

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Der Einfluss des Endocannabinoidsystems auf die Cortexentwicklung der Maus

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Valentin Theodor Stiemcke (geb. Beck)
aus Speyer

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand: (entfernt)

1. Gutachter: (entfernt)

2. Gutachter: (entfernt)

Tag der Promotion: 07. Dezember 2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis.....	9
1 Einleitung	10
1.1 Zielsetzung dieser Arbeit.....	11
2 Literaturdiskussion	12
2.1 Corticogenese.....	12
2.2 Das Endocannabinoidsystem.....	16
2.3 Die Funktion des Endocannabinoidsystems bei der Entwicklung des Cortex 20	
2.4 FAAH	23
2.5 Manipulation von Gewebe durch Transfektion	24
2.6 <i>In utero</i> - Elektroporation.....	26
2.6.1 pCAGIG – Ein eukaryotischer Expressionsvektor mit IRES und GFP .	27
2.7 Das Cre-loxP-System.....	28
3 Material und Methoden.....	30
3.1 Material	30
3.1.1 Geräte.....	30
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	33
3.1.3 Chemikalien, Medien und Reagenzien	33
3.1.4 Puffer und Lösungen.....	36
3.1.5 Kits.....	37
3.1.6 Enzyme	37
3.1.7 Oligonukleotide	37
3.1.8 Plasmide	39
3.1.9 Antikörper	39
3.1.10 Bakterienstämme	40

3.1.11	Zelllinien.....	40
3.1.12	Versuchstiere	40
3.1.13	Software und Internetressourcen	40
3.1.14	Größenstandards	41
3.2	Methoden	42
3.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	42
3.2.1.1	Escherichia coli – Bakterienkultur	42
3.2.1.2	Einfrieren von Bakterienkulturen (Glycerol-Stocks)	42
3.2.1.3	Anzucht von Bakterienkulturen auf Nährböden.....	43
3.2.1.4	Transformation.....	44
3.2.1.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	44
3.2.1.5.1	Maxipräparation	44
3.2.1.5.2	Minipräparation.....	45
3.2.1.6	Restriktionsverdau von DNA.....	46
3.2.1.7	Auftrennung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese	47
3.2.1.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	48
3.2.1.9	Extraktion von PCR-Produkten aus Elektrophoresegelen	48
3.2.1.10	A-Additionsreaktion.....	49
3.2.1.11	Aufreinigung von DNA	49
3.2.1.12	Subklonierung von PCR-Produkten mittels <i>TOPO TA Cloning</i>	49
3.2.1.13	Subklonierung von DNA in einen Zielvektor.....	50
3.2.2	Arbeiten in Zellkultur	53
3.2.2.1	Zellkulturbedingungen	53
3.2.2.2	Transfektion	54
3.2.2.3	Probenvorbereitung für SDS-PAGE.....	55
3.2.2.4	SDS-PAGE	56
3.2.2.5	Western Blot	57
3.2.3	Tierexperimentelle Methoden.....	59

3.2.3.1	Versuchstierhaltung	59
3.2.3.2	<i>In utero</i> – Elektroporation.....	60
3.2.3.3	Präparation von Gewebe	62
3.2.4	Immunhistochemie.....	62
3.2.4.1	Fixierung von Gewebematerial	62
3.2.4.2	Floating sections.....	62
3.2.4.3	Fluoreszenzmarkierung von Gewebeschnitten	63
4	Ergebnisse	65
4.1	Ergebnisse der molekularbiologischen Arbeiten	65
4.1.1	Herstellung eines eukaryotischen Transfektionsvektors zur Überexpression von FAAH.....	65
4.1.1.1	Subklonierung der HA-FAAH-Sequenz in pCAGIG	66
4.1.1.1.1	Amplifikation der HA-FAAH Sequenz aus CBA-floxstop-HA-FAAH	67
4.1.1.1.2	TOPO TA Cloning.....	68
4.1.1.1.3	Subklonierung der HA-FAAH Sequenz aus pCR11-TOPO in pCAGIG	69
4.1.1.2	Subklonierung einer <i>floxed stop</i> -Sequenz in pCAGIG-HA-FAAH	72
4.2	Ergebnisse der Arbeiten in Zellkultur	76
4.2.1	Transfektion von Zellen durch Lipofektion	76
4.2.2	Nachweis der Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	77
4.2.3	Nachweis von FAAH mittels Western Blot	81
4.3	Ergebnisse der tierexperimentellen Arbeiten	82
4.3.1	Transfektion von Gewebe mit pCAGIG mithilfe der <i>in utero</i> -Elektroporation.....	82
4.3.2	Einflussgrößen der Transfektionseffizienz	82
4.3.3	Geeignete Aufbereitungsmethoden für durch Elektroporation transfiziertes Gewebe.....	84
4.4	Ergebnisse der immunhistochemischen Arbeiten	84

4.4.1	Nachweis der GFP-Expression in corticalen Neuronen	84
4.4.1.1	Bedeutung der Immunhistochemie bei der Identifikation transfizierter Zellen	84
5	Diskussion	86
5.1	pCAGIG-HA-FAAH – Ein eukaryotischer Transfektionsvektor zur Überexpression von FAAH	87
5.2	pCAGIG-floxstop-HA-FAAH – Zelltypspezifische Überexpression von FAAH 88	
5.3	Geeignete Techniken zur Aufbereitung von <i>in utero</i> -elektroporierten Gehirnen	90
5.4	Ausblick	91
6	Zusammenfassung	92
7	Literaturverzeichnis	94
8	Anhang	103
8.1	DNA-Sequenzen verwendeter Moleküle	103
8.1.1	#419 (pAM-floxstop-HA-FAAH-WPRE-bGHpA)	103
8.1.2	pCAGIG	107
8.1.3	pCRII-TOPO	110
8.1.4	NotI-HA-FAAH-NotI	112
8.1.5	HA-FAAH in pCRII-TOPO	116
8.1.6	pCAGIG-HA-FAAH	119
8.1.7	pCAGIG-floxstop-HA-FAAH	123
8.2	Identifikation der generierten Plasmide	128
	Danksagung	129
	Lebenslauf	130

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
2-AG	2-Arachidonoylglycerol
AAV	<i>adeno-associated virus</i> , Adeno-assoziiertes Virus
AEA	Arachidonylethanolamid, Anandamid
ApoER2	<i>apolipoprotein E receptor 2</i>
APS	Ammoniumpersulfat
bp	<i>base pairs</i> , Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CB1	Cannabinoidrezeptor 1
CB2	Cannabinoid-Rezeptor 2
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNS
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>
Da	Dalton
DAG	1,2-Diacylglycerol
DAGL	Diacylglycerollipase
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DSE	depolarisationsinduzierte Suppression der Exzitation
DSI	depolarisationsinduzierte Suppression der Inhibition
E	Embryonaltag
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eCB	Endocannabinoid
ECS	Endocannabinoidsystem
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
EGFP	<i>enhanced GFP</i>
Eppi	Mikroreaktionsgefäß
FAAH	<i>fatty acid amid hydrolase</i> , Fettsäureamidhydrolase
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FGF-2	<i>fibroblast-derived growth factor 2</i> , Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2
GABA	γ -Amino-Buttersäure
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
GOI	<i>gene of interest</i>
HSL	hormonsensitive Lipase
HU-210	1,1-Dimethylheptyl-11-hydroxytetrahydrocannabinol
IP	<i>intermediate progenitor</i> , intermediäre Vorläuferzelle
IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i> , interne ribosomale Eintrittsstelle
IUE	<i>In-utero</i> -Elektroporation
IZ	<i>intermediate zone</i> , Intermediärzone
KO	<i>Knockout</i>
LB	lysogeny broth
loxP	<i>locus of x-over</i> , P1
lysoPLC	Lyso-Phospholipase C
MAGL	Monoacylglycerin-Lipase
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>

NaCl	Natriumchlorid
NAPE-PLD	N-Acyl-Phosphatidylethanolamin-spezifische Phospholipase D
NArPE	N-Arachidonoylphosphatidylethanolamin
NAT	N-Acyltransferase
NGF	<i>nerve growth factor</i>
<i>p.c.</i>	<i>post coitum</i>
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC β	Phospholipase C β
PLC γ	Phospholipase C γ
PP	<i>preplate</i> , Präplatte
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
rpm	rotations per minute, Umdrehungen pro Minute
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SVZ	subventrikuläre Zone
TAG	Triacylglycerid
TARC	<i>Translational Animal Research Center</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCEP	<i>Tris(2-carboxyethyl)phosphin</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
TRPV1	<i>transient receptor potential subfamily V member 1</i> -Rezeptor
UV	ultraviolett
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
VZ	ventrikuläre Zone
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.4-1: Hydrolyse von Anandamid durch FAAH.	23
Abbildung 2.6-1: Sequenzkarte von pCAGIG.	27
Abbildung 4.1-1: Schematische Darstellung von Plasmid #419.	66
Abbildung 4.1-2: Spezifische Primer zur Amplifikation von HA-FAAH.....	67
Abbildung 4.1-3: Amplifikation von HA-FAAH durch PCR.	68
Abbildung 4.1-4: Ligation des PCR-Produktes in pCRII-TOPO.....	68
Abbildung 4.1-5: Restriktionsverdau von HA-FAAH in pCRII-TOPO.....	69
Abbildung 4.1-6: Schematische Darstellung von pCAGIG-HA-FAAH.....	70
Abbildung 4.1-7: Restriktionsverdau von pCAGIG-HA-FAAH.....	71
Abbildung 4.1-8: floxstop-Kassette in pCAGIG-floxstop-HA-FAAH.	73
Abbildung 4.1-9: Schematische Darstellung von pCAGIG-floxstop-HA-FAAH.	74
Abbildung 4.1-10: pCAGIG-floxstop-HA-FAAH.	75
Abbildung 4.2-1: Test von pCAGIG.	77
Abbildung 4.2-2: Test von pCAGIG-HA-FAAH.	78
Abbildung 4.2-3: Test von pCAGIG-floxstop-HA-FAAH.....	79
Abbildung 4.2-4: Test von pCAGIG-floxstop-HA-FAAH und einem Cre-Plasmid.	80
Abbildung 4.2-5: Nachweis von FAAH mittels Western Blot.....	81
Abbildung 4.3-1: Elektroporation unerwünschter Gehirnnareale.	83
Abbildung 4.4-1: Immunhistochemischer und direkter Nachweis von GFP.	85

1 Einleitung

Die Entwicklung der Großhirnrinde in der Embryonalphase ist ein komplex gesteuerter Vorgang. Die regelrechte Wanderung, finale Positionierung und anschließende Verknüpfung der Zellen des sich entwickelnden Neocortex ist essentiell für dessen spätere korrekte Funktion. Neben den verschiedenen intrinsischen und extrinsischen Einflussfaktoren auf diesen Prozess hat sich insbesondere in den letzten ca. 15 Jahren durch intensives Erforschen der Vorgänge während der Gehirnentwicklung die elementare Bedeutung des Endocannabinoidsystems herausgestellt (Maccarrone et al., 2014). Das Endocannabinoidsystem (ECS) ist ein retrogrades Transmittersystem, das nahezu ubiquitär im Gehirn lokalisiert ist (Steiner und Lutz, 2006). Mit seinen beiden an der Postsynapse gebildeten Haupttransmitterstoffen 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) und Arachidonylethanolamid (Anandamid; AEA) vermittelt es an der Präsynapse eine modulierende Wirkung, indem es durch verschiedene intrazelluläre Prozesse zu einer verminderten Ausschüttung von Neurotransmittern führt (Piomelli, 2003). Hierzu diffundieren die Transmitterstoffe des ECS retrograd von der Postsynapse zur Präsynapse, wo sie an für sie spezifische Cannabinoidrezeptoren, insbesondere den Cannabinoidrezeptor 1 (CB1), binden (Howlett et al., 2004). Die hierdurch hervorgerufene hemmende Wirkung findet an exzitatorischen wie an inhibitorischen Synapsen statt, sodass das System effektiv sowohl hemmend als auch stimulierend wirken kann und so im adulten Gehirn einen wichtigen Beitrag zum Erhalt einer Art neuroexzitatorischer Balance leistet (Kreitzer und Regehr, 2001, Pitler und Alger, 1992).

Auch während der Embryonalentwicklung kommt dem Endocannabinoidsystem eine entscheidende Rolle zu (Harkany et al., 2007). So hat seine Aktivität Einfluss auf die Zellteilungsrate (Aguado et al., 2005), die Migration (Mulder et al., 2008) sowie die Ausbildung von Zellfortsätzen sich entwickelnder Neurone (Watson et al., 2008). In der Vergangenheit wurden bereits einige wichtige Erkenntnisse zum Einfluss des Endocannabinoidsystems bei diesen Vorgängen gewonnen (Maccarrone et al., 2014, Steiner und Lutz, 2006, Ligresti et al., 2016, Mechoulam und Parker, 2013). Der Einfluss einer erniedrigten Konzentration von AEA auf die genannten Prozesse wurde bisher jedoch lediglich *in vitro* untersucht (Mulder et al., 2008). Die verschiedenen Auswirkungen auf das sich entwickelnde Gehirn *in vivo* untersuchen zu können ist daher von großem Interesse.

Da die Transmitterstoffe des Endocannabinoidsystems, die Endocannabinoide, durch molekülspezifische Enzyme auf- und abgebaut werden (Piomelli, 2003), ist durch künstliche Veränderung der Expression dieser Enzyme eine längerfristige und gleichmäßige Beeinflussung der Endocannabinoidspiegel möglich. In der Vergangenheit waren die Auswirkungen einer erhöhten Expression von FAAH und der damit einhergehenden verminderten Konzentration von AEA bereits in glutamatergen Neuronen des Hippocampus adulter Mäuse unter Zuhilfenahme eines *adeno associated virus* (AAV) *in vivo* untersucht worden. Hierbei konnten elektrophysiologisch eine gesteigerte Langzeitpotenzierung sowie in Verhaltenstests eine Neigung zu ängstlichem Verhalten, eine Auslöschung des aversiven Gedächtnisses sowie eine Beeinträchtigung in der Wiedererkennung von Objekten nachgewiesen werden (Zimmermann et al., 2019). Zur Untersuchung der Auswirkungen eines gesteigerten Abbaus von AEA während der Gehirnentwicklung ist dieses System jedoch nicht geeignet, da der Zeitraum von der Transfektion bis zur Expression des *gene of interest* den Beobachtungszeitraum im Rahmen der Gehirnentwicklung überschreitet (Karra und Dahm, 2010).

Schon seit einigen Jahren gibt es die Möglichkeit, mit Hilfe der sogenannten *in utero*-Elektroporation Manipulationen an embryonalem Gewebe vorzunehmen, die weitere Embryonalentwicklung voranschreiten zu lassen und im Anschluss die Auswirkungen der Veränderungen zu untersuchen (Sirotnak und Hutchinson, 1959, Li, 2004). Zur Transfektion mithilfe der *in utero*-Elektroporation ist jedoch ein Expressionsvektor erforderlich, dessen Eigenschaften sich von denen eines AAV-Vektors unterscheiden (Shimomura et al., 1962, Buning et al., 2008).

1.1 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Konstruktion zweier eukaryotischer Expressionsvektoren zur Überexpression von FAAH in embryonalen Neuronen. Einer der beiden Vektoren sollte eine konstitutive Expression in allen transfizierten Zellen ermöglichen (anwendbar in der Wildtyp-Maus), während ein weiterer unter Verwendung des Cre/loxP-Systems einer zelltypspezifischen, Cre-Rekombinase-abhängigen Expression dienen sollte. Die konstruierten Vektoren sollten anschließend auf ordnungsgemäße Funktion geprüft und geeignete Methoden zur Aufarbeitung und Analyse von durch *in utero*-Elektroporation transfiziertem Gewebe untersucht werden.

2 Literaturdiskussion

2.1 Corticogenese

Der Neocortex ist ein komplexes Gebilde, das sich aus hunderten verschiedenen Arten von Neuronen und einer Vielzahl von Gliazellen zusammensetzt (Peters und Jones, 1984, Ramón y Cajal, 1895). Als phylogenetisch verhältnismäßig neuer Abschnitt des Gehirns dient er Funktionen wie Kognition, Bewusstsein, Gedächtnis, Emotionen sowie der Wahrnehmung sensorischer Reize und der Steuerung willkürlicher Bewegungen (Trepel, 2012: S. 221 ff.). Die im Laufe der Evolution zunehmende Bedeutung des Neocortex spiegelt sich heute in einer verhältnismäßig deutlichen Volumenzunahme wieder (Finlay und Darlington, 1995). Wie der Neurologe Korbinian Brodmann bereits im frühen 20. Jahrhundert entdeckte, zeigt der Neocortex bei allen Säugetieren einen typischen sechsschichtigen Aufbau (Brodmann, 1909); einige Jahrzehnte später wurde entdeckt, dass eine Aufhebung dieser Grundarchitektur durch einen Defekt im für das extrazelluläre Glykoprotein Reelin kodierenden Gen bei Mäusen zu spezifischen Ausfallerscheinungen führt (Falconer, 1951).

Man unterscheidet zwei Gruppen von Neuronen, die zusammen mit den Gliazellen den Cortex bilden (vgl. zum Folgenden: Trepel, 2012: S. 11 ff. und S. 221 ff.): Projektionsneuronen und Interneuronen. Die Projektionsneuronen, die aufgrund ihrer histologischen Morphologie auch als Pyramidenzellen bezeichnet werden und deren Axone Kontakt zu intracorticalen, subcorticalen und subcerebralen Regionen herstellen, wirken aufgrund ihrer exzitatorischen Neurotransmitter, meist Glutamat, erregend auf Zielzellen. Interneuronen stellen über kurze Distanzen Verbindungen zu anderen Neuronen her und üben aufgrund ihrer inhibitorischen Neurotransmitter, meist γ -Amino-Buttersäure (GABA), hemmenden Einfluss aus (Trepel, 2012). Während die Projektionsneuronen aus Vorläuferzellen hervorgehen, die sich in Zell„pools“ (Molyneaux et al., 2007) im Bereich der Seitenventrikel befinden (Anderson et al., 2002) und im Anschluss radial, von innen nach außen migrieren, liegen die Vorläuferzellen der GABAergen Interneuronen sowie der spezialisierten, glutamatergen, Reelin-produzierenden Cajal-Retzius-Zellen in weiter entfernten Regionen und migrieren tangential, also parallel zur Hirnoberfläche, teilweise über weite Strecken, bis sie ihre finale Position im Cortex erreichen (Gelman et al., 2012, Meyer, 2010). So liegen die Vorläuferzellen der GABAergen Interneuronen größtenteils im ventralen Telencephalon (Subpallium), vor allem im Bereich der

Ganglienhügel („ganglionic eminences“) (Wonders und Anderson, 2006); die Cajal-Retzius-Zellen entstammen verschiedenen Regionen des Palliums, unter anderem der *cortical hem*, und Teilen des Subpalliums (Yoshida et al., 2006, Bielle et al., 2005).

Projektionsneuronen bilden im adulten Neocortex diverse unterschiedliche Populationen, die sich unter anderem in Lokalisation, Morphologie, Genexpression und Funktion unterscheiden. Untersuchungen der Genexpression verschiedener Zellpopulationen und deren räumliche Zuordnung in den letzten Jahren haben es ermöglicht, schichtspezifische Markergene zu isolieren, mit deren Hilfe Veränderungen im strukturellen Aufbau des Neocortex oder der Genexpression bestimmter Zellen oder Zellpopulationen nachgewiesen werden können (Molyneaux et al., 2007). Die Ausprägung der morphologischen Eigenschaften der Projektionsneuronen geschieht nach deren Migration der Zellen an ihre entsprechenden Positionen in der Rindenplatte (*cortical plate*) (Fishell und Hanashima, 2008). Neben der korrekten Anordnung der Zellen im sich bildenden Cortex durch Migration sind auch die Regulation der Teilungsrates neuronaler Vorläuferzellen sowie der Aussprossung von Zellfortsätzen (Neuriten) und der synaptischen Verknüpfung von Zellen untereinander wichtige Einflussgrößen, die im Rahmen der Gehirnentstehung einer engmaschigen Kontrolle unterliegen (Marin und Rubenstein, 2003, Guillemot, 2005).

Die eigentliche Entstehung des Neocortex findet bei Mäusen zwischen den Embryonaltagen (E) 11,5 und 17,5 statt (Angevine und Sidman, 1961). Die Voraussetzungen hierfür werden jedoch bereits in der frühen Embryonalentwicklung geschaffen: Nachdem sich im Rahmen der Neurulation das Neuralrohr aus dem Neuroektoderm abschnürt, beginnt im Bereich der dorsolateralen Wand des rostralen Abschnitts des Neuralrohres eine starke Proliferation des Neuroepithels, aus dem später die corticalen Projektionsneuronen hervorgehen werden (Trepel, 2012: S. 14 ff.). Es bildet sich eine Zellschicht aus neuroepithelialen Zellen, die sich an der luminalen Seite des Neuralrohres befindet und als ventrikuläre Zone (VZ) bezeichnet wird, da das Lumen des Neuralrohres die primitive Anlage des Ventrikelsystems darstellt (Trepel, 2012: S. 14 ff.). Im Verlauf der Neurogenese lässt sich eine zweite Schicht proliferierender Zellen abgrenzen, die sich unmittelbar an die ventrikuläre Zone anschließt und als subventrikuläre Zone (SVZ) bezeichnet wird (Smart und McSherry, 1982). Die in diesen beiden Zellschichten liegenden Vorläuferzellen produzieren nach einem streng geregelten Schema die corticalen Projektionsneuronen, die im Anschluss

durch eine bestimmte Abfolge von Migrationsbewegungen ihre finale Position erreichen (Marin und Rubenstein, 2003).

Man unterscheidet im Verlauf der Neurogenese drei Arten von Vorläuferzellen (Götz und Huttner, 2005): Die neuroepithelialen Zellen stellen die zuerst auftretende Zellpopulation dar. Sie bilden zunächst ein die Wand des Ventrikels auskleidendes mehrreihiges Epithel, das durch symmetrische Zellteilung an Volumen zunimmt und, zu einem kleineren Anteil, durch asymmetrische Zellteilung die ersten Neuronen generiert (Smart, 1973). Die neuroepithelialen Zellen werden im Verlauf der Neurogenese in radiäre Gliazellen umgewandelt, welche Zellfortsätze bilden, die von der untersten Schicht der VZ mit Kontakt zur Ventrikelwand bis zur pialen Oberfläche des entstehenden Cortex reichen und somit fortan als Leitstruktur für die radiale Migration entstehender Neuronen dienen (Rakic, 1972). Gleichzeitig leistet zumindest ein Teil der radiären Gliazellen weiterhin einen Beitrag zur Neurogenese, sowohl direkt durch Zellteilung und Bildung von Neuronen im apikalen Bereich der VZ als auch indirekt durch Bildung von intermediären Vorläuferzellen („intermediate progenitors“, IPs) (Noctor et al., 2001). Es konnte beobachtet werden, dass diese meist durch asymmetrische Zellteilung von radiären Gliazellen im Bereich der VZ abgespalten werden, als IPs in die SVZ wandern und dort durch symmetrische Zellteilung zwei neue Neuronen bilden (Noctor et al., 2004).

Die ersten gebildeten Neuronen formen ein an die SVZ angrenzendes, mehrschichtiges Gewebe, das als *preplate* (PP) bezeichnet wird (vgl. zum Folgenden: Gilmore und Herrup, 1997). Nachfolgend gebildete Neuronen wandern in die Mitte der PP ein und bilden so die Rindenplatte (*cortical plate*, CP) als Vorläuferstruktur des entstehenden Neocortex, wobei sie die PP in eine oberflächliche und eine tiefe Schicht spalten, die fortan als Marginalzone („marginal zone“, MZ) respektive „subplate“ (SP) bezeichnet werden (Gilmore und Herrup, 1997). Zwischen der Subplate und der SVZ bildet sich die Intermediärzone (IZ) aus, in der sich migrierende Neuronen und deren Zellfortsätze befinden und deren Größe im Verlauf der Corticogenese zunimmt, bis sie nach deren Abschluss schließlich in weiße Substanz umgewandelt wird (Del Rio et al., 2000). In der oberhalb der CP gelegenen Marginalzone finden sich die bereits um den Embryonaltag (E) 10,5 an verschiedenen Orten des ventralen Telencephalon gebildeten (Bielle et al., 2005) und per tangentialer Migration eingewanderten Cajal-Retzius-Zellen, zusammen mit GABAergen Interneuronen (Ma et al., 2014). Das von den Cajal-Retzius-Zellen an den Extrazellularraum abgegebene Glykoprotein Reelin

führt zu einer Besonderheit bei der Bildung der Zellschichten des Neocortex: Nachdem die neuronalen Vorläuferzellen in der VZ oder SVZ ihre letzte mitotische Teilung durchlaufen haben, nutzen sie zunächst „multipolare Migration“ zur Fortbewegung, um im Anschluss einen Leitfortsatz auszubilden und als bipolare Zellen in einem als „locomotion“ bezeichneten Prozess entlang der Radialgliafasern durch die Intermediärzone bis über die Rindenplatte hinaus zu migrieren (Tabata et al., 2009, Tabata und Nakajima, 2003). Hier treffen sie auf die Extrazellulärmatrix, die das von den Cajal-Retzius-Zellen sezernierte Glykoprotein Reelin enthält. Durch eine komplexe intrazelluläre Signalkaskade kommt es nach Aktivierung des ApoER2 und des VLDL-Rezeptors durch Reelin zu einem Umschalten vom Radialglia-abhängigen Migrationsmodus zu einem als terminale Translokation („*terminal translocation*“) bezeichneten Prozess, der zu einer Verankerung der Leitfortsätze der Neuronen in der Extrazellulärmatrix der Marginalzone und deren finaler Positionierung führt (Sekine et al., 2012). Nachfolgend gebildete Neuronen migrieren über die bereits final positionierten Neuronen hinweg, bis auch sie durch Kontakt zu Reelin in die terminale Translokation wechseln und sich so zu ihrem Zielort bewegen (Nadarajah et al., 2001). Dieser Prozess führt dazu, dass die am frühesten geborenen Neuronen später die am tiefsten liegende (*Lamina VI*) der sechs mit römischen Ziffern bezeichneten Schichten des Neocortex bilden (Gilmore und Herrup, 1997). Die oberflächlichste Schicht (*Lamina I*) bildet eine Ausnahme, da sie aus Cajal-Retzius-Zellen sowie GABAergen Interneuronen gebildet wird, von denen erstere zum Großteil nach Abschluss der Corticogenese untergehen (Ma et al., 2014). Auch die radiären Gliazellen sind schließlich nicht mehr vorhanden, sie gehen entweder apoptotisch unter oder transdifferenzieren zu Astrozyten (Chanas-Sacre et al., 2000). Die Zonen, die während der Cortexentstehung die neuronalen Vorläuferzellen enthielten, sind schließlich ebenfalls nicht mehr nachweisbar; an ihrer Stelle findet sich im adulten Gehirn die weiße Substanz (Trepel, 2012: S. 14 ff.).

2.2 Das Endocannabinoidsystem

Die Hanfpflanze *Cannabis sativa* gilt als eine der ersten von Menschen verwendeten Nutzpflanzen und wurde schon vor über 3000 Jahren neben der Verarbeitung der Pflanzenfasern und der Verwendung als Nahrungsmittel auch aufgrund ihrer Wirkung in sozialen und religiösen Ritualen und als Therapeutikum gegen diverse Beschwerden wie Angstzustände, Stress, Appetitlosigkeit, Schmerzen oder Krämpfe angewandt (Mechoulam, 1986). Die Mechanismen, die den vielfältigen Wirkungen von *Cannabis sativa* auf den Organismus zugrunde liegen, waren jedoch lange unbekannt, vor allem, weil es aufgrund der chemischen Struktur der pharmakologisch wirksamen Inhaltsstoffe lange nicht gelungen war, diese zu isolieren (Steiner und Lutz, 2006). Die erfolgreiche Gewinnung des Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) in Reinform 1964 legte schließlich den Grundstein für die Erforschung der Pharmakodynamik der Substanz (Gaoni und Mechoulam, 1964), die schließlich zur Entdeckung von THC bindenden Rezeptoren und körpereigenen Signalmolekülen mit THC-ähnlicher Wirkung führte, die als Endocannabinoide (eCB) bezeichnet werden (Steiner und Lutz, 2006).

Das Endocannabinoidsystem ist ein Signalsystem, das sich aus den Endocannabinoiden (eCB), deren auf- und abbauenden Enzymen und seinen entsprechenden Rezeptoren zusammensetzt (Howlett et al., 2004). Es ist ein komplexes und wichtiges physiologisches System, das in einer Vielzahl von Stoffwechselfvorgängen involviert ist, die sich hauptsächlich im Bereich des Gehirnstoffwechsels abspielen (Ligresti et al., 2016). Die zwei wichtigsten Endocannabinoide Arachidonoyl ethanolamid (Anandamid, AEA) und 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) (Stella et al., 1997, Mechoulam et al., 1995, Devane et al., 1992) sind Lipide, die über Zwischenschritte aus Zellmembranbestandteilen synthetisiert werden (Cadas et al., 1996, Di Marzo et al., 1994). Obwohl eCB aufgrund ihrer Struktur über Zellmembranen diffundieren können, erfolgt deren Abbau durch spezifische Enzyme in der Regel nach Internalisierung über ein schnelles und selektives Transportsystem (Kaczocha et al., 2009, Piomelli, 2003), das sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen vorhanden ist und aus einem Zusammenspiel aus verschiedenen eCB-bindenden Proteinen, und möglicherweise Cholesterin (Fowler, 2013, Di Pasquale et al., 2009) besteht, auch wenn ein Transporter im Sinne eines Transmembranproteins bis heute nicht identifiziert werden konnte (Deutsch, 2016).

AEA wird durch das Enzym N-Acyl-Phosphatidylethanolamin-spezifische Phospholipase D (NAPE-PLD) aus N-Arachidonoylphosphatidylethanolamin (NArPE) gebildet (Okamoto et al., 2004). NArPE entsteht, indem die N-Acyltransferase (NAT) eine Arachidonsäuregruppe von Phosphatidylcholin auf Phosphatidylethanolamin überträgt (Cadas et al., 1997, Sugiura et al., 1996). Abgebaut wird AEA nach Aufnahme durch das Enzym Fettsäureamidhydrolase (*fatty acid amid hydrolase*, FAAH), indem es durch Einführung eines Wassermoleküls in Arachidonsäure und Ethanolamin gespalten wird (Maurelli et al., 1995, Cravatt et al., 1996).

2-AG liegt im Vergleich zu AEA im Gehirn in circa 170-fach höherer Konzentration vor (Stella et al., 1997). Es wurden für die Produktion von 2-AG mehrere Synthesewege beschrieben, von denen zwei in einer gemeinsamen Endstrecke münden, in der 2-AG durch die beiden Diacylglycerollipasen DAGL α und DAGL β aus 1,2-Diacylglycerol (DAG) gebildet wird (Piomelli, 2003): DAG entsteht dabei entweder als Teil eines intrazellulären Signalweges durch Aktivität der Phospholipase C β (PLC β) oder Phospholipase C γ (PLC γ) zusammen mit Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP $_3$) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) oder alternativ aus der Hydrolyse arachidonsäurehaltiger Triacylglyceride (TAGs) durch die hormonsensitive Lipase (HSL), eine Carboxylesterase oder andere Lipasen, worauf 2-AG durch DAGL α und DAGL β aus den TAGs unter Abspaltung einer Fettsäure entsteht. (Stella et al., 1997). Bei einem alternativen Syntheseweg wird PIP $_2$ mithilfe der PIP $_2$ -Phosphatase zunächst in Phosphatidylinositol und anschließend durch die Phospholipase A1 in 2-Arachidonoyl-Lyso-Phospholipid umgewandelt. Durch Abspaltung des Phosphatrestes durch die Lyso-Phospholipase C (lysoPLC) entsteht dann 2-AG (Ueda et al., 1993). Auf der Basis von Studien mit DAGL-Inhibitoren oder DAGL-Knockout-Mäusen (KO) wird derzeit davon ausgegangen, dass die DAGL-abhängige Synthese den wichtigeren Beitrag zur Produktion von 2-AG leistet und die alternativen Signalwege eine untergeordnete Rolle spielen (Hsu et al., 2012, Tanimura et al., 2010, Gao et al., 2010). Der Abbau von 2-AG erfolgt durch die Serinhydrolase Monoacylglycerin-Lipase (MAGL), welche primär an der Präsynapse lokalisiert ist (Dinh et al., 2002), sich aber auch im Sinne der tripartiten Synapse an perisynaptischen Astrozyten befindet, womit eine laterale Diffusion von 2-AG aus dem synaptischen Spalt verhindert wird (Kreitzer et al., 2002, Wilson und Nicoll, 2001).

Der Modus der Signaltransduktion des Endocannabinoidsystems stellt eine Besonderheit dar, weil die Signalmoleküle, anders als in den meisten Fällen, an der Postsynapse gebildet werden, retrograd über den synaptischen Spalt diffundieren und ihre Wirkung an der Präsynapse entfalten (Wilson und Nicoll, 2001, Ohno-Shosaku et al., 2001, Kreitzer und Regehr, 2001). Die Zielstruktur an der Präsynapse bildet vor allem der Cannabinoid-Rezeptor Typ 1 (CB1), ein G-Protein-gekoppelter 7-Transmembran-Rezeptor (Howlett et al., 1990, Console-Bram et al., 2012), der im adulten Gehirn vor allem in für Bewegung und Kognition verantwortlichen Arealen wie den Basalganglien, der Substantia nigra, dem Globus pallidus, dem Cerebellum, dem Hippocampus sowie im Hirnstamm zu finden ist (Mechoulam und Parker, 2013). Ein zweiter Rezeptor, der Cannabinoid-Rezeptor Typ 2 (CB2), ebenfalls ein G-Protein-gekoppelter 7-Transmembran-Rezeptor, teilt sich bei einer Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz von 44% einige strukturelle Gemeinsamkeiten mit CB1, allerdings unterscheidet er sich von diesem sowohl in seiner Selektivität für Liganden als auch insbesondere in seiner Lokalisation (Console-Bram et al., 2012): Während CB1 vor allem im ZNS vorhanden ist, findet sich CB2 überwiegend in lymphatischem Gewebe und auf Immunzellen (Lynn und Herkenham, 1994). Sein Einfluss auf physiologische Vorgänge im adulten ZNS ist bisher umstritten – schon alleine die Frage, ob funktionell aktive CB2-Rezeptoren im ZNS überhaupt vorhanden sind, verursachte in der Vergangenheit Kontroversen (Stempel et al., 2016, Chin et al., 2008, Onaivi et al., 2006). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die funktionelle Relevanz des CB1-Rezeptors im ZNS zumindest wesentlich besser charakterisiert ist als die des CB2-Rezeptors (Pacher und Mechoulam, 2011).

Im adulten Gehirn kommt es durch Aktivierung des CB1-Rezeptors an der Präsynapse zu einer intrazellulären Signalkaskade, die über verschiedene Wirkmechanismen zu einer verringerten Ausschüttung von Neurotransmittern wie GABA oder Glutamat führt (Howlett et al., 2002), beispielsweise durch Verringerung der Spiegel von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), der Aktivierung verschiedener Kinasen oder Phosphatasen sowie der Hyperpolarisation der Zelle durch das Schließen von Ca^{2+} -beziehungsweise Öffnen von K^{+} -Kanälen (Rueda et al., 2000, Romero et al., 2002, Twitchell et al., 1997, Diaz-Laviada und Ruiz-Llorente, 2005, Mackie et al., 1995). Da die durch die genannten Vorgänge verminderte Ausschüttung von Neurotransmittern sowohl in glutamatergen als auch in GABAergen Neuronen stattfindet, kann hieraus sowohl eine Hemmung als auch eine Disinhibition der Signalübertragung resultieren

(Piomelli, 2003). In glutamatergen Neuronen spricht man von einer depolarisationsinduzierten Suppression der Exzitation (DSE) (Kreitzer und Regehr, 2001), während es in GABAergen Neuronen zu einer depolarisationsinduzierten Suppression der Inhibition (DSI) kommt (Pitler und Alger, 1992). Während diese retrograde Form der Signalübertragung sowohl durch 2-AG als auch AEA vermittelt wird, existiert für AEA ein weiterer Mechanismus, bei dem es zur präsynaptischen Bildung von AEA kommt, welches *transient receptor potential subfamily V member 1*-Rezeptoren (TRPV1) an der Postsynapse aktivieren kann (Grueter et al., 2010, Chavez et al., 2010). 2-AG hat eine hohe Affinität zu CB1 und CB2, während AEA einen Partialagonisten für CB1 darstellt und zu CB2 eine geringe Affinität aufweist (Reggio, 2010).

2.3 Die Funktion des Endocannabinoidsystems bei der Entwicklung des Cortex

Auch während der Embryonalentwicklung kommt dem Endocannabinoidsystem eine entscheidende Rolle zu und insbesondere die Auswirkungen auf die Prozesse während der Gehirnentstehung wurden in den letzten Jahren zunehmend besser verstanden (Maccarrone et al., 2014). Dass das Endocannabinoidsystem generell Einfluss auf die Embryonalentwicklung hat, ist bereits seit den 1970er Jahren bekannt, als erste Versuche an Mäusen zeigten, dass THC die Plazentaschranke überschreitet, in den Blutkreislauf der Föten gelangt und dosisabhängig zu deutlich verringertem Geburtsgewicht oder intrauterinem Fruchttod führen kann (Harbison und Mantilla-Plata, 1972, Hutchings et al., 1989). Diese Auswirkungen können mit dem Vorhandensein des CB1-Rezeptors bereits im Stadium der trophoblastischen Stammzelle, noch vor der Entwicklung des Neuroektoderms, erklärt werden (Harkany et al., 2007), denn Aktivität an CB1 ist in diesem Stadium essentiell für die Regulation Zellproliferation- und differenzierung im Rahmen der Plazentation (Sun und Dey, 2008). In den 2000ern durchgeführte Beobachtungsstudien konnten den Zusammenhang zwischen Cannabiskonsum Schwangerer und Wachstumsverzögerungen deren Kinder auch beim Menschen nachweisen (Hurd et al., 2005, El Marroun et al., 2009). Untersuchungen von Kindern und Jugendlichen, deren Mütter in der Schwangerschaft Cannabis konsumiert hatten, konnten als Hinweis auf Störungen in der zentralnervösen Entwicklung unter anderem negative Auswirkungen auf Intelligenz, visuelles Gedächtnis, Hand-Auge-Koordination sowie analytisches Denken feststellen (Willford et al., 2010, Fried et al., 2003). Des Weiteren zeigten sich neben Aufmerksamkeitsdefiziten vermehrt Störungen der Impulskontrolle, Angststörungen, Depressionen sowie eine Tendenz zu Substanzmissbrauch und delinquentem Verhalten (Day et al., 2006, Leech et al., 2006, Leech et al., 1999, Day et al., 2011). Diese deutlichen Hinweise auf eine Beteiligung des Endocannabinoidsystems bei entscheidenden Prozessen der Gehirnentwicklung führten zu einer intensiven interdisziplinären Erforschung des Themas in den letzten Jahren, auch mit Augenmerk auf einen möglichen Einfluss auf die Entstehung psychiatrischer Erkrankungen, von denen ein Ursprung in der Embryonalphase angenommen wird, wie beispielsweise Schizophrenien, bipolare Störungen, Suchterkrankungen, Gehirnstoffwechselstörungen und neurodegenerativen

Erkrankungen (Maccarrone et al., 2014). Auch wenn längst nicht alle Aspekte erforscht sind, haben hierdurch viele interessante Entdeckungen eine bedeutende Beteiligung des Endocannabinoidsystems an verschiedensten Prozessen der Gehirnentwicklung, wie Proliferation, Migration, Polarisation und Synaptogenese belegen können.

