INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von Diplom-Chemiker Wolfram Bernhard Schleich aus Konstanz

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Clomeleon Biosensor-Mauslinien zur optophysiologischen Bestimmung der intrazellulären Chloridkonzentration in Nervenzellen

Gutachter: Prof. Dr. Peter H. Seeburg PD Dr. Thomas Kuner

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen, als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Des Weiteren erkläre ich, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt oder die Dissertation in dieser oder einer anderen Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, 9. Februar 2006

Wolfram B. Schleich

Meinen lieben Eltern gewidmet

Clomeleon Biosensor-Mauslinien zur optophysiologischen Bestimmung der intrazellulären Chloridkonzentration in Nervenzellen

Zusammenfassung

Chlorid hat eine weitreichende Bedeutung für die neuronale Signalverarbeitung. Seine intrazelluläre Konzentration entscheidet, ob GABA oder Glyzin eine erregende oder hemmende Wirkung auf Nervenzellen haben. Entgegen seiner physiologischen Bedeutung stehen nur wenige, mit Problemen in der Anwendung behaftete Techniken zur Verfügung, um intrazelluläre Chloridkonzentrationen messen zu können.

Clomeleon ist ein ratiometrischer, genetisch kodierter Chloridindikator bestehend aus einer Fusion von cyan- und gelb-fluoreszierendem Protein, der nichtinvasive Chloridmessungen an lebendem Gewebe erlaubt. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Strategien diesen Indikator in Biosensor-Mauslinien nutzbar zu machen und deren Anwendbarkeit anhand der Frage nach der Entwicklungsabhängigkeit der Chloridkonzentration von Neuronen zu testen.

Es wurden sieben Linien transgener Mäuse generiert, die den Indikator unter Kontrolle des *Thy1*-Promotors exprimieren. Die Linien unterschieden sich in dem Expressionsmuster von Clomeleon. Generell wurde in diesen Linien eine weitverbreitete und hohe Expression des Indikators gefunden. Diese Mauslinien sind für Populations-Imaging gut geeignet. Einzelzell-Imaging ist durch die dichte Expression anspruchsvoll und verlangt nach einem quantitativen Ansatz, der unter definierten Messbedingungen die Ermittlung eines Hintergrundes erlaubt. Unter Beachtung dieser Einschränkung konnte an akuten Hirnschnitten dieser Linie der postulierte Abfall intrazellulärer Chloridkonzentrationen in Nervenzellen nach der Geburt gezeigt werden. Ausgehend von einer Konzentration von 21 mM bei P5 fällt die Chlorid-konzentration bis auf 6 mM bei P20. Daraus folgt eine Umpolung der GABAergen Antwort bei P14.

Darüberhinaus wurde eine universelle Clomeleon-Indikatormauslinie auf Basis des ubiquitär aktiven ROSA26-Promotors und einer loxP-flankierten Stopp-Kassette erzeugt. Durch Verpaarung mit einer Cre-Aktivatormauslinie erlaubt diese Linie die Expression des Indikators in genetisch definierten Zellpopulationen. Dieses Konzept birgt enorme Möglichkeiten zur Verbesserung der Imagingbedingungen. Einerseits stammt alles gesammelte Licht aus derselben genetisch identifizierten Zellpopulation, was die Aussagekraft von Populationssignalen erhöht. Andererseits besteht für das Einzelzell-Imaging die Chance vereinzelt stehende markierte Zellen zu erhalten, was die für quantitatives Imaging notwendige Hintergrundsbestimmung vereinfacht. Durch die niedrige Expression von Clomeleon in Nervengewebe sind intensitätsbasierte Imagingmethoden nur sehr eingeschränkt möglich, die Verwendung von 2P FLIM bietet jedoch eine sehr erfolgversprechende Möglichkeit, quantitative Messungen trotz der niederen Fluoreszenz durchführen zu können.

Ein vergleichbares Konzept verfolgten wir durch Kombination von viralen Gentransfer und Techniken konditionaler Genaktivierung. Hier gelang es durch Infektion mit dem für Zellen völlig untoxischen rekombinanten AAV1/2-Virus in transgenen Aktivator-Mauslinien eine ausserordentlich hohe Expression von Clomeleon in genetisch definierten Nervenzellen zu erhalten. Diese Situation schafft ideale Voraussetzungen für das Imaging einzelner Zellen.

Es konnte gezeigt werden, dass die chronische Expression von Clomelon in Biosensor-Mauslinien erfolgreich zur nichtinvasiven, optophysiologischen Darstellung der intrazellulären Chloridkonzentration eingesetzt werden können. Damit steht ein neues Werkzeug zur Verfügung, mit welchem viele, bisher experimentell nicht zugängliche biologische Fragestellungen nunmehr untersucht werden können.

Clomeleon biosensor mouse lines for optophysiological determination of intracellular chloride concentration in neurons

Summary

Chloride is of eminent relevance for neural signal processing. Its intracellular concentration determines whether GABA or glycine excite or inhibit neurons. Despite its physiological relevance only a few techniques are available to measure intracellular chloride concentrations. Clomeleon is a ratiometric genetically encoded indicator comprising a fusion of cyan and yellow fluorescent protein that allows noninvasive chloride measurements in living tissue. The work presented here deals with strategies to make this indicator available in biosensor mouse lines and to test their applicability by investigating the developmental dependence of chloride concentration in neurons.

Seven mouse lines that express the indicator under control of *Thy1* promotor have been generated. Each line exhibits a distinct expression pattern. Generally widespread and high expression of the indicator is observed. These lines are well suited for population imaging. Single-cell imaging is challenging due to the dense expression but became feasible by applying a quantitative approach that allowed for the determination of autofluorescence background by comparison with wildtype tissue. By considering these constraints the postulated decrease in intracellular chloride of neurons could be shown using acute slices. Starting from a concentration of 21 mM at p5 the concentration drops to 6 mM at p20 in CA1 neurons. That means an inversion of a GABAergic response around p14.

Furthermore a universal chloride indicator mouse line was engineered making use of the ubiquitously active ROSA26 promotor and a loxP-flanked stop-cassette. This mouse line allows for expression of Clomeleon in a genetically defined cell population by a simple breeding scheme. This concept harbors enormous possibilities to improve imaging conditions. On the one side all collected light originates from the same genetically identified population augmenting the significance of population experiments. On the other side this concept increases the chance to obtain a sparse labeling facilitating background acquisition so vital for single-cell measurements. Due to the low expression levels in neural tissue, intensity based measurements are hardly feasible. The employment of 2P FLIM holds promise to conduct experiments despite low fluorescence.

We pursued a similar labeling concept by combining virus-mediated gene transfer and techniques of conditional gene expression. We succeeded in achieving high levels of Clomelon expression in genetically defined neurons of an activator mouse line by infecting with the non-toxic AAV1/2 virus. This situation provides best conditions for single cell imaging.

We showed that chronic expression of Clomelon in biosensor mouse lines enables successful non-invasive optophysiological recordings of intracellular chloride concentrations. This establishes a new tool for answering many questions that were experimentally inaccessible up to now.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1		
	1.1 Die Polarität einer GABA- oder Glycin-Antwort			
	1.2 Chlorid-Transporter	4		
	1.3 Chlorid-Kanäle	6		
	1.4 Chlorid Messung	8		
	1.5 Genetisch kodierte Indikatoren	8		
	1.6 Clomeleon	.10		
	1.7 Expressionssysteme	.12		
	1.8 <i>Thy1</i> -Transgen	.14		
	1.9 Konditionale Modelle	.14		
	1.9.1 Cre/loxP	.15		
	1.9.2 Das Tet-System	.15		
	1.10 Der ROSA26-Lokus	.16		
	1.11 Viraler Gentransfer	.18		
	1.11.1 Sindbis-Viren	.18		
	1.11.2 Adenoassoziierte Viren	.18		
	1.12 Ziel der Arbeit	. 19		
2	Ergebnisse	.20		
	2.1 Herstellung von Clomeleon Biosensor-Mauslinien und deren Charakterisierung	.20		
	2.1.1 <i>Thy1</i> -Clomeleon	.20		
	2.1.2 ROSA26-floxSTOP-Clomeleon (ROSAC1)	.24		
	2.1.3 Chronische Expression von Clomeleon	.32		
	2.2 Untersuchung von [Cl] _i in neuronalen Geweben	.34		
	2.2.1 Kalibrierung in primären hippokampalen Neuronen	.34		
	2.2.2 Bestimmung von [Cl ⁻] _i an akuten Hirnschnitten der Linie CLM11	.38		
	2.2.3 Zeitliches Auflösungsvermögen der Indikatoren	.45		
_	2.2.4 Clomeleon Expression durch virale Infektionssysteme	.46		
3	Diskussion	.50		
	3.1 Präparat	. 53		
	3.2 Mikroskopie	.55		
	3.3 Chronische Expression und Integrität	.56		
	3.4 Kalibrierung	.56		
	3.5 <i>Thy1</i> -Clomeleon	.59		
	3.6 ROSA26-floxSTOP-Clomeleon (ROSAC1)	.60		
	3.7 Clomeleon Expression durch virale Infektionssysteme	.61		
	3.8 Bestimmung der Entwicklung der postnatalen Chloridkonzentration an akuten	()		
	Hirnschnitten der Linie CLM11	.63		
	3.9 Verbesserungen an Clomeleon	.67		
	3.10 Zusammenfassung und Ausblick	.68		
4	Material und Methoden	.70		
	4.1 Genetische Fechniken	. /0		
	4.1.1 Molekularbiologische Standardmethoden	. /0		
	4.1.2 Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i>	. /0		
	4.1.5 Sequenzierung	. /0		
	4.1.4 Isolierung genomischer DNS aus ES-Zellen für PCR-Analyse	. /0		
	4.1.5 Hochmolekulare genomische DNS aus ES-Zellen für die Southern-Analyse	. /]		
	4.1.0 Southern Blot-Analyse	. / 1		
	4.1./ Kadioaktive Markierung von Sonden und Hybridisierung	. 12		
	4.1.8 Genotypisterung der mutanten Mauslinien mittels PCK	. 12		

4.	2 Pro	otein Biochemie	73
	4.2.1	Isolierung von Proteinen aus <i>E. coli</i>	.73
	4.2.2	Kinetische Messungen mit Hilfe des Stopped-Flow-Apparates	73
	4.2.3	Protein-Präparation aus Hirngewebe und Proteinkonzentrationsbestimmung	.74
	4.2.4	Western Blot	.75
4.	3 Im	munhistochemie	.75
	4.3.1	Immunohistochemische Untersuchungen von Vibratom-Gewebeschnitten	.75
4.	4 Vii	rale Techniken	.76
	4.4.1	Herstellung rekombinanter Sindbis-Virenpartikel	.76
	4.4.2	Herstellung rekombinanter adenoassoziierter Viren	.76
	4.4.3	Stereotaktische Injektionen	.77
4.	5 Zel	llkultur und ES-Zellkultur	. 77
	4.5.1	Primäre hippokampale Zellkultur der Ratte	77
	4.5.2	Gene Targeting	.78
	4.5.3	Transfektion von pMC-Cre zur Cre-vermittelten Rekombination in vitro	. 79
	4.5.4	Blastozysteninjektion	. 79
4.	6 Ka	librierung	. 79
	4.6.1	Kalibrierung durch patch-clamp	. 79
	4.6.2	Kalibrierung über Ionophore	.80
4.	7 Qu	antitatives Imaging an akuten Schnitten	.81
	4.7.1	Akute parasagittale Hirnschnitte	.81
	4.7.2	Quantitatives Chloridimaging	. 82
	4.7.3	pH-Korrektur	. 84
	4.7.4	Zwei-Photonen-geführte Patch-Clamp-Ableitungen	. 84
5	Abkürz	zungsverzeichnis	.85
6	Referen	nzen	.86
7	Danksa	gung	.97

1 Einleitung

Ursprünglich wurde angenommen, dass Zellmembranen Chloridleitfähigkeiten besitzen und sich die intrazelluläre Chloridkonzentration so einstellt, dass das Gleichgewichtspotenzial für Chlorid dem Membranpotenzial entspricht (ECCLES, 1964). Chlorid wäre also ein passives Gegenion ohne eigene Bedeutung in der Signaltransduktion. Viele frühe Untersuchungen wurden am Muskel gemacht, für den diese Annahme bedingt zutreffend ist. Für Nervenzellen wurde erst später gefunden, dass sich die intrazelluläre Chloridkonzentration nicht passiv dem Membranpotenzial folgend einstellt, sondern eine davon abweichende Konzentration annimmt. Die daraus folgende Triebkraft für Chlorid und der Zusammenbruch des Chloridgradienten auf Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren (Kaila, 1994) hin, wurden erst später als Mechanismen erkannt, die zu Inhibition führen (Barker and Ransom, 1978; Wong and Watkins, 1982). Ein Zustand indem das Gleichgewichtspotenzial von Chlorid nicht dem RMP entspricht und die intra- und extrazelluläre Chloridkonzentration sich nicht im elektrochemischen Gleichgewicht befinden, ist aber nur durch die Existenz von Transportmechanismen zu erreichen (Misgeld et al., 1986). Dieser Befund impliziert, dass Chlorid eine bedeutendere Rolle zukommt, als die alleinige Funktion eines Gegenions zum Zwecke des Ladungsausgleichs. So ergeben sich eine ganze Reihe interessanter Fragestellungen. Wenn ein Potenzial für Chlorid über die Membran besteht, spielt dieses Potenzial eine Rolle in der neuronalen Signalverarbeitung? Kann die intrazelluläre Chloridkonzentration und damit das Potenzial von Chlorid so eingestellt werden, dass sich Auswirkungen auf die Signalverarbeitung ergeben? So wird angenommen, dass die Polarität einer GABAvermittelten Änderung des Membranpotenzials vom Verhältnis intra- zu extrazellulärer Chloridkonzentration abhängt. Gibt es Unterschiede in der Chloridkonzentration innerhalb einer Zelle wie in Abbildung 1.1 skizziert? Was wäre die funktionelle Relevanz für die neuronale Verrechnung? Welche Rolle spielen dynamische Prozesse? Könnte es sein, dass eine Änderung der intrazellulären Chloridkonzentration auf GABAerge Stimulation hin die Interpretation weiterer Stimulation beeinflusst? So wurde gezeigt, dass wiederholte Aktivierung GABA-aktivierter Chloridkanäle die Größe postsynaptischer inhibitorischer Potenziale verringert (Thompson and Gahwiler, 1989a; Thompson and Gahwiler, 1989b; Thompson and Gahwiler, 1989c; Huguenard and Alger, 1986).



Abb. 1.1: Bestehen innerhalb einer Zelle Unterschiede in der Chloridkonzentration? Eine unterschiedliche Chloridkonzentration an verschieden Orten einer Zelle könnte eine jeweils unterschiedliche Interpretation eines GABAergen Signals bedeuten.

1.1 Die Polarität einer GABA- oder Glycin-Antwort

Welcher Faktor bestimmt, welche Antwort die Ausschüttung der Neurotransmitter GABA (γ -Aminobuttersäure) oder Glycin durch Interaktion mit Chloridleitfähigkeiten hervorruft? In der Regel verursachen diese Neurotransmitter in reifen Neuronen durch Chlorideinstrom eine Hyperpolarisation, die das Membranpotenzial von der Auslöseschwelle eines Aktionspotenzials entfernt. Im jungen Tier jedoch, d.h. für Maus bzw. Ratte bis einige Tage nach der Geburt (Owens et al., 1996; LoTurco et al., 1995; Cherubini et al., 1991), ruft die Applikation von GABA eine Depolarisation hervor. Dieser verblüffende Effekt lässt sich zwanglos über die intrazelluläre Chloridkonzentration erklären.

Das Gleichgewichtspotenzial von Chlorid E_{Cl} wird durch die Nernst-Gleichung beschrieben:

$$E_{Cl^{-}} = -\frac{RT}{ZF} \cdot \ln\left(\frac{[Cl^{-}]_{i}}{[Cl^{-}]_{o}}\right)$$

Dabei ist R die universelle Gaskonstante, T die Temperatur, Z die Ladung und F die Faradaykonstante.

Für eine Konzentration von 130 mM Chlorid außerhalb und 10 mM innerhalb der Zelle ergibt sich ein Gleichgewichtspotenzial von -65 mV bei einer Temperatur von 20 °C. Für eine Zelle mit einem typischen Ruhemembranpotenzial von -65 mV entsprechen sich demnach beide Potenziale (Abb. 1.2, mittlere Situation). Dies bedeutet aber, dass unter diesen Bedingungen keine Triebkraft für einen Chloridtransport durch einen geöffneten Chlorid-Kanal besteht.

Im Falle einer intrazellulären Chloridkonzentration von 5 mM beträgt das Gleichgewichtspotenzial -82 mV (Abb. 1.2, Situation rechts). Es ist somit negativer als das Ruhemembranpotenzial der Zelle, somit besteht eine Triebkraft für eine Chloridverschiebung über die Membran. Wenn eine Leitfähigkeit geöffnet wird, entsteht ein positiver Strom, d.h. für eine Chloridleitfähigkeit ein Chlorideinstrom in die Zelle gegen den elektrischen Gradienten. Dadurch sinkt das Membranpotenzial zu negativeren Werten ab – die Zelle hyperpolarisiert. Durch den teilweisen Zusammenbruch des Chloridgradienten aber erhöht sich das Gleichgewichtspotenzial von Chlorid. Wenn sich beide Potenziale angeglichen haben, ist die Triebkraft für Chloridverschiebung über die Membran gleich Null.

Wenn die intrazelluläre Chloridkonzentration 20 mM beträgt E_{Cl} -47 mV (Abb. 1.2, Situation links). Im Falle des Öffnens einer Chloridleitfähigkeit wird ein Chloridausstrom gegen den chemischen aber mit dem elektrischen Gradienten stattfinden - die Zelle depolarisiert. Durch die Ionenbewegung wird aber E_{Cl} negativer. Wenn beide Potenziale sich angeglichen haben, kommt die Triebkraft zum erliegen.



Abb. 1.2: Depolarisation versus Hyperpolarisation in Abhängigkeit des Ruhemembranpotenzials und des Gleichgewichtspotenzials von Chlorid.

Der während der postnatalen Entwicklung beobachtete Wechsel von GABAerger Depolarisation zu Hyperpolarisation ließe sich also durch eine Änderung der ionalen Zusammensetzung des Zytosols erklären, wobei bereits eine verhältnismäßig kleine Änderung der Chloridionen-Konzentration für diesen Effekt verantwortlich wäre. So ist es von großem Interesse, Aussagen über die intrazelluläre Chloridkonzentration treffen zu können.

