR wurde 1993 entwickelt und beruht auf Messung der DNA-Amplifikation über einen Fluoreszenzanstieg, welcher proportional zur PCR-Produktmenge ist (Higuchi *et al.*, 1993; Heid *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I (Absolute SYBR Green Fluorescein Mix, ABgene/Thermo Fisher Scientific) verwendet, welcher mit doppelsträngiger DNA interkaliert

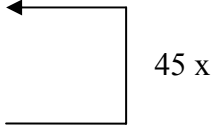
und dessen Fluoreszenz in gebundener Form 1000fach höher ist als in freier Form (Wittwer *et al.*, 1997). Die Anregungswellenlänge von SYBR Green I liegt bei 480 nm, das Emissionsmaximum bei 520 nm (Jin *et al.*, 1994). Die qRT-PCR wurde mit einem MyiQ Thermal Cycler (Bio-Rad), die Auswertung mit der zugehörigen MyiQ-Software (Version 1.0) sowie mit Microsoft Office Excel und WinSTAT für Microsoft Excel (R. Fitch Software, Bad Krozingen) durchgeführt.

Mittels qRT-PCR können sowohl absolute Quantifizierungen mit Hilfe einer Kalibriergerade als auch relative Quantifizierungen durchgeführt werden (Pfaffl, 2004). In meiner Arbeit erfolgte eine relative Quantifizierung der Genexpression, welche auf ein Haushaltsgen, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*gapdh*), normiert wurde (Pfaffl, 2001). Zuvor wurde die Expression von *gapdh* in CN, SOC und IC bei P4 und P60 in einem qRT-PCR-Lauf überprüft. Diese Vorversuche zeigten, dass sich *gapdh* für die zu untersuchenden Gewebe und Entwicklungsstufen als Haushaltsgen eignet, da dieses Gen zwischen den verschiedenen Geweben sowie zu beiden untersuchten Altersstadien eine konstante Expression zeigte (Tab. 16). Die Eignung von *gapdh* als Haushaltsgen wurde bereits in diversen anderen Studien gezeigt. So untersuchten Li *et al.* (2003) Stammzellen aus dem sensorischen Epithel des Vestibularorgans der Maus, während Thellin *et al.* (1999) eine konstante Expression von *gapdh* zwischen *Cerebellum*, *Cortex*, subcorticalen Strukturen sowie Hirnstamm von Wistar-Ratten zeigten. Zudem konnte H. Ehmann (Abteilung Tierphysiologie, TU Kaiserslautern) im Rahmen ihrer Promotion eine konstante Expression von *gapdh* im SOC der Ratte zwischen P4, P16 und P25 zeigen (mündliche Mitteilung). Ein solches Referenzgen ist nötig, um sicherzustellen, dass Unterschiede in der Zahl der Transkripte verschiedener Proben nicht auf unterschiedliche Ausgangsmengen zurückzuführen sind.

Die Analyse der *ncx*/*nckx*-Genexpression erfolgte an drei verschiedenen cDNA-Pools pro Gewebe und Entwicklungsstufe (biologische Replikate). Jeder dieser cDNA-Pools wurde drei unabhängigen qRT-PCR-Läufen unterzogen (technische Replikate). In die Reaktion eingesetzt wurden:

- 1 µl cDNA
- 0,5 µl Vorwärtsprimer (20 pmol/µl)
- 0,5 µl Rückwärtsprimer (20 pmol/µl)
- 12,5 µl Absolute QRT-PCR SYBR Green Fluorescein Mix
- 5,5 µl RNase-freies Wasser

qRT-PCR-Lauf:

- 95 °C 15 min
 - 95 °C 30 s
 - 60 °C 30 s
 - 72 °C 40 s
 - 72 °C 5 min
- 

Nach Abschluss des qRT-PCR-Laufs wurden die Schmelzkurven der PCR-Produkte ermittelt. Dazu wurde die Temperatur, beginnend bei 55 °C, in 80 Zyklen für jeweils 30 s um 0,5 °C erhöht. Die Proben wurden in jedem qRT-PCR-Lauf im Triplikate aufgetragen und die Schnittpunkte der Amplifikationskurven mit dem von der Software ermittelten Schwellenwert gemittelt (Cycle threshold, Ct; (Pfaffl, 2004); Abb. 10A). Während der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion ist die Menge an amplifizierten PCR-Produkten proportional zur eingesetzten cDNA-Menge. Daher muss die Quantifizierung stets in der noch exponentiellen Phase der PCR-Reaktion erfolgen (Schmittgen *et al.*, 2000). Die MyiQ-Software wählte den Ct-Wert so, dass er bei allen zu vergleichenden Reaktionsansätzen in der exponentiellen Reaktionsphase und über der Hintergrundfluoreszenz lag. Wicht in einem qRT-PCR-Lauf der Ct-Wert eines der Triplikate einer Probe um mehr als 0,3 Zyklen von den anderen ab, wurde dieses Replikate von der Auswertung ausgeschlossen (Abb. 10B). Für jedes Primerpaar erfolgte stets eine Negativkontrolle mit Wasser statt cDNA (Abb. 10A).

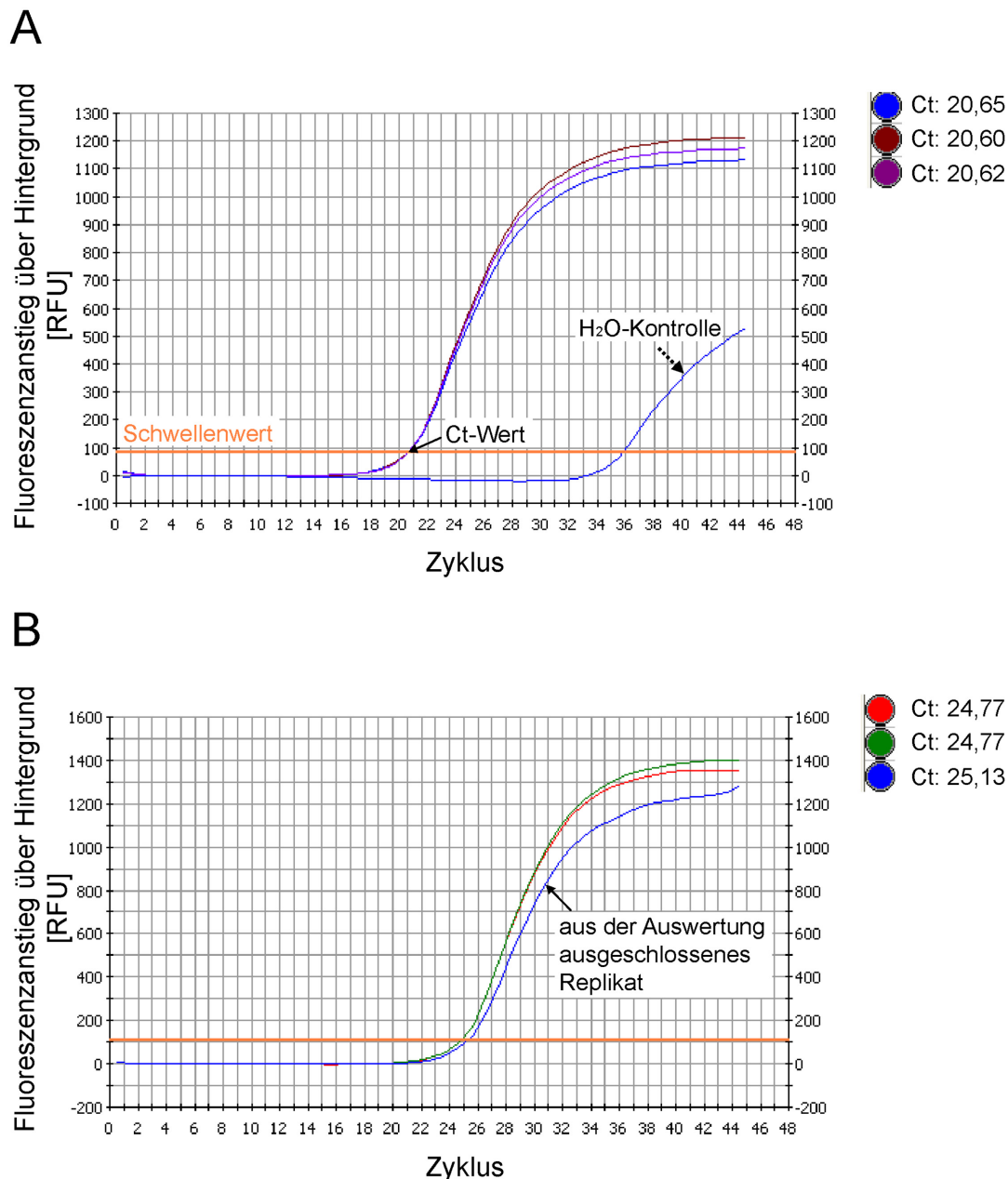


Abb. 10: Bestimmung der Cycle threshold (Ct)-Werte mit Hilfe der MyiQ-Software

(A) qRT-PCR-Reaktion für *ncx1*; die drei dargestellten Kurven stellen eine im Triplikate aufgetragene cDNA-Probe von P4 IC-Gewebe dar. Die Ct-Werte (Pfeil) stellen den jeweiligen Schnittpunkt der Kurven mit dem von der MyiQ-Software ermittelten Schwellenwert (orange) dar. In diesem Beispiel waren die Ct-Werte der Replikate mit Werten von 20,60 (braune Kurve), 20,62 (violette Kurve) und 20,65 Zyklen (blaue Kurve) nahezu identisch, der Mittelwert lag bei 20,62. Die Wasserprobe zeigte erwartungsgemäß einen sehr späten Anstieg in der Fluoreszenz (gestrichelter Pfeil); (B) qRT-PCR-Reaktion für *ncx3*; die blaue Kurve (Pfeil) stellt ein Replikat dar, welches aufgrund seines um 0,36 Zyklen von den anderen Replikaten abweichenden Ct-Wertes von der weiteren Auswertung ausgeschlossen wurde. Der Mittelwert aus den verbleibenden Replikaten lag bei 24,77 Zyklen. RFU = relative Fluoreszenzeinheit (relative fluorescence unit)

Zu Beginn der qRT-PCR-Experimente wurde die Effizienz (E) der Primer bestimmt. Dazu wurde P60 *Cerebellum* Gewebe unverdünnt sowie in einer 1:5 und 1:25 Verdünnung einem qRT-PCR-Lauf unterzogen. Von der verwendeten MyiQ-Software wurden cDNA-Menge und Ct-Wert gegeneinander aufgetragen (Abb. 11A) und die Effizienz daraufhin wie folgt berechnet (Pfaffl, 2001):

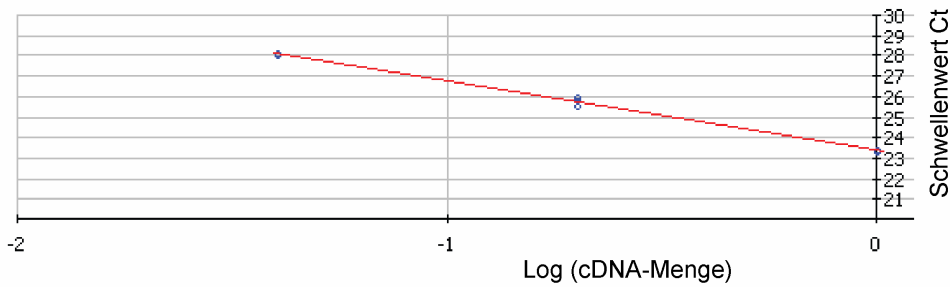
$$E = 10^{(-1/\text{Geradensteigung})} \quad \text{Formel 2}$$

Von der MyiQ-Software werden die Primereffizienzen in Prozent angegeben. Eine Effizienz von 100% entspricht einer Verdopplung der cDNA-Menge mit jedem Zyklus. Nach n Zyklen läge die Amplifikation demnach bei 2^n . Eine Amplifikation von 1,992 pro Zyklus, wie in Abb. 11A am Beispiel des Primerpaares für *ncx2* mit obiger Formel berechnet, entspricht einer Effizienz von 99,2%. Die Effizienzen der verwendeten Primerpaare sind in Tab. 3 aufgelistet. Da die Entstehung von Nebenprodukten in der PCR die Quantifizierung beeinflusst (Wilhelm und Pingoud, 2003), wurden nur Primerpaare verwendet, bei denen die Schmelzkurve einen einzigen Peak zeigte, also das Vorhandensein von einem einzigen PCR-Produkt bestätigte (Abb. 11B).

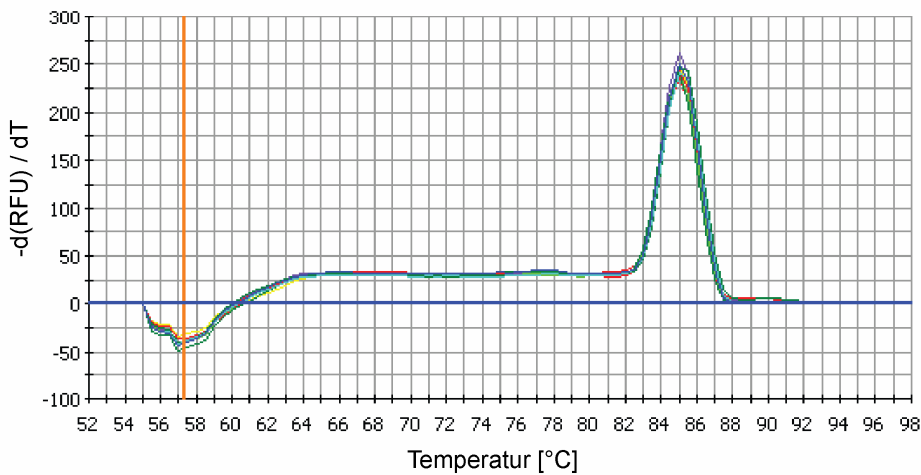
Da sämtliche selbst entworfenen Primer für *nckx3* ein Nebenprodukt erzeugten (Abb. 11C), konnte für die Genexpression von *nckx3* keine Quantifizierung mittels qRT-PCR durchgeführt werden.

A

Korrelationskoeffizient: 0,998 Steigung: -3,342 Achsenschnittpunkt: 23,424
 $Y = -3,342 X + 23,424$ PCR-Effizienz: 99,2%



B



C

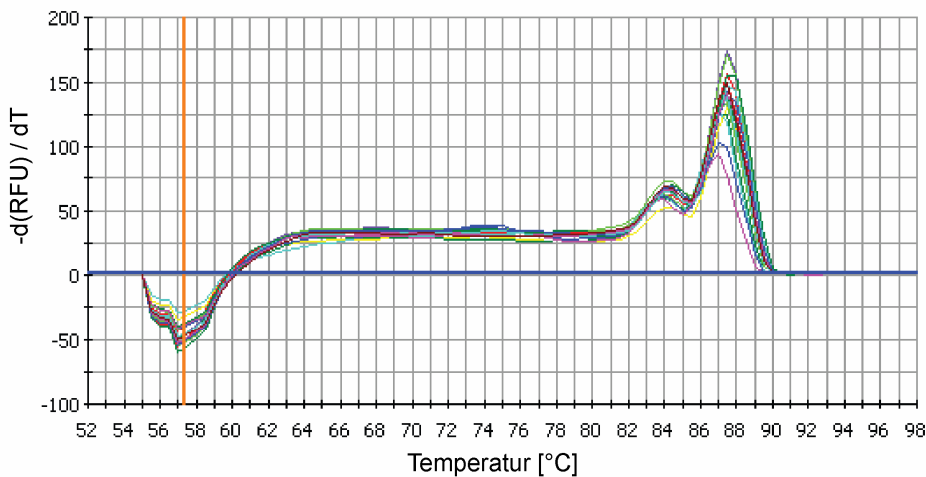


Abb. 11: Bestimmung der Primereffizienz mit Hilfe der MyiQ-Software

(A) Berechnung der Primereffizienz am Beispiel von *ncx2*. Auf der y-Achse ist die Änderung der relativen Fluoreszenz über die Zeit dargestellt. Anhand der Ct-Werte der unterschiedlich verdünnten Proben berechnet die MyiQ-Software über die Formel $E = 10^{(-1/\text{Geradensteigung})}$ die Effizienz der eingesetzten Primer. (B) Die Schmelzkurve der *ncx3*-qRT-PCR-Produkte zeigte mit nur einem Peak die Entstehung eines spezifischen PCR-Produktes. (C) Die Schmelzkurve der *nckx3*-qRT-PCR-Produkte zeigte zwei Peaks und damit die Entstehung von zwei PCR-Produkten. RFU = relative Fluoreszenzeinheit (relative fluorescence unit)

Die Berechnung der Regulationsfaktoren (r) eines qRT-PCR Experiments erfolgte nach Pfaffl (2001) mit folgender Formel:

$$r = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta Ct_{\text{Zielgen}} (\text{Gewebe } x - \text{Gewebe } y)}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta Ct_{\text{Referenzgen}} (\text{Gewebe } x - \text{Gewebe } y)}} \quad \text{Formel 3}$$

$E_{\text{Referenzgen}}$ ist dabei die Primereffizienz des Haushaltsgens *gapdh*, E_{Zielgen} die des zu untersuchenden *ncx-1/ncx2*-Gens. Von zwei zu vergleichenden Geweben (Gewebe X und Y) wurden zunächst die aus einem qRT-PCR-Lauf gemittelten Ct-Werte subtrahiert (ΔCt). Diese ΔCt -Werte wurden dann zur Berechnung der Regulationsfaktoren mittels obiger Formel herangezogen. Zur statistischen Auswertung wurden die ΔCt -Werte auf Normalverteilung getestet und die ΔCt -Werte der zwei zu vergleichenden Gewebe einem unabhängigen Student's t-Test unterzogen. Resultierende Werte für die Irrtumswahrscheinlichkeit (P-Werte) $< 0,05$ wurden mit * gekennzeichnet, Werte $< 0,01$ mit ** und Werte $< 0,001$ mit ***.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen (standard deviation, SD) der Regulationsfaktoren der biologischen und technischen Replikate wurden mit Hilfe folgender Formeln berechnet:

$$SD = \sqrt{e^{2\mu + \sigma^2}} \quad \text{mit } \mu = 1/n \cdot \sum_{i=1}^n \ln(r_i) \quad \text{und } \sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (\ln(r_i) - \ln \bar{r})^2} \quad \text{Formel 4}$$

Demnach stellt μ den arithmetischen Mittelwert der logarithmierten Regulationsfaktoren dar und σ deren Standardabweichung (Ehmann *et al.*, 2008). Die Zahl der Replikate eines Experimentes wird mit n angegeben, r steht für den aus einem Experiment resultierenden Regulationsfaktor. Aus der Standardabweichung wurde zur Darstellung in den Abbildungen der Standardfehler (standard error of the mean, SEM) nach folgender Formel berechnet:

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad \text{Formel 5}$$

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Antikörperspezifität

Zur Untersuchung der Spezifität der zur Immunhistochemie (IHC) verwendeten NCX1- (Swant) sowie NCX2- und NCX3- (Alpha Diagnostics International) Antikörper wurden Western Blots durchgeführt (Abb. 12-13). Dabei wurden neben den soeben erwähnten Antikörpern auch zwei weitere primäre Antikörper anderer Herkunft gegen NCX2 und NCX3 verwendet (Tab. 1). Zudem wurden die immunhistochemischen Färbemuster beider NCX2- sowie beider NCX3-Antikörper verglichen (siehe 4.2.3, 4.2.5 und 4.2.6).

4.1.1 Untersuchung der NCX1-Antikörperspezifität mittels Western Blot auf Mausgewebe

Der gegen NCX1 gerichtete Antikörper detektierte im Western Blot in der Spur des WT-Homogenats zwei starke Banden, die stärkste bei ca. 110 kDa, was dem Molekulargewicht von NCX1 entspricht (Nicoll *et al.*, 1990), eine weitere Bande bei ca. 160 kDa (Abb. 12). Zusätzliche schwächere Bande zeigten sich bei ca. 60 kDa, ca. 40 kDa und ca. 34 kDa. In dem als Negativkontrolle verwendeten Homogenat der BHK-Zellen wurden dagegen keinerlei Banden detektiert.

Die beobachteten zusätzlichen Banden bei 160 kDa und 60 kDa wurden bereits von Lytton (2007) beschrieben (siehe 5.3.1.1), die Banden bei 40 kDa und 34 kDa stellen wahrscheinlich Abbauprodukte von NCX1 dar, da sie in der Negativkontrolle nicht detektiert wurden. Die Spezifität des Antikörpers wird unter 5.3.1.1 und 5.3.3 ausführlich diskutiert, zusammenfassend gehe ich davon aus, dass der verwendete NCX1-Antikörper das NCX1-Protein spezifisch erkennt.

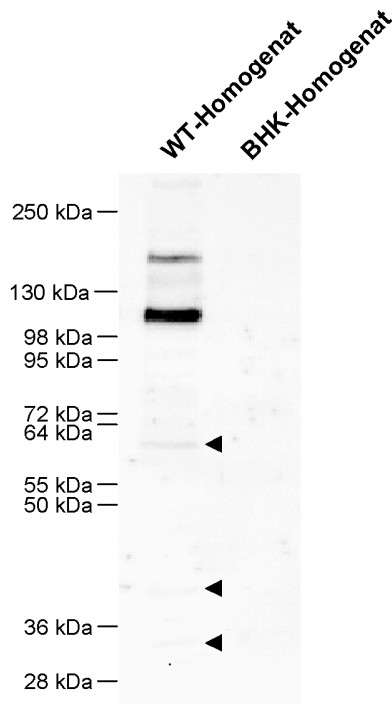


Abb. 12: Western Blot zur Untersuchung der NCX1-Antikörperspezifität

Der NCX1-Antikörper detektierte im WT-Homogenat zwei prominente Banden, eine bei ca. 110 kDa, was dem Molekulargewicht von NCX1 entspricht, und eine weitere bei ca. 160 kDa. Weitere schwache Banden zeigten sich bei ca. 60 kDa, ca. 40 kDa sowie ca. 34 kDa (Pfeilspitzen). Im Homogenat der BHK-Zellen wurden keine Banden detektiert. Für die weiteren Experimente wurde dieser Antikörper trotzdem als spezifisch angesehen (Details siehe Text).

4.1.2 Untersuchung der NCX2-Antikörperspezifität mittels Western Blot auf Mausgewebe

Der gegen NCX2 gerichtete polyklonale Antikörper (Alpha Diagnostics International) detektierte im Western Blot in der Probe des WT-Homogenats acht Banden (Abb. 13A): Die stärkste Bande lag im Bereich von knapp 250 kDa, eine ebenfalls intensive Doppelbande wurde bei ca. 50 kDa detektiert. Zwischen diesen drei Hauptbanden wurden eine schwächere Bande bei ca. 95 kDa und drei Banden oberhalb von 130 kDa detektiert (Pfeilspitzen). Eine weitere schwache Bande lag bei ca. 250 kDa (offene Pfeilspitze). Im Homogenat der BHK-Zellen wurden keine Banden detektiert. Die Cytoplasmafraktion des WT-Gewebes zeigte eine schwache Bande bei 50 kDa, die entsprechende Fraktion der BHK-Zellen wiederum keine Banden.

Der monoklonale NCX2-Antikörper von Prof. Porzig (Tab. 1) detektierte im WT-Homogenat zwei Banden, eine bei ca. 50 kDa sowie eine bei knapp 250 kDa (Abb. 13B). Diese lagen damit auf Höhe der mittels des polyklonalen Antikörpers (Abb. 13A) detektierten Hauptbanden. Die Probe des WT-Cytoplasmas zeigte wie in Abb. 13A eine schwache Bande

bei ca. 50 kDa, während in den BHK-Proben keine Banden detektiert wurden. Das NCX2-Protein hat ein Molekulargewicht von 102 kDa (Pignataro *et al.*, 2004j), eine diesem Gewicht entsprechende Bande wurde überraschend von keinem der verwendeten Antikörper detektiert. Dies könnte auf eine zu geringe Konzentration des monomeren Proteins in der Probe zurückzuführen sein.

Dass zwei der Banden in Abb. 13 von beiden Antikörpern detektiert wurden, erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei diesen um Aggregate oder Dimere (200 kDa) bzw. Degradationsprodukte (50 kDa) von NCX2 handelt. Das monomere NCX2-Protein (102 kDa) scheint im Vergleich dazu in so geringen Mengen vorzuliegen, dass es nicht detektiert werden kann. Auch bei den weiteren, vom polyklonalen NCX2-Antikörper detektierten Banden, könnte es sich um Abbauprodukte sowie Aggregate dieser Abbauprodukte handeln. Allerdings ist dennoch nicht ausgeschlossen, dass es sich bei diesen Banden um eine unspezifische Bindung an ein im Gehirn exprimiertes Protein handeln könnte, welches wie NCX2 ebenfalls nicht endogen in BHK-Zellen vorkommt. Die Spezifität dieses Antikörpers wird unter 5.3.1.3 und 5.3.3 ausführlicher diskutiert.

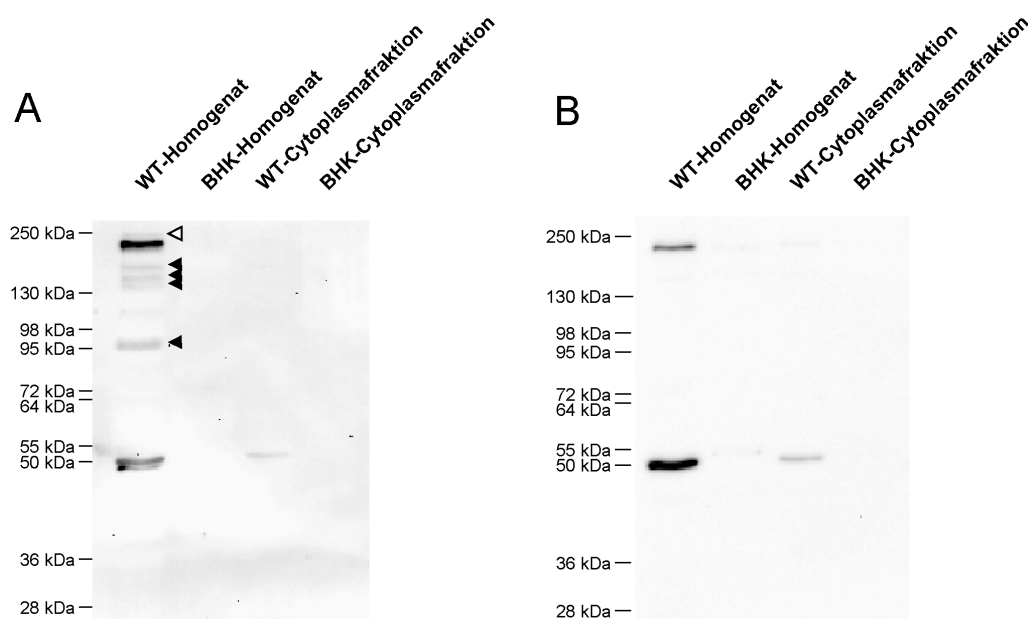


Abb. 13: Western Blots zur Untersuchung der NCX2-Antikörperspezifität

(A) Mit dem NCX2-Antikörper von Alpha Diagnostics International wurden im WT-Homogenat acht Banden zwischen 50 kDa und knapp 250 kDa, in der WT-Cytoplasmafraktion eine schwache Bande bei ca. 50 kDa detektiert. Die Proben der BHK-Zellen zeigten keine Signale. (B) Mit dem monoklonalen NCX2-Antikörper wurde im WT-Homogenat eine Bande bei ca. 50 kDa sowie eine zweite Bande im Bereich von knapp 250 kDa detektiert. In der WT-Cytoplasmafraktion wurde eine schwache Bande bei ca. 50 kDa detektiert. Die Proben der BHK-Zellen zeigten keine Banden. Auf Höhe des erwarteten Molekulargewichtes von 102 kDa wurden keine Banden detektiert. Aufgrund dieses Bandenmusters konnte die Spezifität beider Antikörper mit diesen Western Blots nicht eindeutig nachgewiesen werden. Auf die Pfeile wird im Text eingegangen

4.1.3 Untersuchung der NCX3-Antikörperspezifität mittels Western Blot auf Mausgewebe

Mit dem gegen NCX3 gerichteten Antikörper (Alpha Diagnostics International) wurden in allen Proben, auch im KO-Gewebe, vier Banden zwischen 98 kDa und 148 kDa sowie eine Bande oberhalb von 148 kDa (doppelte Pfeilspitze) detektiert (Abb. 14A). Die einzige Ausnahme stellte die WT-Cytoplasmafraktion dar, sie zeigte keinerlei Banden. Die intensivste Bande lag in allen Proben unterhalb von 148 kDa (gestrichelter Pfeil). Die Banden unterhalb dieser Hauptbande (Pfeil und Pfeilspitzen) waren in den Membranfraktionen am stärksten angereichert, was für ein membranständiges Protein wie NCX3 den Erwartungen entspricht. In der KO-Cytoplasmafraktion sowie in den Homogenaten war die Bande bei ca. 100 kDa nur sehr schwach zu erkennen.

Die Probe der WT-Cytoplasmafraktion zeigte auch mit dem von Prof. Philipson hergestellten NCX3-Antikörper (Tab. 1) keine Banden (Abb. 14B). In den übrigen Proben wurden vier Banden zwischen 100 kDa und 148 kDa detektiert. Diese vier Banden stimmen von ihrem Molekulargewicht mit den vom NCX3-Antikörper von Alpha Diagnostics International in diesem Bereich detektierten Banden überein (Abb. 14A). Weitere schwache Banden bei ca. 64 kDa sowie ca. 40 kDa (offene Pfeilspitzen) zeigten sich in KO- und WT-Homogenat. Die Membranfraktionen des KO- bzw. WT-Tieres zeigten dagegen eine ebenfalls schwache Bande bei ca. 36 kDa (doppelte offene Pfeilspitze). Demnach konnten keine Unterschiede im Bandenmuster zwischen WT und KO festgestellt werden.

Das NCX3-Protein hat ein Molekulargewicht von 105 kDa (Pignataro *et al.*, 2004i), so dass die in Abb. 14B intensiv, in Abb. 14A schwach detektierte Bande etwas oberhalb von 98 kDa (Pfeil) diesem Gewicht entsprechen könnte. Geht man allerdings davon aus, dass die KO-Tiere in Italien korrekt genotypisiert wurden (was für mich leider nicht überprüfbar ist), ist aufgrund der fehlenden Unterschiede zwischen WT und KO leider davon auszugehen, dass es sich bei den Banden beider Antikörper um unspezifische Bindungen handelt.

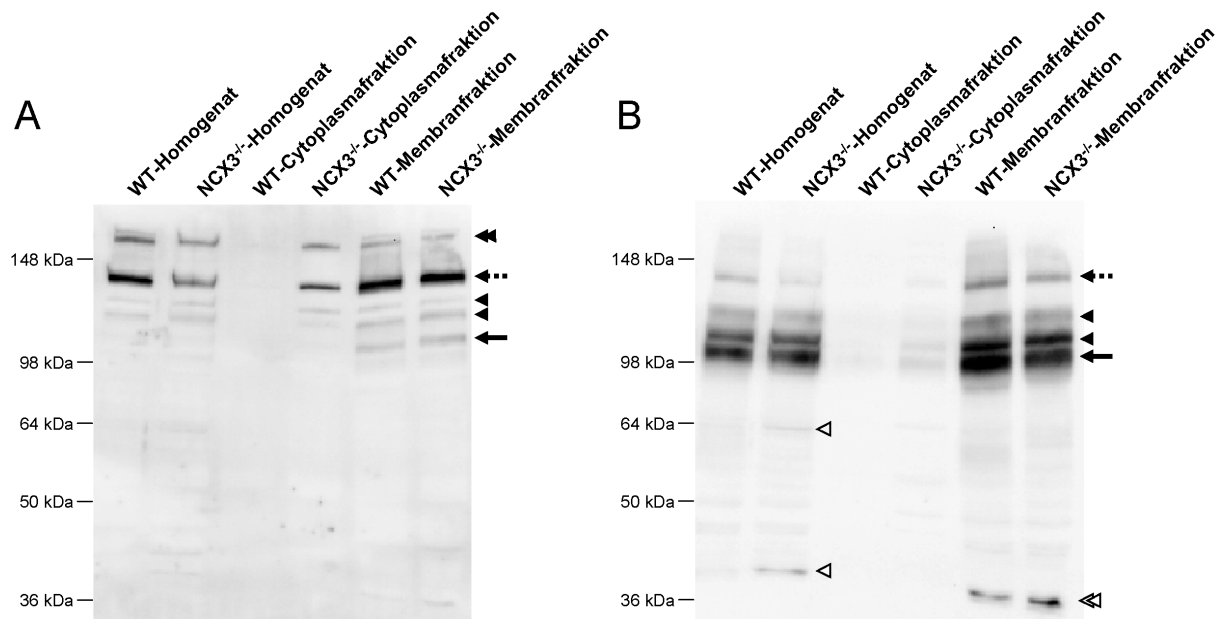


Abb. 14: Western Blots zur Untersuchung der NCX3-Antikörperspezifität

(A) Der NCX3-Antikörper von Alpha Diagnostics International detektierte in allen Spuren außer der der WT-Cytoplasmafraktion vier Banden zwischen 100 kDa (Pfeil) und oberhalb von 148 kDa (doppelte Pfeilspitze). Die mit Pfeilspitzen und Pfeil gekennzeichneten Banden waren in der Membranfraktion am stärksten angereichert

(B) Der NCX3-Antikörper von Prof. Philipson detektierte in allen Spuren außer der der WT-Cytoplasmafraktion vier Banden zwischen 98 kDa (Pfeil) und 148 kDa (gestrichelter Pfeil). Im Homogenat des KO-Tieres wurden zusätzliche Banden bei ca. 64 kDa sowie bei ca. 40 kDa (offene Pfeilspitzen) detektiert, in den Membranfraktionen von KO und WT jeweils eine Bande bei ca. 36 kDa (doppelte offene Pfeilspitze). Die mit Pfeilspitzen gekennzeichneten Banden entsprechen in ihrem Molekulargewicht den mit Pfeilspitzen gekennzeichneten Banden in (A). Die Cytoplasmafraktion des KO-Tieres zeigte sehr schwache Banden. Die starken Banden in den KO-Geweben weisen darauf hin, dass keiner der Antikörper spezifisch für NCX3 ist.

4.1.4 Vergleich der Antikörperbanden in Maus- und Rattengewebe

Da die zuvor beschriebenen Western Blots für die verwendeten NCX2- und NCX3-Antikörper, im Gegensatz zu dem verwendeten NCX1-Antikörper, nicht mit Sicherheit auf deren Spezifität schließen lassen und die immunhistochemischen Untersuchungen auf Rattengewebe erfolgten, wurden die verwendeten NCX2- und NCX3-Antikörpern ebenfalls auf Rattengewebe getestet. Wie Abb. 15A zeigt, detektierte der NCX2-Antikörper von Alpha Diagnostics International sowohl im Homogenat als auch in der Membranfraktion des Rattengewebes zwei prominente Banden, eine bei ca. 130 kDa sowie eine oberhalb von 148 kDa (Pfeile). Die Membranfraktion zeigte zusätzlich drei sehr schwache Banden zwischen 100 kDa und 130 kDa (Pfeilspitzen) sowie vier schwache Banden zwischen 60 kDa und ca. 90 kDa (offene Pfeilspitzen).

Der NCX3-Antikörper der gleichen Firma detektierte im Homogenat ausschließlich eine Bande bei ca. 130 kDa (Abb. 15B, Pfeil), die Membranfraktion zeigte eine zusätzliche schwächere Bande bei ca. 100 kDa (Pfeilspitze). Beide Western Blots zeigten eine Anreicherung der detektierten Proteine in der Membranfraktion (Abb. 15A, B).

Mit dem NCX3-Antikörper von Prof. Philipson (Abb. 15C) wurden zwei prominente Banden detektiert, eine Bande bei ca. 130 kDa sowie eine weitere bei ca. 60 kDa (Pfeile). Die 130 kDa Bande zeigte eine Anreicherung in der Membranfraktion während die 60 kDa Bande nur im Homogenat zu erkennen war. Beide Fraktionen zeigten zudem fünf weitere schwache Banden (Pfeilspitzen) und zwar bei ca. 120 kDa, ca. 100 kDa, ca. 90 kDa sowie unterhalb der im Homogenat detektierten 60 kDa Bande und bei 50 kDa. Die Membranfraktion zeigte in der gesamten Spur oberhalb der 130 kDa Bande ein starkes Signal, welches jedoch keine Bandenstrukturen aufwies und daher nicht weiter gewichtet wurde.

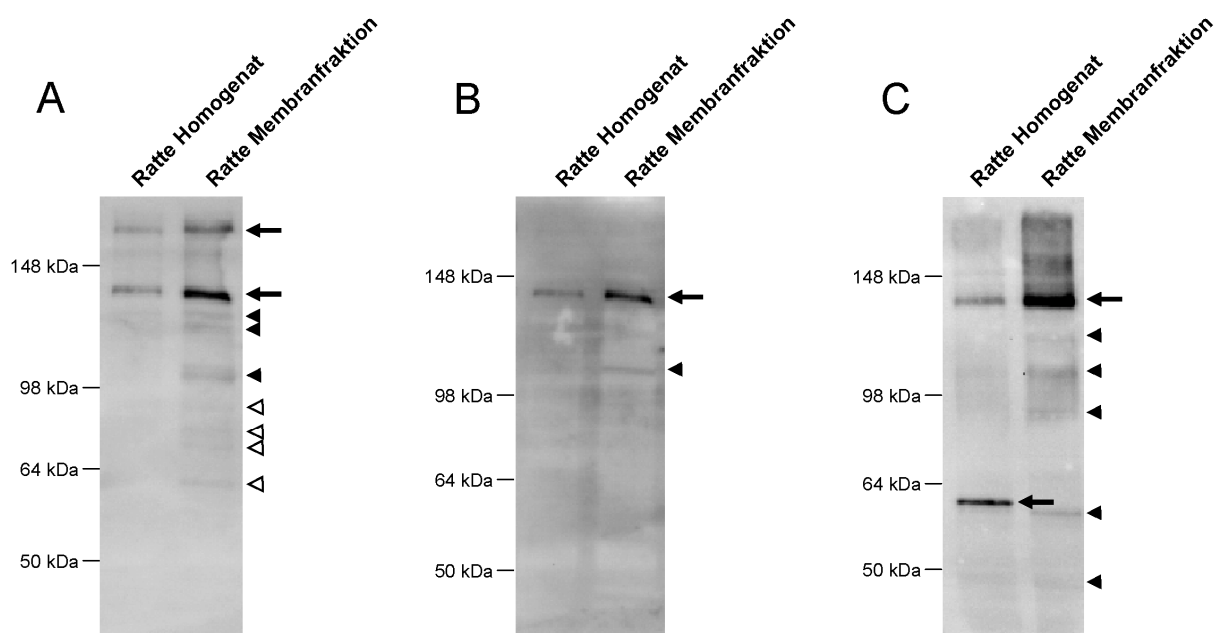


Abb. 15: Western Blots auf Rattengewebe zur Untersuchung der NCX2- und NCX3-Antikörperspezifität

(A) Mit dem NCX2-Antikörper von Alpha Diagnostics International wurden in Homogenat und Membranfraktion zwei prominente Banden bei ca. 130 kDa sowie oberhalb von 148 kDa detektiert (Pfeile). Sieben weitere schwächere Banden zeigten sich in der Membranfraktion zwischen ca. 60 kDa und knapp unterhalb der 130 kDa Bande (offene und geschlossene Pfeilspitzen). (B) Der NCX3-Antikörper von Alpha Diagnostics International detektierte in beiden Fraktionen jeweils eine Bande bei ca. 130 kDa (Pfeil) sowie eine schwache Bande bei ca. 100 kDa (Pfeilspitze). (C) Der NCX3-Antikörper von Prof. Philipson detektierte zwei prominente Banden bei ca. 130 kDa sowie bei ca. 60 kDa (Pfeile) sowie weitere schwächere Banden zwischen 50 kDa und ca. 120 kDa (Pfeilspitzen). Alle Antikörper detektierten schwache Banden auf Höhe des erwarteten Molekulargewichts. Aufgrund der zusätzlichen Banden kann die Spezifität der Antikörper allerdings nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden.

4.1.5 Zusammenfassung Western Blots

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der verwendete NCX1-Antikörper im Weiteren als spezifisch angesehen wird. Die stärkste Bande dieses Antikörpers entspricht mit 110 kDa dem Molekulargewicht von NCX1 (Nicoll *et al.*, 1990), zwei der weiteren Banden wurden bereits in der Literatur als Aggregations- bzw. Degradationsprodukte von NCX1 beschrieben (Lytton, 2007). Zwei weitere schwache Banden im Bereich von 40 kDa und 34 kDa konnten zwar nicht mit Sicherheit als Degradationsprodukte nachgewiesen werden, für diese Annahme spricht jedoch, dass sie in der Negativkontrolle nicht detektiert wurden.

In Mausgewebe detektierte keiner der untersuchten, gegen NCX2 gerichteten Antikörper eine Bande auf Höhe des erwarteten Molekulargewichts von 102 kDa (Pignataro *et al.*, 2004h). Vergleicht man die Signale der beiden Antikörper untereinander, so detektierten beide jeweils die gleichen Banden bei ca. 50 kDa sowie unterhalb von 250 kDa, wobei der Antikörper von Alpha Diagnostics International noch mehrere schwächere Banden dazwischen detektierte. In den BHK-Negativkontrollen zeigte keiner der Antikörper ein Signal. In den Proben des Rattengewebes zeigte der NCX2-Antikörper von Alpha Diagnostics International dagegen ein anderes Bandenmuster als in der Maus. Hier war eine sehr schwache Bande auf Höhe des erwarteten Molekulargewichtes zu erkennen, die prominenten Banden lagen jedoch weit darüber. Demnach zeigten beide Antikörper sowohl in der Maus als auch in der Ratte Banden, die nicht eindeutig identifiziert werden konnten, so dass die Spezifität der Antikörper nicht mit Sicherheit festgestellt werden konnte.

Die beiden gegen NCX3 gerichteten Antikörper zeigten in WT- und KO-Mausgewebe keine Unterschiede im Detektionsmuster. Beide Antikörper detektierten vier augenscheinlich identische Banden zwischen 100 kDa und 148 kDa, die allerdings in ihrer Intensität zwischen den Antikörpern variierten. Dem erwarteten Molekulargewicht von 105 kDa könnte die knapp oberhalb von 98 kDa detektierte Bande entsprechen. In Rattengewebe wurde dagegen nur in der Membranfraktion eine schwache Bande auf Höhe des erwarteten Molekulargewichtes detektiert. Weitere Banden zeigten sich bei ca. 60 kDa. Aufgrund der Banden im KO-Tier muss daher bei korrekter Genotypisierung der Tiere leider davon ausgegangen werden, dass der Antikörper unspezifische Bindungen eingeht.

Um weiteren Aufschluss über die Spezifität der verwendeten Antikörper gegen NCX2 und NCX3 zu erhalten, wurden immunhistochemische Färbungen beider NCX2- sowie beider

NCX3-Antikörper verglichen (siehe 4.2.3 und 4.2.5) und in den folgenden Kapiteln erläutert. Eine abschließende Wertung der Antikörper erfolgt unter 4.2.7 und 5.3.3.

Der zur IHC verwendete NCKX2-Antikörper wurde bereits in der Literatur auf KO-Gewebe getestet (Li *et al.*, 2006), so dass dieses Experiment hier nicht wiederholt wurde. Die Spezifität dieses Antikörpers wird unter 5.3.1.4 diskutiert.

4.2 Immunhistochemischer Nachweis von NCX1-3 und NCKX2

Mittels der in Tab. 1 aufgeführten Antikörper (für NCX2 und NCX3 wurden die Antikörper von Alpha Diagnostics International verwendet) wurde die Lokalisation von NCX1-3 sowie NCKX2 in den auditorischen Hirnstammarealen untersucht. Die Auswertung im SOC beschränkte sich dabei auf LSO, MSO, SPN und MNTB, die Hauptkerne des SOC (Schwartz, 1992b).

4.2.1 Immunhistochemischer Nachweis von NCX1 bei P4

Die zur IHC angefertigten coronalen Hirnschnitte sind schematisch in Abb. 16 dargestellt, um die Lage der analysierten Strukturen zu verdeutlichen. In Abb. 16A ist ein Schnitt mit DCN dargestellt, Abb. 16B zeigt einen Schnitt auf Höhe des PVCN, in dem auch der SOC (dargestellt mit LSO, SPN und MNTB) enthalten ist. Der AVCN ist in Abb. 16C zu erkennen, dieser schematische Schnitt enthält ebenfalls den SOC sowie caudale Bereiche des IC. Zur immunhistochemischen Analyse wurden allerdings weiter rostral gelegene Bereiche des IC verwendet, eine detaillierte schematische Darstellung des IC zeigt Abb. 19. Die roten gestrichelten Kästchen geben die ungefähre Position der Ausschnitte an, welche in den folgenden IHC-Abbildungen analysiert wurden. Der schematische Aufbau dieser IHC-Abbildungen ist den Abb. 17 und 20 zu entnehmen.