Während im adulten Gehirn Endocannabinoide ihre Wirkung durch einen parakrinen Sekretionsmodus entfalten (Paria et al., 2001), spielt vor allem zu Beginn der Neurogenese, in differenzierenden Neuronen sowie neuronalen Vorläuferzellen, überwiegend autokrine Signaltransduktion eine Rolle, bei der die von der Zelle freigesetzten Signalmoleküle Rezeptoren der gleichen Zelle aktivieren (Aguado et al., 2006, Keimpema et al., 2010, Walker et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Mechanismus neben dem Einfluss von Wachstumsfaktoren wie *epidermal growth factor* (EGF) und fibroblast-derived growth factor (FGF-2) (Temple, 2001) einen wichtigen Beitrag zur Steuerung der Proliferation und Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen leistet und diese ein funktionierendes Endocannabinoidsystem aufweisen (Aguado et al., 2005). CB1-spezifische mRNA konnte ab E 12,5 in den Proliferationszonen des murinen Gehirns nachgewiesen werden (Mulder et al., 2008). Die Tatsache, dass sich in den neuronalen Vorläuferzellen die 2-AG produzierenden Enzyme (DAGL α/β) in direkter Nähe zu CB1- und CB2-Rezeptoren befinden, lässt eine Rezeptoraktivierung nach lateraler Diffusion der Liganden innerhalb der Plasmamembran vermuten (Maccarrone et al., 2014, Mulder et al., 2008). Im Gegensatz zu ausdifferenzierten Neuronen koexprimieren neuronale Vorläuferzellen CB1- und CB2-Rezeptoren. Insbesondere in der SVZ konnte auch das Vorkommen von CB2 nachgewiesen werden, und es wurde gezeigt, dass neben DAGL- auch CB2-Inhibitoren proliferationsinhibierend auf neuronale Vorläuferzellen wirkten, während FAAH-Inhibitoren und CB2-Rezeptoragonisten die Proliferation stimulierten (Goncalves et al., 2008). Doch auch die Manipulation an CB1 hat Auswirkungen auf die Proliferation, so führt ein CB1-Knockout zu einer verringerten Proliferationsrate in der VZ und SVZ, während ein Knockout von FAAH diese erhöht (Mulder et al., 2008).

Im Laufe der neuronalen Differenzierung kommt es zu einer verstärkten Expression von CB1 auf Kosten von CB2 (Goncalves et al., 2008), und es gibt Hinweise darauf, dass dieser Wechsel an der Ausbildung der Zellpolarität differenzierender Neuronen sowie an deren Migration über weite Strecken beteiligt ist, bei der Zellen mithilfe ihrer am Leitfortsatz befindlichen CB1-Rezeptoren einem Endocannabinoidgradienten folgen (Soderstrom und Tian, 2006, Morozov et al., 2009, Watson et al., 2008, Begbie

et al., 2004). Außerdem wird im Verlauf die DAGL-Expression reduziert, was zu einer zunehmenden Abhängigkeit der Zelle von externem 2-AG und zu einer Migration in Richtung von durch postmitotische Neuronen in der Rindenplatte produziertem 2-AG führt (Bisogno et al., 2003). Da die Migration von Neuronen somit unter anderem der Konzentration von Endocannabinoiden folgt, ist es wichtig, deren unkontrollierte Diffusion und somit eine ungerichtete Migration von differenzierenden Neuronen zu verhindern. Die Tatsache, dass außer neuronalen Vorläuferzellen (Aguado et al., 2005, Aguado et al., 2006) auch radiäre Gliazellen FAAH und MAGL exprimieren (Morozov et al., 2004, Harkany et al., 2007, Keimpema et al., 2010) legt nahe, dass diese entlang ihrer von der Ventrikeloberfläche bis zur Pia mater reichenden Fasern, die migrierenden Neuronen als Leitstrukturen dienen (Metin et al., 2008), Endocannabinoide abbauen, um eine gerichtete Migration zu ermöglichen (Maccarrone et al., 2014). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl ein CB1-Knockout als auch eine FAAH-Überexpression (letztere in organotypischer Gewebekultur) die Migration von Neuronen aus der VZ beziehungsweise SVZ in die oberflächlich gelegenen Cortexschichten (vor allem II und III) stark beeinträchtigt, während ein FAAH-Knockout sowie eine pharmakologische Beeinflussung mit HU-210¹ oder URB597² zu einer beschleunigten Migration und einer Ansammlung von Neuronen in weiter oben liegenden Cortexschichten führt (Mulder et al., 2008).

Nach der Migration der Neuronen üben Endocannabinoide auch Einfluss auf die neurochemische, physiologische und morphologische Differenzierung von Projektionsneuronen aus (Maccarrone et al., 2014). So führt eine übermäßige Zugabe von AEA in isolierten Pyramidenzellen aus Embryonen im Stadium E 14,5 zu einer Elongation des Axons und einer reduzierten Aussprossung von Axonterminalen, während die Zugabe von *nerve growth factor* (NGF) oder AM251³ eine gegenteilige Entwicklung bewirkt (Mulder et al., 2008). Ein Knockout von CB1 führt zur aberranten Elongation von Axonen sowie zu Faszikulationsdefiziten, wodurch Projektionsneuronen keinen Kontakt zu ihren Projektionszielen finden konnten (Mulder et al., 2008). Mit Ausbildung der Synapse kommt es zum Wechsel von autokrinem zu

¹ 1,1-Dimethylheptyl-11-hydroxytetrahydrocannabinol, ein hochpotentes synthetisches Cannabinoid, das länger und 100- bis 800-fach stärker wirkt als THC und sowohl CB1 als auch CB2 aktivieren kann, mit einer höheren Affinität zu CB1 (Little et al., 1989).

² Alternativer Name KDS-4103, ein relativ selektiver FAAH-Inhibitor (Mor et al., 2004, Tarzia et al., 2006).

³ Ein inverser Agonist am CB1-Rezeptor (Lan et al., 1999), ähnlich zu Rimonabant (Fong und Heymsfield, 2009).

parakrinem (retrogradem) Sekretionsmodus und damit bei gleichbleibender Lokalisation der Cannabinoidrezeptoren zwangsläufig zur Verlagerung verschiedener beteiligter Enzyme (Maccarrone et al., 2014). So findet sich beispielsweise DAGLα in differenzierenden beziehungsweise migrierenden Neuronen im Bereich des Axons und nach Etablierung der Synapse an der Postsynapse (Bisogno et al., 2003, Keimpema et al., 2010).

2.4 FAAH

Endogene neuromodulatorische Moleküle unterliegen funktionsbedingt grundsätzlich einem exakt geregelten System aus auf- und abbauenden Enzymen, um eine rasche Initiation und Inaktivierung der Signalübertragung bewirken zu können (MacPhee-Quigley et al., 1985, Singer, 1995). Das Endocannabinoid Anandamid wird durch die Serinhydrolase FAAH (*fatty acid amid hydrolase*, Fettsäureamidhydrolase) abgebaut, die erstmals 1993 als Anandamid-abbauendes Enzym beschrieben wurde (Deutsch und Chin, 1993). Es handelt sich um ein Transmembranprotein, das aus 579 Aminosäuren besteht und ein Molokulargewicht von 63.055 Da aufweist (McKinney und Cravatt, 2005).

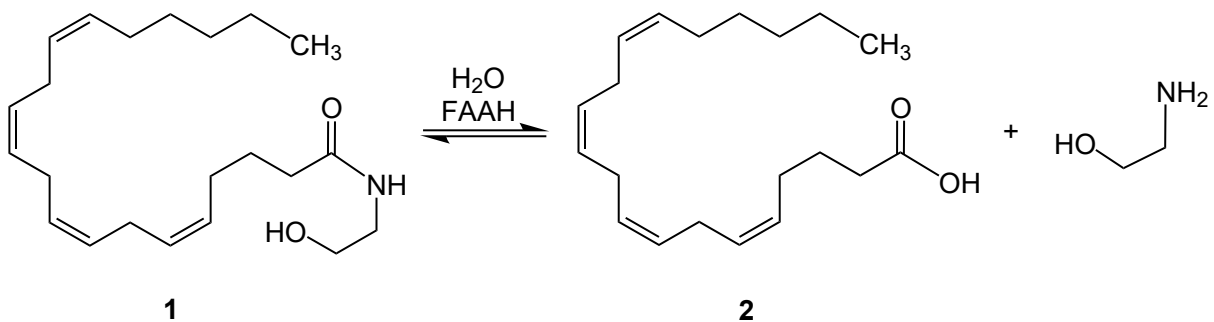


Abbildung 2.4-1: Hydrolyse von Anandamid durch FAAH. Anandamid (1) wird unter Einführung eines Wassermoleküls mithilfe der Fettsäureamidhydrolase in Arachidonsäure (2) und Ethanolamin (rechts) gespalten. Grafik erstellt durch Kchm123, verwendet unter Lizenz: CC BY-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0>)

Es katalysiert hauptsächlich die Hydrolyse von Anandamid durch Einführung eines Wassermoleküls, wobei Arachidonsäure und Ethanolamin freigesetzt werden (Bracey et al., 2002). Das Enzym weist grundsätzlich Amidase- und Esteraseaktivität auf und hydrolysiert neben Anandamid ein breites Spektrum von Amid- und Estersubstraten, unter anderem auch bioaktive Fettsäureamide, die an keinen bekannten Cannabinoidrezeptor binden (Calignano et al., 1998, Mazzari et al., 1996, Fu et al., 2003); die höchste Enzymaktivität weist es mit nahezu 100 % allerdings nur bei der

Hydrolyse von Ölsäure und AEA auf (Bracey et al., 2002, Cravatt et al., 1996). Da die Hydrolysereaktion als katalysierte Gleichgewichtsreaktion abläuft, kann FAAH grundsätzlich auch die Rückreaktionen katalysieren (Deutsch et al., 2002). FAAH ist nahezu im gesamten Gehirn nachweisbar, in hohen Konzentrationen in Somata und vor allem Dendriten von Projektionsneuronen (Cravatt et al., 2001, Gulyas et al., 2004, Kathuria et al., 2003). Im Hippocampus, im Neocortex und im Cerebellum ist FAAH an der Postsynapse lokalisiert, wo es dem Abbau von antero- und retrograd sezerniertem AEA dient (Egertova et al., 2003, Tsou et al., 1998). Innerhalb der Zelle befindet sich FAAH überwiegend im somatodendritischen Kompartiment und meist integriert in intrazelluläre Membranen wie der äußeren Mitochondrienmembran und der Membran des glatten endoplasmatischen Retikulums (Egertova et al., 1998, Gulyas et al., 2004). Nachweisbar ist FAAH bereits in der Periimplantationsperiode im Uterus und in Embryonen von Mäusen (Paria et al., 1999) sowie im Uterusepithel prämenopausaler Frauen (MacCarrone et al., 2000) und in der menschlichen Plazenta während des ersten Trimesters der Schwangerschaft, was der Verhinderung des Übertritts von maternalem AEA oder der Regulation des plazentaren AEA-Spiegels dienen könnte (Helliwell et al., 2004). Im ZNS konnte FAAH-Aktivität ab E 14,0 in Ratten nachgewiesen werden (Thomas et al., 1997). Ein Knockout von FAAH in Mäusen führt zu 15-fach erhöhten AEA-Spiegeln im ZNS (Cravatt et al., 2001).

2.5 Manipulation von Gewebe durch Transfektion

Transfektion bezeichnet grundsätzlich das Einbringen von zellfremdem genetischem Material (DNA oder RNA) in eukaryotische Zellen. 1958 wurde erstmals die Aufnahme freier Poliovirus-RNA durch HeLa-Zellen beschrieben (Alexander et al., 1958). Ein Jahr darauf wiesen Sirotnak und Hutchinson die Absorption radioaktiv markierter DNA durch Mauslymphomzellen nach (Sirotnak und Hutchinson, 1959). Man unterscheidet eine stabile Transfektion, bei der das eingebrachte Material in das Genom der Wirtszelle integriert wird, von einer transienten Transfektion ohne Integration in das Genom (Kim und Eberwine, 2010). Durch Einführung von genetischem Material in Kombination mit einem geeigneten Vektor ist in den Zielzellen die Expression eines *gene of interest* (GOI) möglich, indem es über verschiedene Mechanismen zu einem Transfer des genetischen Materials in den Zellkern und dort zur Transkription kommt, worauf die Translation der entstandenen mRNA zur Bildung des resultierenden Proteins führt (Washbourne und McAllister, 2002). Die in der vorliegenden Arbeit

beabsichtigte Überexpression des GOI FAAH war im Vorfeld bereits in adulten Gehirnen durchgeführt worden, wobei die Transfektion mithilfe eines *adeno associated virus* (AAV) erfolgte (Zimmermann et al., 2019). Es existieren verschiedene Verfahren, die es erlauben, Transfektionen durchzuführen, die sich in Bezug auf die Eignung der Zielzellen, das zu transfizierende Material sowie den zeitlichen und finanziellen Aufwand unterscheiden (Vgl. zum Folgenden: Karra und Dahm, 2010, Teifel, 2012):

Die zuerst entwickelten Methoden zum Einbringen von zellfremdem genetischem Material basierten auf chemischen Mechanismen, die zusammenfassend auf dem Prinzip beruhen, dass es zur Phagozytose von zuvor gebildeten Kopräzipitaten oder Komplexen aus DNA oder RNA und verschiedenen Chemikalien durch die zu transfizierenden Zellen kommt. Nach Adsorption und Phagozytose durch die Zielzelle kommt es zur Verschmelzung der Endosomen, die das genetische Material enthalten, mit Lysosomen und im Anschluss zur Freisetzung des Inhaltes ins Cytoplasma. Ebenfalls auf Adsorption und Endozytose beruhen die Methoden des rezeptorvermittelten Gentransfers, bei dem Komplexe aus Plasmid-DNA und Liganden für bestimmte Rezeptoren, wie den Asialoglykoproteinrezeptor oder den Ferritin-Rezeptor rezeptorvermittelt endozytiert werden, sowie der Lipofektion, bei der Komplexe aus Liposomen und DNA mit der Zellmembran verschmelzen und ins Cytoplasma gelangen. Eine weitere Möglichkeit bietet die virale Transfektion, bei der das GOI in ein virales Genom eingebracht wird und es nach Infektion der Zielzelle im Rahmen der Virusreplikation auch zur Synthese des GOI kommt. Allen genannten Methoden ist gemein, dass die genauen Mechanismen, die zum Transfer des eingebrachten genetischen Materials in den Zellkern der Zielzelle führen, bislang nicht vollständig bekannt sind. Bei der Transfektion von proliferierendem Gewebe ist anzunehmen, dass es im Rahmen der Zellteilung, beim Öffnen der Kernhülle, zu einem Eindringen von DNA aus dem Cytoplasma in den sich neu organisierenden Zellkern kommt. Obwohl die Transfektion von mitotisch aktivem Gewebe mithilfe spezieller Viren grundsätzlich möglich ist und in der Regel zufriedenstellende Transfektionseffizienzen bietet, spricht die durchschnittliche Zeitdauer von ca. 2 Wochen von der Transfektion bis zur zuverlässigen Expression des GOI gegen eine Verwendung in embryonalem Gewebe, wie in der vorliegenden Arbeit beabsichtigt. (Karra und Dahm, 2010, Teifel, 2012)

Eine Alternative bietet die Methode der Elektroporation, bei der es durch kurzzeitige, gepulste Erzeugung eines elektrischen Feldes über den zu transfizierenden Zellen zu

vorübergehenden strukturellen Veränderungen in der Zellmembran kommt, die durch teilweise bisher nicht vollständig erforschte Mechanismen zu einer Permeabilisierung der Membran führen, wodurch Fremdmaterial in die Zelle aufgenommen werden kann (Li, 2004, Washbourne und McAllister, 2002).

2.6 *In utero*- Elektroporation

Eine besondere Abwandlung hiervon stellt die Methode der *in utero*-Elektroporation dar (Vgl. zum Folgenden: Wang und Mei, 2013). Bei dieser erfolgt die Transfektion von embryonalem Gewebe durch Elektroporation *in vivo*. Im Rahmen eines Eingriffs an einem narkotisierten trächtigen Tier wird den im Uterus befindlichen Embryonen von Mäusen eine gefärbte Lösung mit Plasmid-DNA verabreicht. Im Anschluss wird diese durch Elektroporation in die Zellen des Zielgewebes eingebracht. Hierbei kann auf die Richtung der Transfektion Einfluss genommen werden, in dem die Positiv-Elektrode (Anode) der Elektroporationspinzette in Richtung des zu transfizierenden Gewebes positioniert wird, wodurch sich die DNA mit ihrer negativen Nettoladung in Richtung dieser bewegt. Im Anschluss kann die weitere Entwicklung der Embryonen abgewartet und die Auswirkungen der herbeigeführten Veränderungen im Verlauf zu einem beliebigen Zeitpunkt studiert werden (Wang und Mei, 2013). Wird die DNA-Lösung in das Ventrikelsystem des Gehirns eingebracht, ist eine effiziente Transfektion spezifischer Cortexareale möglich und bereits umfangreich beschrieben worden (Baumgart und Baumgart, 2016). Die Methode wurde in der Vergangenheit für die Mauslinie C57BL/6J optimiert (Baumgart und Grebe, 2015), die daher für diese Arbeit als Modell diente.

2.6.1 pCAGIG – Ein eukaryotischer Expressionsvektor mit IRES und GFP

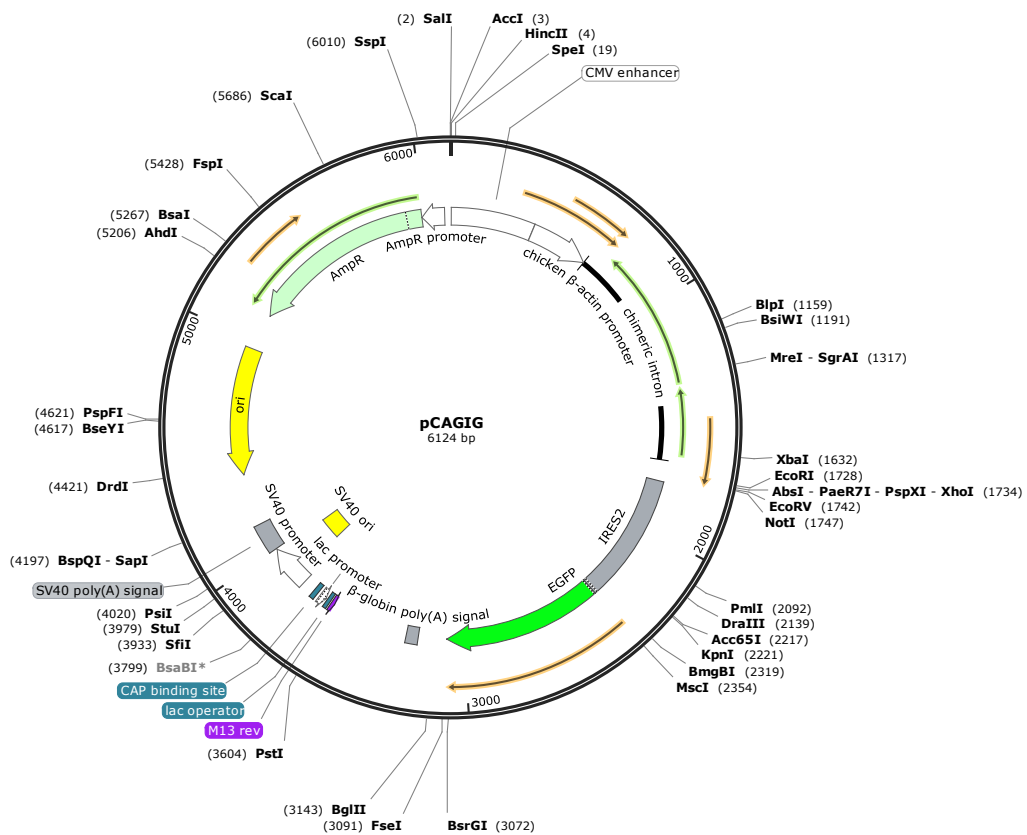


Abbildung 2.6-1: Sequenzkarte von pCAGIG. Die außen liegenden Pfeile markieren die offenen Leseraster. Zur Subklonierung des HA-FAAH-Sequenz wurde die NotI-Schnittstelle bei Position 1747 verwendet. Grafik erstellt mit SnapGene Viewer 5.1.3 auf macOS 10.15.7

Als Grundlage für den zu konstruierenden Vektor wurde das Plasmid pCAGIG verwendet (Matsuda und Cepko, 2004). Es handelt sich um den bereits 1991 beschriebenen Vektor pCAGGS (Niwa et al., 1991), der um eine *internal ribosomal entry site* (IRES) erweitert wurde. Eine IRES ist eine spezielle Sequenz, aus der im Rahmen der Transkription ein spezifisch gefalteter Abschnitt im RNA-Einzelstrang entsteht, der eine Bindung der RNA an Ribosomen vermittelt und eine Initiation der Translation unabhängig von der ansonsten erforderlichen 5'-Cap-Struktur bewirken kann, beispielsweise auch aus der Mitte eines RNA-Einzelstranges heraus (Thompson, 2012). Im Falle des pCAGIG-Vektors dient die IRES am ehesten zur Aufrechterhaltung der Translation auch bei sehr großen Konstrukten im offenen Leseraster. Wie sein Vorlagevektor verfügt auch pCAGIG über den CAG-Promotor, der sich aus dem Humanen Cytomegalievirus (HCMV) *early* Enhancerelement (C), dem aus dem ersten nicht translatierten Exon und dem 5'-Teil des ersten Introns des beta-Aktin Gens des Huhns bestehenden Promotor (A), sowie dem 3'-Teil des zweiten Introns und dem 5'-Teil des dritten Exons des beta-Globin-Gens vom Kaninchen (G)

zusammensetzt und eine starke Expression in Eukaryoten ermöglicht (Miyazaki et al., 1989). In einer transgenen Mauslinie fand sich das unter dem CAG-Promotor exprimierte Reporter-gen *green fluorescent protein* (grün fluoreszierendes Protein, GFP) in sämtlichen Geweben mit Ausnahme der Erythrozyten und der Haare (Okabe et al., 1997). GFP wurde auch in der vorliegenden Arbeit als Reporter-gen eingesetzt. Es handelt sich um ein 1962 erstmals beschriebenes Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*, das bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert (Shimomura et al., 1962). Da GFP Bestandteil des pCAGIG-Vektors ist, dient es dem indirekten Nachweis der Expression des *gene of interest* in transfizierten Zellen, indem fluoreszenzmikroskopisch oder immunhistochemisch der Nachweis von GFP erbracht und somit die Koexpression des GOI angenommen wird. Das für diese Arbeit relevante GOI FAAH war bereits zuvor aus muriner cDNA isoliert und mithilfe eines AAV zur Expression gebracht worden (Zimmermann et al., 2019).

2.7 Das Cre-loxP-System

Das Cre-loxP-System ist ein Rekombinations-System, das gezielte Veränderungen an DNA ermöglicht, ursprünglich aus dem Bakteriophagen *P1* stammt und 1981 erstmals beschrieben wurde (Sternberg und Hamilton, 1981). Es besteht aus dem Protein Cre-Rekombinase, das mit spezifischen DNA-Sequenzen („*locus of x-over, P1*“, loxP) interagiert (Vgl. zum Folgenden: Kim et al., 2018):

In Zellen, in denen die Cre-Rekombinase aktiv ist, erkennt diese zwei gleich orientierte loxP-Sequenzen auf DNA, und entfernt die dazwischenliegende Sequenz mitsamt einer der loxP-Sequenzen. Dies ermöglicht ein Entfernen spezifischer DNA-Abschnitte in Zellen mit aktiver Cre-Rekombinase, indem vor und nach diesen Abschnitten mithilfe molekularbiologischer Methoden eine loxP-Sequenz eingefügt wird. Trifft die Cre-Rekombinase auf zwei loxP-Sequenzen, von denen eine umgekehrt zur anderen orientiert ist, so entfernt sie den dazwischenliegenden Abschnitt, um ihn anschließend in umgekehrter Orientierung wieder einzusetzen. Dies stellt eine Möglichkeit dar, ein Gen Cre-Rekombinase-abhängig zu aktivieren, indem es zunächst umgekehrt orientiert und damit inaktiv vorliegt wird und erst durch Aktivität der Cre-Rekombinase durch das Umkehren der Orientierung in ein funktionierendes Gen umgewandelt wird. Eine zweite Möglichkeit einer Cre-Rekombinase-abhängigen Aktivierung ist das Einfügen einer von loxP-Sequenzen (in gleicher Orientierung) flankierten Stop-Sequenz, die zum Abbruch der Translation führt, aber in Anwesenheit der Cre-

Rekombinase entfernt wird und so die Translation der dahinterliegenden Sequenz ermöglicht (Kim et al., 2018). Anwendung findet dieses System zum Beispiel bei viralen Transfektionen in Kombination mit Mauslinien, die zelltypspezifisch Cre-Rekombinase exprimieren, wie zum Beispiel in Koexpression mit dem für glutamaterge Projektionsneuronen spezifischen NEX-Protein (NEX-Cre Mäuse) (Zimmermann et al., 2019).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Typ	Modell	Hersteller
Analysenwaage	XS 305	Mettler Toledo
Analysenwaage	XP205	Mettler Toledo
Autoklav	3870ELV	Tuttnauer, Ronkonkoma (USA)
Autoklav	3150ELV	Tuttnauer, Ronkonkoma (USA)
Binokular	SZ6I	Olympus
Binokular		Zeiss
Blockthermostat	BT100	Kleinfeld
Brutschrank	Heracell150i	Thermo Fishe Scientific
Brutschrank	BF115	Binder, Tuttlingen (Deutschland)
Brutschrank	20530	Binder, Tuttlingen (Deutschland)
Brutschrank	B6060	Heraeus
Brutschrank	B53	Binder
Elektroden für Elektroporator	CUY 650 P 0,5-10 mm	Nepagene (Ichikawa, Japan)
Elektrophoresekammer für Gelelektrophorese	Compact M	Biometra
Elektrophoresekammer für Western Blot		
Elektroporator	CUY21 SC Square Wave Electroporator	Nepagene (Ichikawa, Japan)
Fluoreszenzmikroskop	DMRA	Leica
Gefrierschrank (-80 °C)		Heraeus Instruments GMBH, Hanau (Deutschland)
Geldokumentationsstation	UVsoloTS	Biometra
Thermopapierdrucker	P95	Mitsubishi Electric
Gussform für Agarosegele		
Gusskammer für SDS-PAGE		
Heizplatte		H. Saur Laborbedarf, Reutlingen (Deutschland)
Heizrührplatte	Advanced VMS C7	VWR
Heizblock	Mixing Block MB-102	Bioer
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf
Kamera	CCD Kamera	Mono
Kapillarzyeher	P-97	Sutter Instruments Co. (Novato, Kalifornien, USA)
Kühlschränke (4 °C)		Liebherr (Deutschland)
Kühlschränke (-20 °C)		Liebherr (Deutschland)

Kühl-Gefrier-Kombination		Bosch BHG (Deutschland)
Kyrostat	HM560	Microm
Kryostat	CM3050 S	Leica Microsystems GmbH, Nussloch (Deutschland)
Lichtquelle	DMSTC	Leica Microsystems GmbH, Nussloch (Deutschland)
Lichtquelle	EBQ100	Leica Microsystems GmbH, Nussloch (Deutschland)
Lichtquelle	CLI500	-
Lichtquelle für Elektroporation	KL2500 LCD	Leica
Magnetrührer	-	IKA
Megafuge	16R	Thermo Fisher Scientific
Megafuge	-	Heraeus
Mikroskop	ID03	Zeiss
Mikroskop	Stemi 2000C	Zeiss
Mikroskop	SZ61	Olympus
Mikroskop mit Kamera	EC3	Leica
Mikroskopkamera	Moticam 2500	Motic Deutschland GMBH, Wetzlar (Deutschland)
Minifuge	-	-
Minizentrifuge	-	Roth
Mixing Block	MB-102	Bioer
Nadelhalter (für IUE)	Castroviejo, mit Sperr, Wolframcarbid, 14 cm	Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
PH Meter	WTW series pH 720	inoLab
Photometer	6131	Eppendorf
Pinzette (für IUE)	Dumont No. 5, gerade	Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
Pinzette (für IUE)	Anatomisch, gerade, mittel, gerieft, 13 cm	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Pipetten		Pipetman
Pipetten		Gilson
Pipetten	ErgoOne	STARLAB
Pipetten		Eppendorf
Ringpinzette (für IUE)	1 mm ID / 1,5 mm AD	Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
Ringpinzette (für IUE)	2,2 mm ID / 3 mm AD	Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
Rührheizplatte		IKA
Rührheizplatte	VMS C7	VWR
Schere (für IUE)	Mayo-Stille, gerade	Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
Schüttelinkubator	-	HAT Infors
Schüttelinkubator	-	GFL
Schütteltisch	-	Eigenbau
Schütteltisch	-	Gerhardt
Schwanenhalslampe	KL200	Schott
Schwanenhalslampe	KL1500	Schott

Spektrophotometer	NanoDrop 2000c	Thermo Scientific GmbH, Schwerte (Deutschland)
Stand-Zentrifuge	RC5B Plus	Sorval
Sterilwerkbank	KSP12	Heraeus
Sterilwerkbank	KSP12	Heraeus
Sterilwerkbank	Heraguard	Heraeus
Thermocycler	T3000	Biometra
Thermocycler	Primus 96	Peqlab
Thermomixer	Vortemp S6	Axon
Thermomixer	MB102	BIOER
Thermomixer	MB 102	Biozym
Thermomixer	-	Eppendorf
Thermomixer	-	Bioer
Thermomixer	-	Eppendorf
Thermomixer	-	Bioer
Thermomixer	-	Eppendorf
Tief-Kühlschränke	-	Bosch
Tief-Kühlschränke	-	Liebherr
Tiefkühlschrank -80°C	Herafreeze Top	Thermoscientific
Tiefkühlschrank -80°C	900ULT Plus	FormaScientific
Tiefkühltruhe	Frostomat	Senator
Tiefkühltruhe -80°C	Sepatech	Heraeus
Tiefkühltruhe -80°C	Sepatech	Heraeus
Tischwaage	PJ300	Mettler
Tischwaage	2000C	PJ Procisa
Überkopfschüttler	Reax 2	Heidolph
Vortex	Vortexer VF2	Janke & Kunkel GmbH, Staufen (Deutschland)
Waage	MC1, Laboratory LC 6200 S	Sartorius, Göttingen (Deutschland)
Wasserbad	JB Aqua 12 Plus	Grant, Cambridge (UK)
Wasserbad	Tissue Floating Bath TFB45	Medite GmbH, Burgdorf (Deutschland)
Wasserbad	JB Aqua 18 Plus	Grant
Wippe		
Wippschüttler	Rocking Platform 444-0142	VWR
Zentrifuge	S702R	Eppendorf (Deutschland)
Zentrifuge	5417R	Eppendorf (Deutschland)
Zentrifuge	Biofuge	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge	5430R	Eppendorf (Deutschland)
Zentrifuge	5417C	Eppendorf (Deutschland)
Zentrifuge	5417R	Eppendorf (Deutschland)
Zentrifuge	Biofuge A	Heraeus Sepatech
Zentrifuge	5415C	Eppendorf (Deutschland)
Zentrifuge	Rotilabo	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Zentrifuge	RC-5B Plus	Sorvall (Kendro/Thermo Electron, Langenselbold (Deutschland))

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Bakterienkulturschalen	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen (Deutschland)
Deckgläser	
Frischhaltefolie	
Glaskapillaren für Elektroporation	GC120T-15, 1. 2 mm O.D. x 0. 94 mm I.D., Harvard Apparatus (Holliston, Massachusetts, USA)
Glaskugeln zur Ausplattierung	
Nahtmaterial für Hautnaht (IUE)	Suture Thread Supramid, Art. Nr. TO07171L, Serag Wiessner, Naila, Deutschland
Nahtmaterial für Peritonealnaht (IUE)	Suture Thread Coated Vicryl, Art. Nr. V4914, Ethicon (Bridgewater, New Jersey, USA)
Objektträger (Superfrost Plus)	Thermo Scientific, Art. Nr. 10149870, Fisher Scientific GmbH, Schwerte (Deutschland)
Parafilm „M“ Laboratory Film	Amcor (ehem. Bemis Company), USA
PCR-Reaktionsgefäße	
Pipettenspitzen	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen (Deutschland)
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen (Deutschland)
Reaktionsgefäße 2 ml	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen (Deutschland)
Reaktionsgefäße 15 ml	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen (Deutschland)
Reaktionsgefäße 30 ml für Maxipräparation	
Reaktionsgefäße 50 ml	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen (Deutschland)
Skalpelle	
Trockeneis	Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz (Deutschland)

3.1.3 Chemikalien, Medien und Reagenzien

Substanz	Bezugsquelle
Aceton	Best.-Nr. 5025.1, Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis Lösung 40 (40% Acrylamid/Bisacrylamidlösung)	Best.-Nr. A121.1, Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Agarose	Best. Nr. 3810.3, Roth, Karlsruhe (Deutschland)
APS (Ammoniumpersulfat)	Best. Nr. 9592.1, Roth, Karlsruhe (Deutschland)

Ampicillin	Best. Nr. K029.1, Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Butanol (H ₂ O-gesättigt)	Best. Nr. T178.1, Roth Karlsruhe (Deutschland)
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Hoechst 33342)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH (Deutschland)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Best.-Nr. K028.3, Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Best. Nr. 7029.1, Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Best. Nr. D6429, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt (Deutschland)
Essigsäureanhydrid	
Ethanol 70%	Best. Nr. T868.2, Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Ethanol 99%	Best. Nr. 9065.4, Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Ethidiumbromid	Best. Nr. 111608, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt (Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Best. Nr. K714.1, Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Fast Green FCF	Best. Nr. 0301.1, Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Fötales Rinderserum (fetal calf serum, fetal bovine serum, FCS, FBS)	Best. Nr. F0804, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt (Deutschland)
Hefeextrakt	
HEPES	Best. Nr. 391340, Millipore, Merck, Darmstadt (Deutschland)
Isofluran	Best. Nr. 792632, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt (Deutschland)
Kanamycin	Best. Nr. 60615, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt (Deutschland)
Magermilchpulver (fettarm)	Refomhaus Mainz (Deutschland)
Maleinsäure	Best. Nr. M0375, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt (Deutschland)
Methanol	Best. Nr. KK39.2, Roth, Karlsruhe (Deutschland)
MgCl ₂	Best. Nr. KK36.3, Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Mowiol 4-88	Best. Nr. 475904, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt (Deutschland)
Natriumchlorid	Best. Nr. 746398, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt (Deutschland)
Natriumhydroxid	Best. Nr. S8045, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt (Deutschland)
Paraformaldehyd	Histofix, Best. Nr. P087.1, Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Penicillin-Streptomycin	Best. Nr. P0781, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt (Deutschland)
Ponceau S	Best.-Nr. 5938.2, Roth, Karlsruhe (Deutschland)

Proteasehemmer-Cocktail cOplete	Best. Nr. 11697498001, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt (Deutschland)
Rimadly (Carprofen)	Zoetis (Österreich)
RNasin	
Salzsäure	
TEMED	Best.-Nr. 2367.1, Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Trishydroxymethylaminoethan (TRIS)	Best.-Nr. 4855.1, Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Triton X 100	Best.-Nr. 3051.2, Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Trypsin 0,25 %	Best. Nr. SM-2001, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt (Deutschland)
Tween 20	Best. Nr. P2287, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt (Deutschland)
Wasserstoffperoxid	Best. Nr. 216763, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt (Deutschland)
Ziegen Serum (goat serum)	Best. Nr. G9023, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt (Deutschland)

3.1.4 Puffer und Lösungen

Substanz	Bezugsquelle / Zusammensetzung
CutSmart Buffer (10X)	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
GoFlexi Buffer, farblos	Promega, Madison, USA
Ladepuffer für SDS-PAGE	100 mM Tris-HCl (pH 7,0), 24 % Glycerin (w/v), 1,4 M β -Mercaptoethanol, 20 mM Bromphenolblau
Lower Buffer (Puffer zur Herstellung des Trenngels für die SDS-PAGE)	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4 % SDS (w/v) in ddH ₂ O
Mowiol Lösung (zum Eindecken histologischer Präparate)	6 g Glycerol; 2,4 g Mowiol 4-88 (475906, Merck); 12 ml Tris 0,2 M; pH 8,5; 6,5 ml H ₂ O (steril)
PBS (<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung)	136 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
PBS-Triton	136 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4; 0,3 % Triton
Quick Start Bradford 1x Dye Reagent	Cat. #500-0205, Bio-Rad, Hercules, USA
SDS 2 % (<i>sodium dodecyl sulfate</i> , 2 % Natriumdodecylsulfatlösung)	2 % SDS (w/v) in sterilem H ₂ O
SDS-Elektrophorese-Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS (v/v), 0,5 mM EDTA
TBE (Tris-Borat-EDTA) Puffer	0,13 mM Tris (pH 6,8), 45 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA
TBS Puffer	20 mM Tris (pH 7,6), 150 mM NaCl
TBS-Tween Puffer	20 mM Tris (pH 7,6), 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20 (w/v)
TE (Tris-EDTA) Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM EDTA-Na
Transferpuffer für Western Blot	25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 % Methanol (v/v), 0,1 % SDS (w/v)
Upper Buffer (Puffer zur Herstellung des Sammelgels für die SDS-PAGE)	0,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,4 % SDS (w/v) in ddH ₂ O

3.1.5 Kits

Kit	Bezugsquelle
Invitrogen TA Cloning Kit, Dual Promoter, with pCRII Vector, without competent cells (Katalognummer: K207020)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Deutschland)
Invitrogen PureLink HiPure Plasmid Miniprep Kit (Katalognummer: K210003)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Deutschland)
Invitrogen PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Katalognummer: K210007)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Deutschland)
Invitrogen PureLink PCR Purification Kit (Katalognummer: K310002)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Deutschland)
Invitrogen Quick Gel Extraction Kit (Katalognummer: K210012)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Deutschland)
Invitrogen Lipofectamine Transfection 2000 Reagent (Katalognummer: 11668019)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Deutschland)
WESTAR ETA C 2.0 ECL substrate	Cyanagen Pharmaceutical (USA)
WESTAR ETA C Ultra 2.0 ECL substrate	Cyanagen Pharmaceutical (USA)