Was mag die physiologische Rolle dieser Chloridregulation sein? Es wird beobachtet, dass im jungen Tier glutamaterge Transmission über NMDA-Rezeptoren vermittelt wird (Isaac et al., 1997; Durand et al., 1996). Bei Ruhemembranpotenzial werden diese Rezeptoren aber durch Mg²⁺-Ionen spannungsabhängig blockiert. Es wird vermutet, dass in dieser Situation GABAerge Depolarisation diese Blockade entfernt und so glutamaterge Transmission durch NMDA-Ströme ermöglicht. Den dabei einströmenden Kalziumionen wird ein trophischer Effekt zugesprochen (Ben Ari, 2002).

GABAerge Depolarisation spielt aber auch im adulten Tier eine Rolle. Neuronale Stammzellen (Tozuka et al., 2005) sowie Zellen der spinalen Hinterhorn-Ganglien (Rohrbough and Spitzer, 1996; Ault and Hildebrand, 1994) sowie des trigeminalen Kerns zeigen im adulten Tier GABA-erge Depolarisation. Ebenso spielt hohes intrazelluläres Chlorid wohl eine Rolle bei der Depolarisation olfaktorischer Rezeptor-Neurone (Kaneko et al., 2004). Auch konnte gezeigt werden, dass auf das initiale Axonsegment von Pyramidenzellen des Hippokampus projizierende axo-axonische Interneurone eine depolarisierende GABA-Antwort auslösen. In diesem Segment wird gleichzeitig eine geringe Expression des Chloridexporters KCC2 gefunden (Szabadics et al., 2006).

1.2 Chlorid-Transporter

Welches sind nun die Mechanismen, die in der Lage sind, Chloridkonzentration aus ihrer Gleichgewichtslage auszulenken? Es ist ein Mechanismus vorstellbar, bei dem Chlorid aktiv von Transportern über die Membran bewegt wird, oder ein Mechanismus, bei dem ein anderes Ion bewegt wird und Chlorid passiv folgt.

Die Kationen-Chlorid-Kotransporter (CCC) sind eine Gruppe von ladungsneutralen Sekundärtransportern (Payne et al., 2003). Das heißt, sie verschieben für jedes Chloridion auch ein Kation in gleicher Richtung über die Membran und verbrauchen für den Transport kein ATP. Der Gradient des Kations über die Membran bestimmt die Richtung des Transportes und stellt gleichzeitig auch die Triebkraft dar. Die Kationengradienten wiederum werden unter ATP-Verbrauch durch die Na^+/K^+ -ATPase aufgebaut (Abb. 1.3).



Abb. 1.3: NKCCs und KCCs sind sekundär aktive ladungsneutrale Transporter. NKCC (A) nützt den Na⁺-Gradienten für den Chlorid-Import während KCC (B) den K⁺-Gradienten für die Chlorid-Extrusion nützt. Verändert nach (Payne et al., 2003)

Die CCCs untergliedern sich in den Na⁺-Cl⁻-Kotransporter (NCC), die Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Kotransporter (NKCC1, 2) und die K⁺-Cl⁻-Kotransporter (KCC1-4). Die beiden wichtigen CCCs des Zentralnervensystems sind NKCC1 und KCC2. Ersterer ist für den Chlorid-Import in Zellen verantwortlich während letzterer für die Chlorid-Extrusion sorgt. NKCC1 wird schon in früheren embryonalen Stadien in Neuronen exprimiert (Hubner et al., 2001a). Im Verlauf der Entwicklung nimmt die Expression in den meisten Formen von Neuronen ab. KCC2 wird in pränatalen Stadien in Kernen des Hirnstamms und dem Rückenmark exprimiert. KCC2-Knock-out-Mäuse sterben sofort nach der Geburt durch Übererregung des Atem-Zentrums (Hubner et al., 2001b). Im Großhirn hingegen wird KCC2 erst postnatal exprimiert (Stein et al., 2004).

Außerdem existieren die Na⁺-unabhängigen Anionen-Austauscher (AE) (Hentschke et al., 2006) sowie die Na⁺-abhängigen Anionen-Austauscher (NDAE) (Grichtchenko et al., 2001; Romero et al., 2000). Im Gegensatz zu den CCCs zeichnen sich AEs und NDAEs durch einen Antiport- bzw. einen gekoppelten Antiport-Symport-Mechanismus aus (Abb. 1.4). Bei den AEs wird eine Akkumulation von Cl⁻-Ionen durch den Austausch von HCO₃⁻- gegen Cl⁻-Ionen erzielt. NDAEs hingegen nutzen den gekoppelten Austausch von Na⁺/HCO₃⁻ gegen H⁺/Cl⁻ zur Extrusion von Cl⁻-Ionen. Diese Transporter spielen eine wesentliche Rolle bei der Regulation des intrazellulären pH-Wertes.



Abb. 1.4: Mechanismen des Chlorid-Imports (A) und der Chlorid-Extrusion (B). Verändert nach (Payne et al., 2003)

Durch Transportvorgänge kann Chlorid aus dem Gleichgewicht gebracht werden. Durch Chlorid-Leitfähigkeiten wird das Gleichgewicht wiederhergestellt. Die Vielfalt der Chlorid-Leitfähigkeiten zeigt, dass Chlorid-Gradienten in verschiedenen Geweben eine physiologische Bedeutung haben.

1.3 Chlorid-Kanäle

Der passive Chloridtransport über die Zellmembran wird von verschiedenen Klassen von Cl-Kanälen vermittelt. Man unterscheidet ligandgesteuerte (GABA, Glycin) Cl⁻-Kanäle, Ca²⁺- aktivierte Cl⁻-Kanäle, spannungsaktivierte Cl⁻-Kanäle sowie einen cAMP-regulierten Cl⁻-Kanal (Jentsch et al., 2002).

GABA- und Glycin-Rezeptoren gehören beide der "Cys-Loop" Superfamilie an (Karlin and Akabas, 1995), welche darüber hinaus noch nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren und den 5-HT₃ Serotonin-Rezeptor umfasst. GABA-Rezeptoren werden in drei unterschiedliche Typen eingeteilt: GABA_A- und GABA_C-Rezeptoren sind ionotrope CI⁻Kanäle, während es sich bei dem GABA_B-Rezeptor (Kaupmann et al., 1997) um einen metabotropen Rezeptor handelt, der durch G-Protein-Kopplung an einen K⁺-Kanal Inhibition erreicht, und vorgenannter Superfamilie nicht angehört. GABA_A-Rezeptoren unterscheiden sich von GABA_C-Rezeptoren unter anderem dadurch, dass sie durch GABA wesentlich schneller aktiviert werden und kürzer geöffnet bleiben (Öffnungszeiten bei Einzelkanalmessung: 0,5-8ms) (Twyman et al., 1990; Macdonald et al., 1989). Dadurch sind GABA_A-Rezeptoren besonders für die Übermittlung phasischer Signale geeignet. Die Aktivierung von GABA_C-Rezeptoren erfolgt langsamer und die Öffnungszeiten sind deutlich länger (150-200ms bei Einzelkanalmessung) (Johnston, 1996; Bormann and Feigenspan, 1995). GABA_C-Rezeptoren übertragen somit eher

tonische Signale. Mutationen der γ - bzw. α -Untereinheit werden mit bestimmten Formen von Epilepsie in Verbindung gebracht.

Glycin-Rezeptoren finden sich hauptsächlich im Rückenmark und im Hirnstamm, aber auch in höheren Gehirnbereichen wie dem Hippokampus, und sind die zweite wichtige Gruppe inhibierender Rezeptoren im Zentralnervensystem (Breitinger and Becker, 2002). Defekte an den Glycin-Rezeptoren (Mutationen der α_1 -Untereinheit) im Hirnstammbereich liegen spezifischen Formen der Hyperekplexie zugrunde (Shiang et al., 1993).

Die Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle untergliedern sich in zwei Gruppen (Frings et al., 2000). Zum einen gibt es Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle, die an der intrazellulären Domäne eine Ca²⁺-Bindungsstelle haben. Sie gehören zu den ligandgesteuerten Ionenkanälen und werden in olfaktorischen Rezeptorneuronen gefunden. Zum anderen existieren Ca²⁺/Calmodulin Protein-Kinase II (CaMK II)-abhängige Cl⁻-Kanäle, die sich ebenfalls bei einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration öffnen, wobei die Aktivierung dieser Kanäle jedoch nicht durch die unmittelbare Bindung von Ca²⁺, sondern indirekt über die CaMK II erfolgt. Dabei findet vermutlich eine Phosphorylierung des Kanals statt (Schild and Restrepo, 1998).

Die spannungsaktivierten Cl⁻-Kanäle bilden neun Unterklassen (CLC1-7, ClC-Ka, ClC-Kb) (Jentsch et al., 2002). Mutationen in einzelnen dieser Kanäle ließen sich mit dem auftreten von Krankheiten korrelieren (Jentsch et al., 2004). So führen Defekte in CLC-1 in Muskeln zu verzögerter Repolarisation und damit zu verzögerter Muskelrelaxation (*Myotonia congenita*). Mutationen des CLC-5 liegen bei den renalen Tubulusstörungen der Dentschen Erkrankung vor, die mit Verlust von Salzen und niedermolekularen Proteinen und Bildung von Nierensteinen einhergeht. Die Störung des ClC-5 wird mit der verlangsamten Ansäuerung von Endosomen in Verbindung gebracht. Das ClC-3 Knock-out Mausmodell zeigt eine Degeneration des Hippokampus und der Retina. Die Analyse ergab eine wichtige Rolle von ClC-3 bei der Ansäuerung synaptischer Vesikel. Untersuchungen zunächst an Knock-out-Mäusen und später auch am Menschen zeigten schließlich, dass Defekte des in Osteoklasten lokalisierten CLC-7-Kanals für die Ausbildung von Osteoporose mitverantwortlich sind.

Der cAMP-regulierte Cl⁻-Kanal (CFTR, cystc fibrosis transmembrane conductance regulator) wird in den Epithelien der Bronchien und des Darms gefunden (Tabcharani et al., 1993; Riordan et al., 1989). Er ist für Chlorid-Verschiebungen über die apikalen Zellmembranen in diesen Geweben zuständig. Mutationen des kodierenden Gens sind die Ursache für die zystische Fibrose (auch Mukoviszidose) der häufigsten autosomal-rezessiv vererbten Krankheit. Das typische Krankheitssymptom sind hochviskose Sekrete, die schwerwiegende Infekte der Atemwege begünstigen, und so einem frühen Tod der Patienten Vorschub leisten.

1.4 Chlorid Messung

Entgegen seiner hohen physiologischen Relevanz stehen nur begrenzte Möglichkeiten zur Verfügung, um intrazelluläre Chloridkonzentrationen zu messen. So bietet die Röntgen-Mikroanlyse zwar eine räumliche aber keine zeitliche Auflösung (Andersson and Roomans, 2002). Für chloridsensitive Elektroden stellt sich die Situation umgekehrt dar (Alvarez-Leefmans et al., 1988). Durch ihre Größe lassen sich nur große Zellen und diese wiederum nur am Soma untersuchen.

Eine indirekte Methode der Chloridbestimmung sind Gramicidin-perforierte Patch-clamp Ableitungen (Kyrozis and Reichling, 1995). Dabei befindet sich in der Patch-Pipette das Polypeptid Gramicidin, das sich in die Zellmembran einlagert und für Chlorid nicht permeable Poren bildet. Über die Bestimmung des Gleichgewichtspotenzials von GABAinduzierten Strömen kann auf die intrazelluläre Chloridkonzentration geschlossen werden. Neben den technischen Schwierigkeiten (Einreißen des perforierten Membranfleckens) dieser Methode ist zu beachten, dass GABA- bzw. Glycinrezeptoren neben dem Chlorid-Fluss auch einen depolarisierenden Hydrogencarbonat-Fluss zulassen (pHCO₃^{-/}pCl⁻ ~ 0,25) (Kaila et al., 1989). Es wird also das Umkehrpotenzial GABA-induzierter Ströme gemessen und nicht das Umkehrpotenzial für Chlorid.

Einen wesentlichen Vorteil gegenüber den elektrophysiologischen Methoden bietet der Einsatz CI⁻sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe, der Messungen mit einer zeitlichen und hohen räumlichen Auflösung und damit z.B. in unterschiedlichen Kompartimenten eines Neurons ermöglicht (Kaneko et al., 2004; Verkman, 1990). Es existieren verschiedene Chinolinbasierte Fluoreszenzfarbstoffe (SPQ, MEQ, MQAE), die durch Anionen in ihrer Fluoreszenz stoß-deaktiviert werden (Jayaraman and Verkman, 2000). Ein erhebliches Problem dieser chemischen CI⁻Indikatoren ist jedoch deren verhältnismäßig hohe Toxizität und geringe Helligkeit. Durch die benötigten energiereichen Anregungswellenlängen im UV-Bereich treten außerdem verstärkt phototoxische Effekte auf. Eine zelltypspezifische Befüllung ist nicht möglich ohne auf Injektionstechniken zurückgreifen zu müssen.

Der zur Gruppe der genetisch kodierten Indikatoren zählende Chlorid-Indikator Clomeleon (Kuner and Augustine, 2000) bietet die Möglichkeit zelltypspezifischer Expression. Dieses eröffnet neue Horizonte für nichtinvasive Chlorid-Messung an definierten Zellpopulationen.

1.5 Genetisch kodierte Indikatoren

Die Möglichkeit an Zellen definierter Populationen oder gar an definierten Zell-Kompartimenten messen zu können ohne direkt in die Zelle einzugreifen, bieten genetisch kodierte Indikatoren. Generell zerfallen die genetisch kodierten Indikatoren in zwei Gruppen. In der einen Gruppe wird durch genetische Hilfsmittel eine Ankergruppe an ein Protein fusioniert; an diese Ankergruppe wird mittels biokonjugater Chemie ein Fluorophor angehängt. Beispiele hierfür sind das FlAsH- (Martin et al., 2005; Griffin et al., 1998) und das AGT-System (Keppler et al., 2004). Die andere große Gruppe basiert auf fluoreszierenden Proteinen (Tsien, 1998).

In dieser zweiten Gruppe gibt es Indikatoren, die nur einen Fluorophor besitzen wie das GCaMP (Nakai et al., 2001). Hier wurden die beiden Sensordomänen mit zirkular permutiertem YFP fusioniert. Wenn Kalzium-Ionen binden, wird die sterische Änderung der Sensordomänen auf den Fluorophor übertragen (Abb. 1.5 A).

Andere Indikatoren basieren auf zwei Fluorophoren und machen sich den FRET-Effekt zunutze. So wurden Ca²⁺-Sensor Domänen zwischen CFP und YFP kloniert. Wenn Kalzium-Ionen binden, wirkt sich die sterische Änderung der Sensordomänen auf den Abstand und die Orientierung Fluorophore aus (Abb. 1.5 B) und beeinflusst damit die FRET-Effizienz (Reiff et al., 2005; Hasan et al., 2004; Miyawaki et al., 1997). In ähnlicher Weise wurden auch Indikatoren für cAMP (Zaccolo et al., 2000) oder Protease Aktivität (Nguyen and Daugherty, 2005) kloniert (Abb. 1.5 C, D). Im Falle von Clomeleon (Kuner and Augustine, 2000) hingegen, einem genetisch kodierten ratiometrischen Indikator für Chlorid, befindet sich die Sensoreigenschaft in der YFP-Spezies selber (Abb. 1.5 E).



Abb. 1.5: Verschiedene Funktionsprinzipien von genetisch kodierten Indikatoren. Im Falle von GCaMP wird die Bewegung der Sensordomänen auf den Fluorophor übertragen und ändert seine Fluoreszenzeigenschaften. Andere Indikatoren nutzen den FRET-Effekt. Clomeleon ist ein ratiometrischer Chlorid-Indikator, dessen Sensor im YFP selber enthalten ist.

1.6 Clomeleon

Der Ausgangspunkt für den Einsatz von Clomeleon als Chlorid-Sensor war die Beobachtung, dass sich die Fluoreszenz von YFP in Abhängigkeit der Halogenid-Konzentration einer YFP-Lösung ändert. Dabei verursacht eine Verringerung des Absorptionskoeffizienten (Abb. 1.6 A) mit steigender Halogenid-Konzentration eine Verringerung der Fluoreszenz des Chromophors (Abb. 1.6 B). Diese Verringerung des Absorptionskoeffizienten wird auf eine verringerte Stabilisierung der stärker absorbierenden Phenolat-Form des Chromophors durch die negative Ladung eines Halogenides erklärt (Abb. 1.6 C). Gestützt wird diese Ansicht durch eine Röntgenstruktur von YFP in der Gegenwart von Jodid, die eine Bindestelle für Jodid in unmittelbarer Nähe des Chromophors zeigt (Wachter et al., 2000). CFP hingegen wird durch Halogenide kaum beeinflusst (Abb. 1.6 B).



Abb 1.6: Abhängigkeit der YFP-Fluoreszenz von Halogeniden (A) Absorptionsspektrum von YFP in der Gegenwart von verschiedenen Chloridkonzentrationen (rekombinantes Protein, Em. 526 nm), (B) Emissionspektren von CFP und YFP in der Gegenwart von verschiedenen Chloridkonzentrationen (rekombinantes Protein, Ex. 434 nm bzw. 510 nm), (C) Modell des Fluorophors im Apo- und im Jodid-gebundenen Zustand. Die negative Ladung des Halogenids beungünstigt die Delokalisation negativer Ladung über den Fluorophor, verändert nach (Wachter et al., 2000).

Durch die Fusion von CFP und YFP wurde der ratiometrische Chloridindikator Clomeleon erhalten (Kuner and Augustine, 2000). In den Übergang von CFP zu YFP wurde eine Basensequenz kloniert, die für die Aminosäuresequenz kodiert, die das Substrat für die rTEV-Protease darstellt (Abb. 1.7 A)



Abb. 1.7: Design und Grundeigenschaften von Clomeleon (A) Clomeleon als Kofusion von CFP und YFP. Die Erkennungssequenz der rTEV Protease ist unterstrichen. (B) CFP und YFP als FRET-Partner: der spektrale Überlapp ist grau unterlegt (C) Emissionsspektrum von Clomeleon in Gegenwart unterschiedlicher Chloridkonzentrationen (rekombinantes Protein, Ex. 434 nm) (D) Beziehung zwischen dem Verhältnis der Emissionen ($F_{526 nm}/F_{476 nm}$) und der Chloridkonzentration.

Durch die Fusion von CFP und YFP erhält man eine Situation in der die Fluorophore in einer 1:1-Stöchiometrie miteinander verbunden sind. Dies erlaubt emissions-ratiometrische Messungen, die unabhängig von der optischen Weglänge und der Konzentration des Indikators sind (Abb. 1.7 B). Außerdem ist über eine Kalibrierung das Auslesen von absoluten Chloridkonzentrationen möglich (Abb. 1.7 C).