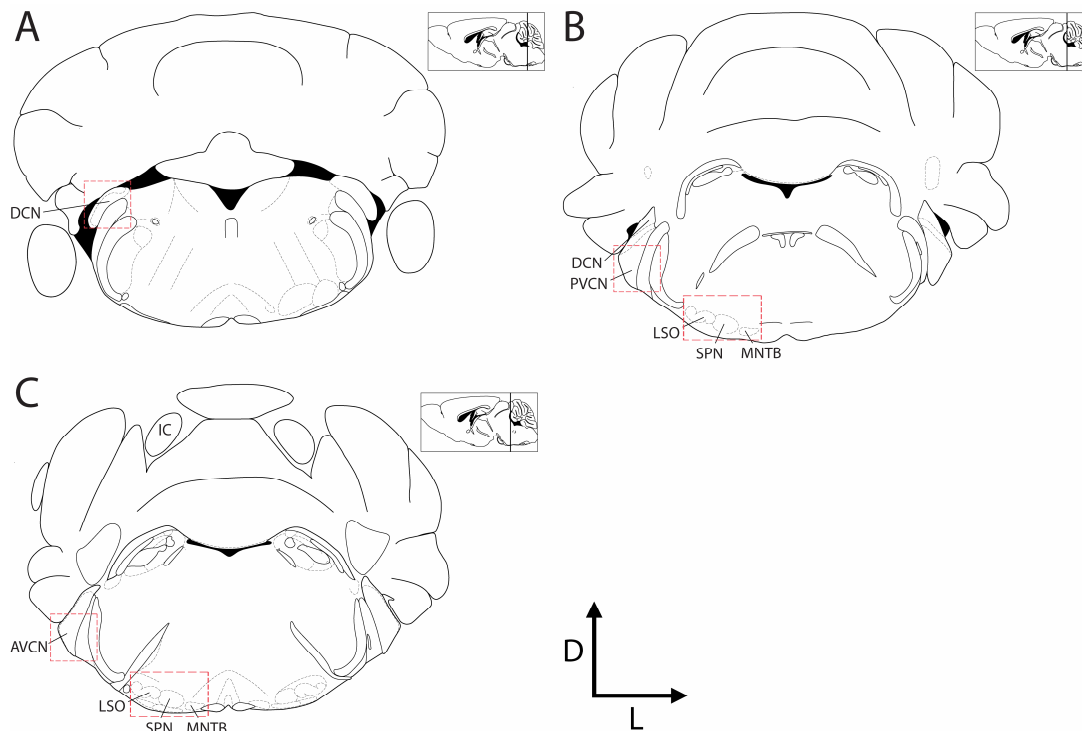


Abb. 16: Schematische Darstellung der Coronalanschnitte zur immunhistochemischen Analyse

(A) Coronalanschnitt auf Höhe des DCN; (B) Coronalanschnitt mit DCN und PVCN, vom SOC sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur LSO, SPN und MNTB dargestellt; (C) Coronalanschnitt mit AVCN, SOC und caudalen Bereichen des IC; die roten gestrichelten Boxen geben grob die Lage der in den immunhistochemischen Abbildungen dargestellten Ausschnitte an; der Orientierungsbalken gilt für alle Abbildungen mit D = dorsal und L = lateral; die eingerahmten Sagittalschnitte oben rechts in jeder Teilabbildung geben die ungefähre Lage der Schnittebene an; Abbildungen verändert aus Paxinos und Franklin (2001)

Der schematische Aufbau der Abbildung zur immunhistochemischen Färbung von NCX1 bei P4 ist in Abb. 17 dargestellt. Im Gegensatz zu den übrigen IHC-Abbildungen wurde bei dieser Färbung zusätzlich ein posteriorer Bereich des PVCN dargestellt (Teilabbildung B bzw. E), da dieser ein vom restlichen PVCN abweichendes Färbemuster zeigte. Des Weiteren sind Übersicht und Vergrößerung von DCN (A, D), ein weiter anterior gelegener Bereich des PVCN (C, F) und AVCN (G, H) sowie eine Übersicht des SOC (I) mit vergrößerter LSO (J), vergrößertem MNTB (K), vergrößertem SPN und vergrößerter MSO (L) dargestellt. Der IC ist aus Platzgründen in einer separaten Abbildung dargestellt. Diese zeigt eine schematische Darstellung des IC mit seinen Teilgebieten (Abb. 17A') sowie eine Übersicht über den gegen NCX1 gefärbten IC (B') mit Vergrößerung des ICc (C'). Alle Teilabbildungen sind so angeordnet, dass sich der dorsale Bereich der gezeigten Strukturen oben im Bild und die laterale Seite des Schnittes rechts im Bild befinden (siehe Orientierungsbalken). Der Größenbalken entspricht, sofern nicht anderweitig angegeben, einer Größe von 100 μm . Stammen vergrößerte Teilabbildungen bzw. Insets in den Teilabbildungen aus demselben

Schnitt wie die zugehörige Übersicht, so wird die Position dieser vergrößerten Ausschnitte durch gestrichelte Boxen angegeben. Gestrichelte Pfeile in den Teilabbildungen weisen auf diskrete Punkta in der Färbung hin.

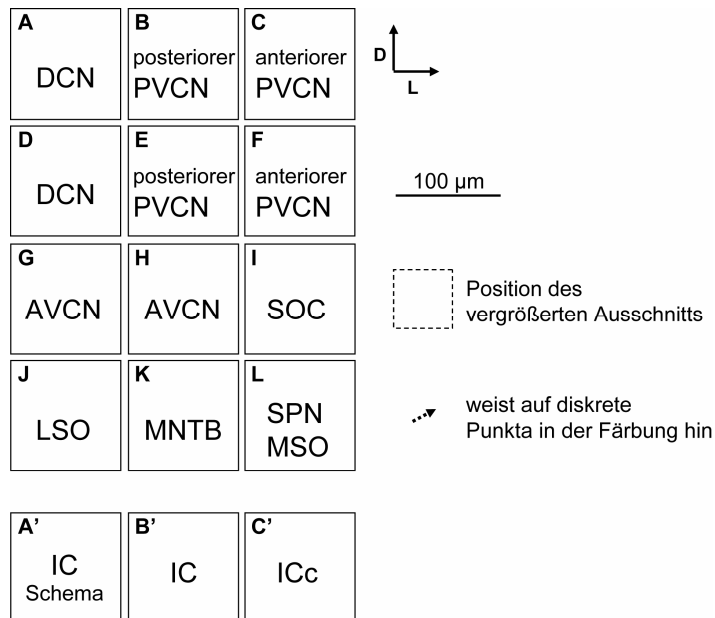


Abb. 17: Schematischer Aufbau der IHC-Abbildung von NCX1 bei P4

Übersicht (A) und Vergrößerung (D) DCN; Übersicht (B) und Vergrößerung (E) posteriorer PVCN; Übersicht (C) und Vergrößerung (F) anteriorer PVCN; Übersicht (G) und Vergrößerung (H) AVCN; (I) Übersicht SOC; (J) Vergrößerung LSO; (K) Vergrößerung MNTB; (L) Vergrößerung SPN und MSO; Die Färbung des IC wird in einer separaten Abbildung dargestellt mit (A') schematische Übersicht der Unterteilung des IC (B') Übersicht IC; (C') Vergrößerung ICc; der Orientierungsbalken gilt für alle Teilabbildungen mit D = dorsal, L = lateral; Größenbalken = 100 µm sofern nicht anderweitig angegeben; gestrichelte Boxen geben in allen Abbildungen die Position des vergrößerten Ausschnitts an, sofern dieser aus demselben Schnitt stammt; gestrichelte Pfeile weisen auf diskrete Punkta in der Färbung hin

Bei P4 wurde eine Färbung für NCX1 im DCN hauptsächlich im Neuropil detektiert (Abb. 18A, D) und war in allen Schichten des Kerns erkennbar. Vereinzelt zeigten zudem immunreaktive (IR) Signale innerhalb des Somas (Abb. 18D, Inset). Diese somatische Färbung wurde bei verschiedenen Neuronentypen festgestellt, ausschließlich aufgrund der vorliegenden NCX1-Färbung konnte der Neuronentyp allerdings nicht eindeutig bestimmt werden. Im posterioren Teil des PVCN wurde NCX1-Immunreaktivität sowohl im Neuropil als auch innerhalb des Somas einiger Zellen detektiert (Abb. 18B, E). Im weiter anterior gelegenen Teil des PVCN dagegen wurden intensive IR-Signale hauptsächlich im Neuropil detektiert (Abb. 18C, F). Im gesamten PVCN bildete die Färbung teilweise ein punktförmiges Muster (gestrichelte Pfeile). Der AVCN zeigte ebenfalls NCX1-Signale im Neuropil des

gesamten Kernbereichs (Abb. 18G und H, rechtes Inset). Vereinzelt wurden auch IR-Signale in den Somata, v.a. von Zellen im Randbereich des Kerns, detektiert (linkes Inset). In sämtlichen VCN-Schnitten, in denen Bereiche des auditorischen Nervs (AN) enthalten waren, zeigte der AN ebenfalls eine starke NCX1-Immunreaktivität (Abb. 18G). Diese Färbung war über den gesamten, in diesen Schnitten sichtbaren Bereich des Nervs verteilt und nicht auf bestimmte Regionen beschränkt. Einige Schnitte, in denen das vestibulocochleäre Ganglion enthalten war, zeigten auch IR-Signale in den Zellkörpern dieses Ganglions (Daten nicht gezeigt).

Die Übersicht des SOC (Abb. 18I) zeigte IR-Signale in allen untersuchten *Nuclei*. In der LSO (Abb. 18J) war die NCX1-Färbung hauptsächlich im Neuropil lokalisiert (Inset), einige Zellen zeigten dennoch eine Färbung innerhalb der Somata (Pfeile). Im MNTB (Abb. 18K) wurden IR-Signale im Neuropil, bei einigen Neuronen auch innerhalb der Somata detektiert (Insets). Ein ähnliches Muster zeigte sich in SPN und MSO (Abb. 18L). In beiden Kernen wurde eine NCX1-Färbung im Neuropil detektiert, vereinzelte Zellen zeigten jedoch auch eine somatische Färbung (linkes Inset SPN, rechtes Inset MSO). Sämtliche SOC-Kerne zeigten, wie schon beim PVCN beobachtet, ein teilweise punktförmiges Muster der Färbung (gestrichelte Pfeile).

Im IC wurden NCX1-positive Neurone in ICd und ICe detektiert (Abb. 19A). Der ICc wies NCX1-Immunreaktivität hauptsächlich im Neuropil auf (Abb. 19B, rechtes Inset), mit vereinzelt auch somatisch gefärbten Zellen (linkes Inset). Auch hier zeigten sich diskrete Punkta in der Färbung (gestrichelte Pfeile).

Damit zeigten für NCX1 sämtliche untersuchten auditorischen Strukturen bei P4 eine überwiegende Färbung des Neuropils. Die Färbung wurde in allen Strukturen über den gesamten Kernbereich detektiert, es konnte demnach kein tonotopes Verteilungsmuster der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher festgestellt werden.

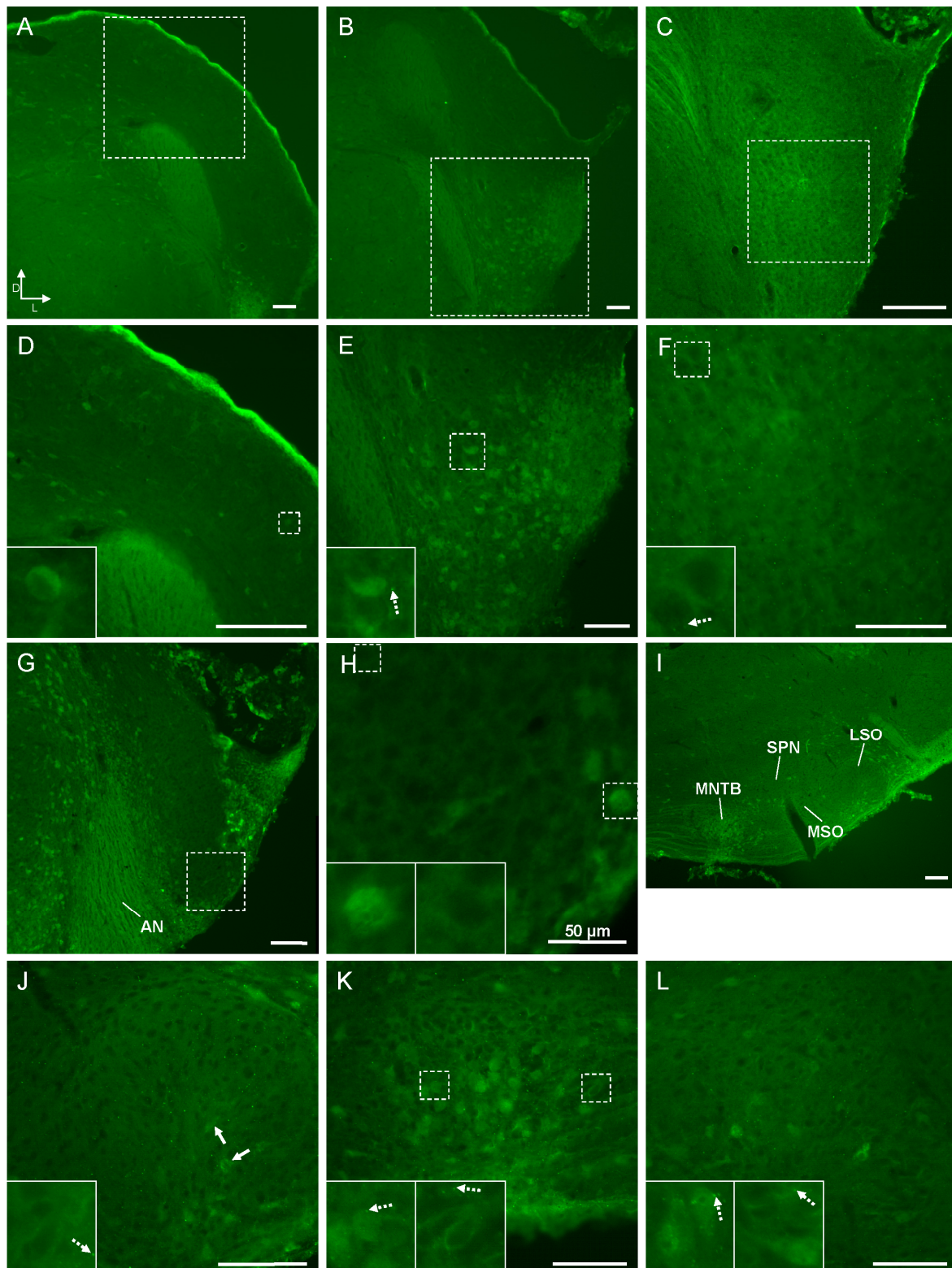


Abb. 18: Immunhistochemischer Nachweis von NCX1 in CN und SOC bei P4

Übersichten sowie Ausschnitte in höherer Vergrößerung des DCN (A, D) zeigten eine Färbung im Neuropil mit vereinzelt gefärbten Somata. Der posteriore PVCN (B, E) zeigte IR-Signale innerhalb der Somata sowie im Neuropil. Weiter anterior gelegene Bereiche des PVCN (C, F), sowie AVCN (G, H) und SOC (I) mit LSO (J), MNTB (K), SPN und MSO (L) zeigten IR-Signale hauptsächlich im Neuropil mit nur wenigen gefärbten Somata. Insets in D-F sowie H und J-L zeigen einzelne Zellen in höherer Vergrößerung; in (L) zeigt das linke Inset SPN-, das rechte Inset MSO-Neurone

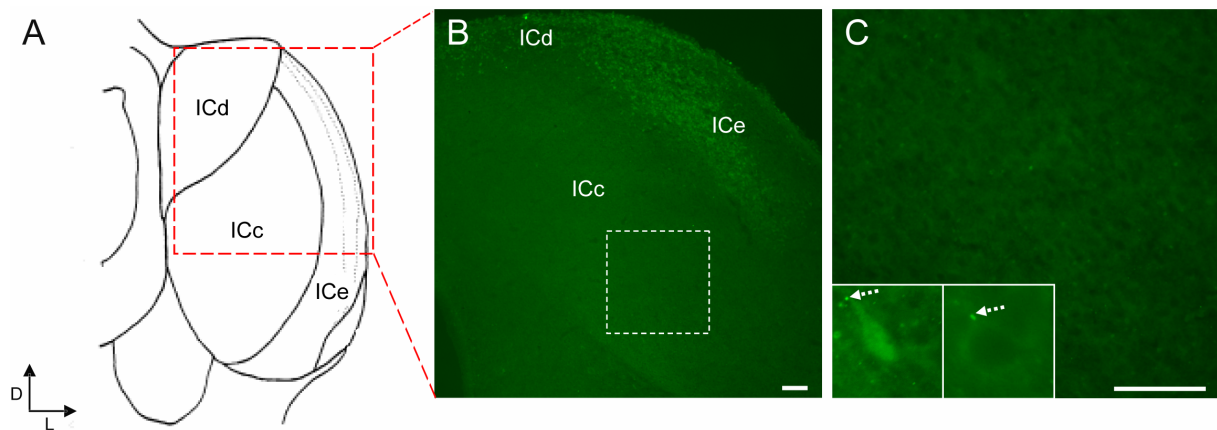


Abb. 19: Immunhistochemischer Nachweis von NCX1 im IC bei P4

(A) Schematische Unterteilung des IC, verändert aus Li *et al.* (2001); die rote gestrichelte Box gibt die ungefähre Position des Ausschnitts in (B) an; (B) Die Übersicht des IC zeigte eine intrazelluläre NCX1-Färbung in ICd und ICe sowie hauptsächlich Neuropilfärbung im ICc. (C) Die Detailansicht des ICc zeigte IR-Signale hauptsächlich im Neuropil (rechtes Inset) aber auch einige gefärbte Somata (linkes Inset).

4.2.2 Immunhistochemischer Nachweis von NCX1 bei P60

Die Abbildungen der immunhistochemischen Färbungen von NCX1 bei P60 sowie NCX2, NCX3 und NCKX2 (jeweils P4 und P60) sind stets nach dem gleichem Schema aufgebaut (Abb. 20). Gezeigt sind jeweils Übersicht und Vergrößerung von DCN (Teilabbildung A bzw. D), PVCN (B, E) und AVCN (C, F) sowie eine Übersicht des SOC (G) mit vergrößerter LSO (H), vergrößertem MNTB (I), vergrößertem SPN und vergrößerter MSO (J). Teilabbildung K zeigt jeweils eine Übersicht über den IC, während in (L) der ICc vergrößert dargestellt ist. Alle Teilabbildungen sind so angeordnet, dass sich der dorsale Bereich der gezeigten Strukturen oben im Bild und die laterale Seite des Schnittes rechts im Bild befinden. Der Größenbalken gibt, sofern nicht anderweitig angegeben, eine Größe von 100 μm an. Stammen vergrößerte Teilabbildungen bzw. Insets in den Teilabbildungen aus demselben Schnitt wie die zugehörige Übersicht, so wird die Position dieser vergrößerten Ausschnitte durch gestrichelte Boxen angegeben. Gestrichelte Pfeile in den Teilabbildungen weisen auf diskrete Punkte in der Färbung hin.

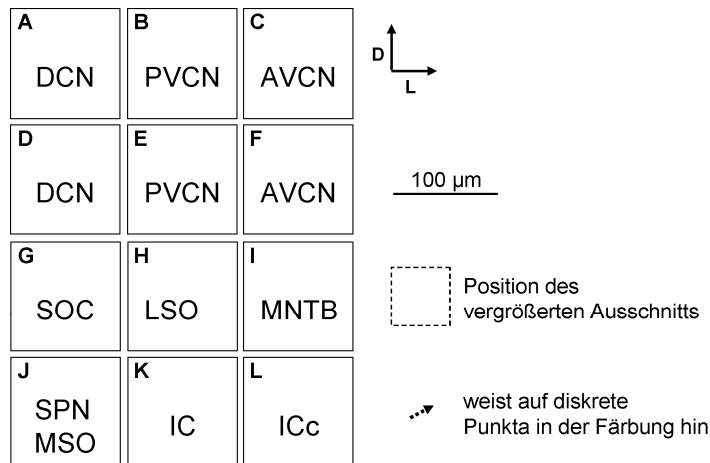


Abb. 20: Schematischer Aufbau der IHC-Abbildungen zu NCX2, NCX3 und NCKX2

Übersicht (A) und Vergrößerung (D) DCN; Übersicht (B) und Vergrößerung (E) PVCN; Übersicht (C) und Vergrößerung (F) AVCN; (G) Übersicht SOC; (H) Vergrößerung LSO; (I) Vergrößerung MNTB; (J) Vergrößerung SPN und MSO; (K) Übersicht IC; (L) Vergrößerung ICc; der Orientierungsbalken gilt für alle Teilabbildungen mit D = dorsal und L = lateral; Größenbalken = 100 µm sofern nicht anderweitig angegeben; gestrichelte Boxen geben in allen Abbildungen die Position des vergrößerten Ausschnitts an, sofern dieser aus demselben Schnitt stammt; gestrichelte Pfeile weisen auf diskrete Punkte in der Färbung hin

Im Alter von P60 zeigte die Übersicht über den DCN (Abb. 21A) eine Verteilung der NCX1-Immunreaktivität über das gesamte Kerngebiet, wobei die Färbung sowohl im Neuropil als auch in den Somata der Neurone lokalisiert war (Abb. 21D). Einige IR-Somata konnten nach Kane *et al.* (1981) als sog. Riesenneurone identifiziert werden (4.2.2.1). Auch PVCN (Abb. 21B, E) und AVCN (Abb. 21C, F) zeigten IR-Signale in Neuropil und Somata.

Im SOC wurde in allen *Nuclei* eine Färbung von NCX1 detektiert (Abb. 21G). Die Vergrößerung in Abb. 21H zeigt, dass die NCX1-Immunreaktivität in der LSO sowohl im Neuropil als auch innerhalb der Somata einiger Neurone lokalisiert war. Letzteres trifft, wie auch in den zuvor analysierten *Nuclei*, augenscheinlich auf verschiedene Neuronentypen zu, aufgrund ihrer Ausrichtung sowie der Form des Somas konnten hierbei jedoch nur Bipolarzellen (Inset), welche auch den häufigsten Zelltyp in der LSO darstellen (Rietzel und Friauf, 1998), mit großer Wahrscheinlichkeit identifiziert werden. Auch die Neurone von MNTB (Abb. 21I), SPN und MSO (Abb. 21J) zeigten IR-Signale in Neuropil und Somata.

Im IC wurden Neurone mit IR-Signalen innerhalb der Somata im ICd und ICe detektiert (Abb. 21K). Der ICc zeigte dagegen hauptsächlich eine Färbung des Neuropils, mit vereinzelt, im Bereich des Somas gefärbten Zellen (Abb. 21L, Inset). Auch bei P60 bildete die Färbung zum Teil diskrete Punkte (gestrichelte Pfeile).

Im Vergleich zu P4 wurde NCX1 bei P60 somit in allen untersuchten Strukturen außer dem ICc zusätzlich zum Neuropil vermehrt innerhalb der Somata der Neurone detektiert.

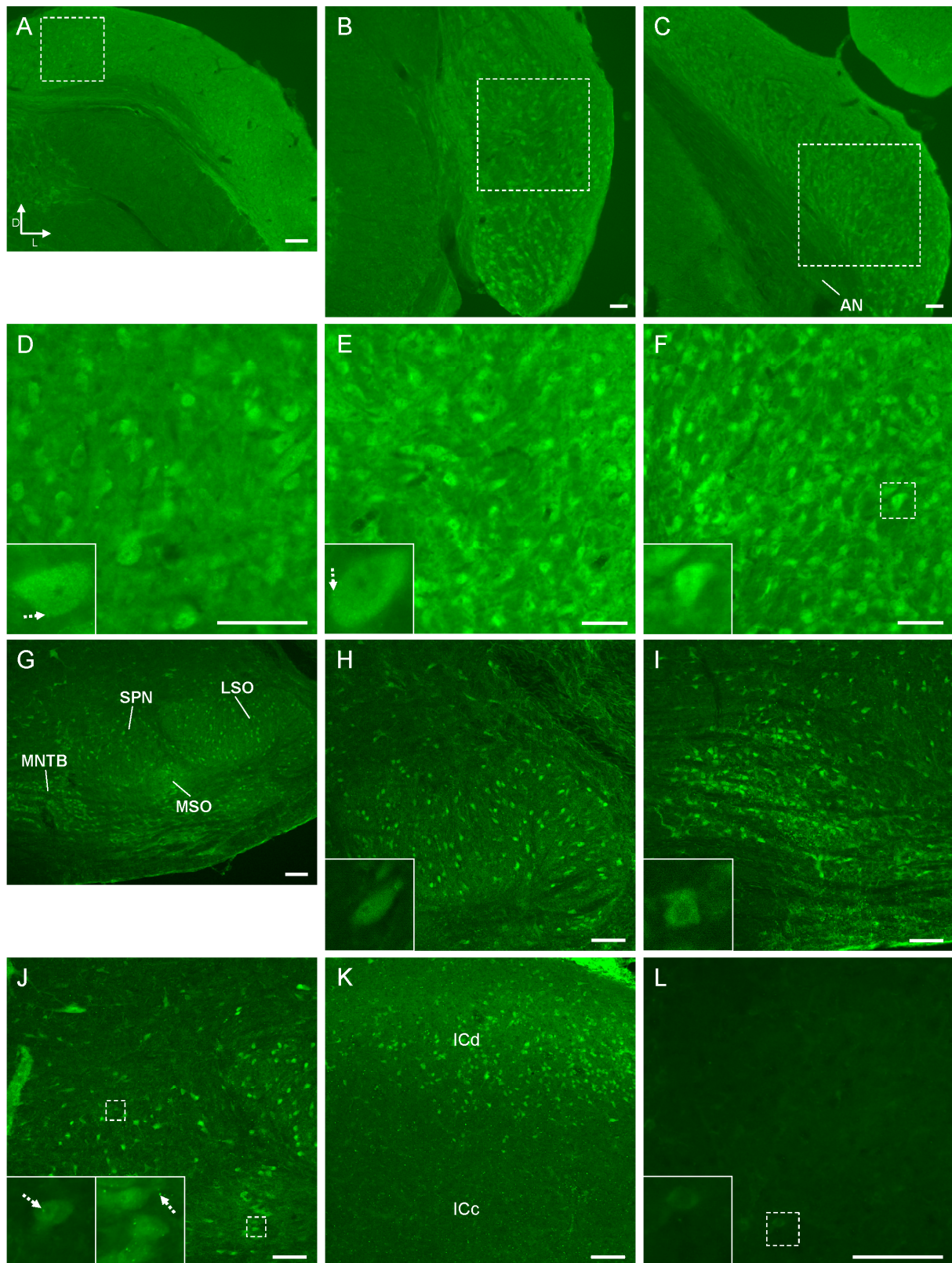


Abb. 21: Immunhistochemischer Nachweis von NCX1 bei P60

Übersichten sowie Ausschnitte in höherer Vergrößerung von DCN (A, D), PVCN (B, E), AVCN (C, F) sowie SOC (G) mit LSO (H), MNTB (I), SPN und MSO (J) zeigten IR-Signale innerhalb der Somata und im Neuropil; Gefärbte Somata zeigten sich in ICd (K) und ICc, der ICc zeigte eine schwache Färbung des Neuropils mit vereinzelt gefärbten Somata (L); in dieser und den folgenden Abbildungen stellt das linke Inset in (J) vergrößerte SPN-Neurone, das rechte Inset MSO-Neurone dar

4.2.2.1 Bestimmung des mittleren Soma-Durchmessers

Zum Vergleich der in dieser Arbeit gewonnenen IHC-Daten mit der Literatur (siehe auch 5.1.2.2) wurden die in Abb. 21A, D gezeigten, NCX1-positiven großen Zellen im DCN vermessen und ihr mittlerer Durchmesser nach Kane *et al.* (1981) bestimmt (siehe 3.6.6). Die Ergebnisse sind in Tab. 5 dargestellt. Der mittlere Soma-Durchmesser lag durchschnittlich bei 21,2 μm , die Standardabweichung betrug 2,3 μm .

Kane *et al.* (1981) definierten die sog. „Riesenneurone“ des DCN über deren mittleren Durchmesser, welcher über 22 μm liegen muss. Des Weiteren unterschied diese Publikation mehrere Typen von Riesenneuronen aufgrund der Form ihrer Somata, auf diese Unterschiede wird in meiner Arbeit jedoch nicht näher eingegangen. Bei 7 der 19 untersuchten NCX1-positiven Neurone im DCN handelt es sich demnach um die von Kane *et al.* (1981) definierten Riesenneurone (Tab. 5, rot). Dieser Zelltyp exprimiert also bei P60 NCX1, während der DCN bei P4 NCX1-IR hauptsächlich im Neuropil zeigte. Bei P4 wurden keine großen NCX1-IR Neurone detektiert. Allerdings bleibt zu berücksichtigen, dass die Untersuchungen von Kane *et al.* (1981) an der Katze durchgeführt wurden und für die Ratte keine Literaturwerte zum Durchmesser der Riesenneurone vorliegen (siehe auch 5.1.2.2).

Eine Bestimmung sämtlicher gefärbten Neuronentypen wurde nicht durchgeführt, da eine detailliertere Untersuchung der Neuronenmorphologie ausschließlich über die NCX-/NCKX-Färbungen nicht möglich war. Vereinzelt konnten Zellen jedoch aufgrund ihrer sehr markanten Morphologie einem bestimmten Zelltyp mit großer Wahrscheinlichkeit zugeordnet werden, beispielsweise Bipolarzellen in der LSO (4.2.2) oder Cartwheel-Zellen im DCN (4.2.4).

Tab. 5: Bestimmung des mittleren Durchmessers NCX1-positiver Neurone im DCN bei P60

Soma-Breite [μm]	Soma-Länge [μm]	mittlerer Somadurchmesser nach Kane <i>et al.</i> (1981) [μm]
16,77	27,73	22,3
22,57	22,57	22,6
19,99	21,93	21,0
14,19	22,57	18,4
18,06	20,64	19,4
16,12	18,06	17,1
18,7	20,64	19,7
18,38	22,9	20,6
20,32	22,58	21,5
19,67	20,32	20,0
15,8	25,16	20,5
14,84	23,87	19,4
22,58	25,16	23,9
19,03	30,64	24,8
18,71	26,12	22,4
20	22,25	21,1
21,61	25,48	23,5
23,54	29,03	26,3
18,71	19,67	19,2
		Mittelwert: 21,2
		SD: 2,3

4.2.3 Immunhistochemischer Nachweis von NCX2 bei P4

4.2.3.1 Färbung mit dem NCX2-Antikörper von Alpha Diagnostics International

Die immunhistochemische Lokalisation von NCX2 bei P4 zeigte im DCN eine starke Färbung der Somata großer Neurone, nach Kane *et al.* (1981) handelt es sich dabei jedoch nicht um Riesenneurone (siehe 4.2.3.2). Zusätzlich wurde auch im Neuropil des DCN eine NCX2-Färbung detektiert (Abb. 22A, D). Die Färbung zeigte zum Teil diskrete Punkte, was in allen im Folgenden beschriebenen Strukturen beobachtet werden konnte (gestrichelte Pfeile). Der PVCN zeigte hauptsächlich eine NCX2-Immunreaktivität im Neuropil (Abb. 22B, E, linkes Inset), mit vereinzelt Neuronen, die eine Lokalisation innerhalb des Somas aufwiesen (Abb. 22E, rechtes Inset). Im AVCN wurde eine NCX2-Färbung vorwiegend im Neuropil detektiert (Abb. 22C, F). Bei den mit einem Stern (*) gekennzeichneten Strukturen im Bereich des auditorischen Nervs handelt es sich um Epithelzellen, die ebenfalls eine NCX2-Färbung aufweisen. Auch Epithelzellen des *Plexus choroideus* zeigten IR-Signale (Abb. 22C, Pfeilspitze).

Abb. 22G lässt eine Färbung von NCX2 in allen Kernen des SOC erkennen. Sowohl LSO (Abb. 22H), MNTB (Abb. 22I) sowie SPN und MSO (Abb. 22J) zeigten eine vorwiegende Lokalisation des Proteins im Neuropil.

Der Überblick über den IC (Abb. 22K) zeigte eine stärkere Färbung im Bereich des ICd und ICe, wobei hauptsächlich das Neuropil, allerdings auch einige Somata IR-Signale zeigten. Dagegen zeigte der ICc nur eine schwache Färbung des Neuropils mit vereinzelt auch somatisch gefärbten Zellen (Abb. 22L, Pfeil).

Bis auf den DCN zeigten damit alle auditorischen Strukturen im Alter von P4 eine vorwiegende Färbung für NCX2 im Neuropil. Auch für NCX2 zeigte die Färbung keine tonotope Verteilung innerhalb der Kerne.

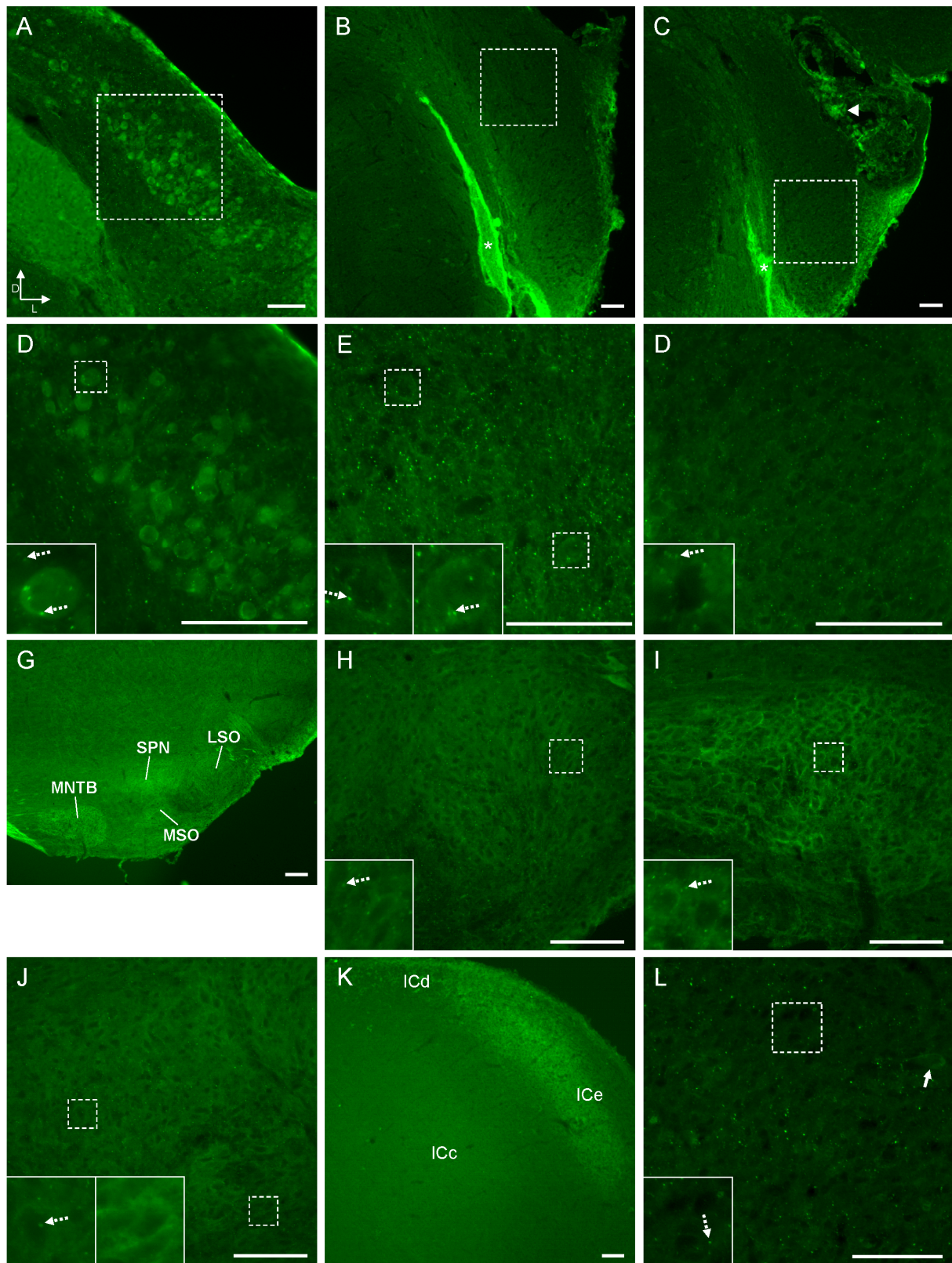


Abb. 22: Immunhistochemischer Nachweis von NCX2 bei P4

Übersichten sowie Ausschnitte in höherer Vergrößerung von DCN (A, D) zeigten eine starke Färbung innerhalb der Somata. PVCN (B, E), AVCN (C, F) sowie der SOC (G) mit LSO (H), MNTB (I), SPN und MSO (J) zeigten dagegen IR-Signale hauptsächlich im Neuropil. In ICd und ICe wurden IR-Signale hauptsächlich innerhalb der Somata detektiert (K), die Vergrößerung des ICc (L) zeigte hauptsächlich Neuropilfärbung. * = gefärbte Epithelzellen; Pfeilspitze = gefärbte Epithelzellen des *Plexus choroideus*

4.2.3.2 Bestimmung des mittleren Soma-Durchmessers

Auch die in Abb. 22A, D gezeigten, NCX2-IR großen Zellen im DCN wurden vermessen und ihr mittlerer Durchmesser nach Kane *et al.* (1981) bestimmt (siehe 3.6.6). Die Ergebnisse sind in Tab. 6 dargestellt. Der mittlere Soma-Durchmesser lag durchschnittlich bei 17,3 μm , die Standardabweichung betrug 2,0 μm . Keine der vermessenen Zellen entspricht demnach den von Kane *et al.* (1981) definierten Riesenneuronen mit einem mittleren Durchmesser von mindestens 22 μm . Dieser Zelltyp exprimiert NCX2 demnach nicht bei P4.

Tab. 6: Bestimmung des mittleren Durchmessers NCX2-positiver Neurone im DCN bei P4

Soma-Breite [μm]	Soma-Länge [μm]	mittlerer Somadurchmesser nach Kane <i>et al.</i> (1981) [μm]
18,1	18,4	18,2
18,4	18,7	18,5
14,2	19,4	16,8
12,9	18,4	15,6
19,0	20,0	19,5
16,1	17,7	16,9
19,7	20,3	20,0
16,8	18,4	17,6
13,6	14,2	13,9
15,8	26,8	21,3
18,1	18,4	18,2
15,5	18,2	16,8
15,8	17,1	16,4
14,5	14,8	14,7
13,9	17,1	15,5
14,8	17,7	16,3
		Mittelwert: 17,3
		SD: 2,0

4.2.3.3 Färbung mit dem monoklonalen NCX2-Antikörper von Prof. Porzig

Um weiteren Aufschluss über die Spezifität der verwendeten polyklonalen Antikörper gegen NCX2 und NCX3 (Alpha Diagnostics International) zu erhalten, wurden zusätzlich zu den unter 4.1 durchgeführten Western Blots auch immunhistochemische Färbungen mit dem monoklonalen anti-NCX2 (Prof. Porzig) sowie dem polyklonalen anti-NCX3 (Prof. Philipson) durchgeführt. Diese wurden daraufhin mit den Färbemustern der NCX2- und NCX3-Antikörper von Alpha Diagnostics International verglichen, da gleiche Färbemuster von Antikörpern, welche gegen unterschiedliche Epitope eines Proteins gerichtet sind, für deren Spezifität sprechen (Fritschy, 2008). Die Untersuchung der Antikörperspezifität wird ausführlich unter 5.3 diskutiert. Diese Färbungen erfolgten nur auf einer kleinen Auswahl an Gehirnschnitten, so dass das Färbemuster im SOC bei P4 nicht analysiert wurde.

Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers zeigte NCX2 in DCN (Abb. 23A, D) und PVCN (Abb. 23B, E) bei P4 die stärksten IR-Signale im Neuropil, wobei innerhalb der Somata ebenfalls eine Färbung, v.a. im Bereich der Plasmamembran, erkennbar war (Abb. 23D, E, Insets). Auch in ICd und ICe wurde die stärkste Färbung im Neuropil detektiert, der ICc zeigte jedoch kaum immunreaktive Signale (Abb. 23C, F, Pfeile).

Vergleicht man nun diese Färbung mit den durch den polyklonalen NCX2-Antikörper detektierten IR-Signalen (Abb. 22), so zeigte das Färbemuster nur im DCN Unterschiede. Mit dem polyklonalen NCX2-Antikörper wurde eine besonders starke Färbung (subjektive Beurteilung der Intensität, siehe 3.6.4) innerhalb der Somata zahlreicher großer Neurone im DCN detektiert (Abb. 22A, D), wogegen durch den monoklonalen Antikörper keine Zellen besonders hervorgehoben wurden. In PVCN sowie ICd und ICe zeigten beide Antikörper eine vorwiegende Färbung des Neuropils, mit schwächerer Färbung der Somata. Der ICc wies mit dem monoklonalen Antikörper nur eine sehr schwache Färbung auf (Abb. 23C, F, Pfeile).

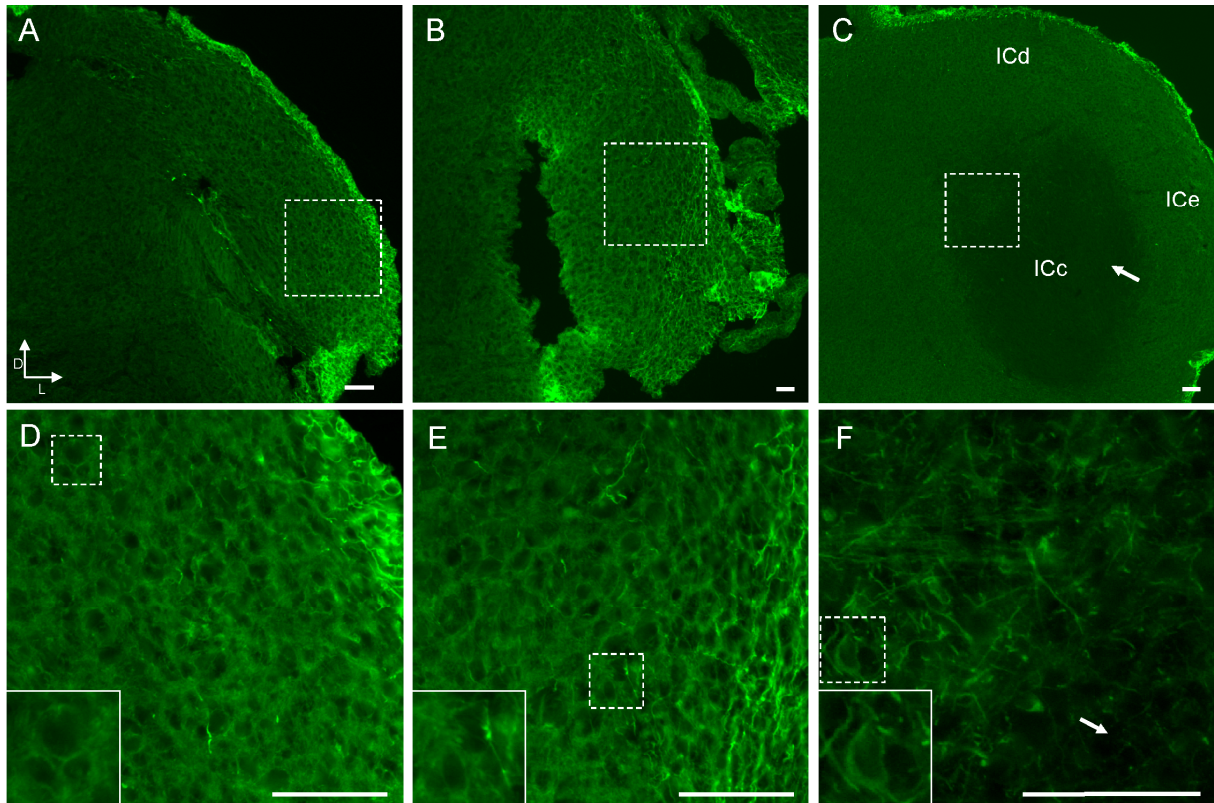


Abb. 23: Immunhistochemischer Nachweis von NCX2 bei P4 mittels monoklonalen Antikörpers

Übersichten sowie Ausschnitte in höherer Vergrößerung von DCN (A, D), PVCN (B, E) und IC (C, F) zeigten IR-Signale vorwiegend im Neuropil sowie im Bereich der Plasmamembran der Somata.

4.2.4 Immunhistochemischer Nachweis von NCX2 bei P60

Der immunhistochemische Nachweis von NCX2 erfolgte bei P60 ausschließlich mit dem Antikörper von Alpha Diagnostics International. Im DCN wurden IR-Signale für NCX2 sowohl im Bereich der Somata (Abb. 24D Inset) als auch im Neuropil detektiert (Abb. 24A, D). In Abb. 24D (gestrichelte Box, Inset) fiel eine markante Färbung von Zellen auf, deren dicke Dendriten in Richtung Molekularschicht des DCN ausgerichtet sind und die einen großen, zentral sitzenden Zellkern besitzen. Diese auffallenden morphologischen Kriterien sprechen dafür, dass es sich bei diesen Neuronen um sog. Cartwheel-Zellen, auch Purkinje-ähnliche Zellen genannt (Webster und Trune, 1982; Hackney *et al.*, 1990), handeln könnte. Zudem konnten einige der gefärbten DCN-Neurone als Riesenneurone identifiziert werden (4.2.4.1). Auch PVCN (Abb. 24B, E) und AVCN (Abb. 24C, F) zeigten eine starke Immunreaktivität im Bereich der Somata (Insets), wobei auch im Neuropil eine NCX2-Färbung erkennbar war.

Im SOC wurde NCX2 in allen *Nuclei* detektiert (Abb. 24G). Die LSO (Abb. 24H) zeigte eine Färbung sowohl im Neuropil als auch innerhalb der Somata einiger Neurone (Inset). Im MNTB (Abb. 24I) wurden starke IR-Signale im Bereich der Somata detektiert, das Neuropil wies ebenfalls eine Färbung auf. SPN und MSO zeigten neben einem stark gefärbten Neuropil auch NCX2-Immunreaktivität innerhalb der Somata (Abb. 24J).