3.1.6 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Anza T4 Ligase	Thermo Fisher Scientific Incorporated
CIP (calf intestinal phosphatase)	New England Biolabs
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Thermo Fisher Scientific (Anza)
Taq DNA Polymerase	Promega

3.1.7 Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')
NotI_HA-FAAH_S1 (HA-FAAH sense-Primer mit angehängter NotI-Schnittstelle #1)	GCGGCCGCAAGCTTACTAGTGTTCCATGTATCCGTA
NotI_HA-FAAH_S2 (HA-FAAH sense-Primer mit angehängter NotI-Schnittstelle #2)	GCGGCCGCAAGCTTACTAGTGTTCCATGTATCCGTAT
NotI_HA-FAAH_AS1 (HA-FAAH antisense-Primer mit angehängter NotI-Schnittstelle #1)	GCGGCCGCAAGCTTGATAACACTAGTTCAAGATGGC
NotI_HA-FAAH_AS2 (HA-FAAH antisense-Primer mit angehängter NotI-Schnittstelle #2)	GCGGCCGCAAGCTTGATAACACTAGTTC
#419_1k-2k_for (Forward Primer für die Sequenzierung des Bereiches 1kb bis 2kb des Plasmids #419)	TTACTCCCACAGGTGAGCG

#419_1k-2k_rev (Reverse Primer für die Sequenzierung des Bereiches 1kb bis 2kb des Plasmids #419)	AGTCAGTCAGATAGGAGGTCACAC
pCAGIG-HF_for (Forward Primer #1 für die Sequenzierung des Plasmids pCAGIG-HA-FAAH und pCAGIG-floxstop-HA-FAAH)	GGACGGCTGCCTTCGG
pCAGIG-HF_for2 (Forward Primer #2 für die Sequenzierung des Plasmids pCAGIG-HA-FAAH und pCAGIG-floxstop-HA-FAAH)	TGCCTAGCCTGCAGCTTG
pCAGIG-HF_for3 (Forward Primer #3 für die Sequenzierung des Plasmids pCAGIG-HA-FAAH und pCAGIG-floxstop-HA-FAAH)	CAAGAGTCCAGGAGGTTCCCTC
pCAGIG-HF_for4 (Forward Primer #4 für die Sequenzierung des Plasmids pCAGIG-HA-FAAH und pCAGIG-floxstop-HA-FAAH)	ACTGCTGAGCTTCCTGCTG
pCAGIG-HF_rev (Reverse Primer für die Sequenzierung des Plasmids pCAGIG-HA-FAAH und pCAGIG-floxstop-HA-FAAH)	AAGACAGGGCCAGGTTTCCG

3.1.8 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pCAGIG	#M680; Eukaryotischer Transfektionsvektor mit CAG Promotor, IRES und GFP) Connie Cepko (Addgene Plasmid #11159 ; http://n2t.net/addgene:11159 ; RRID:Addgene_11159	Connie Cepko (Matsuda und Cepko, 2004)
pAM-floxstop-HA-FAAH-WPRE-bGHpA	#419; Eukaryotischer Transfektionsvektor zur Expression von FAAH mit HA-Tag in Kombination mit einem AAV	Stephan Guggenhuber ⁴
pCRII-TOPO	Vektor mit kovalent gebundener („aktivierter“) Topoisomerase I zur Vervielfältigung von PCR-Produkten im Rahmen von TA-Cloning; Teil des TOPO TA Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific Incorporated (USA)
pBSK-floxed stop (pBSK-zero-trans)	#270; pBluescript SK(-) mit floxed stop (zero-trans), als Donator für die floxstop-Kassette	Im Haus hergestellt (pBSK (-): Stratagene
HA-FAAH in TOPOII	#681; HA-FAAH aus Plasmid #419 in pCRII-TOPO	selbst hergestellt
pCAGIG-HA-FAAH	M#682; pCAGIG mit HA-FAAH-Sequenz aus Plasmid #419 zur Expression von FAAH mit HA-Tag durch Transfektion ohne AAV	selbst hergestellt
pCAGIG-floxstop-HA-FAAH	M#683; pCAGIG mit HA-FAAH-Sequenz aus Plasmid #419 zur Expression von FAAH mit HA-Tag durch Transfektion ohne AAV, mit floxed stop aus pBSK-floxed stop zur spezifischen Genexpression mittels Cre/LoxP-System	selbst hergestellt
pAM-Syn-HA-NLS-Cre-2A-mCherry-WPRE2-SpA	#405; Cre-exprimierendes Plasmid mit HA und mCherry als Markerprotein zur Koexpression von Cre für den Test von pCAGIG-floxstop-HA-FAAH	Stephan Guggenhuber

3.1.9 Antikörper

Primärantikörper	Bezugsquelle	Konzentration
Rabbit anti-GFP	Serum im Haus hergestellt ⁵	1:500
Rabbit anti-mouse CB1 IgG	Code # CB1-Rb-Af380, Frontier Institute Co Ltd., Hokkaido, Japan	1:500
Rabbit anti-FAAH	Ken Mackie ⁶	1:500
Rabbit anti-GAPDH	Best. Nr. ABS16, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt (Deutschland)	1:500

Sekundärantikörper (Immunhistochemie)	Bezugsquelle	Konzentration
Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit	Thermo Fisher Scientific (USA) Inc.	1:1000

⁴ (Zimmermann et al., 2019)

⁵ (von Jonquieres et al., 2013)

⁶ (Malone et al., 2008)

Alexa Fluor 546 Goat Anti-Rabbit	Thermo Fisher Scientific (USA)	1:1000
----------------------------------	--------------------------------	--------

Sekundärantikörper (Western Blot)	Bezugsquelle	Konzentration
Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP (mit Meerrettichperoxidase konjugierter Sekundärantikörper)	Cat. #111-035-144, Dianova, Hamburg, Deutschland	1:5000

3.1.10 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Bezugsquelle
Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells Cat. No. 18265-017	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Invitrogen OneShot Stbl3 Competent Cells	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)

3.1.11 Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle
N2a (Neuro-2a)	Thermo Fisher Scientific, Inc. (USA)

3.1.12 Versuchstiere

Versuchstierlinie	Bezugsquelle
C57BL/6J (C57BL/6JRj) Mäuse, terminiert verpaart, trächtig (Embryonalstadium E12-E14)	Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle (Frankreich)

3.1.13 Software und Internetressourcen

Software	Hersteller
Vector NTI	Thermo Fisher Scientific
Snapgene Viewer	GLS Biotech LLC (Chicago, USA)
BLAST Database	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Microsoft Office	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Fiji	https://fiji.sc
Leica Application Suite X	Leica Microsystems, Wetzlar (Deutschland)

3.1.14 Größenstandards

Größenstandard	Bezugsquelle
PageRuler Prestained Protein Ladder (Cat. #26617)	Thermo Fisher Scientific
Thermo Scientific MassRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use (Cat. #SM0403)	Thermo Fisher Scientific
Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use (Cat. #SM0314)	Thermo Fisher Scientific

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Escherichia coli – Bakterienkultur

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA sowie für sämtliche Klonierungsschritte wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α eingesetzt.

Für die Gewinnung kleinerer Mengen Plasmid-DNA (im Bereich von bis zu 30 μg ⁷), zum Beispiel zur Prüfung auf ein erfolgreiches Klonierungsergebnis, wurde eine Übernachtskultur mit Nährmedium angesetzt. Hierzu wurden 5 ml *lysogeny broth* (LB) Medium mit 5 μl Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml Ampicillin in sterilem Wasser) in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen, entsprechend einer Endkonzentration von 100 μg Ampicillin pro ml LB vorgelegt und eine sterile Pipettenspitze mit der zu untersuchenden Bakterienkolonie in das Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Kultur wurde über Nacht bei 200 rpm und 37 °C auf dem Flachbettschüttler inkubiert.

Zum Anlegen einer Übernachtskultur zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA, zum Beispiel für die *in utero*-Elektroporation (IUE), wurde zunächst eine Starterkultur angelegt und hierfür pro Ansatz 5 ml LB Medium mit 5 μl Ampicillin-Stammlösung (s. o.) versetzt und in 15 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Anschließend erfolgte die Beimpfung der Ansätze durch Zugabe jeweils einer sterilen Pipettenspitze, mit der zuvor eine Probe der entsprechenden Bakterienkolonie aufgenommen worden war. Im Anschluss erfolgte die Inkubation für 5 h bei 200 rpm und 37 °C auf dem Flachbettschüttler, wonach die Starterkulturen in jeweils einen mit 200 ml LB Medium sowie 200 μl der Ampicillin-Stammlösung (Endkonzentration ebenfalls 100 μg Ampicillin pro ml LB) vorbereiteten Erlenmeyerkolben überführt und über Nacht bei 200 rpm und 37 °C auf dem Flachbettschüttler inkubiert wurden.

3.2.1.2 Einfrieren von Bakterienkulturen (Glycerol-Stocks)

Von Bakterienkulturen wurde vor der Präparation der Plasmid-DNA jeweils ein Glycerol-Stock angelegt, indem in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß (Eppi) 200 μl Glycerin 99% auf Eis vorgelegt und 800 μl der Übernachtskultur hinzugegeben wurde.

⁷ <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K210003?SID=srch-srp-K210003>

Im Anschluss wurde der Inhalt durch vorsichtiges Schwenken homogenisiert, das Eppi wieder auf Eis gegeben und sofort bei -80 °C eingefroren.

3.2.1.3 Anzucht von Bakterienkulturen auf Nährböden

Zur Selektion einzelner Bakterienkolonien kamen feste Nährmedien auf Basis von LB-Agar zum Einsatz. Hierzu wurde ein Gefäß mit 200 ml festem LB-Agar bei 450 W für 10 min bis zur homogenen Verflüssigung in der Mikrowelle erhitzt, dann unter laufendem Wasserstrahl vorsichtig abgekühlt und auf 4 Petrischalen gleichmäßig aufgeteilt. Sobald das Nährmedium noch flüssig, aber bereits auf Handwärme abgekühlt war, wurden, je nach Anwendungszweck, Chemikalien zur Differenzierung der anzuzüchtenden Bakterien in das Nährmedium eingebracht.

Zur selektiven Anzucht von Bakterien, die durch ein Ampicillin-tragendes Plasmid transformiert worden waren, wurde das Nährmedium mit 50 µl Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml Ampicillin sterilem Wasser) pro Petrischale, entsprechend einer Endkonzentration von 100 µg/ml Ampicillin, versetzt und durch Schwenken homogenisiert.

Um im Rahmen von TOPO TA-Subklonierung Bakterienkolonien zu isolieren, welche durch einen pCR2-TOPO-Vektor mit einligiertem PCR-Produkt transformiert wurden, kamen Nährmedien zum Einsatz, die eine selektive Anzucht von Bakterien mit Kanamycin-Resistenz sowie eine visuelle Trennung von Kolonien mittels Blau-Weiß-Selektion ermöglichten. Hierzu wurden vor der Verfestigung 50 µl Kanamycin-Stammlösung (50 mg/ml Kanamycin in sterilem Wasser) pro Petrischale mit Nährmedium, entsprechend einer Endkonzentration von 50 µg Kanamycin pro ml LB-Agar hinzugegeben. Nach vollständigem Abkühlen wurden pro Petrischale 10 µl IPTG⁸ (100 mg/ml) sowie 80 µl X-Gal⁹ (20 mg/ml) auf die Oberfläche des Nährmediums aufpipettiert.

Im Anschluss wurden die Verfestigung der Nährmedien bei Raumtemperatur abgewartet und die Platten anschließend bei 4 °C bis zu 7 Tage aufbewahrt oder direkt im Anschluss weiterverwendet.

⁸ Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

⁹ 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

3.2.1.4 Transformation

Bakterielle Transformationen erfolgten nach einer Abwandlung des Herstellerprotokolls¹⁰. Zur Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli* wurde zunächst ein Eppi mit 200 µl kompetenten Zellen (DH5alpha) aus dem Gefrierschrank bei -80 °C entnommen und direkt auf Eis gegeben. Nach Verflüssigung des Inhaltes wurde 1 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA, vorliegend in Tris-EDTA (TE) Puffer (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA-Na, pH 8,0), einpipettiert und das Reaktionsgefäß für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 1 min auf dem Heizblock bei 42 °C. Nach Zugabe von 300 µl LB Medium wurde das Reaktionsgemisch anschließend bei 37 °C für 30 min inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Ausplattierung auf bei 37 °C vorgewärmten LB-Agar-Platten in zwei Konzentrationen. Hierzu wurden auf eine LB-Agar-Platte 200 µl und auf eine zweite 100 µl ausplattiert und mit Glaskügelchen durch Schütteln auf den Platten verteilt. Anschließend wurden die LB-Agar-Platten gestürzt und mit dem Nährboden nach obenweisend bei 37 °C über Nacht im Wärmeschrank inkubiert.

3.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

3.2.1.5.1 *Maxipräparation*

Die Präparation größerer Mengen von Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung des Invitrogen PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kits nach einer Abwandlung des Herstellerprotokolls¹¹.

Zunächst wurden 200 ml Bakteriensuspension einer Übernachtskultur für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Dem bei der Zentrifugation entstandenen Bakterienpellet wurden 10 ml Puffer R3 mit RNase A zugegeben, das Pellet durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und die Suspension in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Suspension wurden 10 ml Lysepuffer L7 zugegeben und das Gemisch durch fünfmaliges Invertieren homogenisiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min. Nach Zugabe von 10 ml Puffer N3 und kurzem, kräftigem Schütteln erfolgte eine Zentrifugation mit 4000 rpm für 10 min bei Raumtemperatur. Währenddessen wurde die Anionenaustauschersäule zu $\frac{3}{4}$ mit Puffer Equilibrierungspuffer EQ1 gefüllt und der

¹⁰ https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/subcloningefficiencydh5alpha_man.pdf

¹¹ https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink_hipure_plasmid_dna_purification_man.pdf

Durchlauf verworfen. Nach der Zentrifugation wurde die entstandene klare Flüssigkeit zwischen der oben im Gefäß schwimmenden Lipidplatte und dem unten im Gefäß entstandenen Proteinsediment abpipettiert und auf die vollständig durchgelaufene Anionenaustauschsäule gegeben. Nachdem die Plasmid-DNA-haltige klare Flüssigkeit ebenfalls vollständig durchgelaufen war, wurde die Anionenaustauschsäule zwei Mal vollständig mit Waschpuffer W8 aufgefüllt und gespült. Anschließend wurde der Durchlauf verworfen und ein 30 ml Reaktionsgefäß unter dem Auslauf der Anionenaustauschsäule platziert. Es wurden 12 ml Puffer E4 auf die Anionenaustauschsäule gegeben und das Eluat, das die Plasmid-DNA enthielt, mit dem 30 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Das Eluat wurde mit 10 ml Isopropanol versetzt, für 30 s kräftig geschüttelt und für 20 min mit 12.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Direkt nach dem Ende der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das entstandene DNA-Pellet mit 1 ml Ethanol 70% durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppi überführt. Anschließend wurde die Suspension für 5 min mit 11.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet für 15 min luftgetrocknet. Schließlich erfolgte die Resuspension in 200 µl TE Puffer sowie die Konzentrationsbestimmung mithilfe eines Spektrophotometers.

3.2.1.5.2 *Minipräparation*

Die Präparation kleinerer Mengen von Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung des Invitrogen PureLink HiPure Plasmid Miniprep Kits nach einer Abwandlung des Herstellerprotokolls¹².

2 µl der Übernachtskultur wurden in 2 ml LB Medium in 2 ml Mikroreaktionsgefäße (Eppis) gegeben und bei 11.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das entstandene Bakterienpellet in 250 µl Puffer R3 mit RNase A durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Puffer L7 wurden die Eppis 8 mal invertiert und danach für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 350 µl Puffer N4 hinzugegeben, die Eppis kräftig geschüttelt und für 10 min mit 11.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand jeweils auf eine in einem 1,5 ml Eppi stehenden Anionenaustauschersäule gegeben und die Eppis mitsamt den

¹²https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink_hipure_plasmid_dna_purification_man.pdf

Anionenaustauschersäulen für 10 min mit 11.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchlauf wurde aus den 1,5 ml Eppis entfernt, die Anionenaustauschersäulen wieder zurück in die Eppis gestellt und erneut für 1 min mit 11.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurden die Eppis mit dem Durchlauf entfernt und die Anionenaustauschersäulen in frische 1,5 ml Eppis gestellt. Es wurden 50 µl TE Puffer mittig auf die Anionenaustauschersäule pipettiert und nach 5 min Inkubationszeit die DNA durch Zentrifugieren für 2 min mit 13.000 rpm bei Raumtemperatur eluiert. Zum Schluss wurden die Anionenaustauschersäulen verworfen und es erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der gewonnenen Plasmid-DNA mithilfe eines Spektrophotometers. Die gewonnene DNA wurde bei 4 °C zur zeitnahen Weiterverarbeitung aufbewahrt, beziehungsweise bei -20 °C in Aliquoten zur längerfristigen Lagerung eingefroren.

3.2.1.6 Restriktionsverdau von DNA

Zur Identifizierung von Plasmiden sowie im Rahmen der Klonierungen wurde Plasmid-DNA mithilfe spezifischer Restriktionsendonukleasen an in der DNA vorhandenen Restriktionssequenzen geschnitten. Die entstehenden DNA-Fragmente wurden anschließend entweder zur Identifizierung des Ausgangsmoleküls mittels Gelelektrophorese oder zur Weiterverwendung bei darauffolgenden Klonierungsschritten verwendet.

Hierzu wurden die Komponenten der Restriktionsreaktion dem jeweiligen Herstellerprotokoll^{13,14} entsprechend kombiniert. Es wurden sowohl Enzyme der Firma New England Biolabs als auch Anza Enzyme der Firma Thermo Fisher Scientific Incorporated verwendet. Nach Vorlegen der erforderlichen Menge DNase- und RNase-freien Wassers wurde aufgereinigte DNA mit dem für das jeweilige Enzym benötigten Puffer sowie der entsprechenden Menge des Restriktionsenzym für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Zur Identifizierung von Plasmid-DNA erfolgte nach Ende der Inkubationszeit durch Zugabe des jeweiligen Ladepuffers der Abbruch der Restriktionsreaktion zur Vermeidung von unspezifischer Restriktionsaktivität (Staraktivität) sowie die

¹³<https://international.neb.com/protocols/2012/12/07/optimizing-restriction-endonuclease-reactions>

¹⁴https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Anza_man.pdf

Einfärbung des Reaktionsansatzes und die Dichteerhöhung der DNA, um eine Analyse mittels Gelelektrophorese zu ermöglichen.

3.2.1.7 Auftrennung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Molekülen nach Größe im elektrischen Feld erfolgte mithilfe der Gelelektrophorese.

Zur Identifizierung von DNA-Molekülen wurden Gele mit 1% Agarose in TBE- Puffer (s. u.) hergestellt; zur Trennung von PCR-Produkten von der Template-DNA mit anschließender Aufreinigung eines Gelstückes zur Gewinnung des Amplicons wurden Gele mit 0,7% Agarose verwendet. Zur Herstellung der Gele wurden 1 g pulverförmige Agarose für ein 1%iges bzw. 0,7 g für ein 0,7%iges Agarosegel zu 100 ml H₂O mit Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE, 0,13 mM Tris, 45 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, pH 6,8) in ein 150 ml Becherglas gegeben und gut verrührt. Anschließend wurde die Mischung für 2 min bei 600 W in der Mikrowelle erhitzt. Nach sorgfältigem Schwenken des Gefäßes zur Auflösung fester Agaroseflocken wurde die Mischung in eine Gussstation gegeben und mit zwei Tropfen Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) versetzt. Anschließend wurde ein Kamm gewünschter Größe in die Gussstation gesteckt (20 µl pro Gelfach zur Analyse bzw. 40 µl für Gelextraktion) und bei Raumtemperatur die vollständige Aushärtung des Gels abgewartet. Nach vollständiger Aushärtung wurde der Kamm entfernt. Das Gel wurde entnommen und entweder direkt weiterverwendet oder in Frischhaltefolie bis zu einer Woche bei 4 °C aufbewahrt.

Zur anschließenden Auftrennung von DNA im elektrischen Feld wurde eine Elektrophoresekammer bis zur vorgesehenen Markierung mit TBE Puffer in H₂O gefüllt und das Agarosegel in die Kammer gelegt. Sobald das Gel vollständig mit Puffer bedeckt und die Geltaschen frei von Luftblasen waren, wurde die mit Ladepuffer versetzte, zu analysierende DNA sowie die passenden Größenstandards in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte dann mit einer Spannung von 110 V. Während der Auftrennung erfolgte die Kontrolle des Fortschritts mithilfe gefärbter Ladepuffer mit Farbindikatorbanden beziehungsweise periodisch unter UV-Licht. Nach ausreichender Diskriminierbarkeit der Banden erfolgte die Dokumentation des Ergebnisses mithilfe einer Geldokumentationsstation.

3.2.1.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation der für das HA-Tag sowie FAAH kodierenden DNA-Sequenz wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mithilfe der unten angegebenen spezifischen Primer sowie der Invitrogen Platinum *Taq* Polymerase. Für die PCR sowie die entsprechende Kontrollreaktion wurden folgende Ansätze verwendet:

	HA- FAAH aus #419¹⁵	Kontrollreaktion	
Autoklaviertes Wasser	35,8 µl	38,8 µl	
Platinum <i>Taq</i> 10X PCR Buffer	5 µl	5 µl	
<i>dNTP Mix</i> 5 µM	2 µl	2 µl	
MgSO ₄ 50 mM	2 µl	2µl	
Platinum <i>Taq</i> DNA Polymerase High Fidelity 5 U/µl	0,2 µl	0,2 µl	
Forward Primer (Notl_HA-FAAH_S1) 10 µM	2 µl	Control Primer Mix	1 µl
Reverse Primer (Notl_HA-FAAH_AS2) 10 µM	2 µl		
DNA-Matrize	1 µl ≙ 20 ng	1 µl ≙ 100 ng	
Gesamt	50 µl	50 µl	

Für die Amplifikation wurde das folgende Zyklusschema verwendet:

	#419	Kontrolle	Zeit	Wiederholung
	Temperatur	Temperatur		
Initiale Denaturierung	94 °C	94 °C	2 min	1X
Denaturierung	94 °C	94 °C	15 s	30X
Primerhybridisierung	57,8 °C	55 °C	30 s	
Elongation	68 °C	68 °C	2 min	
Finale Elongation	68 °C	68 °C	30 min	1X
Kühlen	4 °C	4 °C	∞	1X

3.2.1.9 Extraktion von PCR-Produkten aus Elektrophoresegelen

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelstücken nach elektrophoretischer Auftrennung wurde das PureLink Quick Gel Extraction Kit verwendet. Zunächst wurde unter UV-Licht die gesuchte fluoreszierende Bande mithilfe des DNA-Längenstandards bestimmt. Es wurde ein die Bande knapp umschließendes Stück des Agarosegels

¹⁵ pAM-floxstop-HA-FAAH-WPRE-bGHpA

ausgeschnitten und auf zwei Mikroreaktionsgefäße aufgeteilt. Die Extraktion erfolgte dann nach dem Herstellerprotokoll¹⁶ unter Verwendung der Zentrifugenmethode.

3.2.1.10 A-Additionsreaktion

Zur Addition von für die TOPO Klonierung erforderlichen überhängenden Desoxyadenosinmolekülen an zu klonierende PCR-Produkte wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Komponente	Konzentration	Volumen
Aufgereinigte DNA	150 ng/µl	16,375 µl
dATP	0,2 mM	1 µl
MgCl ₂	25 mM	2,5 µl
GoFlexi Buffer	5 X	5 µl
GoTaq DNA Polymerase	5 u/µl	0,125 µl
Gesamt		25 µl

Der Ansatz wurde für 20 min bei 72 °C inkubiert und anschließend auf Eis gegeben. Vor dem nächsten Schritt erfolgte eine Aufreinigung der DNA.

3.2.1.11 Aufreinigung von DNA

Zur Aufreinigung von DNA vor der Weiterverarbeitung, zum Beispiel nach einer PCR zur Entfernung der Primermoleküle, der Enzyme sowie der Desoxynukleotidtriphosphate, wurde das Invitrogen PureLink PCR Purification Kit¹⁷ mit dem zugehörigen Puffer B2 verwendet. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurden nur 20 µl Puffer B2 verwendet und das Eluat nach dem letzten Schritt wieder auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert.

3.2.1.12 Subklonierung von PCR-Produkten mittels TOPO TA Cloning

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte mit der TA-Klonierungstechnik in den Zwischenvektor pCRII-TOPO mithilfe des Invitrogen TOPO TA Cloning Kit. Hierzu wurden PCR-Produkte zunächst aufgereinigt und die Desoxyadenosin-Additionsreaktion durchgeführt; im Anschluss wurde die DNA erneut aufgereinigt. Danach erfolgte entsprechend dem Herstellerprotokoll¹⁸ die Ligationsreaktion mit folgendem Ansatz:

¹⁶[https://assets.thermofisher.com/TFS-](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink_quick_gel_extraction_kit_man.pdf)

[Assets/LSG/manuals/purelink_quick_gel_extraction_kit_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink_quick_gel_extraction_kit_man.pdf)

¹⁷https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink_pcr_man.pdf

¹⁸ https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/topota_man.pdf

Komponente	Volumen
PCR-Produkt (von 20 µl des Eluats aus dem vorausgegangenen Aufreinigungsschritt entnommen)	4 µl
<i>Salt solution</i> (NaCl 1,2 M; MgCl 0,06 M)	1 µl
pCRII-TOPO Vektor (10 ng/µl)	1 µl
Gesamt	6 µl

Nach dreißigminütiger Inkubationszeit wurde mit 2 µl des Reaktionsansatzes ohne vorherige Aufreinigung eine Transformation von DH5alpha-Bakterien durchgeführt. Nach einstündiger Inkubationszeit des Transformationsansatzes bei 37 °C erfolgte die Ausplattierung auf bei 37 °C vorgewärmte LB-Agar-Platten, die zuvor mit Kanamycin in der Endkonzentration 50 µg/ml LB-Agar, s. o.) sowie X-Gal und IPTG behandelt worden waren, um im Anschluss mittels Blau-Weiß-Selektion Bakterienkolonien identifizieren zu können, welche den Zwischenvektor mit dem gewünschten DNA-Fragment aufgenommen hatten.

3.2.1.13 Subklonierung von DNA in einen Zielvektor

Zur Klonierung von DNA-Sequenzen aus einem Quellvektor in einen Zielvektor wurde zunächst die entsprechende DNA-Sequenz mithilfe eines Restriktionsverdau ausgeschnitten. Bei unterschiedlichen Restriktionsstellen wurde ein Doppelrestriktionsverdau den Herstellervorgaben entsprechend angesetzt.

Zur Exzision der zuvor mittels TA-Subklonierung eingefügten HA-FAAH-Sequenz aus HA-FAAH in TOPOII erfolgte ein Restriktionsverdau nach folgendem Schema:

Komponente	Volumen
H ₂ O	30 µl
Anza 10X Buffer	4 µl
HA-FAAH in TOPOII (Plasmid-DNA)	4 µl (entsprechend 20 µg)
Anza <i>NotI</i>	2 µl (entsprechend 40 U, doppelte Enzymmenge aufgrund der hohen zu verdauenden DNA-Menge)
Gesamt	40 µl

Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Zur Exzision der floxstop-Kassette aus pBSK-floxed stop wurde folgender Ansatz verwendet:

Komponente	Volumen
H ₂ O	30 µl
pBSK-floxed stop (Plasmid-DNA)	10 µl (entsprechend 20 µg)
CutSmart Buffer 10X	5 µl
<i>Hpa</i> I	4 µl (20 U)
<i>EcoRV</i> -HF	1 µl (20 U)
Gesamt	50 µl

Der Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert.

Jeweils im Anschluss an den Restriktionsverdau wurde die exzidierte Sequenz mittels Agarosegelelektrophorese vom Quellvektor getrennt, aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt.

Parallel erfolgte die Linearisierung und Dephosphorylierung des Zielvektors durch Restriktionsverdau und Zugabe von *calf intestinal phosphatase* (CIP), wodurch eine Ligation des linearisierten Vektors mit sich selbst im anschließenden Ligationsschritt verhindert wurde.

Die Linearisierung und Dephosphorylierung von pCAGIG erfolgte mit folgendem Ansatz entsprechend dem Thermo Fisher Scientific Anza *1-Step* Protokoll:

Komponente	Volumen
H ₂ O	6 µl
pCAGIG (Plasmid-DNA)	10 µl (entsprechend 1 µg)
Anza 10X Buffer	2 µl
Anza <i>NotI</i>	1 µl
Anza Alkaline Phosphatase	1 µl
Gesamt	20 µl

Der Ansatz wurde zunächst für 30 min bei 37 °C und danach für 20 min bei 80 °C inkubiert¹⁹. Anschließend erfolgte eine Abkühlung auf Raumtemperatur. Vor der anschließenden Ligrationsreaktion erfolgte keine Aufreinigung.

¹⁹ Die Inkubationszeiten wurden im Vergleich zum Herstellerprotokoll verdoppelt, nachdem ein vorangegangener Versuch mit den angegebenen Inkubationszeiten fehlgeschlagen war.

Zur Linearisierung und Dephosphorylierung von pCAGIG-HA-FAAH wurde folgender Ansatz verwendet:

Komponente	Volumen
H ₂ O	24 µl
pCAGIG-HA-FAAH	20 µl (entsprechend 2 µg)
CutSmart Buffer 10X (NEB)	5 µl
EcoRV-HF (NEB)	1 µl (20 U)
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP; NEB)	1 µl
Gesamt	50 µl

Der Ansatz wurde insgesamt für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die *CIP* wurde nach 1 h hinzugegeben.

Im Anschluss an den Restriktionsverdau sowie die Linearisierung und Dephosphorylierung erfolgte die Ligation des DNA-Fragmentes in den jeweiligen Zielvektor. Die jeweiligen Konzentrationen der Ligationskomponenten wurden im molaren Verhältnis 1 : 3 (Zielvektor : einzufügende DNA-Sequenz) gewählt. Zur Berechnung der erforderlichen DNA-Mengen kam der NEBioCalculator²⁰ (New England Biolabs) zum Einsatz.

Folgende Ligationsreaktion wurde zur Ligation von HA-FAAH in pCAGIG angesetzt:

Komponente	Volumen
H ₂ O	10 µl
pCAGIG	2 µl (entsprechend 100 ng)
HA-FAAH	3 µl (entsprechend 96 ng)
Anza T4 Ligase Master Mix (Thermo Fisher Scientific)	5 µl
Gesamt	20 µl

²⁰ <http://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>

Zur Ligation der floxstop-Kassette aus pBSK-floxed stop in pCAGIG-HA-FAAH wurde folgender Ligationsansatz verwendet:

Komponente	Volumen
H ₂ O	13,2 µl
pCAGIG-HA-FAAH (Zielvektor)	0,8 µl (entsprechend 100 ng)
floxstop-Kassette (DNA-Fragment mit floxstop-Sequenz)	1 µl (entsprechend 12 ng)
Anza T4 Ligase Master Mix (Thermo Fisher Scientific)	5 µl
Gesamt	20 µl

Die Ligationsreaktionen erfolgten mit einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte eine Gelelektrophorese mit einem Teil des Reaktionsansatzes zur Überprüfung einer erfolgreichen Ligation sowie eine Transformation und Ausplattierung zur Selektion von den das gewünschte Genprodukt tragenden Bakterienkolonien.

3.2.2 Arbeiten in Zellkultur

3.2.2.1 Zellkulturbedingungen

Arbeiten in Zellkultur fanden an Zellen der Linie N2a statt, welche einschichtig in 150 cm² Zellkulturflaschen bei 37 °C kultiviert wurden. Als Kulturmedium und zur Resuspension kam *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, D6429, Sigma-Aldrich) zum Einsatz, welchem 5% fetales Kälberserum (fetal calf serum, FCS, F0804, Sigma-Aldrich), 1% Natriumpyruvat sowie 1% Penicillin-Streptomycinlösung (10.000 I. E. Penicillin, 10 mg Streptomycin pro ml in 0,9 % NaCl-Lösung in sterilem Wasser, P0781, Sigma-Aldrich) zugesetzt war. Um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten und ein Absinken der Proliferationsrate der Zellkultur durch zu dicht liegende Zellen zu verhindern, wurde jeweils kurz vor Eintritt der Konfluenz eine Subkultivierung durchgeführt. Hierzu wurde das Nährmedium verworfen und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1 ml Trypsinlösung pro Zellkulturflasche (0,25 % Trypsin in Hank's Balanced Salt Solution, SM-2001, Sigma-Aldrich) für maximal 5 min enzymatisch angedaut, um sie aus dem Monolayer herauszulösen. Die Loslösung der Zellen wurde auflichtmikroskopisch beurteilt. Sobald die Zellen gelöst waren, wurde durch Zugabe von 5 ml DMEM die enzymatische Andauung (Trypsinierung) beendet. Die Zellen wurden dann durch vorsichtiges Schwenken von der Zellkulturflasche gelöst. Das Medium mit den Zellen

wurde abpipettiert und in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen für 5 min bei 20 °C und 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 5 ml DMEM resuspendiert. Je nach gewünschter Dichte wurden die resuspendierten Zellen dann auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt und das jeweilige Volumen mit DMEM auf 7 ml aufgefüllt.

3.2.2.2 Transfektion

Um die Expression von Genprodukten der im Rahmen der molekularbiologischen Arbeiten erzeugten Plasmide zu überprüfen, wurden Transfektionen in Zellkultur durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen zunächst erneut passagiert, wobei nach der Resuspension in DMEM eine Auszählung der Zellen mithilfe einer Zählkammer nach Neubauer erfolgte. Anschließend wurden jeweils 1×10^5 Zellen pro Vertiefung der Zellkulturplatte („Well“, $9,6 \text{ cm}^2$) einer sechsfach-Multiwellplatte einpipettiert und das Volumen jeweils mit DMEM auf 2 ml Medium aufgefüllt. Am darauffolgenden Tag wurde sichergestellt, dass die Zellen zwischen 70 % und 90 % Konfluenz zeigten und es erfolgte die Liposomentransfektion mit Lipofectamine 2000.

Hierzu wurde zunächst ein Lipofectamine-Mix aus dem Nährmedium Opti-MEM und Lipofectamine 2000 angesetzt. Dann wurden DNA-Medium-Mischungen mit Opti-MEM für jedes zu untersuchende Plasmid hergestellt. Nun wurde zu jeder DNA-Medium-Mischung das gleiche Volumen Lipofectamine-Mix hinzugegeben und die Gemische für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde jeweils ein Gemisch in ein Well pipettiert, sodass pro Well $2,5 \mu\text{g}$ DNA und $9 \mu\text{l}$ Lipofectamine 2000 vorlagen. Zur Cotransfektion zweier Plasmide wurde die DNA-Konzentration jeweils halbiert, sodass insgesamt $2,5 \mu\text{g}$ DNA eingesetzt wurden. Am darauffolgenden Tag wurde 1 ml DMEM ohne Penicillin / Streptomycin hinzugegeben und die Zellen auflichtmikroskopisch begutachtet. Einen weiteren Tag später erfolgte die Entnahme und Lyse der Zellen.

Hierzu wurde zunächst das Medium von allen Wells vorsichtig abgesaugt und anschließend alle Wells mit PBS gespült. Es erfolgte die enzymatische Andauung zum Lösen der Zellen mit $200 \mu\text{l}$ Trypsin pro Well. Anschließend wurde die Trypsinierung mit 1,5 ml DMEM pro Well gestoppt und die Zellen nach Auf- und Abpipettierung in Mikroreaktionsgefäße übertragen. Es erfolgte eine Zentrifugation der gelösten Zellen für 5 min mit 800 rpm bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit jeweils $500 \mu\text{l}$ PBS gespült und erneut für 5 min mit 800 rpm bei

Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und die Zellen mit 200 µl RIPA Buffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C für 30 min auf einem rotierenden Gerüst inkubiert. Im Anschluss wurden 10 µl einer 25-fach konzentrierten cOmplete Proteasehemmer-Cocktail-Stammlösung hinzugegeben und für 10 min mit 12.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils mit einer Pipette in ein separates Mikroreaktionsgefäß überführt. Danach wurden sowohl die abpipettierten Überstände als auch die Zellpellets mit flüssigem Stickstoff schockgefrostet und im Anschluss bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.2.3 Probenvorbereitung für SDS-PAGE

Zunächst wurde die Gesamtproteinkonzentration für jede Lysatprobe bestimmt. Hierzu wurde mithilfe eines Bradford Tests die Proteinmenge photometrisch bestimmt. Das Testprinzip basiert hier auf der Eigenschaft des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau G-250 in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe zu bilden, wodurch er in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfonatform stabilisiert wird. Hierbei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm. Gleichzeitig erhöht sich der Extinktionskoeffizient des Protein-Farbstoff-Komplexes im Vergleich zum ungebundenen Farbstoff, sodass die Absorption bei 595 nm als Maß für die Proteinkonzentration einer Lösung herangezogen werden kann²¹.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden für jede Probe 1 ml Bradford-Reagenz (Quick Start Bradford Protein Assay) vorgelegt und 1 µl des Zelllysates hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 min wurde mithilfe eines Photometers die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Kalibrierung erfolgte mit 1 ml Bradford-Reagenz ohne Proteinzugabe.

Nachdem die Proteinkonzentration für jede Probe bestimmt worden war, wurde je ein 20 µg Protein entsprechendes Volumen des Zelllysates mit Ladepuffer²² versetzt und für 5 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 14.000 rpm für 30 s bei Raumtemperatur.

²¹ (Fazekas de St Groth et al., 1963)

²² 3X konzentriert: 13,5 ml 20 % SDS, 48 ml Tris 2M, pH 6,8

3.2.2.4 SDS-PAGE

Zur Analyse von durch die generierten Plasmide (über)exprimierten Proteinen, wurde eine Auftrennung der aus den Zelllysaten gewonnenen Proteine im elektrischen Feld mit 0,75 mm starken Acrylamidgelen durchgeführt. Hierzu kam das Verfahren der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS²³-PAGE) zum Einsatz, bei der die individuelle Eigenladung der zu trennenden Proteine durch das anionische Detergens SDS überdeckt wird. Da die mit SDS behandelten Proteine außerdem durch Abstoßungsreaktionen der negativen SDS-Moleküle untereinander denaturiert werden und in Kettenform vorliegen, wird somit eine Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld, dem Prinzip des Molekularsiebs entsprechend, alleine nach Moleküllänge ermöglicht, welche proportional zur Molekülmasse ist.