Die Emissionsbande von CFP und die Absorptionsbande von YFP weisen einen spektralen Überlapp auf (Abb. 1.7 D). Durch die geringe Distanz der beiden Fluorophore zueinander tritt ein FRET-Effekt auf (Förster, 1948). Dabei handelt es sich um eine strahlungslose Energieübertragung vom Fluorophor kürzerer Wellenlänge (Donor) auf den Chromophor längerer Wellenlänge (Akzeptor). Wenn der Donor seine Energie auf den Akzeptor überträgt, kann der Donor nicht mehr fluoreszieren, wohingegen der Akzeptor mit seiner charakteristischen Wellenlänge emittiert, sofern es sich um einen zur Fluoreszenz fähigen Chromophor handelt.

Die Effizienz Eff_{FRET} des Energieübertags hängt nach folgender Formel von der Distanz der beiden Chromophore ab:

$$Eff_{FRET} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}$$

Dabei ist der Abstand halbmaximaler Übertragungseffizienz Eff_{FRET} ist der Förster-Abstand R_0 . Der Förster-Abstand bestimmt sich nach folgender Formel:

$$R_0 = \sqrt[6]{J(\lambda) \cdot \kappa^2 \cdot \Phi_D \cdot n^{-4}} \cdot 9,7 \cdot 10^3 \text{ Å}$$

Dabei ist $J(\lambda)$ der spektrale Überlapp, κ ein Faktor, der die Orientierung der Chromophore zueinander beschreibt, Φ die Qantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors und *n* der Brechungsindex des Mediums. In die spektrale Überlappung geht aber neben der Fluoreszenzintensität des Donors $F_D(\lambda)$ auch der Absorptionskoeffizient des Akzeptors $\varepsilon_A(\lambda)$ ein. Dieser aber ändert sich für das YFP in Clomeleon, wenn ein Halogenid gebunden wird.

$$J(\lambda) = \frac{\int F_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda}{\int F_D(\lambda) d\lambda}$$

So lässt sich der FRET-Effekt für die Chlorid-Messungen nutzen. Es reicht also aus CFP alleine anzuregen. Das Verhältnis des Energieübertrags von CFP auf YFP hängt von der Chloridkonzentration ab und findet seinen Niederschlag in dem chloridabhängigen Verhältnis der Intensitäten der beiden zu beobachtenden Emissionskanäle. Zu beachten ist, dass auch der pH-Wert einen Einfluss auf die Fluoreszenz von YFP hat. Dieser Effekt ist bei Kalibrierung und Messung zu berücksichtigen (Kuner and Augustine, 2000).

1.7 Expressionssysteme

Genetisch kodierte Indikatoren werden ihre Überlegenheit erst ausspielen können, wenn sie mittels geeigneter Methoden nicht nur in Zellkultur sondern auch im Tiermodell zur Anwendung gebracht werden können. Biosensor-Mauslinien, die einen genetisch kodierten Indikator wie Clomeleon exprimieren, erlauben es den vielen offenen Fragen einen experimentellen Ansatz gegenüberzustellen. Durch den Einsatz moderner Methoden der Genetik geraten Möglichkeiten in Reichweite, die vor wenigen Jahren noch nicht vorstellbar erschienen. So sollte es möglich sein Biosensor-Mauslinien zu generieren, die das SensorProtein nur in einzelnen genetisch definierten Zellpopulationen exprimieren. Es sind sogar Biosensor-Mauslinien denkbar, in denen diese spezifische Art der Expression je nach Fragestellung in unterschiedlichen Populationen flexibel aktiviert werden kann, sodass man mit einer Mauslinie ein Hilfsmittel zur Beantwortung verschiedenster Problemstellungen zur Verfügung hat. Grundsätzlich gibt es verschiede Möglichkeiten, einen genetisch kodierten Indikator im Mausmodell zu exprimieren. Dabei zeichnen sich die verschiedenen Systeme durch spezifische Vor- und Nachteile aus.

Eine Möglichkeit sind transgene Tiere. Dabei wird das Gen, das für den Indikator kodiert, hinter ein Promotor-Fragment kloniert und diese DNS in Pronuklei injiziert. Die DNS integriert an einem zufälligen Ort in das Genom. Diese Methode ist verhältnismäßig aufwändig, entsprechende Transgen-Labore sind aber zwischenzeitlich an vielen Instituten etabliert. In der Regel erhält man Mauslinien, die das Transgen stabil transmittieren. Es kann aber bei den transgenen Linien die Schwierigkeit auftreten, dass sich das Expressionsverhalten über die Generationen verändert. Dieses Problem lässt sich durch eine Knock-in-Strategie umgehen. In diesem Fall wird eine Fremd-DNS durch homologe Rekombination an einem definierten Genort integriert. Experimentell ist die Knock-in-Strategie noch aufwändiger, da die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus durchgeführt wird. Diese Stammzellen werden in Blastozysten injiziert und nehmen an der Entwicklung des Embryos teil. Wenn sich dabei aus diesen Zellen ein Teil der Gameten bildet, besteht eine von Null verschiedene Wahrscheinlichkeit, dass Nachkommen dieser Chimäre die zusätzliche Erbinformation tragen und ihrerseits stabil transmittieren. Die große Schwierigkeit besteht darin, einen geeigneten Promotor zu finden, der die Expression des Indikators in dem Gewebe des Interesses mit ausreichender Stärke treibt. Promotoren, die ausreichend gewebespezifisch sind, exprimieren nicht notwendigerweise mit der Stärke, um das Indikatormolekül in mikro-molaren Konzentrationen zu exprimieren, die notwendig sind, um mit sinnvollem Signal/Rauschverhältnis und gewünschter zeitlicher Auflösung Imaging zu betreiben. Ein klarer Vorteil der transgenen Tiere - im Besonderen der Knock-in-Tiere - ist die einfache Reproduzierbarkeit der Experimente.

Eine zweite Möglichkeit um ein Indikatorprotein zu exprimieren, bietet der virale Gentransfer. Dabei wird das Gewebe des Interesses durch Injektion einer Suspension von rekombinanten Viren infiziert. Die transduzierten Zellen werden durch das Virus veranlasst, das Sensorprotein zu exprimieren. Nach geeigneter Inkubationszeit kann das Tier analysiert werden. Dieser Ansatz bietet eine große Flexibilität, hat aber vielleicht Nachteile auf Seiten der Reproduzierbarkeit.

Generell kann man feststellen, dass für die meisten durchzuführenden Experimente mindestens zwei Anforderungen an ein Expressionssystem gestellt werden können. Es muss Expression in einer definierten Zellpopulation erlauben und die Expression muss hinreichend stark sein. Wenn Einzelzell-Imaging das Ziel ist, sollten selbst innerhalb eines Zelltyps hinreichend wenige Zellen exprimieren, um das Signal einer Zelle von ihren Nachbarn trennen zu können. Konditionale Systeme könnten helfen, Expressionssysteme zu entwickeln, die diese Forderungen erfüllen.

1.8 Thy1-Transgen

Das *Thy1*-Promotorfragment ist ein bewährtes Mittel, um in transgenen Mauslinien hohe Proteinexpression in Prinzipal-Neuronen zu erhalten (Feng et al., 2000). Thy1 ist ein Mitglied der Immunoglobulin Superfamilie, das in Neuronen aber auch verschiedenen anderen Zelltypen (darunter den namensgebenden Thymozyten) exprimiert wird. Durch geschicktes Design der Expressionskassette ist es gelungen, die Expression auf Neurone zu beschränken. Die Kassette besteht aus einem 6,5 kbp großen Fragment, des murinen *Thy1.2* Gens und erstreckt sich vom Promotor bis zum Intron hinter Exon 4. Exon 3 und seine flankierenden Introns sind deletiert (Caroni, 1997). Sie werden durch das zu exprimierende Gen ersetzt. Die deletierten Sequenzen werden für die Expression in nicht-neuronalem Gewebe benötigt während Intronsequenzen 5' von Exon 2 für die neuronale Expression notwendig sind (Vidal et al., 1990).

1.9 Konditionale Modelle

Konditionale Mausmodelle bieten die Möglichkeit, ein Gen zelltypspezifisch und unter zeitlicher Kontrolle zu exprimieren. Dafür wurden Regulationsmechanismen aus prokaryotischen Organismen entliehen und für die Verwendung im Säugetier angepasst. Durch diesen Kunstgriff können Wechselwirkungen mit endogenen Mechanismen minimiert werden. Für das Imaging bedeutet konditionale Genexpression vor allem die Möglichkeit ausschließlich Signal von genetisch identifizierten Zellen zu sammeln.

1.9.1 Cre/loxP

Ein etabliertes System zur konditionalen Genexpression im Säugetier ist das Cre/*loxP*-System. Es besteht aus der Cre-Rekombinase aus dem Bakteriophagen P1 (Hoess et al., 1982; Hoess et al., 1986) und ihrer kognaten Erkennungssequenz (Abb. 1.18). Diese *loxP*-Elemente (locus of crossover) entsprechen einer invertierten Wiederholung ("Inverted repeat", ITR) mit einer Stammlänge von 13 Bp und einer asymmetrisch gerichteten Kernregion von 8 Bp in der Mitte. Abhängig von der Orientierung von zwei *loxP* Elementen zueinander findet entweder ein Deletions- oder Inversionsereignis statt. Die Deletion ist quasi irreversibel wohingegen die Inversion reversibel ist.



Abb. 1.8: Schematische Darstellung Cre-vermittelter Rekombination (A) Nukleotidsequenz des *loxP*-Elementes mit der asymmetrischen Kernregion und den flankierenden Inverted repeats. (B) Cre-vermittelte Rekombination eines mit *loxP*-Elementen flankierten Sequenzbereiches; abhängig von der Orientierung der Erkennungsstellen zueinander kommt es zur Deletion oder Inversion.

1.9.2 Das Tet-System

Die regulatorischen Elemente des vom Transposon 10 (Tn10) stammenden Tetracyclin (Tc)-Resistenz Operons aus *E. coli* wurden für die Generierung Tetracyclin-abhängiger Expressionssysteme angepasst. Im ursprünglichen, bakteriellen System verhindert die Bindung des dimeren Tet-Repressors (*TetR*) an die spezifische Operatorsequenz (*tetO*) des Tc-Promotors die Transkription des Tetracyclin-Resistensgens *tetA*. Die Bindung von Tetracyclin an *tetR* bewirkt eine allosterische Konformationsänderung des *tetR*, was zu dessen Dissoziation von der Operatorsequenz führt und die Transkription des *tetA*-Gens ermöglicht (Hillen and Berens, 1994). Durch Fusion mit der C-terminalen VP16-Transaktivatordomäne des *H. simplex* Virus wurde der ursprüngliche Tet-Repressor in den Tetracyclin-abhängigen Transaktivator (tTA) umgewandelt (Gossen and Bujard, 1992). Der tTA-abhängige Promotor (Ptet) besteht aus einer Fusion der Minimalsequenz des humanen CMV (Cytomegalovirus) "immediate early promotor" (Boshart et al., 1985) und einer für die tTA-abhängige Aktivierung am 5'-Ende eingefügten Serie von sieben tet-Operatorsequenzen (tetO7) (Baron et al., 1995). In Gegenwart des Effektors Tetracyclin (oder seines Analogons Doxycyclin) kann tTA nicht an die Operatorsequenz des Ptet binden (Abb. 1.9). In Abwesenheit von Tetracyclin hingegen führt die Bindung von tTA an den Ptet zur Expression von Genen, die unter Kontrolle des tTA-aktivierbaren Promotors stehen.



Abb. 1.9: Schematische Darstellung des Tetracyclin-abhängigen Transaktivators (tTA) sowie des auf tTAbasierenden induzierbaren Systems zur Regulierung von Genexpression. Der Transaktivator tTA ist eine Fusion des Tet-Repressors (*tetR*) mit der C-terminalen VP16-Transaktivatordomäne des *H. simplex* Virus. Da sich das ursprüngliche Fusionsprotein toxisch auf Säugerzellen auswirkte, wurde VP16 durch Minimalsequenzen ersetzt. Bei Anwesenheit von Doxycyclin (Dox) wird im tTA-System die Genexpression reprimiert, während in Abwesenheit von Dox tTA an die Operatorsequenzen (tetO₇) binden kann und so eine Aktivierung der Genexpression ermöglicht.

1.10 Der ROSA26-Lokus

Ein ubiquitär exprimierender Promotor könnte interessant sein, um eine universell einsetzbare Indikator-Mauslinie zu generieren. Der ROSA26-Lokus wurde durch ein Promotor-trap Experiment gefunden (Friedrich and Soriano, 1991) und als ubiquitär exprimierender Genort beschrieben (Zambrowicz et al., 1997). Ausgehend vom ROSA26-Promotor werden zwei Transkripte erzeugt, die sich durch alternatives Spleißen unterscheiden (Abb. 1.10). Zusätzlich zu den beiden Sense-Transkripten wird ein Antisense-Transkript generiert. Das Antisense-Transkript (AS) überlappt nicht mit Transkript 1, jedoch über einen Bereich von 381 Bp mit Transkript 2. Dieser überlappende Bereich liegt in der kodierenden Sequenz von Transkript AS. Während die Transkripte 1 und 2 nicht kodieren, umfasst Transkript AS einen offenen Leserahmen von 506 Aminosäuren. Für keines der drei Transkripte ist eine Funktion bekannt. Ein Knockout der Transkripte 1 und 2 in der Maus zeigt keinen erkennbaren Phänotyp; für Transkript 3 liegen keine Knockout-Daten vor.



Abb. 1.10: Der ROSA26 Lokus. Das 3'-Ende von Exon 3 des Transkriptes2 ist nicht bekannt, das Exon ist durch ein Sternchen (*) gekennzeichnet. Restriktionsenzyme: B, *Bgl*II; Nc, *NcoI*; No, *NotI*; S, *Sal*I; pA, poly(A)-Signal (verändert nach (Zambrowicz et al., 1997))

Der Genort ist für Gentargeting sehr gut zugänglich. So wurden bereits kurze Zeit nach der Beschreibung unter Nutzung dieses Promotors die universelle *LacZ*-Indikator-Mauslinie R26R (Soriano, 1999) und eCFP/eYFP exprimierende Mäuse (Srinivas et al., 2001) vorgestellt. In diesen Mäusen wird die Trankription durch eine zwischen Promotor und Gene of interest klonierte loxP-flankierte Stopp-Kassette terminiert. Abhängig von der Charakteristik einer Cre-Rekombinase exprimierenden Aktivatormauslinie kann diese Stopp-Kassette zelltypspezifisch excidiert werden.

1.11 Viraler Gentransfer

Der virale Gentransfer eröffnet völlig neue Möglichkeiten eine hohe DNA Expression zu erhalten. Dafür stehen zwischenzeitlich auf verschiedenen Viren basierende Infektionssysteme zur Verfügung (Washbourne and McAllister, 2002).

1.11.1 Sindbis-Viren

Das Sindbis-Virus ist ein zur Familie der Toga-Viren gehörender Alpa-Virus, der in Nagern Enzephalitis hervorruft. Alphaviren sind +-strängige RNS-Viren, deren virales Genom nicht in die DNS der Wirtszelle integriert.

Um diesen Virus als Expressionssystem zu nutzen wurde das wt-Virengenom auf zwei Plasmide aufgeteilt (Frolov et al., 1997). In den pSinRep-Vektor wird das zu exprimierende Gen kloniert, außerdem bringt er die zur intrazellulären Replikation der viralen RNS nötigen, nicht-strukturellen Proteine wie z.B. die RNS-Polymerase mit. Die zur Herstellung infektiöser Viruspartikel notwendigen strukturellen Proteine (d.h. die Kapsel- und Hüllproteine) werden vom *defective-helper*-Plasmid DH26s zur Verfügung gestellt. Dazu werden die in vitro transkribierten RNS beider Plasmide in kultivierte Zellen transfiziert. Diese Zellen produzieren Viruspartikel, die infektiös aber nicht replikationsfähig sind. Dieser Sicherheitsmechanismus wird durch das Fehlen der Verpackungssequenz auf der Helfer-RNS erreicht. So wird die genetische Information für die strukturellen Proteine wird nicht mit in die fertigen Viruspartikel verpackt (Frolova et al., 1997). Mit diesen Viren infizierte Wirtszellen sind dann nicht in der Lage neue Viruspartikel herzustellen.

Das Sinbis-Vius System eignet sich als Kurzzeit-Expressionssystem (Ehrengruber et al., 1999). Nach kurzer Inkubationszeit von einem halben Tag wird das Zielprotein großer Konzentration erzeugt. Die Zytotoxizität beschränkt aber die Verwendbarkeit des Systems auf zwei Tage im Tier bzw. einen Tag in Zellkultur.

1.11.2 Adenoassoziierte Viren

Der humane adenoassoziierte Virus ist ein Parvo-Virus, der einen DNA-Einzelstrang enthält (Grimm et al., 1998; Grimm et al., 2003). Der Virus ist nicht pathogen, d.h. einer Virusinfektion konnte kein Krankheitsbild zugeordnet werden. Wildtyp-AAV integriert in Abwesenheit von Helfer-Viren in das Genom an Position 19q13.3. Es wird angenommen, dass er nicht onkogen ist (Tenenbaum et al., 2003). In Anwesenheit eines Helfer-Virus (wie

eines Adeno- oder Herpes-Virus) kann der lytische Zyklus stattfinden. Wenn *rep* und *cap* aus dem Genom entfernt werden besteht das virale Genom nur noch aus zwei flankierenden 145 bp ITRs, die eine Rolle in der viralen Replikation und Verpackung spielen. Bei der Klonierung von Konstrukten muss darauf geachtet werden, dass bedingt durch die Größe des Virions ein rAAV Vektor eine Länge von 4,7 kbp nicht überschreitet (During et al., 2003). Da in das ZNS injizierte AAV-Viren bevorzugt Neuronen infizieren können auch nichtgewebespezifische Promotoren genutzt werden. Dabei besteht die Hoffnug, dass durch die episomale Lokation des Konstruktes der Promotor auch nach längerer Zeit keinen epigenetischen Beeinflussungen unterworfen ist und seine Stärke behält.

Da es untoxisch ist, ist das AAV1/2-System ideal geeignet, um Langzeitexpression in Neuronen zu erhalten. Nachteilig ist die lange Inkubationszeit von mindestens 10 Tagen.