Der IC zeigte im Überblick (Abb. 24K) eine Färbung von Neuropil und Somata über den ganzen *Nucleus*. Auch im ICc (Abb. 24L) waren sowohl Neuropil als auch einige Somata gefärbt (Inset). Die Färbung zeigte wiederum ein zum Teil punktförmiges Muster, v.a. in CN sowie LSO und MNTB (gestrichelte Pfeile), dieses war jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei P4.

Bei P60 zeigte NCX2 damit im Vergleich zu P4 in den meisten Strukturen zusätzlich zur Färbung des Neuropils eine starke Färbung innerhalb der Somata. Dies galt besonders für die Bereiche des CN sowie für den MNTB. Eine tonotope Verteilung der NCX2-IR wurde für keine der Strukturen gezeigt.

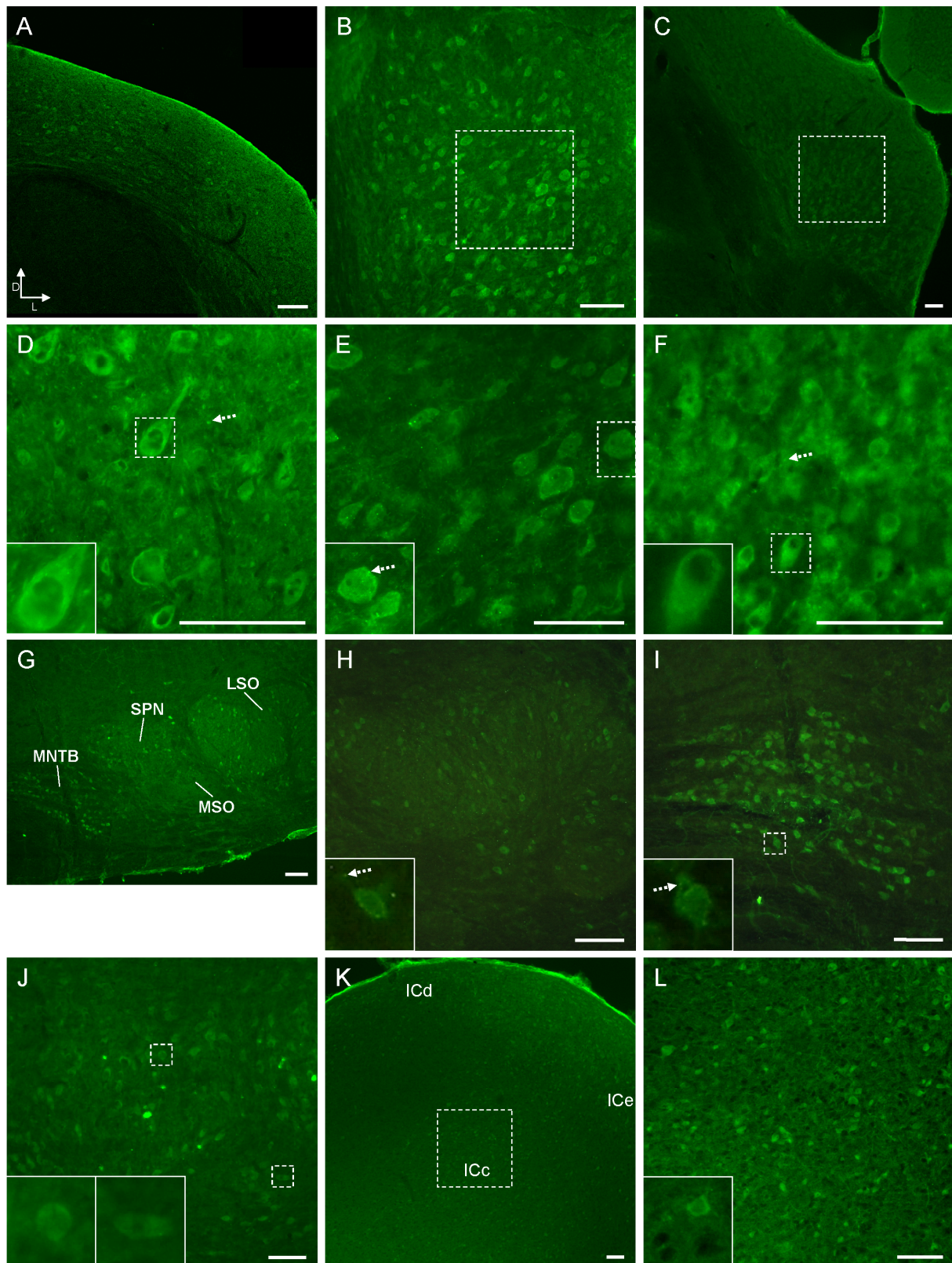


Abb. 24: Immunhistochemischer Nachweis von NCX2 bei P60

Übersichten sowie Ausschnitte in höherer Vergrößerung von DCN (A, D), PVCN (B, E), AVCN (C, F) sowie SOC (G) mit LSO (H), MNTB (I), SPN und MSO (J) zeigten IR-Signale innerhalb der Somata und im Neuropil. Auch der IC zeigte eine Färbung von Neuropil und Somata über den gesamten *Nucleus* (K), die Vergrößerung des ICc ist in (L) dargestellt.

4.2.4.1 Bestimmung des mittleren Soma-Durchmessers

Auch bei P60 wurden große DCN-Neurone vermessen und ihr mittlerer Durchmesser nach Kane *et al.* (1981) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 7 dargestellt. Der mittlere Soma-Durchmesser betrug durchschnittlich 21,9 μm , die Standardabweichung lag bei 4,0 μm .

Bei 16 der 30 untersuchten NCX2-positiven Neurone im DCN handelt es sich um die von Kane *et al.* (1981) definierten Riesenneurone mit einem mittleren Durchmesser von mindestens 22 μm (Tab. 7, rot). Einige der in Abb. 24A, D NCX2-IR Neurone stellen somit Riesenneurone dar. Dieser Zelltyp exprimiert demnach NCX2 ausschließlich bei P60, bei P4 konnten keine gefärbten Riesenneurone identifiziert werden (Tab. 6).

Tab. 7: Bestimmung des mittleren Durchmessers NCX2-positiver Neurone im DCN bei P60

Soma-Breite [μm]	Soma-Länge [μm]	mittlerer Somadurchmesser nach Kane <i>et al.</i> (1981) [μm]
16,77	25,8	21,3
17,41	24,51	21,0
21,28	23,22	22,3
18,06	28,38	23,2
18,7	19,99	19,3
18,06	19,35	18,7
16,77	17,41	17,1
19,99	24,51	22,3
16,12	22,57	19,3
15,48	17,42	16,5
12,9	18,38	15,6
18,38	21,93	20,2
18,06	18,06	18,1
18,06	19,03	18,5
15,16	16,13	15,6
15,8	16,77	16,3
23,22	29,67	26,4
19,99	31,6	25,8
22,57	27,7	25,1

Soma-Breite [μm]	Soma-Länge [μm]	mittlerer Somadurchmesser nach Kane <i>et al.</i> (1981) [μm]
21,28	29,02	25,2
29,67	33,54	31,6
24,51	30,96	27,7
17,41	28,38	22,9
19,99	29,02	24,5
21,28	23,22	22,3
22,58	28,38	25,5
24,83	29,67	27,3
22,58	23,54	23,1
20,32	25,8	23,1
18,38	22,25	20,3
		Mittelwert: 21,9
		SD: 4,0

Rote Markierungen stellen sog. „Riesenneurone“ mit einem mittleren Durchmesser von mindestens 22 μm dar

4.2.5 Immunhistochemischer Nachweis von NCX3 bei P4

4.2.5.1 Färbung mit dem NCX3-Antikörper von Alpha Diagnostics International

Bei P4 zeigte NCX3 im DCN eine starke Färbung im Bereich der Somata einiger Neurone (Abb. 25A, D), die jedoch nicht den Riesenneuronen zugeordnet werden konnten (4.2.5.2). Der PVCN dagegen zeigte vorwiegend eine starke Färbung des Neuropils (Abb. 25B, E). Auch im AVCN (Abb. 25C, F) wies vorwiegend das Neuropil IR-Signale auf, allerdings war die Färbung schwächer als im PVCN. Innerhalb des AVCN zeigten die ventralen und lateralen Randbereiche die stärkste Färbung. Auch im Bereich des AN wurde eine starke Immunreaktivität detektiert (Abb. 25C).

Der SOC zeigte, wie auch schon für die zuvor untersuchten NCX-Isoformen, IR-Signale für NCX3 in allen vier untersuchten *Nuclei* (Abb. 25G). In der LSO (Abb. 25H) wurden IR-Signale sowohl im Neuropil als auch im Bereich der Somata detektiert. Der MNTB zeigte ebenfalls eine starke Färbung im Bereich der Somata, wobei auch das Neuropil IR-Signale aufwies (Abb. 25I). Auch SPN und MSO zeigten eine NCX3-Färbung sowohl im Neuropil als auch im Bereich der Somata (Abb. 25J).

Im gesamten IC (Abb. 25K, L) wurden IR-Signale vorwiegend im Neuropil, aber auch im Bereich der Somata detektiert.

Somit wurde NCX3 bei P4 in VCN und IC hauptsächlich im Neuropil detektiert, alle anderen untersuchten Strukturen zeigten ebenfalls eine Färbung im Bereich der Somata. Die Somata zeigten dabei besonders im Bereich der Plasmamembran eine stärkere Lokalisation von NCX3 als im Cytoplasma. Auch NCX3 zeigte keine tonotope Verteilung innerhalb der Kerne.

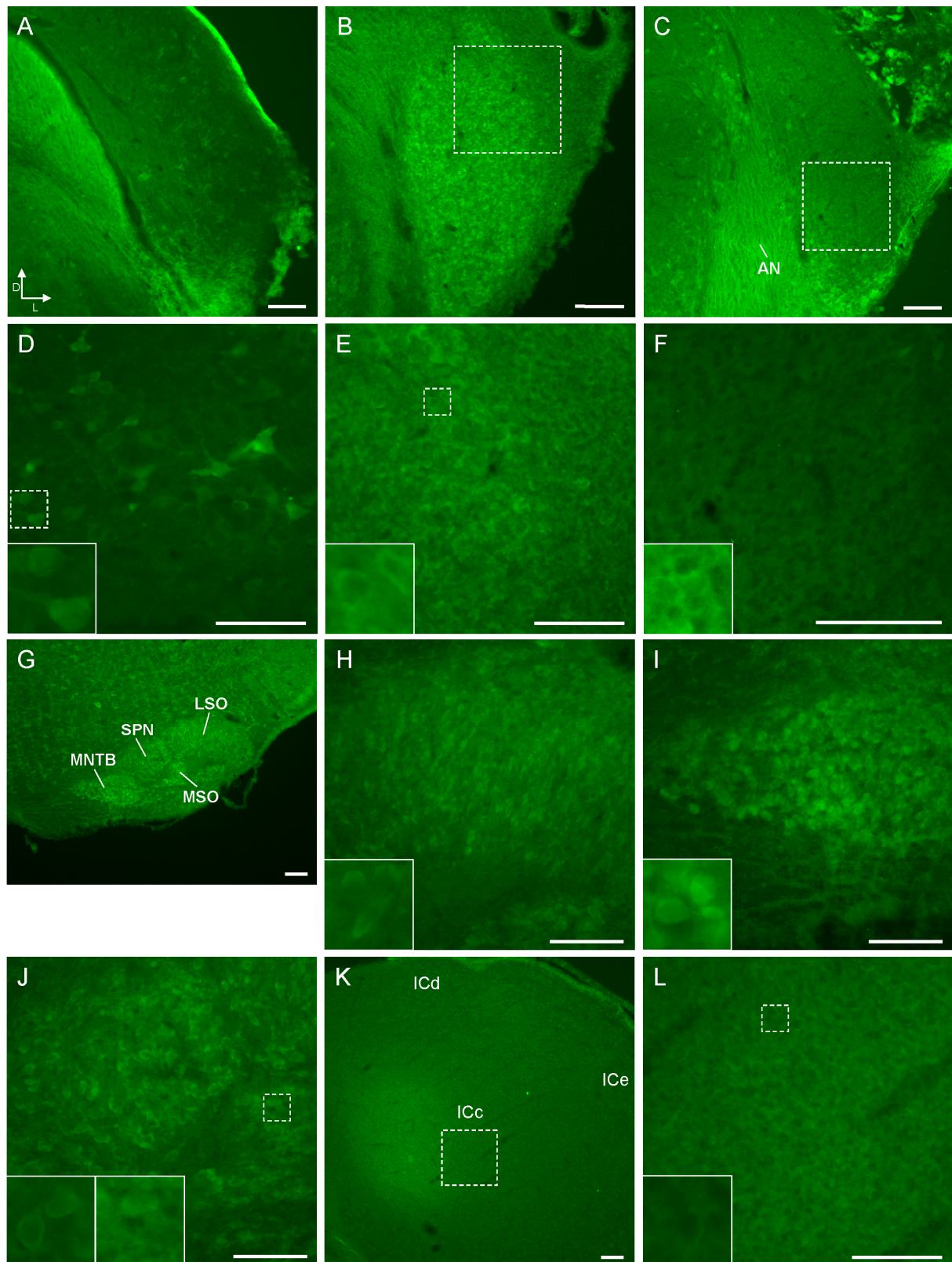


Abb. 25: Immunhistochemischer Nachweis von NCX3 bei P4

Der DCN (A, D) zeigte in einigen Neuronen IR-Signale innerhalb der Somata. PVCN (B, E) und AVCN (C, F) zeigten hauptsächlich eine Färbung des Neuropils. Der SOC (G) mit LSO (H), MNTB (I), SPN und MSO (J) wies IR-Signale in Neuropil und Somata auf; Der IC (K, mit Vergrößerung des ICc in L) zeigte eine Färbung vorwiegend im Neuropil.

4.2.5.2 Bestimmung des mittleren Soma-Durchmessers

Auch von den in Abb. 25A, D gezeigten, großen, NCX3-IR Neuronen im DCN wurde der mittlere Soma-Durchmesser bestimmt (siehe 3.6.6). Der mittlere Durchmesser betrug durchschnittlich 23,79 μm (Tab. 8). Legt man wiederum die Definition von Kane *et al.* (1981) zugrunde (siehe 4.2.3.2), so erfüllt keines der vermessenen Neurone das Kriterium eines mittleren Durchmessers von mindestens 22 μm . Demnach handelt es sich bei den vermessenen und in Abb. 25A, D gefärbten Neuronen nicht um die von Kane *et al.* (1981) definierten Riesenneurone.

Tab. 8: Bestimmung des mittleren Durchmessers NCX3-positiver Neurone im DCN bei P4

Soma-Breite [μm]	Soma-Länge [μm]	mittlerer Somadurchmesser nach Kane <i>et al.</i> (1981) [μm]
14,84	20	17,4
15,16	18,71	16,9
16,13	20,96	18,5
15,48	15,8	15,6
14,51	18,06	16,3
12,58	15,08	13,8
9,68	10,32	10,0
18,06	19,67	18,9
13,55	22,25	17,9
16,13	19,35	17,7
12	12,9	12,5
13,22	17,42	15,3
11,93	13,22	12,6
		Mittelwert: 15,7
		SD: 2,7

4.2.5.3 Färbung mit dem NCX3-Antikörper von Prof. Philipson

Der in Prof. Philipsons Labor generierte Antikörper detektierte NCX3 bei P4 in DCN (Abb. 26A, D), PVCN (Abb. 26B, E) und AVCN (Abb. 26C, F) hauptsächlich im Neuropil, zusätzlich zeigten jedoch auch zahlreiche Neurone, v.a. im VCN, eine Färbung im Bereich der Somata (Insets). Im Bereich des auditorischen Nerven zeigten Epithelzellen ebenfalls eine NCX2-Färbung, was in Abb. 26B mit einem Stern (*) markiert wurde. Auch im IC wurden IR-Signale hauptsächlich im Neuropil detektiert (Abb. 26G, H), wobei der ICc eine etwas schwächere Färbung zeigte als ICd und ICe (Abb. 26G). Die Färbung bildete teilweise diskrete Punkte, besonders deutlich wurde dies in PVCN und IC (gestrichelte Pfeile).

Im VCN sowie im IC zeigte dieser Antikörper damit das gleiche Färbemuster wie der zuvor verwendete NCX3-Antikörper von Alpha Diagnostics International (Abb. 25). Im DCN wurden dagegen durch letzteren zusätzlich die Somata einiger Neurone stärker angefärbt (Abb. 25), was bei dem Philipson-Antikörper nicht beobachtet werden konnte.

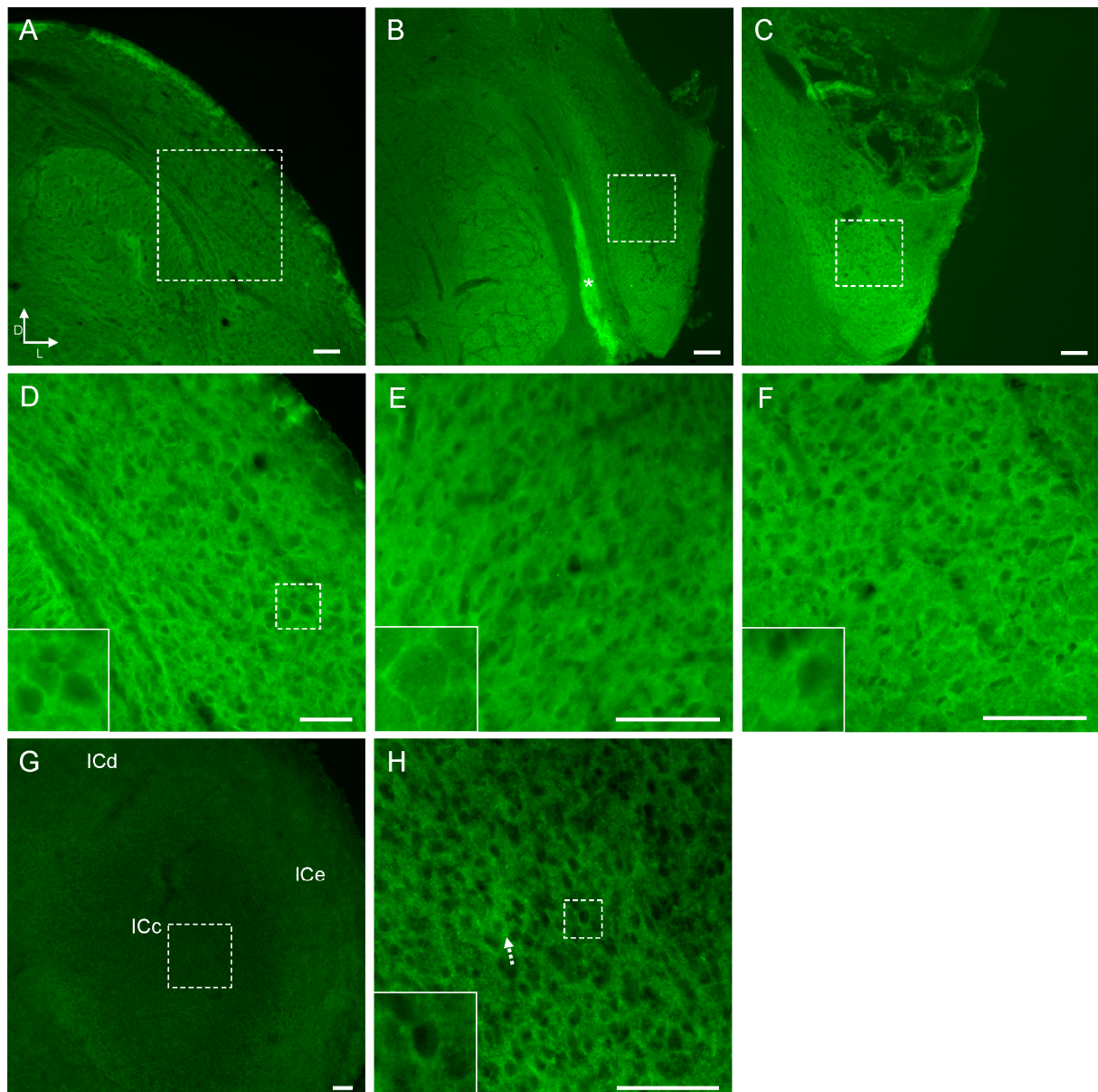


Abb. 26: Immunhistochemischer Nachweis von NCX3 bei P4 mittels des Antikörpers von Prof. Philipson
 Übersichten sowie Ausschnitte in höherer Vergrößerung von DCN (A, D), PVCN (B, E) und AVCN (C, F) zeigten IR-Signale im Neuropil sowie im Bereich der Plasmamembran der Somata. Gleiches wurde für ICd und ICe (G) sowie ICc (H) beobachtet. * = gefärbte Epithelzellen

4.2.6 Immunhistochemischer Nachweis von NCX3 bei P60

4.2.6.1 Färbung mit dem NCX3-Antikörper von Alpha Diagnostics International

Im DCN bei P60 wurden IR-Signale für NCX3 sowohl im Bereich der Somata als auch im Neuropil detektiert (Abb. 27A, D). Die Somata zeigten besonders im Bereich der Plasmamembran eine stärkere Färbung (Inset). Einige der gefärbten Neurone konnten als Riesenneurone identifiziert werden (4.2.6.2). Auch im PVCN zeigten Neurone besonders im Bereich der Plasmamembran eine stärkere Färbung, wobei im Neuropil ebenfalls Immunreaktivität detektiert wurde (Abb. 27B, E). Im AVCN wurden ebenfalls die stärksten IR-Signale im Bereich der Plasmamembran der Somata detektiert (Abb. 27C, F, Inset) und auch hier wies das Neuropil ebenfalls NCX2-Immunreaktivität auf.

Im SOC zeigten alle *Nuclei* eine Färbung für NCX3 (Abb. 27G). In der LSO wurden die stärksten IR-Signale innerhalb der Somata sowie in den proximalen Dendriten einiger Neurone detektiert (Abb. 27H, Inset). In MNTB (Abb. 27I), SPN und MSO (Abb. 27J) wurde die stärkste Immunreaktivität ebenfalls innerhalb der Somata detektiert. Auch das Neuropil wies IR-Signale auf. Im Bereich der MSO zeigte sich ein punktförmiges Muster in der Färbung (gestrichelter Pfeil).

Der IC zeigte in allen Bereichen eine Färbung von Neuropil und Somata (Abb. 27K, L). Die Färbung war insgesamt schwächer als die in den übrigen untersuchten Strukturen und wies ebenfalls diskrete Punkte auf (gestrichelter Pfeil).

Somit zeigte NCX3 bei P60 in allen Strukturen die stärkste Immunreaktivität innerhalb der Somata, wobei das Neuropil stets ebenfalls eine Färbung aufwies. Im Vergleich zur Färbung bei P4 war NCX3 damit bei P60 stärker innerhalb der Somata lokalisiert, v.a. im VCN, in der LSO sowie im IC. Auch bei P60 zeigte sich keine tonotope Verteilung der NCX3-Färbung.

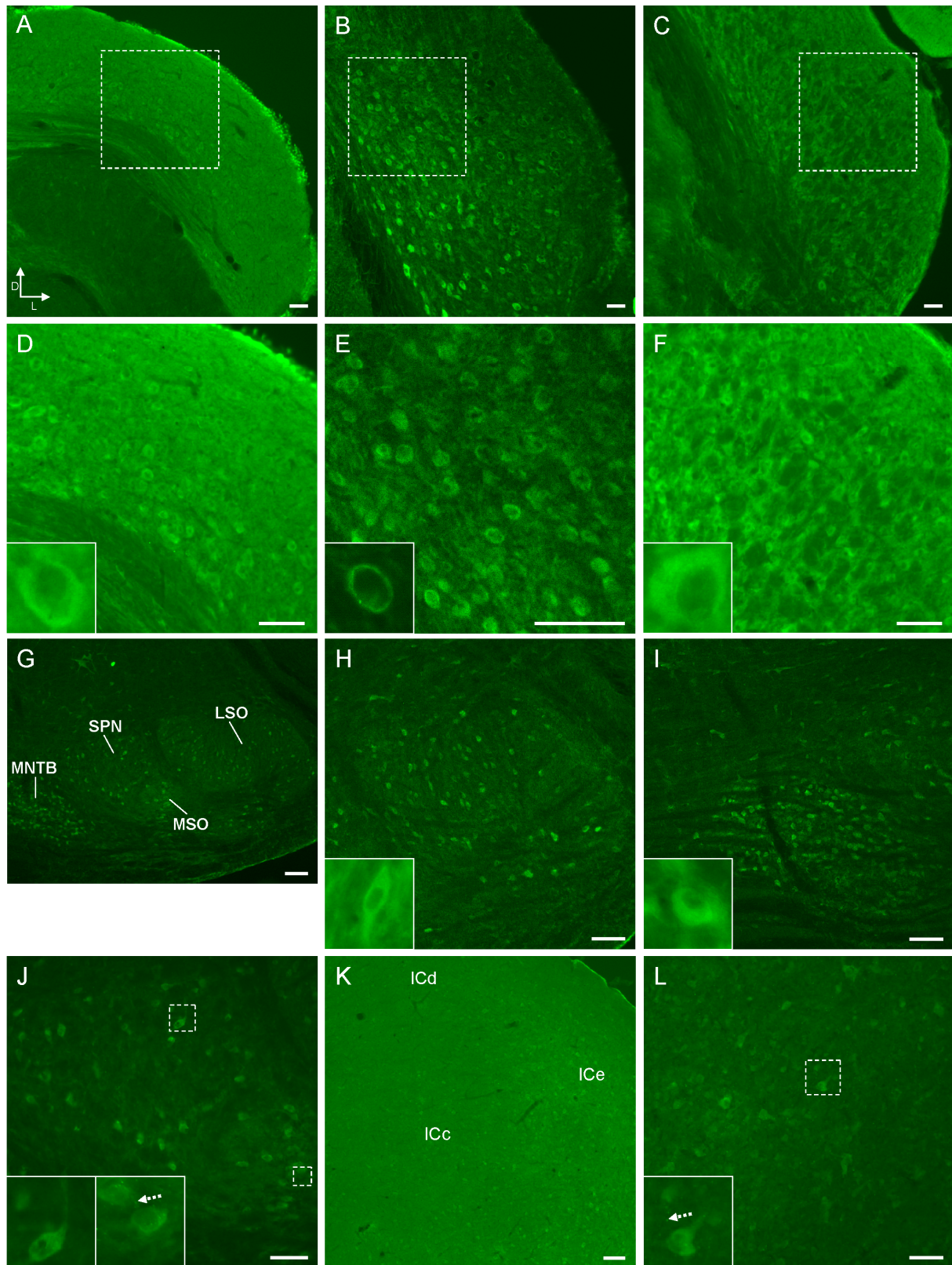


Abb. 27: Immunhistochemischer Nachweis von NCX3 bei P60

Übersichten sowie Ausschnitte in höherer Vergrößerung von DCN (A, D), PVCN (B, E), AVCN (C, F) sowie SOC (G) mit LSO (H), MNTB (I), SPN und MSO (J) zeigten hauptsächlich eine Färbung der Somata, aber auch IR-Signale im Neuropil; Der IC zeigte in allen Bereichen (K) eine Färbung von Neuropil und Somata. (L) Vergrößerung des ICc

4.2.6.2 Bestimmung des mittleren Soma-Durchmessers

Der mittlere Soma-Durchmesser nach Kane *et al.* (1981) der großen NCX3-positiven Neurone im DCN bei P60 betrug durchschnittlich 22,5 μm , die Standardabweichung lag bei 2,3 μm (Tab. 9). Bei 12 der 19 untersuchten Neurone handelt es sich um die von Kane *et al.* (1981) definierten Riesenneurone mit einem mittleren Durchmesser von mindestens 22 μm (Tab. 9, rot). Bei einigen der in Abb. 27A, D gefärbten Neurone handelt es sich demnach um Riesenneurone, während dieser Zelltyp bei P4 keine NCX3-IR zeigte (Tab. 8).

Tab. 9: Bestimmung des mittleren Durchmessers NCX3-positiver Neurone im DCN bei P60

Soma-Breite [μm]	Soma-Länge [μm]	mittlerer Somadurchmesser nach Kane <i>et al.</i> (1981) [μm]
16,12	21,28	18,7
22,57	23,86	23,2
20,64	25,8	23,2
18,7	21,28	20,0
24,51	24,51	24,5
16,12	29,02	22,6
18,7	36,76	27,7
21,93	25,15	23,5
17,41	27,73	22,6
18,7	22,57	20,6
16,12	26,44	21,3
18,7	23,86	21,3
20,64	25,15	22,9
21,93	23,86	22,9
23,99	25,75	24,9
19,05	24,35	21,7
21,87	22,22	22,0
18,38	18,7	18,5
20,11	30,69	25,4
		Mittelwert: 22,5
		SD: 2,3

Rote Markierungen stellen sog. „Riesenneurone“ mit einem mittleren Durchmesser von mindestens 22 μm dar

4.2.6.3 Färbung mit dem NCX3-Antikörper von Prof. Philipson

Bei P60 zeigte der Philipson-Antikörper im DCN sowohl eine Färbung im Neuropil als auch innerhalb der Somata (Abb. 28A, D). In PVCN (Abb. 28B, E) und AVCN (Abb. 28C, F) wurde eine Färbung von NCX3 hauptsächlich in den Somata detektiert (Insets), allerdings waren auch IR-Signale im Neuropil zu erkennen.

Im SOC wurde NCX3-Immunreaktivität in allen Kernen nachgewiesen (Abb. 28G). In der LSO (Abb. 28H) wurden starke IR-Signale im Bereich der Plasmamembran einiger Neurone detektiert (Inset). Auch im Neuropil war eine deutliche Färbung zu erkennen. Im MNTB (Abb. 28I) wurden IR-Signale hauptsächlich innerhalb der Somata detektiert (Inset). Die stärkste Färbung im SPN (Abb. 28J) zeigte sich im Bereich der Plasmamembran (Inset). Allerdings wurde auch eine Immunreaktivität im Neuropil detektiert. Im Bereich der MSO wurden sowohl Neuropil als auch die Somata angefärbt (Abb. 28J, rechtes Inset).

Der IC zeigte die stärkste Färbung innerhalb der Somata, wobei auch das Neuropil angefärbt war (Abb. 28K, L). In allen untersuchten Strukturen zeigte die Färbung punktförmige Muster (gestrichelte Pfeile).

Damit stimmen bei P60 die Färbemuster des NCX3-Antikörpers von Prof. Philipson mit denen des NCX3-Antikörpers von Alpha Diagnostics (Abb. 27) in allen untersuchten Strukturen überein. In LSO und SPN scheint die Färbung durch den Philipson-Antikörper lediglich etwas stärker im Bereich der Plasmamembran lokalisiert zu sein (Abb. 28H, J).

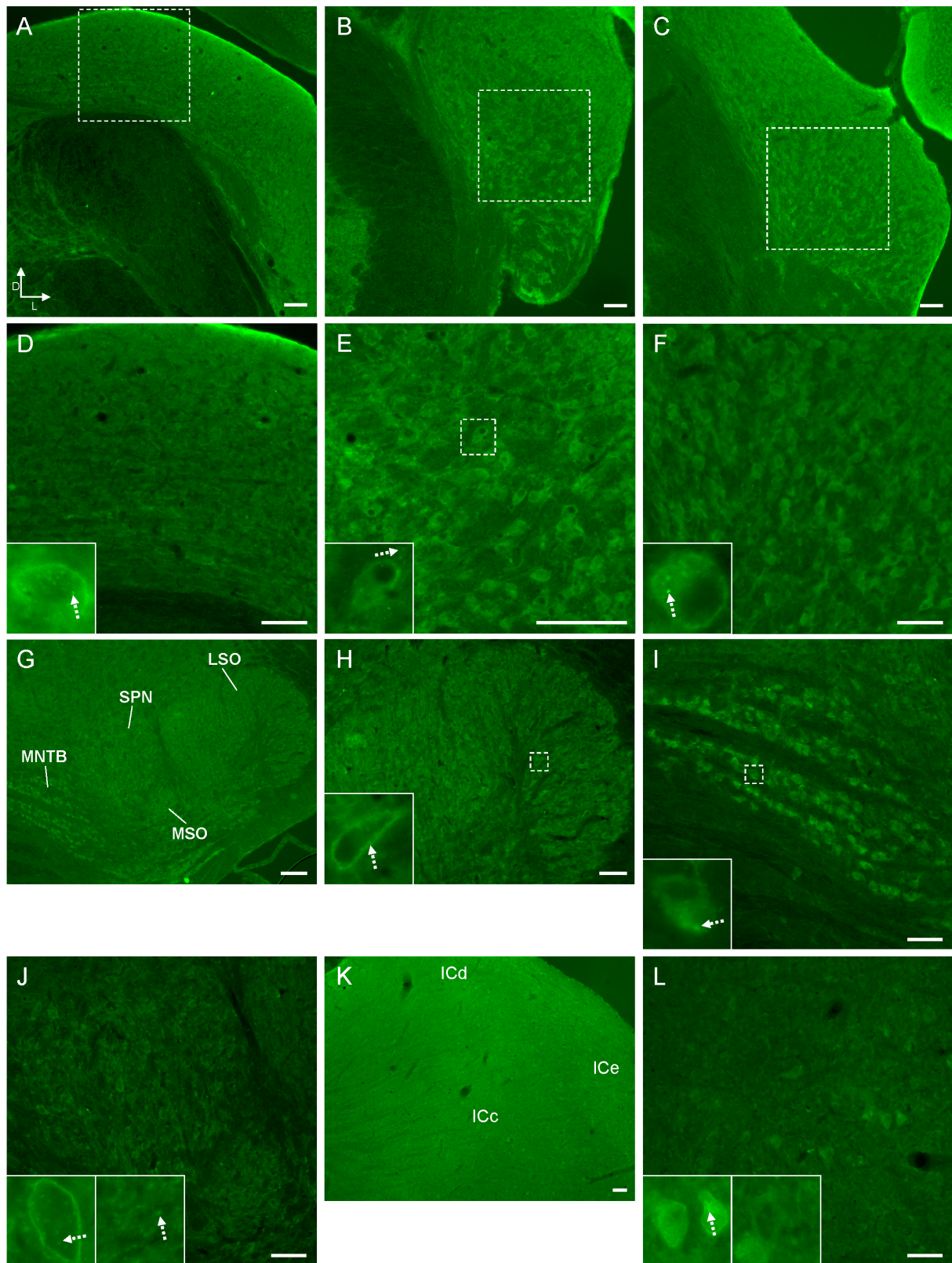


Abb. 28: Immunhistochemischer Nachweis von NCX3 bei P60 mittels des Antikörpers von Prof. Philipson
 Übersichten sowie Ausschnitte in höherer Vergrößerung von DCN (A, D), PVCN (B, E) und AVCN (C, F) zeigten IR-Signale in Neuropil und Somata. Der SOC (G) zeigte eine Färbung aller *Nuclei*, LSO (H), MNTB (I), MSO und SPN (J) wiesen IR-Signale im Bereich der Somata wie auch im Neuropil auf. ICd und ICe (G) sowie ICc (H) zeigten ebenfalls eine Färbung innerhalb der Somata sowie im Neuropil.

4.2.7 Zusammenfassung Antikörperspezifität

Western Blots sowie IHC-Färbungen zeigten einige Unterschiede zwischen den beiden untersuchten NCX2-Antikörpern. Wie unter 4.1.2 und 4.1.4 besprochen, gibt es Hinweise auf eine spezifische Reaktion der NCX2-Antikörper im Western Blot, auch wenn beide Antikörper Banden zeigten, die ohne weitere Experimente (siehe 5.3.3) nicht zweifelsfrei identifiziert werden können. Im IHC-Färbemuster zeigte der Vergleich beider NCX2-Antikörper nur Unterschiede im DCN bei P4. So wurden mit dem anti-NCX2 von Alpha Diagnostics International IR-Signale im Neuropil sowie innerhalb der Somata einiger Neurone detektiert (Abb. 22A, D), während der monoklonale Antikörper ausschließlich das Neuropil färbte (Abb. 23A, D).

Beide NCX3-Antikörper zeigten im Western Blot (Abb. 14) Banden, die zwar zwischen den Antikörpern übereinstimmten, jedoch auch im NCX3-KO-Gewebe detektiert wurden. Demnach konnte auch hier keine Präferenz für einen der Antikörper begründet werden, bei korrekter Genotypisierung der Tiere müsste davon ausgegangen werden, dass beide unspezifische Bindungen eingehen. Weitere Experimente zur Identifizierung der Banden stehen noch aus (siehe 5.3.3). Im Vergleich der Färbemuster zeigten beide NCX3-Antikörper ausschließlich Unterschiede im DCN bei P4. Während der Antikörper von Alpha Diagnostics International IR-Signale sowohl im Neuropil als auch innerhalb der Somata einiger Neurone zeigte, färbte der Antikörper von Prof. Philipson ausschließlich das Neuropil.

Der Vergleich des Färbemusters eines Antikörpers für ein bestimmtes Zielprotein mit den IR-Signalen eines weiteren Antikörpers, welcher gegen ein anderes Epitop desselben Proteins generiert wurde, stellt nach Fritschy (2008) eine Kontrolle der Spezifität der verwendeten Antikörper dar (Details siehe 5.3). Die in meiner Arbeit miteinander verglichenen NCX2- bzw. NCX3-Antikörper zeigten mit Ausnahme des DCN bei P4 ein übereinstimmendes Färbemuster im auditorischen Hirnstamm. Dies spricht demnach für deren Spezifität in den untersuchten Strukturen, mit Ausnahme des DCN. Im DCN könnte es zu einer unspezifischen Bindung an ein ausschließlich dort stark exprimiertes Protein kommen. Da die bisherigen Experimente keine Präferenz für einen der Antikörper zulassen, ist eine eindeutige Aussage über die somatische Färbung innerhalb des DCN nicht möglich.

Die immunhistochemischen Färbemuster sprechen demnach für eine Spezifität der verwendeten Antikörper in VCN, SOC und IC. Die NCX2-Antikörper zeigten zudem im Western Blot erwartungsgemäß keine Banden in der Negativkontrolle. Daher wurde die NCX2- und NCX3-Proteinlokalisierung in meiner Arbeit anhand jeweils eines Antikörpers für

NCX2 und NCX3 analysiert, in beiden Fällen wurde aufgrund der besseren Verfügbarkeit der Antikörper von Alpha Diagnostics International gewählt. Die Antikörperspezifität wird unter 5.3 ausführlich diskutiert, ebenso weitere Versuche, die zur Bestimmung der Antikörperspezifität beitragen können.

4.2.8 Immunhistochemischer Nachweis von NCKX2 bei P4

NCKX2 zeigte im DCN bei P4 sowohl eine starke Färbung im Bereich der Somata als auch im Neuropil (Abb. 29A, D). Die gefärbten Somata stellen dabei keine Riesenneurone dar (4.2.8.1). Die Färbung bildete teilweise punktförmige Muster, v.a. im Neuropil (gestrichelter Pfeil). Im PVCN (Abb. 29B, E) wurden dagegen IR-Signale hauptsächlich im Neuropil detektiert, nur vereinzelte Neurone zeigten eine Färbung der Somata (Abb. 29E, rechtes Inset). Diese PVCN-Neurone konnten leider keinem bestimmten Neuronentyp zugeordnet werden, da eine detaillierte Untersuchung der Morphologie mit den durchgeführten Färbungen nicht möglich war. Auch im AVCN wurden IR-Signale vorwiegend im Neuropil detektiert (Abb. 29C, F). Sowohl PVCN als auch AVCN zeigten einige Punkte in der Färbung (gestrichelte Pfeile).

Im SOC zeigten sämtliche *Nuclei* eine Immunreaktivität für NCKX2 (Abb. 29G). Auch hier bildete die Färbung zum Teil diskrete Punkte (gestrichelte Pfeile). In der LSO wurden IR-Signale hauptsächlich im Neuropil detektiert (Abb. 29, linkes Inset), nur vereinzelte Neurone zeigten auch eine Färbung innerhalb des Somas (Abb. 29H, rechtes Inset). Der MNTB zeigte neben IR-Signalen im Neuropil auch eine Färbung innerhalb der Somata (Abb. 29I, linkes Inset). SPN und MSO zeigten hauptsächlich eine Färbung des Neuropils, wobei auch hier einige Neurone IR-Signale im Bereich der Somata aufwiesen (Abb. 29J).

Im gesamten IC (Abb. 29K) wurde Immunreaktivität für NCKX2 sowohl im Neuropil als auch im Bereich der Somata detektiert. Dabei wurde innerhalb der Somata die stärkste Immunreaktivität im Bereich der Plasmamembran detektiert (Abb. 29L, Inset). Die Färbung bildete v.a. im Neuropil ein punktförmiges Muster (gestrichelter Pfeil).

Somit zeigte NCKX2 bei P4 eine starke Expression im Neuropil, v.a. in VCN und LSO. DCN und MNTB wiesen zusätzlich noch eine weit verbreitete Färbung innerhalb der Somata auf. Eine tonotopie Verteilung der IR wurde für keinen der Kerne gezeigt.

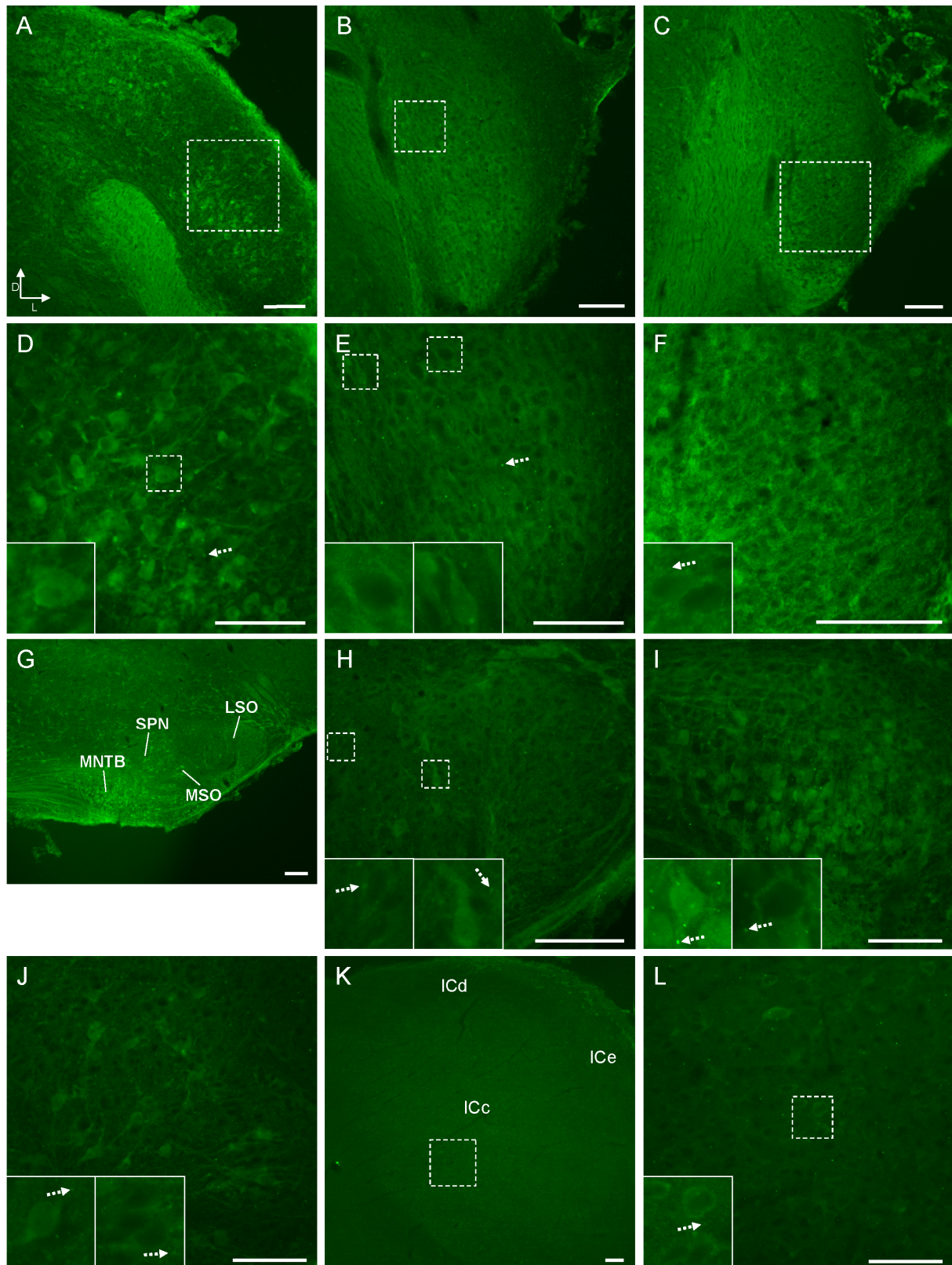


Abb. 29: Immunhistochemischer Nachweis von NCKX2 bei P4

Übersichten (A) sowie Ausschnitte in höherer Vergrößerung (D) zeigten im DCN eine Färbung innerhalb der Somata sowie im Neuropil. PVCN (B, E) und AVCN (C, F) zeigten IR-Signale hauptsächlich im Neuropil. LSO (H), SPN und MSO (J) zeigten eine Färbung vorwiegend des Neuropils, während im MNTB auch zahlreiche Somata gefärbt wurden. Im gesamten IC wurden IR-Signale im Neuropil sowie im Bereich der Plasmamembran der Somata detektiert (K, L).

4.2.8.1 Bestimmung des mittleren Soma-Durchmessers

Auch für NCKX2-positive Neurone im DCN bei P4 wurde der mittlere Soma-Durchmesser nach Kane *et al.* (1981) bestimmt. Dieser betrug durchschnittlich 17,2 μm , die Standardabweichung lag bei 2,1 μm (Tab. 10). Bei den untersuchten NCX2-positiven Neuronen im DCN handelt es sich demnach nicht um die von Kane *et al.* (1981) definierten Riesenneurone mit einem mittleren Durchmesser von mindestens 22 μm . Dieser Neuronentyp exprimiert demnach bei P60 kein NCKX2.