Die Auftrennung erfolgte mithilfe eines diskontinuierlichen Systems nach Laemmli. Hierbei kamen zwei Trenngel unterschiedlicher Dichte zum Einsatz: Zunächst ein Sammelgel (4 % Acrylamid, pH 6,8), welches durch seine größeren Poren die Proteine zunächst unabhängig von der Molekülmasse durch einen starken elektrischen Feldgradienten auf gleiche Laufhöhe brachte. Anschließend durchwanderten die Proteine ein feinporigeres Trenngel (10 % Acrylamid, pH 8,8), welches eine genaue Auftrennung nach Molekülmasse ermöglichte. Da die Auftrennung im elektrischen Feld der Schwerkraft folgend verlief, wurde zunächst das untere Trenngel nach folgendem Ansatz hergestellt:

Komponente	Volumen
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis Lösung 40, 40 % Acrylamid/Bisacrylamidlösung, unvernetzte Co-Polymere)	2,5 ml
<i>Lower Buffer</i> (1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4 % SDS (w/v) in ddH ₂ O)	2,5 ml
H ₂ O	5 ml
TEMED ²⁴	5 µl
10 % APS ²⁵ in ddH ₂ O	80 µl

Der fertige Ansatz wurde zwischen die zwei Glasscheiben einer Gussstation eingefüllt. Anschließend wurden 200 µl H₂O-gesättigtes Butanol aus der Oberphase auf den Ansatz gegeben, um Luftblasen an der Oberfläche zu verhindern und um den

²³ SDS (sodium dodecyl sulfate, engl.): Natriumdodecylsulfat

²⁴ N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, katalysiert die Bindung freier Radikale an APS

²⁵ Ammoniumpersulfat, initiiert die Polymerisation durch Zerfall in zwei Sulfatradikale

Polymerisationsfortschritt abschätzen zu können, indem beobachtet wurde, ob sich bei der Polymerisation freiwerdendes Wasser in der Unterphase der Butanolschicht zeigte. Die Polymerisation war in der Regel nach 20 min abgeschlossen.

Als nächstes wurde der Ansatz für das Sammelgel vorbereitet:

Komponente	Volumen
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis Lösung 40, 40 % Acrylamid/Bisacrylamidlösung, unvernetzte Co-Polymere)	1 ml
<i>Upper Buffer</i> (0,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,4 % SDS (w/v) in ddH ₂ O)	2,5 ml
ddH ₂ O	6,5 ml
TEMED	10 µl
10 % APS in ddH ₂ O	70 µl

Die Butanol/H₂O-Phase wurde vom Trenngel abgegossen. Anschließend wurden 100 µl des Sammelgel-Mix auf das Trenngel pipettiert, leicht geschwenkt und ebenfalls verworfen, um überschüssiges Wasser und Butanol zu entfernen, welches am Übergang von Sammelgel zu Trenngel stören könnte. Dann wurde die Kammer bis zum oberen Rand mit dem Sammelgel-Mix gefüllt und die vollständige Polymerisation abgewartet. Nach Abschluss der Polymerisation wurden die Gele entweder bis zu einer Woche, gegen Austrocknung geschützt, bei 4 °C aufbewahrt oder direkt weiterverwendet.

Zur elektrophoretischen Auftrennung wurde ein Gel in einer Elektrophoresekammer befestigt und diese mit SDS-Elektrophoresepuffer²⁶ gefüllt. Dann wurden je 20 µg Protein in Ladepuffer²⁷ sowie ein Massenstandard in die Geltaschen einpipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 130 V für ca. 60 min. Mit dem Massenstandard wurde der Fortschritt kontrolliert.

3.2.2.5 Western Blot

Um die Proteinproben nach elektrophoretischer Auftrennung für immunologische Untersuchungen zugänglich zu machen, wurden sie mithilfe der Western Blot-Technik aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die hierfür

²⁶ Tris 25 mM, Glycin 192 mM, SDS 0,1 % (v/v), EDTA 0,5 mM

²⁷ 100 mM Tris-HCl (pH 7,0), 24 % Glycerin (w/v), 1,4 M β-Mercaptoethanol, 20 mM Bromphenolblau

notwendigen Komponenten wurden in einem Bad mit Transferpuffer²⁸ mithilfe eines Halters wie folgt zusammengesetzt:

<i>Kathodenseite</i>
Schwamm
Filterpapier
Gel
Membran
Filterpapier
Schwamm
<i>Anodenseite</i>

Anschließend wurde das „Sandwich“ in einer Transferstation befestigt, diese vollständig mit Transferpuffer gefüllt und die Proteine mit 300 V und 300 mA senkrecht zur Gelebene auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Während des Transfers wurde mithilfe eines Kühlakkus sowie eines Magnetrührers eine Überhitzung des Transferpuffers verhindert.

Nach 75 min wurde die Membran entnommen und in einer Kunststoffkammer mit Ponceau S benetzt. Dieser rote Azofarbstoff bindet an die positiv geladenen Aminogruppen von Proteinen und macht sie so für das bloße Auge erkennbar. So konnte überprüft werden, ob der Transfer erfolgreich war. Im Anschluss wurde die Membran zugeschnitten, sodass nur der Proteinbanden enthaltende Bereich verblieb. Dann wurde der Farbstoff mit H₂O von der Membran gewaschen.

Um eine unselektive Reaktion der zur Proteinidentifikation verwendeten Antikörper mit der Membran zu vermeiden, wurde diese in einem nächsten Schritt für 1 h mit 5 % fettfreier Milch auf einer Wippe inkubiert. Hierdurch wurden verbleibende Bindungsstellen auf der Membran mit unspezifischen Proteinen abgesättigt.

Im Anschluss erfolgte die Reaktion mit dem entsprechenden Erstantikörper, welcher in der erforderlichen Konzentration in 5 ml fettfreier Milch auf die Membran gegeben und diese so über Nacht bei 4 °C auf einer Wippe inkubiert wurde. Am darauffolgenden Tag wurde die Milch mit dem Erstantikörper verworfen und die Membran dreimal für 10 min auf der Wippe mit TBS-Tween gewaschen, um überschüssige und unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Danach erfolgte die Inkubation mit einem

²⁸ 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 % Methanol (v/v), 0,1 % SDS (w/v)

Zweitantikörper, welcher an den Fc-Teil des Erstantikörpers bindet und selbst eine Meerrettichperoxidase trägt. Dieser wurde in der erforderlichen Konzentration mit 5 ml fettfreier Milch auf die Membran gegeben und bei Raumtemperatur für 1 h auf einer Wippe inkubiert. Anschließend wurden überschüssige Zweitantikörper entfernt, indem die Membran dreimal für 10 min mit TBS-Tween und abschließend einmal mit TBS gewaschen wurde.

Die Detektion der gesuchten Proteinbanden erfolgte mit dem WESTAR ETA C 2.0 beziehungsweise dem WESTAR ETA C ULTRA 2.0 Kit (Cyanagen). Es wurden je 1,5 ml *Luminol Enhancer Solution* sowie *Peroxide Solution* gemischt und anschließend auf die Membran aufgetragen. Die bei der Umwandlung von Luminol in Animophtalat freiwerdenden Lichtblitze bei 245 nm konnten mithilfe des Vilber Lourmat Peqlab FUSION SL Gel Chemiluminescence Documentation System detektiert werden.

Um nach einer Detektion eine weitere Antikörperreaktion durchführen zu können, musste die Membran zunächst gestrippt, also Erst- und Zweitantikörper von den gebundenen Proteinen entfernt werden. Hierzu wurde die Membran fünfmal für jeweils 5 min auf der Wippe mit ultrafiltriertem Wasser gewaschen. Parallel wurde 2 %-iges SDS auf 60 °C erhitzt und 6 mg TCEP pro 10 ml SDS-Lösung hinzugegeben. Beides wurde auf die Membran gegeben und diese für 1 h bei 54 °C auf der Wippe inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran mehrfach mit ultrafiltriertem Wasser gewaschen. Danach wurde die Membran für 5 min auf einer Wippe bei Raumtemperatur mit TBS-Tween²⁹ gewaschen. Schließlich wurde die Membran für 15 min auf einer Wippe bei Raumtemperatur mit fettfreier Milch blockiert. Im Anschluss konnte eine neue Erstantikörperinkubation erfolgen.

3.2.3 Tierexperimentelle Methoden

3.2.3.1 Versuchstierhaltung

Die Versuchstiere wurden nach deren Lieferung in temperatur- und luftfeuchtigkeitsüberwachten Versuchstierställen in der TARC (Translational Animal Research Center) der Universitätsmedizin Mainz im Hochhaus am Augustusplatz bei einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Tiere erhielten Nahrung und

²⁹ 20 mM Tris (pH 7,6), 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20 (w/v)

Wasser zur freien Verfügung. Alle an Versuchstieren vorgenommenen Eingriffe erfolgten mit den entsprechenden Genehmigungen der lokalen Behörden.

3.2.3.2 In utero – Elektroporation

Zur Expression bestimmter Proteine im sich entwickelnden Gehirn von Mäusen im Embryonalstadium kam die *in utero*-Elektroporation zum Einsatz. Bei dieser Methode wird zunächst eine DNA-Lösung mit einem eukaryotischen Expressionsvektor, in den zuvor die für das zu exprimierende Gen codierende Sequenz inkloniert worden war, in den Seitenventrikel einer Neokortex-Hemisphäre eines im Uterus befindlichen Embryos appliziert. Anschließend werden die DNA-Moleküle durch gepulstes Anlegen eines elektrischen Feldes in die umliegenden Zellen, hier die Zellen der ventrikulären Zone, eingebracht, wobei sich die negativ geladenen DNA-Moleküle in Richtung der Anode bewegten.

Die *in utero*-Elektroporationsexperimente wurden in der Arbeitsgruppe von (entfernt) (Universitätsmedizin Mainz) unter Anleitung an terminiert verpaarten, trächtigen Mäusen der Zelllinie C57BL/6J (Janvier Labs) im Alter von 8-13 Wochen, 12-13 Tage *p.c.* (Embryonalstadium E12.5-E13.5) durchgeführt. Diese wurden zuvor mit frühestens seit 11 Tagen bestehender Trächtigkeit geliefert und verblieben zur Akklimatisierung mindestens für einen Tag in den Tierhaltungsräumen der TARC bevor die Eingriffe durchgeführt wurden. Zunächst wurden die Tiere einzeln gewogen und erhielten eine gewichtsadaptierte Analgesie mit einem subkutanen Depot des Wirkstoffes Carprofen (Rimadyl Lösung, 100 µl je 10 g Körpergewicht, entsprechend 4 mg je kg Körpergewicht Carprofen), wodurch aufgrund der Wirkdauer von 24 h auch eine postinterventionelle Analgesie gewährleistet war. Um einen ausreichenden Wirkspiegel zu erreichen, wurde mit dem Eingriff erst 30 min nach der Injektion begonnen. Hierzu wurde ein tragendes Tier zunächst in eine mit 2,8 % Isofluran bei einem O₂-Fluss von 2,5 l/min gefluteten Vorfluterkammer gesetzt. Nach dem Ausfall der Stellreflexe wurde die Maus aus der Vorfluterkammer genommen und auf eine auf 37 °C vorgeheizte Wärmeplatte gelegt. Die Narkose wurde über eine spezielle Maske mit 2,5 % Isofluran und einem O₂-Fluss von 2,5 l/min fortgeführt. Nachdem geprüft wurde, ob Kneif- und Lidreflex erloschen waren, wurden die Augen mit Bepanthen Augensalbe bedeckt, um ein Austrocknen durch den fehlenden Lidschlag zu verhindern. Zur automatischen Anpassung der Temperatur der Wärmeplatte wurde eine Rektalsonde zur Körpertemperaturmessung eingeführt. Das Versuchstier wurde dann mithilfe von ablösbaren Klebestreifen auf der Unterlage fixiert und überprüft, ob

der Zwischenzehenreflex erloschen war. Im Anschluss wurde der Bereich des Operationsfeldes mit 70 % vergälltem Alkohol desinfiziert und anschließend mit zwei Lagen steriler, lochförmig ausgeschnittener Gaze abgedeckt, welche mit bakteriostatischer Lösung (0,9 % NaCl, 0,9 % Benzylalkohol) benetzt wurde. Es erfolgte ein 2-2,5 cm langer medianer Hautschnitt von inguinal nach kranial. Dann wurde die darunterliegende Muskelschicht mit einem 1-1,5 cm langen medianen Schnitt entlang der Linea alba vom inguinalen Milchdrüsenkomplex nach kranial eröffnet. Die beiden Uterushörner wurden aufgesucht, behutsam aus dem Abdomen gehoben und beidseits auf die Gaze gelegt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der Uterus nur mit Ringpinzetten und stets im Bereich zwischen zwei Embryonen gegriffen wurde. Der Uterus wurde permanent mit bakteriostatischer Lösung feucht gehalten. Die Embryonen wurden gezählt und Besonderheiten, wie Fruchtresorptionen, auffällige Färbung oder Einblutungen im Operationsbericht dokumentiert. Anschließend wurde ein Embryo zur Elektroporation ausgewählt und so positioniert, dass einer der beiden Hirnventrikel gut sichtbar und erreichbar war und keine uterinen Gefäße oberhalb der geplanten Injektionsstelle lagen. Als Leitstruktur zum Auffinden der Injektionsstelle diente hier ein gedachtes Dreieck zwischen der Lambdanaht und der Pfeilnaht. Der Ventrikel wurde durch die Uteruswand hindurch mit einer gezogenen Glaskapillare³⁰ punktiert und 1,5 µl der mit Fast Green eingefärbten Plasmidlösung manuell mithilfe einer 10 ml Einwegspritze (BD Discardit II, BD, Heidelberg, Deutschland) appliziert. Hierbei wurde auf eine gleichmäßige, nicht zu rasche Injektion geachtet, um eine Verletzung des Ventrikelsystems oder eine durch zu hohen Injektionsdruck verursachte Verschiebung der DNA-Lösung in andere Abschnitte des Ventrikelsystems zu verhindern. Eine erfolgreiche Injektion war durch eine sichtbare Blaufärbung des Ventrikels zu erkennen. Anschließend wurde die Elektrodenpinzette des Elektroporators so positioniert, dass sich die Anode hinter dem zu transfizierenden Areal auf einer gedachten Linie zwischen Kathode und Anode befand. Nun erfolgte die Elektroporation mit 5 Entladungen (35 V, 50 ms Impulsdauer, 950 ms Pause zwischen den Entladungen). Der Uterus wurde anschließend an den Stellen, an denen die Elektroden auflagen, mit bakteriostatischer Lösung befeuchtet. Die Injektion der Plasmidlösungen sowie die Elektroporation wurde für weitere Embryonen wiederholt, es wurden bis zu 4 Embryonen pro tragendem Tier elektroporiert. Im Anschluss wurden die Uterushörner wieder vorsichtig zurück in die Bauchhöhle verbracht. Das

³⁰ Einstellungen des Kapillarziehers: P = 500; heat = 300; pull = 40; velocity = 50; time = 50

Peritoneum wurde mit einer fortlaufenden Naht und die Bauchhaut mit Einzelknopfnähten vernäht, sodass auch bei einer Manipulation des Tieres an der Naht vor der Verheilung diese nicht vollständig eröffnet wurde. Im Anschluss wurde die Zufuhr des Narkosegases beendet, die Normalisierung der Atmung abgewartet und die Maus in Papiertücher gewickelt in den Käfig gelegt, um ein Auskühlen zu vermeiden. Es wurde darauf geachtet, dem gesamten Eingriff in unter 30 min zu beenden, um die Belastung für die Tiere so gering wie möglich zu halten. Nach den Eingriffen erfolgten regelmäßige Kontrollen durch die Tierpfleger der TARC.

3.2.3.3 Präparation von Gewebe

Die Präparation der embryonalen Gehirne erfolgte am Embryonaltag 18. Hierzu wurden die tragenden Tiere zunächst durch zervikale Dislokation getötet. Es erfolgte ein zügiger abdomineller Transversalschnitt und die Entnahme des Uterus. Die vorhandenen Embryonen wurden durch Scherenschlag getötet und die Anzahl und eventuelle Fruchtresorptionen dokumentiert. Dann erfolgte die zügige Präparation der Gehirne. Hierzu wurde die Haut und der Schädelknochen von occipital bis auf Höhe des Bulbus olfactorius medial eingeschnitten und zur Seite abpräpariert. Dann wurden die Gehirne mit einer kleinen Ringpinzette von caudal leicht angehoben, vom Schädelknochen gelöst und in vorbereitete, gekühlte 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS (*phosphate buffered saline*: 136 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4) gegeben.

3.2.4 **Immunhistochemie**

3.2.4.1 Fixierung von Gewebematerial

Nach der Präparation der Gehirne und dem Überführen in Zentrifugenröhrchen verblieben diese zunächst über Nacht in 4 % PFA bei 4 °C auf einer Wippe. Am Folgetag wurde die PFA-Lösung verworfen, die Gehirne einmal mit PBS gespült und in 20 % Sucroslösung mit 0,1 % Natriumazid in PBS gegeben, bis die Gehirne im Medium absanken. Nach erneutem Spülen mit PBS wurden die Gehirne auf einem Stück Aluminiumfolie, welches in einen Behälter mit Trockeneis gelegt wurde, eingefroren und danach bis zur weiteren Verarbeitung bei -18 °C aufbewahrt.

3.2.4.2 Floating sections

Zur histologischen und immunhistochemischen Analyse wurden 80 µm starke koronare Gefrierschnitte am Kryostaten hergestellt. Hierzu wurden die zuvor eingefrorenen Gehirne auf einem Probenteller mithilfe von Einbettmedium (Tissue

Freezing Medium, Leica) auf der Schnellgefrierplatte des Kryostaten sagittal ausgerichtet und aufgefroren. Die gewonnenen Gehirnschnitte wurden in kryoprotektiver Lösung in 48-Well Multiwellplatten bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

3.2.4.3 Fluoreszenzmarkierung von Gewebeschnitten

Zur fluoreszenzmikroskopischen Identifikation bestimmter Proteinstrukturen kamen spezielle Antikörper zum Einsatz, welche durch Reaktion mit einem fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Zweitantikörper die gesuchten Zielstrukturen mikroskopisch sichtbar machten.

Hierzu wurde zunächst PBS-Triton (0,3 % Triton X 100, Nr. 3051.2, Roth, Deutschland in PBS) in einer 24-Well Multiwellplatte vorgelegt. Dann wurden auflichtmikroskopisch geeignete Schnitte nach Hirnregion und Qualität ausgewählt und diese mit einem Pinsel in jeweils ein Well der 24-Well Multiwellplatte übertragen. Die Schnitte wurden so für 5 min bei Raumtemperatur auf einer Wippe inkubiert. Anschließend wurde das PBS-Triton mit dem Wasserstrahlsauger abgesaugt und 200 µl PBS-Triton mit 5 % Ziegen Serum (Nr. G9023, Sigma-Aldrich) pro Well einpipettiert, um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu reduzieren. Es erfolgte eine Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur auf einer Wippe. Das PBS-Triton mit 4 % Ziegen Serum wurde abgesaugt und 150 µl des Primärantikörpers in PBS-Triton mit 4 % Ziegen Serum pro Well einpipettiert. Die Menge des zugesetzten Primärantikörpers richtete sich nach der gewünschten Konzentration. In der Regel wurde eine Konzentration von 1:500 gewählt, wozu 0,3 µl der Primär-Antikörpers zu 149,7 µl PBS-Triton mit 4 % Ziegen Serum gegeben wurden. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte dann über Nacht bei 4 °C auf einer Wippe. Am darauffolgenden Tag erfolgte eine dreimalige Waschung mit PBS-Triton. Hierzu wurde zunächst der Primärantikörper in PBS-Triton mit 4 % Ziegen Serum abgesaugt, 200 µl PBS-Triton pro Well einpipettiert und für 5 min bei Raumtemperatur auf eine Wippe inkubiert. Anschließend wurde das PBS-Triton abgesaugt und der Waschschrift noch zweimal wiederholt. Danach wurde das PBS-Triton abgesaugt und 200 µl Sekundärantikörper in PBS-Triton mit 4 % Ziegen Serum pro Well einpipettiert. Die Menge des Sekundärantikörpers richtete sich auch hier nach der gewünschten Endkonzentration. Typischerweise wurde eine Endkonzentration von 1:1000 angestrebt, wozu 0,2 µl Sekundärantikörper zu 199,8 µl PBS-Triton mit 4% Ziegen Serum gegeben wurden. Die Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgte für 1 h lichtgeschützt auf einer Wippe, um einen Intensitätsverlust des an den

Sekundärantikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Sekundärantikörper in PBS-Triton mit 4 % Ziegen Serum abgesaugt und etwas PBS zum Waschen in jedes Well gegeben. Das PBS wurde abgesaugt und 200 µl DAPI in der Konzentration 1:5000 pro Well einpipettiert. Der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff DAPI³¹ wurde als Gegenfärbung zur Sichtbarmachung der Zellkerne bei allen immunhistochemischen Analysen eingesetzt. Es erfolgte eine Inkubation mit DAPI für 10 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde DAPI abgesaugt und etwas PBS in jedes Well gegeben. Danach wurden die Schnitte mit einem Pinsel auf Objektträger übertragen, getrocknet und mit Mowiol³² eingedeckelt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mit der Software LAS X und einem Fluoreszenzmikroskop angefertigt.

³¹ 4',6-Diamidin-2-phenylindol, Hoechst 33342, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland

³² 6 g Glycerol; 2,4 g Mowiol 4-8 (475906, Merck); 12 ml Tris 0,2 M; pH 8,5; 6,5 ml H₂O (steril)

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der molekularbiologischen Arbeiten

4.1.1 Herstellung eines eukaryotischen Transfektionsvektors zur Überexpression von FAAH

Zur Herstellung eines eukaryotischen Expressionsvektors zur Überexpression von FAAH musste zunächst ein geeignetes Plasmid gewählt und die für FAAH codierende DNA-Sequenz in dieses einkloniert werden. Die erforderliche DNA-Sequenz für FAAH war bereits in der Vergangenheit als cDNA aus murinen Gehirnllysaten isoliert und in einen viralen Transfektionsvektor einkloniert worden, welcher zur Überexpression von FAAH in adulten Gehirnen in Verbindung mit einem *adeno associated virus* (AAV) verwendet worden war (vgl. Abb. 4.4-1; Zimmermann et al., 2019). Diese Sequenz sollte nun in einen Vektor subkloniert werden, der zur (Über-)Expression von Genen in embryonalem Gewebe geeignet war. Hierzu wurde das Plasmid pCAGIG verwendet, welches neben einem starken Promotor über eine IRES zur 5'-CAP-unabhängigen Translation sowie das unter UV-Licht grün fluoreszierende EGFP als Reporter gen verfügte (Matsuda und Cepko, 2004).

Ziel dieses Projekts, das die Grundlage für weiterführende Experimente, nämlich mittels FAAH-Überexpression den Einfluss der verminderten AEA-Konzentration zu untersuchen, liefert, ist es, zwei Konstrukte für die FAAH-Expression herzustellen:

- Eines, das FAAH konstitutiv überexprimiert und so auch in wildtypischen Tieren, beziehungsweise Zellen zur Überexpression führt (das Gen muss also ohne vorgeschaltete floxstop-Kassette im Vektor vorliegen) sowie
- Ein weiteres, das erlaubt, FAAH in spezifischen Zellen gezielt zu überexprimieren, mit Hilfe der vorgeschalteten floxstop-Kassette und Zuhilfenahme des Cre-Systems (vgl. 2.7.)

4.1.1.1 Subklonierung der HA-FAAH-Sequenz in pCAGIG

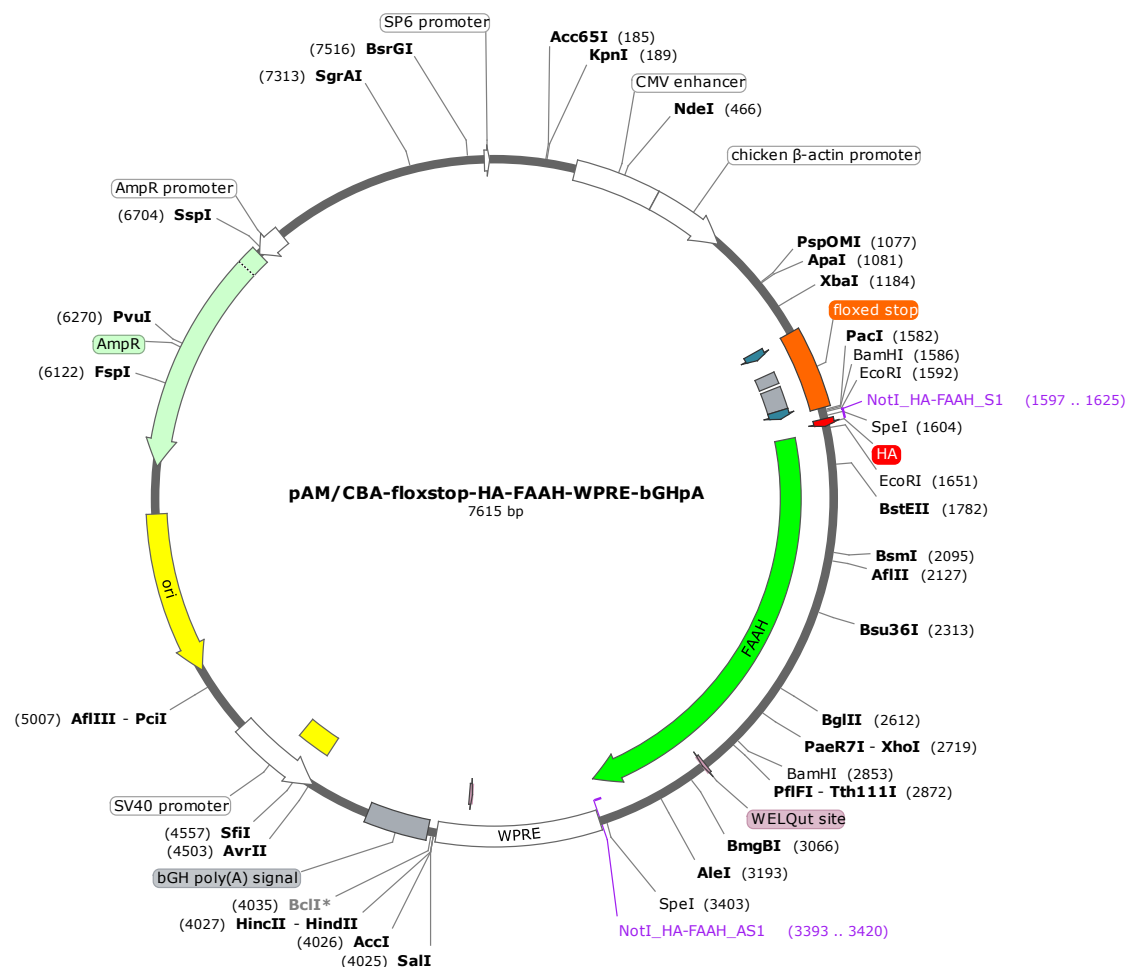


Abbildung 4.1-1: Schematische Darstellung von Plasmid #419. Da dieser Vektor über einen floxed stop vor der HA-FAAH-Sequenz verfügt und sich dazwischen keine für die Subklonierung geeigneten Restriktionsstellen befanden, wurde die HA-FAAH-Sequenz durch PCR mit speziellen Primern (violett hinterlegt) aus dem Plasmid amplifiziert, durch die zu beiden Seiten der Sequenz im Rahmen der PCR eine NotI-Restriktionsstelle zur Ligation in pCAGIG angehängt wurde.

Da sich im Plasmid pAM-floxstop-HA-FAAH-WPRE-bGHpA keine mit dem Zielvektor kompatiblen Restriktionsstellen zur direkten Subklonierung der FAAH-Sequenz fanden, wurde mithilfe einer PCR die entsprechende Sequenz mit in 5'- sowie in 3'-Richtung angehängten Restriktionsstellen für NotI amplifiziert. Hierzu wurden spezielle Primer konstruiert, welche zusätzlich die für die Restriktionsstellen kodierenden Sequenzen trugen. Da die Replikation der komplementären Stränge durch DNA-Polymerasen stets bis zum Strangende erfolgt, entstanden hierbei glatte Enden, sog. *blunt ends*. Zur Ligation des DNA-Fragmentes in die NotI-Restriktionsstelle des Zielvektors mussten diese zunächst mithilfe von NotI durch Restriktion in überhängende Enden, sog. *sticky ends* umgewandelt werden. Da Restriktionsenzyme an den Enden eines DNA-Stranges nur ineffektiv schneiden und die kurzen, bei der Restriktion entstehenden Reststücke bei der Ligation stören können, wurde das

Amplicon daher zunächst mithilfe von TA-Cloning in einen Zwischenvektor eingebracht, dieser mithilfe kompetenter Zellen vervielfältigt und schließlich die Sequenz mit *NotI* ausgeschnitten und in den Zielvektor kloniert.

4.1.1.1.1 Amplifikation der HA-FAAH Sequenz aus CBA-floxstop-HA-FAAH

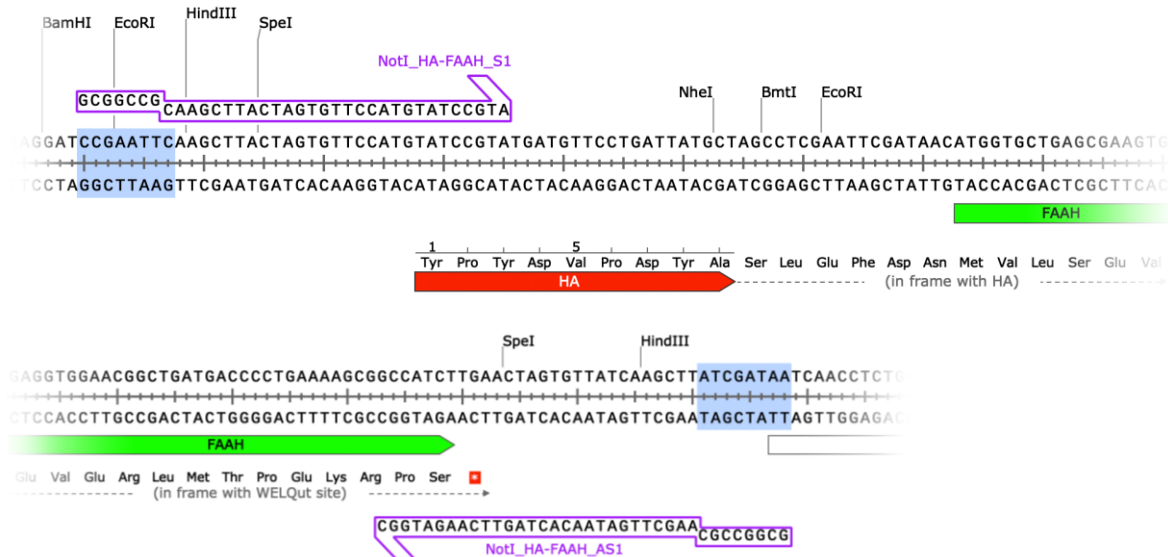


Abbildung 4.1-2: Spezifische Primer zur Amplifikation von HA-FAAH. Zu sehen ist die Anlagerung der Primer am N- und C-terminalen Ende der HA-FAAH-Sequenz. Die überhängenden Enden der Primer tragen die *NotI*-Restriktionsstellen (3'-GCGGCCGC-5').

Zunächst wurde die für FAAH kodierende Sequenz mithilfe einer PCR aus pAM-floxstop-HA-FAAH-WPRE-bGHpA amplifiziert. Für die Herstellung des Konstrukts für eine konstitutiv aktive FAAH-Expression durfte die floxstop-Sequenz vor dem HA-Tag nicht mitamplifiziert werden. Die Primer wurden daher hierbei so gewählt, dass auch das am N-terminalen Ende der FAAH gelegene HA-Tag mitamplifiziert wurde, die unmittelbar davor liegende Sequenz der floxstop-Kassette jedoch nicht (siehe Abb. 4.1-1). Da die HA-Sequenz zusammen mit FAAH ein Fusionsprotein bildet, kann es so mithilfe immunologischer Methoden zur Detektion einer erfolgreichen Expression dienen. Aufgrund der Größe des Amplicons von insgesamt 1853 bp (Basenpaaren) wurde die speziell für große PCR Produkte geeignete Platinum *Taq* Polymerase verwendet. Die *NotI*-Sequenz wurde anschließend an die SpeI und HindIII-Sequenz des FAAH-Fragments angefügt (siehe Schema Abb. 4.1-1).

Da für die folgende TA-Klonierung Adenosin-Überhänge an den 3'-Enden der synthetisierten DNA erforderlich waren, welche von der Platinum *Taq* DNA-Polymerase jedoch nicht zuverlässig synthetisiert werden, erfolgte im Anschluss an die PCR und einem Aufreinigungsschritt eine Inkubation mit einer weiteren *Taq* DNA-

Polymerase, welche der Ergänzung der überhängenden Adenosinmoleküle an den 3'-Enden diene. Im Anschluss wurde die DNA aufgereinigt.

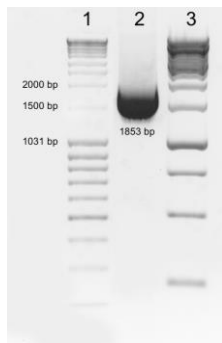


Abbildung 4.1-3: Amplifikation von HA-FAAH durch PCR. 1: DNA-Längenstandard MassRuler DNA Ladder Mix; 2: HA-FAAH; 3: GeneRuler 1 kb DNA Ladder

4.1.1.1.2 TOPO TA Cloning



Abbildung 4.1-4: Ligation des PCR-Produktes in pCRII-TOPO. Rechts und links sind die beiden offenen Enden des TOPO-Vektors zu erkennen, an denen die Topoisomerase gebunden ist. Die zuvor an das PCR-Produkt angehängten 3'-Desoxyadenosine sind grün hinterlegt. Nach erfolgter Ligation löst sich die Topoisomerase vom Vektor. Die Grafik zeigt Ausschnitte der tatsächlichen Sequenz.

Als Nächstes erfolgte die Ligation des mit 3'-Adenosinüberhängen versehenen PCR-Produktes in einen speziellen proprietären Vektor. Es handelte sich hierbei um ein durch die Topoisomerase I des *Vaccinia*-Virus linearisiertes Plasmid. Bei der Linearisierung im Rahmen des Herstellungsprozesses schneidet diese Topoisomerase spezifisch am Ende der Sequenz (C/T)CCTT und bleibt im Anschluss jeweils kovalent an die 3'-Phosphatgruppen der endständigen Desoxythymidine gebunden. Somit wird eine Selbstligation des Vektors verhindert. Lagern sich nun die komplementären 3'-Desoxyadenosin-Überhänge des PCR-Produkts an die 5'-Desoxythymidin-Überhänge des TOPO-Vektors an, übernimmt die gebundene Topoisomerase eine Ligasefunktion und verbindet PCR-Produkt und Vektor (Shaffer und Traktman, 1987).

Nach der erfolgten Ligationsreaktion wurde eine Transformation durchgeführt. Nach Ausplattierung und Inkubation über Nacht wurden mehrere Kolonien isoliert und diese mithilfe einer Minipräparation und Restriktionsverdau auf die Aufnahme des PCR-Produktes untersucht. Hierzu erfolgte von mehreren Kolonien jeweils ein Restriktionsverdau mit *Bam*HI, für das eine Restriktionsstelle in der HA-FAAH-Sequenz und eine im Vektor vorhanden war, sowie mit *Not*I, um sicherzugehen, dass die für die weiteren Klonierungsschritte benötigten Restriktionsstellen intakt waren. Im Anschluss wurde eine Sequenzierung in Auftrag gegeben. Hierbei zeigte sich, bis auf ein zusätzliches Triplet (AAC) vor dem Startcodon der FAAH-Sequenz, die erwartete Sequenz. Bei der Resequenzierung der PCR-Vorlage (pAM-floxstop-HA-FAAH-WPRE-bGHpA) zeigte sich, dass dieses Triplet – mutmaßlich als Überbleibsel einer in der Vergangenheit erfolgten Klonierung – bereits in der ursprünglichen Sequenz vorhanden war. Da das zusätzliche Triplet nicht zu einer Verschiebung des Leserasters führte und die Ursprungssequenz in der Vergangenheit erfolgreich für das HA-FAAH-Fusionsprotein kodierte, wurde es belassen.

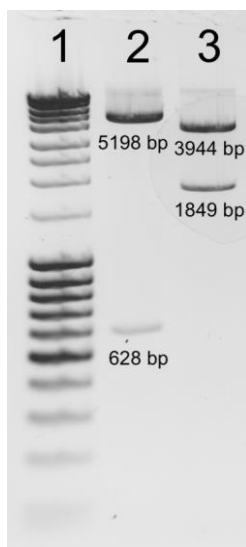


Abbildung 4.1-5: Restriktionsverdau von HA-FAAH in pCRII-TOPO. 1: DNA-Längenstandard MassRuler DNA Ladder Mix; 2: Restriktionsverdau mit BamHI; 3: Restriktionsverdau mit NotI. Die gleichen Untersuchungen wurden mit vier weiteren Kolonien mit gleichen Ergebnissen durchgeführt, die hier nicht dargestellt sind.

4.1.1.1.3 Subklonierung der HA-FAAH Sequenz aus pCRII-TOPO in pCAGIG

Um die HA-FAAH-Sequenz aus dem Zwischenvektor in pCAGIG zu klonieren, erfolgte zuerst eine Maxipräparation von HA-FAAH in TOPOII. Anschließend wurde ein Restriktionsverdau mit *Not*I durchgeführt und das ausgeschnittene HA-FAAH-Fragment gelelektrophoretisch vom Vektor getrennt. Dann wurde das Gelstück mit

dem Fragment unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Parallel erfolgte die Linearisierung des Zielvektors pCAGIG mithilfe von NotI sowie eine Dephosphorylierung mit CIP, um eine Selbstligation des Vektors zu verhindern. Im Anschluss wurde die HA-FAAH-Sequenz in pCAGIG im molaren Verhältnis 3:1 ligiert.