1.12 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, den Chloridindikator Clomeleon durch die Herstellung von Bioindikator Mauslinien nutzbar zu machen. Einerseits wurden dazu transgene Mauslinien generiert, die Clomeleon unter Kontrolle des neuronenspezifischen *Thy1*-Promotors exprimieren. Andererseits sollte der ROSA26-Lokus genutzt werden, um eine in allen Gewebetypen einsetzbare universelle Chloridindikator-Mauslinie zu erhalten. Das Konzept dieser Mauslinie zeichnet sich dadurch aus, dass die Expression von Clomeleon durch Cre-Aktivator-Mauslinien in zelltypspezifischer Weise gesteuert werden kann. Komplementär sollte das Potenzial viralen Gentransfers getestet werden, um starke Expression in definierten Populationen zu erhalten.

Die Anwendbarkeit der Mauslinien sollte anhand der Frage nach der entwicklungsabhängigen Regulierung der intrazellulären Chloridkonzentration in Neuronen getestet werden. Darüber hinaus sollte die Chloridregulation von GnRH-Neuronen, einer für die Fortpflanzugsfähigkeit wichtigen Neuronenpopulation von 800 Zellen untersucht werden. Dies sollte an den universellen Chloridindikator-Mäusen geschehen, bei denen die Expression von Clomeleon in diesen Neuronen durch Kreuzung mit der GnRH-iCre-Mauslinie aktiviert wurde

Darüber hinaus sollte der Indikator selbst in seinen Eigenschaften wie dem zeitlichen Auflösungsvermögen verbessert werden.

2 Ergebnisse

2.1 Herstellung von Clomeleon Biosensor-Mauslinien und deren Charakterisierung

2.1.1 Thy1-Clomeleon

Um neurophysiologische Fragestellungen mit Clomeleon als optischem Biosensor beantworten zu können, ist es notwendig, das Protein in Neuronen zu exprimieren. Dafür wurde die cDNS von Clomeleon im Labor von Prof. Guoping Feng anstelle von Exon III und flankierender Intron-Sequenzen in ein 6,5 kbp großes Fragment des murinen *Thy1.2*-Genes kloniert, das sich vom Promotor bis zum Intron nach Exon IV erstreckte. Durch Pronukleusinjektion der linearisierten DNS wurden transgene Mäuse erzeugt und in den C57BI/6 Hintergrund zurückgekreuzt, analog zu den bereits beschriebenen Thy1-GFP Mauslinien (Feng et al., 2000). Es wurden sieben das Transgen in die Filialgenerationen transmittierende F_0 -Tiere erhalten. Die von diesen Tieren abstammenden Mauslinien wurden als CLM1, 2, 8, 9, 11, 12 bzw. 13 bezeichnet



Abb. 2.1: Sagittalschnitt eines paraformaldehyd-fixierten Gehirns einer 90 Tage alten Maus der Linie CLM11

Abbildung 2.1 zeigt einen Sagittalschnitt durch ein mit Paraformaldehyd fixiertes Gehirn einer 90 Tage alten Maus der Linie 11 der *Thy1*-Clomeleon Mäuse. Gut zu erkennen ist die hohe Proteinexpression in der CA1-Region des Hippokampus und den tieferen Schichten der Großhirnrinde. Man beachte, dass quasi kein Hirnareal frei von Fluoreszenz ist.

2. Ergebnisse

	CLM1	CLM2	CLM8	CLM9	CLM11	CLM12	CLM13
Bulbus olfactorius							
Glomeruli	++	++	++	++	-	+	+
äußere plexif. Schicht	+	-	+	+	-	+	-
Mitralzellen	+++	++	-	-	+	++	-
innere plexif. Schicht	+	-	+	+	++	+	-
Neokortex							
Schicht 1	+	-	-	-	+	-	-
Schicht 2/3	++	-	-	-	+++	+	++
Schicht 4	+	-	-	-	-	-	+
Schicht 5	+++	-	-	-	+++	++	+
Schicht 6	++	-	-	-	++	++	+
Hippokampus							
Gyrus dentatus	+++	++	-	++	++	+	+++
Hilus	+	-	-	-	++	+	+
CA3	+	+	-	++	+	_	++
CA2	+	+++	-	++	+	-	++
CA1	+++	++	-	+++	+++	++	+++
Stratum lacunosum	-	+	-	-	-	+	+
Basalganglien	+	+	-	++	+	+	+
Amygdala	+++	-	-	-	+++	++	+++
Thalamus	++	+	-	+	++	+++	++
Cerebellum							
Moosfasern	-	++	+	++	+++	++	+++
Körnerzellen	+++	-	-	-	-	-	-
Purkinjezellen	-	-	-	-	+	-	-
Nuclei	-		-	-	+++	+++	+++
Hirnstamm	++	+	-	++	++	++	++
Rückenmark							
α-Motoneurone	+				++		
Hinterhorn	+				+		
Retina							
Bipolarzellen	+++	+	-	-	++	+	-
Amakrine Zellen	+	+	-	++	+	++	-
Ganglienzellen	+++	+	-	+++	++	-	++

Tab. 2.1: Übersicht über die verschiedenartigen Expressionsmuster in den erhaltenen sieben *Thy1*-Clomeleon Mauslinien ("positional variegation"),+ niedrige, +++ hohe Dichte markierter Neurone

2.1.1.1 Räumliche Verteilung der Clomeleon Expression

Generell lässt sich sagen, dass die meisten Linien robuste Expression in Hippokampus, Gyrus dentatus, thalamischen Kernen, den Glomeruli der Riechkolben, Moosfasern des Kleinhirns und den zugehörigen Somata der inferioren Olive zeigen.

Es ist bekannt, dass das Expressionsmuster in *Thy1*-Transgenen – räumlich wie zeitlich gesehen – sehr stark vom zufälligen Integrationsort der injizierten DNS abhängt ("positional variegation", (Feng et al., 2000)). So war CLM1 die einzige Linie die in cerebellären Körnerzellen oder retinalen "blue cone" Bipolarzellen (Haverkamp et al., 2005) exprimierte. Ein "Golgie-Typ" Expressionsmuster, d.h. starke Expression in wenigen, vereinzelt stehenden Neuronen (Feng et al., 2000), wurde nicht erhalten. Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht über die verschieden stark exprimierenden Neuronenpopulationen in rückgekreuztem Nachwuchs der sieben F_0 -Tiere. Das Expressionsmuster wurde innerhalb der Linien stabil an die Folgegenerationen vererbt.

Abbildung 2.2 zeigt hochauflösende konfokale Aufnahmen von paraformaldehyd-fixierten Schnitten der *Thy1*-Clomeleon Mäuse. Die Fluoreszenz wurde nicht durch Antikörperfärbung verstärkt. Unter den guten optischen Bedingungen im perfundierten Gewebe sind sogar einzelne dendritische Dornen auflösbar (A). Interessant ist das komplementäre Expressionsmuster im Kleinhirn der Linien CLM1 und CLM11. In Linie CLM1 exprimieren die Körnerzellen (C), wohingegen in Linie CLM11 die mit den Körnerzellen synaptische Kontakte ausbildenden Moosfasern markiert sind (D). Es soll an dieser Stelle noch einmal betont werden: beide Mäuse exprimieren das gleiche Gen, aber das Gen befindet sich in einer unterschiedlichen Sequenzumgebung.

Die Fluoreszenzverteilung innerhalb eines Neurons ist homogen. Es ist keine Kernexklusion oder Anreicherung in Organellen zu beobachten.



Abb. 2.2: Hoch auflösende konfokale Aufnahmen von paraformaldehyd-fixierten Schnitten der *Thy1*-Clomeleon Linie CLM1 Mäuse: (A) Dendriten von L5-Pyramidenzellen, (B) CA1 des Hippokampus, (C) cerebelläre Körnerzellen, (D) L5-Pyramidenzellen, (E) L2/3-Pyramidenzellen, (F) Moosfaserendigungen in der Körnerschicht des Kleinhirns (Linie CLM11)

2.1.1.2 Zeitliche Entwicklung der Clomeleon Expression

Auch im zeitlichen Verlauf der Expression wurden große Unterschiede zwischen den Linien beobachtet. So exprimierten in Linie CLM1 postnatal nur Blutgefäße Clomeleon. Im Verlauf der ersten Lebenswoche begannen auch Neurone das Protein zu synthetisieren. Linie CLM11 hingegen exprimierte Clomeleon bereits am zweiten postnatalen Tag in Neuronen. In den folgenden Tagen stieg die Expression noch einmal deutlich an.

Da aber die Entwicklung der intrazellulären Chloridkonzentration in den ersten drei postnatalen Wochen untersucht werden sollte, entschieden wir uns, für die Experimente hauptsächlich Linie CLM11 zu nutzen.

2.1.2 ROSA26-floxSTOP-Clomeleon (ROSAC1)

Ziel der Generierung dieser Mauslinie war es, eine universell einsetzbare Chlorid-Indikatormauslinie zu erhalten. Dazu bedienten wir uns der Kombination einer loxPflankierten ("gefloxten") Stopp-Kassette (Abb. 2.3 A) und des ubiquitär exprimierenden ROSA26-Promotors (Zambrowicz et al., 1997; Soriano, 1999; Srinivas et al., 2001). Dadurch sollte es gelingen, durch bloßes Verpaaren dieser Indikator-Mauslinie mit einer geeigneten Cre-Aktivatormauslinie die Expression von Clomeleon in dem Gewebe des Interesses zu initiieren (Abb. 2.3 B). Welche Zellpopulation letztendlich ab welchem Zeitpunkt markiert ist, wird durch den Promotor bestimmt, der in der Aktivatormauslinie die Expression der Cre-Rekombinase, welche die Stopp-Kassette excidiert, kontrolliert.



Abb. 2.3: Konzept einer universellen Chloridindikator-Mauslinie: (A) Durch eine loxP-flankierte Stopp-Kassette zwischen dem ubiquitär aktiven ROSA26-Promotor und Clomeleon wird die Transkription effizient terminiert. Die Stopp-Kassette kann durch Cre-Rekombinase deletiert werden. (B) Durch ein konditionales Allel kann die Expression von Clomeleon in Abhängigkeit von der Cre-Aktivatorlinie kontrolliert werden.

Da Cre-Linien häufig eine ungleichmäßige Cre-Expression aufweisen, besteht die Möglichkeit, gute optische Bedingungen für Einzelzell-Messungen zu erreichen. Durch Einkreuzen der LC1-Mauslinie (Schonig et al., 2002) können auch die mannigfach zur Verfügung stehenden tTA-Mauslinien als Aktivator-Mauslinien eingesetzt werden.

2.1.2.1 Aufbau des Targeting-Konstruktes

Das Targeting Konstrukt besteht aus einer Neomycin-Phosphotransferase-Kassette (PGK-*neo*) zur Selektion rekombinierter ES-Zellklone und einem transkriptionellen Stopp bestehend aus drei SV40-Polyadenylierungssignalen (Maxwell et al., 1989). Eine den Strang entlang wandernde DNS-abhängige RNS-Polymerase findet also vier transkriptionsterminierende Signale vor. Dies gewährleistet die Effizienz des Transkriptionsstopps (Soriano, 1999). Diese Elemente befinden sich zwischen zwei gleichgerichteten loxP Elementen. Dadurch können sie *in vitro* wie *in vivo* durch Cre-vermittelte Rekombination aus dem Genom entfernt werden. An diese Kassette schließt sich am 5'-Ende ein Spleißakzeptor und am 3'-Ende die cDNS von Clomeleon mit eigenem Polyadenylierungssignal an. Diese Expressionskassette ist 5' von einem 1 kbp kurzen sowie 3' von einem 4,3 kbp langen, zur endogenen Zielsequenz homologen Sequenzarm flankiert. Zur Negativselektion nicht-homologer Integrationsereignisse enthält der Targeting Vektor am 3'-Ende das Diphtherie Toxin-A (DT-A) unter Kontrolle des Phosphoglyceratkinase-(PGK)-Promotors.



Abb. 2.4: Schematischer Aufbau des Targeting-Vektors und des ROSA26-Lokus vor und nach der homologen Rekombination bzw. Deletion der Stopp-Kassette durch Cre-Rekombinase

2.1.2.2 Homologe Rekombination in ES-Zellen

Das Targeting Konstrukt wurde durch KpnI Verdau linearisiert und in R1 ES-Zellen elektroporiert (Nagy et al., 1993). Nach Selektion mit Genticin (G418) wurden 288 Klone gepickt und propagiert. Genomische DNS dieser Klone wurde mit einer versetzten PCR auf Rekombination hin untersucht. Bei erfolgreicher homologer Rekombination wurde in einer PCR mit den Oligonukleotiden ROSA26-OUT und SA-OUT ein 1367 bp DNS-Fragment und nachfolgend mit den Oligonukleotiden ROSA26-IN und SA-IN ein 1243 bp DNS Fragment amplifiziert. Es wurden elf PCR-positive Klone erhalten. Diese Klone wurden weiter expandiert und deren DNS für eine Southern-Analyse gewonnen. Die genomische DNS wurde mit EcoRV verdaut. Zur Detektion der entsprechenden DNS-Fragmente wurden ein 80 Bp DNS Fragment aus dem 5'-Bereich des ersten Exons des ROSA26-Gens (ROSA 5'-Sonde, Sonde 1) sowie ein 625 bp DNS Fragment aus dem Bereich des neo-Gens (neo-Sonde, Sonde 2) radioaktiv markiert. Mit der ROSA 5'-Sonde konnte das Wildtyp-Allel durch eine 11,5 kbp große Bande und das mutante Allel durch eine 4,1 kbp große Bande nachgewiesen werden (Abb. 2.5). Mit der neo-Sonde wurde in Wildtyp-DNS keine und für das rekombinierte Allel eine 4,1 kbp Bande detektiert. Für einen Klon (#3.2) deuteten zwei Banden auf unerwünschte Mehrfachintegration hin.



Abb. 2.5: Southern-Blot auf genomischer DNS der ES-Zellklone: 5'-Sonde: Wildtyp-Allel (11,5 kbp), rekombiniertes Allel (4,1 kbp); *neo*-Sonde: Wildtyp-Allel (keine Bande), rekombiniertes Allel (4,1 kbp)
2.1.2.3 Test auf Funktionalität der Expressionskassette

Um die Funktionalität der Expressionskassette zu testen, wurde ein Aliquot des für die Blastozysteninjektion ausgewählten Klons (#1.9) aufgetaut und mit dem Plasmid pMC-Cre elektroporiert. Die Zellen wurden ausplattiert und nach einigen Tagen auf Fluoreszenz hin untersucht. Ein Teil der Klone zeigte homogene Fluoreszenz (Abb. 2.6) – ein Hinweis auf korrekte Insertion und Funktionalität der Kassette.



Abb 2.6: Test der Funktion der loxP-flankierten Stopp-Kassette: (A) zwei ES-Zellklone nach Transfektion von pMC-Cre im Durchlicht. (B) der linke Klon zeigt homogene Fluoreszenz

2.1.2.4 Etablierung und Genotypisierung der mutanten Mauslinie ROSAC1

Einer der korrekt rekombinierten ES-Zellklone (#1.9) wurde für die Injektion in C57Bl/6-Mausblastozysten eingesetzt. Daraus resultierende männliche Chimären wurden in den C57Bl/6-Hintergrund zurückgekreuzt. Keimbahntransmission konnte durch Weitergabe der Mutation in die nächste Generation festgestellt werden. Es wurde als Linienbezeichnung ROSAC1 gewählt. Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch PCR auf genomischer DNS aus kupierten Schwanzspitzen. Mit den Oligonukleotiden ROSAFA und ROSARA konnte das Wildtyp-Allel durch ein 580 bp PCR-Produkt nachgewiesen werden und mit den Oligonukleotiden ROSAFA und SpliAcB konnte das rekombinierte Allel durch ein 320 bp PCR-Produkt nachgewiesen werden. Die Primer eigneten sich auch für eine 3-Primer-PCR. Bei Anwesenheit der Stopp-Kassette ergaben die Primer neo4 und neo5 ein 620 bp PCR-Produkt. Die Anwesenheit des Cre-Rekombinase Gens wurde mit den Primern cre1 und cre2 durch ein 200 bp PCR-Produkt gezeigt.

2.1.2.5 Aktivierung durch Deletion der Stopp-Kassette in vivo: ROSAC1^{ΔSTOP}

Um die Stopp-Kassette *in vivo* zu deletieren wurden Tiere der Linie ROSAC1 mit Cre-Deleter-Mäusen verpaart (Schwenk et al., 1995). Cre-Deleter-Mäuse exprimieren transient Cre-Rekombinase in einem frühembryonalen Stadium unter Kontrolle des CMV-Promotors. Das Rekombinationsereignis findet bereits vor Anlage der Keimbahn statt, sodass das rekombinierte Allel an die Nachkommen weitergegeben wird.

Das Transgen ist bei den Cre-Deleter Mäusen auf dem X-Chromosom lokalisiert. Um eine unvollständige Excision der Stopp-Kassette durch Inaktivierung des X-Chromosoms zu vermeiden, wurden nur männliche Nachkommen analysiert. Bei der Analyse von Tieren, die heterozygot für Cre-Rekombinase und Clomeleon waren, wurde keine nennenswerte Fluoreszenz gesehen. Für das ROSAC1 Allel homozygote Mäuse ließen eine höhere Expression erwarten. Auch wenn kein Phänotyp offensichtlich wird, bedeutet die Analyse eines homozygoten Knock-in Tieres für den ROSA-Lokus immer auch die Analyse des Knock-outs von zwei Transkripten.

Die Funktionalität der Kassette ist im Falle schwacher Fluoreszenz schlecht abzuschätzen. Daher entschlossen wir uns ROSAC1 mit Mäusen zu verpaaren, die Cre-Rekombinase in gewebespezifischer Weise exprimieren. Dadurch sollte es möglich sein, das Signal besser vom Hintergrund abzugrenzen.

2.1.2.6 ROSAC1 x GnRH-iCre

Bei den GnRH-Neuronen handelt es sich um eine Gruppe von etwa 800 Zellen im praeoptischen Areal, die eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Fortpflanzungsfähigkeit spielen. Für diese Zellen wird durchgehende GABAerge Depolarisation (DeFazio et al., 2002) oder ein im Vergleich zu anderen Neuronen des ZNS späterer Wechsel von GABAerger Depolarisation zu Hyperpolarisation diskutiert (Han et al., 2002). Chloridmessungen mit der ROSAC1-Maus sollten zur Klärung des Sachverhaltes beitragen. Ein weitere interessante Frage, die mit Chlorid-Imaging zu beantworten wäre, ist, ob der pulsatile Rhythmus der GnRH-Sekretion durch einen steten Wechsel von GABAerger Erregung und Hemmung hervorgerufen wird, ähnlich den Neuronen des SCN (Wagner et al., 1997; Wagner et al., 2001).