Tab. 10: Bestimmung des mittleren Durchmessers NCKX2-positiver Neurone im DCN bei P4

Soma-Breite [μm]	Soma-Länge [μm]	mittlerer Somadurchmesser nach Kane <i>et al.</i> (1981) [μm]
16,45	18,38	17,4
18,38	19,67	19,0
14,51	20,32	17,4
14,83	19,35	17,1
17,41	19,35	18,4
14,84	15,16	15,0
12,58	17,74	15,2
14,19	17,09	15,6
12,9	13,87	13,4
12,58	13,87	13,2
12,26	14,51	13,4
11,93	19,03	15,5
15,48	14,19	14,8
15,48	16,12	15,8
14,19	21,93	18,1
14,83	19,35	17,1
17,41	24,51	21,0
14,83	23,22	19,0
14,19	15,48	14,8
15,16	19,03	17,1
15,16	18,06	16,6

Soma-Breite [μm]	Soma-Länge [μm]	mittlerer Somadurchmesser nach Kane <i>et al.</i> (1981) [μm]
15,48	19,67	17,6
18,38	21,61	20,0
15,8	18,38	17,1
15,16	18,38	16,8
17,74	19,67	18,7
14,84	17,09	16,0
18,06	19,35	18,7
14,84	24,51	19,7
15,48	16,77	16,1
14,19	19,67	16,9
18,06	18,7	18,4
25	18,7	21,9
14,83	15,48	15,2
19,99	22,57	21,3
16,77	18,06	17,4
16,12	18,7	17,4
23,22	14,19	18,7
16,45	18,38	17,4
		Mittelwert: 17,2
		SD: 2,1

4.2.9 Immunhistochemischer Nachweis von NCKX2 bei P60

Bei P60 zeigte NCKX2 im DCN IR-Signale vorwiegend im Neuropil (Abb. 30A, D). Diese Färbung wies ein punktiertes Muster auf, wobei die Punkta auch um die Somata der Neurone herum angeordnet waren (Abb. 30D, Inset, gestrichelter Pfeil). Auch in PVCN (Abb. 30B, E) und AVCN (Abb. 30C, F) wurde eine Färbung vorwiegend im Neuropil detektiert. Auch hier bildeten die IR-Signale Punkta, welche um die Somata angeordnet waren (Insets).

Der SOC zeigte NCKX2-Immunreaktivität in allen Kernen (Abb. 30G). Dabei zeigten alle Kerne die stärksten IR-Signale im Bereich der Somata (Abb. 30H-J). Im MNTB waren punktförmige Muster der Färbung erkennbar (gestrichelter Pfeil).

Im IC wurden NCKX2-positive Somata im ICd und ICe detektiert (Abb. 30K), während der zentrale *Nucleus* hauptsächlich schwach gefärbtes Neuropil mit vereinzelt schwach gefärbten Somata zeigte (Abb. 30L, Inset).

Somit wurde NCKX2 bei P60 im gesamten CN hauptsächlich im Neuropil detektiert, wobei die IR-Signale Punkta um die Somata bildeten. Die Kerne des SOC wiesen dagegen die stärkste Färbung innerhalb der Somata auf, während der ICc nur eine sehr schwache Färbung, hauptsächlich im Neuropil, zeigte. Vergleicht man nun die Lokalisation von NCKX2 bei P4 und P60, so zeigt sich im DCN eine Umverteilung von einer starken Färbung der Somata hin zu einer vorwiegenden Färbung des Neuropils. Der VCN zeigte dagegen in beiden Entwicklungsstadien eine vorwiegende Lokalisation von NCKX2 im Neuropil. In LSO, SPN und MSO wurden bei P60 deutlich mehr Neurone detektiert, die Immunreaktivität innerhalb ihrer Somata aufwiesen. NCKX2 zeigten kein tonotopes Verteilungsmuster innerhalb der untersuchten Strukturen.

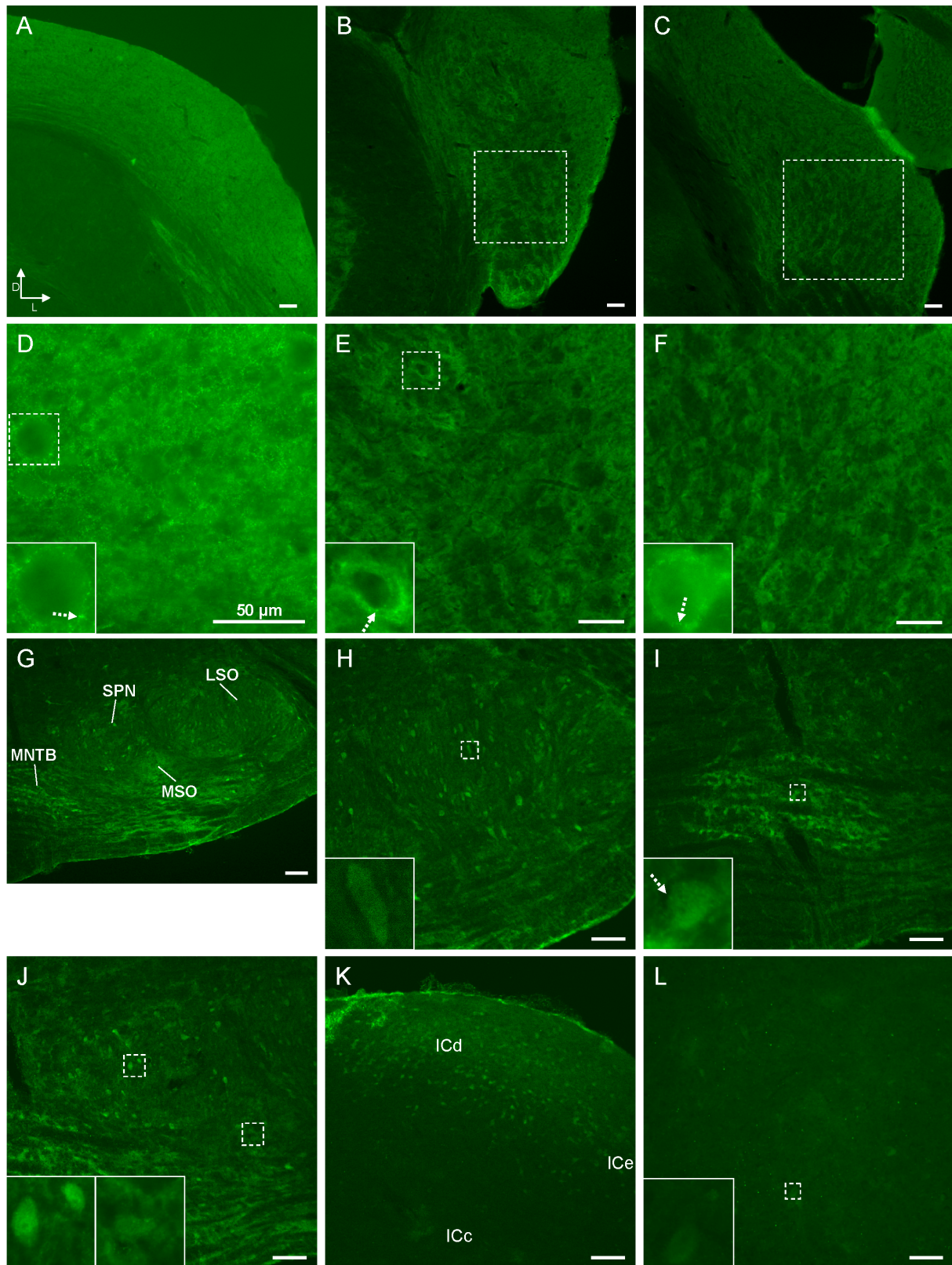


Abb. 30: Immunhistochemischer Nachweis von NCKX2 bei P60

Übersichten sowie Ausschnitte in höherer Vergrößerung von DCN (A, D), PVCN (B, E) und AVCN (C, F) zeigten eine Färbung hauptsächlich im Neuropil. In allen *Nuclei* des SOC (G), d.h. in LSO (H), MNTB (I), SPN und MSO (J), wurden IR-Signale vorwiegend innerhalb der Somata detektiert. ICd und ICe zeigten gefärbte Somata (K), während im ICc (L) hauptsächlich Neuropil gefärbt wurde.

4.2.10 Zusammenfassung des immunhistochemischen Nachweises von NCX1-3 und NCKX2

Zusammenfassend ist zu sagen, dass NCX1-3 sowie NCKX2 in sämtlichen untersuchten auditorischen Hirnstammstrukturen beider Entwicklungsstadien immunreaktive Signale zeigten. Dabei kam es zu einer besonders auffallenden Umverteilung der Lokalisation der Transporter im Laufe der Entwicklung. So zeigte NCX1 in allen Strukturen mit Ausnahme des IC eine bei P60 stärkere Expression innerhalb der Somata, während die Färbung bei P4 hauptsächlich auf das Neuropil beschränkt war. Auch bei NCX2 zeigte sich diese Entwicklung. Hier bildete der DCN die Ausnahme, welcher schon bei P4 starke Immunreaktivität innerhalb der Somata zeigte. Auch für NCX3 zeigten alle Strukturen im Laufe der Entwicklung eine zunehmende Expression innerhalb der Somata. NCKX2 wurde bei P4 ebenfalls hauptsächlich im Neuropil detektiert, Ausnahmen bildeten hier der DCN und der MNTB, welche auch bei P4 schon eine starke Färbung der Somata aufwiesen. Im Gegensatz zu den NCX-Isoformen wurde NCKX2 bei P60 jedoch im gesamten CN hauptsächlich im Neuropil detektiert. Der SOC zeigte, wie schon für die NCX-Isoformen, eine zunehmende Expression von NCKX2 innerhalb der Somata. Auch ICd und ICe zeigten eine Zunahme der NCKX2-IR innerhalb der Somata, wogegen der ICc nur eine schwache Färbung hauptsächlich im Neuropil zeigte. Eine Zusammenfassung der IHC in tabellarischer Form ist in Tab. 11-14 dargestellt.

Die IR-Signale für NCX1-3 und NCKX2 wurden stets über die gesamten Teilkerngebiete detektiert, es konnte kein tonotopes Verteilungsmuster detektiert werden. Die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher werden demnach nicht nur in bestimmten, frequenzspezifischen Arealen exprimiert.

Tab. 11: Zusammenfassung der NCX1-IR

Gewebe	NCX1-IR bei P4	NCX1-IR bei P60
DCN	Neuropil ++ Somata +	Neuropil + Somata ++
posteriorer PVCN	Neuropil ++ Somata ++	Neuropil + Somata ++
anteriorer PVCN	Neuropil ++ Somata +	Neuropil + Somata ++
AVCN	Neuropil ++ Somata +	Neuropil + Somata ++
LSO	Neuropil ++ Somata +	Neuropil + Somata ++
MNTB	Neuropil ++ Somata ++	Neuropil + Somata ++
MSO	Neuropil ++ Somata +	Neuropil + Somata ++
SPN	Neuropil ++ Somata +	Neuropil + Somata ++
ICc	Neuropil ++ Somata +	Neuropil ++ Somata +
ICd	Neuropil + Somata ++	Neuropil + Somata ++
ICe	Neuropil + Somata ++	Neuropil + Somata ++

+ = moderate Lokalisation der IR; ++ = starke Lokalisation der IR; die Unterschiede wurden rein subjektiv bestimmt

Tab. 12: Zusammenfassung der NCX2-IR

Gewebe	NCX2-IR bei P4	NCX2-IR bei P60
DCN	Neuropil ++ Somata ++	Neuropil + Somata ++
PVCN	Neuropil ++ Somata +	Neuropil + Somata ++
AVCN	Neuropil ++ Somata +	Neuropil + Somata ++
LSO	Neuropil ++ Somata +	Neuropil + Somata ++
MNTB	Neuropil ++ Somata +	Neuropil + Somata ++
MSO	Neuropil ++ Somata +	Neuropil + Somata ++
SPN	Neuropil ++ Somata +	Neuropil + Somata ++
ICc	Neuropil + Somata +	Neuropil ++ Somata ++
ICd	Neuropil ++ Somata +	Neuropil ++ Somata ++
ICe	Neuropil ++ Somata +	Neuropil ++ Somata ++

+ = moderate Lokalisation der IR; ++ = starke Lokalisation der IR; die Unterschiede wurden rein subjektiv bestimmt

Tab. 13: Zusammenfassung der NCX3-IR

Gewebe	NCX3-IR bei P4	NCX3-IR bei P60
DCN	Neuropil ++ Somata ++	Neuropil + Somata ++
PVCN	Neuropil ++ Somata +	Neuropil + Somata ++
AVCN	Neuropil ++ Somata +	Neuropil + Somata ++
LSO	Neuropil ++ Somata +	Neuropil + Somata ++
MNTB	Neuropil ++ Somata ++	Neuropil + Somata ++
MSO	Neuropil ++ Somata ++	Neuropil + Somata ++
SPN	Neuropil ++ Somata ++	Neuropil + Somata ++
ICc	Neuropil ++ Somata +	Neuropil + Somata +
ICd	Neuropil ++ Somata +	Neuropil + Somata +
ICe	Neuropil ++ Somata +	Neuropil + Somata +

+ = moderate Lokalisation der IR; ++ = starke Lokalisation der IR; die Unterschiede wurden rein subjektiv bestimmt

Tab. 14: Zusammenfassung der NCKX2-IR

Gewebe	NCKX2-IR bei P4	NCKX2-IR bei P60
DCN	Neuropil ++ Somata ++	Neuropil ++ Somata +
PVCN	Neuropil ++ Somata +	Neuropil ++ Somata +
AVCN	Neuropil ++ Somata +	Neuropil ++ Somata +
LSO	Neuropil ++ Somata +	Neuropil + Somata ++
MNTB	Neuropil ++ Somata ++	Neuropil + Somata ++
MSO	Neuropil ++ Somata +	Neuropil + Somata ++
SPN	Neuropil ++ Somata +	Neuropil + Somata ++
ICc	Neuropil ++ Somata ++	Neuropil + Somata (+)
ICd	Neuropil ++ Somata ++	Neuropil + Somata ++
ICe	Neuropil ++ Somata ++	Neuropil + Somata ++

(+) kaum IR; + = moderate Lokalisation der IR; ++ = starke Lokalisation der IR; die Unterschiede wurden rein subjektiv bestimmt

4.3 Untersuchung der Expression von *ncx1-3* sowie *nckx2-6* auf mRNA- Ebene

Da zum Zeitpunkt der Untersuchungen keine Antikörper gegen NCKX3-6 erhältlich waren, wurde deren Expression ausschließlich auf mRNA-Ebene untersucht. Die Untersuchung der Genexpression aller Isoformen erfolgte sowohl qualitativ über RT-PCR wie auch quantitativ mittels qRT-PCR. Zu diesem Zweck wurde zunächst die gesamte RNA aus den zu untersuchenden Geweben isoliert.

4.3.1 RNA Isolierung

Die isolierte RNA (siehe 3.9) wurde zunächst mit Hilfe eines Agilent 2100 Bioanalyzers auf mögliche Degradationen sowie Verunreinigungen untersucht. Zur nachfolgenden reversen Transkription wurde ausschließlich RNA verwendet, deren 28S zu 18S rRNA-Peak-Verhältnis mindestens 1,3 betrug und welche die weiteren unter 3.9.1 beschriebenen Qualitätsmerkmale erfüllte. Insgesamt lagen die Werte der RNA-Proben zwischen 1,3 und 2,0 (Tab. 15), wobei sich nur drei Proben nahe der unteren Qualitätsgrenze befanden (P4 CN 1, P4 SOC 3 und P60 CN 3). Alle in Tab. 15 aufgeführten RNA-Proben wurden für die qRT-PCR bzw. RT-PCR (*Cerebellum*, Herz und Leber) verwendet.

Tab. 15: Verhältnis des 28S rRNA-Peaks zum 18S rRNA-Peak in den RNA-Proben

Gewebe	Verhältnis 28S rRNA zu 18S rRNA
P4 CN Replikat 1	1,33
P4 CN Replikat 2	1,80
P4 CN Replikat 3	1,52
P4 SOC Replikat 1	1,43
P4 SOC Replikat 2	1,48
P4 SOC Replikat 3	1,30
P4 IC Replikat 1	1,50
P4 IC Replikat 2	1,50
P4 IC Replikat 3	1,80
P60 CN Replikat 1	1,57
P60 CN Replikat 2	1,50
P60 CN Replikat 3	1,35
P60 SOC Replikat 1	1,61
P60 SOC Replikat 2	1,62
P60 SOC Replikat 3	1,51
P60 IC Replikat 1	1,70
P60 IC Replikat 2	1,46
P60 IC Replikat 3	1,77
P4 <i>Cerebellum</i>	1,69
P4 Herz	1,61
P4 Leber	1,83
P60 <i>Cerebellum</i>	2,00
P60 Herz	1,89
P60 Leber	1,40

4.3.2 Untersuchung der Genexpression mittels PCR

Um die Genexpression der *ncx*- und *nckx*-Isoformen in CN, SOC und IC zu untersuchen, wurde auf die zuvor generierten, gewebespezifischen cDNA-Pools eine genspezifische PCR durchgeführt (Abb. 31). *Cerebellum* (Cereb), Herz und Leber dienten als Kontrollgewebe, da die Expression der Austauschere in diesen Geweben bereits in der Literatur (Lee *et al.*, 1994; Nicoll *et al.*, 1996b; Tsoi *et al.*, 1998; Kraev *et al.*, 2001; Lytton *et al.*, 2002; Cai und Lytton, 2004a; Lamason *et al.*, 2005) beschrieben wurde (siehe auch 3.11).

4.3.2.1 *ncx1*

Die Transkription von *ncx1* wurde in allen untersuchten Geweben nachgewiesen (Abb. 31A). Die detektierte Bande (Pfeil) entspricht der erwarteten PCR-Produktgröße von 504 bp (Tab. 3). In *Cerebellum*, Herz und Hirnstamm wurde eine Expression von *ncx1* bereits mittels Northern Blot gezeigt (Lee *et al.*, 1994; Lytton *et al.*, 2002). Lebergewebe zeigte dagegen in Northern Blots nur eine sehr schwache (Lee *et al.*, 1994; Lytton *et al.*, 2002) bzw. keine (Nicoll *et al.*, 1996b) Expression von *ncx1*.

4.3.2.2 *ncx2*

Mit den in Tab. 3 dargestellten Primern für *ncx2*, welche eine gute Effizienz für die qRT-PCR zeigten, war eine PCR unter in den 3.11 beschriebenen Bedingungen nicht durchführbar. Nach der Gelelektrophorese waren keine klaren Produktbanden erkennbar. Auch eine Reduktion der Temperatur zur Primeranlagerung von 60 °C auf 56 °C, ein Verzicht auf MgCl₂ im Reaktionsansatz sowie eine Erhöhung der Zyklenzahl auf 45 führte zu keiner Verbesserung. Um die Genexpression mittels PCR zeigen zu können, wurden weitere Primerpaare für *ncx2* getestet (Tab. 4), jedoch ebenfalls ohne Erfolg. Die Genexpression von *ncx2* in CN, SOC und IC konnte jedoch mit den in Tab. 3 beschriebenen Primern mittels qRT-PCR gezeigt werden (4.3.3).

4.3.2.3 *ncx3*

Die Genexpression von *ncx3* konnte ebenfalls in allen untersuchten Geweben gezeigt werden (Abb. 31B; 339 bp). In Herz und Leber wurden im Vergleich zu den Gehirngeweben nur

schwache Banden detektiert. Wie zuvor bereits erwähnt konnten Nicoll *et al.* (1996b) im Northern Blot keine Transkription von *ncx3* in Herz und Leber nachweisen, lediglich Skelettmuskel und Gehirn wiesen eine starke Genexpression auf. Weitere Strukturen innerhalb des Gehirns wurden in deren Arbeit nicht unterschieden.

4.3.2.4 *nckx2*

nckx2-Transkripte wurden in allen untersuchten Gehirngeweben sowie als schwache Banden in P4 Herz und P60 Leber detektiert (Abb. 31C; 535 bp). Auch Tsoi *et al.* (1998) sowie Lytton *et al.* (2002) wiesen die Expression von *nckx2* mittels Northern-Blot und *in situ* Hybridisierung (Lytton *et al.*, 2002) bereits in *Cerebellum* und Hirnstamm nach, während Herzgewebe im Northern Blot nur eine schwache Transkription zeigte und in Lebergewebe keine Banden detektiert wurden.

4.3.2.5 *nckx3*

Die Genexpression von *nckx3* (470 bp) wurde in allen Geweben nachgewiesen, wobei die Leber schwächere Banden zeigte (Abb. 31D). Zusätzliche Banden oberhalb von 672 bp waren in den Gehirngeweben mit Ausnahme von P60 CN und P60 *Cerebellum* zu erkennen (Pfeilspitze), weitere Banden von ca. 500 bp in P60 CN, SOC, IC sowie P4 *Cerebellum* (gestrichelter Pfeil). Auch Kraev *et al.* (2001) wiesen bereits mittels Northern Blot sowie *in situ* Hybridisierung eine Genexpression von *nckx3* in *Cerebellum* und Hirnstamm nach. Leber und Herz dagegen zeigten im Northern Blot nur schwache Banden.

4.3.2.6 *nckx4*

Die Transkription von *nckx4* (222 bp) wurde in sämtlichen untersuchten Geweben detektiert (Abb. 31E), eine zusätzliche Bande zeigte sich in den Gehirngeweben bei P60 sowie in Herz und Leber bei P4 (Pfeilspitze). Auch Li *et al.* (2002) wiesen mittels Northern Blot und *in situ* Hybridisierung *nckx4*-Transkripte in Hirnstamm und *Cerebellum* nach. Herzgewebe zeigte im Northern Blot schwache Banden, während in der Leber keine Transkription detektiert wurde.

4.3.2.7 *nckx5*

Die Genexpression von *nckx5* (162 bp) wurde ebenfalls in allen analysierten Geweben gezeigt (Abb. 31F). Neben den erwarteten Banden waren zusätzliche Banden in Herz und Leber bei P4 zu erkennen (Pfeilspitze).

Die Transkription von *nckx5* wurde bereits mittels qRT-PCR im Gesamthirn sowie im Herz von Mäusen nachgewiesen (Lamason *et al.*, 2005).

4.3.2.8 *nckx6*

Auch die Transkripte von *nckx6* (299 bp) wurden in sämtlichen Geweben nachgewiesen, wobei sich im *Cerebellum* nur schwache Banden zeigten (Abb. 31G). Zusätzliche Banden wurden in den auditorischen Hirnstammgeweben mit Ausnahme von P60 CN sowie in P4 Leber detektiert (Pfeilspitze). Die Genexpression von *nckx6* wurde bereits von Cai und Lytton (2004a) mittels Northern Blot in *Cerebellum*, Hirnstamm und Herz nachgewiesen, die Transkription in der Leber wurde bisher noch nicht untersucht.

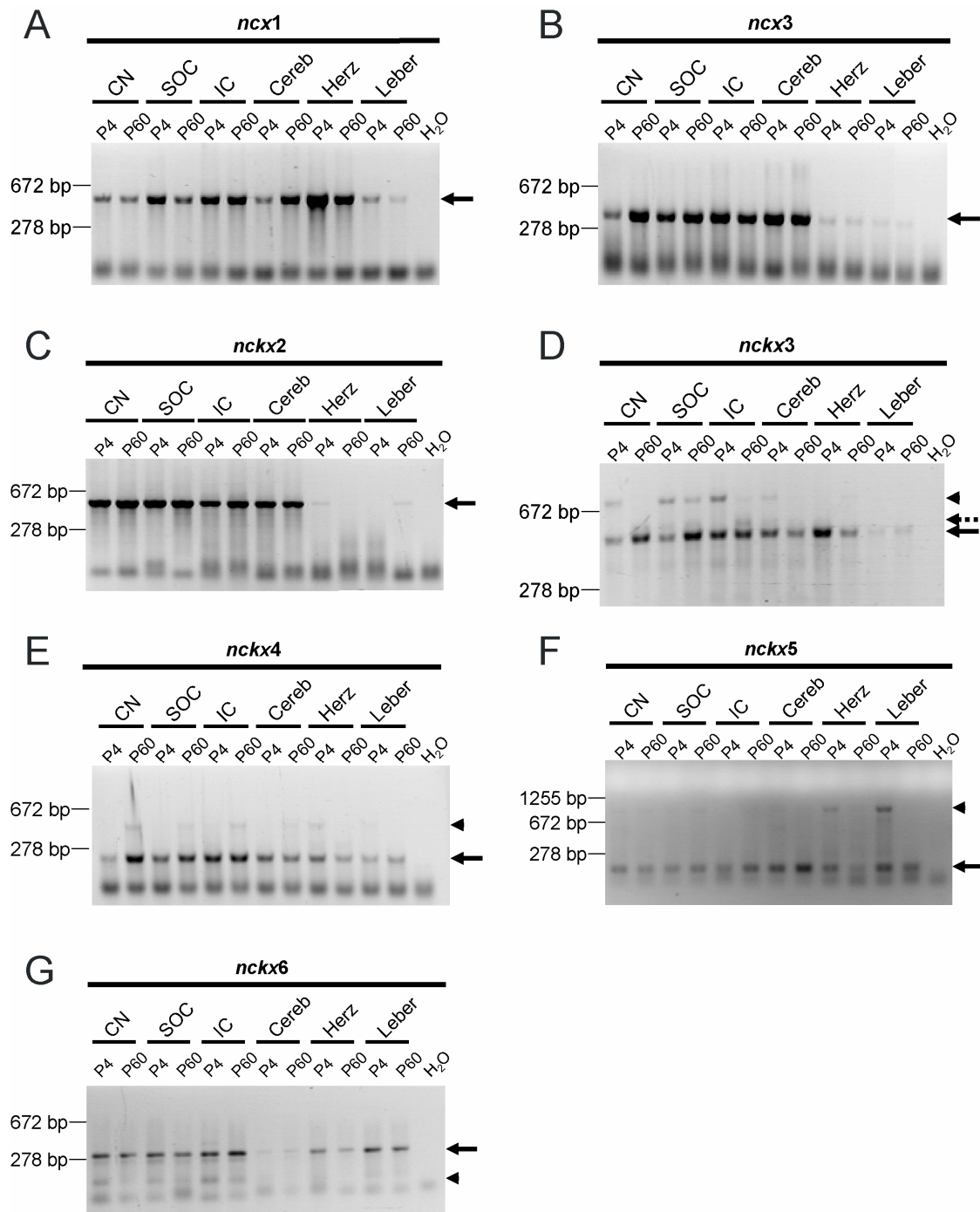


Abb. 31: Genexpressionsanalyse von *ncx1*, *ncx3* und *nckx2-6* mittels RT-PCR

Gewebespezifische cDNA-Pools wurden auf die Transkription der *ncx*- und *nckx*-Isoformen (Pfeile) untersucht. (A) *ncx1*-Transkripte wurden in allen analysierten Geweben nachgewiesen. (B) Alle untersuchten Gewebe zeigten eine Genexpression von *ncx3*, während *nckx2*-Transkripte (C) nur in den untersuchten Gehirngeweben detektiert wurden. (D) *nckx3*-Transkripte wurden in allen untersuchten Geweben nachgewiesen. Die Gehirngewebe mit Ausnahme von P60 CN und P60 *Cerebellum* zeigten zusätzliche Banden oberhalb von 672 bp (Pfeilspitze), eine weitere Bande bei ca. 500 bp wurde in P60 CN, SOC und IC sowie in P4 *Cerebellum* detektiert (gestrichelter Pfeil). (E) *nckx4*-Transkripte wurden in allen untersuchten Geweben detektiert. Die P60 Gehirngewebe sowie P4 Herz und P4 Leber zeigten eine zusätzliche Bande (Pfeilspitze). *nckx5* (F) und *nckx6* (G) wurden in allen untersuchten Geweben detektiert. *nckx5* zeigte zusätzliche Banden in P4 Herz und Leber, *nckx6* in P4 Leber sowie in den auditorischen Gehirngeweben mit Ausnahme von P60 CN (Pfeilspitzen).

4.3.3 Quantitative real-time PCR

Nachdem die Genexpression der *ncx*- und *nckx*-Isoformen qualitativ mittels RT-PCR in allen untersuchten Kernen nachgewiesen wurde, sollte die differenzielle Regulation der Genexpression quantitativ mittels qRT-PCR analysiert werden. Dabei wurden die relativen Unterschiede in der Genexpression zwischen den beiden Altersstufen P4 und P60 untersucht (Abb. 32) sowie die einzelnen Hörbahnkerne innerhalb einer Altersstufe miteinander verglichen (Abb. 33 und Abb. 34).

4.3.3.1 qRT-PCR für *gapdh* als Haushaltsgen

Zunächst wurde *gapdh* in einem qRT-PCR-Lauf auf seine Eignung als Haushaltsgen überprüft. Tab. 16 zeigt, dass die Zyklusanzahl, nach der die Amplifikationskurve von *gapdh* den von der MyiQ-Software ermittelten Schwellenwert (Ct) erreichte, für alle untersuchten Gewebe und Altersstadien zwischen 15,71 und 16,29 lag. Durchschnittlich wurde der Schwellenwert nach 15,91 Zyklen erreicht, die unterschiedlichen Gewebeproben zeigten eine Standardabweichung von nur 0,15. Somit wurde *gapdh* zwischen den untersuchten Geweben und Altersstadien konstant exprimiert und eignete sich daher als sehr gut Haushaltsgen für die durchgeführten Experimente. Neben *gapdh* wurden auch Tubulin α -1B (*tuba1B*), Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (*hprt*), Elongationsfaktor 2 (*ef2*), γ -Actin und Peptidyl-Prolyl-Isomerase A (*ppiA*), welche ebenfalls als Haushaltsgene bekannt sind, auf ihre Expression in den auditorischen Hirnstammkernen untersucht. Diese Gene zeigten eine deutliche Regulation zwischen den untersuchten Geweben und eigneten sich daher für meine Experimente nicht als Haushaltsgene (SD der Ct-Werte der untersuchten Gewebe für *tuba1B*: 1,25; *hprt*: 0,46; *ef2*: 0,83; γ -Actin: 0,98; *ppiA*: 0,52).

Tab. 16: qRT-PCR für *gapdh*

Gewebe	Ct	Gewebe	Ct
P4 CN Replikat 1	15,71	P60 CN Replikat 1	15,78
P4 CN Replikat 2	15,89	P60 CN Replikat 2	15,92
P4 CN Replikat 3	15,97	P60 CN Replikat 3	15,84
P4 SOC Replikat1	15,85	P60 SOC Replikat1	16,08
P4 SOC Replikat2	15,84	P60 SOC Replikat2	16,15
P4 SOC Replikat3	15,96	P60 SOC Replikat3	16,29
P4 IC Replikat 1	15,95	P60 IC Replikat 1	15,78
P4 IC Replikat 2	15,73	P60 IC Replikat 2	15,87
P4 IC Replikat 3	15,96	P60 IC Replikat 3	15,88
Mittelwert: 15,91			
SD: 0,15			

Dargestellt sind die Schnittpunkte der Amplifikationskurven von *gapdh* mit dem von der Software ermittelten Schwellenwert (Ct) für die verschiedenen auditorischen Hirnstammgewebe und Altersstadien.

4.3.3.2 Relative differenzielle Regulation der *ncx-/nckx*-Genexpression in auditorischen Kernen zwischen P4 und P60

Die differenzielle Regulation der *ncx-/nckx*-Genexpression im Laufe der Entwicklung ist grafisch in Abb. 32 dargestellt, die zugehörigen Werte werden in Tab. 17 aufgeführt. Im CN (Abb. 32A) zeigte sich eine Zunahme der Genexpression von P4 zu P60 für alle *ncx*-Isoformen sowie für *nckx5*. Die Regulationsfaktoren lagen hierbei für *ncx1* und *ncx2* bei 1,4, für *ncx3* bei 1,6 und für *nckx5* bei 2,0 (Tab. 17). *nckx2*, *nckx4* und *nckx6* zeigten dagegen im Vergleich von P4 zu P60 eine verminderte Genexpression um einen Faktor von 9,5, 6,3 bzw. 3,1. Die mit Abstand höchsten Regulationsfaktoren innerhalb der Entwicklung des CN zeigten somit *nckx2* und *nckx4*.

Im SOC (Abb. 32B) wurde eine Erhöhung der Genexpression von P4 zu P60 für *ncx1* um den Faktor 2,9 und für *ncx2* um den Faktor 4,9 detektiert. Die anderen untersuchten Isoformen zeigten eine verminderte Transkription bei P60. Bei *ncx3* wurde die Expression 1,1fach reduziert, *nckx2* zeigte eine Reduktion um den Faktor 2,8. Die Expression von *nckx4* wurde von P4 nach P60 um den Faktor 5,1 reduziert, während *nckx5* und *nckx6* um das 1,3fache

bzw. 3,9fache vermindert exprimiert wurden. Damit zeigten *ncx2* und *nckx4* während der Entwicklung des SOC die stärkste differenzielle Regulation.

Im IC (Abb. 32C) zeigten *ncx1*, *ncx2* sowie *nckx5* eine um den Faktor 3,6, 2,5 bzw. 10,9 erhöhte Genexpression bei P60 im Vergleich zu P4, während die Genexpression von *nckx2* und *nckx6* bei P60 um das 3,1fache bzw. 3,3fache vermindert war. *ncx3* und *nckx4* zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression. Demnach zeigte *nckx5* in der Entwicklung des IC die mit Abstand höchste differenzielle Regulation.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Genexpression der untersuchten *ncx*- und *nckx*-Isoformen während der Entwicklung der analysierten auditorischen Hirnstammregionen in neunzehn von einundzwanzig Fällen differenziell reguliert wurde (Ausnahmen waren *ncx3* und *nckx4* im IC). Die Regulationsfaktoren lagen je nach Isoform und Gewebe zwischen -1,1 (*ncx3* im SOC) und 10,9 (*nckx5* im IC).

In sieben von neun Fällen wurde die Genexpression der *ncx*-Isoformen im Laufe der Entwicklung erhöht, während sie für die *nckx*-Isoformen in neun von zwölf Fällen abnahm. Dabei zeigte keine der Isoformen ein zeitlich begrenztes Expressionsmuster.

Tab. 17: Relative Regulationsfaktoren der *ncx*-/*nckx*-Genexpression zwischen P4 und P60

Gen	Relative Regulationsfaktoren von P4 zu P60								
	CN			SOC			IC		
	Faktor	SEM	P	Faktor	SEM	P	Faktor	SEM	P
<i>ncx1</i>	1,4	0,06	0,013	2,9	0,55	$2,91 \cdot 10^{-17}$	3,6	0,83	$1,14 \cdot 10^{-8}$
<i>ncx2</i>	1,4	0,3	0,010	4,9	0,86	$1,12 \cdot 10^{-22}$	2,5	0,41	$2,58 \cdot 10^{-14}$
<i>ncx3</i>	1,6	0,95	$5,30 \cdot 10^{-4}$	-1,1	0,22	0,002	-1,0	0,12	0,555
<i>nckx2</i>	-9,5	0,45	$3,04 \cdot 10^{-26}$	-2,8	0,49	$4,00 \cdot 10^{-15}$	-3,1	2,3	0,001
<i>nckx4</i>	-6,3	2,58	$4,66 \cdot 10^{-20}$	-5,1	0,79	$4,82 \cdot 10^{-21}$	-1,4	0,37	0,085
<i>nckx5</i>	2,0	0,32	$1,11 \cdot 10^{-15}$	-1,3	0,26	0,009	10,9	7,95	$1,05 \cdot 10^{-9}$
<i>nckx6</i>	-3,1	0,62	$1,18 \cdot 10^{-5}$	-3,9	0,4	$1,05 \cdot 10^{-9}$	-3,3	0,97	$1,92 \cdot 10^{-13}$

Aufgeführt werden die in Abb. 32 graphisch dargestellten relativen differenziellen Regulationsfaktoren mit zugehörigem SEM; positive Regulationsfaktoren = P60 > P4; negative Regulationsfaktoren = P60 < P4; P = Irrtumswahrscheinlichkeit laut Student's t-Test

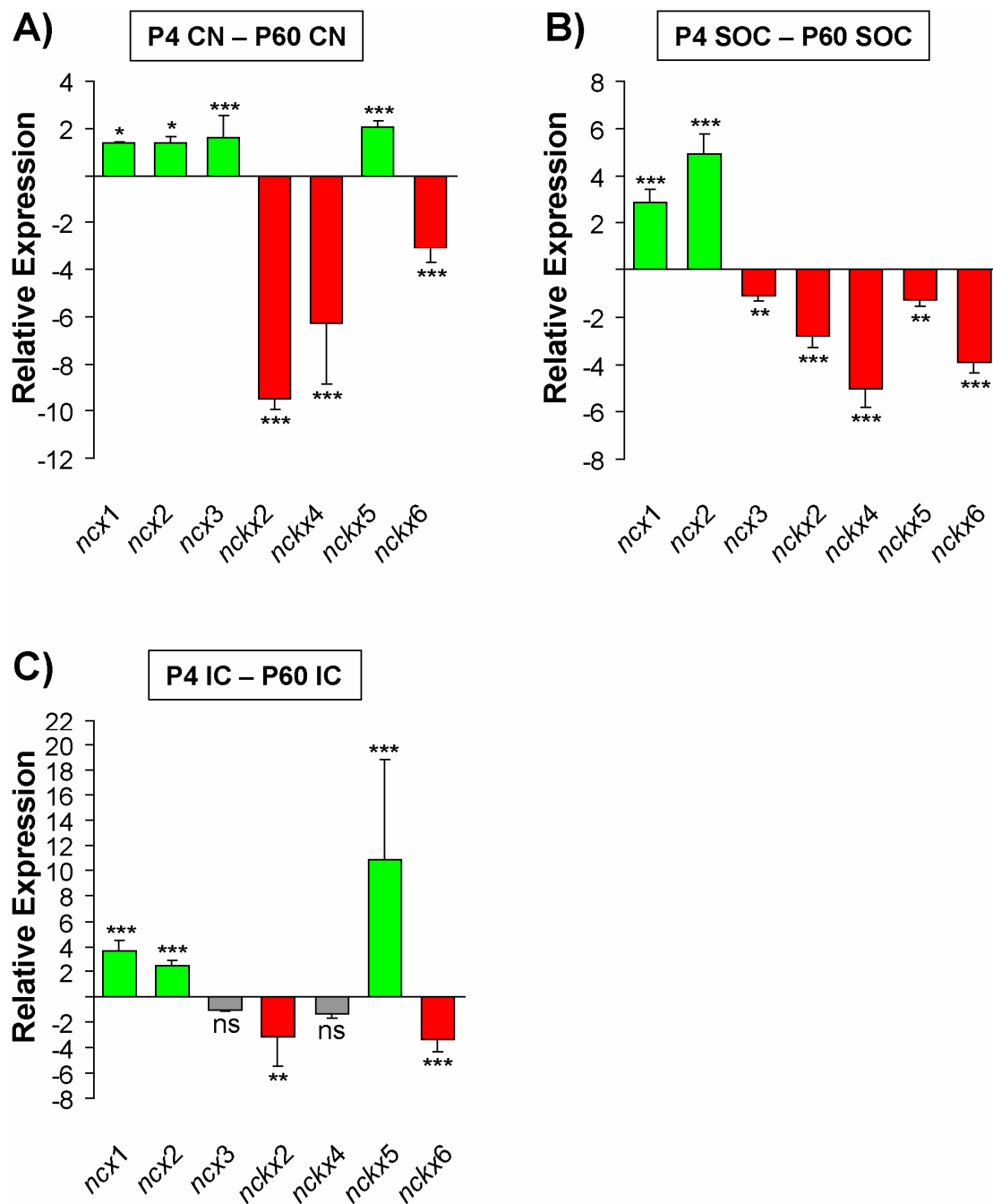


Abb. 32: Relative differenzielle Regulation der *ncx*-/*nckx*-Genexpression in auditorischen Kernen zwischen P4 und P60

Mittels qRT-PCR wurde die relative Transkription der *ncx*-/*nckx*-Isoformen im Laufe der Entwicklung von P4 zu P60 untersucht. Die angegebenen Regulationsfaktoren sind mit SEM dargestellt. Positive Regulationsfaktoren = P60 > P4; negative Regulationsfaktoren = P60 < P4; * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,001; ns = nicht signifikant im Student's t-Test; (A) Relative Genexpression im CN. *ncx1-3* sowie *nckx5* zeigten eine erhöhte Genexpression (grüne Balken) von P4 zu P60, während die Genexpression von *nckx2*, *nckx4* und *nckx6* bei P60 vermindert war (rote Balken). (B) Im SOC wurde für *ncx1* und *ncx2* bei P60 eine im Vergleich zu P4 erhöhte Genexpression detektiert, während die anderen untersuchten Isoformen eine verminderte Expression zeigten. (C) Im IC nahm die Genexpression von *ncx1*, *ncx2* und *nckx5* von P4 nach P60 zu, während sie für *nckx2* und *nckx6* reduziert wurde. Für *ncx3* und *nckx4* wurden keine signifikanten Unterschiede in der Transkription detektiert.

4.3.3.3 Relative differenzielle Regulation der *ncx*-/*nckx*-Genexpression bei P4

In Abb. 33 bzw. Tab. 18 ist die relative Expression der Isoformen im Alter von P4 in den auditorischen Hirnstammkernen dargestellt. Bei einem Vergleich von CN und SOC in diesem Alter (Abb. 33A) zeigten *ncx1-3* sowie *nckx2* eine im SOC verminderte Genexpression, während die Expression von *nckx5* und *nckx6* im SOC gegenüber dem CN erhöht war. *nckx4* zeigte keine signifikanten Expressionsunterschiede. Die Regulationsfaktoren lagen zwischen 1,4 (*nckx6*) und -2,5 (*ncx1*).

Im Vergleich von CN und IC zeigten alle Isoformen mit Ausnahme von *nckx6* eine im IC verringerte Expression. *nckx6* zeigte keine signifikanten Expressionsunterschiede. Die mit einem Regulationsfaktor von -4,5 stärkste Regulation zeigte *nckx4*, die schwächste *ncx3* mit -1,5 (Abb. 33B, Tab. 18).

Verglichen mit dem SOC zeigten ebenfalls alle Isoformen außer *nckx6* eine verminderte Genexpression im IC. *nckx6* zeigte wiederum keine signifikanten Expressionsunterschiede. Mit einem Regulationsfaktor von -1,3 zeigte, wie schon im Vergleich von CN und IC, *ncx3* die geringste differenzielle Regulation, während *nckx4* mit -3,2 wiederum am stärksten differenziell reguliert wurde (Abb. 33C, Tab. 18).

Betrachtet man die einzelnen *ncx*-/*nckx*-Isoformen, so wurde für *ncx1-3* und *nckx2* die jeweils höchste Genexpression im CN detektiert (Abb. 33A, B), gefolgt von SOC und IC (Abb. 33C, Tab. 18). *nckx4* zeigte keine Expressionsunterschiede zwischen CN und SOC (Abb. 33A), jedoch ebenfalls die geringste Expression im IC (Abb. 33B, C). Für *nckx5* wurde die höchste Expression im SOC detektiert (Abb. 33A, C), gefolgt von CN und IC (Abb. 33B). *nckx6* zeigte eine höhere Expression im SOC verglichen mit dem CN (Abb. 33A), bei den Vergleichen von CN und IC bzw. SOC und IC wurden dagegen keine signifikanten Unterschiede detektiert (Abb. 33B, C; Tab. 18).