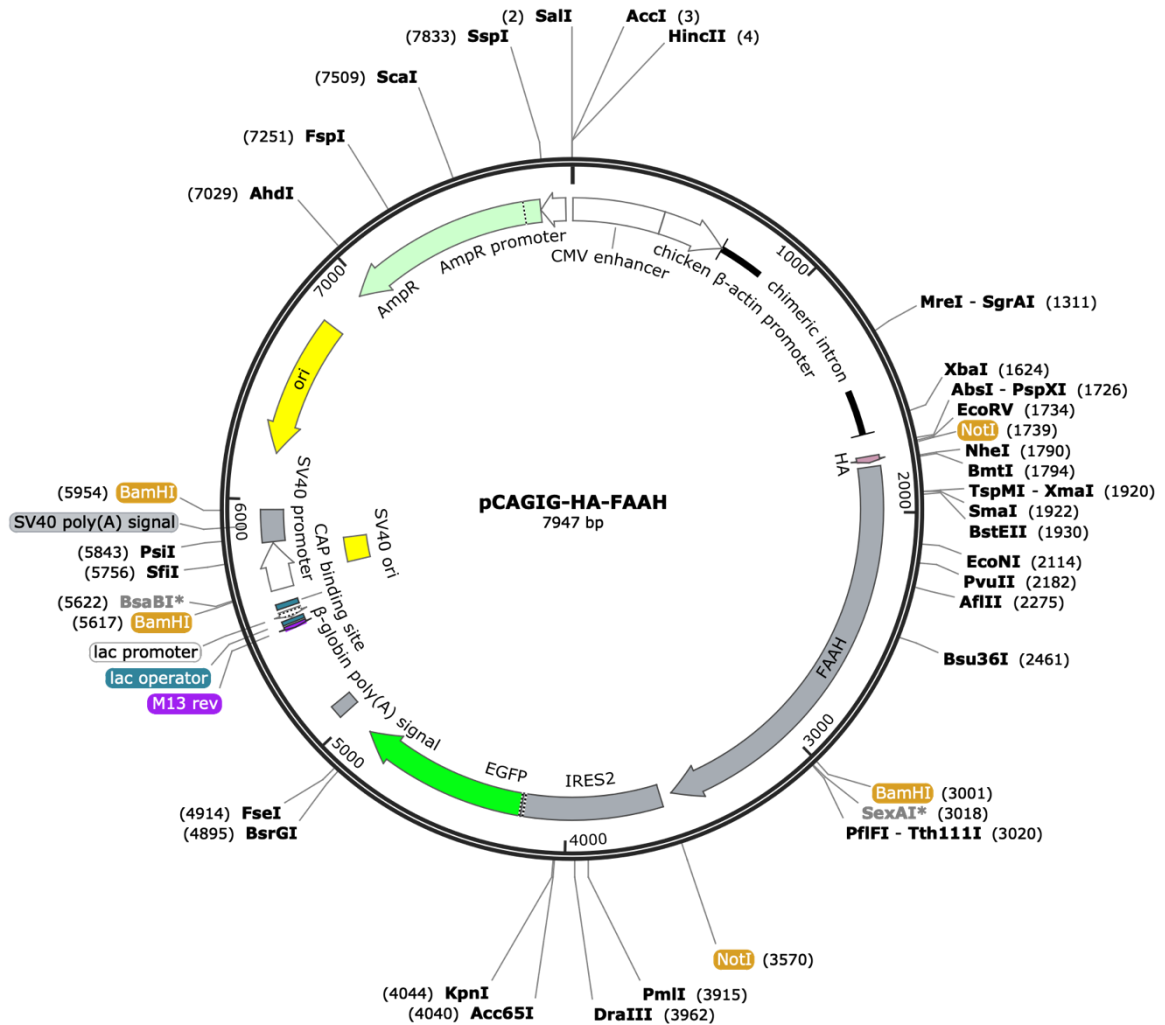


Abbildung 4.1-6: Schematische Darstellung von pCAGIG-HA-FAAH. Hervorgehoben sind die NotI-Restriktionsstellen, die zum Einfügen der HA-FAAH-Sequenz dienten, sowie die BamHI-Restriktionsstellen, durch die der Nachweis einer erfolgreichen Ligation sowie, aufgrund der asymmetrischen Lage im HA-FAAH-Fragment, der korrekten Orientierung der eingefügten Sequenz erfolgte. Das Schema zeigt aus Gründen der Übersichtlichkeit lediglich eine Auswahl der über 600 vorhandenen Restriktionsstellen.

Es erfolgte die Transformation und Ausplattierung des Ligationsproduktes. Am Folgetag wurden insgesamt 30 Kolonien isoliert und durch Minipräparation auf eine erfolgreiche Klonierung untersucht.

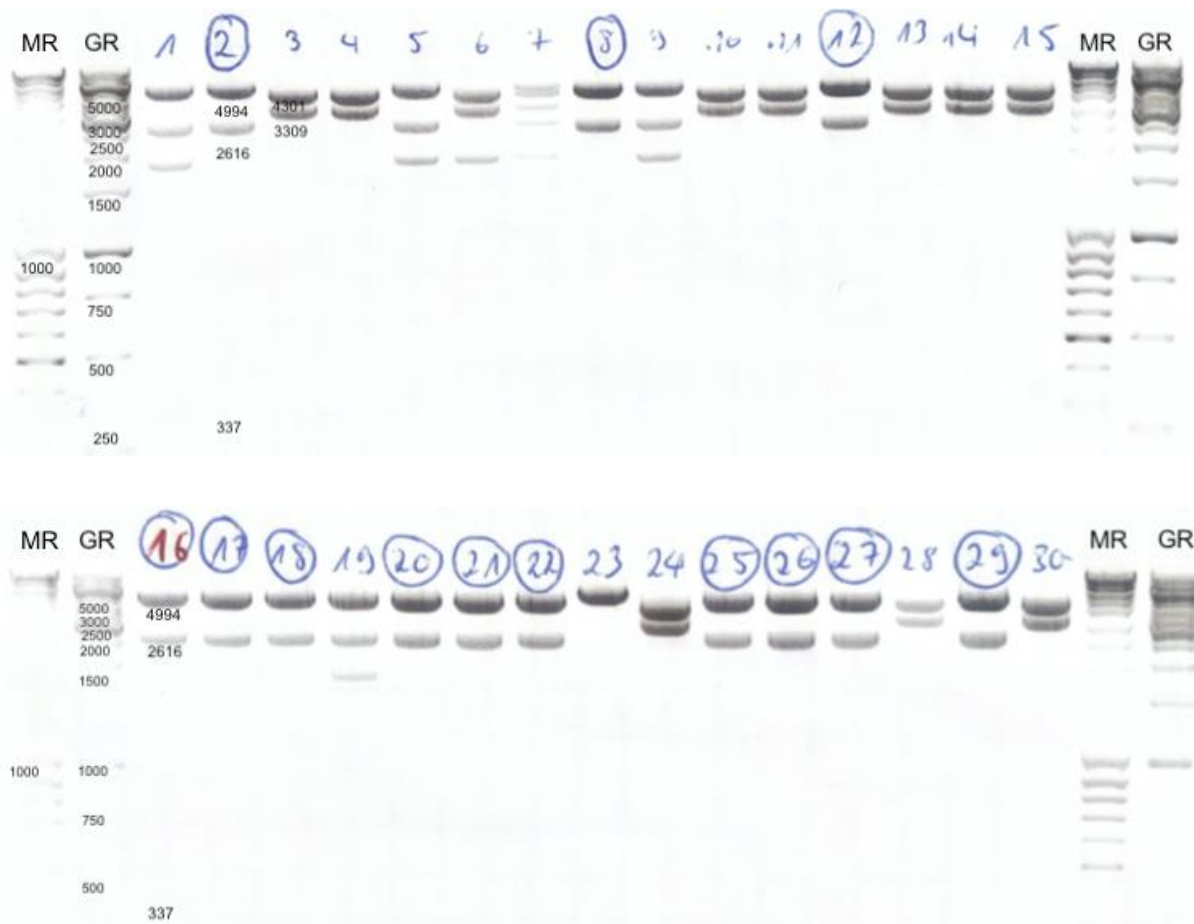


Abbildung 4.1-7: Restriktionsverdau von pCAGIG-HA-FAAH. Testverdau der Ligationsansätze des HA-FAAH-Fragments aus pCRII-TOPO in pCAGIG durch BamHI. Klone mit dem gewünschten Produkt sind umkreist. Die Bande bei 337 Basenpaaren war bei allen Klonen vorhanden, ist aufgrund der geringen Masse aber bei dieser Aufnahme schwer erkennbar. MR: MassRuler DNA Ladder Mix; GR: GeneRuler 1kb DNA Ladder

Es zeigte sich im Restriktionsverdau mit *Bam*HI bei 13 Kolonien eine Aufnahme der HA-FAAH-Sequenz in den Vektor mit korrekter Orientierung (vgl. Abb. 4.1-6; Fragmente nach Verdau mit *Bam*HI mit 4994, 2616 sowie 337 Basenpaaren, siehe bspw. Banden 2, 8 in Abb. 4.1-7), bei 10 Kolonien die Aufnahme in umgekehrter Orientierung (4301, 3309 sowie 337 Basenpaare, siehe bspw. Banden 3, 4 in Abb. 4.1-7) sowie bei weiteren 7 Kolonien eine mehrfache Ligation der HA-FAAH-Sequenz in den Vektor. In einem Fall wurde eine Selbstligation des Vektors festgestellt (5779 und 337 Basenpaare, Bande 23 in Abb. 4.1-7). Bei der im Anschluss beauftragten Sequenzierung zeigte sich die vollständige erwartete Sequenz.

4.1.1.2 Subklonierung einer *floxed stop*-Sequenz in pCAGIG-HA-FAAH

Um für zukünftige Untersuchungen neben der kontinuierlichen auch eine Cre-Rekombinase-abhängige Expression von FAAH zu ermöglichen, wurde, ausgehend von pCAGIG-HA-FAAH, ein weiteres FAAH-Expressions-Konstrukt generiert, welches am N-terminalen Ende der HA-FAAH-Sequenz über einen *floxed stop* verfügen sollte (Vgl. zum Folgenden: Kim et al., 2018 sowie Kapitel 2.7 der vorliegenden Arbeit).

Ein *floxed stop* besteht aus einer in 5'- wie in 3'-Richtung von gleich orientierten loxP-sites flankierten Sequenz aus einem Poly(A)-Signal und einer darauffolgenden *pause site*. Diese Sequenz führt in Zellen ohne aktive Cre-Rekombinase zu einem Abbruch der Transkription durch die RNA-Polymerase II, noch bevor diese die darauffolgende DNA-Sequenz (in der Regel das zu untersuchende Gen) transkribieren kann (Gromak et al., 2006). Ist in der Zelle, die das Plasmid aufgenommen hat, jedoch eine Cre-Rekombinase aktiv, so erkennt diese die beiden gleich orientierten loxP-Sequenzen und schneidet die dazwischenliegende Sequenz sowie eine der beiden loxP-Sequenzen aus dem Plasmid aus.

Im Falle eines *floxed stop* wird so die Terminierungssequenz entfernt und die RNA-Polymerase II setzt die Transkription fort (Gromak et al., 2006, Dragatsis und Zeitlin, 2001, Kim et al., 2018). Mithilfe der Cre-Rekombinase-abhängigen Expression der FAAH ist zum Beispiel eine selektive Expression mithilfe einer Mauslinie möglich, die die Cre-Rekombinase mit einem zelltypspezifischen Protein koexprimiert (z. B. Nex-Cre Mauslinie, Goebbels et al., 2006).

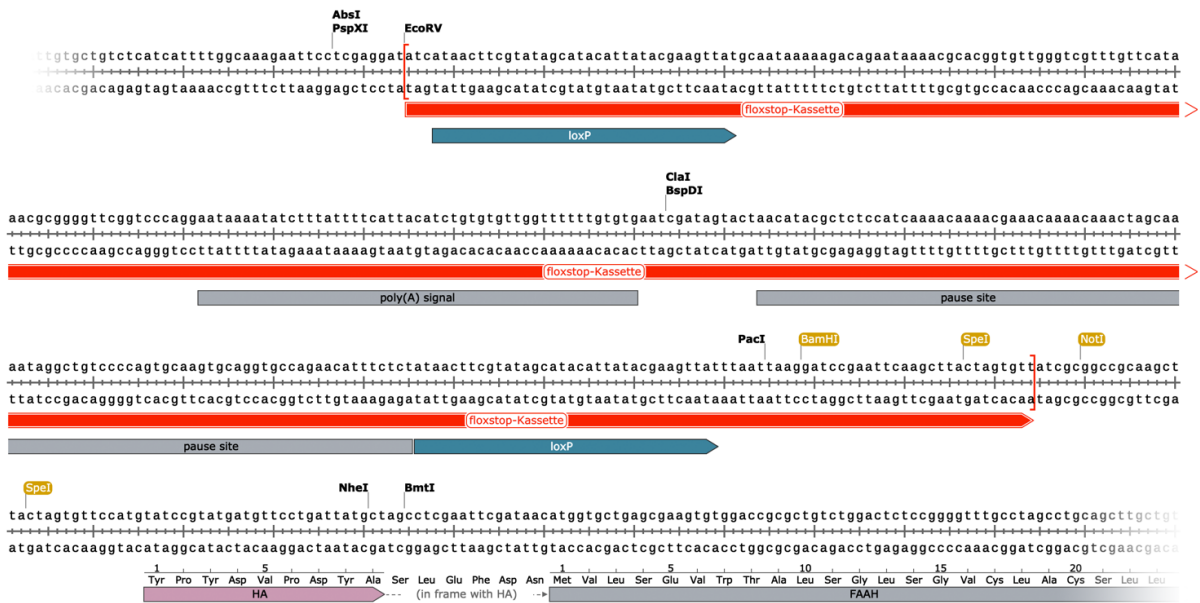


Abbildung 4.1-8: floxstop-Kassette in pCAGIG-floxstop-HA-FAAH. Dargestellt ist die floxstop-Kassette aus pBSK-floxed stop nach der Ligation in pCAGIG-HA-FAAH, wodurch das Konstrukt pCAGIG-floxstop-HA-FAAH entstanden ist. Die Ligation erfolgte in die geöffnete EcoRV-Restriktionsstelle von pCAGIG-HA-FAAH, die intakt geblieben ist (GATATC); am in 3'-Richtung des Matrizenstranges liegenden Ende der floxstop-Kassette wurde sie jedoch durch Ligation des GTT-Restes der HpaI-Restriktion zerstört (GTTATC). Die asymmetrisch liegende SpeI-Sequenz innerhalb der floxstop-Kassette diente zum Nachweis der korrekten Orientierung (siehe Abb. 4.1-9).

Zur Subklonierung der floxstop-Kassette wurde diese zunächst aus einem Plasmid mit geeigneten Restriktionsstellen (pBSK-floxed stop) ausgeschnitten. Hierfür wurden die Restriktionsenzyme *HpaI* und *EcoRV* verwendet, welche für die beabsichtigte Ligation kompatible Enden produzieren. Gleichzeitig wurde der Zielvektor pCAGIG-HA-FAAH mit *EcoRV* linearisiert und mit CIP dephosphoryliert. Anschließend erfolgte die Ligrationsreaktion sowie die Transformation und Ausplattierung. Am Folgetag wurden 20 Kolonien isoliert und Übernachtkulturen angelegt.

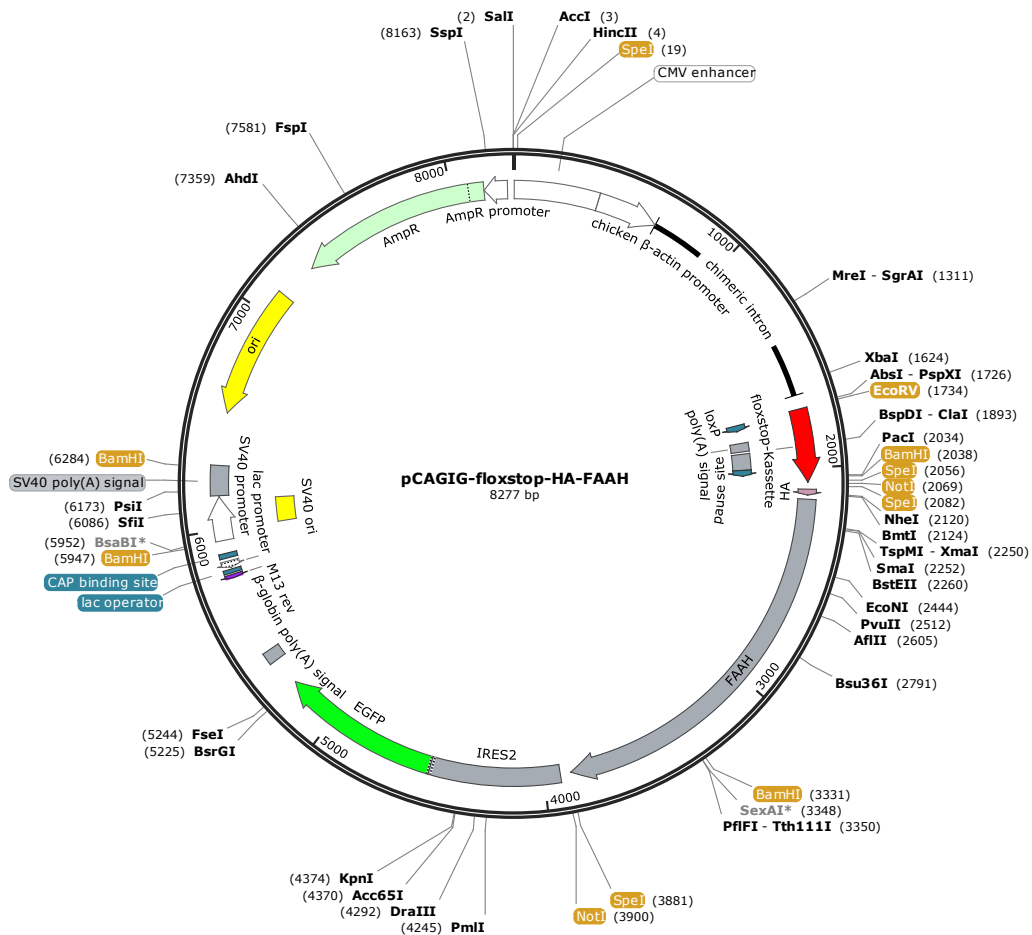


Abbildung 4.1-9: Schematische Darstellung von pCAGIG-floxstop-HA-FAAH. Hervorgehoben sind sowohl die relevanten Restriktionsstellen der Ursprungsplasmide als auch die zur Identifikation der korrekten Orientierung der floxstop-Kassette verwendeten SpeI-Sequenzen. Die Ligation der floxstop-Kassette erfolgte in die EcoRV-Restriktionsstelle bei 1734 bp.

Bei der Minipräparation und dem darauffolgenden Restriktionsverdau mit SpeI zeigten sich 11 von 20 Kolonien mit der aufgenommenen floxstop-Kassette in korrekter Orientierung (resultierende Restriktionsfragmente: 4415 bp / 2037 bp; 1799 bp; 26 bp). Eine in Auftrag gegebene Sequenzierung bestätigte die korrekte Sequenz.

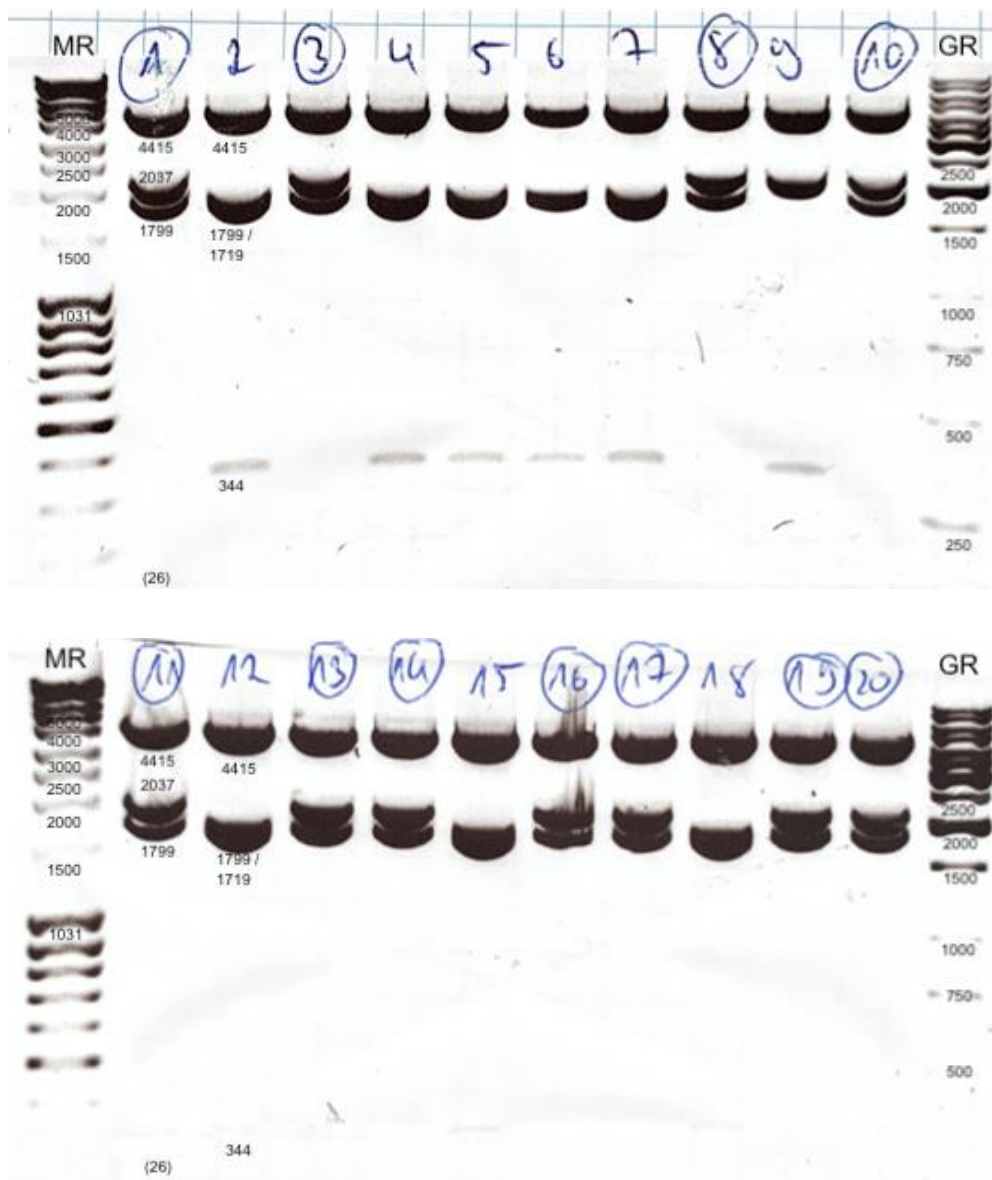


Abbildung 4.1-10: pCAGIG-floxstop-HA-FAAH. SpeI-Testverdau der Ligationsansätze der floxstop-Kassette aus pBSK-floxed-stop in pCAGIG-HA-FAAH. Klone mit dem gewünschten Produkt sind umkreist. Klone mit Restriktionsfragmenten von 4415 bp, 2037 bp, 1799 bp und 26 bp (letzteres auf der Abbildung schwer erkennbar) haben das Konstrukt in der korrekten Orientierung aufgenommen. MR: MassRuler DNA Ladder Mix; GR: GeneRuler 1kb DNA Ladder.

4.2 Ergebnisse der Arbeiten in Zellkultur

4.2.1 Transfektion von Zellen durch Lipofektion

Die generierten Plasmide wurden in Zellen der Zelllinie N2a getestet. Hierzu wurde die Methode der Lipofektion unter Verwendung des Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) angewandt.

Als Referenzplasmid wurde der Zielvektor pCAGIG ohne Modifikationen verwendet, der als Positivkontrolle diente. Außerdem wurde der konstitutiv aktive Vektor pCAGIG-HA-FAAH getestet. Da beide Vektoren über ein für GFP kodierendes Gen verfügten, war bei einer erfolgreichen Transfektion und anschließenden Synthese der Genprodukte unter UV-Licht eine grüne Fluoreszenz zu erwarten. Das mit einer floxstop-Kassette versehene pCAGIG-floxstop-HA-FAAH-Plasmid wurde sowohl einzeln als auch mit Cotransfektion eines für die Cre-Rekombinase kodierenden Plasmids getestet. Bei der einzelnen Transfektion war keine grüne Fluoreszenz zu erwarten, da die floxstop-Sequenz zu einem Abbruch der Transkription führen sollte. Bei Cotransfektion mit einem für die Cre-Rekombinase kodierenden Plasmid sollte die Stop-Sequenz jedoch entfernt und die Genprodukte von pCAGIG-floxstop-HA-FAAH exprimiert werden, weshalb hierbei ebenfalls eine grüne Fluoreszenz zu erwarten war. Außerdem verfügte das cotransfizierte Cre-Plasmid selbst über ein Gen für mCherry, das unter UV-Licht zu einer roten Fluoreszenz führt. Im Idealfall sollte also Grün- (FAAH)- und Rot- (Cre)- Färbung überlappend detektiert werden können.

4.2.2 Nachweis der Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie

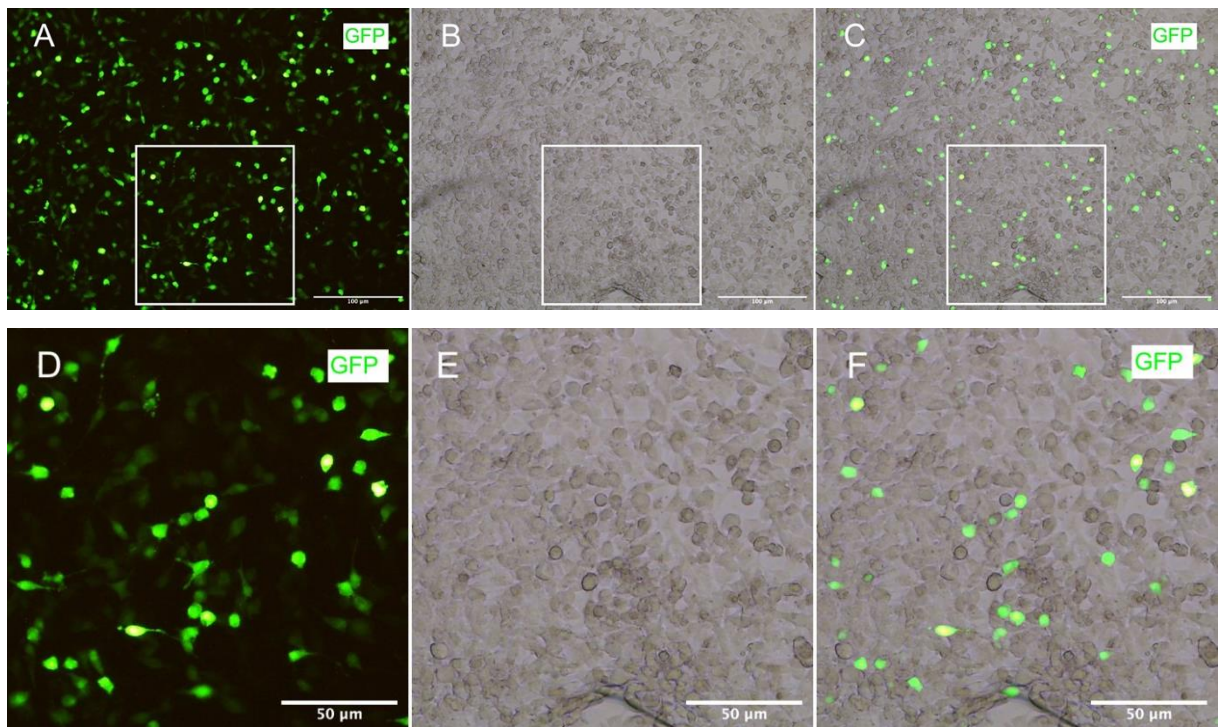


Abbildung 4.2-1: Test von pCAGIG. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von mit pCAGIG transfizierten Zellen. Die grün fluoreszierenden Zellen haben das Plasmid aufgenommen und das Genprodukt GFP synthetisiert. **A:** Nachweis von GFP als Zeichen der erfolgreichen Transfektion. **B:** Auflichtmikroskopische Darstellung der Zellen. **C:** Korrelation von auflicht- und fluoreszenzmikroskopischer Darstellung. **D, E, F:** Ausschnittsvergrößerungen von **A, B, C**. Skalierungsbalken in **A, B, C:** 100 µm; in **D, E, F:** 50 µm.

Alle fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden 20 h nach Transfektion angefertigt. Bei der Transfektion der Zellen mit pCAGIG zeigte sich erwartungsgemäß eine deutliche Fluoreszenz als Zeichen einer erfolgreichen Transfektion.

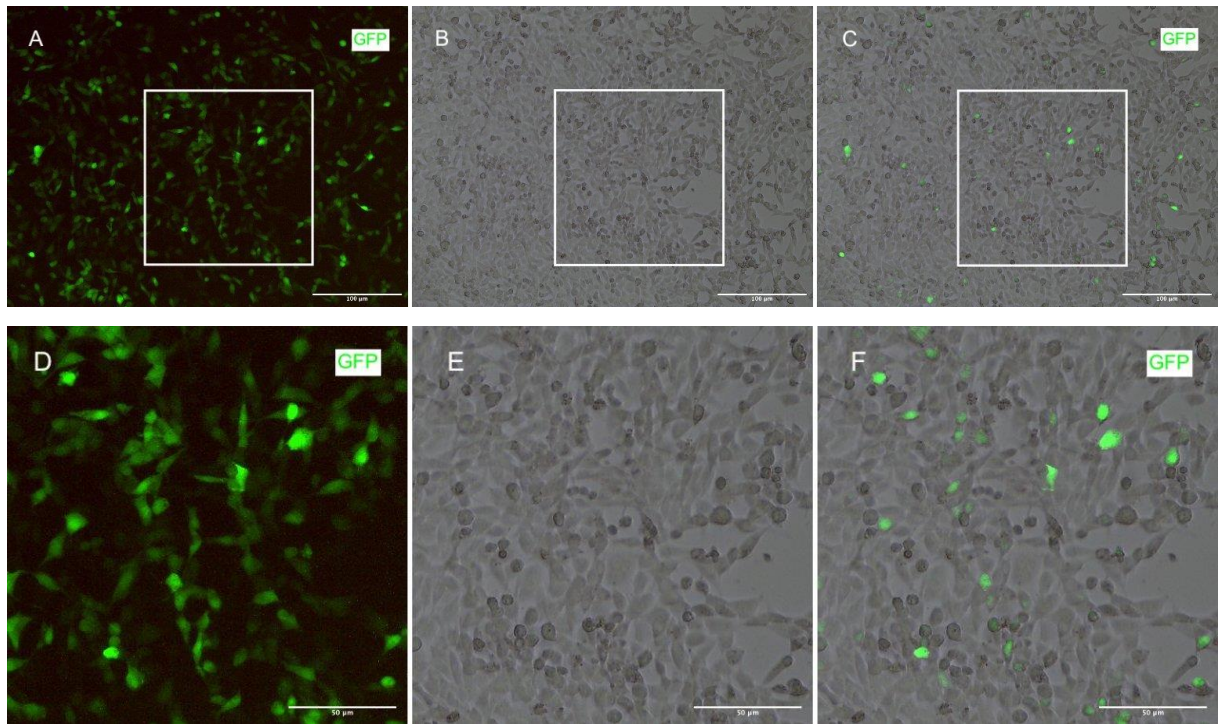
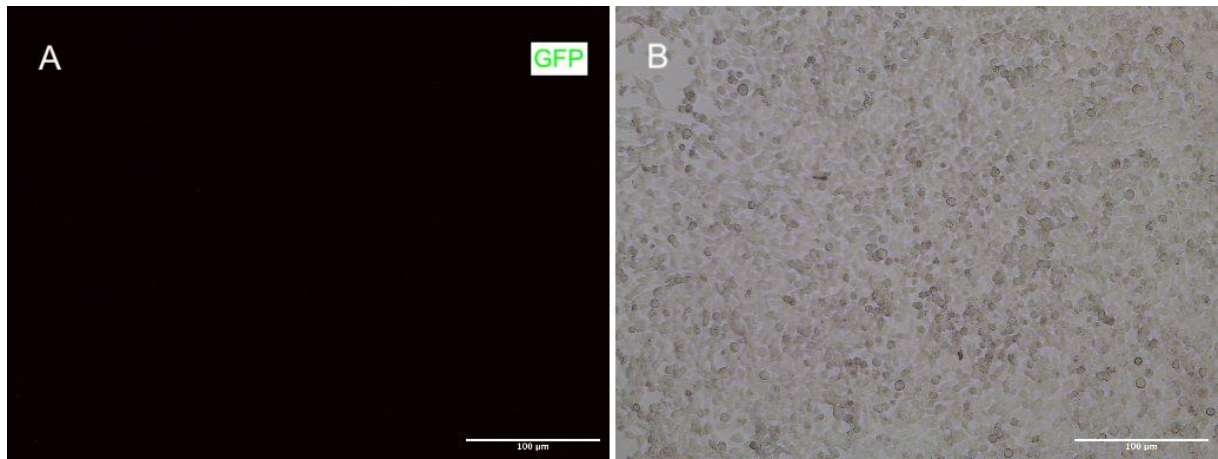


Abbildung 4.2-2: Test von pCAGIG-HA-FAAH. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von mit pCAGIG-HA-FAAH transfizierten Zellen. Die grün fluoreszierenden Zellen haben das Plasmid aufgenommen und das Genprodukt GFP synthetisiert. **A:** Nachweis von GFP als Zeichen der erfolgreichen Transfektion. **B:** Auflichtmikroskopische Darstellung der Zellen. **C:** Korrelation von auflicht- und fluoreszenzmikroskopischer Darstellung. **D, E, F:** Ausschnittsvergrößerungen von **A, B, C**. Skalierungsbalken in **A, B, C:** 100 µm; in **D, E, F:** 50 µm.

Bei der Transfektion von Zellen mit pCAGIG-HA-FAAH zeigte sich ebenfalls eine deutliche grüne Fluoreszenz als Nachweis einer erfolgreichen Transfektion. Da die HA-FAAH-Sequenz in 5'-Richtung des EGFP-Gens eingefügt wurde, war ebenfalls von einer erfolgten Expression von FAAH auszugehen; der Nachweis wurde im Anschluss mithilfe eines Western Blots erbracht.



*Abbildung 4.2-3: Test von pCAGIG-floxstop-HA-FAAH. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von mit pCAGIG-floxstop-HA-FAAH transfizierten Zellen. Als Korrelat einer intakten floxstop-Kassette war keine Fluoreszenz nachweisbar, da die Translation durch die Stop-Sequenz terminiert wurde. **A:** Fehlende grüne Fluoreszenz bei nicht exprimiertem Genprodukt. **B:** Auflichtmikroskopische Darstellung der Zellen. Skalierungsbalken in **A, B:** 100 µm.*

Beim Test von pCAGIG-floxstop-HA-FAAH zeigte sich als Korrelat einer intakten floxstop-Kassette in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse keine grüne Fluoreszenz (siehe Abb. 4.2-3). Die Expression der Genprodukte des Vektors wurde in Abwesenheit einer aktiven Cre-Rekombinase effektiv terminiert.

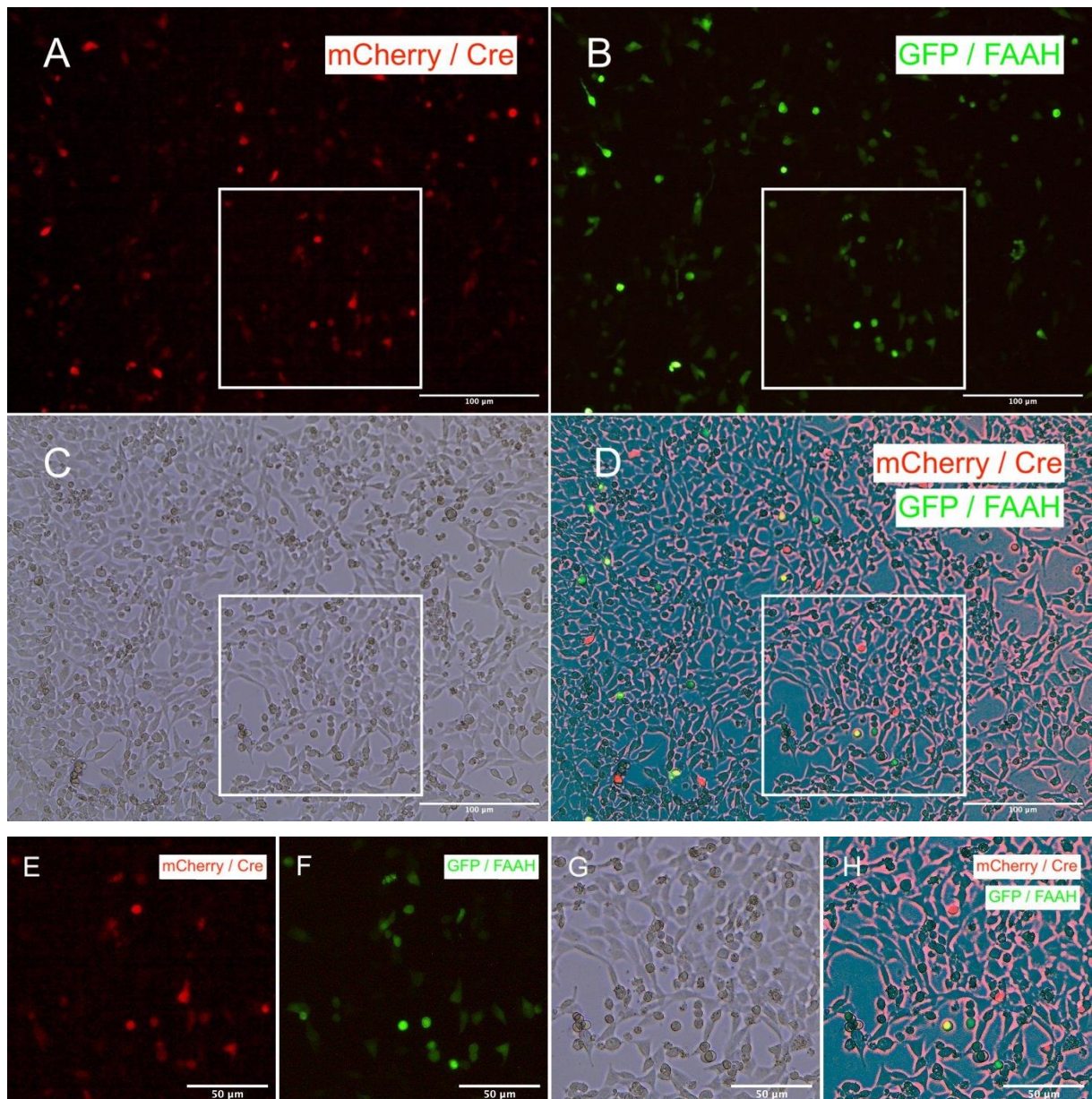


Abbildung 4.2-4: Test von pCAGIG-floxstop-HA-FAAH und einem Cre-Plasmid. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von mit pCAGIG-floxstop-HA-FAAH sowie mit einem Cre-Plasmid (pAM-Syn-HA-NLS-Cre-2A-mCherry-WPRE2-SpA) transfizierten Zellen. Die rot fluoreszierenden Zellen haben das Cre-Plasmid aufgenommen und mCherry synthetisiert. Die grün fluoreszierenden Zellen haben pCAGIG-floxstop-HA-FAAH und das Cre-Plasmid aufgenommen; die durch das Cre-Plasmid exprimierte Cre-Rekombinase hat den floxed stop aus pCAGIG-floxstop-HA-FAAH entfernt und das Genprodukt GFP konnte als Hinweis auf eine Expression von FAAH synthetisiert werden. **A:** Nachweis von mCherry als Zeichen der erfolgreichen Transfektion mit dem Cre-exprimierenden Plasmid. **B:** Nachweis von GFP als Korrelat der erfolgreichen Synthese der Genprodukte von pCAGIG-floxstop-HA-FAAH. **C:** Auflichtmikroskopische Darstellung der Zellen. **D:** Korrelation von auflicht- und fluoreszenzmikroskopischer Darstellung. **E, F, G, H:** Ausschnittsvergrößerungen von **A, B, C, D**. Skalierungsbalken in **A - D:** 100 µm; in **E - H:** 50 µm.