Bei der Linie GnRH-iCre handelt es sich um eine Linie, bei der die Expression der humanisierten Cre-Rekombinase von einem 3,5 kbp großen Fragment des murinen GnRH-Promotors gesteuert wird (Shimshek et al., 2002). Es war das Ziel die Stopp-Kassette zwischen ROSA26-Promotor und Clomeleon in GnRH-Neuronen zu entfernen, um durch Clomeleon basiertes Chlorid-Imaging die Physiologie dieser Neurone zu untersuchen.

Von bezüglich beider Allele heterozygoten Mäusen wurden akute koronare Schnitte angefertigt. Es war in Neuronen des praeoptischen Areals nur geringe Fluoreszenz festzustellen. Abbildung 2.7 zeigt mit dem Nipkow-Scheiben Mikroskop aufgenommene konfokale Bilder. Beide Kanäle weisen nur schwache Fluoreszenz auf.



Abb. 2.7: Akute koronare Schnitte des präoptischen Areals weisen nur eine schwache Fluoreszenz auf. Akzeptorkanal (A) und Donorkanal (B) in gleicher Graustufen-Gradation. Intensitätsprofile (C, D) beziehen sich jeweils auf die Linie im darüber stehenden Fluoreszenzbild. (Nipkow-Scheiben Mikroskop, Anregung 458 nm, 4000 ms Belichtung, 63x Tauchobjektiv, 8x8-Binning)

Distance (Pixel)

Da die Cre-vermittelte Rekombination unumkehrbar ist, aber viel mehr Neurone eine transiente GnRH-Promotor Aktivität aufweisen als sich GnRH-Neurone im adulten Tier finden, war es notwendig, in einem *post hoc* Experiment die GnRH-Neurone zu identifizieren. Um auf Rekombination zu testen, wurden Immunfluoreszenz Färbungen angefertigt. Die

Distance (Pixel)

akuten Schnitte wurden in Paraformaldehyd-Lösung fixiert und anschließend mit Triton-X permeabilisiert. Es wurden Neurone gefunden, die Immunreaktivtät mit dem anti-GFP and dem anti-GnRH-Antikörper zeigen (Abb. 2.8 A, B). Typischerweise ist die anti-GFP-Färbung homogen über das Neuron, während die anti-GnRH-Färbung Kernexklusion zeigt.



Abb. 2.8: ROSAC1 x GnRHiCre: (A) Fluoreszenz im akuten Schnitt (B) anti-GFP Immunfluoreszenz (C) anti-GnRH Immunfluoreszenz desselben Neurons

Es zeigt sich, dass der Reporter in der GnRH-Neuronen Population durch Cre-vermittelte Rekombination aktiviert werden kann, die Fluoreszenz aber nur geringfügig über Hintergrund liegt.

2.1.2.7 ROSAC1 x BACα₆Cre und ROSAC1 x Parvalbumin-Cre

Die Linie $BAC\alpha_6Cre$ eine Linie bei der die cDNS der Cre-Rekombinase durch homologe Rekombination in den Lokus der α_6 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors auf einem artifiziellen bakteriellen Chromosom (BAC) insertiert wurde (Aller et al., 2003). Cre-Rekombinase wird in diesen Tieren postnatal in cerebellären Körnerzellen exprimiert.

Die Linie Parvalbumin-Cre ist eine Linie, die Cre-Rekombinase postnatal in Parvalbuminpositiven Interneuronen exprimiert (E.C. Fuchs/H. Monyer, unveröffentlicht).



Abb. 2.9: Gewebespezifische Expression der ROSAC1 nach Verpaarung mit einer Cre-Mauslinie: (A) ROSAC1 x BAC α_6 Cre (B) ROSAC1 x Parvalbumin-Cre Montage, akute Sagittalschnitte, Nipkow-Scheiben Mikroskop, Anregung 514 nm (YFP), Nikon Plan UW 1x/0,04

Von bezüglich Cre-Rekombinase und BAC α_6 Cre bzw. Parvalbumin-Cre heterozygoten Mäusen wurden akute Sagittalschnitte angefertigt. Aus Abbildung 2.9 A ist ersichtlich, dass Clomeleon im Falle der BAC α_6 Cre Aktivatorlinie in Körnerzellen des Kleinhirns exprimiert wird. Die Purkinje-Zellschicht bleibt ausgespart. Gemäß der natürlichen Verteilung der α_6 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors und dem veröffentlichten Expressionsprofil bleibt das Vorderhirn praktisch frei von Fluoreszenz. Im Falle der Parvalbumin-Cre Aktivatorlinie wird Expression in Purkinje-Zellen beobachtet, sodass wegen deren Dendriten auch die molekulare Schicht markiert ist (Abb. 2.9 B). In Vorderhirn wird schwache Fluoreszenz beobachtet. Dies wird nach der Verteilung Parvalbumin-positiver Interneurone auch erwartet (Meyer et al., 2002). Die Expression ist aber in jedem Fall schwach. Dabei ist zu Berücksichtigen, dass diese Aufnahmen unter Direktanregung von YFP entstanden sind. Die Signale wären unter den Versuchsbedingungen der Chlorid-Imaging Experimente durch die Anregung des in Vergleich zu YFP deutlich dunkleren CFP (25% der Helligkeit von YFP) noch geringer.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es gelingt durch Verpaarung von ROSAC1 mit einer geeigneten Cre-Linie die Expression des Indikators durch *in vivo* Rekombination der loxP-Sequenzen zu initiieren. Andererseits sind die Expressionsniveaus gering.

2.1.3 Chronische Expression von Clomeleon

Um die Integrität des Indikators auch während chronischer Expression zu zeigen, wurde ein Western-Blot auf Gesamthirnextrakten von *Thy1*-Clomeleon Tieren unterschiedlicher Altersstufen angefertigt. Degradierte der Indikator z.B. durch Hydrolyse an dem rTEV Spaltungsmotiv, wäre das Verhältnis von Akzeptor- zu Donorfluoreszenz gegenüber der Kalibrierungsmessung verschoben und die Anwendung der mit einem Kurzzeit-Expressionssystems erhaltenen Kalibrierung auf Gewebeschnitte nicht mehr gerechtfertigt. Um eventuelle Bruchstücke detektieren zu können, wurde als Primärantikörper ein polyklonales Anti-GFP-Serum gewählt. Um zu zeigen, dass dieser gegen GFP gezogene Antikörper auch in der Lage ist CFP und YFP zu erkennen, wurden rekombinantes CFP, YFP und Clomeleon als Kontrolle geladen. Der Western-Blot (Abb. 2.10 A) zeigt in beiden Alterstufen keine relevante Degradation. Interessanterweise ist in der YFP-Spur Dimerisierung zu beobachten. Die Neigung zu dimerisieren ist für viele der fluoreszierenden Proteine beschrieben (Shaner et al., 2005).

Die Langzeitexpression hinterließ keine offensichtliche Spur von Toxizität bei den Tieren. Selbst zwei Jahre alte Tiere zeigten im fixierten Hirnschnitt keine sichtbaren Veränderungen oder Proteinablagerungen.

Darüber hinaus wurden von Dr. Patrik Krieger 2-Photonen-geführte Patch-Clamp Ableitungen von kortikalen Schicht-V-Pyramidenzellen durchgeführt. Dabei wurden zwei bekannte Arten von Aktivitätsmustern gefunden: "burst-type" und "regular". Die elektrophysiologischen Eigenschaften entsprechen den für diese Zellen typischen Werten (Tab. 2.2).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Clomeleon überexprimiert werden kann, ohne zelluläre Toxizität zu entwickeln.



Abb. 2.10: Chronische Expression von Clomeleon: (A) Western-Blot: CFP, YFP, Clomeleon (zwei Verdünnungen), Extrakt CLM1 P21(7 µg und 1,5 µg Extrakt), Extrakt CLM1 P270 (9 Monate, 7 µg und 1,5 µg Extrakt), Größenstandard in kDa (B) Ableitungen von Pyramidenzellen in Strom-Klemme zeigen zwei typische Aktivitätsmuster: "burst-type" und "regular" (P. Krieger).

Ruhemembranpotential	$-68 \pm 4 \text{ mV}$
Zugangswiderstand	$92 \pm 34 \text{ M}\Omega$
AP Amplitude (RMP bis Spitze)	$106 \pm 11 \text{ mV}$
AP Amplitude (Schwelle bis Spitze)	$82 \pm 12 \text{ mV}$
AP Auslöseschwelle	$-43 \pm 3 \text{ mV}$
AP Halbwertsbreite	0.75 ± 0.12 ms

Tab. 2.2: Elektropysiologische Eigenschaften von Clomeleon exprimierenden Pyramidenzellen der Schicht Vdes cerebralen Kortex. Linie CLM1, Mittelwert \pm SD, n = 14 (P. Krieger)

2.2 Untersuchung von [CI]_i in neuronalen Geweben

2.2.1 Kalibrierung in primären hippokampalen Neuronen

2.2.1.1 Patch-clamp

Um das chloridabhängige Verhältnis der Fluoreszenz in eine Chloridkonzentration umrechnen zu können, wurde das Zytoplasma mit Hilfe einer "whole-cell patch-clamp" Ableitung dialysiert. Dabei wurden die Chloridkonzentration der Zelle und der pH-Wert durch die Lösung in der Patchpipette bestimmt. So war die Erstellung einer Eichkurve möglich.

Es wurden aus Rattenembryonen (E18) primäre hippokampale Kulturen gewonnen. Diese wurden in einer Spanne vom 7. bis 14. Tag *in vitro* mit rekombinanten Sindbis-Virus Partikeln infiziert, die Clomeleon exprimierten. Um die Toxizität des Virus zu vermeiden wurde bereits 12 Stunden nach der Infektion mit den Ableitungen begonnen. Dazu wurde unter optischer Kontrolle in DIC Darstellung (Abb. 2.11 A) mit einem Mikromanipulator die Pipette an die Zelle gebracht, bis ein leichtes Zurückweichen der Zellmembran sichtbar war. Dann wurde der Überdruck von der Pipette genommen – Pipette und Zelle berühren sich und der Giga-Seal wird ausgebildet ("cell attached" Konfiguration, Abb. 2.11 B), d.h. zwischen der Elektrode in der Pipette und der Referenzelektrode im Bad liegt ein Widerstand größer als 1 G Ω . Nun wurde durch kurzen Unterdruck an der Pipette der Membranfleck zum Kollabieren gebracht und der Zugang zur Zelle eröffnet ("whole-cell" Konfiguration). Der Verstärker wurde in den Spannungsklemme-Modus gestellt und das Ruhemembranpotenzial gemessen. Innerhalb kurzer Zeit (< 1 min) war die Äquilibrierung der Chloridkonzentrationen zwischen dem Zytosol und dem dominierenden Reservoir der Pipette abgeschlossen (Abb. 11 C).



Abb. 2.11: Kalibrierung an mit rekombinantem Sinbis-Virus infizierten primären hippokampalen Neuronen: (A) zwei benachbarte Zellen in DIC Darstellung, die vordere in Kontakt mit der Patch-Pipette (B, C) Falschfarbendarstellungen der Chloridkonzentration der beiden Zellen in "cell attached" Konfiguration bzw. "whole-cell" Konfiguration der vorderen Zelle.

Es wurden Messungen für folgende [Cl⁻] vorgenommen: 4, 10, 25, 50, 125 mM. Um R_{min} darzustellen wurde eine 125 mM Fluorid-Lösung genommen. Ein Experiment bei einer Konzentration von 0 mM Chlorid ist technisch nicht durchführbar, da die Ag⁺/AgCl-Elektrode in Abwesenheit von Silber keine korrekten Spannungswerte liefert, sodass die Existenz des Giga-Seals nicht verifizert werden kann.



Abb. 2.12: Kalibrierungskurve unter Verwendung der Dialyse durch "whole-cell patch-clamp" Ableitung.

 K_D ' und R_{max} wurden unter Berücksichtigung folgender Gleichung an die Wertepaare gefittet (R_{min} bei 0,68 festgehalten):

$$R = \frac{K_D' \cdot R_{\max} + [Cl^-] \cdot R_{\min}}{[Cl^-] + K_D'}$$

Daraus ergibt sich folgende Formel für die Umrechnung eines Verhältnisses R von YFP-(Akzeptor)-Fluoreszenz zu CFP-(Donor)-Fluoreszenz (für diese Messapparatur, bei pH 7,25):

$$[Cl^{-}] = 130mM \cdot \left(\frac{3,75-R}{R-0,68}\right)$$

2.2.1.2 Ionophore

Bei der Kalibrierung durch die Patch-Clamp Ableitung besteht die Möglichkeit, dass niedermolekulare Stoffe, die einen Einfluss auf die Fluoreszenz des Indikators haben könnten, aus der Zelle ausgewaschen werden. So wurde als zweite unabhängige Methode die Kalibrierung mit Hilfe von Ionophoren gewählt. Hierbei wird die Zellmembran durch Ionophore nur für bestimmte Ionen permeabel. So gelingt es, durch Verwendung von 20 µM

Tributylzinnchlorid (Cl⁻/OH⁻ Kanal) und 20 μ M Nigericin (H⁺/K⁺ Kanal) den intrazellulären pH und [Cl⁻]_i zu klemmen. Es ist wichtig, dabei in einer Hoch-Kalium-Lösung zu arbeiten, um eine Verschiebung des pH_i durch die Triebkraft eines Kalium-Gradienten zu vermeiden. Es wurden Messungen für folgende [Cl⁻] vorgenommen: 0 (nominell), 10, 25, 50, 141,6 mM. Um R_{min} darzustellen wurde eine 120 mM Fluorid-Lösung genommen. Es ist zu berücksichtigen, dass eine Lösung von nominell 0 mM Chlorid durch die Verunreinigung der Reagenzien eine Chloridkonzentration von etwa 70 μ M hat.



Abb. 2.13: Kalibrierungskurve unter Verwendung der Ionophore Tributyl-Zinn und Nigericin.

 K_D ' R_{max} und R_{min} wurden unter Berücksichtigung folgender Gleichung an die Wertepaare gefittet:

$$R = \frac{K_D' \cdot R_{\max} + [Cl^-] \cdot R_{\min}}{[Cl^-] + K_D'}$$

Daraus ergibt sich folgende Formel für die Umrechnung eines Verhältnisses R von YFP-(Akzeptor)-Fluoreszenz zu CFP-(Donor)-Fluoreszenz (für diese Messapparatur, bei pH 7,25):

$$[Cl^{-}] = 143mM \cdot \left(\frac{3,56-R}{R-1,00}\right)$$

Nachdem beide Methoden einer Kalibrierung ihre Vor- und Nachteile hinsichtlich ihrer Eignung haben, wurde, um eine endgültige Kalibrierung zu erhalten, im physiologisch relevanten Bereich gemittelt.



Abb. 2.14: Vergleich der Kalibrierungen: Die resultierende Kurve als Mittel der beiden mit verschiedenen Techniken durchgeführten Kalibrierungen.

Dabei wurde nach erneutem Fit der Daten folgende Beziehung zwischen dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten R und der Chloridkonzentration [Cl⁻] erhalten (pH 7,25):

$$[Cl^{-}] = 142mM \cdot \left(\frac{3,65-R}{R-0,80}\right)$$

Diese Kalibrierung wurde den weiteren Auswertungen von Chloridmessungen mit Clomeleon zugrunde gelegt. Es ist zu beachten, dass sich diese Kalibrierung nicht auf einen anderen Versuchsaufbau übertragen lässt.

2.2.2 Bestimmung von [Cl⁻]_i an akuten Hirnschnitten der Linie CLM11

2.2.2.1 Entwicklung eines Messprotokolls

Um die Frage nach der Änderung der Chlorid-Konzentration über die Entwicklung der Maus zu beantworten, wurden ratiometrische Chloridmessungen an akuten koronaren Hirnschnitten verschiedener Altersstufen vorgenommen. Dabei ist es von entscheidender Bedeutung, vor der Bestimmung des Verhältnisses R von Akzeptorfluoreszenz zu Donorfluoreszenz für beide Kanäle einen geeigneten Hintergrund zu subtrahieren:

 $R = \frac{Fluoreszenz_{Akzeptor} - Hintergrund_{Akzeptor}}{Fluoreszenz_{Donor} - Hintergrund_{Donor}}$

Gerade dies bereitet Schwierigkeiten bei Verwendung den in vielen Zellpopulationen exprimierenden *Thy*1-Clomeleon Mäuse. Auch wenn in einem Feld keine Zellkörper oder Dendriten sichtbar sind, so ziehen doch Faserzüge durch den Bildausschnitt, die in Regionen mit potentiell anderer Chloridregulation ihren Ursprung haben. Durch die verhältnismäßig geringe Konfokalität des Nipkow-Scheiben Mikroskops war es auch nicht möglich, aus nicht exprimierenden Zellen einen Hintergrundwert zu ermitteln. So entschieden wir uns, zur Hintergrundsbestimmung Wildtyp Tiere gleichen Alters heranzuziehen und unter standardisierten Bedingungen eine Eichkurve zu erzeugen. Ziel war es, für beide Kanäle eine Fluoreszenzintensität/Pixel/(ms Belichtungszeit)/(µW Beleuchtungsleistung) für Wildtyptiere zu ermitteln, um dann diesen Wert von den eigentlichen Messwerten zu subtrahieren.

Dazu wurde die Überlegung angestellt, dass sich das Messsignal aus drei Komponenten zusammensetzt: dem belichtungszeitabhängigen Dunkelstrom der Kameras, der Autofluoreszenz des Gewebes (abhängig von Belichtungszeit und Beleuchtungsstärke) und dem eigentlichen Nutzsignal (abhängig von Belichtungszeit und Beleuchtungsstärke), das es zu isolieren galt.



Abb. 2.15: Abhängigkeit des Dunkelstroms von der Belichtungszeit pro Super-Pixel (Mittelwerte ± SD)

Der Dunkelstrom nimmt mit der Belichtungszeit linear zu (Abb. 2.15). Um den Betrag der Autofluoreszenz zu erhalten, wurden Hirnschnitte von C57Bl/6-Mäusen untersucht. Dazu wurden bei gemessener Beleuchtungsstärke mit verschiedener Belichtungsdauer Aufnahmen gemacht. Die gemessene Fluoreszenz wurde um den Dunkelstrom korrigiert, auf 50 μ W Beleuchtungsstärke normiert und gegen die Belichtungszeit aufgetragen (Abb. 2.16). Die Autofluoreszenz nimmt mit der Belichtungszeit linear zu und unterscheidet sich für die drei betrachteten Hirnareale nicht signifikant.