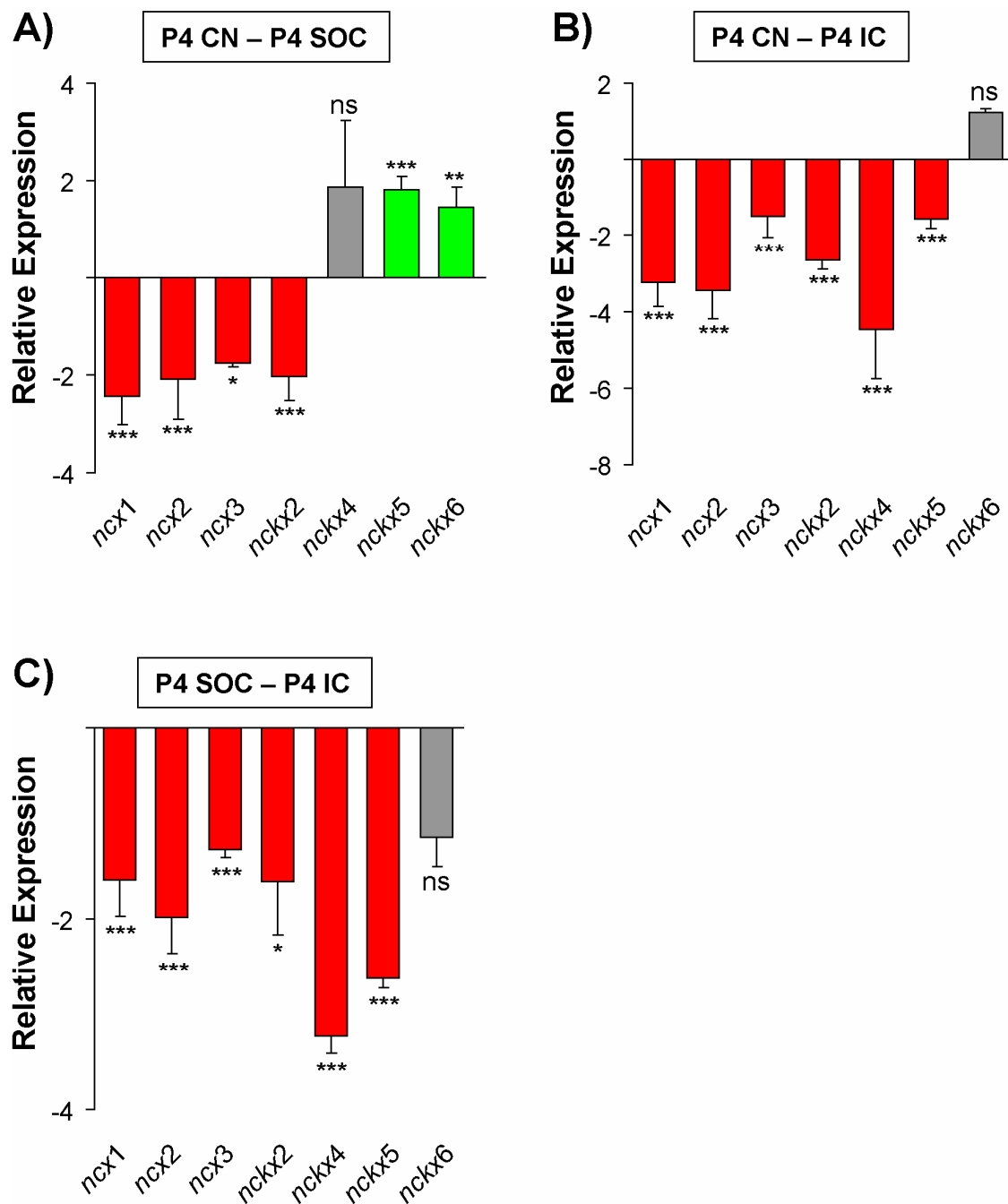


Abb. 33: Relative differenzielle Regulation der *ncx*-/*nckx*-Genexpression in auditorischen Kernen bei P4

Mittels qRT-PCR wurde die relative Transkription der *ncx*-/*nckx*-Isoformen zwischen den einzelnen auditorischen Hirnstammkernen bei P4 untersucht. Positive Regulationsfaktoren in (A) = SOC > CN, negative Regulationsfaktoren = SOC < CN; positive Regulationsfaktoren in (B) bzw. (C) = IC > CN bzw. IC > SOC, negative Regulationsfaktoren = IC < CN bzw. IC < SOC; die Regulationsfaktoren sind jeweils mit SEM dargestellt. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; ns = nicht signifikant im Student's t-Test; (A) Relative Genexpression im SOC verglichen mit dem CN. *ncx1-3* sowie *nckx2* zeigten eine geringere Genexpression im SOC, während die Expression von *nckx5* und *nckx6* im SOC erhöht war. *nckx4* zeigte keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den beiden Geweben. (B) Im IC zeigten alle untersuchten Isoformen mit Ausnahme von *nckx6* eine im Vergleich zum CN (B) bzw. SOC (C) verminderte Expression. Die Expression von *nckx6* wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweils untersuchten Geweben auf.

Tab. 18: Relative Regulationsfaktoren der *ncx*-/*nckx*-Genexpression in auditorischen Kernen bei P4

Gen	Relative Regulationsfaktoren bei P4								
	CN - SOC			CN - IC			SOC - IC		
	Faktor	SEM	P	Faktor	SEM	P	Faktor	SEM	P
<i>ncx1</i>	-2,5	-0,55	$1,48 \cdot 10^{-8}$	-3,2	-0,63	$8,87 \cdot 10^{-12}$	-1,6	-0,37	$1,18 \cdot 10^{-5}$
<i>ncx2</i>	-2,1	-0,83	$1,86 \cdot 10^{-5}$	-3,5	-0,73	$9,04 \cdot 10^{-14}$	-2,0	-0,38	$4,37 \cdot 10^{-10}$
<i>ncx3</i>	-1,8	-0,08	0,045	-1,5	-0,56	$2,06 \cdot 10^{-12}$	-1,3	-0,09	$2,13 \cdot 10^{-5}$
<i>nckx2</i>	-2,0	-0,47	$6,34 \cdot 10^{-6}$	-2,6	-0,24	$6,7 \cdot 10^{-8}$	-1,6	-0,56	0,011
<i>nckx4</i>	1,9	1,37	0,205	-4,5	-1,29	$9,21 \cdot 10^{-16}$	-3,2	-0,18	$9,62 \cdot 10^{-19}$
<i>nckx5</i>	1,8	-0,28	$9,85 \cdot 10^{-11}$	-1,6	0,27	$7,46 \cdot 10^{-6}$	-2,6	0,09	$4,6 \cdot 10^{-13}$
<i>nckx6</i>	1,4	0,41	0,005	1,2	0,13	0,394	-1,1	-0,32	0,344

Aufgeführt werden die in Abb. 33 graphisch dargestellten relativen differenziellen Regulationsfaktoren mit zugehörigem SEM. P = Irrtumswahrscheinlichkeit laut Student's t-Test; positive Regulationsfaktoren im ersten Vergleich = SOC > CN, im zweiten Vergleich IC > CN, im dritten Vergleich IC > SOC; negative Regulationsfaktoren = SOC < CN bzw. IC < CN bzw. IC < SOC

4.3.3.4 Relative differenzielle Regulation der *ncx*-/*nckx*-Genexpression bei P60

In Abb. 34 bzw. Tab. 19 wurde die relative Expression der Isoformen zwischen den auditorischen Hirnstammkernen im Alter von P60 untersucht. Ein Vergleich von CN und SOC in diesem Alter (Abb. 34A) zeigte im SOC eine verstärkte Expression von *ncx2* und *nckx2*, während *ncx3*, *nckx5* und *nckx6* im SOC eine verminderte Genexpression zeigten. Für *ncx1* und *nckx4* konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression nachgewiesen werden. Den kleinsten Regulationsfaktor zeigte *nckx6*, welches im SOC um den Faktor 1,2 vermindert exprimiert wurde. Die stärkste Regulation wurde mit einer im SOC um den Faktor 2,2 erhöhten Expression für *ncx2* gezeigt.

Im Vergleich von CN und IC (Abb. 34B) zeigten *ncx2* und *ncx3* eine im IC verminderte Genexpression, während sowohl *nckx2* als auch *nckx5* eine stärkere Expression im IC zeigten. Die Regulationsfaktoren lagen zwischen -1,9 (*ncx3*) und 4,5 (*nckx5*). Für *ncx1*, *nckx4* und *nckx6* wurden keine signifikanten Unterschiede in der Expression detektiert.

Ein Vergleich von SOC und IC (Abb. 34C) ergab eine verminderte Genexpression im IC für *ncx2* und *ncx3*, während *nckx4* und *nckx5* eine im IC erhöhte Expression aufwiesen. Den mit 1,3 kleinsten Regulationsfaktor zeigte *nckx4*, der mit 7,2 größte Regulationsfaktor wurde für

nckx5 ermittelt. *ncx1*, *nckx2* sowie *nckx6* zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Expression.

Bei Betrachtung der einzelnen Isoformen zeigte *ncx1* demnach zwischen den untersuchten Geweben keine signifikanten Genexpressionsunterschiede. Für *ncx2* wurde die höchste Expression im SOC detektiert (Abb. 34A, C), gefolgt von CN und IC (Abb. 34B). *ncx3* zeigte die geringste Expression ebenfalls im IC (Abb. 34B, C), allerdings wurde für dieses Gen im CN eine höhere Expression als im SOC detektiert (Abb. 34A). *nckx2* zeigte die höchste Expression im SOC (Abb. 34A, B), gefolgt von CN und IC, wobei im direkten Vergleich von SOC und IC keine signifikanten Unterschiede detektiert wurden (Abb. 34C). *nckx4* zeigte nur im Vergleich von IC und SOC eine im IC höhere Genexpression (Abb. 34C), während in den weiteren Vergleichen keine signifikanten Unterschiede detektiert wurden. Für *nckx5* wurde die höchste Genexpression im IC detektiert (Abb. 34B, C), gefolgt von CN und SOC (Abb. 34A), während *nckx6* nur im Vergleich von CN und SOC eine im CN höhere Expression zeigte (Abb. 34A).

Somit zeigte *ncx3* bei P4 und P60 das gleiche differenzielle Expressionsmuster zwischen den untersuchten Kernen, während sich die Expressionsmuster der übrigen Isoformen im Laufe der Entwicklung veränderten. Zudem zeigten bis auf zwei Ausnahmen alle Isoformen, sowohl bei P4 als auch bei P60, die geringste Expression im IC. Diese Ausnahmen bildeten zum einen *nckx5*, für welchen bei P60 im IC die höchste Expression detektiert wurde, zum anderen *nckx4*, welcher im IC bei P60 eine höhere Expression zeigte als im SOC.

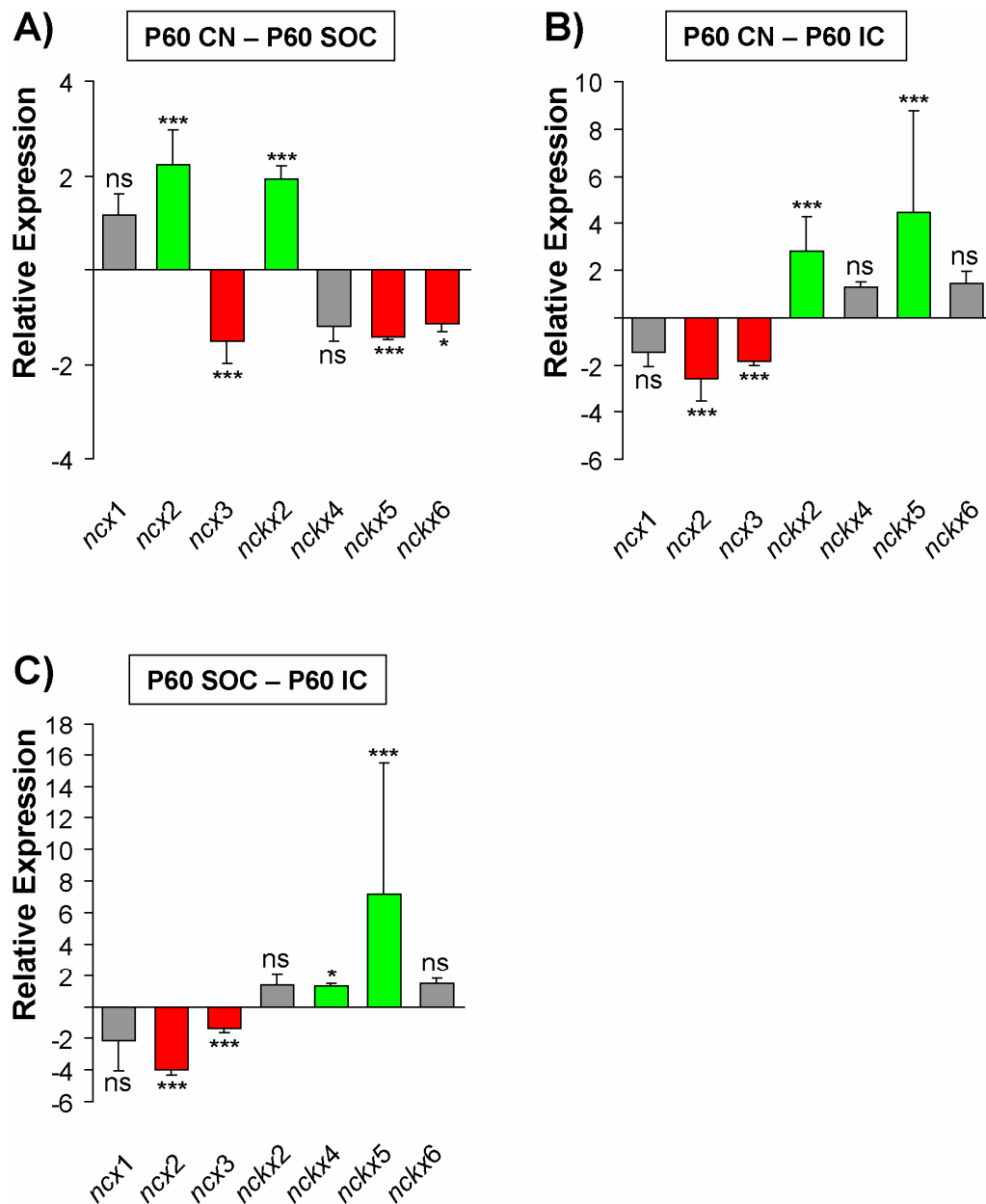


Abb. 34: Relative differenzielle Regulation der *ncx*-/*nckx*-Genexpression in auditorischen Kernen bei P60
Mittels qRT-PCR wurde die relative Transkription der *ncx*-/*nckx*-Isoformen zwischen den einzelnen Kernen bei P60 untersucht. Positive Regulationsfaktoren in (A) = SOC > CN, negative Regulationsfaktoren = SOC < CN; positive Regulationsfaktoren in (B) bzw. (C) = IC > CN bzw. IC > SOC, negative Regulationsfaktoren = IC < CN bzw. IC < SOC; die Regulationsfaktoren sind jeweils mit SEM dargestellt. * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,01; ns = nicht signifikant im Student's t-Test; (A) Relative Genexpression im SOC verglichen mit dem CN. *ncx2* sowie *nckx2* zeigten eine im SOC erhöhte Expression, während die Expression von *ncx3*, *nckx5* und *nckx6* im SOC im Vergleich zum CN vermindert war. *ncx1* und *nckx4* zeigten keine signifikanten Expressionsunterschiede. (B) Relative Genexpression im IC verglichen mit dem CN. *ncx2* und *ncx3* zeigten eine im IC verminderte Expression, *nckx2* sowie *nckx5* wurden dagegen im IC verstärkt exprimiert. *ncx1*, *nckx4* und *nckx6* zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression. (C) Relative Genexpression im IC verglichen mit dem SOC. *ncx2* und *ncx3* wurden im IC vermindert exprimiert, während *nckx4* und *nckx5* eine im IC verstärkte Expression zeigen. Die relative Genexpression von *ncx1*, *nckx2* sowie *nckx6* unterschied sich nicht zwischen SOC und IC.

Tab. 19: Relative Regulationsfaktoren der *ncx*-/*nckx*-Genexpression in auditorischen Kernen bei P60

Gen	Relative Regulationsfaktoren bei P60								
	CN - SOC			CN - IC			SOC - IC		
	Faktor	SEM	P	Faktor	SEM	P	Faktor	SEM	P
<i>ncx1</i>	1,9	0,43	0,991	-1,5	-0,64	0,075	-2,2	-1,85	0,106
<i>ncx2</i>	2,2	0,71	$4,05 \cdot 10^{-4}$	-2,6	-0,97	$7,9 \cdot 10^{-5}$	-4,0	-0,36	$2,67 \cdot 10^{-22}$
<i>ncx3</i>	-1,5	-0,49	$3,08 \cdot 10^{-5}$	-1,9	-0,14	$6,28 \cdot 10^{-7}$	-1,4	-0,24	$2,06 \cdot 10^{-13}$
<i>nckx2</i>	1,9	0,27	$2,73 \cdot 10^{-10}$	2,8	1,51	$4,81 \cdot 10^{-4}$	1,4	0,69	0,905
<i>nckx4</i>	-1,2	-0,29	0,160	1,3	0,21	0,058	1,3	0,17	0,021
<i>nckx5</i>	-1,4	-0,06	$5,56 \cdot 10^{-5}$	4,5	4,32	$2,23 \cdot 10^{-4}$	7,2	8,26	$7,97 \cdot 10^{-6}$
<i>nckx6</i>	-1,2	-0,16	0,040	1,4	0,5	0,209	1,4	0,38	0,052

Aufgeführt werden die in Abb. 34 graphisch dargestellten relativen differenziellen Regulationsfaktoren mit zugehörigem SEM. P = Irrtumswahrscheinlichkeit laut Student's t-Test; positive Regulationsfaktoren im ersten Vergleich = SOC > CN, im zweiten Vergleich IC > CN, im dritten Vergleich IC > SOC; negative Regulationsfaktoren = SOC < CN bzw. IC < CN bzw. IC < SOC

4.3.4 Zusammenfassung und Vergleich von Gen- und Proteinexpression

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Genexpression der untersuchten *ncx*- und *nckx*-Isoformen sowohl innerhalb der analysierten Hörbahnkerne im Laufe der Entwicklung als auch innerhalb einer Altersstufe zwischen den einzelnen Hörbahnkernen differenziell reguliert ist. Dabei wurden für den Vergleich zwischen den beiden untersuchten Entwicklungsstufen insgesamt höhere Regulationsfaktoren detektiert als zwischen den einzelnen Hörbahnkernen innerhalb einer Entwicklungsstufe. So wurden auch die beiden höchsten Regulationsfaktoren mit -9,5 für *nckx2* im Vergleich CN bei P4 gegen P60 (Abb. 32A) und 10,9 für *nckx5* im Vergleich IC bei P4 gegen P60 (Abb. 32C) detektiert. Des Weiteren zeigten die *ncx*-Isoformen im Laufe der Entwicklung in sieben von neun Fällen eine Zunahme der Genexpression, während die Expression der *nckx*-Isoformen im Laufe der Entwicklung in neun von zwölf abnahm. Keine der Isoformen zeigte ein zeitlich begrenztes Expressionsmuster.

Die Genexpressionsanalysen bestätigten demnach die auf Proteinebene gezeigte Lokalisation der *ncx*-Isoformen sowie von *nckx2* innerhalb der untersuchten Hörbahnkerne zu beiden

Entwicklungsstufen. Auf zellulärer Ebene zeigte die IHC zudem eine Proteinexpression von NCX1-3 und NCKX2 in allen Teilgebieten der untersuchten auditorischen Strukturen. Im Laufe der Entwicklung wurde zudem in vielen Kernen eine Umverteilung der IR-Signale vom Neuropil hin zu einer verstärkten Lokalisation innerhalb der Somata detektiert.

Eine Zusammenfassung der immunhistochemischen Färbungen sowie der qRT-PCR-Regulationsfaktoren im Vergleich von P4 zu P60 ist in Tab. 20 (P4) und Tab. 21 (P60) dargestellt. Da eine quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen aufgrund der Hintergrundfärbung nicht möglich war, konnte ein Vergleich der qRT-PCR-Daten mit der IHC nicht erfolgen.

Tab. 20: Zusammenfassung IHC und Genexpressionsdaten bei P4

Isoform		P4									
		CN			SOC				IC		
		DCN	PVCN	AVCN	LSO	MNTB	MSO	SPN	ICd	ICe	ICc
NCX1	IHC	Neuropil Somata	Neuropil	Neuropil	Neuropil	Neuropil Somata	Neuropil	Neuropil	Somata	Somata	Neuropil
	qRT	-1,4			-2,9				-3,6		
NCX2	IHC	Somata Neuropil	Neuropil	Neuropil	Neuropil	Neuropil	Neuropil	Neuropil	Neuropil Somata	Neuropil Somata	Neuropil
	qRT	-1,4			-4,9				-2,5		
NCX3	IHC	Somata Neuropil	Neuropil	Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Neuropil	Neuropil	Neuropil
	qRT	-1,6			1,1				1,0		
NCKX2	IHC	Somata Neuropil	Neuropil	Neuropil	Neuropil	Somata Neuropil	Neuropil	Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil
	qRT	9,5			2,8				3,1		
NCKX3	RT	transkribiert			transkribiert				transkribiert		
NCKX4	qRT	6,3			5,0				1,4		
NCKX5	qRT	-2,0			1,3				-10,9		
NCKX6	qRT	3,1			3,9				3,3		

Dargestellt ist für jede auditorische Hirnstammstruktur die vorwiegende Lokalisation der IR-Signale (Neuropil und/oder innerhalb der Somata); qRT = Regulationsfaktoren der qRT-PCR: positive Regulationsfaktoren stellen eine verstärkte Transkription bei P4 gegenüber P60 dar, negative Regulationsfaktoren = P4 < P60; Regulationsfaktoren zwischen den einzelnen Kernen einer Altersstufe sind nicht aufgeführt; für NCKX3 wurde keine qRT-PCR durchgeführt, daher werden die Ergebnisse der RT-PCR angegeben

Tab. 21: Zusammenfassung IHC und Genexpressionsdaten bei P60

Isoform		P60									
		CN			SOC				IC		
		DCN	PVCN	AVCN	LSO	MNTB	MSO	SPN	ICd	ICe	ICc
NCX1	IHC	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Neuropil
	qRT	1,4			2,9				3,6		
NCX2	IHC	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil
	qRT	1,4			4,9				2,5		
NCX3	IHC	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil
	qRT	1,6			-1,1				-1,0		
NCKX2	IHC	Neuropil	Neuropil	Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Somata Neuropil	Neuropil
	qRT	-9,5			-2,8				-3,1		
NCKX3	RT	transkribiert			transkribiert				transkribiert		
NCKX4	qRT	-6,3			-5,0				-1,4		
NCKX5	qRT	2,0			-1,3				10,9		
NCKX6	qRT	-3,1			-3,9				-3,3		

Dargestellt ist für jede auditorische Hirnstammstruktur die vorwiegende Lokalisation der IR-Signale (Neuropil und/oder innerhalb der Somata); qRT = Regulationsfaktoren der qRT-PCR: positive Regulationsfaktoren stellen eine verstärkte Transkription bei P60 gegenüber P4 dar, negative Regulationsfaktoren = P60 < P4; Regulationsfaktoren zwischen den einzelnen Kernen einer Altersstufe sind nicht aufgeführt; für NCKX3 wurde keine qRT-PCR durchgeführt, daher werden die Ergebnisse der RT-PCR angegeben

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung von acht $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern (NCX1-3 sowie NCKX2-6) im auditorischen Hirnstamm der Ratte untersucht. Dabei konnte die Genexpression aller acht Austauscher in CN, SOC und IC nachgewiesen werden. Real-time PCR Experimente zeigten, dass die Transkription der drei *ncx*-Isoformen im Verlauf der Ontogenese in der Regel zunahm (in sieben von neun Vergleichen), während sie für die fünf *nckx*-Isoformen in den meisten Fällen (neun von zwölf Vergleichen) abnahm. Auf Proteinebene wurden die drei NCX-Isoformen sowie NCKX2 ebenfalls in den untersuchten Strukturen des auditorischen Hirnstamms bei P4 sowie bei P60 nachgewiesen. Eine Proteinexpression zeigte sich in allen Teilgebieten der verschiedenen Strukturen. Alle vier Isoformen zeigten in den meisten Kerngebieten bei P4 eine verstärkte Lokalisation im Neuropil, während bis P60 die Lokalisation innerhalb der Somata zunahm. Eine Ausnahme stellte NCKX2 im CN dar, hier wurden die IR-Signale auch bei P60 hauptsächlich im Neuropil detektiert.

5.1 Untersuchung der Proteinexpression

5.1.1 Subzelluläre Umverteilung der Proteinlokalisierung während der Ontogenese

Auf Proteinebene konnte von P4 nach P60 eine Umverteilung der NCX- und NCKX2-Lokalisation gezeigt werden. Während die Isoformen bei P4 in den meisten untersuchten Strukturen hauptsächlich im Neuropil lokalisiert waren, zeigte sich bei P60 meist eine verstärkte Immunfluoreszenz innerhalb der Somata (Abb. 18-30). Ausnahme war hier NCKX2, welcher im CN auch bei P60 hauptsächlich im Neuropil detektiert wurde (Abb. 30A-F). Funktionelle Unterschiede zwischen den NCX- und NCKX-Isoformen werden unter 5.2.2.3 diskutiert.

5.1.1.1 NCX- und NCKX2-Expressionsstudien aus der Literatur

Minelli *et al.* (2007) zeigten in *Neocortex* sowie *Hippocampus* der adulten Ratte ebenfalls eine Lokalisation von NCX1-3 im Neuropil sowie innerhalb der Somata. Minelli *et al.* (2007) verwendeten dazu einen monoklonalen NCX1-Antikörper von Swant sowie den in meiner Arbeit als Vergleich herangezogenen monoklonalen NCX2-Antikörper und den NCX3-Antikörper von Prof. Philipson. Dabei zeigten alle Isoformen eine weit verbreitete Expression in den untersuchten Hirnarealen. Während NCX1 in *Neocortex* und *Hippocampus* ausschließlich eine punktförmige Färbung im Neuropil zeigte, wurden NCX2 und NCX3 auch innerhalb der Somata detektiert. Minelli *et al.* (2007) führten diese Untersuchungen am adulten Tier durch, in diesem Alter (P60) wurden in meiner Arbeit im auditorischen Hirnstamm für alle NCX-Isoformen IR-Signale innerhalb der Somata (sowie im Neuropil) detektiert (Abb. 18-30).

IR-Signale für NCX1-3 wurden von Minelli *et al.* (2007) in Dendriten und dendritischen Dornen detektiert. Auch Astrozyten zeigten eine Expression der Isoformen, hauptsächlich in Zellausläufern, welche exzitatorische Synapsen umgeben sowie in perivaskulären Endfüßen. Eine Expression von NCX-Isoformen im Neuropil wurde demnach, neben dem in meiner Arbeit untersuchten auditorischen Hirnstamm, auch schon für andere Hirnareale gezeigt. Allerdings zeigt meine Arbeit als erste eine entwicklungsabhängige Umverteilung der Austauscher.

Innerhalb der Somata wurden alle drei NCX-Isoformen in der Nähe von Mikrotubuli sowie assoziiert mit der inneren Seite der Plasmamembran detektiert (Minelli *et al.*, 2007). Kar *et al.* (2009) wiesen NCX (welche Isoformen wird nicht angegeben) in der Mitochondrienmembran nach, wo $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher für den größten Anteil des Ca^{2+} -Exports verantwortlich sind (Minelli *et al.*, 2007). NCX1 wurde sogar, immunhistochemisch wie funktionell, in der inneren Membran des Zellkerns nachgewiesen (Ledeen und Wu, 2007). NCX1 ist dort für den Ca^{2+} -Transport aus dem Nucleoplasma in das Lumen zwischen innerer und äußerer Zellkernmembran verantwortlich, wobei NCX1 mit dem Gangliosid GM1 interagiert.

Die cytoplasmatische Färbung innerhalb der Somata, welche im Rahmen meiner Arbeit auch im auditorischen Hirnstamm gezeigt wurde und auf den ersten Blick für ein plasmamembranständiges Protein unerwartet erscheint, wird somit durch diese Untersuchungen untermauert. Des Weiteren könnte die Färbung im Cytoplasma auf eine Detektion der Isoformen während ihres Synthese- und Transportweges, z.B. im

endoplasmatischen Retikulum, Golgi-Apparat oder in Transportvesikeln, zurückzuführen sein. Eine Doppelfärbung gegen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und entsprechende Markerproteine könnte darüber Aufschluss geben.

Frühere Studien an hippocampalen Kulturen zeigten eine Expression von NCX2 ausschließlich in Gliazellen, nicht in Neuronen (He *et al.*, 1998b; He *et al.*, 1998c; Thurneysen *et al.*, 2002). Die im Rahmen meiner Arbeit im auditorischen Hirnstamm gewonnenen *in situ* Daten sowie die Resultate von Minelli *et al.* (2007) widerlegen diese Beobachtungen. Die Expression von NCX2 ist demnach *in situ* nicht auf Gliazellen beschränkt.

Auch für NCKX2 wurde bereits eine weit verbreitete Expression im Gehirn gezeigt (Reuter und Porzig, 1995; Li und Lytton, 2002; Lytton *et al.*, 2002). Wie in meiner Arbeit für den CN gezeigt, ist NCKX2 auch in adulten hippocampalen Pyramidenneuronen der Maus hauptsächlich im Neuropil lokalisiert (Li *et al.*, 2006). Eine Expression von NCKX2 in Dendriten wurde auch von weiteren Studien nachgewiesen (Lee *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005a).

5.1.1.2 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher im Neuropil

Die Expression von NCX1-3 und NCKX2 im Neuropil junger Tiere legt eine Ca^{2+} -regulierende Funktion im Bereich dendritischer Synapsen nahe. Eine Zuordnung der IR-Signale zu prä- oder postsynaptischer Seite stellt einen interessanten Ansatz dar, um meine Arbeit weiterzuführen. Dies könnte immunhistochemisch über Kollokalisierungen mit prä- bzw. postsynaptischen Markerproteinen oder mittels Elektronenmikroskopie erfolgen.

Ein Einfluss von NCX auf postsynaptische Ca^{2+} -Ströme wurde bereits in Purkinje-Zellen des *Cerebellums* nachgewiesen. Durch eine Inhibition von NCX wurden dort α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (AMPA)-Rezeptor-vermittelte Ca^{2+} -Ströme reduziert (Kim *et al.*, 2005b). Durch diese Modulation von AMPA-Rezeptoren könnten NCX somit einen Einfluss auf die synaptische Plastizität haben. Eine solche Funktion wäre auch im auditorischen Hirnstamm denkbar, v.a. da sich die synaptischen Verbindungen bei P4 noch in einem unreifen Stadium befinden (Kandler und Friauf, 1995b; Ehrlich *et al.*, 1999; Lohrke *et al.*, 2005). Des Weiteren leisten NCX einen Beitrag zur Reduktion der Ca^{2+} -Konzentration nach NMDA-Rezeptor-Aktivierung, was an primären Neuronenkulturen gezeigt wurde (Ranciat-McComb *et al.*, 2000). Da die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren zu LTP bzw.

LTD führen kann (Artola und Singer, 1993; Hansel *et al.*, 1996) siehe auch 5.1.1.4), sind NCX somit auch in der Lage, die synaptische Plastizität nach NMDA-Rezeptor-Aktivierung zu beeinflussen.

Durch eine Hemmung der NCX-Isoformen wurde das Abklingen transientser Ca^{2+} -Ströme in einzelnen dendritischen Dornen verlangsamt und Ca^{2+} diffundierte vermehrt aus den Dornen in den zugehörigen Dendriten (Korkotian *et al.*, 2004). NCX2 und NCX3 sind zudem in neocortikalen und hippocampalen nicht-pyramidalen Interneuronen, welche kaum dendritische Dornen aufweisen, hoch exprimiert (Minelli *et al.*, 2007). NCX-Isoformen könnten demnach ebenfalls dazu beitragen, postsynaptische Ca^{2+} -Ströme in dendritischen Regionen zu modulieren, welche keine Dornen und damit morphologische Barrieren für die Ca^{2+} -Diffusion besitzen. Dies trifft auch auf die Strukturen des in meiner Arbeit untersuchten auditorischen Hirnstamms zu. Die bisherigen ultrastrukturellen Untersuchungen weisen darauf hin, dass alle drei NCX-Isoformen aufgrund ihrer Lokalisation an der Modulation postsynaptischer Ca^{2+} -Ströme beteiligt sind (Minelli *et al.*, 2007).

Auch auf präsynaptischer Seite wurde eine Beteiligung von $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern an der Ca^{2+} -Regulation nachgewiesen. So zeigten funktionelle Studien an hippocampalen Kulturen und Schnitten sowie an GABAergen Neuronen des *Nucleus basalis* Meynert einen Einfluss von NCX auf die Erregbarkeit von Axonterminalen sowie auf die Transmitterausschüttung (Amoroso *et al.*, 1993; Reuter und Porzig, 1995; Bouron und Reuter, 1996; Doi *et al.*, 2002). Minelli *et al.* (2007) konnten NCX1-3 nur in einer begrenzten Anzahl neocortikaler und hippocampaler Axonterminalen nachweisen, so dass sie von einer geringen präsynaptischen Expression der Isoformen im Gehirn ausgehen. Eine starke Kolo-kalisation von NCX1 mit präsynaptischen Markern wurde dagegen in hippocampalen Kulturen gezeigt (Reuter und Porzig, 1995), während in Synapsen des Ziliarganglions im Hühnchen nur eine geringe Expression von NCX1 in der Präsynapse nachgewiesen wurde (Juhaszova *et al.*, 2000). Demnach agieren NCX sowohl prä- als auch postsynaptisch, wobei sich die bevorzugte Expression in verschiedenen Gehirnarealen unterscheidet.

NCX1-3 sowie NCKX2 wurden in meiner Arbeit auch im MNTB nachgewiesen (Abb. 18, 21, 22, 24, 25, 27, 29, 30). Wie eine funktionelle Studie zeigt, erfolgen in der *Calyx* von Held des MNTB 42% der gesamten Ca^{2+} -Klärung durch NCKX, während NCX und die PMCA einen Anteil von 26% bzw. 23% haben (Kim *et al.*, 2005a). Die Ca^{2+} -Klärung über intrazelluläre

Speicher wie die Mitochondrien spielt laut dieser Publikation erst bei anhaltend erhöhter Ca^{2+} -Konzentration eine Rolle, wenn die Transporter der Plasmamembran gesättigt sind. Aufgrund ihrer kelchartigen Struktur besitzt die *Calyx* von Held-Synapse eine im Verhältnis zum Volumen große Oberfläche (Satzler *et al.*, 2002). Dies hat zur Folge, dass Ca^{2+} über Ca^{2+} -transportierende Proteine in der Plasmamembran wie NCX/NCKX oder PMCA effektiver aus dem Cytoplasma entfernt werden kann als über die Organellen (Kim *et al.*, 2005a). Die *Calyx* von Held überträgt zur Schalllokalisierung APs mit sehr hohen Frequenzen bis zu 600 Hz (siehe auch 1.6.2). Daher muss der durch ein AP hervorgerufene Anstieg der präsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration sehr schnell wieder abgebaut werden, so dass das nächste AP einen diskreten Ca^{2+} -Einstrom hervorrufen kann. Für diese Aufgabe sind die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher aufgrund ihrer hohen Ca^{2+} -Transportkapazität (siehe 5.1.2.1) besonders geeignet. Demnach weist meine Arbeit ergänzend zur Arbeit von Kim *et al.* (2005a) darauf hin, dass alle drei NCX-Isoformen aufgrund ihrer Lokalisation einen Beitrag zu den 26% der Ca^{2+} -Regulation über NCX der *Calyx* von Held leisten und dass NCKX2 zumindest eine NCKX-Isoform darstellt, die an den 42% der NCKX-Transportaktivität beteiligt zu sein scheint.

5.1.1.3 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher im unreifen Gehirn

Bei P4 ist die Chlorid-Homöostase und damit die inhibitorische Transmission auditorischer Hirnstammneurone noch in einem unreifen Zustand. Die postsynaptischen ionotropen Rezeptoren der in reifen Neuronen inhibitorisch wirkenden Transmitter Glycin und GABA sind ligandengesteuerte Kanäle mit hoher Permeabilität für Chloridionen. Je nach elektrochemischem Gradienten kommt es daher nach Transmitterbindung zu einem Chlorideinstrom, der zu einer Hyperpolarisation der postsynaptischen Zelle führt, oder zu einem Chloridausstrom, welcher eine Depolarisation verursacht (Eccles, 1966; Kaila, 1994; Payne *et al.*, 2003; Mercado *et al.*, 2004). In einer frühen Entwicklungsphase zeigen Neurone eine hohe intrazelluläre Chloridkonzentration (Cherubini *et al.*, 1990b; Kandler und Friauf, 1995a; Chen *et al.*, 1996; Ehrlich *et al.*, 1999; Kakazu *et al.*, 1999). Ausgereifte Neurone weisen dagegen bis auf wenige Ausnahmen (Gulacsi *et al.*, 2003; Bartho *et al.*, 2004) eine niedrigere Chloridkonzentration auf (Delpire, 2000), die auf einem Chloridtransport aus der Zelle beruht (Rivera *et al.*, 1999; DeFazio *et al.*, 2000; Balakrishnan *et al.*, 2003; Payne *et al.*, 2003). Korrelierend damit bewirken GABA und Glycin in einer frühen neuronalen Entwicklungsphase einen Chloridausstrom und damit eine Depolarisation des postsynaptischen Neurons (Owens *et al.*, 1996), während GABA und Glycin im ausgereiften

Gehirn die wichtigsten inhibitorischen Transmitter darstellen und eine Hyperpolarisierung bewirken (entwicklungsabhängiger D/H-Wechsel; (Mueller *et al.*, 1984; Benari *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 1991; Kaila, 1994). Die frühe depolarisierende Wirkung der Transmitter wiederum führt zu einem Ca^{2+} -Einstrom über spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle sowie NMDA-Rezeptoren, der vielseitige Auswirkungen auf die neuronale Entwicklung hat (Leinekugel *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 1998). So wird die morphologische Differenzierung von Neuronen (Ben-Ari *et al.*, 1994; Ben-Ari, 2002; Zheng und Poo, 2007) sowie die Synapsenbildung (Ben-Ari *et al.*, 1997; Cherubini *et al.*, 1998; Kirsch und Betz, 1998) beeinflusst und die Neurogenese reguliert (Maric *et al.*, 2001). Eine Lokalisation der NCX- und NCKX-Isoformen in unreifen Synapsen könnte demnach direkten Einfluss auf diese Ca^{2+} -Regulation an den Synapsen haben.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass im Laufe der frühen postnatalen Entwicklung die tonotopische Organisation der Projektionen im auditorischen Hirnstamm präzisiert wird (Review: Kandler *et al.*, 2009). So ist das MNTB-Gebiet, welches ein LSO-Neuron kontaktiert, im unreifen System um ca. 75% größer als im adulten SOC. Zudem weisen unreife MSO-Neurone viele Eingänge vom MNTB an ihren distalen Dendriten auf, welche erst im Laufe der Entwicklung eliminiert werden. Da die Projektionen des MNTB vor dem D/H-Wechsel wie schon erläutert depolarisierend wirken, wären verstärkte Ca^{2+} -Regulationsmechanismen im Neuropil unreifer Neuronen sinnvoll. Meine Arbeit deutet darauf hin, dass diese Rolle von den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern übernommen werden könnte.

5.1.1.4 Gegensätzliche Phänotypen der NCKX2-KO und NCX2-KO

KO-Tiere für NCX2 und NCKX2 zeigen gegensätzliche Phänotypen. Während NCX2-KOs eine verstärkte LTP sowie eine verminderte LTD zeigen (Jeon *et al.*, 2003), weisen NCKX2-KOs eine verminderte LTP und erhöhte LTD auf (Li *et al.*, 2006).

Allgemein anerkannt führt ein hoher Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu LTP, ein niedrigerer zu LTD (Artola und Singer, 1993; Hansel *et al.*, 1996). Somit ist der Phänotyp des NCKX2-KO auf den ersten Blick überraschend, da das Fehlen eines Ca^{2+} -Exportmechanismus zunächst einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur Folge hat und demnach, wie beim NCX2-KO beobachtet, zu einer verstärkten LTD führen sollte. Allerdings deuten weitere Studien darauf hin, dass das Gleichgewicht zwischen zellulären Prozessen, die LTP bzw. LTD begünstigen, von der Dynamik postsynaptischer Ca^{2+} -Ströme

reguliert wird (Augustine *et al.*, 2003; Malenka und Bear, 2004). Starke, aber kurze Anstiege der Ca^{2+} -Konzentration führen über Aktivierung verschiedener Kinasen zu LTP, während geringere, dafür länger anhaltende Erhöhungen zur Aktivierung von Phosphatasen und damit zu LTD führen.

Doch wie erklärt diese Theorie den gegensätzlichen Phänotyp der KOs zweier Ca^{2+} -Exportmechanismen? Zum einen wurde NCX2 im Gegensatz zu NCKX2 in hippocampalen Neuronen hauptsächlich im Zellsoma detektiert. Somit könnten diese Unterschiede in der subzellulären Lokalisation zwischen NCX2 und NCKX2 eine Rolle bei den gegensätzlichen Phänotypen der KO-Tiere spielen (Li *et al.*, 2006). Meiner Meinung nach ist es aber wahrscheinlicher, dass die Unterschiede in Kinetik und Regulation zwischen NCX2 und NCKX2 für diese Phänotypen verantwortlich sind. Die Aktivität von NCX2 wird allosterisch von intrazellulärem Ca^{2+} reguliert, so dass NCX2 hauptsächlich bei signifikant erhöhten Ca^{2+} -Konzentrationen eine Rolle für den Ca^{2+} -Export spielt (Li *et al.*, 1994). Ein KO von NCX2 kann daher dazu führen, dass postsynaptische Ca^{2+} -Ströme höhere Spitzenwerte erreichen und damit LTP begünstigen. Dagegen wird NCKX2 nicht durch cytosolisches Ca^{2+} moduliert (Dong *et al.*, 2001) und auch bei geringeren Ca^{2+} -Konzentrationen aktiviert (Sheng *et al.*, 2000), so dass diese Isoform eher zur Ca^{2+} -Regulation nach einem transienten Ca^{2+} -Einstrom beiträgt. Ein KO von NCKX2 führt daher eher zu einer geringeren Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration als ein KO von NCX2, die, wenn sie lang anhaltend ist, zu LTD führen kann (Li *et al.*, 2006). Die Phänotypen dieser KOs zeigen demnach, dass die Rolle von NCX2 bzw. NCKX2 nicht vollständig durch die anderen NCX- und NCKX-Isoformen kompensiert werden kann.

Die Tatsache, dass der K^+ -abhängige $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch in den meisten Neuronen der NCKX2-KO-Maus nur reduziert ist und nicht vollständig fehlt (Li *et al.*, 2006), lässt auf die Aktivität weiterer NCKX-Isoformen schließen. In meiner Arbeit weist die Genexpression von NCKX3-6 in den untersuchten auditorischen Hirnstammkernen ebenfalls auf eine Mitwirkung dieser NCKX-Isoformen hin. *In situ* Hybridisierungen könnten einen weiteren Aufschluss über die zelluläre Verteilung dieser Isoformen innerhalb der einzelnen Kerne geben. Funktionell könnte das Vorhandensein von K^+ -abhängigen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Strömen in den entsprechenden auditorischen Hirnstammstrukturen der NCKX2-KO-Maus ebenfalls die Aktivität weiterer Isoformen bestätigen.

Dass NCKX2 zu 40% für den K^+ -abhängigen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch in kortikalen Neuronen verantwortlich ist, konnte aus Experimenten an kultivierten kortikalen Neuronen aus NCKX2-KO-Tieren geschlossen werden. Bezieht man den NCX-Strom mit ein, so beläuft sich der

Beitrag auf ca. 10-15% des gesamten $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs (Li *et al.*, 2006). Trotz dieses relativ geringen Beitrags zur generellen Ca^{2+} -Regulation zeigen die KO-Tiere, dass die Funktion von NCKX2 nicht durch die anderen Austauscher kompensiert werden kann. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Ca^{2+} -Regulation durch eine Vielzahl an NCX- und NCKX-Isoformen nicht ganz so redundant ist, wie es auf den ersten Blick erscheint und einzelne Isoformen nicht ersetzt werden können.

Auch die Experimente mit KO-Tieren weisen somit darauf hin, dass die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher im Neuropil junger Ratten direkt an der Modulation synaptischer Transmission beteiligt sein könnten und die synaptische Plastizität in diesem frühen Entwicklungsstadium beeinflussen. Daher würden Experimente, die den Zeitpunkt der Umverteilung genauer bestimmen, einen interessanten weiteren Aspekt liefern.

5.1.2 Vergleich mit dem Expressionsmuster anderer Ca^{2+} -regulierender Proteine

Neben den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern sind auch weitere Ca^{2+} -transportierende Proteine wie die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPasen (PMCA; (Schatzmann, 1966a; Carafoli, 1991b; Carafoli, 1992b) sowie Ca^{2+} -bindende Proteine wie Calbindin (Bredderman und Wasserman, 1974b), Calretinin (Arai *et al.*, 1991b) und Parvalbumin (Heizmann, 1984) an der Ca^{2+} -Regulation beteiligt. Letztere sind aufgrund ihrer Lokalisation im Cytoplasma als mobile Ca^{2+} -Puffer schnell zu Orten mit erhöhter Ca^{2+} -Konzentration rekrutierbar. Auch Mitochondrien spielen eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Homöostase (Lu, 2009). Wie schon erwähnt (5.1.1.1), sind $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher auch an der Ca^{2+} -Regulation über die Mitochondrien beteiligt, sie wurden in der Mitochondrienmembran nachgewiesen und sind dort für den größten Anteil des Ca^{2+} -Exports verantwortlich (Minelli *et al.*, 2007; Kar *et al.*, 2009).

5.1.2.1 PMCA

Die PMCA weisen eine im Vergleich mit den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern höhere Affinität für Ca^{2+} auf (PMCA: $K_m = 0,5 \mu\text{M}$ (Isoform nicht angegeben); NCX: $K_m = 100\text{-}400 \mu\text{M}$), jedoch eine geringere Transportrate (PMCA: $0,5 \text{ nmol Ca}^{2+}/\text{mg PMCA}$ in der Sekunde; NCX1: $30 \text{ nmol Ca}^{2+}/\text{mg NCX1}$ in der Sekunde; (Enyedi *et al.*, 1987; Carafoli, 1987; Carafoli, 1994; Visser *et al.*, 2007). Daher eignet sich die PMCA besonders für die Aufrechterhaltung der basalen Ca^{2+} -Konzentration, die NCX-/NCKX-Isoformen könnten eher eine Rolle spielen,

wenn auf größere Schwankungen in der Ca^{2+} -Konzentration reagiert werden muss. Zudem sind die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher durch Kopplung des Ca^{2+} -Transports an den Na^+ -Gradienten bzw. Na^+ - und K^+ -Gradienten in der Lage, ihre Transportrichtung umzukehren. Die PMCA sowie $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher stellen damit Ca^{2+} -transportierende Mechanismen dar, die unterschiedliche Anforderungen an die Ca^{2+} -Regulation erfüllen können. In Zellen, die regelmäßig größere Schwankungen in ihren Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentrationen aufweisen, wie beispielsweise Neuronen und Kardiomyozyten, eignen sich die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher aufgrund ihrer zuvor aufgeführten Eigenschaften besonders als Ca^{2+} -Regulatoren. Der Nachweis der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher als dominanter, allerdings nicht ausschließlicher, Ca^{2+} -Exportmechanismus in Herz sowie in einigen neuronalen Systemen untermauert diese Annahme (siehe folgender Text; (Carafoli, 1994; Carafoli und Stauffer, 1994; Lytton, 2007).