Bei der gemeinsamen Transfektion von Zellen mit pCAGIG-floxstop-HA-FAAH mit einem Cre-Plasmid (pAM-Syn-HA-NLS-Cre-2A-mCherry-WPRE2-SpA) zeigte sich sowohl eine rote Fluoreszenz als Nachweis der erfolgreichen Transfektion mit dem Cre-Plasmid als auch eine grüne Fluoreszenz, welche darauf hindeutete, dass die floxstop-Kassette von der aktiven Cre-Rekombinase exzidiert und somit die

Translation von pCAGIG-floxstop-HA-FAAH nicht mehr terminiert wurde. Als Bestätigung der Funktion der floxstop-Kassette zeigte sich eine grüne Fluoreszenz lediglich in Zellen, die auch rot fluoreszierten, was darauf hinwies, dass die Translation in Zellen ohne aktive Cre-Rekombinase weiterhin terminiert wurde.

4.2.3 Nachweis von FAAH mittels Western Blot

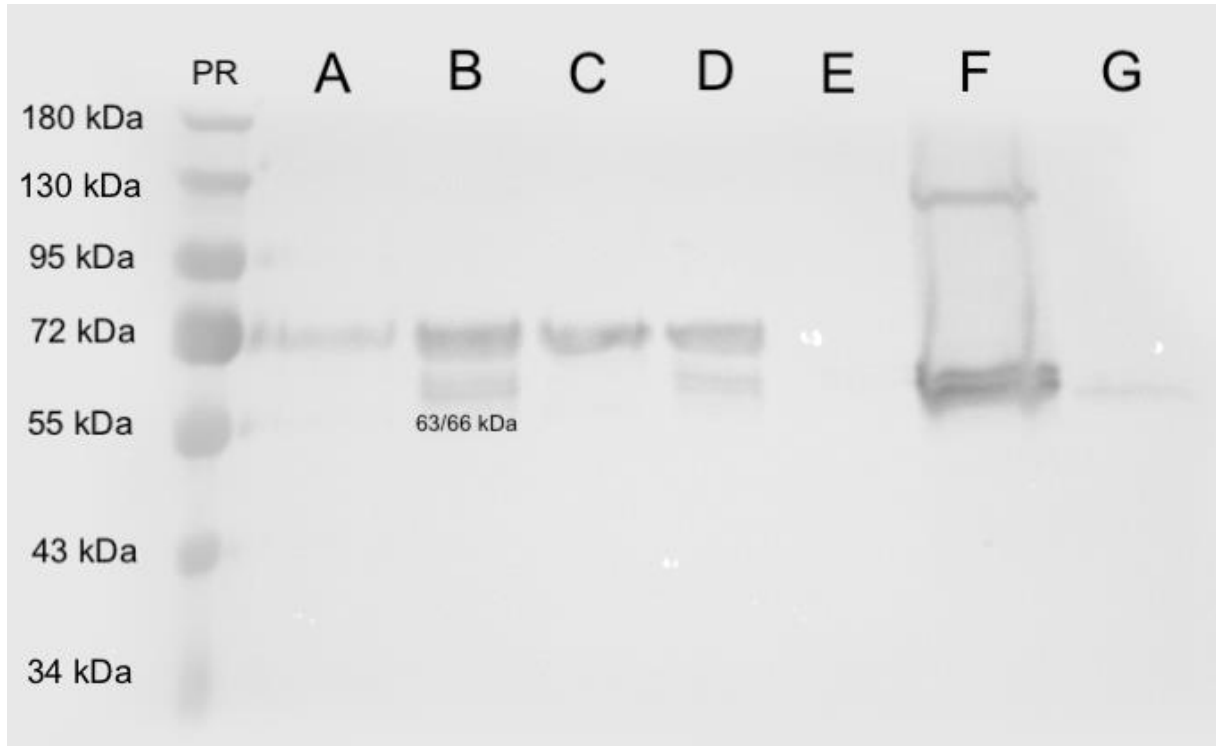


Abbildung 4.2-5: Nachweis von FAAH mittels Western Blot. SDS-PAGE von Zelllysaten zum Nachweis von FAAH. **A-D**: Lysate der Zellkulturexperimente mit N2a nach Transfektion mit den zu untersuchenden Plasmiden. **E-G**: Kontrollproben mit Lysaten aus Maushippocampi mit FAAH-Knockout, -Überexpression oder -Wildtyp. **PR**: PageRuler Prestained Protein Ladder (Molekulargewichtsmarker); **A**: pCAGIG; **B**: pCAGIG-HA-FAAH; **C**: pCAGIG-floxstop-HA-FAAH; **D**: pCAGIG-floxstop-HA-FAAH + pAM-Syn-HA-NLS-Cre-2A-mCherry-WPRE2-SpA; **E**: FAAH Knockout (Negativkontrolle); **F**: FAAH Überexpression (Positivkontrolle); **G**: FAAH Wildtyp (Positivkontrolle). Resultierende Bande bei FAAH-Expression: 63/66 kDa. Die unspezifische Bande bei 72 kDa in den Spuren **A-D** ist ein bekanntes, fakultativ auftretendes Phänomen des FAAH-Antikörpers.

Um die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zu bestätigen, wurde eine SDS-PAGE der Zelllysate und anschließend ein Western Blot durchgeführt. Hierbei wurde mit einem FAAH-spezifischen Antikörper die Expression von FAAH nachgewiesen. Es zeigte sich erwartungsgemäß in Zellen, die lediglich mit dem Zielvektor pCAGIG transfiziert wurden, keine FAAH-spezifische Bande bei

63/66 kDa³³; ebenso bei der alleinigen Transfektion mit pCAGIG-floxstop-HA-FAAH (Abb. 4.2-5, Spur C) sowie in Hippocampus-Lysaten von Mäusen mit einem Knockout für FAAH (Spur E). Die entsprechende Bande konnte sowohl bei mit pCAGIG-HA-FAAH transfizierten Zellen als auch bei mit pCAGIG-floxstop-HA-FAAH und einem Cre-Plasmid cotransfizierten Zellen (Spuren B und D) sowie in den Positivkontrollen mit Hippocampuslysaten von Tieren mit FAAH-Überexpression und -Wildtyp (Spuren F respektive G) nachgewiesen werden.

4.3 Ergebnisse der tierexperimentellen Arbeiten

4.3.1 Transfektion von Gewebe mit pCAGIG mithilfe der *in utero*-Elektroporation

Da der eukaryotische Transfektionsvektor *pCAGIG* als Grundgerüst für die in dieser Arbeit entwickelten Plasmide diente, wurden die *in utero*-Elektroporationen mit diesem Vektor durchgeführt. Mit dieser Methode war die Transfektion von verschiedenen Cortexarealen möglich.

4.3.2 Einflussgrößen der Transfektionseffizienz

Es zeigte sich, dass die benötigte Gesamtzeit des Eingriffs einen wichtigen Einflussfaktor für das Überleben der transfizierten Embryonen darstellte. Es ist anzunehmen, dass, im Einklang mit bisher unveröffentlichten Daten, eine Gesamtzeit von 30 Minuten nicht überschritten werden sollte, da eine längere Eingriffsdauer mit einer deutlich erhöhten Letalität von Embryonen und adulten Tieren einherzugehen schien. Darüber hinaus wurde deutlich, dass für eine effiziente Elektroporation ein leichter Druck der Elektroporationselektroden auf den Schädel nötig war. Da die zur Injektion verwendeten Kapillaren an der Spitze sehr fein zuliefen, war ein zügiges Arbeiten auch deshalb von Interesse, da die hochkonzentrierte DNA-Lösung (circa 5 µg/µl) zur Okklusion der Kapillarenspitze neigte.

³³ Das FAAH-Protein hat ein Molekulargewicht von 63 kDa; die resultierende Bande bei FAAH-Expression liegt hier jedoch bei 66 kDa, da es in den zu untersuchenden Plasmiden als Fusionsprotein mit einem N-terminal gelegenen HA-Tag synthetisiert wird, welches selbst ein Molekulargewicht von 3 kDa aufweist.

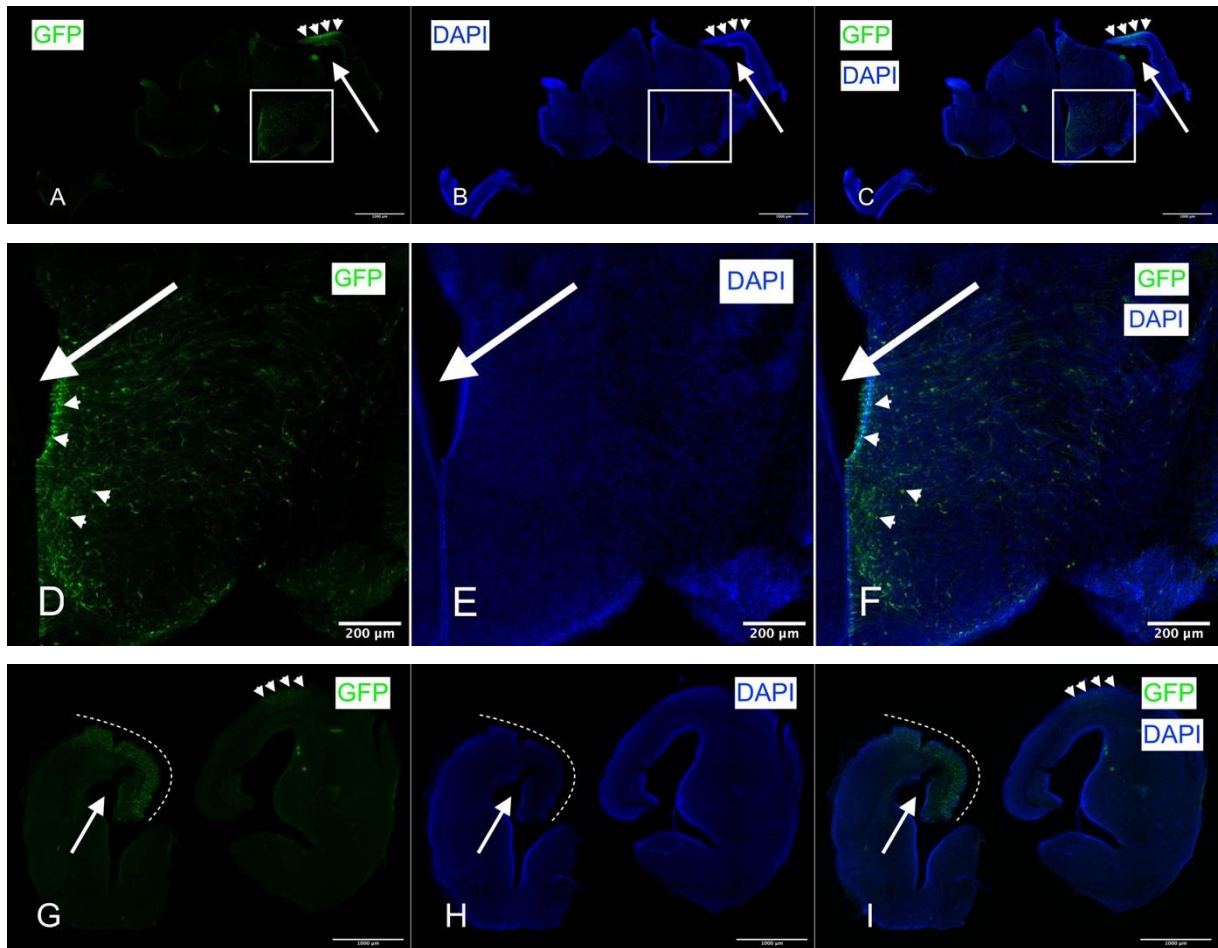


Abbildung 4.3-1: Elektroporation unerwünschter Gehirnareale. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von mit pCAGIG transfiziertem Hirngewebe. Die grün fluoreszierenden Strukturen gehören zu Zellen, die pCAGIG aufgenommen und das Genprodukt GFP synthetisiert haben. **A, B, C:** Durch zu schnelle Applikation der DNA-Lösung ist es zur Verteilung im Ventrikelsystem gekommen. DNA-Lösung im dritten Ventrikel hat zu einer unerwünschten Transfektion subpallialer Areale geführt. Pfeile: Seitenventrikel, hier wurde die DNA-Lösung ursprünglich injiziert. Kleine Pfeilspitzen: Gewünschtes Elektroporationsareal. **D, E, F:** Ausschnittsvergrößerungen von **A, B,** und **C** im Bereich des Subpalliums. Pfeil: 3. Ventrikel. Pfeilspitzen: Exemplarisch einzelne unerwünscht transfizierte Zellen. **G, H, I:** Durch Verteilung von DNA-Lösung wurden kontralaterale Gehirnareale transfiziert. Pfeile: Seitenventrikel der geplant transfizierten Hemisphäre. Gestrichelte Linie: Gewünschtes Elektroporationsareal. Kleine Pfeilspitzen: Unerwünscht transfizierte Zellen der kontralateralen Hemisphäre. Skalierungsbalken in **A - C** und **G - I:** 1000 μm ; in **D - F:** 200 μm .

Bei Okklusion und dem damit erforderlichen höheren Druck zur Applikation der DNA-Lösung kam es teilweise zu einer zu schnellen Injektion der Lösung, wodurch sich diese vom Seitenventrikel in andere Bereiche des Ventrikelsystems verteilen konnte und es im Anschluss zu einer unerwünschten Elektroporation anderer, auch kontralateraler Gehirnareale kam.

4.3.3 Geeignete Aufbereitungsmethoden für durch Elektroporation transfiziertes Gewebe

Die Fixierung von Gewebeschnitten gelang am besten, indem die transfizierten embryonalen Gehirne nach Dekapitation sofort präpariert und dann in vorgekühlte Paraformaldehydlösung gegeben wurden. Zur Aufbereitung von Gewebeschnitten eigneten sich nach Fixierung in Paraformaldehyd aufgrund der geringen Größe der untersuchten Strukturen am besten vergleichsweise dicke Gewebeschnitte. Eine Schnittdicke von 80 µm erwies sich als optimaler Kompromiss aus gutem Handling und geringem Beschädigungsrisiko im Verlauf der immunhistochemischen Behandlung einerseits und guter Abgrenzbarkeit einzelner Strukturen in der nichtkonfokalen Fluoreszenzmikroskopie.

4.4 Ergebnisse der immunhistochemischen Arbeiten

4.4.1 Nachweis der GFP-Expression in corticalen Neuronen

Zur Identifikation elektroporierter Areale wurde das Markerprotein GFP nachgewiesen. Dies geschah anhand des nativen GFP-Signals sowie mithilfe eines immunhistochemischen Nachweises.

4.4.1.1 Bedeutung der Immunhistochemie bei der Identifikation transfizierter Zellen

Zur Untersuchung der Bedeutung des immunhistochemischen Nachweises von GFP zur Identifikation elektroporierter Areale wurde die Intensität des nativen GFP-Signals elektroporierter Zellen mit dem Signal eines gegen GFP gerichteten Antikörpers verglichen. Da eine immunhistochemische Analyse zwei zusätzliche Tage in Anspruch nimmt, war der Nutzen dieser Aufarbeitung gegenüber einer direkten fluoreszenzmikroskopischen Analyse von Interesse. Hierzu wurde ein GFP-Antikörper mit einem Sekundärantikörper inkubiert, der einen roten Fluoreszenzfarbstoff trug. Es zeigte sich sowohl eine deutliche Signalverstärkung in Arealen, in denen eine Transfektion durch das native GFP nachweisbar war, als auch eine Signalanreicherung in Bereichen, in denen sich kein natives GFP Signal zeigte.

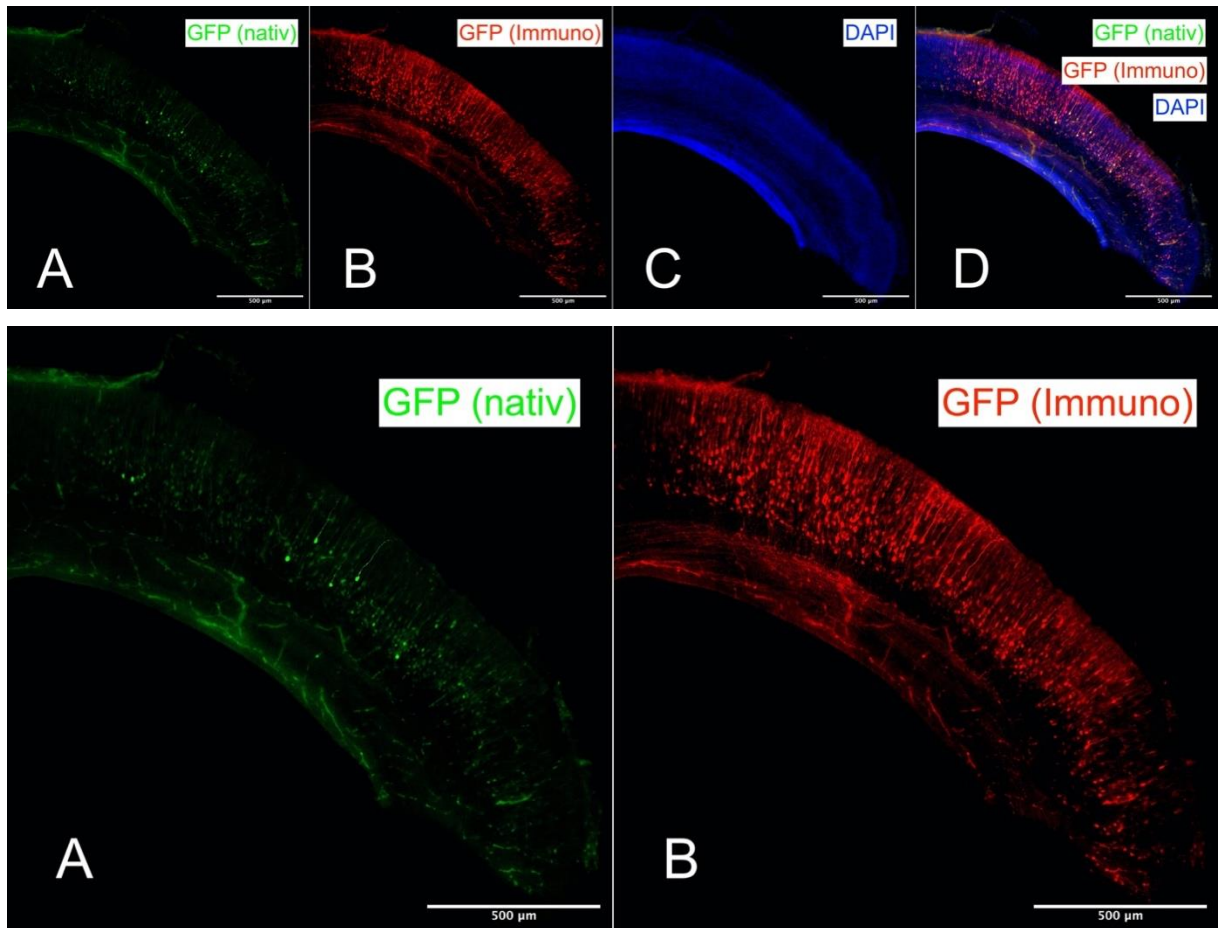


Abbildung 4.4-1: Immunhistochemischer und direkter Nachweis von GFP. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von mit pCAGIG transfiziertem Hirngewebe. Die grün fluoreszierenden Strukturen gehören zu Zellen, die pCAGIG aufgenommen und das Genprodukt GFP synthetisiert haben, welches noch vollständig intakt ist und fluoresziert. In den rot gefärbten Arealen hat der anti-GFP Antikörper gebunden. Hier ist GFP nachweisbar und vorhanden, scheint aber seine Funktionalität verloren zu haben. **A:** Nachweis des nativen GFP-Signals; **B:** Immunhistochemischer Nachweis von GFP; **C:** Zellkernfärbung mit DAPI; **D:** Korrelation von nativem und immunhistochemischem GFP-Nachweis sowie der Zellkernanfärbung. Skalierungsbalken in **A - D:** 500 µm.

Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist wohl vor allem in einer teilweisen Expression von GFP unterhalb der Nachweisgrenze zu sehen, was durch die mittels Zweitantikörper verstärkende Immunhistochemie behoben werden kann, eventuell könnte auch ein Wirkverlust des GFP im Prozess der Denaturierung durch Paraformaldehyd beteiligt sein, bei dem unter Umständen die Molekülstruktur des GFP derart verändert wird, dass das Molekül keine Fluoreszenz mehr zeigt, das Epitop des entsprechenden Antikörpers jedoch weiterhin intakt ist. Eine alleinige Analyse anhand des nativen GFP-Signals scheint für diese Art von Untersuchung jedenfalls nicht ausreichend zu sein.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die beiden Plasmide pCAGIG-HA-FAAH und pCAGIG-floxstop-HA-FAAH generiert, die eine Überexpression von FAAH in eukaryotischen Zellen ermöglichen. Sie sollen dazu dienen, die Auswirkungen einer erniedrigten AEA-Konzentration während der Embryonalperiode auf die Entwicklung des Neokortex zu untersuchen, um als Teil der Grundlagenforschung die Vorgänge im Rahmen dieses Prozesses besser verstehen zu können und somit vielleicht auch Rückschlüsse auf Erkrankungen des Menschen und deren Behandlung ziehen zu können

Dass es zwischen der Maus und anderen Spezies wie dem Menschen wichtige Unterschiede in Bezug auf bestimmte Eigenschaften des Neocortex geben muss, wird allein durch die offenkundige Divergenz in Bezug auf die kognitiven Fähigkeiten der Spezies deutlich (Rakic, 2009). Dennoch eignet sich die Maus nach wie vor auch speziesübergreifend als Modell zur Erforschung des Neocortex, nicht nur aufgrund praktischer Aspekte wie kurzer Generationszeit und guter Verfügbarkeit sondern auch in Bezug auf die große Übereinstimmung zwischen den Spezies im grundlegenden strukturellen Aufbau sowie der bisher bekannten beteiligten Prozesse im Rahmen der Corticogenese und im adulten Gehirn (Pinson et al., 2019).

Obwohl schon einiges über die Beteiligung des Endocannabinoidsystems an der Entstehung des Gehirns im Allgemeinen und des Neocortex im Speziellen bekannt ist, wurden die Auswirkungen einer Überexpression von FAAH und der damit einhergehenden Erniedrigung des AEA-Spiegels in embryonalem Gewebe bisher lediglich in Zellkultur erforscht, wobei dargelegt werden konnte, dass die Migration von embryonalen Neuronen aus der VZ beziehungsweise SVZ in die oberflächlichen Cortexschichten hierunter stark beeinträchtigt war; eine übermäßige Zugabe von AEA hingegen führte in isolierten Pyramidenzellen im Stadium E 14,5 zu einer deutlichen Elongation des Axons und einer reduzierten Aussprossung von Axonterminalen (Mulder et al., 2008). Diese Ergebnisse stammen aus Experimenten *in vitro*. Da die Prozesse während der Corticogenese allerdings relevant von Umgebungsfaktoren beeinflusst werden und die Gehirnentstehung ein dreidimensionaler Prozess ist, ist die Untersuchung dieser Vorgänge *in vivo* von großem Interesse. Hierzu wäre auch der Einsatz eines viralen Transfektionsvektors denkbar gewesen, was sich jedoch aufgrund der Zeitdauer von Transfektion bis Expression *des gene of interest* von ungefähr 2 Wochen als nicht praktikabel erwies (Teifel, 2012). Daher wurde ein nicht-

viraler eukaryotischer Expressionsvektor auf Basis des pCAGIG-Vektors (Matsuda und Cepko, 2004) kreiert, der mit einem starken Promotor, einer IRES sowie GFP als Reporter gen ausgestattet ist und sich zur Transfektion von Gewebe durch *in utero*-Elektroporation eignet.

Es handelt sich bei der *in utero*-Elektroporation um eine Technik, bei der Manipulationen an Embryonen zu einem beliebigen Zeitpunkt vorgenommen werden können, und die darauffolgende Entwicklung *in vivo* bis zu einem beliebigen Zeitpunkt beobachtet werden kann (Wang und Mei, 2013). Dies bietet gegenüber anderen Techniken wie dem Generieren einer Mauslinie mit genetischen Veränderungen den Vorteil, dass die betreffenden Veränderungen nicht ab Geburt bestehen. Im Rahmen der *in utero*-Elektroporation findet allerdings lediglich eine transiente Transfektion statt. Da diese in mitotisch hoch aktivem Gewebe stattfindet, kommt es mit jeder Zellteilung zu einem weiteren allmählichen Absinken der Plasmidkonzentration in den transfizierten Zellen. Der Zeitraum, in dem die durch das Plasmid hervorgerufenen Veränderungen nachweisbar sind, ist daher schwer abschätzbar und auch von der initialen Transfektionseffizienz und DNA-Konzentration abhängig. Das macht eine Einschätzung des möglichen Beobachtungszeitraumes von Transfektion bis Auswertung schwierig.

5.1 pCAGIG-HA-FAAH – Ein eukaryotischer Transfektionsvektor zur Überexpression von FAAH

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein eukaryotischer Expressionsvektor generiert, der mithilfe des konstitutiv aktiven CAG-Promotors zu einer kontinuierlichen Überexpression von FAAH in transfizierten Zellen führt. Das *gene of interest* FAAH wurde in Form einer für das Fusionsprotein HA-FAAH kodierenden Sequenz aus einem zuvor hergestellten viralen Transfektionsvektor übernommen (Zimmermann et al., 2019), was aufgrund des N-terminal gelegenen HA-tags eine einfache immunhistochemische Nachweisbarkeit sowie eine Abgrenzung von endogenem FAAH ermöglicht (Zimmermann et al., 2019). Somit ergeben sich gleich mehrere Optionen, eine erfolgreiche Transfektion mit dem kreierten Vektor im Zielgewebe nachzuweisen: Es existieren Antikörper gegen GFP, HA sowie FAAH; außerdem kann auch fluoreszenzmikroskopisch GFP nativ im Gewebe nachgewiesen werden – auch wenn in dieser Arbeit bewiesen wurde, dass ein fluoreszenzmikroskopischer Nachweis

von nativem GFP zumindest nach Gewebefixierung mit Paraformaldehyd nicht als verlässlich angesehen werden kann und ein immunhistochemischer Nachweis vorzuziehen ist.

Die Tatsache, dass in dem kreierte Vektor HA-FAAH in 5'-Richtung der IRES liegt, ließ Zweifel aufkommen, ob ein Nachweis von GFP sicher auch auf die erfolgreiche Expression von FAAH schließen lässt. Es konnte jedoch in Zelllysaten mit fluoreszenzmikroskopischem GFP-Nachweis auch mittels Western Blot FAAH-Protein nachgewiesen werden.

Eine Limitation des Vektors pCAGIG-HA-FAAH ist seine fehlende Zelltypspezifität: Da es sich um einen eukaryotischen Transfektionsvektor mit dem konstitutiv aktiven CAG-Promotor handelt, beginnt nach der Aufnahme der Plasmid-DNA im Rahmen der Elektroporation jede transfizierte Zelle, FAAH zu synthetisieren. Hiervon sind alle Zellen betroffen, die während der Elektroporation im Bereich des elektrischen Feldes lagen, auch solche, die FAAH natürlicherweise gar nicht exprimieren. Das kann ein Vorteil sein, da hierdurch unter Umständen im elektroporierten Areal sehr niedrige AEA-Spiegel resultieren mit möglicherweise deutlicheren Auswirkungen auf die untersuchten Parameter. Allerdings baut FAAH nicht nur AEA ab und der Einfluss der übrigen Substrate der FAAH auf den Zellstoffwechsel ist teilweise noch nicht erforscht.

5.2 pCAGIG-floxstop-HA-FAAH – Zelltypspezifische Überexpression von FAAH

Eine Möglichkeit zur zelltypspezifischen Überexpression bietet das zweite kreierte Plasmid pCAGIG-floxstop-HA-FAAH, das mit einem *floxed stop* versehen ist, was eine Expression von HA-FAAH sowie GFP ausschließlich in Zellen mit Cre-Rekombinase-Aktivität ermöglicht (Dragatsis und Zeitlin, 2001). Zwischen dem CAG-Promotor und dem für das Fusionsprotein HA-FAAH kodierenden DNA-Abschnitt wurde eine Terminierungssequenz aus dem Plasmid pBSK-floxed stop eingesetzt, die aus zwei *loxP-sites* in gleicher Orientierung bestehen, zwischen denen sich ein Poly(A)-Signal sowie eine *pause site* befinden. Diese letzten beiden Elemente werden zusammen als *stop*-Sequenz bezeichnet und führen zu einem Abbruch der Transkription durch die

RNA-Polymerase II³⁴ im Zellkern, wodurch der darauf folgende DNA-Abschnitt nicht in biologisch aktive mRNA transkribiert wird und es somit nicht zur Expression der in 3'-Richtung des Nichtmatrizenstrangs gelegenen Gene HA, FAAH und GFP kommt (Gromak et al., 2006). In einer Zelle mit aktiver Cre-Rekombinase erkennt und schneidet diese jedoch die zwischen den loxP-sites liegende stop-Sequenz zusammen mit einer der beiden loxP-sites aus und ligiert den DNA-Strang, der nun durch die RNA-Polymerase II abgelesen werden kann (Dragatsis und Zeitlin, 2001). Somit kommt es nur in Zellen mit aktiver Cre-Rekombinase nach einer Transfektion mit pCAGIG-floxstop-HA-FAAH zu einer Expression von FAAH.

Tatsächlich konnte in Zellkultur bewiesen werden, dass mit pCAGIG-floxstop-HA-FAAH transfizierte Zellen ausschließlich in Anwesenheit einer funktionell aktiven Cre-Rekombinase HA-FAAH exprimieren, was beweist, dass mit diesem Vektor eine zelltypspezifische Expression möglich ist.

In der Vergangenheit wurde eine zelltypspezifische FAAH-Expression bereits in glutamatergen Neuronen des adulten Hippocampus durchgeführt, wobei sich in elektrophysiologischen Untersuchungen interessante Auswirkungen auf die synaptische Plastizität, wie eine verstärkte Langzeitpotenzierung, und eine insgesamt erhöhte exzitatorische und inhibitorische synaptische Aktivität bei unveränderter kurzfristiger synaptischer Plastizität (DSE und DSI) und Langzeit-Depression zeigten (Zimmermann et al., 2019). In Verhaltensstudien spiegelten sich diese Veränderungen in einem verstärkten Angstverhalten sowie Defiziten in der Objekterkennung verantwortlichen Gedächtnis und der Auslöschung aversiver Gedächtnisinhalte wider (Zimmermann et al., 2019).

Während diese Untersuchungen Veränderungen an adulten Synapsen studierten, wäre es für die Zukunft interessant zu erfahren, welche Auswirkungen eine FAAH-Überexpression in der Entwicklung und Differenzierung von Neuronen vor Etablierung der Synapse und im Verlauf der Synaptogenese hat.

³⁴ Genauer: Den DNA-abhängigen RNA-Polymerase II-Kernkomplex

5.3 Geeignete Techniken zur Aufbereitung von *in utero*-elektroporierten Gehirnen

Zur Aufbereitung von Gewebeschnitten nach Transfektion wurden verschiedene Aufbereitungsverfahren getestet. Eine Fixierung des gesamten Schädels mit Präparation des Gehirns nach erfolgter Fixierung lieferte unbefriedigende Ergebnisse, da sich die Gewebeschichten schlechter voneinander lösen ließen und es teilweise zur Fixierung von Abdrücken der Schädelknochen auf der Gehirnoberfläche kam, somit ist eine Fixierung nach vollständiger Präparation der Gehirne zu empfehlen.

Bezüglich einer empfehlenswerten Schnittdicke der Gewebeschnitte stellte sich ein Optimum von 80 μm heraus. Eine Schnittdicke von unter 50 μm führte oft zu Beschädigungen während der immunhistochemischen Färbeschritte, während eine Schnittdicke über 100 μm die Auswertung mit nichtkonfokaler Mikroskopie erschwerte. Die oftmals zur Auswertung von elektroporierem embryonalem Gewebe verwendeten Vibratomschnitte von in Agarose eingebettetem Gewebe wurden in dieser Arbeit nicht untersucht.

In einem Vergleich zwischen dem Nachweis des nativen GFP-Signals und einem immunhistochemischen Nachweis von GFP in transfizierten Zellen zeigte sich, dass ein Großteil des noch immunhistochemisch nachweisbaren GFP keine Eigenfluoreszenz mehr zeigte. Dies lässt darauf schließen, dass die Eigenfluoreszenz von GFP zur Identifikation transfizierter Zellen nicht ausreicht und ein immunhistochemischer Nachweis vorzuziehen ist. Eine mögliche Ursache könnte eine Expression unterhalb der Nachweisgrenze sein, die durch die Sekundärantikörperbindung behoben wird, eventuell auch die Denaturierung des Proteins im Rahmen der Fixierung, die zu einer Konfigurationsänderung führt, die die Fluoreszenzeigenschaften des Proteins ändert, das Epitop des GFP-Antikörpers jedoch intakt lässt.

5.4 Ausblick

Die beiden generierten Vektoren ermöglichen in Zukunft eine Überexpression von FAAH in embryonalem Gewebe; im Falle von pCAGIG-floxstop-HA-FAAH in Abhängigkeit einer aktiven Cre-Rekombinase. Sie eignen sich dazu, die Auswirkungen eines zellspezifisch erniedrigten AEA-Spiegels auf die Gehirnentwicklung zu untersuchen und ein besseres Verständnis vom Einfluss des Endocannabinoidsystems auf die hierbei beteiligten Prozesse zu gewinnen.

Da im Falle von pCAGIG-floxstop-HA-FAAH eine zelltypspezifische Expression möglich ist und FAAH physiologischerweise vor allem in Projektionsneuronen vorkommt (Cravatt et al., 2001, Gulyas et al., 2004, Kathuria et al., 2003), bietet sich hier unter Umständen eine Kombination mit einer passenden Mauslinie, wie zum Beispiel der NEX-Cre-Maus, an, die Cre-Rekombinase spezifisch in glutamatergen Projektionsneuronen exprimiert (Goebbels et al., 2006). Da in Untersuchungen an reifen Synapsen in adulten Hippocampi bereits interessante Auswirkungen einer FAAH-Überexpression nachgewiesen werden konnten (Zimmermann et al., 2019, s. o.), sind neben den Auswirkungen auf die neuronale Proliferation, Migration und Differenzierung zukünftige Untersuchungen vor oder im Rahmen der Synaptogenese von großem Interesse, zu denen die in der vorliegenden Arbeit generierten Vektoren gegebenenfalls einen Beitrag leisten können.

Ebenfalls von großer Bedeutung wäre eine Analyse der Proliferation der Projektionsneuronen *in vivo* bei verminderter AEA-Konzentration durch BrdU-Untersuchungen sowie eine Erforschung von eventuellen Veränderungen der Migration beziehungsweise des korrekten Aufbaus der Abfolge der corticalen Schichten durch Analyse der Expression cortexspezifischer Markerproteine.

In dieser Arbeit wurde FAAH lediglich immunhistochemisch nachgewiesen und seine Nachweisbarkeit rein qualitativ mit der GFP-Expression korreliert. Es wäre für die Zukunft von Relevanz, die Funktionalität des Enzyms mithilfe eines Aktivitätsassays nachzuweisen (Bari et al., 2016).

Zum Schluss stellt sich die Frage, zu welchen Veränderungen im adulten Tier eine Überexpression von FAAH während der Embryonalphase im Verhalten und in der Gehirnanatomie führt und ob und inwiefern Kompensationsmechanismen für diese Veränderungen existieren.

6 Zusammenfassung

Der Neokortex stellt den phylogenetisch jüngsten Teil des Säugergehirns dar (Trepel, 2012: S. 221 ff.) und seine Bildung während der Embryonalperiode ist ein komplex gesteuerter Prozess, der von intrinsischen und extrinsischen Einflussfaktoren abhängig ist (Molyneaux et al., 2007). Im Verlauf der letzten Jahrzehnte wurde mit der Entdeckung des Endocannabinoidsystems auch dessen Bedeutung für die Entwicklung des Gehirns im Allgemeinen und des Neocortex im Speziellen beleuchtet (Maccarrone et al., 2014).

Das Endocannabinoidsystem ist ein retrogrades Neurotransmittersystem, das nahezu im gesamten Gehirn vorhanden ist und aus den Endocannabinoiden, hauptsächlich Anandamid und 2-Arachidonoylglycerol, deren auf- und abbauenden Enzymen und seinen Rezeptoren, dem Cannabinoidrezeptor 1 und dem Cannabinoidrezeptor 2 besteht (Steiner und Lutz, 2006). Während das Endocannabinoidsystem im adulten Gehirn durch Inhibition von exzitatorischen oder inhibitorischen Afferenzen sowohl hemmend als auch stimulierend wirken kann (Piomelli, 2003) und hierdurch für eine neuroexzitatorische Balance sorgt (Kreitzer und Regehr, 2001, Pitler und Alger, 1992), übernimmt es während der Entwicklung des Gehirns in der Embryonalphase viele wichtige Aufgaben, die sich von denen im adulten Gehirn unterscheiden (Maccarrone et al., 2014):

Neben einem Einfluss auf die Zellteilungsrate (Aguado et al., 2005) und die Migration von sich entwickelnden Neuronen (Harkany et al., 2007), wird auch die Ausbildung von Zellfortsätzen und deren Verzweigung durch das Endocannabinoidsystem reguliert (Mulder et al., 2008). Die Auswirkungen von erniedrigten AEA-Spiegeln wurden bisher jedoch lediglich *in vitro* untersucht (Mulder et al., 2008). Da die Corticogenese jedoch ein dreidimensionaler, durch Umgebungsfaktoren beeinflusster Prozess ist, ist die Untersuchung dieser Vorgänge *in vivo* von Relevanz.

In den letzten Jahren hat sich die Technik der *in utero*-Elektroporation zunehmend etabliert und konnte kürzlich für die gut untersuchte Mauslinie C57BL/6 optimiert werden (Baumgart und Grebe, 2015). Mithilfe dieser Technik können Veränderungen an Embryonen *in vivo* vorgenommen werden, indem genetisches Material von außen eingebracht und per Elektroporation in Zellen des Zielgewebes eingeschleust wird (Wang und Mei, 2013, Teifel, 2012). Im Anschluss kann die weitere physiologische Embryonalentwicklung voranschreiten und schließlich können die Auswirkungen der

Veränderungen zu einem beliebigen Zeitpunkt untersucht werden (Sirotnak und Hutchinson, 1959, Li, 2004).