Abb. 2.16: Abhängigkeit der Autofluoreszenz/Super-Pixel für beide Detektionskanäle von der Belichtungszeit für drei Hirnareale (P10, bezogen auf 50 μ W Beleuchtungsstärke, Mittelwerte \pm SD)

Da sich die Autofluoreszenz zwischen den Hirnarealen nicht unterschied, wurden die Daten innerhalb der jeweiligen Alterstufe vereinigt. Anschließend wurde die Altersabhängigkeit der Autofluoreszenz untersucht. Dazu wurde die gemessene Fluoreszenz um den Dunkelstrom korrigiert, auf 50 μ W Beleuchtungsstärke normiert und gegen die Belichtungszeit aufgetragen (Abb. 2.16).









Autofluoreszenz Donor (50 µW Beleuchtungsstärke)

Abb. 2.17: Fluoreszenzintensität/Super-Pixel bezogen auf eine für die experimentellen Bedingungen typische Beleuchtungsstärke von 50 μ W für vier verschiedene Alterstufen (P5, P10, P15, P20)

Durch einen linearen Fit an diese Daten ließ sich ein Autofluoreszenzbeitrag/Pixel/(ms Belichtungszeit)/(µW Beleuchtunsleistung) für jede Altersstufe berechnen.

So war es möglich, für jedes Fluoreszenzbild unter Berücksichtigung von Belichtungszeit und Beleuchtungsstärke den Kamera- und Autofluoreszenzbeitrag des Hintergrundes zu subtrahieren.

2.2.2.2 Chloridkonzentration in CA1-Neuronen in akuten Hirnschnitten von Linie CLM11

Es wurden parasagittale Hirnschnitte von Tieren unterschiedlicher Altersstufen (P5, P10, P15, P20) der Linie CLM11 angefertigt. Unter DIC-Illumination wurde das CA1-Band des Hippokampus lokalisiert. Die Fluoreszenzbilder wurden im konfokalen Modus des Nipkow-Scheiben Mikroskops unter Anregung bei 457 nm aufgenommen. Um den endgültigen Bildausschnitt festzulegen, wurden Stapel von Fluoreszenzbildern mit kurzer Belichtungszeit (50-200 ms) aufgenommen. Dann wurde der eigentliche Bildstapel aufgenommen. Dabei wurde darauf geachtet, die CCDs nicht zu sättigen. Anschließend wurde ein Photosensor in den Anregungsstrahlengang geschoben und die Laser-Leistung gemessen. Die Bilderstapel reichten typischerweise von der Schnittoberfläche bis in eine Tiefe von 50 μ m mit einem Abstand von 3–5 μ m von Bild zu Bild. Zusätzlich wurde ein Bilderstapel unter DIC-Illumination aufgenommen.

Zur Auswertung der Messungen wurden ROIs um die Somata von im Fluoreszenzbild gesund aussehenden Zellen gelegt und die Fluoreszenzintensitäten in den beiden Kanälen bestimmt. Als morphologische Kriterien für die Auswahl der in die Auswertung eingehenden Zellen wurden eine gleichmäßige Fluoreszenz und die typische Form ("zwiebelähnlich") herangezogen. Anschließend wurde unter Berücksichtigung von Alterstufe, Belichtungszeit und Beleuchtungsstärke für die beiden Emissionskanäle der Hintergrund errechnet und subtrahiert.

$$R = \frac{Fluoreszenz_{Akzeptor} - Hintergrund_{Akzeptor}}{Fluoreszenz_{Donor} - Hintergrund_{Donor}}$$

Mit den so erhaltenen Intensitäten für den Donor- und den Akzeptorkanal konnte das Verhältnis R bestimmt und mit Hilfe der Kalibrierung in eine Chlorid-Konzentration "übersetzt" werden (Abb. 2.18 und 2.19 A).

Dabei wurde die pH-Wert Abhängigkeit von Clomeleon berücksichtigt. Viele Veröffentlichungen beschreiben für Neuronen einen pH-Wert um 7,1 (Pond et al., 2006; Xiong et al., 2000; Knopfel et al., 1998; Amos et al., 1996; Amos and Richards, 1996; Gaillard and Dupont, 1990), sodass dieser Wert der pH-Wert Korrektur zu Grunde gelegt wurde.



0 mM [Cl⁻] 60

Abb. 2.18: Konfokale Bilder einer Population von Pyramidenzellen im CA1-Band des Hippokampus (P20): Intensitäten beider Kanäle nach gleicher Graustufenskala; Falschfarben-Darstellungen der Chlorid-Konzentration (Nipkow-Scheiben Mikroskop, Anregung 458 nm, 63x Tauchobjektiv, 8x8-Binning)

Abbildung 2.19 A zeigt Falschfarben-Darstellungen der Chloridkonzentration hippokampaler CA1-Neurone. Es ist zu sehen, wie mit dem Alter die Chloridkonzentration dieser Population abnimmt. Um eine Aussage über die Verteilung der Konzentrationen jeder Altersstufe machen zu können, wurden die ermittelten Chloridwerte für die einzelnen Alterstufen als Histogramm aufgetragen und mit einer Gaußkurve gefittet (Abb. 2.19 B). Für die Altersstufe P5 ergeben sich dabei zwei Populationen. Für die Auftragung der mittleren Chloridkonzentration gegen das Alter wurden Werte über 40 mM Chlorid vernachlässigt (Abb. 2.19 C). Sie repräsentieren einen unphysiologischen Zustand und liegen außerhalb des Populationsschwerpunktes.

Unter Vernachlässigung des Hydrogencarbonat-Stromes und einem RMP von -68 mV ergibt sich eine Umpolung der GABAergen Antwort bei P14 (Abb. 2.19 D).

Mit diesen Messungen wurde somit erstmalig die Veränderung der Chloridkonzentration während der postnatalen Entwicklung nichtinvasiv in Hirnschnitten beschrieben.

2. Ergebnisse



Abb. 2.19: $[CI^-]_i$ von hippokampalen Neuronen über die Entwicklung der Maus: (A) Flaschfarbendarstellung der Chloridkonzentration von Neuronen des CA1-Bandes des Hippokampus P5, P10 bzw. P20. (B) Histogrammierte Chloridkonzentration in hippokamapalen Neuronen für die Alterstufen P5, P10, P15, P20 (C) Durchschnittliche $[CI^-]$ in Abhängigkeit von der Altersstufe (Fehlerbalken entsprechen Standardfehler des Mittelwertes), Kreuze entsprechen dem Schwerpunkt der jeweiligen Histogramme, für P5 Schwerpunkt der großen Population) (D) Aus den in C dargestellten Werten folgende Kurve für E_{CI}^- . Unter Vernachlässigung des Hydrogencarbonat-Stromes und einem RMP von -68 mV ergibt sich eine Umpolung der GABAergen Antwort bei P14.

2.2.3 Zeitliches Auflösungsvermögen der Indikatoren

Ein inhibitorisches postsynaptisches Ereignis hat eine Zeitkonstante von etwa 100 ms. Um zu testen, ob der Indikator diese Zeitauflösung erreicht, wurde die Chlorid-Bindekinetik von Clomeleon mit der Stopped-flow-Technik untersucht werden.

Clomeleon besteht aus eCFP einem 24 AS langem Linker und Topaz als YFP-Komponente, wobei letztere den eigentlichen Sensor darstellt. Zusätzlich klonierten wir eine Variante, bei der an der AS-Position 152 des Topaz-YFP ein Austausch von Isoleucin gegen Leucin stattfand. Für diese Mutation war in einem anderen YFP-Hintergrund eine kleines τ_{ass} der Chloridbindung beschrieben worden (Galietta et al., 2001). Diese Variante wurde Clomeleon3 benannt. Die gleiche Mutation mit einem 8 AS Linker zwischen eCFP und Topaz(I152L) wurde als Clomeleon2 bezeichnet. Da die verschiedenen Formen von Clomeleon durch Überexpression in *E. coli* kaum zugänglich waren (Ablagerung in Einschlusskörpern), entschlossen wir uns, die YFP-Komponenten allein zu testen. Dazu wurden Präparationen von Topaz und Topaz(I152L) gegen einen Null-Chlorid Puffer dialysiert und dann in der thermostatisierten Stopped-flow-Apparatur gegen definierte Chloridlösungen geschossen.



Abb. 2.20: Abhängigkeit der Chlorid Assoziationskinetik von der Chloridkonzentration und der Temperatur.

Die beobachteten Kinetiken legen nahe, dass in dem physiologischen Bereich der Chloridkonzentrationen (um 10 mM) Clomeleon in Experimenten bei Raumtemperatur keine einzelnen inhibitorischen postsynaptischen Ereignisse auflösen kann. Durch Erhöhung der Temperatur und Einsatz der I152L-Mutante wird die Darstellbarkeit solcher Ereignisse wahrscheinlich.

2.2.4 Clomeleon Expression durch virale Infektionssysteme

Nachdem die Expression von Clomeleon in genetisch definierten Zellen in der ROSAC1 Linie zwar möglich, ein funktionelles Imaging durch das geringe Expressionsniveau aber schwierig ist, müssen andere Methoden herangezogen werden, um dieses Ziel zu erreichen. Einen Ansatz bietet die Proteinexpression durch viralen Gentransfer. Dazu wird Suspension rekombinanten Virus an den Ort gewünschter Expression mittels stereotaktischer Injektion verbracht und infiziert dort das Gewebe. Nach angemessener Inkubationszeit können die Tiere analysiert werden. Durch den Einsatz konditionaler Techniken sollte es gelingen, die Expression im Injektionsgebiet auf genetisch definierte Zellen zu beschränken.

AAV1/2-floxSTOP-Clomelon:

Es wurde eine Expressionskassette in das AAV1/2 ITR-Konstrukt kloniert, die eine loxP flankierte Stopp-Kassette (drei Polyadenylierungssignale) (Maxwell et al., 1989) zwischen dem CMV-Verstärkter/Huhn- β -Aktin Promotor (CBA-Promotor) und der cDNS von Clomeleon aufweist.

AAV1/2-tetO7minibi-Cre/Clomeleon:

Ausgehend von einem Konstrukt der Arbeitsgruppe um Dr. Rolf Sprengel wurde ein Konstrukt kloniert, das ein bidirektionales tetO₇-CMV tTA-responder Element enthält, das im aktivierten Zustand auf der einen Seite die Expression von iCre und auf der anderen Seite von Clomeleon treibt. Diese Kassette befand sich in einem ITR-Konstrukt zur Expression durch rekombinanten adenoassoziierten Virus Serotyp 1/2 (AAV1/2).

Injektion der mit Hilfe dieser Konstrukte erzeugten rekombinanten AAV1/2 Responder-Viren in geeignete Aktivator-Mauslinien führte zu Expression von Clomeleon in hohen Konzentrationen. In welchen infizierten Zellen schlussendlich Expression getrieben wird, wird durch das Expressionsprofil der Aktivatorlinie bestimmt.



Abb. 1.21: Schema der Expressionskassetten zweier rAA-Viren: (A) Der CMV-Verstärkter/Huhn-β-Aktin (CBA) Promotor treibt die Expression. Eine loxP-flankierte Stopp-Kassette (drei Polyadenylierungs-Signale, tpA) erlaubt Cre-vermittelte Aktivierung der Kassette. Das posttranskriptionelle Element des "woodchuck hepatitis virus" (WPRE) verbessert die RNA Stabilität. (B) Das bidirektionale Tet-Operator-CMV-Minimalpromotor Konstrukt treibt Expression von Cre-Rekombinase und Clomeleon nach Aktivierung durch tTA.

Der AAV1/2-floxSTOP-Clomeleon Virus wurde CamK-Cre4 Mäusen (Mantamadiotis et al., 2002) und Parvalbumin-Cre Mäusen (E. Fuchs, H. Monyer, unveröffentlicht) in die hippokampale Formation bzw. das Kleinhirn injiziert (Dr. Verena C. Wimmer, Dr. Leena S. Knight). In den CamK-Cre4 Mäusen wurde gemäß dem beschriebenen Muster der Cre-Expression starke Expression von Clomeleon in Projektionsneuronen des Hippokampus (Abb. 2.22 A, B) und Gyrus dentatus gefunden (Abb. 2.22 C). Auch entlang des Injektions-kanals wurden markierte Neurone beobachtet (Abb. 2.22 D). Das gleiche Konstrukt injiziert in Parvalbumin-Cre Mäuse führt zur Expression von Clomeleon in Interneuronen des Hippokampus (Abb. 2.22 E, Abb. 2.24) und Gyrus dentatus (Abb. 2.22 F) sowie Purkinje-Zellen des Kleinhirns (Abb. 2.22 G). Daraus folgt, das AAV1/2 beide Arten von Neuronen infiziert und die Transkription in infizierten Neuronen, die keine Cre-Rekombinase exprimieren, durch die Stopp-Kassette effektiv terminiert wird.

Der AAV1/2-tetO7minibi-Cre/Clomeleon Virus wurde in die hippokampale Formation von tTA-Aktivator Mäusen (P. Zhu, R. Sprengel, unveröffentlicht) injiziert (Dr. Leena S. Knight). In Hippokampus, Gyrus dentatus und dem Stichkanal durch den Kortex wurde gemäß dem Expressionsmuster der Aktivatorlinie starke Expression von Clomeleon erhalten (Abb. 2.23 A-C) . Injektion des Virus zusammen mit einem DyeI-Kristall in Wildtyp-Mäuse führte zu keiner sichtbaren Fluoreszenz (Abb. 2.23 D-F). Das bedeutet, dass die tetO₇-CMV_m-Kassette in Abwesenheit von tTA als Aktivator dicht ist.

2. Ergebnisse



2. Ergebnisse



Abb. 2.23: Injektion von AAV1/2-tetO₇minibi-Cre/Clomeleon in *Thy1*-tTA Aktivator Mäuse: Expression von Clomelon im (A) Gyrus dentatus, (B) Kortex (Stichkanal) und (C) CA1-Feld des Hippokampus.

Dichtheit der Expressionskassette: alle drei Aufnahmen (D-E) wurden unter gleichen Bedingungen aufgenommen. (D) Injektion in *Thy1*-tTA Aktivator Maus, (E) DyeI Injektionskontrolle in Wildtyp, (F) gleiches Bild YFP-Kanal.

Endogene Fluoreszenz, fixiertes Gewebe, Weitfeld-Beleuchtung, 10x



Abb. 2.24: Projektion eines konfokalen Bildstapels des Interneurons aus Abbildung 2.22 E. (Leica SP2)

3 Diskussion

Die Bedeutung von Chlorid für die Physiologie wurde lange Zeit unterschätzt. Dabei entscheidet sein Konzentrationsgradient über die Zellmembran hinweg, ob das Öffnen einer Chlorid-Leitfähigkeit eine depolarisierende oder eine hyperpolarisierende Wirkung auf das Membranpotenzial hat. Das bedeutet aber, dass die Chloridkonzentration unmittelbaren Einfluss auf die neuronale Signalverarbeitung hat. Das wiederum impliziert, dass eine räumliche oder zeitliche Modulation der Chloridkonzentration Auswirkungen auf die Polarität durch Neurotransmitter vermittelter Chloridströme hat. Bisher standen zur Untersuchung dieser Zusammenhänge nur eingeschränkt Methoden zur Verfügung. Die Bestimmung der Chloridkonzentration durch Messung des Umkehrpotenzials EGABA durch Gramicidinperforierte Ableitung ist eine indirekte Messmethode. Problematisch ist dabei, dass keine isolierten Chlorid-Ströme betrachtet werden. Die ebenfalls durch den GABAA-Rezeptor durchtretenden Hydrogencarbonat-Ionen verhindern eine Messung von E_{Cl} und erschweren damit die Bestimmung der Chloridkonzentration. Optophysiologische Methoden hingegen erlauben es solche Fragestellungen durch direkte, nichtinvasive Messungen zu beantworten. Die Entwicklung genetisch kodierter Indikatoren eröffnete hier neue Perspektiven und zwischenzeitlich steht mit Clomeleon ein Indikator bereit, der Chloridmessungen in lebendem Gewebe erlaubt

Wodurch zeichnet sich die Optophysiologie aus? Die klassische Methode zur Bestimmung zellulärer Ionenkonzentrationen ist die Elektrophysiologie. Sie bietet eine hervorragende Zeitauflösung, macht aber nur Auskunft über die Zelle als Ganzes. Bestenfalls können im Falle eines kleineren Kompartimentes, wie z.B. eines Dendriten, auf subzelluläre Dimensionen eingeschränkte Aussagen gemach werden. Für mehr Einsicht in räumliche Details müssen andere Verfahren eingesetzt werden. Der Elektrophysiologie sind auch bei der Beschreibung großer Ensembles Grenzen gesetzt. Gerade in den Neurowissenschaften hat die Ausdehnung der Betrachtungsweise von den Eigenschaften einer Zelle auf die Eigenschaften von Netzwerken den Bedarf nach Untersuchungsmethoden für die Aktivität in Netzwerken und damit die simultane Aktivität vieler Zellen geschaffen. Die Lichtmikroskopie erlaubt es, unter Verwendung fluoreszenter Sonden physiologische Vorgänge von der subzellulären Ebene bis hin zur Ensembleebene orts- und zeitaufgelöst zu untersuchen. Je nach Fragestellung werden dabei unterschiedliche Mikroskopie-Techniken und unterschiedliche Probenpräparationen zum Einsatz kommen. Der Art der verwendeten Fluoreszenzsonden kommt dabei eine ganz herausragende Bedeutung zu.

Das Imaging ganzer Zellpopulationen stellt vielleicht die geringsten Anforderungen an die apparative Seite des Versuchs. Solange die Erfassung von Messdaten nicht auf bestimmte Subtypen von Zellen in einem Areal beschränkt bleiben soll, können Zellen mit synthetischen werden. Für Fluoreszenzfarbstoffen effektiv markiert verschiedene Arten von Untersuchungen stehen Farbstoffe zur Verfügung; so gibt es Ca2+- oder pH-sensitive Farbstoffe oder Farbstoffe, deren Eigenschaften sich mit dem Membranpotenzial ändern. Diese Farbstoffe werden in der Regel in ihrer veresterten Form appliziert, überwinden auf Grund ihrer lipophilen Eigenschaft die Zellmembran und werden in der Zelle durch Esterasen in eine nicht membranpermeable Form überführt, was zu guter Retention führt. Spannungsabhängige Farbstoffe lagern sich in die Membran ein. Die Beladung von neuronalem Gewebe mit den ester-konjugierten Farbstoffen hat sich dabei als nicht trivial herausgestellt. Erst durch die Druck-Injektion (Stosiek et al., 2003) konnten Areale mit guter Intensität markiert werden. Die Markierung großer Areale ist so zwar möglich, aber nicht einfach. Typischerweise weisen diese synthetischen Farbstoffe eine große Helligkeit (Produkt von Absorptionskoeffizient und Quantenausbeute) auf, und können in ihren Eigenschaften (Bindungskonstante, Wellenlängen) an die speziellen Erfordernisse einer Fragestellung angepasst werden. Was den Mikroskopaufbau angeht, wird ein Weitfeld-Mikroskop in der Regel ausreichend sein. Es sammelt mehr Licht als ein konfokales Mikroskop und hat damit ein besseres Signal/Rauschverhältnis $(S/N \propto \sqrt{n})$ mit *n* als der Zahl der gesammelten Photonen). Mit einer schnellen Kamera ausgestattet wird es auch schneller sein als ein konfokaler Aufbau, bei dem das Bild Punkt für Punkt gerastert wird. Dass das gesammelte Licht nicht nur aus der fokalen Ebene stammt, erschwert unter Umständen die Interpretation der Ergebnisse. Bei der Verwendung eines konfokalen Mikroskops dagegen ist der Ursprungsort des gesammelten Lichtes definiert.