In der Ratte werden vier verschiedene Isoformen der PMCA exprimiert, zusätzlich unterliegen diese noch alternativem Spleißen (Hammes *et al.*, 1994). Alle vier Isoformen werden im Gehirn exprimiert, und zwar ausschließlich in Neuronen (Carafoli und Stauffer, 1994). Während einige Spleißvarianten der Isoformen 1 und 4 ubiquitär exprimiert werden, wird die PMCA2 hauptsächlich in Gehirn und Herz, die PMCA3 hauptsächlich in Gehirn und Skelettmuskel exprimiert (Carafoli und Stauffer, 1994; Strehler *et al.*, 2007). Die unterschiedlichen Spleißvarianten der PMCA-Isoformen zeigten ebenfalls differenzielle Expressionsmuster. So wird eine Spleißvariante der PMCA1 hauptsächlich in differenzierten Neuronen exprimiert, einige Spleißvarianten der PMCA2 in den Haarzellen des Cortiorgans sowie in Neuronen des Spiralganglions (Strehler *et al.*, 2007). Mutationen der PMCA2 werden zudem mit vererbter Taubheit in Verbindung gebracht, KO-Mäuse haben Gleichgewichtsstörungen und sind taub (Kozel *et al.*, 1998; Brini *et al.*, 2007). Dabei zeigen sie morphologische Veränderungen im Cortiorgan. Somit wurde für die PMCA2 eine essenzielle Funktion in der *Cochlea* nachgewiesen. Die differenzielle Expression der verschiedenen Isoformen deutet auf unterschiedliche Funktionen in der Ca^{2+} -Homöostase hin, zumal einige der Spleißvarianten über spezifische interagierende Proteine zu unterschiedlichen Regionen der Plasmamembran rekrutiert werden können (Brini *et al.*, 2007). Die Expression der verschiedenen PMCA-Isoformen im auditorischen Hirnstamm wurde bisher noch nicht analysiert und würde sich zur weiteren Untersuchung der Ca^{2+} -Regulation in diesen Strukturen anbieten.

Dass sowohl PMCA als auch $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher an der Ca^{2+} -Homöostase beteiligt sind, wurde schon früh im Tintenfischaxon und in Meerschweinchen-Synaptosomen nachgewiesen (Gill *et al.*, 1981). In den meisten Zellen, auch in Neuronen, werden $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher

und PMCA koexprimiert, was sowohl mittels funktioneller Studien als auch mittels Immunocytoologie gezeigt wurde (Blaustein *et al.*, 2002). Während die PMCA recht uniform in der gesamten Plasmamembran von Neuronen exprimiert wird, zeigen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher eine limitierte Expression, in der Regel in Regionen der Plasmamembran, unterhalb derer endoplasmatisches Retikulum (ER) nachgewiesen wurde (Blaustein *et al.*, 2002). Damit scheinen die PMCA und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher für die Ca^{2+} -Regulation in verschiedenen subzellulären Bereichen verantwortlich zu sein. Ob $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher in sog. Membrane Rafts (Pike, 2006) in der Plasmamembran angereicht sind, konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden. Membrane Rafts sind kleine (10-200 nm), sehr dynamische Membrandomänen, die reich an Sterolen und Sphingolipiden sind und zur Kompartimentierung zellulärer Prozesse beitragen (Pike, 2006). So spielen Membrane Rafts häufig eine Rolle in der Signaltransduktion oder im Trafficking von Proteinen und Lipiden. Für NCX1 wurde in Gliomazellen eine teilweise Assoziation mit den Membrane Rafts-Markern Caveolin 1 und 2 nachgewiesen (Cha *et al.*, 2004), Studien am Herzen kommen dagegen zu widersprüchlichen Ergebnissen (Lytton, 2007).

Wie schon unter 5.1.1.2 beschrieben, erfolgen in der *Calyx* von Held 42% des gesamten Ca^{2+} -Exports durch NCKX, während NCX und die PMCA einen Anteil von 26% bzw. 23% haben (Kim *et al.*, 2005a). Für den schnellen Ca^{2+} -Export nach den hochfrequenten APs (bis zu 600 Hz; Wu und Kelly, 1993), die von der *Calyx* von Held übertragen werden, sind die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher aufgrund ihrer hohen Ca^{2+} -Transportkapazität, wie schon erwähnt (5.1.1.2), besonders geeignet. Weitere Studien über die PMCA im auditorischen Hirnstamm gibt es nicht, daher kann ein Vergleich mit dem Expressionsmuster der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher nicht erfolgen.

5.1.2.2 Calbindin

Die Expression einiger Ca^{2+} -puffernder Proteine während der Entwicklung des auditorischen Hirnstamms wurde bereits detailliert beschrieben. So zeigt Calbindin in den Somata des SOC eine transiente Expression (Friauf, 1993a): Somata und Neuropil der LSO weisen schon bei E20 IR-Signale für Calbindin auf, deren Stärke bis P7 zunimmt. Ab P8 wurde eine Abschwächung der Färbung innerhalb der Somata beobachtet, bis sich ab P28 das adulte Expressionsmuster mit einer fast ausschließlichen Färbung des Neuropils zeigt. Damit fällt die Phase der somatischen Calbindin-Expression in der LSO in die Zeit der

Synapsenstabilisierung. Die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher zeigten in der LSO dagegen ein umgekehrtes Expressionsmuster: IR-Signale wurden im jungen Tier hauptsächlich im Neuropil, im adulten Tier stärker innerhalb der Somata detektiert (Abb. 18J; 21H; 22H; 24H; 25H; 27H; 29H; 30H). Embryonale Stadien wurden in meiner Arbeit nicht untersucht.

In den übrigen Kernen des SOC wird Calbindin erst postnatal exprimiert. So zeigt der MNTB ab P8 eine Färbung innerhalb der Somata und in primären Dendriten (Friauf, 1993a). Bis P18 nimmt die Stärke dieser Färbung, v.a. im Neuropil, zu, parallel zur ebenfalls in diesem Zeitraum ansteigenden Färbung im Neuropil von LSO, MSO und SPN. Daher handelt es sich bei den gefärbten Terminalen in LSO, MSO und SPN höchstwahrscheinlich um Axone des MNTB. In MSO und SPN wird Calbindin ab P14 (MSO) bzw. P10 (SPN) exprimiert und zwar stets ausschließlich im Neuropil.

Damit zeigen SPN und MSO bei P4 noch keine Expression von Calbindin, wiesen in diesem Alter aber eine Färbung des Neuropils für $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher auf (Abb. 18L; 21J; 22J; 24J; 25J; 27J; 29J; 30J). Im adulten Tier zeigten, wie schon in der LSO, die Somata eine verstärkte Expression der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, während Calbindin ausschließlich im Neuropil exprimiert wird. Im MNTB wurden die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher bereits bei P4, also vor Calbindin, detektiert, allerdings zeigte sich auch hier im Laufe der Entwicklung eine Zunahme der Calbindinfärbung im Neuropil, während die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher eine Zunahme der IR innerhalb der Somata zeigten (Abb. 18K; 21I; 22I; 24I; 25I; 27I; 29I; 30I).

Bis auf die LSO exprimieren demnach alle Kerne des SOC Calbindin später als die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, welche in meiner Arbeit bereits ab P4 detektiert wurden. Die hohe Expression der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher im Neuropil der unreifen Neurone könnte für die effektive Ca^{2+} -Regulation zur Gewährleistung der synaptischen Plastizität (siehe 5.1.1) verantwortlich sein, so dass eine frühe Expression von Calbindin im Neuropil nicht notwendig ist. Im adulten Tier, welches eine vorwiegende Expression der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher innerhalb der Somata zeigt, könnte Calbindin als mobiler Ca^{2+} -Puffer dagegen die Ca^{2+} -Regulation im Neuropil übernehmen.

In den äußeren Schichten des DCN wurden einige schwach für Calbindin gefärbte Neurone schon bei P3 detektiert (Friauf, 1994a). Ab P8 zeigen auch die sog. „Riesenneurone“ in den tieferen Schichten des DCN eine Expression von Calbindin. NCX2 und NCX3 zeigten bei P4 ebenfalls eine Färbung innerhalb verschiedener Zelltypen des DCN (Abb. 22A, D; Abb. 25A, D), aufgrund ihres mittleren Durchmessers konnte ich jedoch keine dieser Neuronen den von Kane *et al.* (1981) definierten Riesenneuronen zuordnen (Tab. 6 und 8). Der von Kane *et al.*

(1981) definierte mittlere Durchmesser von mindestens 22 μm gilt dabei für adulte Katzen. Überraschenderweise wurden Riesenneurone in adulten Meerschweinchen mit noch größeren Somadurchmessern von mindestens 35 μm definiert (Hackney *et al.*, 1990). Für junge Ratten lagen leider keine Literaturangaben vor, so dass die vermessenen Zellen nur mit den beschriebenen Spezies verglichen werden konnten. Im Gegensatz zu P4 ergaben die Vergleiche mit Kane *et al.* (1981) bei P60 eine Färbung von Riesenneuronen für NCX1 (Tab. 5), NCX2 (Tab. 7) und NCX3 (Tab. 9). NCKX2-IR Riesenneurone konnten in keiner Altersstufe identifiziert werden (Tab. 10), wobei NCKX2 im adulten CN auch hauptsächlich im Neuropil exprimiert wird (Abb. 30A-F). Die Expression der NCX-Isoformen in den Riesenneuronen scheint demnach erst im späteren Verlauf der postnatalen Entwicklung von Bedeutung zu sein. Ob die Riesenneurone eine NCX-Expression gleichzeitig mit der Expression von Calbindin ab P8 aufweisen, könnte durch weitere Experimente geklärt werden.

NCX1 zeigte im DCN eine hauptsächliche Färbung des Neuropils (Abb. 18A, D, Abb. 21A, D), während NCKX2 auch IR-Signale innerhalb der Somata zahlreicher, über alle Schichten verteilter, Neurone zeigte (Abb. 29A, D, Abb. 30A, D). Wie schon erwähnt, konnten NCKX2-positive Riesenneurone nicht identifiziert werden. Im PVCN zeigen die Oktopuszellen eine Calbindin-Färbung ab der zweiten postnatalen Woche. Ausschließlich anhand der NCX-/NCKX-Färbung konnte die Zellmorphologie in meiner Arbeit nicht detailliert untersucht werden, so dass die Identifizierung weiterer Zelltypen, wie beispielsweise der Oktopuszellen, nicht möglich war. Im AVCN zeigen sich Calbindin-IR Fasern ab P15, die Stärke der Färbung nimmt dann bis P28 zu. Im VCN zeigt Calbindin damit ebenfalls nicht das für die NCX-Isoformen charakteristische Muster einer frühen Färbung des Neuropils und einer verstärkten Färbung der Somata im adulten Tier. Im adulten Tier wird jedoch sowohl Calbindin als auch NCKX2 im Neuropil des AVCN exprimiert. Dies weist darauf hin, dass das Neuropil des VCN auch im adulten Tier einen besonders hohen Bedarf an Ca^{2+} -exportierenden Mechanismen hat.

Im gesamten IC exprimieren Neurone Calbindin ab P3. Die Stärke der Färbung nimmt daraufhin bis P15 zu (Friauf, 1994a), mit weiter zunehmendem Alter sinkt die Zahl der gefärbten Neurone im ICc dann wieder. Ab P21 wird kaum mehr Calbindin im ICc exprimiert. Auch NCX2 und NCKX2 zeigten bei P4 eine Expression innerhalb der Somata aller IC-Regionen (Abb. 22, 29 je K, L), während NCX1 (Abb. 21B, C) und NCX3 (Abb. 25K, L) im ICc hauptsächlich im Neuropil detektiert wurden. In ICd und ICe zeigten mit

Ausnahme von NCX3 alle Isoformen eine Expression innerhalb der Somata. Bei P60 zeigten alle Isoformen eine Expression innerhalb der Somata von ICd und ICe, während der ICc eine im Vergleich stets schwächere Färbung zeigte, die auch stärker im Neuropil lokalisiert war (Abb. 21B, C; Abb. 24, 27, 30 je K, L). Da in meiner Arbeit keine Altersstufen zwischen P4 und P60 analysiert wurden, konnte die Expression der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher nicht mit der ab P15 stark abnehmenden Calbindin-Färbung im ICc verglichen werden. Festzustellen bleibt, dass sowohl Calbindin als auch die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher im adulten Tier nur eine schwache Expression im ICc zeigen. Im jungen Tier dagegen werden sowohl Calbindin als auch $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX2 und NCKX2 innerhalb der Somata, NCX1 und NCX3 im Neuropil) in allen Bereichen des IC exprimiert. Diese verstärkte Expression Ca^{2+} -regulierender Mechanismen könnte, wie zuvor schon erläutert (siehe 5.1.1), auf die hohen Ca^{2+} -Konzentrationen vor dem D/H-Wechsel bzw. vor der Präzisierung der tonotopischen Projektionen zurückzuführen sein.

Zusammenfassend verläuft die Expression von Calbindin während der Entwicklung des auditorischen Hirnstamms nicht in die gleiche Richtung wie die Expression der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher. Während letztere im Verlauf der Entwicklung eher vom Neuropil in die Somata verlagert wurden, zeigte Calbindin in den meisten Fällen eine Zunahme der Expression im Neuropil. Demnach könnte Calbindin im adulten Tier die Ca^{2+} -Regulation im Neuropil von den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern übernehmen. Für manche Entwicklungsstadien wurde, wie zuvor für die einzelnen Kerne erläutert, auch eine gleichzeitige Expression von Calbindin und den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern in Neuropil und/ oder Somata detektiert. Dies spricht dafür, dass die Kerne jeweils unterschiedliche Stadien in der Entwicklung aufweisen, in denen ein besonders hoher Bedarf an Ca^{2+} -Regulation besteht, beispielsweise um synaptische Plastizität zu garantieren (siehe auch 5.1.1). In den meisten Strukturen wurden die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher früher als Calbindin detektiert, alle untersuchten Isoformen zeigten bereits eine Expression ab P4. Ausnahme bildet die LSO, in der Calbindin schon embryonal nachgewiesen wurde. Sowohl Calbindin als auch die NCX-/NCKX-Isoformen zeigten im adulten Tier eine schwache Expression im ICc, dieser scheint demnach einen geringen Bedarf an Ca^{2+} -regulierenden Mechanismen zu haben oder aber die Ca^{2+} -Homöostase über andere Regulationsmechanismen aufrecht zu erhalten. Alles in allem zeigt die unterschiedliche Verteilung der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und von Calbindin, dass es sich bei diesen Ca^{2+} -regulierenden Proteinen nicht um redundante Mechanismen handelt.

5.1.2.3 Parvalbumin und Calretinin

Parvalbumin und Calretinin zeigen in den auditorischen Hirnstammkernen ein zumeist komplementäres Expressionsmuster (Lohmann und Friauf, 1996). Parvalbumin wird ab P8 im Neuropil sowie innerhalb der Somata von CN, SOC und IC exprimiert. Die Expression in Neuropil und Somata steigt bis zum Erreichen des adulten Expressionslevels bei ca. P28 in allen Bereichen der untersuchten Strukturen an. Damit wird Parvalbumin erst später exprimiert als die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und zeigt während der Entwicklung keine Umverteilung in Neuropil und Somata. Da Parvalbumin jedoch ab P8 sowohl im Neuropil als auch innerhalb der Somata exprimiert wird, kann man ab diesem Zeitpunkt von einer gleichzeitigen Expression von Parvalbumin und den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern in Neuropil bzw. innerhalb der Somata ausgehen.

Im Gegensatz zu Parvalbumin wird Calretinin in vielen *Nuclei* des auditorischen Hirnstamms bereits pränatal exprimiert und zeigt im Laufe der Entwicklung einen Rückgang der Färbung (Lohmann und Friauf, 1996).

Der DCN zeigt bei P4 hauptsächlich IR-Signale in den äußeren Schichten, während im adulten Tier die tieferen Schichten eine Färbung zeigen. Der PVCN zeigt schon pränatal einige wenige gefärbte Neurone, mit zunehmendem Alter steigen sowohl Anzahl der gefärbten Neurone als auch die Färbintensität. Im AVCN exprimieren zwischen P0 und P12 nur einige wenige Somata Calretinin, die Anzahl der gefärbten Neurone steigt jedoch bis P20 an. Im Neuropil wird Calretinin ab P12 exprimiert. Eine zunehmende Expression innerhalb der Somata des CN wurde demnach sowohl für Calretinin als auch für die NCX-Isoformen gezeigt. Im Gegensatz dazu steht die auch bei P60 noch vorwiegende Färbung des Neuropils für NCKX2 (Abb. 30A-F). Somit zeigt der CN sowohl im Expressionsmuster der NCX-Isoformen als auch durch die Expression von Parvalbumin und Calretinin eine im adulten Tier verstärkte Ca^{2+} -Regulation im Bereich der Somata. Für die Ca^{2+} -Regulation im Neuropil des adulten Tieres scheinen von den untersuchten Proteinen hauptsächlich NCKX2 und Parvalbumin sowie Calbindin zuständig zu sein.

Im SOC zeigen die LSO sowie einige perioliväre Gebiete nur eine transiente Expression von Calretinin. IR-Somata werden in diesen Strukturen bereits bei E20 detektiert. In der LSO steigt die Intensität der Färbung daraufhin bis P4 stark an. Nach P4 konnte in der LSO sowie den periolivären Regionen ein Rückgang der Calretinin-Immunreaktivität beobachtet werden,

so dass dort ab P20 keine IR-Neurone mehr detektiert wurden. Der MNTB zeigt schwächer gefärbte Somata, mit zunehmendem Alter nimmt hier die Färbung im Neuropil zu (Lohmann und Friauf, 1996). Kim *et al.* (2005a) konnten im Laufe der Entwicklung des MNTB eine Zunahme der Calretinin-positiven *Calyces* von Held nachweisen. Somit verläuft auch die Expression von Calretinin im SOC nicht parallel zur Expression der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher. Die pränatale Expression der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher wurde in meiner Arbeit nicht untersucht, so dass keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob Calretinin in der LSO bereits vor den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern exprimiert und ab P4 eventuell von letzteren abgelöst wird. Allerdings wurde, wie zuvor beschrieben, eine bereits embryonale Expression von Calbindin in der LSO gezeigt, die dann im Laufe der postnatalen Entwicklung von den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern abgelöst wird.

Im gesamten IC wird Calretinin bereits ab E20 exprimiert (Lohmann und Friauf, 1996). Nach P4 nimmt die Färbung im ICc drastisch ab, so dieser ab P28 keine IR-Signale mehr zeigt. Somata und Neuropil des ICd und ICe zeigen dagegen auch im adulten Tier noch IR-Signale für Calretinin. Auch für die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher wurden im adulten Tier IR-Signale hauptsächlich in ICd und ICe detektiert. Die Färbung des ICc war im Vergleich stets schwächer und zeigte eher eine Lokalisation im Neuropil. Somit zeigt der adulte ICc sowohl für die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher als auch für die Ca^{2+} -bindenden Proteine Calbindin und Calretinin eine schwache Expression und damit einen anscheinend geringeren Bedarf an Ca^{2+} -regulierenden Mechanismen in diesem Entwicklungsstadium. Ausschließlich Parvalbumin wird im adulten ICc stark exprimiert und scheint die Ca^{2+} -Regulation zu übernehmen. Die Expression weiterer Ca^{2+} -regulierender Proteine, wie beispielsweise der PMCA, bleibt noch zu untersuchen. ICd und ICe dagegen, welche, wie schon in der Einleitung erwähnt, hauptsächlich absteigende Projektionen aus höheren auditorischen Gebieten beinhalten, lassen durch das Expressionsmuster der Ca^{2+} -regulierenden Proteine einen über die gesamte Entwicklung hohen Bedarf an verschiedenen Ca^{2+} -regulierenden Mechanismen vermuten.

5.1.2.4 Zusammenfassung: Ca^{2+} -regulierende Proteine im auditorischen Hirnstamm

Ein Vergleich der Expressionsmuster der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher mit dem der PMCA ist aufgrund der bisher noch nicht untersuchten Expression der PMCA im auditorischen Hirnstamm nicht möglich. Da aber zumindest die PMCA-Isoformen 1 und 4 als Haushaltsgene gelten, ist eine parallele Expression wahrscheinlich.

Während im Laufe der Entwicklung die Expression der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher im Neuropil zugunsten der Lokalisation innerhalb der Somata abnahm, zeigt Calbindin in den meisten auditorischen Hirnstammstrukturen eine entwicklungsabhängige Zunahme der Expression im Neuropil. Zudem zeigten die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher eine frühere Expression als Calbindin. Auch Parvalbumin wird erst ab P8, also später als die NCX-Isoformen bzw. NCKX2, exprimiert. Parvalbumin wird ab P8 in allen untersuchten Altersstufen sowohl in Neuropil als auch innerhalb der Somata hoch exprimiert. Das Expressionsmuster von Parvalbumin überschneidet sich demzufolge mit der Expression der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher. Calretinin wird in LSO und ICc nur transient exprimiert.

Die verschiedenen Ca^{2+} -regulierenden Proteine scheinen sich demnach in ihrer Rolle im auditorischen Hirnstamm zu ergänzen. Schon frühere Studien zeigten, dass sich innerhalb eines Neurons Ca^{2+} -regulierende Mechanismen in Soma, Dendriten und Axon unterscheiden können (Mironov *et al.*, 1993). Als membranständige Proteine sind die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher zudem besonders geeignet, eine schnelle und effektive Ca^{2+} -Regulation lokal in der Nähe von Ca^{2+} -Kanälen, beispielsweise im Bereich von Synapsen, zu gewährleisten. Die mögliche Bedeutung der parallelen Expression mehrerer NCX- und NCKX-Isoformen wird unter 5.2.2 ausführlicher diskutiert. Ca^{2+} -bindende Proteine sind dagegen aufgrund ihrer Lokalisation im Cytoplasma als mobile Ca^{2+} -Puffer schnell zu Orten mit erhöhter Ca^{2+} -Konzentration rekrutierbar.

5.2 Untersuchung der Genexpression

5.2.1 Spleißvarianten

Um auch die *nckx*-Isoformen 3-6, gegen die bisher keine Antikörper verfügbar sind, zu untersuchen, wurde in meiner Arbeit die Genexpression aller *ncx*- und *nckx*-Isoformen (außer *nckx1*, da diese Isoform nur in der Retina exprimiert wird) per RT-PCR und qRT-PCR analysiert. Dabei zeigten in der RT-PCR alle untersuchten Isoformen eine Transkription in den auditorischen Hirnstammarealen zu beiden Altersstufen. Eine *in situ* Hybridisierung könnte in zukünftigen Experimenten eine Aussage über die Verteilung der einzelnen Isoformen innerhalb von CN, SOC und IC ermöglichen.

Die *nckx*-Isoformen 3-6 zeigten in der RT-PCR zusätzlich zu den erwarteten Banden noch weitere Banden (Abb. 31), bei denen es sich um Spleißvarianten handeln könnte. Für *nckx3* wurden bereits drei Spleißvarianten beschrieben (Schnetkamp, 2004), die alle durch alternatives Spleißen innerhalb der Nukleotidsequenz des großen intrazellulären Loops generiert werden. Das PCR-Produkt von *nckx3* umfasst die Basen 556-1031 (Kraev *et al.*, 2001). Translatiert man die Sequenz dieses PCR-Produktes in die Proteinsequenz (ExPASy Proteomics Server des Swiss Institute of Bioinformatics) und vergleicht diese mit der von Kraev *et al.* (2001) ermittelten vollständigen Proteinsequenz von NCKX3, so beginnt das PCR-Produkt auf Proteinebene zwischen den TMDs 4 und 5 (Nomenklatur M3 und M4 in Kraev *et al.*, 2001) bei Aminosäure 206 und endet im Bereich des großen intrazellulären Loops bei Aminosäure 343 (Abb. 2; Kraev *et al.*, 2001). Alternatives Spleißen im Bereich des intrazellulären Loops könnte demzufolge mit diesen Primern detektiert werden, wobei die genauen Stellen innerhalb des Loops, an denen Spleißen stattfindet, in der Literatur nicht angegeben sind (Schnetkamp, 2004). Somit ist es wahrscheinlich, dass es sich bei den zusätzlichen Banden in der PCR um Spleißvarianten von *nckx3* handelt.

Auch für *nckx4* wurde alternatives Spleißen innerhalb des intrazellulären Loops nachgewiesen. Li *et al.* (2002) konnten für die menschliche Sequenz von *nckx4* eine Region von Aminosäure 258 bis 276 innerhalb des intrazellulären Loops vorhersagen, in deren Nukleotidsequenz es wahrscheinlich zu alternativem Spleißen kommt. Vergleicht man die menschliche *nckx4*-Sequenz mit der aus der Ratte, so umfasst das in meiner Arbeit generierte *nckx4*-PCR-Produkt die Aminosäuren 403 bis 476 der menschlichen Sequenz nach Li *et al.*

(2002). Dabei handelt es sich um ein Stück des großen intrazellulären Loops sowie die TMDs 7 und 8 (M6 und M7 nach Kraev *et al.*, 2001; Abb. 3). Die von Li *et al.* (2002) postulierte Region für alternatives Spleißen liegt demnach nicht innerhalb dieses PCR-Produktes. In der Ratte wurden Spleißvarianten von *nckx4* noch nicht untersucht, so dass es nicht ausgeschlossen ist, dass es sich bei der zusätzlichen Bande in der PCR um eine Spleißvariante handelt.

Für *nckx5* wurden noch keine Spleißvarianten beschrieben, allerdings stellt *nckx5* die bisher am wenigsten charakterisierte Isoform dar. Diese Arbeit stellt die erste Untersuchung der NCKX5-Genexpression in einem spezifischen Areal des Gehirns dar. Zudem wurde die Transkription von NCKX5 in dieser Arbeit das erste Mal in der Ratte untersucht, Lamason *et al.* (2005) verwendeten für die Analysen eine Gesamthirnprobe der adulten Maus, auch unreife Tiere wurden daher bisher noch nicht analysiert.

Zusätzlich zum vollständigen NCKX6-Protein wurde in der Maus noch eine um ca. 50 bp verkürzte Variante detektiert (Palty *et al.*, 2004). Auch im Western Blot zeigten sich zwei Banden, eine 70 kDa Bande, die dem vollständigen Protein entspricht, sowie eine schwächere 55 kDa Bande, die bei einer Verkürzung um ca. 50 bp erwartet würde (Palty *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen *nckx*-Isoformen erfolgt das alternative Spleißen bei *nckx6* jedoch nicht in der Nukleotidsequenz des großen intrazellulären Loops, sondern innerhalb der TMD 9 (nach Aminosäure 470) und führt zu einer Verschiebung des Leserasters (Cai und Lytton, 2004a). Dadurch werden die letzten drei TMDs durch einen großen intrazellulären C-terminalen Schwanz ersetzt. Auf diese Weise fehlt in der verkürzten Spleißvariante der zweite α -repeat. Das in meiner Arbeit generierte PCR-Produkt umfasst die Aminosäuren 241 bis 339 und demnach einen Teil der TMD 5 sowie einen Großteil des intrazellulären Loops. Die zuvor beschriebene alternative Spleißen-Region liegt demzufolge nicht innerhalb dieses PCR-Produktes. Auch für *nckx6* wurden noch keine Spleißvarianten in der Ratte untersucht, so dass es sich bei der detektierten zweiten Bande um eine bisher noch nicht beschriebene Spleißvariante, die analog zu den anderen *nckx*-Isoformen ebenfalls im großen intrazellulären Loop entsteht, handeln könnte.

Somit weist meine Arbeit auf neue Spleißvarianten für *nckx4-6* hin, für die sich eine weitere Charakterisierung anbieten würde.

Die soeben beschriebenen putativen Spleißvarianten von *nckx4-6* wurden nur mittels PCR, nicht jedoch in der qRT-PCR detektiert. Die Schmelzkurven der qRT-PCR zeigten deutlich die Entstehung von jeweils einem einzigen PCR-Produkt für *nckx4-6* (vgl. Abb. 11B). Dies

kann an den im Vergleich zur PCR unterschiedlichen Reaktionsbedingungen liegen (3.12). So enthält der zur qRT-PCR verwendete „Absolute QRT-PCR SYBR Green Fluorescein Mix“ eine andere DNA-Polymerase (Thermo-Start DNA-Polymerase, ABgene), auf deren Spezifikationen von ABgene allerdings nicht näher eingegangen wird.

Für *nckx3* zeigte die Schmelzkurve der qRT-PCR die Entstehung von zwei PCR-Produkten (Abb. 11C). Da eine Differenzierung zwischen mehreren Produkten in der qRT-PCR nicht möglich ist, konnte für *nckx3* keine Quantifizierung erfolgen.

5.2.2 Ontogenetische Regulation der *ncx*- und *nckx*-Transkription

5.2.2.1 Höhe der Regulationsfaktoren

Der in meiner Arbeit kleinste signifikante Regulationsfaktor lag bei -1,1 (*ncx3* im SOC, Vergleich von P4 und P60), der höchste bei +10,9 (*nckx5* im IC, Vergleich von P4 und P60, Tab. 17). Die Vergleiche der verschiedenen auditorischen Strukturen innerhalb einer Altersstufe ergaben kleinere Unterschiede als der Vergleich der beiden Altersstufen. Insgesamt lagen die meisten Regulationsfaktoren unter zwei (Tab. 17-19).

Ohne Informationen über die Proteinexpression, wie in meiner Arbeit für NCKX3-6 der Fall, stellt sich bei solchen relativ kleinen Regulationsfaktoren zunächst die Frage der physiologischen Relevanz. Diese kann mit den in meiner Arbeit durchgeführten Experimenten zwar nicht direkt beantwortet werden, allerdings wurde bei Untersuchungen an anderen Systemen gezeigt, dass auch Regulationsfaktoren kleiner zwei physiologisch relevante Auswirkungen haben: So befasste sich eine Studie mit der Stimulation der Rezeptor-Tyrosinkinase Tie2 durch Angiopoietin-1. Dabei verändert sich die von aktiviertem Tie2 ausgelöste Signalkaskade, wenn Tie2 an die Kontaktstellen zweier Zellen rekrutiert wird (Fukuhara *et al.*, 2008). Die Regulationsfaktoren der mittels qRT-PCR validierten, differenziell regulierten Gene nach Tie2-Stimulation lagen zwischen ca. 1,3 und 2,4. Trotz dieser relativ geringen Regulation führt die Aktivierung von Tie2 an Zell-Zell-Kontakten zur Stilllegung von Blutgefäßen, während die Aktivierung von Tie2 außerhalb dieser Kontaktstellen zur Angiogenese führt.

Auch eine Studie über die sog. Einschlusskörpermyositis (Askanas und Engel, 2006) zeigte in betroffenen Muskelfasern eine 1,2fach bis 2,4fach erhöhte Expression von proinflammatorischen Chemokinen (Schmidt *et al.*, 2008). Die durch diese Mediatoren hervorgerufene Entzündung führt letztendlich zur Zerstörung von Muskelfasern.

Diese Beispiele zeigen, dass auch eine relativ geringe Veränderung des Genexpressionslevels signifikante funktionelle Auswirkungen haben kann. Letztlich muss für NCKX3-6 jedoch zunächst die Proteinexpression im auditorischen Hirnstamm untersucht werden. Eine gute Korrelation zwischen mRNA- und Proteinexpression wurde für NCX1-3 in verschiedenen Hirnstammstrukturen bereits gezeigt (Papa *et al.*, 2003), so dass auch für die verwandten NCKX3-6 eine Korrelation wahrscheinlich ist.

5.2.2.2 Verstärkte Transkription der *ncx*-Isoformen und verminderte Transkription der *nckx*-Isoformen im Verlauf der Ontogenese

Die qRT-PCR zeigte für *ncx1* und *ncx2* in sämtlichen untersuchten Strukturen eine verstärkte Genexpression bei P60, während *nckx2*, *nckx4* (mit Ausnahme des IC der keine signifikante Regulation zeigte) sowie *nckx6* eine verminderte Genexpression bei P60 aufwiesen. Bei P60 zeigte *nckx5* in CN und IC eine erhöhte Transkription, während im SOC eine verminderte Genexpression detektiert wurde (Abb. 32). Somit zeigten die *ncx*-Isoformen im Verlauf der Entwicklung meist eine verstärkte Transkription, während die *nckx*-Isoformen in den meisten Fällen eine verminderte Transkription im adulten Tier zeigten. Unterschiede in der ontogenetischen Regulation finden sich demnach eher zwischen den Na⁺/Ca²⁺-Austauscher-Familien als zwischen den einzelnen Isoformen (siehe auch 5.2.2.3).

Auch in anderen Gehirnregionen wurde die gleichzeitige Expression mehrerer NCX- und NCKX-Isoformen detektiert, so beispielsweise im olfaktorischen System (Annunziato *et al.*, 2007; Pyrski *et al.*, 2007), im *Neocortex* (Annunziato *et al.*, 2007) oder in der Übersicht über das gesamte Gehirn von Papa *et al.* (2003). Letztere konnten mittels *in situ* Hybridisierung *ncx1*-Transkripte in LSO und SPN nachweisen. Die anderen *Nuclei* des SOC sind in dem gezeigten Hirnschnitt (Abb. 10C in Papa *et al.*, 2003) nur undeutlich zu erkennen, im Bereich der MSO wurden *ncx1*-Transkripte detektiert, der Bereich des MNTB zeigte nur schwache Signale. Demzufolge wird durch diese Studie die in meiner Arbeit gezeigte Transkription von *ncx1* im SOC der adulten Ratte zum einen bestätigt, zum anderen eine Transkription von *ncx1* in sämtlichen *Nuclei* demonstriert. Eine Proteinexpression von NCX1 in allen *Nuclei* des SOC wurde in meiner Arbeit gezeigt (Abb. 18, 21).

Im olfaktorischen System wurde sogar eine differenzielle Transkription der verschiedenen Spleißvarianten von *ncx1* nachgewiesen, was die Redundanz der Na⁺/Ca²⁺-Austauscher noch

weiter erhöht (Pyrski *et al.*, 2007). In meiner Arbeit wurde nicht zwischen verschiedenen Spleißvarianten unterschieden.

Im Gegensatz zum in meiner Arbeit untersuchten auditorischen System nahm die Transkription von *ncx1* im Myokard im Laufe der postnatalen Entwicklung ab (Boerth und Artman, 1996; Cernohorsky *et al.*, 1998). Im cerebralen *Cortex* wurde eine im Laufe der Entwicklung verminderte Transkription von *ncx1-3* detektiert (Sakaue *et al.*, 2000), in cerebrocortikalen Terminalen älterer Ratten konnte eine verminderte NCX1-Aktivität nachgewiesen werden (Canzoniero *et al.*, 1992). Somit stellt die in meiner Arbeit detektierte, meist verstärkte Transkription der *ncx*-Isoformen im Laufe der Entwicklung kein generell beobachtetes Phänomen dar, sondern scheint an die besonderen Anforderungen (siehe 2.6) des auditorischen Hirnstammes angepasst zu sein.

nckx2-Transkripte wurden über sämtliche Hirnregionen verteilt detektiert, v.a. in tieferen Schichten des *Cortex* sowie im *Hippocampus*, der Molekularschicht des *Cerebellums* sowie in rostralen Regionen der *Pons* (Lytton *et al.*, 2002). Der IC zeigte in dieser Studie eine eher moderate Transkription. Auch in meiner Arbeit wurde eine Transkription von *nckx2* im IC nachgewiesen. Dabei wurde *nckx2* im IC höher exprimiert als im CN; IC und SOC zeigten keine signifikanten Unterschiede im Expressionslevel (Abb. 34). Da in den gezeigten *in situ* Hybridisierungen (Lytton *et al.*, 2002) ausschließlich Sagittalschnitte dargestellt sind, können die weiteren auditorischen Strukturen anhand dieser Publikation nicht näher analysiert werden. Demzufolge zeigt *nckx2* eine weit verbreitete Genexpression in verschiedenen Gehirnarealen, zu denen nach meiner Arbeit auch CN, SOC und IC gehören.

nckx3 zeigte eine selektive Expression in Schicht 4 des *Neocortex*, in der CA1-Region des *Hippocampus*, der Molekularschicht des *Cerebellums* sowie in einigen Kernen des *Thalamus* (Lytton *et al.*, 2002). *nckx4*-Transkripte zeigten die gleichmäßigste Verteilung der drei untersuchten Isoformen im Gehirn, wobei auch hier einige Gebiete wie die CA1- und CA3-Regionen sowie der *Gyrus dentatus* des *Hippocampus*, die Körnerschicht des *Cerebellums* sowie der *Bulbus olfactorius* eine besonders starke Genexpression zeigten.

Im Gesamthirn wurde die ontogenetische Regulation der Transkription von *nckx2-4* ebenfalls von Lytton *et al.* (2002) untersucht. Dabei wurde eine Genexpression von *nckx2* erst ab P0 detektiert und erreichte ihr von da ab anhaltendes Maximum nach vier Wochen. Im Gegensatz dazu zeigte meine Arbeit eine in CN, SOC und IC verminderte Transkription bei P60 im Vergleich zu P4. Der auditorische Hirnstamm zeigt demnach eine im Vergleich zum Gesamthirn abweichende Regulation der *nckx2*-Transkription, was wiederum für eine besondere Ca^{2+} -Regulation in diesen Arealen spricht. Für *nckx3* wurde dagegen schon eine

embryonale Genexpression gezeigt, mit maximaler Transkription bei P2 (Lytton *et al.*, 2002). Der weitere Verlauf der Transkription nach P2 wird in dieser Publikation nicht beschrieben. In meiner Arbeit konnte die Genexpression von *nckx3*, wie schon zuvor erwähnt, nicht quantitativ untersucht werden, daher wurde ausschließlich qualitativ eine Genexpression von *nckx3* in CN, SOC und IC nachgewiesen (Abb. 31). *nckx4* zeigte embryonal eine stärkere Genexpression als *nckx3* (Lytton *et al.*, 2002). Die Transkription nahm dann während der ersten postnatalen Wochen ab, stieg aber nach der Stillzeit wieder an. In älteren Tieren wurde wiederum eine Abnahme der Genexpression nachgewiesen. In meiner Arbeit zeigte *nckx4* in CN und SOC ebenfalls eine bei P60 im Vergleich zu P4 verminderte Transkription (Abb. 32). Der auditorische Hirnstamm stellt somit nicht die einzige Gehirnregion dar, in der mehrere *ncx*- und *nckx*-Isoformen gleichzeitig exprimiert werden. Allerdings untersucht meine Arbeit als erste die Transkription aller *ncx*- und *nckx*-Isoformen (mit Ausnahme von *nckx1*, siehe 2.4) in einer spezifischen Geweberegion. Die ontogenetische Regulation von *nckx2-4* im Gesamthirn wurde bereits von Lytton *et al.* (2002) untersucht. Für *nckx2* zeigen CN, SOC und IC eine vom Gesamthirn abweichende Regulationsrichtung (verminderte Transkription bei P60), während *nckx4* sowohl in den auditorischen Hirnstammkernen als auch im Gesamthirn im Alter vermindert exprimiert wird.

5.2.2.3 Funktionelle Unterschiede zwischen den NCX- und NCKX-Isoformen

In meiner Arbeit zeigten sich in der Entwicklung, wie schon erwähnt, hauptsächlich Unterschiede im Expressionsmuster zwischen den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher-Familien. Vergleicht man nun deren funktionelle Eigenschaften, so ist der offensichtlichste Unterschied die zusätzliche Kopplung der NCKX-Isoformen an den K^+ -Gradienten. Damit sind NCKX in der Lage, Ca^{2+} in Situationen, in denen der Na^+ -Gradient vermindert ist, effektiver zu exportieren als NCX-Isoformen (Tsoi *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006). Besonders Zellen, die hohe Fluktuationen in der Na^+ -Konzentration aufweisen, können daher über NCKX einen effektiven Ca^{2+} -Transport gewährleisten (Lee *et al.*, 2002; Lytton, 2007). Dies trifft auf Neurone im Allgemeinen und besonders auf die mit hoher AP-Frequenz feuernden Neurone des auditorischen Hirnstammes zu. So wurden für MNTB-Neurone AP-Raten von bis zu 600 Hz gemessen (Kim *et al.*, 2005a). In den bei P4 noch unreifen Neuronen des auditorischen Hirnstammes wirken zudem, wie schon zuvor erläutert, auch inhibitorische Transmitter wie GABA und Glycin depolarisierend, die Neurone befinden sich vor dem sog. D/H-Wechsel (Kandler und Friauf, 1995a) siehe 5.1.1.3). Diese Depolarisation führt zu einem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom in die Neurone, gleichzeitig wird der Na^+ -Gradient durch die erhöhte Anzahl eingehender APs vermindert. Die in meiner Arbeit dokumentierte verstärkte Expression von NCKX-Isoformen im unreifen Stadium würde damit die Effektivität des Ca^{2+} -Exports erhöhen und die für die Entwicklung der Neurone wichtigen Ca^{2+} -Signale zeitlich formen.

Des Weiteren ist eine Umkehr der Transportrichtung (siehe auch 2.3) unter physiologischen Bedingungen bei NCKX eher unwahrscheinlich. Zudem sind NCKX in der Lage, niedrigere Ca^{2+} -Konzentrationen aufrecht zu erhalten als NCX (Lytton *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). Ein Beitrag der umgekehrten Transportrichtung der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher zum Ca^{2+} -Einstrom nach Glutamat-Ausschüttung wurde von Lytton (2007) postuliert. Dieser Effekt kommt laut dieser Publikation hauptsächlich durch einen Anstieg in der intrazellulären Na^+ -Konzentration nach repetitiven APs zum Tragen. Dadurch soll die Na^+ -Konzentration in lokalen Mikrodomänen kurzfristig (im Millisekundenbereich) so stark ansteigen, dass dies zusammen mit der Membrandepolarisation zu einer Umkehr des Na^+ -Gradienten führt. Die darauf folgende Umkehr der NCX soll zu den kumulativen Langzeiteffekten von Ca^{2+} beitragen. Eine solche Umkehr wurde u.a. für NCX1 im Myokard bereits gezeigt (Bers, 2002). Allerdings sind die APs mit ca. 300 ms im Myokard deutlich länger als in Neuronen (ca. 1-5

ms; Klinke und Silbernagl, 2003), so dass ein Langzeiteffekt durch Umkehr der NCX während des in Neuronen maximal ca. 2 ms dauernden AP-„Overshoots“ meiner Meinung nach eher unwahrscheinlich ist.

Die physiologische Bedeutung der zahlreichen Isoformen und Spleißvarianten innerhalb einer Familie ist zum derzeitigen Zeitpunkt noch nicht hinreichend geklärt, eine Möglichkeit wären jedoch unterschiedliche Regulationsmechanismen (siehe folgende Kapitel).

5.2.2.3.1 Regulation der NCX-Isoformen

Sowohl für die NCX- als auch für einige NCKX-Isoformen wurden Phosphorylierungen und Glykosylierungen nachgewiesen, welche die Transportaktivität beeinflussen; zudem wurden, v.a. für NCX-Isoformen, verschiedene interagierende Proteine identifiziert (Lytton, 2007). Dabei zeigen die Isoformen innerhalb einer Familie oft ähnliche Mechanismen: so reagieren NCX1-3 ähnlich auf Veränderungen des pH oder Behandlung mit diversen Inhibitoren (Linck *et al.*, 1998; Annunziato *et al.*, 2004c). Die Aktivität von NCX1 und NCX3, nicht aber NCX2, wird durch eine Aktivierung der Proteinkinasen A und C in moderatem Maße erhöht. Eine Besonderheit in der Regulation von NCX3 ist die Tatsache, dass es sich hierbei um das einzige Mitglied der NCX-Familie handelt, das in der Abwesenheit von ATP aktiv ist (Annunziato *et al.*, 2004d). Daher wird über eine besondere Rolle von NCX3 bei Ischämie spekuliert (Molinario *et al.*, 2008). Eine Erklärung für die Tatsache, dass *ncx3* als einzige *ncx*-Isoform im adulten SOC vermindert exprimiert wird, liefern die bisherigen Erkenntnisse jedoch nicht. Alle NCX-Isoformen zeigen zudem gleiche Affinitäten für die transportierten Ionen (Ca^{2+} : $K_m = 100\text{-}400 \mu\text{M}$; Na^+ : $10\text{-}60 \text{mM}$; (Annunziato *et al.*, 2004e; Visser *et al.*, 2007), letztere wirken außerdem auf die gleiche Weise regulierend auf NCX1-3 (siehe auch 2.3).

5.2.2.3.2 Regulation von NCKX2-4

Über die Regulation der NCKX-Isoformen ist generell weniger bekannt als über die Regulation der NCX, einen Überblick gibt Lytton (2007). NCKX2-4 zeigen gleiche Affinitäten für Ca^{2+} ($K_m = \text{ca. } 100 \mu\text{M}$) und Na^+ ($K_m = \text{ca. } 30 \text{mM}$), die Affinität für K^+ ist jedoch für NCKX3 und NCKX4 deutlich höher (NCKX2: $K_m = 40 \text{mM}$, NCKX3-4: $K_m = 1 \text{mM}$; (Visser *et al.*, 2007). Die physiologische Bedeutung dieser unterschiedlichen K^+ -Affinitäten ist noch nicht geklärt, die Isoformen scheinen auf Regionen mit unterschiedlichen K^+ -Schwankungen spezialisiert zu sein. So ist NCKX2 aufgrund seiner niedrigeren K^+ -Affinität besonders für Regionen mit hohen K^+ -Schwankungen geeignet, beispielsweise in der

Nähe von K^+ -Kanälen, wo es zu lokal hohen Schwankungen kommt. Auch in Neuronen kommt es während der APs lokal zu Schwankungen in der K^+ -Konzentration, diese sind allerdings durch die kurze AP-Dauer auf wenige Millisekunden begrenzt (Klinke und Silbernagl, 2003), so dass ihr möglicher Einfluss auf die Na^+/Ca^{2+} -Austauscher noch experimentell geklärt werden müsste. Die Affinität von NCKX5 wurde bisher noch nicht untersucht. NCKX6 zeigt eine Ca^{2+} -Affinität mit einer K_m von ca. 800 μM sowie eine Na^+ -Affinität mit einer K_m von ca. 60 mM, die K^+ -Affinität wurde noch nicht untersucht (Palty *et al.*, 2004). Somit zeigt NCKX6 eine deutlich geringere Affinität für Ca^{2+} und ist dadurch in der Lage, einen Ca^{2+} -Export auch bei höheren Ca^{2+} -Konzentrationen, bei denen die anderen Isoformen bereits gesättigt sind, zu gewährleisten. Auf die Eigenschaften von NCKX6 wird im Folgenden (5.2.2.3.4) weiter eingegangen.