In dieser Arbeit wurden zwei Plasmide konstruiert, die sich für die Verwendung im Rahmen der *in utero*-Elektroporation eignen und zu einer Überexpression des AEA abbauenden Enzyms FAAH (Deutsch et al., 2002) in Zielzellen führen sollten. Als Vorlagevektor diente der etablierte eukaryotische Expressionsvektor pCAGIG, der neben dem starken CAG-Promotor über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) und das Reportergen GFP verfügt (Matsuda und Cepko, 2004). In diesen Vektor wurde die FAAH-Sequenz zusammen mit einem HA-*tag* aus einem viralen Expressionsvektor einkloniert und die ordnungsgemäße Funktion des entstandenen Konstrukts überprüft. Daneben wurde ein zweiter Vektor generiert, der mithilfe eines *floxed stops* eine Cre-Rekombinase-abhängige (Kim et al., 2018) und damit zelltypspezifische Expression von FAAH ermöglichen sollte. Außerdem wurden geeignete Techniken zur Auswertung von transfiziertem Gewebe untersucht.

Mithilfe von Experimenten in Zellkultur konnte die ordnungsgemäße Funktion beider Vektoren durch Fluoreszenzmikroskopie und Proteinnachweismethoden bewiesen werden. Sie können in der Zukunft für die Untersuchung einer erniedrigten AEA-Konzentration auf die Entwicklung des Neocortex verwendet werden. Da physiologischerweise hauptsächlich glutamaterge Projektionsneuronen FAAH exprimieren, wäre für die Zukunft beispielsweise eine Kombination von pCAGIG-floxstop-HA-FAAH mit einer NEX-Cre-Maus von Interesse.

Im Rahmen der Aufbereitung von transfiziertem Gewebe erwies sich eine Schnittdicke der Gefrierschnitte von 80 µm als optimal, während eine Präparation von Gewebe vor Fixierung zu besseren Ergebnissen führte als eine nachträgliche Präparation. Es wurde gezeigt, dass zur Identifikation erfolgreich transfizierter Areale ein immunhistochemischer Nachweis des Reportergens GFP dem reinen fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von nativem GFP vorzuziehen ist. Maßgebliche Einflussfaktoren der Transfektionseffizienz waren die Dauer des Eingriffs, der sichere Kontakt der Elektrodenpinzette zu dem zu elektroporierenden Gewebe und eine vorsichtige Injektion der DNA-Lösung.

7 Literaturverzeichnis

- AGUADO, T., MONORY, K., PALAZUELOS, J., STELLA, N., CRAVATT, B., LUTZ, B., MARSICANO, G., KOKAIA, Z., GUZMAN, M. & GALVE-ROPERH, I. 2005. The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J*, 19, 1704-6.
- AGUADO, T., PALAZUELOS, J., MONORY, K., STELLA, N., CRAVATT, B., LUTZ, B., MARSICANO, G., KOKAIA, Z., GUZMAN, M. & GALVE-ROPERH, I. 2006. The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells. *J Neurosci*, 26, 1551-61.
- ALEXANDER, H. E., KOCH, G., MOUNTAIN, I. M., SPRUNT, K. & VAN DAMME, O. 1958. Infectivity of ribonucleic acid of poliovirus on HeLa cell mono-layers. *Virology*, 5, 172-3.
- ANDERSON, S. A., KAZNOWSKI, C. E., HORN, C., RUBENSTEIN, J. L. & MCCONNELL, S. K. 2002. Distinct origins of neocortical projection neurons and interneurons in vivo. *Cereb Cortex*, 12, 702-9.
- ANGEVINE, J. B., JR. & SIDMAN, R. L. 1961. Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature*, 192, 766-8.
- BARI, M., FEOLE, M. & MACCARRONE, M. 2016. Assay of FAAH Activity. *Methods Mol Biol*, 1412, 131-6.
- BAUMGART, J. & BAUMGART, N. 2016. Cortex-, Hippocampus-, Thalamus-, Hypothalamus-, Lateral Septal Nucleus- and Striatum-specific In Utero Electroporation in the C57BL/6 Mouse. *J Vis Exp*, e53303.
- BAUMGART, J. & GREBE, N. 2015. C57BL/6-specific conditions for efficient in utero electroporation of the central nervous system. *J Neurosci Methods*, 240, 116-24.
- BEGBIE, J., DOHERTY, P. & GRAHAM, A. 2004. Cannabinoid receptor, CB1, expression follows neuronal differentiation in the early chick embryo. *J Anat*, 205, 213-8.
- BIELLE, F., GRIVEAU, A., NARBOUX-NEME, N., VIGNEAU, S., SIGRIST, M., ARBER, S., WASSEF, M. & PIERANI, A. 2005. Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat Neurosci*, 8, 1002-12.
- BISOGNO, T., HOWELL, F., WILLIAMS, G., MINASSI, A., CASCIO, M. G., LIGRESTI, A., MATIAS, I., SCHIANO-MORIELLO, A., PAUL, P., WILLIAMS, E. J., GANGADHARAN, U., HOBBS, C., DI MARZO, V. & DOHERTY, P. 2003. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol*, 163, 463-8.
- BRACEY, M. H., HANSON, M. A., MASUDA, K. R., STEVENS, R. C. & CRAVATT, B. F. 2002. Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling. *Science*, 298, 1793-6.
- BRODMANN, K. 1909. *Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues*, Leipzig, Barth.
- BUNING, H., PERABO, L., COUELLE, O., QUADT-HUMME, S. & HALLEK, M. 2008. Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *J Gene Med*, 10, 717-33.
- CADAS, H., DI TOMASO, E. & PIOMELLI, D. 1997. Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *J Neurosci*, 17, 1226-42.
- CADAS, H., GAILLET, S., BELTRAMO, M., VENANCE, L. & PIOMELLI, D. 1996. Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J Neurosci*, 16, 3934-42.
- CALIGNANO, A., LA RANA, G., GIUFFRIDA, A. & PIOMELLI, D. 1998. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*, 394, 277-81.
- CHANAS-SACRE, G., ROGISTER, B., MOONEN, G. & LEPRINCE, P. 2000. Radial glia phenotype: origin, regulation, and transdifferentiation. *J Neurosci Res*, 61, 357-63.
- CHAVEZ, A. E., CHIU, C. Q. & CASTILLO, P. E. 2010. TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 13, 1511-8.
- CHIN, C. L., TOVCIMAK, A. E., HRADIL, V. P., SEIFERT, T. R., HOLLINGSWORTH, P. R., CHANDRAN, P., ZHU, C. Z., GAUVIN, D., PAI, M., WETTER, J., HSIEH, G. C.,

- HONORE, P., FROST, J. M., DART, M. J., MEYER, M. D., YAO, B. B., COX, B. F. & FOX, G. B. 2008. Differential effects of cannabinoid receptor agonists on regional brain activity using pharmacological MRI. *Br J Pharmacol*, 153, 367-79.
- CONSOLE-BRAM, L., MARCU, J. & ABOOD, M. E. 2012. Cannabinoid receptors: nomenclature and pharmacological principles. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 38, 4-15.
- CRAVATT, B. F., DEMAREST, K., PATRICELLI, M. P., BRACEY, M. H., GIANG, D. K., MARTIN, B. R. & LICHTMAN, A. H. 2001. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 9371-6.
- CRAVATT, B. F., GIANG, D. K., MAYFIELD, S. P., BOGER, D. L., LERNER, R. A. & GILULA, N. B. 1996. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, 384, 83-7.
- DAY, N. L., GOLDSCHMIDT, L. & THOMAS, C. A. 2006. Prenatal marijuana exposure contributes to the prediction of marijuana use at age 14. *Addiction*, 101, 1313-22.
- DAY, N. L., LEECH, S. L. & GOLDSCHMIDT, L. 2011. The effects of prenatal marijuana exposure on delinquent behaviors are mediated by measures of neurocognitive functioning. *Neurotoxicol Teratol*, 33, 129-36.
- DEL RIO, J. A., MARTINEZ, A., AULADELL, C. & SORIANO, E. 2000. Developmental history of the subplate and developing white matter in the murine neocortex. Neuronal organization and relationship with the main afferent systems at embryonic and perinatal stages. *Cereb Cortex*, 10, 784-801.
- DEUTSCH, D. G. 2016. A Personal Retrospective: Elevating Anandamide (AEA) by Targeting Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) and the Fatty Acid Binding Proteins (FABPs). *Front Pharmacol*, 7, 370.
- DEUTSCH, D. G. & CHIN, S. A. 1993. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem Pharmacol*, 46, 791-6.
- DEUTSCH, D. G., UEDA, N. & YAMAMOTO, S. 2002. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 66, 201-10.
- DEVANE, W. A., HANUS, L., BREUER, A., PERTWEE, R. G., STEVENSON, L. A., GRIFFIN, G., GIBSON, D., MANDELBAUM, A., ETINGER, A. & MECOULAM, R. 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258, 1946-9.
- DI MARZO, V., FONTANA, A., CADAS, H., SCHINELLI, S., CIMINO, G., SCHWARTZ, J. C. & PIOMELLI, D. 1994. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372, 686-91.
- DI PASQUALE, E., CHAHINIAN, H., SANCHEZ, P. & FANTINI, J. 2009. The insertion and transport of anandamide in synthetic lipid membranes are both cholesterol-dependent. *PLoS One*, 4, e4989.
- DIAZ-LAVIADA, I. & RUIZ-LLORENTE, L. 2005. Signal transduction activated by cannabinoid receptors. *Mini Rev Med Chem*, 5, 619-30.
- DINH, T. P., FREUND, T. F. & PIOMELLI, D. 2002. A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem Phys Lipids*, 121, 149-58.
- DRAGATIS, I. & ZEITLIN, S. 2001. A method for the generation of conditional gene repair mutations in mice. *Nucleic Acids Res*, 29, E10.
- EGERTOVA, M., CRAVATT, B. F. & ELPHICK, M. R. 2003. Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and cb(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience*, 119, 481-96.
- EGERTOVA, M., GIANG, D. K., CRAVATT, B. F. & ELPHICK, M. R. 1998. A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc Biol Sci*, 265, 2081-5.
- EL MARROUN, H., TIEMEIER, H., STEEGERS, E. A., JADDOE, V. W., HOFMAN, A., VERHULST, F. C., VAN DEN BRINK, W. & HUIZINK, A. C. 2009. Intrauterine cannabis exposure affects fetal growth trajectories: the Generation R Study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 48, 1173-81.

- FALCONER, D. S. 1951. Two new mutants, 'trembler' and 'reeler', with neurological actions in the house mouse (*Mus musculus* L.). *J Genet*, 50, 192-201.
- FAZEKAS DE ST GROTH, S., WEBSTER, R. G. & DATYNER, A. 1963. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim Biophys Acta*, 71, 377-91.
- FINLAY, B. L. & DARLINGTON, R. B. 1995. Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science*, 268, 1578-84.
- FISHELL, G. & HANASHIMA, C. 2008. Pyramidal neurons grow up and change their mind. *Neuron*, 57, 333-8.
- FONG, T. M. & HEYMSFIELD, S. B. 2009. Cannabinoid-1 receptor inverse agonists: current understanding of mechanism of action and unanswered questions. *Int J Obes (Lond)*, 33, 947-55.
- FOWLER, C. J. 2013. Transport of endocannabinoids across the plasma membrane and within the cell. *FEBS J*, 280, 1895-904.
- FRIED, P. A., WATKINSON, B. & GRAY, R. 2003. Differential effects on cognitive functioning in 13- to 16-year-olds prenatally exposed to cigarettes and marijuana. *Neurotoxicol Teratol*, 25, 427-36.
- FU, J., GAETANI, S., OVEISI, F., LO VERME, J., SERRANO, A., RODRIGUEZ DE FONSECA, F., ROSENGARTH, A., LUECKE, H., DI GIACOMO, B., TARZIA, G. & PIOMELLI, D. 2003. Oleyethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature*, 425, 90-3.
- GAO, Y., VASILYEV, D. V., GONCALVES, M. B., HOWELL, F. V., HOBBS, C., REISENBERG, M., SHEN, R., ZHANG, M. Y., STRASSLE, B. W., LU, P., MARK, L., PIESLA, M. J., DENG, K., KOURANOVA, E. V., RING, R. H., WHITESIDE, G. T., BATES, B., WALSH, F. S., WILLIAMS, G., PANGALOS, M. N., SAMAD, T. A. & DOHERTY, P. 2010. Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci*, 30, 2017-24.
- GAONI, Y. & MECHOULAM, R. 1964. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American chemical society*, 86, 1646-1647.
- GELMAN, D. M., MARIN, O. & RUBENSTEIN, J. L. R. 2012. The Generation of Cortical Interneurons. In: TH, NOEBELS, J. L., AVOLI, M., ROGAWSKI, M. A., OLSEN, R. W. & DELGADO-ESCUETA, A. V. (eds.) *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. Bethesda (MD).
- GILMORE, E. C. & HERRUP, K. 1997. Cortical development: layers of complexity. *Curr Biol*, 7, R231-4.
- GOEBBELS, S., BORMUTH, I., BODE, U., HERMANSON, O., SCHWAB, M. H. & NAVE, K. A. 2006. Genetic targeting of principal neurons in neocortex and hippocampus of NEX-Cre mice. *Genesis*, 44, 611-21.
- GONCALVES, M. B., SUETTERLIN, P., YIP, P., MOLINA-HOLGADO, F., WALKER, D. J., OUDIN, M. J., ZENTAR, M. P., POLLARD, S., YANEZ-MUNOZ, R. J., WILLIAMS, G., WALSH, F. S., PANGALOS, M. N. & DOHERTY, P. 2008. A diacylglycerol lipase-CB2 cannabinoid pathway regulates adult subventricular zone neurogenesis in an age-dependent manner. *Mol Cell Neurosci*, 38, 526-36.
- GÖTZ, M. & HUTTNER, W. B. 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 777-88.
- GROMAK, N., WEST, S. & PROUDFOOT, N. J. 2006. Pause sites promote transcriptional termination of mammalian RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, 26, 3986-96.
- GRUETER, B. A., BRASNJO, G. & MALENKA, R. C. 2010. Postsynaptic TRPV1 triggers cell type-specific long-term depression in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci*, 13, 1519-25.
- GUILLEMOT, F. 2005. Cellular and molecular control of neurogenesis in the mammalian telencephalon. *Curr Opin Cell Biol*, 17, 639-47.
- GULYAS, A. I., CRAVATT, B. F., BRACEY, M. H., DINH, T. P., PIOMELLI, D., BOSCIA, F. & FREUND, T. F. 2004. Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci*, 20, 441-58.

- HARBISON, R. D. & MANTILLA-PLATA, B. 1972. Prenatal toxicity, maternal distribution and placental transfer of tetrahydrocannabinol. *J Pharmacol Exp Ther*, 180, 446-53.
- HARKANY, T., GUZMAN, M., GALVE-ROPERH, I., BERGHUIS, P., DEVI, L. A. & MACKIE, K. 2007. The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol Sci*, 28, 83-92.
- HELLIWELL, R. J., CHAMLEY, L. W., BLAKE-PALMER, K., MITCHELL, M. D., WU, J., KEARN, C. S. & GLASS, M. 2004. Characterization of the endocannabinoid system in early human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 5168-74.
- HOWLETT, A. C., BARTH, F., BONNER, T. I., CABRAL, G., CASELLAS, P., DEVANE, W. A., FELDER, C. C., HERKENHAM, M., MACKIE, K., MARTIN, B. R., MECHOULAM, R. & PERTWEE, R. G. 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*, 54, 161-202.
- HOWLETT, A. C., BREIVOGEL, C. S., CHILDERS, S. R., DEADWYLER, S. A., HAMPSON, R. E. & PORRINO, L. J. 2004. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology*, 47 Suppl 1, 345-58.
- HOWLETT, A. C., JOHNSON, M. R. & MELVIN, L. S. 1990. Classical and nonclassical cannabinoids: mechanism of action--brain binding. *NIDA Res Monogr*, 96, 100-11.
- HSU, K. L., TSUBOI, K., ADIBEKIAN, A., PUGH, H., MASUDA, K. & CRAVATT, B. F. 2012. DAGLbeta inhibition perturbs a lipid network involved in macrophage inflammatory responses. *Nat Chem Biol*, 8, 999-1007.
- HURD, Y. L., WANG, X., ANDERSON, V., BECK, O., MINKOFF, H. & DOW-EDWARDS, D. 2005. Marijuana impairs growth in mid-gestation fetuses. *Neurotoxicol Teratol*, 27, 221-9.
- HUTCHINGS, D. E., MARTIN, B. R., GAMAGARIS, Z., MILLER, N. & FICO, T. 1989. Plasma concentrations of delta-9-tetrahydrocannabinol in dams and fetuses following acute or multiple prenatal dosing in rats. *Life Sci*, 44, 697-701.
- KACZOCHA, M., GLASER, S. T. & DEUTSCH, D. G. 2009. Identification of intracellular carriers for the endocannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 6375-80.
- KARRA, D. & DAHM, R. 2010. Transfection techniques for neuronal cells. *J Neurosci*, 30, 6171-7.
- KATHURIA, S., GAETANI, S., FEGLEY, D., VALINO, F., DURANTI, A., TONTINI, A., MOR, M., TARZIA, G., LA RANA, G., CALIGNANO, A., GIUSTINO, A., TATTOLI, M., PALMERY, M., CUOMO, V. & PIOMELLI, D. 2003. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med*, 9, 76-81.
- KEIMPEMA, E., BARABAS, K., MOROZOV, Y. M., TORTORIELLO, G., TORII, M., CAMERON, G., YANAGAWA, Y., WATANABE, M., MACKIE, K. & HARKANY, T. 2010. Differential subcellular recruitment of monoacylglycerol lipase generates spatial specificity of 2-arachidonoyl glycerol signaling during axonal pathfinding. *J Neurosci*, 30, 13992-4007.
- KIM, H., KIM, M., IM, S. K. & FANG, S. 2018. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res*, 34, 147-159.
- KIM, T. K. & EBERWINE, J. H. 2010. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*, 397, 3173-8.
- KREITZER, A. C., CARTER, A. G. & REGEHR, W. G. 2002. Inhibition of interneuron firing extends the spread of endocannabinoid signaling in the cerebellum. *Neuron*, 34, 787-96.
- KREITZER, A. C. & REGEHR, W. G. 2001. Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron*, 29, 717-27.
- LAN, R., LIU, Q., FAN, P., LIN, S., FERNANDO, S. R., MCCALLION, D., PERTWEE, R. & MAKRIYANNIS, A. 1999. Structure-activity relationships of pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists. *J Med Chem*, 42, 769-76.
- LEECH, S. L., LARKBY, C. A., DAY, R. & DAY, N. L. 2006. Predictors and correlates of high levels of depression and anxiety symptoms among children at age 10. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 45, 223-230.

- LEECH, S. L., RICHARDSON, G. A., GOLDSCHMIDT, L. & DAY, N. L. 1999. Prenatal substance exposure: effects on attention and impulsivity of 6-year-olds. *Neurotoxicol Teratol*, 21, 109-18.
- LI, S. 2004. Electroporation gene therapy: new developments in vivo and in vitro. *Curr Gene Ther*, 4, 309-16.
- LIGRESTI, A., DE PETROCELLIS, L. & DI MARZO, V. 2016. From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. *Physiol Rev*, 96, 1593-659.
- LITTLE, P. J., COMPTON, D. R., MECHOULAM, R. & MARTIN, B. R. 1989. Stereochemical effects of 11-OH-delta 8-THC-dimethylheptyl in mice and dogs. *Pharmacol Biochem Behav*, 32, 661-6.
- LYNN, A. B. & HERKENHAM, M. 1994. Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids. *J Pharmacol Exp Ther*, 268, 1612-23.
- MA, J., YAO, X. H., FU, Y. & YU, Y. C. 2014. Development of layer 1 neurons in the mouse neocortex. *Cereb Cortex*, 24, 2604-18.
- MACCARRONE, M., DE FELICI, M., BARI, M., KLINGER, F., SIRACUSA, G. & FINAZZI-AGRO, A. 2000. Down-regulation of anandamide hydrolase in mouse uterus by sex hormones. *Eur J Biochem*, 267, 2991-7.
- MACCARRONE, M., GUZMAN, M., MACKIE, K., DOHERTY, P. & HARKANY, T. 2014. Programming of neural cells by (endo)cannabinoids: from physiological rules to emerging therapies. *Nat Rev Neurosci*, 15, 786-801.
- MACKIE, K., LAI, Y., WESTENBROEK, R. & MITCHELL, R. 1995. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci*, 15, 6552-61.
- MACPHEE-QUIGLEY, K., TAYLOR, P. & TAYLOR, S. 1985. Primary structures of the catalytic subunits from two molecular forms of acetylcholinesterase. A comparison of NH₂-terminal and active center sequences. *J Biol Chem*, 260, 12185-9.
- MALONE, D. T., KEARN, C. S., CHONGUE, L., MACKIE, K. & TAYLOR, D. A. 2008. Effect of social isolation on CB1 and D2 receptor and fatty acid amide hydrolase expression in rats. *Neuroscience*, 152, 265-72.
- MARIN, O. & RUBENSTEIN, J. L. 2003. Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci*, 26, 441-83.
- MATSUDA, T. & CEPKO, C. L. 2004. Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 16-22.
- MAURELLI, S., BISOGNO, T., DE PETROCELLIS, L., DI LUCCIA, A., MARINO, G. & DI MARZO, V. 1995. Two novel classes of neuroactive fatty acid amides are substrates for mouse neuroblastoma 'anandamide amidohydrolase'. *FEBS Lett*, 377, 82-6.
- MAZZARI, S., CANELLA, R., PETRELLI, L., MARCOLONGO, G. & LEON, A. 1996. N-(2-hydroxyethyl)hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation. *Eur J Pharmacol*, 300, 227-36.
- MCKINNEY, M. K. & CRAVATT, B. F. 2005. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu Rev Biochem*, 74, 411-32.
- MECHOULAM, R. 1986. *Cannabinoids as therapeutic agents*, Boca Raton, FL, CRC Press.
- MECHOULAM, R., BEN-SHABAT, S., HANUS, L., LIGUMSKY, M., KAMINSKI, N. E., SCHATZ, A. R., GOPHER, A., ALMOG, S., MARTIN, B. R., COMPTON, D. R. & ET AL. 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 50, 83-90.
- MECHOULAM, R. & PARKER, L. A. 2013. The endocannabinoid system and the brain. *Annu Rev Psychol*, 64, 21-47.
- METIN, C., VALLEE, R. B., RAKIC, P. & BHIDE, P. G. 2008. Modes and mishaps of neuronal migration in the mammalian brain. *J Neurosci*, 28, 11746-52.
- MEYER, G. 2010. Building a human cortex: the evolutionary differentiation of Cajal-Retzius cells and the cortical hem. *J Anat*, 217, 334-43.

- MIYAZAKI, J., TAKAKI, S., ARAKI, K., TASHIRO, F., TOMINAGA, A., TAKATSU, K. & YAMAMURA, K. 1989. Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5. *Gene*, 79, 269-77.
- MOLYNEAUX, B. J., ARLOTTA, P., MENEZES, J. R. & MACKLIS, J. D. 2007. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*, 8, 427-37.
- MOR, M., RIVARA, S., LODOLA, A., PLAZZI, P. V., TARZIA, G., DURANTI, A., TONTINI, A., PIERSANTI, G., KATHURIA, S. & PIOMELLI, D. 2004. Cyclohexylcarbamic acid 3'- or 4'-substituted biphenyl-3-yl esters as fatty acid amide hydrolase inhibitors: synthesis, quantitative structure-activity relationships, and molecular modeling studies. *J Med Chem*, 47, 4998-5008.
- MOROZOV, Y. M., BEN-ARI, Y. & FREUND, T. F. 2004. The spatial and temporal pattern of fatty acid amide hydrolase expression in rat hippocampus during postnatal development. *Eur J Neurosci*, 20, 459-66.
- MOROZOV, Y. M., TORII, M. & RAKIC, P. 2009. Origin, early commitment, migratory routes, and destination of cannabinoid type 1 receptor-containing interneurons. *Cereb Cortex*, 19 Suppl 1, i78-89.
- MULDER, J., AGUADO, T., KEIMPEMA, E., BARABAS, K., BALLESTER ROSADO, C. J., NGUYEN, L., MONORY, K., MARSICANO, G., DI MARZO, V., HURD, Y. L., GUILLEMOT, F., MACKIE, K., LUTZ, B., GUZMAN, M., LU, H. C., GALVE-ROPERH, I. & HARKANY, T. 2008. Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 8760-5.
- NADARAJAH, B., BRUNSTROM, J. E., GRUTZENDLER, J., WONG, R. O. & PEARLMAN, A. L. 2001. Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci*, 4, 143-50.
- NIWA, H., YAMAMURA, K. & MIYAZAKI, J. 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 108, 193-9.
- NOCTOR, S. C., FLINT, A. C., WEISSMAN, T. A., DAMMERMAN, R. S. & KRIEGSTEIN, A. R. 2001. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*, 409, 714-20.
- NOCTOR, S. C., MARTINEZ-CERDENO, V., IVIC, L. & KRIEGSTEIN, A. R. 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci*, 7, 136-44.
- OHNO-SHOSAKU, T., MAEJIMA, T. & KANO, M. 2001. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron*, 29, 729-38.
- OKABE, M., IKAWA, M., KOMINAMI, K., NAKANISHI, T. & NISHIMUNE, Y. 1997. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett*, 407, 313-9.
- OKAMOTO, Y., MORISHITA, J., TSUBOI, K., TONAI, T. & UEDA, N. 2004. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem*, 279, 5298-305.
- ONAVI, E. S., ISHIGURO, H., GONG, J. P., PATEL, S., PERCHUK, A., MEOZZI, P. A., MYERS, L., MORA, Z., TAGLIAFERRO, P., GARDNER, E., BRUSCO, A., AKINSHOLA, B. E., LIU, Q. R., HOPE, B., IWASAKI, S., ARINAMI, T., TEASENFITZ, L. & UHL, G. R. 2006. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann N Y Acad Sci*, 1074, 514-36.
- PACHER, P. & MECOULAM, R. 2011. Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system? *Prog Lipid Res*, 50, 193-211.
- PARIA, B. C., SONG, H., WANG, X., SCHMID, P. C., KREBSBACH, R. J., SCHMID, H. H., BONNER, T. I., ZIMMER, A. & DEY, S. K. 2001. Dysregulated cannabinoid signaling disrupts uterine receptivity for embryo implantation. *J Biol Chem*, 276, 20523-8.
- PARIA, B. C., ZHAO, X., WANG, J., DAS, S. K. & DEY, S. K. 1999. Fatty-acid amide hydrolase is expressed in the mouse uterus and embryo during the periimplantation period. *Biol Reprod*, 60, 1151-7.
- PETERS, A. & JONES, E. G. 1984. *Cerebral cortex*, New York, Plenum Press.
- PINSON, A., NAMBA, T. & HUTTNER, W. B. 2019. Malformations of Human Neocortex in Development - Their Progenitor Cell Basis and Experimental Model Systems. *Front Cell Neurosci*, 13, 305.

- PIOMELLI, D. 2003. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*, 4, 873-84.
- PITLER, T. A. & ALGER, B. E. 1992. Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABA_A responses in hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci*, 12, 4122-32.
- RAKIC, P. 1972. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol*, 145, 61-83.
- RAKIC, P. 2009. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nat Rev Neurosci*, 10, 724-35.
- RAMÓN Y CAJAL, S. 1895. *Les nouvelles idées sur la structure du système nerveux chez l'homme et chez les vertébrés*, Paris, Reinwald.
- REGGIO, P. H. 2010. Endocannabinoid binding to the cannabinoid receptors: what is known and what remains unknown. *Curr Med Chem*, 17, 1468-86.
- ROMERO, J., LASTRES-BECKER, I., DE MIGUEL, R., BERRENDERO, F., RAMOS, J. A. & FERNANDEZ-RUIZ, J. 2002. The endogenous cannabinoid system and the basal ganglia. biochemical, pharmacological, and therapeutic aspects. *Pharmacol Ther*, 95, 137-52.
- RUEDA, D., GALVE-ROPERH, I., HARO, A. & GUZMAN, M. 2000. The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol Pharmacol*, 58, 814-20.
- SEKINE, K., KAWAUCHI, T., KUBO, K., HONDA, T., HERZ, J., HATTORI, M., KINASHI, T. & NAKAJIMA, K. 2012. Reelin controls neuronal positioning by promoting cell-matrix adhesion via inside-out activation of integrin alpha5beta1. *Neuron*, 76, 353-69.
- SHAFFER, R. & TRAKTMAN, P. 1987. Vaccinia virus encapsidates a novel topoisomerase with the properties of a eucaryotic type I enzyme. *J Biol Chem*, 262, 9309-15.
- SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H. & SAIGA, Y. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*, 59, 223-39.
- SINGER, T. P. 1995. The colorful past and bright future of monoamine oxidase research. *Prog Brain Res*, 106, 1-22.
- SIROTNAK, F. M. & HUTCHINSON, D. J. 1959. Absorption of deoxyribonucleic acid by mouse lymphoma cells. *Biochim Biophys Acta*, 36, 246-8.
- SMART, I. H. 1973. Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the mouse neocortex: a pilot study based on recording the number, location and plane of cleavage of mitotic figures. *J Anat*, 116, 67-91.
- SMART, I. H. & MCSHERRY, G. M. 1982. Growth patterns in the lateral wall of the mouse telencephalon. II. Histological changes during and subsequent to the period of isocortical neuron production. *J Anat*, 134, 415-42.
- SODERSTROM, K. & TIAN, Q. 2006. Developmental pattern of CB1 cannabinoid receptor immunoreactivity in brain regions important to zebra finch (*Taeniopygia guttata*) song learning and control. *J Comp Neurol*, 496, 739-58.
- STEINER, M. & LUTZ, B. 2006. Physiologie und Pharmakologie des Endocannabinoid-Systems. In: SCHUSDZIARRA, V. (ed.) *Das Endocannabinoid-System*. Bremen: UNI-MED.
- STELLA, N., SCHWEITZER, P. & PIOMELLI, D. 1997. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, 388, 773-8.
- STEMPEL, A. V., STUMPF, A., ZHANG, H. Y., OZDOGAN, T., PANNASCH, U., THEIS, A. K., OTTE, D. M., WOJTALLA, A., RACZ, I., PONOMARENKO, A., XI, Z. X., ZIMMER, A. & SCHMITZ, D. 2016. Cannabinoid Type 2 Receptors Mediate a Cell Type-Specific Plasticity in the Hippocampus. *Neuron*, 90, 795-809.
- STERNBERG, N. & HAMILTON, D. 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol*, 150, 467-86.
- SUGIURA, T., KONDO, S., SUKAGAWA, A., TONEGAWA, T., NAKANE, S., YAMASHITA, A., ISHIMA, Y. & WAKU, K. 1996. Transacylase-mediated and phosphodiesterase-mediated synthesis of N-arachidonylethanolamine, an endogenous cannabinoid-receptor ligand, in rat brain microsomes. Comparison with synthesis from free arachidonic acid and ethanolamine. *Eur J Biochem*, 240, 53-62.

- SUN, X. & DEY, S. K. 2008. Aspects of endocannabinoid signaling in periimplantation biology. *Mol Cell Endocrinol*, 286, S3-11.
- TABATA, H., KANATANI, S. & NAKAJIMA, K. 2009. Differences of migratory behavior between direct progeny of apical progenitors and basal progenitors in the developing cerebral cortex. *Cereb Cortex*, 19, 2092-105.
- TABATA, H. & NAKAJIMA, K. 2003. Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*, 23, 9996-10001.
- TANIMURA, A., YAMAZAKI, M., HASHIMOTODANI, Y., UCHIGASHIMA, M., KAWATA, S., ABE, M., KITA, Y., HASHIMOTO, K., SHIMIZU, T., WATANABE, M., SAKIMURA, K. & KANO, M. 2010. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase alpha mediates retrograde suppression of synaptic transmission. *Neuron*, 65, 320-7.
- TARZIA, G., DURANTI, A., GATTI, G., PIERSANTI, G., TONTINI, A., RIVARA, S., LODOLA, A., PLAZZI, P. V., MOR, M., KATHURIA, S. & PIOMELLI, D. 2006. Synthesis and structure-activity relationships of FAAH inhibitors: cyclohexylcarbamic acid biphenyl esters with chemical modulation at the proximal phenyl ring. *ChemMedChem*, 1, 130-9.
- TEIFEL, M. 2012. Transfektion von Säugerzellen. In: JANSOHN, M., ROTHHÄMEL, S. & AIGNER, A. (eds.) *Gentechnische Methoden - Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 5. Aufl. ed. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.
- TEMPLE, S. 2001. The development of neural stem cells. *Nature*, 414, 112-7.
- THOMAS, E. A., CRAVATT, B. F., DANIELSON, P. E., GILULA, N. B. & SUTCLIFFE, J. G. 1997. Fatty acid amide hydrolase, the degradative enzyme for anandamide and oleamide, has selective distribution in neurons within the rat central nervous system. *J Neurosci Res*, 50, 1047-52.
- THOMPSON, S. R. 2012. Tricks an IRES uses to enslave ribosomes. *Trends Microbiol*, 20, 558-66.
- TREPEL, M. 2012. Neuroanatomie Struktur und Funktion ; [mit dem Plus im Web ; Zugangscode im Buch]. 5. Aufl. ed. München: Elsevier.
- TSOU, K., NOGUERON, M. I., MUTHIAN, S., SANUDO-PENA, M. C., HILLARD, C. J., DEUTSCH, D. G. & WALKER, J. M. 1998. Fatty acid amide hydrolase is located preferentially in large neurons in the rat central nervous system as revealed by immunohistochemistry. *Neurosci Lett*, 254, 137-40.
- TWITCHELL, W., BROWN, S. & MACKIE, K. 1997. Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol*, 78, 43-50.
- UEDA, H., KOBAYASHI, T., KISHIMOTO, M., TSUTSUMI, T. & OKUYAMA, H. 1993. A possible pathway of phosphoinositide metabolism through EDTA-insensitive phospholipase A1 followed by lysophosphoinositide-specific phospholipase C in rat brain. *J Neurochem*, 61, 1874-81.
- VON JONQUIERES, G., MERSMANN, N., KLUGMANN, C. B., HARASTA, A. E., LUTZ, B., TEAHAN, O., HOUSLEY, G. D., FROHLICH, D., KRAMER-ALBERS, E. M. & KLUGMANN, M. 2013. Glial promoter selectivity following AAV-delivery to the immature brain. *PLoS One*, 8, e65646.
- WALKER, D. J., SUETTERLIN, P., REISENBERG, M., WILLIAMS, G. & DOHERTY, P. 2010. Down-regulation of diacylglycerol lipase-alpha during neural stem cell differentiation: identification of elements that regulate transcription. *J Neurosci Res*, 88, 735-45.
- WANG, C. & MEI, L. 2013. Neural Development Methods and Protocols. In: ZHOU, R. & MEI, L. (eds.) *Methods in Molecular Biology, Methods and Protocols 1018*. Totowa, NJ: Humana Press.
- WASHBOURNE, P. & MCALLISTER, A. K. 2002. Techniques for gene transfer into neurons. *Curr Opin Neurobiol*, 12, 566-73.
- WATSON, S., CHAMBERS, D., HOBBS, C., DOHERTY, P. & GRAHAM, A. 2008. The endocannabinoid receptor, CB1, is required for normal axonal growth and fasciculation. *Mol Cell Neurosci*, 38, 89-97.
- WILLFORD, J. A., CHANDLER, L. S., GOLDSCHMIDT, L. & DAY, N. L. 2010. Effects of prenatal tobacco, alcohol and marijuana exposure on processing speed, visual-motor coordination, and interhemispheric transfer. *Neurotoxicol Teratol*, 32, 580-8.

- WILSON, R. I. & NICOLL, R. A. 2001. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*, 410, 588-92.
- WONDERS, C. P. & ANDERSON, S. A. 2006. The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci*, 7, 687-96.
- YOSHIDA, M., ASSIMACOPOULOS, S., JONES, K. R. & GROVE, E. A. 2006. Massive loss of Cajal-Retzius cells does not disrupt neocortical layer order. *Development*, 133, 537-45.
- ZIMMERMANN, T., BARTSCH, J. C., BEER, A., LOMAZZO, E., GUGGENHUBER, S., LANGE, M. D., BINDILA, L., PAPE, H. C. & LUTZ, B. 2019. Impaired anandamide/palmitoylethanolamide signaling in hippocampal glutamatergic neurons alters synaptic plasticity, learning, and emotional responses. *Neuropsychopharmacology*, 44, 1377-1388.