Wenn hingegen Aussagen über physiologische Vorgänge auf zellulärer oder subzellulärer Ebene getroffen werden sollen, spielt das konfokale Mikroskop seine Vorzüge aus. Durch das konfokale Prinzip gelingt, es den Ursprung der gesammelten Information auf das Anregungsvolumen von einigen Femtolitern zurückzuführen. So kann Information aus einer Zelle oder gar einem Kompartiment isoliert gewonnen werden, ohne dass es durch Licht, das außerhalb des Fokus seinen Ursprung hat, verfälscht wird. Diese Aussage ist in dieser Form für die 2-Photonen-Mikroskopie gültig. Für ein konventionelles konfokales Mikroskop wird das Maß der Konfokalität durch die Größe der Lochblende bestimmt. Der Anteil von Signalbeiträgen, die außerhalb des fokalen Volumens ihren Ursprung haben, ist größer als in der 2-Photonen-Mikroskopie.

Wenn aber die Messungen auf einzelne Zelltypen in Gewebe beschränkt werden soll, stoßen die synthetischen Indikatoren an ihre Grenzen. Eine zelltypspezifische Beladung ist von wenigen Ausnahmen abgesehen nicht möglich. Einzig die Mikroinjektion in einzelne Zellen bietet eine Handhabe. Dieser Weg mag für Einzelzell-Imaging gangbar sein, für Populationsmessungen ist er es nicht. Außerdem ist dies eine hochgradig invasive Methode. Hier kommen die genetisch kodierten Indikatoren ins Spiel. Sie basieren in der Regel auf einem fluoreszierenden Protein. Durch Methoden der Gentechnik können die Zellen der Probe dazu gebracht werden, den Sensor mit dem sie untersucht werden sollen, selber herzustellen, was ein maximal nicht-invasives Experiment erlaubt. Durch den Einsatz gewebespezifischer Promotoren kann das Sensorprotein in definierten Zellpopulationen exprimiert werden. Bei diesen gewebe- bzw. zelltypspezifischen Promotoren besteht das Problem, dass sie häufig nicht stark genug sind, um eine für Imaging-Zwecke hinreichende Protein-Expression zu treiben. Werkzeuge der konditionalen Genexpression jedoch erlauben die Verwendung starker generischer Promotoren bei gleichzeitiger Gewebespezifität. Dieses Vorgehen erlaubt auch ein Labeling bei dem nur einzelne Zellen stark markiert sind. Diese Situation ist für Imaging Experimente besonders günstig, da in diesem Fall der Hintergrundwert (Dunkelstrom und Autofluoreszenz) dem gleichen Bild entnommen werden kann, aus dem auch die eigentlichen Messdaten gewonnen werden. Gerade die genetisch kodierten Indikatoren erreichen häufig nicht die Intensität, die mit synthetischen Indikatoren erreicht wird. Gerade bei geringeren Labeling-Intensitäten, damit aber auch geringerem Signal/Hintergrund-Verhältnis, ist eine Betrachtung des Hintergrundes wichtig. Dies gilt in besonderem Maße, wenn es nicht nur um die Beobachtung von Transienten geht, sondern um absolute Messgrößen. Ein weiterer Effekt einer geringeren Intensität ist deren Einfluss auf die Belichtungszeit, so dass für die Beobachtung schneller Effekte genetisch kodierte Indikatoren den synthetischen Indikatoren unterlegen seien können. Außerdem sind von den synthetischen Indikatoren bereits deutlich mehr erprobte Systeme verfügbar, und sie bieten vielleicht auch mehr Freiheiten bei der Anpassung an die spezielle Fragestellung. Zu Beachten ist auch, dass synthetische Farbstoffe manchmal eine nicht unerhebliche Toxizität zeigen, während die Expression von proteinbasierten Indikatoren gut toleriert wird. Dabei ist natürlich zu beachten, dass bei dem Versuch hohe Expression zu erreichen kein System gewählt wird, das zu sehr mit der Transkription und Translation der endogenen Proteine konkurriert, und daher die Zelle beeinträchtigt (Squelching-Effekt). Genetisch kodierte Indikatoren können auch einfacher innerhalb der Zelle lokalisert werden, indem man Membrananker oder Signalsequenzen

verwendet. Sie neigen auch weniger zur Anreicherung in sekretorischen Vesikeln als synthetische Farbstoffe.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die genetisch kodierten Indikatoren gegenüber der Elektrophysiologie bei Anwendungen Vorteile haben, wo definierte Zellen oder Zellpopulationen untersucht werden sollen. Außerdem sind sie unersetzbar in Situationen in denen subzelluläre Auflösung angestrebt wird.

Gegenüber synthetischen Farbstoffen spielen sie besonders in Gewebe ihre Vorteile aus. Die synthetischen Farbstoffe mögen in Zellkultur, wo die Beladung weniger ein Problem ist, überlegen sein. Außerdem übertreffen sie, was den dynamischen Signalumfang und das zeitliche Auflösungsvermögen angeht, meist die proteinbasierten Indikatoren.

Im Folgenden möchte ich zunächst einige technische Aspekte beleuchten, die für Imaging-Experimente im Allgemeinen und für Experimente zur Bestimmung von Chloridkonzentrationen mit Clomeleon im speziellen von Interesse sind. Somit muss je nach Fragestellung abgewogen werden, welche Methodik zum Einsatz kommen soll. Bezüglich der Messung von [Cl⁻]_i ist, zumindest unter den gegebenen Bedingungen, Clomeleon-Imaging als die Methode der Wahl für alle oben diskutierten Anwendungen anzusehen.

3.1 Präparat

Eine Untersuchung physiologischer Phänomene *in vivo* wird mit Sicherheit die wertvollsten Ergebnisse liefern. Andererseits ist der Versuch *in vivo* aus Gründen der Zugänglichkeit in vielen Fällen nicht möglich. Auf die Fluoreszenzmikroskopie bezogen bedeutet das, dass mit Hilfe der 2-Photonen-Mikroskopie zwar eine Untersuchungstiefe von bis zu 500 µm in das Gewebe hinein möglich ist, viele zu erforschende Fragestellungen aber zu tief im Gewebe verborgen sind als dass sie mit mikroskopischen Methoden *in vivo* zugänglich wären. So muss auf Schnittpräparationen zurückgegriffen werden. Generell sind akute Hirnschnitte eine anerkannte Präparation, dennoch besteht die Gefahr von Artefakten. Für neuronale Gewebe ist beschrieben, dass Traumazustände hervorgerufen durch Erschütterung, epileptiforme Aktivität, Ischämie aber auch durch direkte Beschädigung der Neurone wie Axotomie mit einer atypischen depolarisierenden GABA-Antwort einhergehen. Dies wird mit einer BDNF vermittelten Aktivierung der Tyrosin-Rezeptor-Kinase B und damit einer Entfernung von KCC2 von der Plasmamembran in Verbindung gebracht (Rivera et al., 2004). Gleichzeitig wird eine Aktivierung von membranständigem NKCC1 durch Phosphorylierung ins Feld

geführt (Pond et al., 2006). Beide Effekte würden zu einer Erhöhung der intrazellulären Chloridkonzentration führen. Da aber das Schneiden von Gewebe mit Sicherheit das Risiko eines Traumas birgt, muss bei der Messung von Chlorid an solchen Präparationen dem Risiko von Verfälschung der intrazellulären Chloridkonzentration durch trauma-induzierte Änderungen des Chlorid-Haushalts Rechnung getragen werden. Um die Belastung für das Präparat zu minimieren wurde in einer Ringer-Lösung geschnitten, in der Na⁺ durch Sucrose ersetzt wurde. Dadurch können keine Aktionspotenziale mehr entstehen und die durch den Schneideprozess erzeugte Exzitotoxizität wird verringert. Für das Einzelzell-Imaging gilt, dass eine rigorose Beurteilung der Zellen nach verschiedenen Kriterien (Morphologie, geringer Kontrast in der DIC-Darstellung, gleichmäßige Fluoreszenz) vorgenommen werden muss, um sicherzustellen, dass nur intakte Zellen zur Auswertung herangezogen werden. Die Elektrophysiologie dagegen selektiert schon durch die Methode bedingt zugunsten gesunder Zellen; von beschädigten Zellen kann häufig gar keine Ableitung hergestellt werden. Für Populations-Imaging mit einem Weitfeld-Mikroskop trifft das Gegenteil zu. Hier werden unvoreingenommen die Signale aller markierten Zellen zum Gesamtsignal addiert. In dieser Situation mag sich günstig auswirken, dass das Weitfeld-Mikroskop auch Licht aus tieferen, weniger in Mitleidenschaft gezogenen Schichten sammelt, selbst wenn auf eine oberflächliche Schicht fokussiert wurde.

Auf die Praxis der durchgeführten Versuche bezogen bedeutet das, dass neben normalen gesunden Neuronen verschiedener Fluoreszenzintensität auch hochfluoreszente Zellen von dreieckiger Morphologie gefunden wurden, die im IR-DIC Bild einen sehr hohen Kontrast zeigten. Dieses Erscheinungsbild in der DIC Darstellung kann auch bei Zellen in Wildtyp-Schnitten gefunden werden, es steht somit nicht notwendigerweise in Zusammenhang mit der Expression von Clomeleon. Von diese Zellen ließen sich nicht ableiten, gleichzeitig wiesen sie ein einer eher unphysiologisch hohen Chloridkonzentration entsprechendes R auf. Wir nehmen an, dass diese Zellen eine beschädigte Membran aufweisen, durch die Nachbarzellen komprimiert werden und dadurch der Indikator konzentriert wird. Da diese Zellen insbesondere in oberflächlichen Zellschichten auftraten, ist die Annahme gerechtfertigt, dass es sich um während des Schneidens geschädigte Zellen handelt, die von einer Analyse der Chloridkonzentrationen ausgeschlossen werden müssen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Hirnschnittpräparationen als Modellsystem angemessen sind, wenn bei der Interpretation der Ergebnisse vorgenannte Einschränkungen berücksichtigt werden.

3.2 Mikroskopie

Nicht nur bei der Auswahl des Präparates sondern auch bei der Auswahl des Mikroskops sind gewisse Punkte zu beachten, um ein erfolgreiches Experiment zu erzielen.

Gerade für emmisions-ratiometrische Sensoren wie Clomeleon spielt das Ausbleichen durch das Anregungslicht eine große Rolle. Ein differentielles Ausbleichen der Fluorophore ist zu vermeiden. Ein Abweichen von der 1:1 Stöchiometrie würde zu einem verschobenen Fluoreszenzverhältnis führen und damit eine Bestimmung von Chloridkonzentrationen auf Grund der durchgeführten Kalibrierung verfälschen. Der Fluorophor von YFP ist der photolabilere der beiden Fluorophore. Ein Ausbleichen von YFP würde das ausgelesene Verhältnis R der Fluoreszenzintensitäten zu kleineren Werten verschieben und damit eine höhere als die reale Chloridkonzentration vorgeben. Der Situation wurde Rechnung getragen, indem im Besonderen während der Festlegung des geeigneten Bildausschnitts darauf geachtet wurde, die Beleuchtungszeit zu minimieren. Da für diese Ruhe-Chlorid Messungen an Zellkörpern die Ortsauflösung nicht kritisch war, wurden die Kameras, die die beiden Emissionskanäle aufzeichnen, in einem Binning-Modus betrieben, um bei gleicher Anregungsintensität die Beleuchtungszeit verkürzen zu können. Außerdem bedienten wir uns eines Nipkow-Scheiben Mikroskopes, das sich im Vergleich zu konfokalen Raster-Mikroskopen durch ein niedrigeres Ausbleichen der Proben auszeichnet. Es wurde auch darauf geachtet, dass der CFP-Donorkanal nicht zu intensitätsschwach aufgezeichnet wird. Dadurch, dass der Term für den Donor im Nenner des Bruchs steht, der das Verhältnis der Emissionsintensitäten R ($R = I_{YFP}/I_{CFP}$) beschreibt, würden sich kleine Fehler bereits deutlich auswirken. Es muss außerdem darauf geachtet, dass der in der Regel hellere Akzeptorkanal nicht gesättigt ist.

Die Korrektur des Hintergrundes spielt eine große Rolle für quantitative Imaging-Experimente. Solange der Hintergrund auf beide Kanäle prozentual gleich verteilt ist, kann er vernachlässigt werden. Diese Situation ist meist nicht gegeben. Der Hintergrund besteht hauptsächlich aus zwei Komponenten. Diese sind der Dunkelstrom der Kamera und die Autofluoreszenz des Gewebes. Wenn in der Probe ein Areal ist, in dem sich kein Sensor befindet und das nicht durch Streulicht überstrahlt wird, kann daraus der Hintergrund bestimmt werden. Andernfalls müssen die Hintergrundwerte aus Wildtyp-Gewebe unter vergleichbaren Bedingungen (Beleuchtungsstärke, Belichtungszeit, Detektorverstärkung) gewonnen werden. Dieser Weg wurde in dieser Arbeit wegen der außerordentlich starken und dichten Expression der *Thy1*-Clomeleon Linie gewählt.

3.3 Chronische Expression und Integrität

Ein wichtiger Aspekt ist die Überprüfung der Integrität des Indikatormoleküls auch unter Bedingungen chronischer Expression. Eine Veränderung der Struktur des Sensor-Proteins könnte Auswirkungen auf die Funktion des Sensors haben.

Eine proteolytische Spaltung des Proteins trennte entweder die Fluorophore oder änderte die Fluoreszenzeigenschaften bis hin zur Nichtfluoreszenz. Dieses würde die Kalibrierungskurve entwerten und zu einer falschen Bestimmung von Chloridkonzentrationen führen. So würde eine Spaltung zwischen den Chromophoren oder eine C-terminale Trunkierung zu falschhohen Chloridwerten führen. Durch einen Western-Blot von Gesamthirnextrakten von *Thy1*-Clomeleon Tieren unterschiedlichen Alters unter Verwendung eines polyklonales Anti-GFP-Serums gelang es zu zeigen, dass Clomeleon auch nach langer Expression intakt bleibt.

Ein weiter wichtiger Punkt ist die Ungiftigkeit des exprimierten Sensorproteins für die Zelle. Die Auswertung von elektrophysiologischen Basisparametern gemessen an Schicht-V Pyramidenzellen des Kortex in akuten Schnittpräparationen von *Thy1*-Clomeleon Tieren lässt den Schluss zu, dass die Expression von Clomeleon die Zelle nicht ungünstig beeinflusst.

Grundsätzlich vorstellbar ist, dass ein Sensormolekül durch die Bindung des Analyten eine Pufferwirkung entfaltet und dadurch Einfluss auf zelluläre Vorgänge nimmt. Dieses lässt sich aber für Clomeleon wegen der gegenüber der Konzentration des Sensorproteins drei Größenordnungen größeren intrazellulären Chloridkonzentration ausschließen.

3.4 Kalibrierung

Wenn Clomeleon nicht nur als Aktivitätssensor für Inhibition genutzt werden soll, wofür YFP allein bereits ausreichte (Slemmer et al., 2004), sondern als Indikator, der absolute Chloridkonzentrationen ausliest, ist eine Kalibrierung der Schlüsselschritt, um einem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der beiden Emissionskanäle eine Chloridkonzentration zuordnen zu können. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten hängt aber von der FRET-Effizienz bei gegebener Chloridkonzentration ab. Die FRET-Effizienz wiederum hängt vom Abstand des FRET-Paares zueinander und dem Förster-Radius R₀ ab. R₀ ist eine Konstante, die den Abstand angibt, in dem der Energieübertrag durch FRET halbmaximal ist. Für des FRET-Paar CFP YFP beträgt R₀ etwa 50 Å. Der Förster-Radius R₀ für ein FRET-Paar hängt ab von Eigenschaften wie dem Brechungsindex n des Mediums und dem Orientierungsfaktor κ der Fluorophore, der auch durch die Beschaffenheit des Mediums beeinflusst werden kann. Von Clomeleon lässt sich mit Sicherheit sagen, dass der Sensor nicht über eine

Änderung des Abstands zwischen Chromophoren beruht (vgl. Cameleon) sondern auf einer Änderung von R₀ durch eine Verringerung des Überlapp-Integrals auf Chlorid-Bindung hin. Wenn Chlorid bindet, verläuft die Kurve, die den Absorptionskoeffizienten in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge beschreibt flacher, womit sich ein geringeres Überlappintegral mit dem Emissionsspektrum von CFP ergibt.

Die Kalibrierung durch Dialyse der Zellen in whole-cell Konfiguration birgt das Risiko, dass niedermolekulare zytosolische Bestandteile rasch ausgewaschen werden und so die Übertragbarkeit der Kalibrierung auf die intakte Zelle nicht mehr gewährleistet ist, weil sich z.B. ionale Bedingungen ändern, was Einfluss auf die räumliche Orientierung der Fluophore haben könnte. Bei der Kalibrierung mit Hilfe von Ionophoren sollte die Zusammensetzung des Zytosols weniger beeinflusst werden, sodass der wenn auch geringe Einfluss anderer zytosolischer Bestandteile neben Chlorid auf den Absorptionskoeffizienten von YFP berücksichtigt wird. Dafür ist die Einstellung des pH-Wertes und der Chloridkonzentration vielleicht weniger verlässlich als bei einem whole-cell Zugang. Ein Nachteil der Ionophore ist sicher ihre hohe Toxizität. Im Prinzip dienen die Zellen in diesem Kalibrierungsexperiment nur als kleine Küvetten. Es wäre aber vorstellbar, dass in einer apoptotischen Zelle das Indikatorprotein verändert wird.