NCKX2 besitzt im großen cytoplasmatischen Loop ein Phosphorylierungsmotiv für die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase, dessen regulatorische Funktion bisher allerdings noch nicht untersucht wurde (Lytton, 2007). Zudem ist NCKX2 bei heterologer Expression in menschlichen embryonalen Nierenzellen (human embryonic kidney, HEK) in der Lage, zu oligomerisieren. Aufgrund des Molekulargewichtes (265 kDa), welches deutlich über dem eines NCKX2-Dimers liegt (NCKX2-Monomer: 75 kDa), handelt es sich dabei entweder um Tri- bzw. Tetramere, oder aber um einen Komplex mit weiteren interagierenden Proteinen (Kang *et al.*, 2003). Des Weiteren zeigt NCKX2 eine Na^+ -abhängige Inaktivierung, ähnlich den NCX-Isoformen (siehe auch 2.3) sowie eine erhöhte Aktivität nach Phosphorylierung durch Proteinkinase C (Lytton, 2007). Ein solcher Effekt der Proteinkinase C wurde für NCKX3 und NCKX4 nicht nachgewiesen. Eine Proteinkinase C-abhängige Erhöhung der NCKX2-Transportaktivität konnte u.a. an der *Calyx* von Held im MNTB nachgewiesen werden (Lee *et al.*, 2006; Lytton, 2007). Dabei führt höchstwahrscheinlich Glutamat über metabotrope Rezeptoren zur Aktivierung der Proteinkinase C. Eine starke Expression von NCKX2 im MNTB wurde auch in meiner Arbeit gezeigt.

Auch wenn noch nicht viele Regulationsmechanismen der NCKX-Isoformen bekannt sind, so sprechen die bisher gezeigten Unterschiede zwischen den NCKX-Isoformen bzw. zwischen den NCKX- und den NCX-Isoformen gegen eine vollständige Redundanz der Ca^{2+} -Regulation durch die zahlreichen NCX- und NCKX-Isoformen. So zeigt der Phänotyp der NCKX2-KO-Maus mit verminderter LTP und verstärkter LTD im *Hippocampus* (siehe 5.1.1.4), dass der Verlust von dieser Isoform nicht durch weitere NCKX-Isoformen, welche aufgrund von verbleibenden K^+ -abhängigen Na^+/Ca^{2+} -Strömen in ihrer Aktivität nachgewiesen wurden, kompensiert werden kann (Li *et al.*, 2006).

5.2.2.3.3 Regulation von NCKX5

NCKX5 scheint im adulten CN und IC eine besondere Rolle zu spielen, da *nckx5* die einzige *nckx*-Isoform darstellt, deren Genexpression im Laufe der Entwicklung hochreguliert wird. Mit einer im Vergleich zu P4 fast 11fach verstärkten Transkription im IC weist *nckx5* zugleich den höchsten Regulationsfaktor auf. Der hohe Standardfehler von $\pm 7,95$ (Tab. 17) ist damit zu begründen, dass zwei der biologischen Replikate jeweils um einen Faktor von $12,0 (\pm 3,59)$ bzw. $11,9 (\pm 0,73)$ verstärkt exprimiert wurden, das dritte Tier jedoch nur einen Regulationsfaktor von $2,2 (\pm 0,18)$ aufwies.

NCKX5 stellt, wie bereits erwähnt, die bisher am wenigsten charakterisierte NCKX-Isoform dar. Nachgewiesen wurde diese Isoform erstmals von Lamason *et al.* (2005) als K^+ -abhängiger Na^+/Ca^{2+} -Austauscher, der die Pigmentierung in Zebrafisch und Mensch beeinflusst. Immunhistochemische Untersuchungen an Green Fluorescent Protein (GFP)- bzw. Hämagglutinin-markiertem NCKX5 zeigten eine unerwartete Expression in intrazellulären Membranen (Lamason *et al.*, 2005). In der Plasmamembran konnte NCKX5 weder immunhistochemisch noch funktionell nachgewiesen werden (Ginger *et al.*, 2008d). Demnach scheint NCKX5 im Gegensatz zu den anderen Na^+/Ca^{2+} -Austauschern hauptsächlich für die Ca^{2+} -Regulation innerhalb von Organellen zuständig zu sein.

Kolokalisationsexperimente zeigten eine Expression von NCKX5 im Trans-Golgi-Netzwerk humaner epidermaler Melanozyten (Ginger *et al.*, 2008c). Dies führte zur Diskussion zweier putativer Mechanismen, über die NCKX5 die Pigmentierung regulieren kann: Zum einen könnte eine Ca^{2+} -Akkumulation im Golgi-Apparat über NCKX5 eine Fusin-ähnliche Protease aktivieren, wobei die Transportaktivität von NCKX5 an einen Na^+/H^+ -Austauscher und dieser wiederum an eine V-ATPase gekoppelt ist. Die auf diese Weise aktivierte Fusin-ähnliche Protease ist in die Prozessierung des Melanosomalen Scaffold Proteins 17 (pmel17) involviert (Lamason *et al.*, 2005; Ginger *et al.*, 2008b). Zum anderen könnte NCKX5 die Melanogenese über einen Einfluss auf die korrekte Sortierung der Proteine aus dem Golgi-Apparat regulieren (Ginger *et al.*, 2008a).

Somit stellt NCKX5 die einzige Na^+/Ca^{2+} -Austauscher-Isoform dar, für die eine ausschließliche Rolle in der Ca^{2+} -Regulation von Organellen nachgewiesen wurde. Diese Besonderheit könnte eine verstärkte Expression im Vergleich zu den anderen Isoformen begründen, es bleibt jedoch zu untersuchen, warum dies im CN und besonders im IC eine besondere Rolle im adulten Tier spielt. Einen Hinweis geben Studien, die eine im Verlauf der postnatalen Entwicklung verstärkte Ca^{2+} -Regulation über intrazelluläre Speicher wie die Mitochondrien postulieren. So wurde eine im Laufe der Entwicklung verstärkte Expression

von Calretinin in der *Calyx* von Held gezeigt (Felmy und Schneggenburger, 2004). Aus der verstärkten Expression dieses Ca^{2+} -puffernden Proteins folgern Kim *et al.* (2005a) eine verstärkte Rolle der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme mit zunehmender Reifung der *Calyx* von Held.

5.2.2.3.4 Regulation von NCKX6

NCKX6 unterscheidet sich als einzige Isoform funktionell deutlich von den anderen NCKX. So ist NCKX6 in der Lage, Na^+ durch Li^+ zu substituieren und auf diese Weise einen K^+ -unabhängigen $\text{Li}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch durchzuführen (Palty *et al.*, 2004; Lytton, 2007). Die physiologische Bedeutung dieses Li^+ -Transports bleibt zu klären. Dieser zusätzliche Transportmechanismus gibt daher noch keinen konkreten Hinweis auf eine besondere Rolle von NCKX6 im auditorischen Hirnstamm. Aufgrund dieser einzigartigen Transportaktivität wird NCKX6 jedoch, wie schon unter 2.5 erwähnt, von einigen Autoren in eine eigene Familie innerhalb der Kationen/ Ca^{2+} -Austauscher-Superfamilie eingeordnet (Palty *et al.*, 2004; Lytton, 2007).

Alternatives Spleißen von NCKX6 resultiert, wie schon erwähnt (5.2.1), in ein deutlich verkürztes Protein. Diese Spleißvariante wird zwar schwächer als das vollständige Protein, aber dennoch abundant exprimiert. Bei heterologer Expression der Spleißvarianten in HEK-Zellen wurde das vollständige Protein ausschließlich im ER detektiert, während die verkürzte Spleißvariante in der Plasmamembran lokalisiert war (Cai und Lytton, 2004a). Eine endogene Expression von NCKX6 im ER könnte demnach auf eine besondere Rolle von NCKX6 (ähnlich wie bei NCKX5) in der Ca^{2+} -Regulation des ERs hinweisen.

Der verkürzten Spleißvariante von NCKX6 fehlt durch Verschiebung des Leserasters der zweite sog. α -repeat, dennoch ist diese Form von NCKX6 funktionell (Palty *et al.*, 2004; Cai und Lytton, 2004a). Es bleibt zu untersuchen, ob diese Funktionalität auf Oligomerisierung bzw. Interaktion mit weiteren Proteinen beruht (Lytton, 2007). Eine zur Funktionalität führende Dimerisierung verkürzter Varianten von NCX1 wurde bereits gezeigt (Gabellini *et al.*, 1996; Li und Lytton, 1999).

5.3 Antikörperspezifität

Die Immunhistochemie wird generell als wertvolle Methode zur Analyse der Lokalisation von Proteinen auf zellulärer und subzellulärer Ebene angesehen. Allerdings hängt die Aussagekraft immunhistochemischer Analysen entscheidend von der Spezifität der verwendeten Antikörper ab. Die Kriterien, die zur Beurteilung der Qualität der in meiner Arbeit verwendeten Antikörper führten, sind abschließend unter 5.3.3 zusammengefasst.

Notwendige Kontrollexperimente sowie Gefahren bei der Auswertung immunhistochemischer Färbungen wurden kürzlich von Fritschy (2008) zusammengefasst: So wird die Bindung von Antikörpern durch Faktoren wie Gewebequalität, -fixierung und -verarbeitung in großem Maße beeinflusst. Die Gewebefixierung dient dem Ziel, den *in vivo* Zustand des Gewebes weitgehend zu erhalten. Da das Fixativ jedoch die chemischen Eigenschaften des Gewebes sowie Proteinkonformationen durch Vernetzungen ändert, beeinflusst dies auch die Affinität der Antikörper. So können Epitope der Antikörper maskiert oder die Penetration des Gewebes erschwert werden. Erfolgt die Fixierung, wie auch in meiner Arbeit, mittels Perfusion, so können verschiedene Faktoren den kardiovaskulären Durchfluss und damit Geschwindigkeit und Stärke der Perfusion beeinflussen. Eine schlechte Perfusion kann zu regionalen Unterschieden in der Fixierungsstärke und damit auch zu regionalen Unterschieden in der IHC-Färbung führen, die nicht auf Expressionsunterschiede des Zielproteins zurückzuführen sind. Zudem wurde gezeigt, dass eine Ischämie auf Grund einer zu langsamen Fixierung zur Umverteilung bzw. Internalisierung von Proteinen führen kann (Tong *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006). Auch mechanische oder chemische Schäden am Schnitt können unspezifische Bindungen fördern. Demnach muss die optimale Gewebepreparation für jedes Antigen experimentell erarbeitet werden und einen Kompromiss zwischen Gewebe- und Antigenerhaltung darstellen.

Im Rahmen meiner Arbeit wurden daher verschiedene Arten der Fixierung und Antigendemaskierung für alle vier Antikörper getestet. So wurden verschiedene Fixative wie 4% PFA-Lösung, Zamboni-Lösung (Stefanini *et al.*, 1967) und Methanol (on-slide Fixierung bei -20 °C) sowie unterschiedliche Fixierzeiten (Perfusion sowie on-slide Fixierung für 5 min, 10 min und 20 min) getestet. Zudem wurden zur Antigendemaskierung eine Mikrowellenbestrahlung während der Fixierung (Fritschy *et al.*, 1998) bzw. ein pH-Wechsel während der Perfusion (15 min Fixierung mit 4% PFA in Acetatpuffer, pH 6,5 gefolgt von

30 min Fixierung mit 4% PFA in Boratpuffer, pH 11) durchgeführt. Das beste Färbeergebnis wurde mit den unter 2.6 beschriebenen Bedingungen (Perfusion mit 4% PFA) erreicht.

Des Weiteren fordern Fritschy (2008) sowie Saper (2005; 2009) umfangreiche Kontrollversuche, um falsch-positive IR-Signale auszuschließen. Diese könnten aufgrund von im Gewebe vorhandenen autofluoreszierenden Molekülen oder bestimmten Enzymen auftreten. Zu diesem Zweck in meiner Arbeit ungefärbt unter dem Epifluoreszenzmikroskop betrachtete Schnitte mit CN und SOC bzw. IC (jeweils P60) zeigten keinerlei Fluoreszenz. Um auszuschließen, dass der Sekundärantikörper alleine eine Färbung verursacht, wurden auch Schnitte ausschließlich mit Sekundärantikörper inkubiert. Auch hier wurden keine IR-Signale detektiert. Eine weitere Kontrolle gegen falsch-positive Signale stellt die Färbung von Gewebearealen oder KO-Tieren, in denen das Zielprotein nicht exprimiert wird, dar. Derzeitig ist keine Gehirnregion bekannt, in der NCX1-3 bzw. NCKX2 nicht exprimiert werden. KO-Tiere, in denen die entsprechende Isoform auch im Gehirn nicht exprimiert wird, wurden bisher für NCX2 (Jeon *et al.*, 2003), NCX3 (Sokolow *et al.*, 2004) und NCKX2 (Li *et al.*, 2006) generiert. Eine Kontrollfärbung im auditorischen Hirnstamm dieser Tiere könnte weiteren Aufschluss über die Spezifität der Antikörper geben. Eine ebenfalls von Fritschy (2008) vorgeschlagene Kontrolle stellt der Vergleich des Färbemusters eines Antikörpers für ein bestimmtes Zielprotein mit den IR-Signalen eines weiteren Antikörpers, welcher gegen ein anderes Epitop desselben Proteins generiert wurde, dar. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit für NCX2 und NCX3 durchgeführt (siehe 4.1.5 und 4.2) und wird unter 5.3.2 diskutiert. Auch ein Vergleich der IHC mit Genexpressionsdaten dient zumindest als weiterer Hinweis, ob eine Proteinexpression in den entsprechenden Zellen oder Geweben überhaupt erwartet werden kann. Vorzugsweise eignet sich hierzu die *in situ* Hybridisierung. Im Rahmen meiner Arbeit wurden die IHC-Resultate mit den Ergebnissen der RT-PCR verglichen. Diese gibt, im Gegensatz zur *in situ* Hybridisierung, keinen Aufschluss über die zelluläre Lokalisation der Transkripte im Gewebe und wird im Detail unter 5.2 diskutiert.

5.3.1 Untersuchung der Antikörperspezifität mittels Western Blot

Die Spezifität der in meiner Arbeit verwendeten Antikörper wurde von mir schließlich auch mittels Western Blots überprüft. Dabei wurde fraktioniertes Gesamthirn einer WT-Maus bzw. Ratte sowie als Negativkontrolle fraktioniertes Gesamthirn einer NCX3 KO-Maus (Sokolow *et al.*, 2004) bzw. fraktionierte BHK-Zellen, welche endogen keine Na⁺/Ca²⁺-Austauscher exprimieren (Linck *et al.*, 1998), verwendet.

5.3.1.1 NCX1

Der verwendete NCX1-Antikörper von Swant zeigte im Western Blot zwei prominente Banden, eine zwischen 110 und 120 kDa, welche dem erwarteten Molekulargewicht von 110 kDa entspricht (Nicoll *et al.*, 1990), sowie eine bei ca. 160 kDa (Abb. 12). Letztere wurde von Lytton (2007) als Hitze-induzierte Aggregate von NCX1 beschrieben, diese könnten während der Probenvorbereitung für den Western Blot entstehen. Die schwächere Bande bei 60 kDa stellt laut Lytton (2007) ein proteolytisches Fragment von NCX1 dar. In den BHK-Zellen wurden keine Banden detektiert, dies spricht dafür, dass es sich auch bei den sehr schwachen Banden bei ca. 40 kDa und 34 kDa um Abbauprodukte von NCX1 handelt. Diese Resultate sprechen daher für die Spezifität des Antikörpers, wobei ein KO-Gehirn eine bessere Kontrolle als die BHK-Zellen darstellen würde. KO-Gewebe stand mir für diese Untersuchungen leider nicht zur Verfügung, zumal globale Knockouts des NCX1-Proteins embryonal lethal sind (Wakimoto *et al.*, 2000). Ausschließlich Tiere, bei denen NCX1 spezifisch in 80-90% der Kardiomyozyten ausgeknockt wurde, sind vital (Koushik *et al.*, 2001; Henderson *et al.*, 2004). Somit wäre selbst mit diesem KO-Herzgewebe nicht hundertprozentig ausgeschlossen, dass der Antikörper unspezifisch an ausschließlich im Gehirn exprimierte Proteine bindet. Ein konditioneller KO von NCX1 im Gehirn wurde noch nicht generiert.

5.3.1.2 NCX2

Der zur IHC verwendete NCX2-Antikörper von Alpha Diagnostics International zeigte im Homogenat des Gesamthirns der WT-Maus mehrere Banden (Abb. 13). Eine Bande auf Höhe des erwarteten Molekulargewichts von 102 kDa (Pignataro *et al.*, 2004g) war überraschenderweise nicht zu erkennen. Die BHK-Negativkontrolle zeigte erwartungsgemäß keine Banden, was eine unspezifische Bindung an ein im Gehirn exprimiertes Protein allerdings nicht vollständig ausschließt. NCX2 KO-Gewebe (Jeon *et al.*, 2003) stand mir leider nicht zur Verfügung. Das zuvor beschriebene Bandenmuster wurde mit dem eines monoklonalen Antikörpers gegen NCX2 verglichen (Thurneysen *et al.*, 2002), welcher nur die oberste, ca. 200 kDa Bande, sowie die unterste 50 kDa Bande des polyklonalen Antikörpers detektierte (Abb. 13).

Beide Antikörper wurden zuvor schon von anderen Arbeitsgruppen verwendet. Für den polyklonalen NCX2-Antikörper zeigten Pignataro *et al.* (2004f) in NCX2-

überexprimierenden BHK-Zellen sowie in Hirngewebe der Ratte eine Bande, der sie ein Molekulargewicht von 102 kDa zuwies (Abb. 35A). Auf weitere Banden wurde in dieser Publikation nicht hingewiesen. Da nur ein kleiner Ausschnitt des entsprechenden Western Blots gezeigt wurde, ist ein näherer Vergleich mit dem von mir beobachteten Bandenmuster leider nicht möglich. Für den monoklonalen NCX2-Antikörper zeigten Thurneysen *et al.* (2002) in NCX2-überexprimierenden BHK-Zellen eine Bande bei ca. 60 kDa und in hippocampalen Kulturen zusätzlich zu dieser 60 kDa-Bande eine Bande bei ca. 54 kDa (Abb. 35B). Letztere scheint der in der vorliegenden Arbeit (Abb. 13) von beiden NCX2-Antikörpern detektierten Bande zu entsprechen. Eine dem Molekulargewicht von 102 kDa entsprechende Bande wurde auch in dieser Publikation im *Hippocampus* nicht detektiert. Die NCX2-überexprimierenden BHK-Zellen zeigten zahlreiche schwache Banden auf dieser Höhe (Abb. 35B). Auch Minelli *et al.* (2007) zeigten in *Hippocampus* und *Cerebellum* der Ratte eine starke Bande bei ca. 60 kDa, welche als Abbauprodukt von NCX2 beschrieben wurde. Sehr schwache Banden waren zusätzlich bei 250 kDa und ca. 100 kDa zu erkennen (Abb. 35C). In meiner Arbeit wurden zwei der Banden in Abb. 13 von beiden untersuchten Antikörpern detektiert. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei diesen um Aggregate oder Dimere (200 kDa) bzw. Degradationsprodukte (50 kDa) von NCX2 handelt. Über eine Oligomerisierung von NCX2 ist laut Literatur nichts bekannt, allerdings wurde für NCX1 (Ren *et al.*, 2008), NCKX1 (Schwarzer *et al.*, 1997) sowie NCKX2 (Cai *et al.*, 2002) gezeigt, dass diese dimerisieren können. Auch bei den weiteren, vom polyklonalen NCX2-Antikörper detektierten Banden, könnte es sich um Abbauprodukte sowie Aggregate dieser Abbauprodukte handeln. Dafür spricht, dass bereits in mehreren Publikationen gezeigt wurde, dass NCX2 besonders anfällig für proteolytischen Abbau ist (Linck *et al.*, 1998; Thurneysen *et al.*, 2002). Zudem wurden diese Banden in den BHK-Zellen, welche exogen kein NCX2-Protein exprimieren, nicht detektiert. Allerdings ist, wie schon zuvor erwähnt, nicht ausgeschlossen, dass es sich bei diesen Banden um eine unspezifische Bindung an ein im Gehirn exprimiertes Protein handeln könnte, welches wie NCX2 ebenfalls nicht endogen in BHK-Zellen vorkommt. Eine Möglichkeit, um zu untersuchen, ob die in meiner Arbeit detektierten Banden NCX2-Protein enthalten, würde die Massenspektrometrie bieten (siehe auch 5.3.3). Dazu müssten die Banden aus der Membran ausgeschnitten und die Proteine mittels eines SDS- und Triton-haltigen Puffers eluiert werden (Szewczyk *et al.*, 1998). Um die Komplexität der Proben zu reduzieren, würde sich anschließend eine reversed-phase high-performance-liquid-chromatography (RP-HPLC)-gekoppelter Elektronenspray-Ionisations (ESI)-Massenspektrometrie anbieten (Schindler *et al.*, 2008).

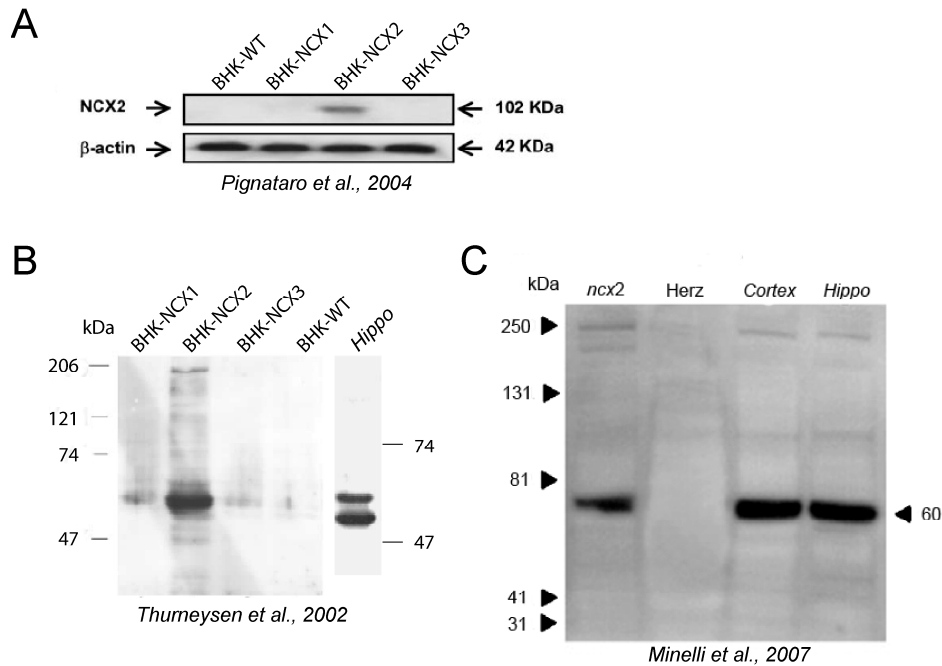


Abb. 35: Western Blots gegen NCX2 aus der Literatur

(A) Western Blot mit dem NCX2-Antikörper von Alpha Diagnostics International, Abbildung verändert aus Pignataro *et al.* (2004e). Nur BHK-Zellen, die NCX3 überexprimieren, zeigten eine Bande bei 102 kDa. (B) Western Blots mit dem monoklonalen NCX2-Antikörper von Prof. Porzig, Abbildung verändert aus Thurneysen *et al.* (2002). NCX2-überexprimierende BHK-Zellen zeigten eine starke Bande bei ca. 60 kDa, diese wurde schwächer auch in NCX1- und NCX3-überexprimierenden BHK-Zellen detektiert. Die NCX2-überexprimierenden Zellen zeigten noch weitere schwache Banden unterhalb und oberhalb der 60 kDa Bande. Im *Hippocampus* (*Hippo*) wurden zwei Banden, eine bei ca. 60 kDa sowie eine bei ca. 54 kDa detektiert. BHK-WT-Zellen zeigten keine Banden (C) Western Blot mit dem monoklonalen NCX2-Antikörper von Prof. Porzig. In NCX2-überexprimierenden BHK-Zellen (*ncx2*) sowie in *Cortex* und *Hippocampus* (*Hippo*) wurde eine starke Bande bei ca. 60 kDa detektiert. Sehr schwache Banden zeigten sich bei ca. 250 kDa und bei ca. 100 kDa. Im Herzgewebe wurden keine Banden detektiert. Abbildung verändert aus Minelli *et al.* (2007)

5.3.1.3 NCX3

Auch der zur IHC verwendete polyklonale NCX3-Antikörper von Alpha Diagnostics International zeigte auf dem Western Blot mit Mausgewebe mehrere Banden zwischen 100 und 200 kDa (Abb. 14). Die unterste dieser Banden (Pfeil in Abb. 14A) könnte dem erwarteten Molekulargewicht von 105 kDa entsprechen (Pignataro *et al.*, 2004d), allerdings wurden sämtliche Banden auch in dem als Negativkontrolle verwendeten NCX3 KO-Gehirngewebe detektiert (Abb. 14B). Dies konnte bei zwei KO-Gehirnen beobachtet werden. Auch für diesen Antikörper zeigten Pignataro *et al.*, (2004c) in NCX3-überexprimierenden BHK-Zellen eine einzige Bande auf Höhe des erwarteten Molekulargewichtes. Wie schon für

NCX2 ist aufgrund des in dieser Abbildung zurechtgeschnittenen Western Blots keine Aussage über weitere Banden möglich. Die schwächeren Banden bei 64 kDa und ca. 40 kDa wurden nur im KO-Gewebe detektiert und scheinen demnach schwache unspezifische Bindungen darzustellen.

Der zum Vergleich untersuchte, im Labor von Prof. Philipson hergestellte, polyklonale NCX3-Antikörper (Thurneysen *et al.*, 2002) detektierte ebenfalls mehrere Banden, sowohl im Wildtyp als auch im KO-Gewebe. Bis auf die Bande oberhalb von 148 kDa detektierte letzterer sämtliche, auch vom Alpha Diagnostics International Antikörper markierten Banden, allerdings mit unterschiedlichen Intensitäten. Zudem war bei dem Antikörper von Prof. Philipson noch eine Bande bei ca. 36 kDa zu erkennen, welche ein Abbauprodukt von NCX3 darstellen könnte.

Pignataro *et al.* (2004b) zeigten für den Antikörper von Prof. Philipson in NCX3-überexprimierenden BHK-Zellen eine starke Bande bei ca. 120 kDa sowie eine schwächere bei ca. 60 kDa. In kultivierten hippocampalen Zellen der Ratte detektierte der Antikörper laut dieser Publikation nur sehr schwache Banden. Auch Minelli *et al.* (2007) zeigten in *Cortex* und *Hippocampus* der Ratte eine starke Bande auf Höhe von 120 kDa, während sehr schwache Banden bei ca. 100 kDa und ca. 50 / 60 kDa zu erkennen sind. Diese Ergebnisse stimmen mit den in meiner Arbeit detektierten Banden nicht überein. Auch unter Verwendung der gleichen Puffer und Arbeitsschritte zur Probenvorbereitung (Gewebehomogenisierung sowie Vorbereitung der Proben für den Western Blot) wie Minelli *et al.* (2007) konnte das Bandenmuster dieser Publikation nicht reproduziert werden, was ebenfalls gegen die Qualität des Antikörpers spricht.

Geht man davon aus, dass die KO-Tiere, welche uns freundlicherweise von Prof. Annunziato (Università degli Studi di Napoli - Federico II, Neapel, Italien) zur Verfügung gestellt wurden, dort korrekt genotypisiert wurden, ist aufgrund dieser Ergebnisse leider davon auszugehen, dass es sich bei den Banden beider NCX3-Antikörper um unspezifische Bindungen handelt. Da keine der WT-Banden im KO fehlte, müsste man dieser Argumentation folgend allerdings auch annehmen, dass beide Antikörper das NCX3-Protein nicht detektieren. Auch um die mit beiden NCX3-Antikörpern detektierten Banden auf das Vorhandensein des NCX3-Proteins zu untersuchen, würde sich die Massenspektrometrie anbieten.

Da die IHC auf Rattengewebe erfolgte, habe ich die Antikörper im Western Blot ebenfalls auf Rattengewebe untersucht. Alle getesteten Antikörper zeigten ein anderes Bandenmuster als

auf Mausgewebe (Abb. 15). Sowohl die NCX2- und NCX3-Antikörper von Alpha Diagnostics International als auch der NCX3-Antikörper von Prof. Philipson detektierten jeweils eine Bande bei ca. 130 kDa. Für die NCX3-Antikörper stimmt diese wahrscheinlich mit der zuvor von Minelli *et al.* (2007) bei ca. 120 kDa beschriebenen starke Bande überein. Bei der vom NCX3-Antikörper von Prof. Philipson in Abb. 15 ebenfalls detektierten 60 kDa Bande könnte es sich um ein Abbauprodukt von NCX3 handeln. Eine schwache Bande auf dieser Höhe ist ebenfalls bei Minelli *et al.* (2007) zu erkennen. Alle untersuchten Antikörper detektierten auf Rattengewebe eine schwache Bande bei ca. 100 kDa, welche den Molekulargewichten von 102 kDa (NCX2) bzw. 105 kDa (NCX3) entsprechen könnte (Pignataro *et al.*, 2004a). Das Mausgewebe zeigte für NCX2, wie schon erwähnt, überraschenderweise keine Bande auf dieser Höhe. Somit lieferten die Western Blots auf Rattengewebe Ergebnisse, die sich von denen auf Mausgewebe erheblich unterschieden. Alle Antikörper detektierten (schwache) Banden auf Höhe des jeweils erwarteten Molekulargewichts. Es wurden insgesamt weniger Banden als auf Mausgewebe detektiert, welche zum Teil bereits in der Literatur beschrieben wurden. Da jedoch auch hier Banden detektiert wurden, die nicht dem erwarteten Molekulargewicht entsprechen, stellten auch diese Resultate keinen zufriedenstellenden Beweis für die Spezifität der untersuchten Antikörper dar. Auch hier könnte eine massenspektrometrische Analyse bei der Interpretation der Banden helfen.

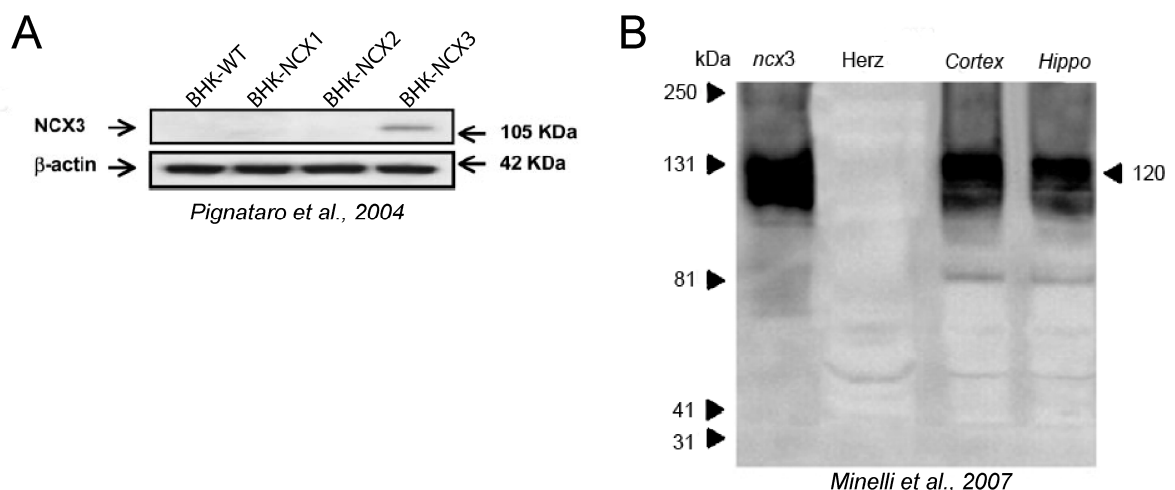


Abb. 36: Western Blots gegen NCX3 aus der Literatur

(A) Western Blot mit dem NCX3-Antikörper von Alpha Diagnostics International, Abbildung verändert aus Pignataro *et al.* (2004n). Nur BHK-Zellen, die NCX3 überexprimieren, zeigten eine Bande bei 105 kDa. (B) Western Blot mit dem NCX3-Antikörper von Prof. Philipson. In NCX3-überexprimierenden BHK-Zellen (*ncx3*) sowie in *Cortex* und *Hippocampus* (*Hippo*) wurde eine starke Bande bei ca. 120 kDa sowie schwache Banden bei ca. 80 kDa und ca. 60 kDa detektiert. Herz zeigte keine Banden. Abbildung verändert aus Minelli *et al.* (2007)

5.3.1.4 NCKX2

Die Spezifität des verwendeten NCKX2-Antikörpers wurde bereits von Li *et al.* (2006) anhand von KO-Gehirngewebe untersucht. Diese Western Blots zeigten neben NCKX2-spezifischen Banden im WT (bei ca. 80 kDa sowie bei ca. 70 kDa), bei denen es sich wahrscheinlich um alternative Spleißvarianten handelt, auch eine Bande bei ca. 48 kDa, welche in WT und KO detektiert wurde. Dabei könnte es sich um eine schwache unspezifische Bindung des Antikörpers handeln. Um eine falsch-positive Färbung in der IHC völlig auszuschließen, bietet sich eine immunhistochemische Färbung von KO-Gehirn an.

5.3.2 Untersuchung der Antikörperspezifität mittels IHC

Um weitere Hinweise über die Spezifität der zur IHC verwendeten Antikörper zu erhalten, wurden der monoklonale NCX2-Antikörper sowie der gegen NCX3 gerichtete Antikörper von Prof. Philipson auf ihr immunhistochemisches Färbemuster untersucht. Beide Antikörper zeigten im Vergleich zu den Antikörpern von Alpha Diagnostics International Unterschiede in der Färbung des DCN. Die Antikörper von Alpha Diagnostics International färbten die Somata einiger großer Neurone im DCN (Abb. 22, 25), was bei Antikörpern von Prof. Porzig bzw. Prof. Philipson nicht beobachtet wurde (Abb. 23, 26). Zudem zeigte der ICc mit dem monoklonalen NCX2-Antikörper im Gegensatz zum polyklonalen fast keine Färbung. Bis auf diese Unterschiede stimmten die Färbemuster der Antikörper überein, wobei für P4 keine Vergleiche im SOC durchgeführt wurden. Im DCN könnte es demnach zu einer unspezifischen Bindung an ein ausschließlich dort stark exprimiertes Protein kommen. Die immunhistochemischen Färbemuster sprechen allerdings für eine Spezifität der verwendeten Antikörper in VCN, SOC und IC.

5.3.3 Zusammenfassung Antikörperspezifität

Zusammenfassend schließe ich aus den durchgeführten Western Blots, dass der verwendete NCX1-Antikörper das NCX1-Protein spezifisch erkennt. Die zusätzlich zum erwarteten Molekulargewicht auftretenden Banden konnten, wie zuvor erläutert, bereits durch die Arbeit anderer Arbeitsgruppen erklärt werden.

Die Spezifität der verwendeten Antikörper gegen NCX2 und NCX3 konnte durch die Kontrollexperimente leider nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist überraschend, wurden die Antikörper doch vielfach in der Literatur verwendet. Besonders die Experimente mit NCX3-KO-Gewebe legen unspezifische Bindungen des NCX3-Antikörpers nahe. In der Ratte, welche zur immunhistologischen Untersuchung diente, zeigten die Antikörper im Western Blot deutlich weniger Banden und somit ein geringeres Risiko für falsch-positive IR-Signale in der IHC als in der Maus.

Das durch den NCKX2-Antikörper detektierte 48 kDa Protein könnte ebenfalls im Gewebe zu einer falsch-positiven Färbung führen. Um dies ausschließen zu können, sollte IHC auf KO-Gewebe durchgeführt werden.

Eine Untersuchung der detektierten Banden mittels Massenspektrometrie könnte einen weiteren Aufschluss über die Spezifität der NCX2- und NCX3-Antikörper geben. Da in einer ausgeschnittenen Bande höchstwahrscheinlich eine Vielzahl verschiedener Proteine enthalten ist, schließt das Vorhandensein der erwarteten NCX2- bzw. NCX3-Proteine in den Banden unspezifische Bindungen zwar nicht hundertprozentig aus, würde aber die Bildung von Aggregaten bzw. Abbauprodukten belegen. Eine Bindung der Antikörper an diese wäre damit wahrscheinlich. Umgekehrt würde eine fehlende Identifizierung von NCX2- und NCX3-Proteinen in den jeweiligen Banden eine spezifische Bindung des Antikörpers nicht ausschließen, da diese inmitten des Gemischs aus evtl. höher exprimierten Proteinen derselben Bande vielleicht nicht detektiert werden können. Um die Komplexität der Probe möglichst zu reduzieren und damit die Wahrscheinlichkeit, auch geringer abundante Proteine identifizieren zu können, zu erhöhen, bietet sich ein mit einer HPLC kombinierter Massenspektrometrieansatz an. Eine weitere Möglichkeit, die Spezifität der verwendeten Antikörper zu untersuchen, wäre die Immunpräzipitierung. Auf diese Weise könnte analysiert werden, welche Proteine der jeweilige Antikörper bindet.

Trotz bestehender Zweifel an der Spezifität habe ich die NCX2- und NCX3-Antikörper von Alpha Diagnostics International (aufgrund der besseren Verfügbarkeit im Vergleich zu den Antikörpern von Prof. Porzig bzw. Prof. Philipson) für die IHC verwendet. Dies begründet sich darin, dass sowohl für NCX2 als auch für NCX3 jeweils zwei gegen unterschiedliche Epitope gerichtete Antikörper in der IHC (bis auf die zuvor erläuterten Unterschiede im DCN) das gleiche Färbemuster zeigten. Auch die starken Banden in den Western Blots wurden jeweils von beiden Antikörpern erkannt. Der NCX2-Antikörper detektierte zudem erwartungsgemäß keine Banden in der Negativkontrolle. Weitere Antikörper gegen NCX2 oder NCX3 waren leider nicht erhältlich.

5.4 Zusammenfassung der Diskussion

Meine Arbeit deutet darauf hin, dass die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher NCX1-3 sowie NCKX2-6 an der Ca^{2+} -Regulation im auditorischen Hirnstamm beteiligt sind. Die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Genexpression weisen darauf hin, dass im jungen Tier vermehrt NCKX-Isoformen, im adulten Tier eher NCX-Isoformen vorkommen. Die physiologische Bedeutung dieser Regulation bzw. die Bedeutung der Ausnahmen von dieser „Regel“ stellt einen interessanten Aspekt für weiterführende Untersuchungen dar und vermag einen Beitrag zur Aufschlüsselung der Rolle der verschiedenen Isoformen zu leisten. Auch zwischen den verschiedenen auditorischen Hirnstammstrukturen wurden quantitative Unterschiede in der Genexpression der *ncx*- und *nckx*-Isoformen detektiert. Diese Strukturen scheinen demnach unterschiedliche Anforderungen an die Ca^{2+} -Regulation zu haben.

Nach der detaillierten Untersuchung der *ncx*- und *nckx*-Genexpression wurde auch die Proteinexpression der verschiedenen Isoformen analysiert. Leider waren nur gegen NCX1-3 und NCKX2 Antikörper erhältlich, zudem führten durchgeführte Kontrollversuche zu Zweifeln an der Qualität der Antikörper gegen NCX2 und NCX3. Die immunhistochemischen Daten stellen somit eine wertvolle Ergänzung der Genexpressionsdaten dar, sind aber für NCX2 und NCX3 mit Vorsicht zu interpretieren.

Meine Arbeit zeigt als erste eine entwicklungsabhängige subzelluläre Umverteilung der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher. Die immunhistochemischen Daten weisen darauf hin, dass die NCX-Isoformen und NCKX2 im jungen Tier ihre Aufgabe hauptsächlich im Neuropil ausüben, während sie im adulten Tier stärker an der Ca^{2+} -Regulation der Somata beteiligt sind. NCKX2 scheint im Neuropil des CN eine besondere Rolle zu spielen, da diese Isoform sowohl im jungen als auch im adulten Tier vorwiegend im Neuropil lokalisiert ist. Die Expression der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher im Neuropil sowie im Bereich der Somata des auditorischen Hirnstammes steht in Übereinstimmung mit Studien anderer Gehirnareale, die ebenfalls eine Expression der Austauscher in Neuropil und Somata nachwiesen (5.1.1.1). Die vorwiegende Expression der Austauscher im Neuropil junger Tiere legt einen Einfluss auf die synaptische Plastizität nahe, zumal sich die auditorischen Hirnstammstrukturen bei P4 noch in einem unreifen Zustand befinden. Ein Einfluss von $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern auf die synaptische Aktivität wurde bereits in verschiedenen Hirnarealen demonstriert.

Abschließend deutet die Verteilung der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher darauf hin, dass die verschiedenen Isoformen gemeinsam und im Zusammenspiel mit weiteren Ca^{2+} -regulierenden Proteinen an der Ca^{2+} -Homöostase des auditorischen Hirnstamms beteiligt sind.

6. Literaturverzeichnis

Altimimi HF, Schnetkamp PPM (2007) Na⁺-dependent inactivation of the retinal cone/brain Na⁺/Ca²⁺-K⁺ exchanger NCKX2. *J Biol Chem* 282:3720-3729.

Amoroso S, Sensi S, Dorenzo G, Annunziato L (1993) Inhibition of the Na⁺-Ca⁺⁺ exchanger enhances anoxia and glucopenia-induced [H-3] aspartate release in hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther* 264:515-520.

Annunziato L, Pignataro G, Boscia F, Sirabella R, Formisano L, Saggese M, Cuomo O, Gala R, Secondo A, Viggiano D, Molinaro P, Valsecchi V, Tortiglione A, Adornetto A, Scorziello A, Cataldi M, Di Renzo GE (2007) *ncx1*, *ncx2*, and *ncx3* gene product expression and function in neuronal anoxia and brain ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 1099:413-426.

Annunziato L, Pignataro G, Di Renzo GF (2004) Pharmacology of brain Na⁺/Ca²⁺ exchanger: From molecular biology to therapeutic perspectives. *Pharmacol Rev* 56:633-654.

Arai R, Winsky L, Arai M, Jacobowitz DM (1991) Immunohistochemical localization of calretinin in the rat hindbrain. *J Comp Neurol* 310:21-44.

Artola A, Singer W (1993) Long-term depression of excitatory synaptic transmission and its relationship to long-term potentiation. *Trends Neurosci* 16:480-487.

Ashmore J, Gale J (2000) The cochlea. *Curr Biol* 10:R325-R327.

Askanas V, Engel WK (2006) Inclusion-body myositis - A myodegenerative conformational disorder associated with A beta, protein misfolding, and proteasome inhibition. *Neurology* 66:S39-S48.

Augustine GJ, Santamaria F, Tanaka K (2003) Local calcium signaling in neurons. *Neuron* 40:331-346.

Balakrishnan V, Becker M, Lohrke S, Nothwang HG, Guresir E, Friauf E (2003) Expression and function of chloride transporters during development of inhibitory neurotransmission in the auditory brainstem. *J Neurosci* 23:4134-4145.

Bartho P, Payne JA, Freund TF, Acsady L (2004) Differential distribution of the KCl cotransporter KCC2 in thalamic relay and reticular nuclei. *Eur J Neurosci* 20:965-975.

Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of GABA during development: The nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3:728-739.

Ben-Ari Y, Khazipov R, Leinekugel X, Caillard O, Gaiarsa JL (1997) GABA(A), NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'menage a trois'. *Trends Neurosci* 20:523-529.

Ben-Ari Y, Tseeb V, Ragozzino D, Khazipov R, Gaiarsa JL (1994) Gamma-aminobutyric-acid (Gaba) - A fast excitatory transmitter which may regulate the development of hippocampal-neurons in early postnatal life. *Prog Brain Res* 102:261-273.

- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL (1989) Giant synaptic potentials in immature rat Ca³ hippocampal-neurons. *J Physiol-London* 416:303-325.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517-529.
- Bers DM (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415:198-205.
- Blaustein MP, Juhaszova M, Golovina VA, Church PJ, Stanley EF (2002) Na/Ca exchanger and PMCA localization in neurons and astrocytes - Functional implications. *Ann N Y Acad Sci* 976:356-366.
- Blaustein MP, Lederer WJ (1999) Sodium calcium exchange: Its physiological implications. *Physiol Rev* 79:763-854.
- Boerth SR, Artman M (1996) Thyroid hormone regulates Na⁺-Ca²⁺ exchanger expression during postnatal maturation and in adult rabbit ventricular myocardium. *Cardiovasc Res* 31:E145-E152.
- Bouron A, Reuter H (1996) A role of intracellular Na⁺ in the regulation of synaptic transmission and turnover of the vesicular pool in cultured hippocampal cells. *Neuron* 17:969-978.
- Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Bredderman PJ, Wasserman RH (1974) Chemical composition, affinity for calcium, and related properties of the vitamin D dependent calcium-binding protein. *Biochemistry* 13:1687-1694.
- Brini M, Di Leva F, Domi T, Fedrizzi L, Lim D, Carafoli E (2007) Plasma-membrane calcium pumps and hereditary deafness. *Biochem Soc Trans* 35:913-918.
- Brown MC, Liu TS (1995) Fos-like immunoreactivity in central auditory neurons of the mouse. *J Comp Neurol* 357:85-97.
- Cai XJ, Lytton J (2004a) Molecular cloning of a sixth member of the K⁺-dependent Na⁺/Ca²⁺ exchanger gene family, NCKX6. *J Biol Chem* 279:5867-5876.
- Cai XJ, Lytton J (2004b) The cation/Ca²⁺ exchanger superfamily: Phylogenetic analysis and structural implications. *Mol Biol Evol* 21:1692-1703.
- Cai XJ, Zhang K, Lytton J (2002) A novel topology and redox regulation of the rat brain K⁺-dependent Na⁺/Ca²⁺ exchanger, NCKX2. *J Biol Chem* 277:48923-48930.
- Caicedo A, Eybalin M (1999) Glutamate receptor phenotypes in the auditory brainstem and mid-brain of the developing rat. *Eur J Neurosci* 11:51-74.
- Caicedo A, Kungel M, Pujol R, Friauf E (1998) Glutamate-induced Co²⁺ uptake in rat auditory brainstem neurons reveals developmental changes in Ca²⁺ permeability of glutamate receptors. *Eur J Neurosci* 10:941-954.