8 Anhang

8.1 DNA-Sequenzen verwendeter Moleküle

8.1.1 #419 (pAM-floxstop-HA-FAAH-WPRE-bGHpA)

TAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTC
GGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGG
AGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATG
CTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGTACCTAATATCACAACTGGAAATGTC
TATCAATATATAGTTGCTCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTT
CATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCT
GGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCC
CATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACG
GTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC
TATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGAC
CTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACC
ATGGTTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCC
CCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGC
GGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGG
CGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCG
CTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGGCGGCGGGCGGGCCCTATAAAAA
GCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGACGCTGCCTTCGCCCCGTGC
CCCGCTCCGCCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTT
ACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGC
GCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGG
GGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGCTGTCCGCGG
GGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGG
CGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTT
TTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCA
AAGAAATCATAACTTCGTATAGCATAATTATACGAAGTTATGCAATAAAAAGACA
GAATAAACGCACGGTGTGGGTGCTTTGTTTCATAAACGCGGGGTTTCGGTCCCA
GGAATAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGAATCG
ATAGTACTAACATACGCTCTCCATCAAACAAAACGAAACAAAACAACTAGCAA
AATAGGCTGTCCCCAGTGCAAGTGCAGGTGCCAGAACATTTCTCTATAACTTCG
TATAGCATAATTATACGAAGTTATTTAATTAAGGATCCGAATTCAGCTTACTAG

TGTTCCATGTATCCGTATGATGTTCCCTGATTATGCTAGCCTCGAATTCGATAACA
TGGTGCTGAGCGAAGTGTGGACCGCGCTGTCTGGACTCTCCGGGGTTTGCCTA
GCCTGCAGCTTGCTGTCCGGCGGCGGTGGTCCTGCGATGGACCAGGAGCCAGA
CCGCCCGGGGCGCGGTGACCAGGGCGCGGCAGAAAGCAGCGAGCCGGCCTGG
AGACCATGGACAAGGCGGTGCAGCGCTTCCGGCTGCAGAATCCTGACCTGGAT
TCAGAGGCCTTGCTGGCTCTGCCCTGCTCCAACCTGGTACAGAAGTTACAGAGT
GGGGAACCTGTCCCCAGAAGCTGTGCTCTTTACCTACCTGGGAAAGGCCTGGGA
AGTGAACAAAGGGACCAACTGTGTGACCTCCTATCTGACTGACTGTGAGACTCA
GCTGTCCCAGGCCCCACGGCAGGGCCTGCTCTATGGCGTCCCCGTGAGCCTC
AAGGAATGCTTCAGCTACAAGGGCCATGCTTCCACACTGGGCTTAAGTTTGAAC
GAGGGTGTGACATCGGAGAGTGACTGTGTGGTGGTGCAGGTAAGCTGCA
GGGAGCTGTGCCCTTTGTGCACACCAACGTCCCCCAGTCCATGCTAAGCTATGA
CTGCAGTAACCCCCTCTTTGGCCAGACCATGAACCCGTGGAAGCCCTCCAAGA
GTCCAGGAGGTTCCCTCAGGGGGTGAGGGGGCTCTCATTGGATCTGGAGGCTCC
CCTCTGGGTTTAGGCACTGACATCGGCGGCAGCATCCGGTTCCCTTCTGCCTTC
TGTGGCATCTGTGGCCTCAAGCCTACTGGGAACCGCCTCAGCAAGAGTGGCCT
GAAGAGCTGTGTTTATGGACAGACAGCAGTGCAGCTTTCTGTTGGCCCCATGGC
ACGGGATGTGGATAGCCTGGCATTGTGCATGAAAGCCCTACTTTGTGAGGATTT
GTTCCGCTTGGACTCCACCATCCCCCCTTGCCCTTCAGGGAGGAGATCTACA
GAAGTTCTCGACCCCTTCGTGTGGGATACTATGAAACTGACAACTACACCATGC
CCACTCCAGCCATGAGGAGGGCTGTGATGGAGACCAAGCAGAGTCTCGAGGCT
GCTGGCCACACGCTGGTCCCCTTCTTACCAAACAACATACTTATGCCCTGGAG
GTCCTGTCGGCAGGTGGGCTGTTCAAGTATGGTGGCTGCTCTTTTCTCCAAAAC
TTCAAAGGCGACTTTGTGGATCCCTGCTTGGGGGACCTGGTCTTAGTGCTGAAG
CTGCCAGGTGGTTTAAAAAACTGCTGAGCTTCCCTGCTGAAGCCTCTGTTTCT
CGGCTGGCAGCCTTTCTCAACAGTATGTGTCCTCGGTCAGCCGAAAAGCTGTG
GGAAGTGCAGCATGAGATTGAGATGTATCGCCAGTCCGTCATTGCCAGTGGAA
GGCAATGAACTTGGACGTGGTGCTAACCCCATGCTGGGTCCTGCTCTGGATTT
GAACACACCGGGCAGAGCCACAGGGGCTATCAGCTACACTGTTCTCTATAACTG
CCTGGACTTCCCTGCGGGGGTGGTGCCTGTCACCACTGTGACCGCTGAGGACG
ATGCCAGATGGAACACTACAAAGGCTACTTTGGGGATATGTGGGACAACATTC
TGAAGAAGGGCATGAAAAAGGGTATAGGCCTGCCTGTGGCTGTGCAGTGCCTG
GCTCTGCCCTGGCAGGAAGAGCTGTGTCTGCGGTTTCATGCGGGAGGTGGAAC
GGCTGATGACCCCTGAAAAGCGGCCATCTTGAAGTGTGTTATCAAGCTTATCG
ATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTAT

GTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTA
TTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCT
CTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGT
GTTTGTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCC
TTCCGGGACTTTCGCTTTCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCG
CCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCC
GTGGTGTTCGCGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCC
ACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCA
GCGGACCTTCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCT
TCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATC
GATACCGTCGACTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATC
TGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAC
TGTCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAT
TCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG
ACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAA
AGAACCAGCTGGGGCTCGACTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCG
GGTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTC
TGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCCCCGACGCC
GGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGCTTTTTGC
AAAAGCCTAGGCCTCCAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGG
CCGAGGCGGCCTCGGCCTCTGCATAAATAAAAAAATTAGTCAGCCATGGGGC
GGAGAATGGGCGGAACTGGGCGGAGTTAGGGGCGGGATGGGCGGAGTTAGG
GGCGGGACTATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCT
GCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCACACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCAT
GCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCACACCCTAACTG
ACACACATTCCACAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGG
TTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGT
CGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTAT
CCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAA
AAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCG
CCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACC
CGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGC
TCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCG
GGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAG
GTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCG

CTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTT
ATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAG
GCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAA
CAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTG
GTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTT
GCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCT
TTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGG
TCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGT
TTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTT
AATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCC
TGACTIONCCCGTCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCC
CAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAG
CAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTA
TCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCG
CCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCA
CGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGA
GTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCG
ATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCA
CTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTG
AGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTT
GCCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGC
TCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGT
TGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTT
TACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAA
AAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAA
TATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATG
TATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCA
CCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTA
TCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGAC
ACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGC
AGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGGC
TTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGCACCATTCGACGCTCT
CCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTT
GAGCACCGCCCGCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGT
CCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGA

GCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAGGCG
CCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGT
AGAGGATCTGGCTAGCGATGACCCTGCTGATTGGTTCGCTGACCATTTCCGGGT
GCGGGACGGCGTTACCAGAACTCAGAAGGTTCTGTTCCAACCAAACCGACTCTG
ACGGCAGTTTACGAGAGAGATGATAGGGTCTGCTTCAGTAAGCCAGATGCTACA
CAATTAGGCTTGTACATATTGTCGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCT
TATGTATCATAACACATACGATTTAGGTGACACTATAGAATACACGGAATTAATTC

8.1.2 pCAGIG

GGTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAG
TTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGC
CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCC
CCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTAC
GGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC
CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGA
CCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTAC
CATGGTTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTC
CCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGG
CGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCNCAGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCGAGGGG
CGGGGGCGGGGGCGAGGGCGGAGAGGTGCGGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGGCGCG
CTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGGCGGGCGGGCGGGCCCTATAAAAA
GCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCC
CCGCTCCGCCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCGGGCTCTGACTGACCGCGTTA
CTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCG
CTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGG
GCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGT
GTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGGGCGGCTGT
GAGCGCTGCGGGCGCGGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAG
GGGAGCGCGGCCGGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGG
GAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGT
GGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCGAGTTGCT
GAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCGGGG
CTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGGC
GGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGGCGCGGGCGGGCCCC
GGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATG

GTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGC
CGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGC
GGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTTCGC
CGCGCCGCGGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGA
CGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGT
GACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTTA
CAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAA
TTCTCGAGGATATCGCGGCCGCTACGTAAATTCCGCCCCCCCCCCCCCTCTC
CCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGT
GCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGG
CCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCTC
TCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGG
AAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTCAGGCAGCGGAACC
CCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACA
CCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGA
AAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCA
GAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTAC
ATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGT
GGTTTTCTTTGAAAACACGATGATAATATGGCCACAACCATGGTGAGCAAGG
GCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGA
CGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGGCGAGGGCGATGCCACC
TACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCC
CTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCT
ACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGC
TACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCG
CGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG
GGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAA
CTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAA
GGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCG
ACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
AACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCG
CGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCA
TGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCGCCAGCACAGTGGTTCGATCGAC
CAATGCCCTGGCTCACAAATACCACTGAGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAATTAT
GGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTT

ATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACAT
ATGGGAGGGCAAATCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGC
AACATATGCCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTTGGCTATAAAGAGGTCA
TCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTCCATAGAAAAGCCTTG
ACTTGAGGTTAGATTTTTTTTATATTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCC
CTAAAATTTTCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCTCCTCTCCTGACTACT
CCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTTATGGAGATCCCTCGACCTGCAGCCCAA
GCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCAC
AATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTA
ATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTC
GGGAAACCTGTCGTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTC
CCGCCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTC
TCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTC
GGCCTCTGAGCTATTCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTT
TTGCAAAAAGCTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAG
CATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGT
CCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCCGCTGCATTAATGAATCGGC
CAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCT
CACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACT
CAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAAC
ATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTTGCT
GGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTC
AAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCC
CTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATAC
CTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGT
AGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGA
ACCCCCGTTTCCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTC
CAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGA
TTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCT
AACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCA
GTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCT
GGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGA
TCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAA
AACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGA
TCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTT

GGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTC
TATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACG
GGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCT
CACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGC
AGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGG
GAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATT
GCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCC
GGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCG
GTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTA
TCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAA
GATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTAT
GCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCAC
ATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAAC
CTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACC
CAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACA
GGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAAT
ACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCA
TGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCG
CACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTG

8.1.3 pCRII-TOPO

AGCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGC
AGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAAT
TAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCG
GCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGC
TATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTAT
GCATCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCT
GGAATTCGCCCTTAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCT
CGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTC
ACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACT
TAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACG
CGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGT
GACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTC
CTTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCC

TTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAG
GGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTG
ACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACAC
TCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGGC
CTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAA
TTCAGGGCGCAAGGGCTGCTAAAGGAAGCGGAACACGTAGAAAGCCAGTCCGC
AGAAACGGTGCTGACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAGG
GAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCG
ATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTG
GGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAACTGGATGGCTTTC
TTGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTGATCAAGAGACAGG
ATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGC
CGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCT
GCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTT
GTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGC
GGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTT
GTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGG
ATCTCCTGTCATCCCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATG
CAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAA
GCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTIONCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGA
TCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCG
CCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGG
CGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCAT
CGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTA
CCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTG
CTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTT
GACGAGTTCTTCTGAATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGT
CGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCCTTCTGTTTTTGCTCACCCAGAA
ACGCTGGTAAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTA
CATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGA
ACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCC
CGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCCCGCATACTACTATTCTCAGAAT
GACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACA
GTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAAC
TACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAAC

ATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGC
CATAACAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTT
GCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATA
GACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCC
GGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCG
GTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCT
ACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAG
ATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATA
TACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATC
CTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAG
CGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCG
CGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGT
GCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGC
GCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAA
GAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGC
TGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTT
ACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCC
AGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATG
AGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGC
GGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCT
GGTATCTTTATAGTCCTGTCCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTT
GTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCC
TTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGT
TATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCG
CTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGA
AG

8.1.4 NotI-HA-FAAH-NotI

GCGGCCGCAAGCTTACTAGTGTTCATGTATCCGTATGATGTTCCCTGATTATGCT
AGCCTCGAATTCGATAACATGGTGCTGAGCGAAGTGTGGACCGCGCTGTCTGG
ACTCTCCGGGGTTTGCCTAGCCTGCAGCTTGCTGTCCGGCGGCGGTGGTCCTGC
GATGGACCAGGAGCCAGACCGCCCGGGGCGCGGTGACCAGGGCGCGGCAGA
AGCAGCGAGCCGGCCTGGAGACCATGGACAAGGCGGTGCAGCGCTTCCGGCT
GCAGAATCCTGACCTGGATTCAGAGGCCTTGCTGGCTCTGCCCTGCTCCAACCT
GGTACAGAAGTTACAGAGTGGGGAACTGTCCCAGAAAGCTGTGCTCTTTACCTA

CCTGGGAAAGGCCTGGGAAGTGAACAAAGGGACCAACTGTGTGACCTCCTATC
TGA CTGACTGTGAGACTCAGCTGTCCCAGGCCCCACGGCAGGGCCTGCTCTAT
GGCGTCCCCGTGAGCCTCAAGGAATGCTTCAGCTACAAGGGCCATGCTTCCAC
ACTGGGCTTAAGTTTGAACGAGGGTGTGACATCGGAGAGTGACTGTGTGGTGG
TGCAGGTA CTGAAGCTGCAGGGAGCTGTGCCCTTTGTGCACACCAACGTCCCC
CAGTCCATGCTAAGCTATGACTGCAGTAACCCCCTCTTTGGCCAGACCATGAAC
CCGTGGAAGCCCTCCAAGAGTCCAGGAGGTTCCCTCAGGGGGTGAGGGGGGCTC
TCATTGGATCTGGAGGCTCCCCTCTGGGTTTAGGCACTGACATCGGCGGCAGC
ATCCGGTTCCTTCTGCCTTCTGTGGCATCTGTGGCCTCAAGCCTACTGGGAAC
CGCCTCAGCAAGAGTGGCCTGAAGAGCTGTGTTTATGGACAGACAGCAGTGCA
GCTTTCTGTTGGCCCCATGGCACGGGATGTGGATAGCCTGGCATTGTGCATGA
AAGCCCTACTTTGTGAGGATTTGTTCCGCTTGGACTCCACCATCCCCCCTTGC
CCTTCAGGGAGGAGATCTACAGAAGTTCTCGACCCCTTCGTGTGGGATACTATG
AAACTGACA ACTACACCATGCCCACTCCAGCCATGAGGAGGGCTGTGATGGAG
ACCAAGCAGAGTCTCGAGGCTGCTGGCCACACGCTGGTCCCCTTCTTACCAA
CAACATACCTTATGCCCTGGAGGTCTGTCCGGCAGGTGGGCTGTTCAAGTATG
GTGGCTGCTCTTTTCTCCAAA ACTTCAAAGGCGACTTTGTGGATCCCTGCTTGG
GGGACCTGGTCTTAGTGCTGAAGCTGCCCAGGTGGTTTAAAAACTGCTGAGCT
TCCTGCTGAAGCCTCTGTTTCCTCGGCTGGCAGCCTTTCTCAACAGTATGTGTC
CTCGGTCAGCCGAAAAGCTGTGGGAACTGCAGCATGAGATTGAGATGTATCGC
CAGTCCGTCATTGCCCAGTGGAAGGCAATGAACTTGGACGTGGTGCTAACCCC
CATGCTGGGTCTGCTCTGGATTTGAACACACCCGGGCAGAGCCACAGGGGGCTA
TCAGCTACACTGTTCTCTATAACTGCCTGGACTTCCCTGCGGGGGTGGTGCCTG
TCACCACTGTGACCGCTGAGGACGATGCCCAGATGGAACACTACAAAGGCTAC
TTTGGGGATATGTGGGACAACATTCTGAAGAAGGGCATGAAAAAGGGTATAGGC
CTGCCTGTGGCTGTGCAGTGCGTGGCTCTGCCCTGGCAGGAAGAGCTGTGTCT
GCGGTT CATGCGGGAGGTGGAACGGCTGATGACCCCTGAAAAGCGGCCATCTT
GAACTAGTGTTATCAAGCTTGCGGCCGCTACGTAAATTCGCCCCCCCCCCCC
TCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCG
GTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTG
AGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTC
CCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCC
TCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCG
GAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAG
ATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTT

GTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGAT
GCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATG
CTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGG
GGACGTGGTTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAACCATGGTGA
GCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGA
CGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT
GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCC
CGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCA
GCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCC
GAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAA
GACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAG
CTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGA
GTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGG
CATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGC
TCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGGCGACGGCCCCGTGCTGCTG
CCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGA
GAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTC
TCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGGCCGCCAGCACAGTGGTC
GATCGACCAATGCCCTGGCTCACAAATACCACTGAGATCTTTTTCCCTCTGCCA
AAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAA
GGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTGTGTCTCTCACTCGGA
AGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGA
GTTTGGCAACATATGCCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTTGGCTATAAA
GAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTCCATAGAAA
AGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTTATTTTTGTTTTGTGTTATTTTTTTCTTT
AACATCCCTAAAATTTTCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCTCCTCTCCT
GACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGGAGATCCCTCGACCTGC
AGCCCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATC
CGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGG
GTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTT
TCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAAC
CATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCCG
CCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGC
CGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTTGGAGGCCT
AGGCTTTTGCAAAAAGCTAACTTGTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAG

CAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTG
GTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCCGCTGCATTAATGA
ATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGC GTATTGGGCGCTCTTCCGCTTC
CTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAG
CTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAA
AGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCG
TTGCTGGCGTTTTTTCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGA
CGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGTT
TCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCG
GATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTTCTCATAGCTCAC
GCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTG
CACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTT
GAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAA
CAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGT
GGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGA
AGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCA
CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAA
AAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGA
ACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCAC
CTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTA
AACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGAT
CTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACG
ATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCC
ACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCG
AGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTG
CCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGC GCAACGTTGTTGC
CATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAG
CTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAA
AGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGCAGT
GTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCC
GTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGT
GTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCG
CCACATAGCAGA ACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCCGGGGCGA
AAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGT
GCACCCA ACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAA

AAACAGGAAGGCAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGT
TGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTG
TCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTT
CCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTG

8.1.5 HA-FAAH in pCRII-TOPO

TAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACAC
AGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAG
CTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGT
AAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAAC
GCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCTGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGA
TTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGC
GGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCT
GCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGAT
ACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAG
CGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTGGCCGATTCAT
TAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAA
CGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATG
CTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGA
AACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCA
AGCTATGCATCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAG
TGTGCTGGAATTCGCCCTTGCGGCCGCAAGCTTACTAGTGTTCCATGTATCCGT
ATGATGTTCCCTGATTATGCTAGCCTCGAATTCGATAACATGGTGCTGAGCGAAG
TGTGGACCGCGCTGTCTGGACTCTCCGGGGTTTTGCCTAGCCTGCAGCTTGCTG
TCGGCGGCGGTGGTCCTGCGATGGACCAGGAGCCAGACCGCCCGGGGCGCG
GTGACCAGGGCGCGGCAGAAGCAGCGAGCCGGCCTGGAGACCATGGACAAGG
CGGTGCAGCGCTTCCGGCTGCAGAATCCTGACCTGGATTGAGAGGCCTTGCTG
GCTCTGCCCTGCTCCAACCTGGTACAGAAGTTACAGAGTGGGGAACTGTCCCC
AGAAGCTGTGCTCTTTACCTACCTGGGAAAGGCCTGGGAAGTGAACAAAGGGA
CCAACCTGTGTGACCTCCTATCTGACTGACTGTGAGACTCAGCTGTCCCAGGCC
CACGGCAGGGCCTGCTCTATGGCGTCCCCGTGAGCCTCAAGGAATGCTTCAGC
TACAAGGGCCATGCTTCCACACTGGGCTTAAGTTTGAACGAGGGTGTGACATCG
GAGAGTGACTGTGTGGTGGTGCAGGTAAGCTGCAGGGAGCTGTGCCCTT
TGTGCACACCAACGTCCCCCAGTCCATGCTAAGCTATGACTGCAGTAACCCCCT
CTTTGGCCAGACCATGAACCCGTGGAAGCCCTCCAAGAGTCCAGGAGGTTCT

CAGGGGGTGAGGGGGCTCTCATTGGATCTGGAGGCTCCCCTCTGGGTTTAGGC
ACTGACATCGGCGGCAGCATCCGGTTCCTTCTGCCTTCTGTGGCATCTGTGG
CCTCAAGCCTACTGGGAACCGCCTCAGCAAGAGTGGCCTGAAGAGCTGTGTTT
ATGGACAGACAGCAGTGCAGCTTTCTGTTGGCCCCATGGCACGGGATGTGGAT
AGCCTGGCATTGTGCATGAAAGCCCTACTTTGTGAGGATTTGTTCCGCTTGGAC
TCCACCATCCCCCCTTGCCCTTCAGGGAGGAGATCTACAGAAGTTCTCGACCC
CTTCGTGTGGGATACTATGAAACTGACAACACTACCCATGCCACTCCAGCCATG
AGGAGGGCTGTGATGGAGACCAAGCAGAGTCTCGAGGCTGCTGGCCACACGC
TGGTCCCCTTCTTACCAAACAACATACCTTATGCCCTGGAGGTCCTGTCCGGCAG
GTGGGCTGTTTCAAGTATGGTGGCTGCTCTTTTCTCCAAAACCTCAAAGGCGACT
TTGTGGATCCCTGCTTGGGGGACCTGGTCTTAGTGCTGAAGCTGCCCAGGTGG
TTTAAAAAACTGCTGAGCTTCCCTGCTGAAGCCTCTGTTTCCCTCGGCTGGCAGCC
TTTCTCAACAGTATGTGTCTCGGTCAGCCGAAAAGCTGTGGGAACTGCAGCAT
GAGATTGAGATGTATCGCCAGTCCGTCATTGCCCAGTGGAAAGGCAATGAACTTG
GACGTGGTGCTAACCCCATGCTGGGTCTGCTCTGGATTTGAACACACCCGGG
CAGAGCCACAGGGGCTATCAGCTACACTGTTCTCTATAACTGCCTGGACTTCCC
TGCGGGGGTGGTGCCTGTCACCACTGTGACCGCTGAGGACGATGCCCAGATG
GAACTACAAAGGCTACTTTGGGGATATGTGGGACAACATTCTGAAGAAGGGC
ATGAAAAGGGTATAGGCCTGCCTGTGGCTGTGCAGTGCGTGGCTCTGCCCTG
GCAGGAAGAGCTGTGTCTGCGGTTTCATGCGGGAGGTGGAACGGCTGATGACC
CCTGAAAAGCGGCCATCTTGAAGTAGTGTTATCAAGCTTGCGGGCCGCAAGGGC
GAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGG
GCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCCTGACCGTCTGTTTTACAA
CGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACAT
CCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTC
CCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATT
AAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGC
GCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTCCGCC
GGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGT
GCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTACGTAGT
GGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTT
TTAATAGTGGACTCTTGTTCAAAACACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCT
ATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAG
CTGATTTAACAAAATTTAACGCGAATTTAACAAAATTCAGGGCGCAAGGGCTG
CTAAAGGAAGCGGAACACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACGGTGCTGACCCC

GGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAGGGAAAACGCAAGCGCAAAG
AGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGT
TTTATGGACAGCAAGCGAACCGBAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGG
TTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTTTCTTGCCGCCAAGGATCTGAT
GGCGCAGGGGATCAAGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATG
ATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCT
ATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTT
CCGGCTGTCAGCGCAGGGGGCGCCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCG
GTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCAC
GACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAAGGG
ACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCCCACCTT
GCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATAC
GCTTGATCCGGCTACCTGCCATTGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGC
GAGCACGTAICTGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAA
GAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCA
TGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAAT
ATCATGGTGGAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGT
GTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGA
GCTTGCGGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTC
CCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAATTG
AAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTT
GCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAA
GATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAAC
AGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGC
ACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAA
GAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCA
CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGT
GCTGCCATAACCATGAGTGATAAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATC
GGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAC
CGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCG
TGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGG
CGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGA
TAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGC
TGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGG
GGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAG

GCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATT
AAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAA
ACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGA
CCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAA
AGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCA
AACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAAGAGCTACC
AACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTT
CTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCT
ACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAG
TCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGA

8.1.6 pCAGIG-HA-FAAH

GGTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAG
TTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGC
CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTT
CCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTAC
GGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC
CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGA
CCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTAC
CATGGTTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTC
CCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGG
CGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGC
GGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGGCGGAGCCAATCAGAGCGGCGCGC
TCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGGCGGGCCCTATAAAAAG
CGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCGC
TCCGCGCCGCTCGCGCCCGCCCGGCTCTGACTGACCGCGTACTCCC
ACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGG
TTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCC
GGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGT
GTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGC GGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGC
GCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAG
CGCGGCCGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAA
GGCTGCGTGC GGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCG
GCGGTGCGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCAC
GGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCC

GTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCC
GCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCGGAGCGC
CGGCGGCTGTGAGGGCGGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGT
GCGAGAGGGCGCAGGGACTTCTTTGTCCCAAATCTGGCGGAGCCGAAATCTG
GGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGGGCGC
CGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCG
TCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTC
GGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGGCGGCT
CTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTTCTACAGCTCCTGGG
CAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCCTCGAGGAT
ATCGCGGCCGCAAGCTTACTAGTGTTCATGTATCCGTATGATGTTCTGATTAT
GCTAGCCTCGAATTCGATAACATGGTGCTGAGCGAAGTGTGGACCGCGCTGTC
TGGACTCTCCGGGGTTTGCCTAGCCTGCAGCTTGCTGTGCGGCGGCGGTGGTCC
TGCGATGGACCAGGAGCCAGACCGCCCGGGGCGCGGTGACCAGGGGCGCGGC
AGAAGCAGCGAGCCGGCCTGGAGACCATGGACAAGGCGGTGCAGCGCTTCCG
GCTGCAGAATCCTGACCTGGATTCAGAGGCCTTGCTGGCTCTGCCCTGCTCC
AACTGGTACAGAAGTTACAGAGTGGGGAAGTGTCCCCAGAAGCTGTGCTCTTTA
CCTACCTGGGAAAGGCCTGGGAAGTGAACAAAGGGACCAACTGTGTGACCTCC
TATCTGACTGACTGTGAGACTCAGCTGTCCCAGGCCCCACGGCAGGGCCTGCT
CTATGGCGTCCCCGTGAGCCTCAAGGAATGCTTCAGCTACAAGGGCCATGCTT
CCCACTGGGCTTAAGTTTGAACGAGGGTGTGACATCGGAGAGTGACTGTGTG
GTGGTGCAGGTACTGAAGCTGCAGGGAGCTGTGCCCTTTGTGCACACCAACGT
CCCCAGTCCATGCTAAGCTATGACTGCAGTAACCCCTCTTTGGCCAGACCAT
GAACCCGTGGAAGCCCTCCAAGAGTCCAGGAGGTTCCCTCAGGGGGTGAGGGG
GCTCTCATTGGATCTGGAGGCTCCCCTCTGGGTTTAGGCACTGACATCGGCGG
CAGCATCCGGTTCCCTTCTGCCTTCTGTGGCATCTGTGGCCTCAAGCCTACTGG
GAACCGCCTCAGCAAGAGTGGCCTGAAGAGCTGTGTTTATGGACAGACAGCAG
TGCAGCTTTCTGTTGGCCCCATGGCACGGGATGTGGATAGCCTGGCATTGTGC
ATGAAAGCCCTACTTTGTGAGGATTTGTTCCGCTTGGACTCCACCATCCCCCC
TTGCCCTTCAGGGAGGAGATCTACAGAAGTTCTCGACCCCTTCGTGTGGGATAC
TATGAAACTGACAACTACACCATGCCCACTCCAGCCATGAGGAGGGCTGTGATG
GAGACCAAGCAGAGTCTCGAGGCTGCTGGCCACACGCTGGTCCCCTTCTTACC
AAACAACATACCTTATGCCCTGGAGGTCCTGTGCGCAGGTGGGCTGTTCAGTGA
TGGTGGCTGCTCTTTTCTCCAAAAGTCAAAGGCGACTTTGTGGATCCCTGCTT
GGGGGACCTGGTCTTAGTGCTGAAGCTGCCCAGGTGGTTTAAAAAAGTGTGA

GCTTCCTGCTGAAGCCTCTGTTTCCTCGGCTGGCAGCCTTTCTCAACAGTATGT
GTCCTCGGTCAGCCGAAAAGCTGTGGGAACTGCAGCATGAGATTGAGATGTAT
CGCCAGTCCGTCATTGCCAGTGGAAGGCAATGAACTTGGACGTGGTGCTAAC
CCCCATGCTGGGTCTGCTCTGGATTTGAACACACCCGGGCAGAGCCACAGGGG
CTATCAGCTACACTGTTCTCTATAACTGCCTGGACTTCCCTGCGGGGGTGGTGC
CTGTCACCACTGTGACCGCTGAGGACGATGCCAGATGGAACACTACAAAGGC
TACTTTGGGGATATGTGGGACAACATTCTGAAGAAGGGCATGAAAAAGGGTATA
GGCCTGCCTGTGGCTGTGCAGTGGCTGCTGCCCTGGCAGGAAGAGCTGT
GTCTGCGGTTTCATGCGGGAGGTGGAACGGCTGATGACCCCTGAAAAGCGGCCA
TCTTGAAGTAGTGTTATCAAGCTTGCGGCCGCTACGTAAATTCCGCCCCCCCC
CCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAG
GCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATTGCCGTCTTTTGGCAA
TGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTC
TTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAG
TTCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTCAGGC
AGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTA
TAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATA
GTTGTGGAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAG
GATGCCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCAC
ATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCA
CGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAACACGATGATAATATGGCCACAACCATGG
TGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCT
GGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGC
GATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCT
GCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGACGTGCT
TCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATG
CCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTA
CAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATC
GAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCT
GGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAA
CGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGC
AGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCT
GCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCA
ACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATC
ACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGGCCGCCAGCACAGTG

GTCGATCGACCAATGCCCTGGCTCACAAATACCACTGAGATCTTTTTCCCTCTG
CCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAAT
AAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTGTGTCTCTCACTC
GGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTT
AGAGTTTGGCAACATATGCCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTTGGCTAT
AAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTCCATAG
AAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTTATATTTTGTGTTATTTTTTC
TTAACATCCCTAAAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCTCCTCT
CCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGGAGATCCCTCGACCT
GCAGCCCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTT
ATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCT
GGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCG
CTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGC
AACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTC
CGCCCATCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAG
GCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGG
CCTAGGCTTTTTGCAAAAAGCTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAATA
AAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTT
GTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCCGCTGCATTAA
TGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCG
CTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTA
TCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCA
GGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGC
CGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAA
TCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGG
CGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTA
CCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCT
CACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGT
GTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCG
TCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTG
GTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGT
GGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGC
TGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAA
CCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAA
AAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGT

GGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTT
CACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATG
AGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGC
GATCTGTCTATTTTCGTTCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACT
ACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGA
CCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGG
CCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATT
GTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTG
TTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCAT
TCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCA
AAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCG
CAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCC
ATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAA
TAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATAC
CGCGCCACATAGCAGA ACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGG
GCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCAC
TCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGA
GCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAA
ATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTT
ATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGG
GGTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTG

8.1.7 pCAGIG-floxstop-HA-FAAH

GGTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAG
TTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGC
CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCC
CCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTAC
GGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC
CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGA
CCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTAC
CATGGTTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTC
CCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGG
CGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGC
GGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGC
TCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGGGCGGCCCTATAAAAAG

CGAAGCGCGCGGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCGC
TCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCC
ACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGG
TTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCC
GGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGT
GTGTGCGTGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGC
GCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAG
CGCGGCCGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAA
GGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCG
GCGGTGCGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCAC
GGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCC
GTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCC
GCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCGGAGCGC
CGGCGGCTGTGAGGGCGCGGCGAGCCGCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGT
GCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGGCGGAGCCGAAATCTG
GGAGGCGCCGCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGGGCGC
CGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCG
TCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTC
GGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCT
CTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTTCTACAGCTCCTGGG
CAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCCTCGAGGAT
ATCATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATGCAATAAAAAGACAGAATA
AAACGCACGGTGTTGGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTCCGGTCCCAGGAA
TAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGAATCGATAGT
ACTAACATACGCTCTCCATCAAACAAAACGAAACAAAACAACTAGCAAATAG
GCTGTCCCCAGTGCAAGTGCAGGTGCCAGAACATTTCTCTATAACTTCGTATAG
CATAACATTATACGAAGTTATTTAATTAAGGATCCGAATTCAAGCTTACTAGTGTTA
TCGCGGCCGCAAGCTTACTAGTGTTCCATGTATCCGTATGATGTTCCCTGATTATG
CTAGCCTCGAATTCGATAACATGGTGCTGAGCGAAGTGTGGACCGCGCTGTCT
GGACTCTCCGGGGTTTGCCTAGCCTGCAGCTTGCTGTGCGGCGGCGGTGGTCCT
GCGATGGACCAGGAGCCAGACCGCCCGGGGCGCGGTGACCAGGGCGCGGCA
GAAGCAGCGAGCCGGCCTGGAGACCATGGACAAGGCGGTGCAGCGCTTCCGG
CTGCAGAATCCTGACCTGGATTACAGAGGCCTTGCTGGCTCTGCCCTGCTCCAA
CTGGTACAGAAGTTACAGAGTGGGGAACTGTCCCAGAAGCTGTGCTCTTTACC
TACCTGGGAAAGGCCTGGGAAGTGAACAAAGGGACCAACTGTGTGACCTCCTA

TCTGACTGACTGTGAGACTCAGCTGTCCCAGGCCCCACGGCAGGGCCTGCTCT
ATGGCGTCCCCGTGAGCCTCAAGGAATGCTTCAGCTACAAGGGCCATGCTTCC
ACACTGGGCTTAAGTTTGAACGAGGGTGTGACATCGGAGAGTACTGTGTGGT
GGTGCAGGTACTGAAGCTGCAGGGAGCTGTGCCCTTTGTGCACACCAACGTCC
CCCAGTCCATGCTAAGCTATGACTGCAGTAACCCCCTCTTTGGCCAGACCATGA
ACCCGTGGAAGCCCTCCAAGAGTCCAGGAGGTTCCCTCAGGGGGTGAGGGGGC
TCTCATTGGATCTGGAGGCTCCCCTCTGGGTTTAGGCACTGACATCGGCGGCA
GCATCCGGTTCCCTTCTGCCTTCTGTGGCATCTGTGGCCTCAAGCCTACTGGGA
ACCGCCTCAGCAAGAGTGGCCTGAAGAGCTGTGTTTATGGACAGACAGCAGTG
CAGCTTTCTGTTGGCCCCATGGCACGGGATGTGGATAGCCTGGCATTGTGCAT
GAAAGCCCTACTTTGTGAGGATTTGTTCCGCTTGACTCCACCATCCCCCCTT
GCCCTTCAGGGAGGAGATCTACAGAAGTTCTCGACCCCTTCGTGTGGGATACTA
TGAAACTGACAACTACACCATGCCACTCCAGCCATGAGGAGGGCTGTGATGG
AGACCAAGCAGAGTCTCGAGGCTGCTGGCCACACGCTGGTCCCCTTCTTACCA
AACAAACATACCTTATGCCCTGGAGGTCCTGTCCGCAGGTGGGCTGTTCAAGTAT
GGTGGCTGCTCTTTTCTCCAAAACCTCAAAGGCGACTTTGTGGATCCCTGCTTG
GGGACCTGGTCTTAGTGCTGAAGCTGCCAGGTGGTTTAAAAACTGCTGAG
CTTCCTGCTGAAGCCTCTGTTTCCTCGGCTGGCAGCCTTTCTCAACAGTATGTG
TCCTCGGTCAGCCGAAAAGCTGTGGGAACTGCAGCATGAGATTGAGATGTATC
GCCAGTCCGTCATTGCCAGTGGAAGGCAATGAACTTGGACGTGGTGCTAACC
CCCATGCTGGGTCCTGCTCTGGATTTGAACACACCGGGCAGAGCCACAGGGGC
TATCAGCTACACTGTTCTCTATAACTGCCTGGACTTCCCTGCGGGGGTGGTGCC
TGTCACCACTGTGACCGCTGAGGACGATGCCAGATGGAACACTACAAAGGCT
ACTTTGGGGATATGTGGGACAACATTCTGAAGAAGGGCATGAAAAAGGGTATAG
GCCTGCCTGTGGCTGTGCAGTGCCTGGCTCTGCCCTGGCAGGAAGAGCTGTGT
CTGCGGTTTCATGCGGGAGGTGGAACGGCTGATGACCCCTGAAAAGCGGCCATC
TTGAACTAGTGTTATCAAGCTTGCGGCCGCTACGTAAATTCCGCCCCCCCCC
CCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGC
CGGTGTGCGTTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATG
TGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTT
CCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTC
CTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGC
GGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAA
GATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGT
TGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGA

TGCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACAT
GCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACG
GGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAACCATGGTG
AGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGG
ACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGA
TGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGC
CCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTC
AGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
CGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACA
AGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGA
GCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGG
AGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACG
GCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAG
CTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCGACGGCCCCGTGCTGCT
GCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACG
AGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACT
CTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGGCCGCCAGCACAGTGGT
CGATCGACCAATGCCCTGGCTCACAAATACCACTGAGATCTTTTTCCCTCTGCC
AAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAA
GGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTGTGTCTCTCACTCGGA
AGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGA
GTTTGGCAACATATGCCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTTGGCTATAAA
GAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTCCATAGAAA
AGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTATATTTTGTGTTATTTTTTTCTTT
AACATCCCTAAAATTTTCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCTCCTCTCCT
GACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGGAGATCCCTCGACCTGC
AGCCCAAGCTTGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATC
CGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGG
GTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTT
TCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAAC
CATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCCG
CCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGC
CGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCT
AGGCTTTTGCAAAAAGCTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAG
CAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTG

GTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCCGCTGCATTAATGA
ATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGC GTATTGGGCGCTCTTCCGCTTC
CTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTTCCGGCTGCGGGCAGCGGTATCAG
CTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAA
AGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCG
TTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGA
CGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTT
TCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCG
GATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAC
GCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTG
CACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTT
GAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAA
CAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGT
GGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGA
AGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCA
CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAA
AAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGA
ACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCAC
CTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTA
AACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGAT
CTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACG
ATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCC
ACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCG
AGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTG
CCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGC GCAACGTTGTTGC
CATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTAG
CTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAA
AGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGT
GTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCC
GTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGT
GTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCG
CCACATAGCAGA ACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGA
AAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGT
GCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAA
AAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGT

TGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTG
TCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTT
CCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTG

8.2 Identifikation der generierten Plasmide

Plasmid	Restriktionsenzym	Resultierende Banden
<i>pCAGIG</i>	<i>HindIII</i>	4507 bp 1609 bp
<i>pCAGIG-HA-FAAH</i>	<i>BamHI</i>	4994 bp 2616 bp 337 bp
<i>pCAGIG-floxstop-HA-FAAH</i>	<i>SpeI</i>	4415 bp 2037 bp 1799 bp (26 bp)
<i>HA-FAAH in pCRII-TOPO</i>	<i>HindIII</i>	3926 bp 1817 bp s(69 bp)

Danksagung

Ich danke (entfernt) für die Betreuung der Doktorarbeit, für die Möglichkeit der Promotion in seiner Arbeitsgruppe und für seine hilfreichen Hinweise und Ratschläge bei unerwarteten Versuchsergebnissen.

(Entfernt) möchte ich für ihre engagierte unmittelbare Betreuung der Doktorarbeit sowie für ihr Verständnis, ihre Genauigkeit und ihre ständige Verfügbarkeit bei Fragen und Problemen danken.

Vielen Dank an (entfernt) und (entfernt), die mir die meisten Labortechniken beigebracht und mir mit ihrer Erfahrung und Hilfsbereitschaft das ein oder andere Experiment gerettet haben.

Danke auch an (entfernt) für ihre Hilfe bei den Zellkulturexperimenten.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die herzliche und wertschätzende Aufnahme sowie die Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft, mit der mir begegnet wurde.

Für die Möglichkeit, die *in utero*-Elektroporation zu erlernen möchte ich mich beim Leiter des Translational Animal Research Centers, (entfernt), sowie für das persönliche Training bei (entfernt) bedanken.

Schließlich danke ich meiner Familie für ihre dauerhafte Unterstützung und Motivation und insbesondere meiner Frau, die geduldig das Korrekturlesen der ersten Fassungen übernommen hat.

Lebenslauf

(entfernt)