- Canzoniero LMT, Rossi A, Tagliatela M, Amoroso S, Annunziato L, Direnzo G (1992) The Na⁺-Ca²⁺ exchanger activity in cerebrocortical nerve-endings is reduced in old compared to young and mature rats when it operates as a Ca²⁺ influx or efflux pathway. *Biochim Biophys Acta* 1107:175-178.
- Carafoli E (1987) Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem* 56:395-433.
- Carafoli E (1991) The calcium-pump of the plasma-membrane. *Physiol Rev* 71:129-153.
- Carafoli E (1992) The plasma-membrane calcium-pump - Structure, function, regulation. *Biochim Biophys Acta* 1101:266-267.
- Carafoli E (1994) Biogenesis - Plasma-membrane calcium-ATPase - 15 years of work on the purified enzyme. *Faseb Journal* 8:993-1002.
- Carafoli E, Stauffer T (1994) The plasma-membrane calcium-pump - Functional domains, regulation of the activity, and tissue-specificity of isoform expression. *J Neurobiol* 25:312-324.
- Caspary DM, Ling L, Turner JG, Hughes LF (2008) Inhibitory neurotransmission, plasticity and aging in the mammalian central auditory system. *J Exp Biol* 211:1781-1791.
- Cernohorsky J, Kolar F, Pelouch V, Korecky B, Vetter R (1998) Thyroid control of sarcolemmal Na⁺/Ca²⁺ exchanger and SR Ca²⁺-ATPase in developing rat heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 275:H264-H273.
- Cha SH, Shin SY, Jung SY, Kim YT, Park YJ, Kwak JO, Kim HW, Suh CK (2004) Evidence for Na⁺/Ca²⁺ exchanger 1 association with caveolin-1 and-2 in C6 glioma cells. *Iubmb Life* 56:621-627.
- Chen G, Trombley PQ, vandenPol AN (1996) Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurones. *J Physiol London* 494:451-464.
- Cherubini E, Martina M, Sciancalepore M, Strata F (1998) GABA excites immature CA3 pyramidal cells through bicuculline-sensitive and -insensitive chloride-dependent receptors. *Perspec Dev Neurobiol* 5:289-304.
- Cherubini E, Rovira C, Gaiarsa JL, Corradetti R, Ben-Ari Y (1990) GABA mediated excitation in immature rat CA3 hippocampal-neurons. *Int J Dev Neurosci* 8:481-490.
- DeFazio RA, Keros S, Quick MW, Hablitz JJ (2000) Potassium-coupled chloride cotransport controls intracellular chloride in rat neocortical pyramidal neurons. *J Neurosci* 20:8069-8076.
- Delpire E (2000) Cation-chloride cotransporters in neuronal communication. *News Physiol Sci* 15:309-312.
- Doi A, Kakazu Y, Akaike N (2002) Na⁺/Ca²⁺ exchanger in GABAergic presynaptic boutons of rat central neurons. *J Neurophysiol* 87:1694-1702.
- Dong H, Light PE, French RJ, Lytton J (2001) Electrophysiological characterization and ionic stoichiometry of the rat brain K⁺-dependent Na⁺/Ca²⁺ exchanger, NCKX2. *J Biol Chem* 276:25919-25928.

- Doucet JR, Ryugo DK (2006) Structural and functional classes of multipolar cells in the ventral cochlear nucleus. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288A:331-344.
- Durkin JT, Ahrens DC, Pan YCE, Reeves JP (1991) Purification and amino-terminal sequence of the bovine cardiac sodium calcium exchanger - Evidence for the presence of a signal sequence. *Arch Biochem Biophys* 290:369-375.
- Eccles JC (1966) Ionic mechanisms of excitatory and inhibitory synaptic action. *Ann N Y Acad Sci* 137:473-&.
- Ehmann H, Salzig C, Lang P, Friauf E, Nothwang HG (2008) Minimal sex differences in gene expression in the rat superior olivary complex. *Hear Res* 245:65-72.
- Ehrlich I, Lohrke S, Friauf E (1999) Shift from depolarizing to hyperpolarizing glycine action in rat auditory neurones is due to age-dependent Cl⁻ regulation. *J Physiol London* 520:121-137.
- Enyedi A, Flura M, Sarkadi B, Gardos G, Carafoli E (1987) The Maximal Velocity and the Calcium Affinity of the Red-Cell Calcium-Pump May be Regulated Independently. *J Biol Chem* 262:6425-6430.
- Faye-Lund H, Osen KK (1985) Anatomy of the inferior colliculus in rat. *Anat Embryol* 171:1-20.
- Felmy F, Schneggenburger R (2004) Developmental expression of the Ca²⁺-binding proteins calretinin and parvalbumin at the calyx of Held of rats and mice. *Eur J Neurosci* 20:1473-1482.
- Friauf E (1993) Transient appearance of calbindin-D28K-positive neurons in the superior olivary complex of developing rats. *J Comp Neurol* 334:59-74.
- Friauf E (1994) Distribution of calcium-binding protein calbindin-D-28K in the auditory-system of adult and developing rats. *J Comp Neurol* 349:193-211.
- Friauf E, Kandler K (1993) Cell birth, formation of efferent connections, and establishment of tonotopic order in the rat cochlear nucleus. In: *Mammalian Cochlear Nuclei - Organization and Function* pp 19-28. New York: Plenum Press Div Plenum Publishing Corp.
- Friauf E, Lohmann C (1999) Development of auditory brainstem circuitry - Activity-dependent and activity-independent processes. *Cell Tissue Res* 297:187-195.
- Fritschy JM (2008) Is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry. *Eur J Neurosci* 28:2365-2370.
- Fritschy JM, Weinmann O, Wenzel A, Benke D (1998) Synapse-specific localization of NMDA and GABA(A) receptor subunits revealed by antigen-retrieval immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 390:194-210.
- Fukuda A, Muramatsu K, Okabe A, Shimano Y, Hida H, Fujimoto I, Nishino H (1998) Changes in intracellular Ca²⁺ induced by GABA(A) receptor activation and reduction in Cl⁻ gradient in neonatal rat neocortex. *J Neurophysiol* 79:439-446.

- Fukuhara S, Sako K, Minami T, Noda K, Kim HZ, Kodama T, Shibuya M, Takakura N, Koh GY, Mochizuki N (2008) Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat Cell Biol* 10:513-526.
- Furman I, Cook O, Kasir J, Low W, Rahamimoff H (1995) The putative amino-terminal signal peptide of the cloned rat-brain Na⁺-Ca²⁺ exchanger gene (Rbe-1) is not mandatory for functional expression. *J Biol Chem* 270:19120-19127.
- Gabellini N, Zatti A, Rispoli G, Navangione A, Carafoli E (1996) Expression of an active Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoform lacking the six C-terminal transmembrane segments. *Eur J Biochem* 239:897-904.
- Gill DL, Grollman EF, Kohn LD (1981) Calcium transport mechanisms in membrane vesicles from guinea pig brain synaptosomes. *J Biol Chem* 256:184-192.
- Ginger RS, Askew SE, Ogborne RM, Wilson S, Ferdinando D, Dadd T, Smith AM, Kazi S, Szerencsei RT, Winkfein RJ, Schnetkamp PPM, Green MR (2008) SLC24A5 encodes a trans-Golgi network protein with potassium-dependent sodium-calcium exchange activity that regulates human epidermal melanogenesis. *J Biol Chem* 283:5486-5495.
- Godfrey DA, Li H, Ross D, Rubin AM (2000) Chemical comparisons between central vestibular and auditory systems. In: *Neurochemistry of the vestibular system* (Beitz AJ, Anderson JH, eds), pp 347-361. Boca Raton: CRC Press.
- Goldhaber JJ, Henderson SA, Han TY, So J, Motter C, An N, Mottino GA, Frank JS, Ross RS, Philipson KD (2003) Calcium handling in adult mouse myocytes after cardiac-specific knock-out of the sodium-calcium exchanger. *Circulation* 108:241.
- Gross AJ, Sizer IW (1959) The oxidation of tyramine, tyrosine, and related compounds by peroxidase. *J Biol Chem* 234:1611-1614.
- Grothe B (2003) New roles for synaptic inhibition in sound localization. *Nat Rev Neurosci* 4:540-550.
- Guinan JJ, Guinan SS, Norris BE (1972) Single auditory units in superior olivary complex .2. Locations of unit categories and tonotopic organization. *Int J Neurosci* 4:147-166.
- Gulacsi A, Lee CR, Sik A, Viitanen T, Kaila K, Tepper JM, Freund TF (2003) Cell type-specific differences in chloride-regulatory mechanisms and GABA(A) receptor-mediated inhibition in rat substantia nigra. *J Neurosci* 23:8237-8246.
- Hackney CM, Osen KK, Kolston J (1990) Anatomy of the cochlear nuclear-complex of guinea-pig. *Anat Embryol* 182:123-149.
- Hammes A, Oberdorf S, Strehler EE, Stauffer T, Carafoli E, Vetter H, Neyses L (1994) Differentiation-specific isoform messenger-RNA expression of the calmodulin-dependent plasma-membrane Ca²⁺-ATPase. *Faseb Journal* 8:428-435.
- Hansel C, Artola A, Singer W (1996) Different threshold levels of postsynaptic [Ca²⁺]_i have to be reached to induce LTP and LTD in neocortical pyramidal cells. *J Physiol Paris* 90:317-319.

- He S, Ruknudin A, Bambrick LL, Lederer WJ, Schulze DH (1998) Isoform-specific regulation of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in rat astrocytes and neurons by PKA. *J Neurosci* 18:4833-4841.
- He Z, Feng S, Tong Q, Hilgemann DW, Philipson KD (2000) Interaction of PIP₂ with the XIP region of the cardiac Na/Ca exchanger. *AJP - Cell Physiology* 278:C661-C666.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6:986-994.
- Heizmann CW (1984) Parvalbumin, an intracellular calcium-binding protein - Distribution, properties and possible roles in mammalian-cells. *Experientia* 40:910-921.
- Henderson SA, Goldhaber JI, So JM, Han TY, Motter C, Ngo A, Chantawansri C, Ritter MR, Friedlander M, Nicoll DA, Frank JS, Jordan MC, Roos KP, Ross RS, Philipson KD (2004) Functional adult myocardium in the absence of Na⁺-Ca²⁺ exchange - Cardiac-specific knockout of NCX1. *Circ Res* 95:604-611.
- Herbert H, Aschoff A, Ostwald J (1991) Topography of projections from the auditory-cortex to the inferior colliculus in the rat. *J Comp Neurol* 304:103-122.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis - Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio-Technology* 11:1026-1030.
- Hilge M, Aelen J, Perrakis A, Vuister GW (2007) Structural basis for Ca²⁺ regulation in the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Ann N Y Acad Sci* 1099:7-15.
- Hilge M, Aelen J, Vuister GW (2006) Ca²⁺ regulation in the Na⁺/Ca²⁺ exchanger involves two markedly different Ca²⁺ sensors. *Mol Cell* 22:15-25.
- Hilgemann DW, Ball R (1996) Regulation of cardiac Na⁺,Ca²⁺ exchange and K-ATP potassium channels by PIP₂. *Science* 273:956-959.
- Hilgemann DW, Matsuoka S, Nagel GA, Collins A (1992) Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange - Sodium-dependent inactivation. *J Gen Physiol* 100:905-932.
- Hryshko LV, Nicoll DA, Weiss JN, Philipson KD (1993) Biosynthesis and Initial Processing of the Cardiac Sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ Exchanger. *Bioch Biophys Acta* 1151:35-42.
- Illing RB, Cao QL, Forster CR, Laszig R (1999) Auditory brainstem: Development and plasticity of GAP-43 mRNA expression in the rat. *J Comp Neurol* 412:353-372.
- Illing RB, Kraus KS, Michler SA (2000) Plasticity of the superior olivary complex. *Microsc Res Tech* 51:364-381.
- Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A, Auffray C (2005) Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res* 33.
- Irvine DRF (1992) Physiology of the cochlear nuclei. In: *The Mammalian Auditory Pathway: Neurophysiology* (Popper AN, Fay, eds), pp 153-231. New York: Springer.

- Iwamoto T, Uehara A, Imanaga I, Shigekawa M (2000) The Na⁺/Ca²⁺ exchanger NCX1 has oppositely oriented reentrant loop domains that contain conserved aspartic acids whose mutation alters its apparent Ca²⁺ affinity. *J Biol Chem* 275:38571-38580.
- Jeon D, Yang YM, Jeong MJ, Philipson KD, Rhim H, Shin HS (2003) Enhanced learning and memory in mice lacking Na⁺/Ca²⁺ exchanger 2. *Neuron* 38:965-976.
- Jin X, Yue S, Wells KS, Singer VL (1994) Sybr Green(Tm)-1 - A new fluorescent dye optimized for detection of picogram amounts of DNA in Gels. *Biophys J* 66:A159.
- Juhaszova M, Church P, Blaustein MP, Stanley EF (2000) Location of calcium transporters at presynaptic terminals. *Eur J Neurosci* 12:839-846.
- Kaila K (1994) Ionic Basis of Gaba(A) Receptor-Channel Function in the Nervous-System. *Prog Neurobiol* 42:489-537.
- Kakazu Y, Akaike N, Komiyama S, Nabekura J (1999) Regulation of intracellular chloride by cotransporters in developing lateral superior olive neurons. *J Neurosci* 19:2843-2851.
- Kandler K, Clause A, Noh J (2009) Tonotopic reorganization of developing auditory brainstem circuits. *Nat Neurosci* 12:711-717.
- Kandler K, Friauf E (1995) Development of glycinergic and glutamatergic synaptic transmission in the auditory brain-stem of perinatal rats. *J Neurosci* 15:6890-6904.
- Kane ES, Puglisi SG, Gordon BS (1981) Neuronal types in the deep dorsal cochlear nucleus of the cat .1. Giant-neurons. *J Comp Neurol* 198:483-513.
- Kang K, Schnetkamp PPM (2003) Signal sequence cleavage and plasma membrane targeting of the retinal rod NCKX1 and cone NCKX2 Na⁺/Ca²⁺-K⁺ exchangers. *Biochemistry* 42:9438-9445.
- Kang K, Bauer PJ, Kinjo TG, Szerencsei RT, Bonigk W, Winkfein RJ, Schnetkamp PPM (2003) Assembly of retinal rod or cone Na⁺/Ca²⁺-K⁺ exchanger oligomers with cGMP-gated channel subunits as probed with heterologously expressed cDNAs. *Biochemistry* 42:4593-4600.
- Kar P, Chakraborti T, Samanta K, Chakraborti S (2009) [mu]-Calpain mediated cleavage of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in isolated mitochondria under A23187 induced Ca²⁺ stimulation. *Arch Biochem Biophys* 482:66-76.
- Kim MH, Korogod N, Schneggenburger R, Ho WK, Lee SH (2005a) Interplay between Na⁺/Ca²⁺ exchangers and mitochondria in Ca²⁺ clearance at the calyx of Held. *J Neurosci* 25:6057-6065.
- Kim MH, Lee SH, Park KH, Ho WK, Lee SH (2003) Distribution of K⁺-dependent Na⁺/Ca²⁺ exchangers in the rat supraoptic magnocellular neuron is polarized to axon terminals. *J Neurosci* 23:11673-11680.
- Kim YT, Park YJ, Jung SY, Seo WS, Suh CK (2005b) Effects of Na⁺-Ca²⁺ exchanger activity on the [alpha]-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolone-propionate-induced Ca²⁺ influx in cerebellar Purkinje neurons. *Neuroscience* 131:589-599.

- Kinjo TG, Szerencsei RT, Winkfein RJ, Kang KJ, Schnetkamp PPM (2003) Topology of the retinal cone NCKX2 Na/Ca-K exchanger. *Biochemistry* 42:2485-2491.
- Kirsch J, Betz H (1998) Glycine-receptor activation is required for receptor clustering in spinal neurons. *Nature* 392:717-720.
- Klinke R, Silbernagl S (2003) *Lehrbuch der Physiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Korkotian E, Holcman D, Segal M (2004) Dynamic regulation of spine-dendrite coupling in cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 20:2649-2663.
- Koushik SV, Wang J, Rogers R, Moskophidis D, Lambert NA, Creazzo TL, Conway SJ (2001) Targeted inactivation of the sodium-calcium exchanger (Ncx1) results in the lack of a heartbeat and abnormal myofibrillar organization. *Faseb Journal* 15:1209-1211.
- Kozel PJ, Friedman RA, Erway LC, Yamoah EN, Liu LH, Riddle T, Duffy JJ, Doetschman T, Miller ML, Cardell EL, Shull GE (1998) Balance and Hearing Deficits in Mice with a Null Mutation in the Gene Encoding Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase Isoform 2. *J Biol Chem* 273:18693-18696.
- Kraev A, Quednau BD, Leach S, Li XF, Dong H, Winkfein R, Perizzolo M, Cai XJ, Yang RM, Philipson KD, Lytton J (2001) Molecular cloning of a third member of the potassium-dependent sodium-calcium exchanger gene family, NCKX3. *J Biol Chem* 276:23161-23172.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* 227:680-&.
- Lamason RL, Mohideen MAPK, Mest JR, Wong AC, Norton HL, Aros MC, Jurynek MJ, Mao XY, Humphreville VR, Humbert JE, Sinha S, Moore JL, Jagadeeswaran P, Zhao W, Ning G, Makalowska I, McKeigue PM, O'Donnell D, Kittles R, Parra EJ, Mangini NJ, Grunwald DJ, Shriver MD, Canfield VA, Cheng KC (2005) SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science* 310:1782-1786.
- Ledeer RW, Wu GS (2007) Sodium-calcium exchangers in the nucleus - An unexpected locus and an unusual regulatory mechanism. *Ann N Y Acad Sci* 494-506.
- Lee JY, Visser F, Lee JS, Lee KH, Soh JW, Ho WK, Lytton J, Lee SH (2006) Protein kinase c-dependent enhancement of activity of rat brain NCKX2 heterologously expressed in HEK293 cells. *J Biol Chem* 281:39205-39216.
- Lee SH, Kim MH, Park KH, Earm YE, Ho WK (2002) K⁺-dependent Na⁺/Ca²⁺ exchange is a major Ca²⁺ clearance mechanism in axon terminals of rat neurohypophysis. *J Neurosci* 22:6891-6899.
- Lee SL, Yu ASL, Lytton J (1994) Tissue-Specific Expression of Na⁺-Ca²⁺ Exchanger Isoforms. *J Biol Chem* 269:14849-14852.
- Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, Benari Y, Khazipov R (1997) Ca²⁺ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron* 18:243-255.

- Lemos VS, Poburko D, Liao CH, Cole WC, van Breemen C (2007) Na⁺ entry via TRPC6 causes Ca²⁺ entry via NCX reversal in ATP stimulated smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 352:130-134.
- Li HW, Liu H, Heller S (2003) Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med* 9:1293-1299.
- Li W, Kaczmarek LK, Perney TM (2001) Localization of two high-threshold potassium channel subunits in the rat central auditory system. *J Comp Neurol* 437:196-218.
- Li XF, Kiedrowski L, Tremblay F, Fernandez FR, Perizzolo M, Winkfein RJ, Turner RW, Bains JS, Rancourt DE, Lytton J (2006) Importance of K⁺-dependent Na⁺/Ca²⁺-exchanger 2, NCKX2, in motor learning and memory. *J Biol Chem* 281:6273-6282.
- Li XF, Kraev AS, Lytton J (2002) Molecular cloning of a fourth member of the potassium-dependent sodium-calcium exchanger gene family, NCKX4. *J Biol Chem* 277:48410-48417.
- Li XF, Lytton J (1999) A circularized sodium-calcium exchanger exon 2 transcript. *J Biol Chem* 274:8153-8160.
- Li XF, Lytton J (2002) Differential expression of Na/Ca exchanger and Na/Ca+K exchanger transcripts in rat brain. *Ann N Y Acad Sci* 976:64-66.
- Li ZP, Matsuoka S, Hryshko LV, Nicoll DA, Bersohn MM, Burke EP, Lifton RP, Philipson KD (1994) Cloning of the Ncx2 isoform of the plasma-membrane Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem* 269:17434-17439.
- Li ZP, Nicoll DA, Collins A, Hilgemann DW, Filoteo AG, Penniston JT, Weiss JN, Tomich JM, Philipson KD (1991) Identification of a peptide inhibitor of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem* 266:1014-1020.
- Linck B, Qiu ZY, He ZP, Tong QS, Hilgemann DW, Philipson KD (1998) Functional comparison of the three isoforms of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX1, NCX2, NCX3). *Am J Physiol -Cell Physiol* 43:C415-C423.
- Lipton SA, Kater SB (1989) Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. *Trends Neurosci* 12:265-270.
- Liu B, Liao M, Mielke JG, Ning K, Chen Y, Li L, El-Hayek YH, Gomez E, Zukin RS, Fehlings MG, Wan Q (2006) Ischemic insults direct glutamate receptor subunit 2-lacking AMPA receptors to synaptic sites. *J Neurosci* 26:5309-5319.
- Loftus WC, Malmierca MS, Bishop DC, Oliver DL (2008) The cytoarchitecture of the inferior colliculus revisited: A common organization of the lateral cortex in rat and cat. *Neuroscience* 154:196-205.
- Lohmann C, Friauf E (1996) Distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin and calretinin in the auditory brainstem of adult and developing rats. *J Comp Neurol* 367:90-109.
- Lohmann C, Ilic V, Friauf E (1998) Development of a topographically organized auditory network in slice culture is calcium dependent. *J Neurobiol* 34:97-112.

- Lohrke S, Srinivasan G, Oberhofer M, Doncheva E, Friauf E (2005) Shift from depolarizing to hyperpolarizing glycine action occurs at different perinatal ages in superior olivary complex nuclei. *Eur J Neurosci* 22:2708-2722.
- Lottspeich F, Engels JW (2006) *Bioanalytik*. Elsevier GmbH, München: Spektrum Akademischer Verlag.
- Lu B (2009) Mitochondrial dynamics and neurodegeneration. *Curr Neurol Neurosci Rep* 9:212-219.
- Luhmann HJ, Prince DA (1991) Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex. *J Neurophysiol* 65:247-263.
- Lytton J (2007) Na⁺/Ca²⁺ exchangers: three mammalian gene families control Ca²⁺ transport. *Biochem J* 406:365-382.
- Lytton J, Li XF, Dong H, Kraev A (2002) K⁺-dependent Na⁺/Ca²⁺ exchangers in the brain. *Ann N Y Acad Sci* 976:382-393.
- Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: An embarrassment of riches. *Neuron* 44:5-21.
- Malmierca MS, Merchán MA (2004) Auditory system. In: *The rat nervous system* (Paxinos G, ed), pp 997-1082. London: Elsevier Academic Press.
- Malmierca MS, Seip KL, Osen KK (1995) Morphological classification and identification of neurons in the inferior colliculus - A multivariate-analysis. *Anat Embryol* 191:343-350.
- Maric D, Liu QY, Maric I, Chaudry S, Chang YH, Smith SV, Sieghart W, Fritschy JM, Barker JL (2001) GABA expression dominates neuronal lineage progression in the embryonic rat neocortex and facilitates neurite outgrowth via GABA(A) autoreceptor/Cl⁻ channels. *J Neurosci* 21:2343-2360.
- Marshall CR, Pan TC, Le HD, Omelchenko A, Hwang PP, Hryshko LV, Tibbits GF (2005) cDNA cloning and expression of the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger from mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) reveal a teleost membrane transporter with mammalian temperature dependence. *J Biol Chem* 280:28903-28911.
- Mauk MD, Buonomano DV (2004) The neural basis of temporal processing. *Annu Rev Neurosci* 27:307-340.
- McAlpine D, Grothe B (2003) Sound localization and delay lines - do mammals fit the model? *Trends Neurosci* 26:347-350.
- Mercado A, Mount DB, Gamba G (2004) Electroneutral cation-chloride cotransporters in the central nervous system. *Neurochem Res* 29:17-25.
- Minelli A, Castaldo P, Gobbi P, Salucci S, Magi S, Amoroso S (2007) Cellular and subcellular localization of Na⁺-Ca²⁺ exchanger protein isoforms, NCX1, NCX2, and NCX3 in cerebral cortex and hippocampus of adult rat. *Cell Calcium* 41:221-234.
- Mironov SL, Usachev YM, Lux HD (1993) Spatial and temporal control of intracellular free Ca²⁺ in chick sensory neurons. *Pflugers Arch* 424:183-191.

- Molinaro P, Cuomo O, Pignataro G, Boscia F, Sirabella R, Pannaccione A, Secondo A, Scorziello A, Adornetto A, Gala R, Viggiano D, Sokolow S, Herchuelz A, Schurmans S, Di Renzo G, Annunziato L (2008) Targeted disruption of Na⁺/Ca²⁺ exchanger 3 (NCX3) gene leads to a worsening of ischemic brain damage. *J Neurosci* 28:1179-1184.
- Mueller AL, Taube JS, Schwartzkroin PA (1984) Development of hyperpolarizing inhibitory postsynaptic potentials and hyperpolarizing response to gamma-aminobutyric acid in rabbit hippocampus studied invitro. *J Neurosci* 4:860-867.
- Nicholas SB, Yang WD, Lee SL, Zhu H, Philipson KD, Lytton J (1998) Alternative promoters and cardiac muscle cell-specific expression of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger gene. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 274:H217-H232.
- Nicoll DA, Hryshko LV, Matsuoka S, Frank JS, Philipson KD (1996a) Mutation of amino acid residues in the putative transmembrane segments of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem* 271:13385-13391.
- Nicoll DA, Longoni S, Philipson KD (1990) Molecular-cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *Science* 250:562-565.
- Nicoll DA, Ottolia M, Lu LY, Lu YJ, Philipson KD (1999) A new topological model of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem* 274:910-917.
- Nicoll DA, Quednau BD, Qui ZY, Xia YR, Lusi AJ, Philipson KD (1996b) Cloning of a third mammalian Na⁺-Ca²⁺ exchanger, NCX3. *J Biol Chem* 271:24914-24921.
- Nicoll DA, Sawaya MR, Kwon S, Cascio D, Philipson KD, Abramson J (2006) The crystal structure of the primary Ca²⁺ sensor of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger reveals a novel Ca²⁺ binding motif. *J Biol Chem* 281:21577-21581.
- On C, Marshall CR, Perry SF, Le HD, Yurkov V, Omelchenko A, Hnatowich M, Hryshko LV, Tibbits GF (2009) Characterization of zebrafish (*Danio rerio*) NCX4: a novel NCX with distinct electrophysiological properties. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 296:C173-C181.
- Owens DF, Boyce LH, Davis MBE, Kriegstein AR (1996) Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci* 16:6414-6423.
- Palty R, Ohana E, Hershinkel M, Volokita M, Elgazar V, Beharier O, Silverman WF, Argaman M, Sekler I (2004) Lithium-calcium exchange is mediated by a distinct potassium-independent sodium-calcium exchanger. *J Biol Chem* 279:25234-25240.
- Papa M, Canitano A, Boscia F, Castaldo P, Sellitti S, Porzig H, Tagliatalata M, Annunziato L (2003) Differential expression of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger transcripts and proteins in rat brain regions. *J Comp Neurol* 461:31-48.
- Paxinos G, Franklin KBJ (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates. (Paxinos G, Franklin KBJ, eds), San Diego: Academic Press.
- Payne JA, Rivera C, Voipio J, Kaila K (2003) Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci* 26:199-206.

- Pecka M, Brand A, Behrend O, Grothe B (2008) Interaural time difference processing in the mammalian medial superior olive: The role of glycinergic inhibition. *J Neurosci* 28:6914-6925.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29.
- Pfaffl MW (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. pp 92-95. *BIOspektrum, Sonderausgabe PCR*.
- Pignataro G, Gala R, Cuomo O, Tortiglione A, Giaccio L, Castaldo P, Sirabella R, Matrone C, Canitano A, Amoroso S, Di Renzo G, Annunziato L (2004) Two sodium/calcium exchanger gene products, NCX1 and NCX3, play a major role in the development of permanent focal cerebral ischemia. *Stroke* 35:2566-2570.
- Pike LJ (2006) Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *Journal of Lipid Research* 47:1597-1598.
- Poburko D, Liao CH, Lemos VS, Lin E, Maruyama Y, Cole WC, van Breemen C (2007) Transient receptor potential channel 6-mediated, localized cytosolic [Na⁺] transients drive Na⁺/Ca²⁺ exchanger-mediated Ca²⁺ entry in purinergically stimulated aorta smooth muscle cells. *Circ Res* 101:1030-1038.
- Pollak GD, Burger RM, Klug A (2003) Dissecting the circuitry of the auditory system. *Trends Neurosci* 26:33-39.
- Pott C, Goldhaber JI, Philipson KD (2004) Genetic manipulation of cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchange expression. *Biochem Biophys Res Commun* 322:1336-1340.
- Pott C, Ren XY, Tran DX, Yang MJ, Henderson S, Jordan MC, Roos KP, Garfinkel A, Philipson KD, Goldhaber JI (2007) Mechanism of shortened action potential duration in Na⁺-Ca²⁺ exchanger knockout mice. *Am J Physiol-Cell Physiol* 292:C968-C973.
- Pyrski M, Koo JH, Polumuri SK, Ruknudin AM, Margolis JW, Schulze DH, Margolis FL (2007) Sodium/calcium exchanger expression in the mouse and rat olfactory systems. *J Comp Neurol* 501:944-958.
- Quednau BD, Nicoll DA, Philipson KD (1997) Tissue specificity and alternative splicing of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in rat. *Am J Physiol-Cell Physiol* 41:C1250-C1261.
- Quednau BD, Nicoll DA, Philipson KD (2004) The sodium/calcium exchanger family - SLC8. *Pflugers Arch* 447:543-548.
- Ranciat-McComb NS, Bland KS, Huschenbett J, Ramonda L, Bechtel M, Zaidi A, Michaelis ML (2000) Antisense oligonucleotide suppression of Na⁺/Ca²⁺ exchanger activity in primary neurons from rat brain. *Neurosci Lett* 294:13-16.
- Ren XY, Nicoll DA, Galang G, Philipson KD (2008) Intermolecular cross-linking of Na⁺-Ca²⁺ exchanger proteins: Evidence for dimer formation. *Biochemistry* 47:6081-6087.
- Reuter H, Porzig H (1995) Localization and functional-significance of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in presynaptic boutons of hippocampal cells in culture. *Neuron* 15:1077-1084.

- Rietzel HJ, Friauf E (1998) Neuron types in the rat lateral superior olive and developmental changes in the complexity of their dendritic arbors. *J Comp Neurol* 390:20-40.
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K (1999) The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397:251-255.
- Rosker C, Graziani A, Lukas M, Eder P, Zhu MX, Romanin C, Groschner K (2004) Ca²⁺ signaling by TRPC3 involves Na⁺ entry and local coupling to the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem* 279:13696-13704.
- Rubel EW, Fritsch B (2002) Auditory system development: Primary auditory neurons and their targets. *Annu Rev Neurosci* 25:51-101.
- Ruknudin A, Schulze DH (2002) Proteomics approach to Na⁺/Ca²⁺ exchangers in prokaryotes. *Ann N Y Acad Sci* 976:103-108.
- Ryugo DK, Parks TN (2003) Primary innervation of the avian and mammalian cochlear nucleus. *Brain Res Bull* 60:435-456.
- Ryugo DK, Willard FH (1985) The dorsal cochlear nucleus of the mouse - A light microscopic analysis of neurons that project to the inferior colliculus. *J Comp Neurol* 242:381-396.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science* 239:487-491.
- Sakaue M, Nakamura H, Kaneko I, Kawasaki Y, Arakawa N, Hashimoto H, Koyama Y, Baba A, Matsuda T (2000) Na⁺-Ca²⁺ exchanger isoforms in rat neuronal preparations: different changes in their expression during postnatal development. *Brain Res* 881:212-216.
- Sanes DH, Merickel M, Rubel EW (1989) Evidence for an alteration of the tonotopic map in the gerbil cochlea during development. *J Comp Neurol* 279:436-444.
- Saper CB (2005) An open letter to our readers on the use of antibodies. *J Comp Neurol* 493:477-478.
- Saper CB (2009) A Guide to the perplexed on the specificity of antibodies. *J Histochem Cytochem* 57:1-5.
- Satzler K, Sohl LF, Bollmann JH, Borst JGG, Frotscher M, Sakmann B, Lubke JHR (2002) Three-dimensional reconstruction of a calyx of held and its postsynaptic principal neuron in the medial nucleus of the trapezoid body. *J Neurosci* 22:10567-10579.
- Schatzmann HJ (1966) ATP-dependent Ca⁺⁺-extrusion from human red cells. *Cell Mol Life Sci* 22:364-365.
- Schindler J, Lewandrowski U, Sickmann A, Friauf E (2008) Aqueous polymer two-phase systems for the proteomic analysis of plasma membranes from minute brain samples. *J Proteome Res* 7:432-442.

- Schmidt J, Barthel K, Wrede A, Salajegheh M, Bahr M, Dalakas MC (2008) Interrelation of inflammation and APP in sIBM: IL-1 beta induces accumulation of beta-amyloid in skeletal muscle. *Brain* 131:1228-1240.
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW (2000) Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: Comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem* 285:194-204.
- Schnetkamp PPM (2004) The SLC24 Na⁺/Ca²⁺-K⁺ exchanger family: vision and beyond. *Pflugers Arch* 447:683-688.
- Schwartz IR (1992) The superior olivary complex and lateral lemniscal nuclei. In: Webster DB, Popper AN, Fay RR (eds), *The mammalian auditory pathway: neuroanatomy*. 117-167.
- Schwarz EM, Benzer S (1997) Calx, a Na-Ca exchanger gene of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10249-10254.
- Schwarzer A, Kim TSY, Hagen V, Molday RS, Bauer PJ (1997) The Na/Ca-K exchanger of rod photoreceptor exists as dimer in the plasma membrane. *Biochemistry* 36:13667-13676.
- Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 28:815-820.
- Sheng JZ, Prinsen CFM, Clark RB, Giles WR, Schnetkamp PPM (2000) Na⁺-Ca²⁺-K⁺ currents measured in insect cells transfected with the retinal cone or rod Na⁺-Ca²⁺-K⁺ exchanger cDNA. *Biophys J* 79:1945-1953.
- Shibukawa Y, Kang KJ, Kinjo TG, Szerencsei RT, Altimimi HF, Pratikhya P, Winkfein RJ, Schnetkamp PPM (2007) Structure-function relationships of the NCKX2 Na⁺/Ca (2⁺)-K⁺ exchanger. *Ann N Y Acad Sci* 1099:16-28.
- Silverstein H, Wolfson RJ, Rosenberg S (1992) *Clinical Symposia: Diagnosis and management of hearing loss*. (Erdélyi-Brown M, Craig JA, Bean KJ, eds), New Jersey: CIBA-GEIGY Corp.
- Sokolow S, Manto M, Gailly P, Molgo J, Vandebrouck C, Vanderwinden JM, Herchuelz A, Schurmans S (2004) Impaired neuromuscular transmission and skeletal muscle fiber necrosis in mice lacking Na/Ca exchanger 3. *J Clin Invest* 113:265-273.
- Sommer I, Lingenhohl K, Friauf E (1993) Principal cells of the rat medial nucleus of the trapezoid body - An intracellular in-vivo study of their physiology and morphology. *Exp Brain Res* 95:223-239.
- Spangler KM, Warr WB, Henkel CK (1985) The projections of principal cells of the medial nucleus of the trapezoid body in the cat. *J Comp Neurol* 238:249-262.
- Stefanini M, De Martino C, Zamboni L (1967) Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216:173-&.
- Stevens SS, Newman EB (1936) The localization of actual sources of sound. *Am J Psychol* 48:297-306.

- Stiebler I, Ehret G (1985) Inferior colliculus of the house mouse .1. A quantitative study of tonotopic organization, frequency representation, and tone-threshold distribution. *J Comp Neurol* 238:65-76.
- Strehler EE, Caride AJ, Filoteo AG, Xiong YN, Penniston JT, Enyedi A (2007) Plasma membrane Ca²⁺ ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling. *Ann N Y Acad Sci* 1099:226-236.
- Szewczyk B, Pilat Z, Bienkowska-Szewczyk K, Summers DF (1998) Elution of glycoproteins from replicas of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels. *Electrophoresis* 19:220-223.
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75:291-295.
- Thompson AM, Schofield BR (2000) Afferent projections of the superior olivary complex. *Microsc Res Tech* 51:330-354.
- Thurneysen T, Nicoll DA, Philipson KD, Porzig H (2002) Sodium/calcium exchanger subtypes NCX1, NCX2 and NCX3 show cell-specific expression in rat hippocampus cultures. *Brain Res Mol Brain Res* 107:145-156.
- Tollin DJ (2003) The lateral superior olive: A functional role in sound source localization. *neuroscientist* 9:127-143.
- Tong H, Rockman HA, Koch WJ, Steenbergen C, Murphy E (2004) G protein-coupled receptor internalization signaling is required for cardioprotection in ischemic preconditioning. *Circ Res* 94:1133-1141.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets - Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354.
- Tsoi M, Rhee KH, Bungard D, Li XF, Lee SL, Auer RN, Lytton J (1998) Molecular cloning of a novel potassium-dependent sodium-calcium exchanger from rat brain. *J Biol Chem* 273:4155-4162.
- Uziel A, Romand R, Marot M (1981) Development of cochlear potentials in rats. *Audiology* 20:89-100.
- Visser F, Valsecchi V, Annunziato L, Lytton J (2007) Analysis of ion interactions with the K⁺-dependent Na⁺/Ca²⁺ exchangers NCKX2, NCKX3, and NCKX4 - Identification of THR-551 as a key residue in defining the apparent K⁺ affinity of NCKX2. *J Biol Chem* 282:4453-4462.
- Wakimoto K, Kobayashi K, Kuro-o M, Yao A, Iwamoto T, Yanaka N, Kita S, Nishida A, Azuma S, Toyoda Y, Omori K, Imahie H, Oka T, Kudoh S, Kohmoto O, Yazaki Y, Shigekawa M, Imai Y, Nabeshima Y, Komuro I (2000) Targeted disruption of Na⁺/Ca²⁺ exchanger gene leads to cardiomyocyte apoptosis and defects in heartbeat. *J Biol Chem* 275:36991-36998.

- Weber K, Osborn M (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244:4406-4412.
- Webster DB, Popper AN, Fay RR (1992) The mammalian auditory pathway: Neuroanatomy.
- Webster DB, Trune DR (1982) Cochlear nuclear-complex of mice. *Am J Anat* 163:103-130.
- Wilhelm J, Pingoud A (2003) Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem* 4:1120-1128.
- Williams JR, Sharp JW, Kumari VG, Wilson M, Payne JA (1999) The Neuron-specific K-Cl Cotransporter, KCC2. Antibody development and initial characterization of the protein. *J Biol Chem* 274:12656-12664.
- Winkfein RJ, Szerencsei RT, Kinjo TG, Kang K, Perizzolo M, Eisner L, Schnetkamp PPM (2003) Scanning mutagenesis of the alpha repeats and of the transmembrane acidic residues of the human retinal cone Na/Ca-K exchanger. *Biochemistry* 42:543-552.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22:130-131.
- Wu SH, Kelly JB (1993) Response of neurons in the lateral superior olive and medial nucleus of the trapezoid body to repetitive stimulation - Intracellular and extracellular recordings from mouse-brain slice. *Hear Res* 68:189-201.
- Yin TCT (2002) Neural mechanisms of encoding binaural localization cues in the auditory brainstem. In: *Integrative functions in the mammalian auditory pathway* (Oertel D, Fay RR, Popper AN, eds), pp 99-159. New York: Springer.
- Zhang L, Spigelman I, Carlen PL (1991) Development of GABA-mediated, chloride-dependent inhibition in CA1 pyramidal neurons of immature rat hippocampal slices. *J Physiol-London* 444:25-49.
- Zheng JQ, Poo MM (2007) Calcium signaling in neuronal motility. *Ann Rev Cell Dev Biol* 23:375-404.

7. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
Abb.	Abbildung
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
AN	auditorischer Nerv
AP	Aktionspotenzial
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BHK-Zellen	Baby hamster kidney cells, Babyhamster-Nierenzellen
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
CaCA	Ca ²⁺ /Cation antiporter, Ca ²⁺ /Kationen-Antiporter
CAX	Ca ²⁺ /Anionen-Austauscher
CBD	Ca ²⁺ -bindende Domäne
CCX	Ca ²⁺ /Kationen-Austauscher
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid, komplementäre Desoxyribonucleinsäure
Cl ⁻	Chlorid
CN	cochlear <i>nucleus</i> , <i>Nucleus cochlearis</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	Cycle threshold, Schwellenwert
CTP	Cytosintriphosphat
DABCO	1,4-Diazobicyclo-(2,2,2)-Octan
DAS	dorsale akustische Stria
DCN	dorsal cochlear <i>nucleus</i> , dorsaler <i>Nucleus cochlearis</i>
D/H-Wechsel	Depolarisations-/Hyperpolarisations-Wechsel
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonucleinsäure

dNTP	Desoxyribonucleotid-Triphosphate
DTT	Dithiotreitol
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektronenspray-Ionisation
EtOH	Ethanol
FCS	fetal calf serum; Fötales Kälberserum
for	forward; vorwärts
GABA	γ -aminobutyric acid, γ -Aminobuttersäure
gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
H ⁺	Proton
HEK-Zellen	human embryonic kidney cells, menschliche embryonale Nierenzellen
HPLC	high-performance-liquid-chromatography
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
IC	inferiorer <i>Colliculus</i>
ICc	central <i>nucleus</i> of the inferior colliculus, zentraler Nucleus des inferioren <i>Colliculus</i>
ICd	dorsaler <i>Cortex</i> des inferioren <i>Colliculus</i>
ICe	externer <i>Cortex</i> des inferioren <i>Colliculus</i>
IHC	Immunhistochemie/immunhistochemisch
IR	Immunreaktivität
K ⁺	Kalium
kDA	Kilodalton
KO	knockout
Li ⁺	Lithium
LNTB	lateral <i>nucleus</i> of the trapezoid body, lateraler <i>Nucleus</i> des Trapezkörpers
LSO	laterale superiore Olive
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
MGB	medial geniculate body, medialer geniculärer <i>Nucleus</i>

MNTB	medial <i>nucleus</i> of the trapezoid body, medialer <i>Nucleus</i> des Trapezkörpers
mRNA	messenger ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure
MSO	mediale superiore Olive
Na ⁺	Natrium
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NCKX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -K ⁺ -Austauscher
NCLX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Li ⁺ -Austauscher
NLL	<i>Nucleus lemniscus lateralis</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
O ₂	Sauerstoff
P	Postnataltag
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PMCA	Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	quantitative real-time Polymerasekettenreaktion
rev	reverse; rückwärts
RFU	relative fluorescence unit, relative Fluoreszenzeinheit
rn	rattus norvegicus
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transkription, gefolgt von Polymerasekettenreaktion
SD	standard deviation, Standardabweichung
SEM	standard error of the mean, Standardfehler
SLC	solute carrier
SOC	superior olivary complex, superiorer Olivenkomplex
SPN	superiorer paraolivärer <i>Nucleus</i>
Tab.	Tabelle

Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TMD	Transmembrandomänen
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> - Tetramethylethyldiamin
TRP	transient receptor potential, transientes Rezeptorpotenzial
TTP	Thymintriphosphat
VAS	ventrale akustische Stria
VCN	ventral cochlear <i>nucleus</i> , ventraler <i>Nucleus cochlearis</i>
VNTB	ventral <i>nucleus</i> of the trapezoid body, ventraler <i>Nucleus</i> des Trapezkörpers
VT	Volumenteil
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
XIP	exchanger inhibitory peptide, Austauscher inhibierendes Peptid

Curriculum vitae

Sandra Grill

Persönliche Informationen

Geburtsdatum	24.08.1981
Geburtsort	Ludwigshafen/Rhein
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

Ausbildung

1988-1992	Kurpfalzschule Dannstadt
1992-2001	Paul-von-Denis-Gymnasium Schifferstadt 7.6.2001 Abitur
2001-2006	Biologiestudium an der Technischen Universität Kaiserslautern 14.10.2003 Abschluss des Vordiploms 15.05.2006 Abschluss der Diplomarbeit im Fachbereich Tierphysiologie Thema: „Herstellung von Fusionsproteinen zur molekularen Analyse des KCC2 Proteinkomplexes“
2006-2009	Promotion im Fachbereich Tierphysiologie Thema: Verteilung von Na ⁺ / Ca ²⁺ -Austauschern in der Ontogenese des auditorischen Hirnstamms der Ratte

Danksagung

Zum Schluss bleibt mir nur noch,

DANK

zu sagen, an alle, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.