Die Auswertung der Kalibrierungskurven zeigt, dass beide Methoden im Bereich mittlerer Konzentrationen recht gut übereinstimmen. In Richtung Extrema ergeben sich jedoch erhebliche Abweichungen voneinander. Da beide Methoden aus den vorherbetrachteten Überlegungen heraus ihre Vor- und Nachteile haben, entschlossen wir uns statt einer Kalibrierung den Vorzug zu geben, die erhaltenen Werte zu mitteln. Die so erhaltene Kalibrierung stimmt in einem Bereich zwischen 10 mM und 50 mM Chlorid doch sehr gut mit den jeweiligen Messwerten überein. Besonders kritisch ist die Bestimmung von Rmax, dem Wert bei Abwesenheit von Chlorid. Mit der Methode der Dialyse der Zellen in whole-cell Konfiguration ist eine Messung bei 0 mM Chlorid aus technischen Gründen nicht möglich. Die Ionophoren-Methode erlaubt es, eine solche Lösung vorzugeben. Ob der Zustand aber erreicht wird bleibt fraglich, auch wenn das weit positiv liegende Gleichgewichtspotenzial von Chlorid den Ausstrom begünstigt. Das Membranpotenzial wird nach der Goldmann-Gleichung durch Ionengradienten und Permeabilitäten bestimmt. Da das Experiment in einer Lösung hoher K⁺-Konzentration durchgeführt wird und gleichzeitig auch die Permeabilität von Chlorid durch die Einlagerung der Ionophore steigt, wird das Membranpotenzial zusammenbrechen. Für Tributyl-Zinn ist eine toxische Wirkung auf Na⁺/K⁺-ATPasen beschrieben (Hartl et al., 2001; Pinkney et al., 1989; Massaro et al., 1989), sodass zu erwarten ist, dass auch der Na⁺-Gradient dissipiert. Dadurch sollte Chlorid durch die extrazelluläre Lösung präzise zu klemmen sein. Ein Membranpotenzial ungleich von Null bedeutete im Gegenteil eine Triebkraft für Chlorid, die eine genaue Einstellung der intrazellulären Chloridkonzentration verunmöglichte. Aus den Verunreinigungen der eingesetzten Chemikalien ergibt sich eine zu erwartende Konzentration von 70 µM Chlorid (Millipore-Wasser allein: 30 nM Chlorid) in der extrazellulären Lösung (nominell 0 mM Chlorid). Wenn das Membranpotenzial nicht zusammenbricht und durch den Na⁺-Gradienten gesetzt würde (56 mV), folgte damit eine intrazelluläre Gleichgewichtskonzentration für Chlorid von 0,7 mM. Inwieweit Transporteraktivität (NKCC1, KCC2) die Gleichgewichtseinstellung beeinflusst ist unklar, wenn auch Vorversuche in Gegenwart von 100 µM Bumetanide (in dieser Konzentration Blocker beider Transporter (Russell, 2000)) keine Unterschiede ergaben. Ein interessanter Aspekt von Clomeleon ist, dass der dynamische Umfang zwischen Küvettenmessungen und Messungen in Zellen vergleichbar ist. Chemische Chlorid-Indikatoren unterscheiden sich in ihren Eigenschaften abhängig von der chemischen Umgebung. Sie werden in ihrem elektronisch angeregten Zustand durch Stöße mit Anionen in ihrer Fluoreszenz gelöscht. Wegen der intrazellulär vorhandenen Anionen ändert sich die Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Chloridkonzentration im Vergleich zu Messungen in Pufferlösungen, sodass für diese Indikatoren eine Kalibrierung in situ zwingend durchzuführen ist. Aber auch genetisch kodierte Indikatoren können durch Wechselwirkungen mit endogenen Bestandteilen von Zellen in ihren Eigenschaften beeinflusst werden. So wird der insbesondere im Vergleich zu Küvettenmessungen geringe dynamische Umfang von Yellow Cameleon in Zellen auf Interaktionen zwischen dem Sensor und endogenem Calmodulin bzw. mit Calmodulin interagierenden Proteinen zurückgeführt (Nagai et al., 2004). Bedingt durch den Aufbau von Clomeleon, bestehend aus den zwei β-Fass Strukturen von CFP und YFP, einem kurzen Linker und einer tief in dem β-Fass von YFP lokalisierten Sensorfunktion, sind solche Interaktionen nicht zu erwarten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Clomeleon auf zwei unabhängige Methoden in Zellkultur kalibriert werden kann. Beide Methoden liefern im Bereich mittlerer Konzentrationen gut übereinstimmende Werte. Vorteilhaft wirkt sich aus, dass Clomeleon durch seine Struktur, von der pH-Abhängigkeit abgesehen, recht unempfindlich gegenüber Umgebungseinflüssen ist.

3.5 Thy1-Clomeleon

Die *Thy1*-Clomeleon Biosensor Mauslinien wurden generiert, um Chlorid betreffende Fragestellungen in neuronalem Gewebe studieren zu können. Ein interessanter Aspekt dieser Mäuse ist die Verschiedenartigkeit der erhaltenen Linien, bedingt durch die starke Abhängigkeit des Expressionsmusters vom Integrationsort des Transgens. Diese Vielfalt erhöht die Wahrscheinlichkeit für eine gegebene Fragestellung eine geeignete Mauslinie zu finden. So konnte eine retinaphysiologische Untersuchung mit Hilfe von Mäusen der Linie CLM1 durchgeführt werden (Duebel et al., 2006), bei denen spezifisch retinale ON-Bipolarzellen markiert sind. Ein "Golgie-Typ" Expressionsmuster, d.h. starke Expression in wenigen, vereinzelt stehenden Neuronen, wurde nicht erhalten. Dieses Expressionsmuster ist für Thy1-Transgene beschrieben (Feng et al., 2000) und hat was die Bestimmung des Hintergrundsignals angeht für das Imaging klare Vorteile.

Die robuste durch das *Thy1*-Promotorfragment kontrollierte Expression ermöglicht ein Imaging mit gutem Signal-/Hintergrundverhältnis. Es wurden Signale erhalten, die häufig ein Verhältnis von 25 im Donorkanal und 50 im Akzeptorkanal überstiegen.

Eine Schwierigkeit bei der Arbeit mit *Thy1*-Clomeleon Mäusen ist, dass bedingt durch die quasi ubiquitäre Expression in neuronalem Gewebe ein Hintergrund schwierig zu bestimmen ist. So war es nötig, unter strikter Kontrolle der Aufnahmeparameter eine Eichkurve an Wildtyp Gewebe zu erzeugen. Dabei zeigte sich, dass die Autofluoreszenz mit dem Alter zunimmt, in einer Altersstufe aber zwischen verschiedenen Hirnarealen kein Unterschied besteht. So konnte zu einem Experiment ein Hintergrundwert unter Berücksichtigung der Alterstufe und der Aufnahmeparameter für jeden Kanal bestimmt und subtrahiert werden.

Generell ist zu beachten, dass auch in der konfokalen Mikroskopie das Signal durch Licht, das seinen Ursprung außerhalb des fokalen Volumens hat, kontaminiert wird. Im Besonderen trifft diese Aussage auf das Nipkow-Scheiben Mikroskop zu, das durch den verwendeten Typus Lochscheibe bedingt eine geringe Konfokalität aufweist. Der Durchmesser dieser Löcher ist auch in der Regel nicht verstellbar, sodass man nicht in der Lage ist Konfokalität gegen Geschwindigkeit zu tauschen und umgekehrt. Dies spielt gerade bei der Auswertung feiner Strukturen, wie z.B. dendritischen Dornen, eine Rolle. In den Fällen, in denen ein Populations-Imaging betrieben wird, spielt es keine große Rolle, wenn das Licht aus gleichartigen Strukturen stammt (im Stratum radiatum z.B. stammt das meiste Licht aus Dendriten).

Wie bereits weiter oben besprochen, stellt die hohe Expression für die Zelle offensichtlich kein Problem dar, da sich die elektrophysiologischen Parameter im typischen Bereich für die untersuchten Zelltypen befinden.

Es lässt sich sagen, dass diese Mauslinie für Populations-Imaging Experimente hervorragend geeignet ist. Einzelzell-Imaging hingegen ist anspruchsvoll, da durch die dichte Expression die Isolation des Nutzsignals erschwert ist. Andererseits ist man durch den zeitlichen Verlauf der Expression und die verschiedenen Expressionsmuster eingeschränkt. So stehen die Chancen zwar gut, eine zu einer bestimmten Fragestellung passende Mauslinie zu finden. Andererseits hat man selber keine Handhabe, die Expression zu beeinflussen. Konditionale Expressionssysteme können zur Lösung dieses Problems beitragen.

3.6 ROSA26-floxSTOP-Clomeleon (ROSAC1)

Die Idee, die zur Generierung dieser Mauslinie führte war, dass es konditionale Genexpression basierend auf dem Cre/loxP-System erlaubt, durch bloßes Verpaaren zweier Mauslinien die Genexpression in definierten Zellpopulationen zu aktivieren. Der Promotor, der die Expression der Cre-Rekombinase kontrolliert, ist damit verantwortlich, welche Zellpopulation den Indikator exprimiert. Dass schließlich alle exprimierenden Zellen zu einer genetischen Population gehören, setzt voraus, dass der Promotor des Cre-Transgens sich so verhält wie der endogene Promotor. Durch die große Zahl verfügbarer Cre-Mauslinien sollte die Flexibilität zu erreichen sein, die das *Thy1*-System vermissen lässt. Durch eine weniger dichte Markierung sollte das Einzelzell-Imaging vereinfacht werden, da aus dem gleichen Bild ein Hintergrund bestimmt werden kann. Außerdem wird Populations-Imaging dahingehen vereinfacht, dass alles Licht (mit Ausnahme der Autofluoreszenz des Gewebes) aus einer definierten Zellpopulation stammt.

Die in Kapitel 2.1.2.6 und 2.1.2.7 beschriebenen Versuche zeigen, dass die Stopp-Kassette durch Cre-Rekombinase in gewebsspezifischer Art und Weise deletiert werden kann und der C-terminale Chromophor (YFP) vorhanden ist. So zeigen die akuten Sagittal-Schnitte des Nachwuches der mit BAC α_6 Cre bzw. Parvalbumin-Cre verpaarten ROSAC1 Mäuse ein unterschiedliches Expressionsmuster, das jeweils mit den Erwartungen für diese Mäuse übereinstimmt (Aller et al., 2003; Meyer et al., 2002). Der Versuch GnRH-Zellen zu aktivieren, zeigt ein bekanntes Problem des Cre/loxP-Systems. Es gibt mehr fluoreszente Zellen als GnRH-Neurone. Dies liegt daran, dass diese Zellen während ihrer Entwicklung vorübergehend Cre-Rekombinase exprimierten, woraufhin die irreversibele Rekombination

des Allels stattfand. Das Rekombinationsereignis spiegelt sich in der reifen Zelle in der Fluoreszenz wieder.

Wir haben keine Zweifel daran, dass das Transgen im Sinne der Klonierungsstrategie in den Ziellokus rekombinierte. Die Effizienz der verwendeten Stopp-Kassette bestehend aus vier Polyadenylierungssignalen ist durch die analog aufgebaute ROSA26-lacZ Maus (R26R) gezeigt (Soriano, 1999). Prinzipiell ist das Konstrukt also funktionell. Ein funktionelles Imaging hingegen wird durch das geringe Expressionsniveau erschwert.

Dieser Befund deckt sich mit der Beobachtung, dass eine LacZ-Färbung mit der R26R-Maus nach verhältnismäßig langen Inkubationszeiten verlangt. Auch andere Arbeiten berichten von geringer Expression am ROSA26-Lokus (S. Freese, Dissertation, Universität Heidelberg). Die Arbeiten, die uns veranlassten einen Knock-in in den ROSA26-lokus zu wagen, berichteten über die Expression im embryonalen Tier (Srinivas et al., 2001; Soriano, 1999; Zambrowicz et al., 1997).

Das Prinzip einer durch das Cre/loxP-System in ihrer Expression kontrollierten universellen Chloridindikator-Mauslinie konnte zwar im Prinzip verwirklicht werden, doch ist der praktische Einsatz durch das geringe Expressionsniveau für intensitätsbasierte Messungen nur eingeschränkt möglich. Eine Erweiterung des Einsatzbereiches scheint dagegen mit der FLIM Mikroskopie gegeben zu sein (siehe Abschnitt 3.10).

3.7 Clomeleon Expression durch virale Infektionssysteme

Die klassischen transgenen Techniken haben klare Vorteile, wenn auf systemischer Ebene Veränderungen erreicht werden sollen. Um z.B. den Effekt eines Rezeptor Knock-outs zu untersuchen, ist es besser mit Hilfe der entsprechenden etablierten Techniken (Cre/loxP) die Rezeptorpopulation in bestimmten Geweben heraus zu nehmen. Für Imaging Experimente hingegen ist es meist von Vorteil nur einen kleinen Teil einer genetisch definierten Population zu markieren, um günstige Bedingungen für das Experiment zu erhalten. In der Praxis bedeutet das eine stark gefärbte Zelle vor einem dunklen Hintergrund. Diese Bedingungen erlauben eine eindeutige Zuordnung des gesammelten Lichtes und eine Hintergrundsbestimmung aus dem gleichen Bild. Mit transgenen Techniken kann diese Situation erreicht werden. In vielen Fällen jedoch werden die gebespezifischen Promotoren nicht die nötigen Expressionsniveaus treiben, um mit gutem Signal/Rausch-Verhältnis imagen zu können. Der Virus basierte Gen Transfer bietet sich als Alternative zu den herkömmlichen transgenen

Techniken an, um in einer sehr viel flexibleren Art und Weise die Expression von Indikatorproteinen in Neuronen zu erreichen.

Virale Expressionssysteme werden schon seit längerer Zeit genutzt, zeichnen sich aber teilweise durch gravierende Nachteile aus. So sind α -virale Expressionssysteme durch eine ausgeprägte Zytotoxizität gekennzeichnet und somit nur als Kuzzeit-Expressionssysteme (max. 48 h) geeignet. Lentiviren sind geeignet um eine stabile Langzeit Expression zu erreichen, breiten sich aber wegen ihrer Partikelgröße nur gering im Gewebe aus. Dies kann je nach Fragestellung vorteilig oder nachteilig sein. Besonders nachteilig ist, dass sie keinen Tropismus zeigen, sodass eine zelltypspezifische Expression nur durch Einsatz entsprechender Promotoren erreicht werden kann. Diese Promotoren sind aber nicht notwendigerweise gleichzeitig spezifisch und stark. Außerdem setzen sie als integrierende Viren eine S2-Einrichtung voraus. Mit der Eigenschaft der Integration in das Genom der Wirtszelle ist auch die Möglichkeit der Entstehung einer Knock-out Situation gegeben. Außerdem besteht dadurch auch die Gefahr einer onkogenen Wirkung.

Als Viren erster Wahl für Langzeitexpression haben sich rekombinate adenoassoziierte Viren (rAAV) erwiesen. Sie breiten sich gut im Gewebe aus, sind praktisch nicht zytotoxisch und zeigen *in vivo* einen Tropismus zugunsten von Neuronen. Dadurch ist man frei in der Wahl des Promotors und kann auch außerordentlich starke generische Promotoren einsetzen. Außerdem sind sie S1 eingestuft. Nachteilig sind die begrenzte Kapazität von 4,9 kbp von ITR zu ITR und die verhältnismäßig schwierige Aufreinigung der Viruspartikel. Gerade durch die Inkubationszeit von in der Regel zehn Tagen kann eine Verunreinigung der injizierten Viren Suspension mit Material der Wirtszellen zu heftigen Immunantworten mit Gewebsnekrose führen.

Die bereits im Labor eingesetzten rAAV1/2 Viren wiesen sehr gute Infektions- und Expressionseigenschaften aus. Der auf dieser Basis durch Einfügen einer loxP flankierten Stoppkassette zwischen Promotor und GOI entwickelte Virus, erfüllt die in ihn gesetzten Erwartungen. Die Stopp-Kassette hält – obwohl gegenüber der in der ROSAC1 Maus um ein Polyadenylierunssignal verkürzt – dicht, andererseits lässt sich das Konstrukt durch Cre-Rekombinase aktivieren. Dabei treibt der generische CMV-Verstärkter/Huhn- β -Aktin Promotor (CBA-Promotor) Expression zu hohen Niveaus.

Es lässt sich sagen, dass diese Art von Viren ein großes Potenzial hat. Einerseits erlauben sie die Markierung definierter Zellpopulationen durch den zelltypspezifischen Promotor des Aktivators. Im floxSTOP-Konstrukt sorgt dann der generische CBA-Promotor unabhängig vom Aktivator für hohe Expressionsniveaus. Die Expression des tetO₇-Responders dagegen
ist von der Promotorstärke des Aktivators abhängig. Die hier verwandte *Thy1*-tTA Aktivator-Linie zeigt sehr starke Expression. Falls jedoch eine verfügbare tTA-Aktivator-Linie nicht genug exprimiert, um eine ausreichende Aktivierung des Responders zu erreichen, könnte das floxSTOP-Konstrukt in Verbindung mit der LC1-Linie (Schonig et al., 2002) aktiviert werden. Ein weiterer Vorteil des tetO₇-Responders ist die bidirektionale Expression. So wird durch dieses Konstrukt neben Clomeleon auch Cre-Rekombinase exprimiert. Dies erlaubte zum Beispiel in Neuronen eine konditionales Knock-out Allel zu aktivieren und den Einfluss dieser Manipulation auf die Chloridkonzentration mit Clomeleon zu messen.

Die Dichte des Labelings lässt sich entweder über den Virustiter oder die Aktivatorlinie einstellen. Von der *Thy1*-tTA Aktivator-Linie ist eine Sub-Linie verfügbar die quasi panneural exprimiert, eine andere Sub-Linie dagegen zeigt ein "Golgi-Typ" Expressionsmuster. Ob es sinnvoller ist mit geringem Titer in erstere Maus zu injizieren oder gar mit hohem Titer in letztere, um in diesem Fall über Mehrfachinfektion höhere Expression zu erreichen, bleibt auszutesten.

Der virusvermittelte Gentransfer hat sich als das besonders viel versprechend erwiesen, um die für das Einzelzell-Imaging geforderten Bedingungen wie hohe Expression in einzeln stehenden, genetisch definierten Zellen zu ermöglichen.

3.8 Bestimmung der Entwicklung der postnatalen Chloridkonzentration an akuten Hirnschnitten der Linie CLM11

Depolarisierende GABA-Antworten wurden bereits vor mehr als einem viertel Jahrhundert beschrieben (Alger and Nicoll, 1979; Andersen et al., 1980). Es dauerte allerdings lange Zeit, bis dieser Effekt einer depolarisierenden GABA-Antwort im jungen Tier gegenüber einer hyperpolarisierenden Antwort im adulten Tier auf eine Änderung der intrazellulären Chlorid-konzentration und damit gekoppelt einer Änderung des Nernst-Potenzials von Chlorid zurück-geführt wurde (Cherubini et al., 1991; Owens et al., 1996). Diese Hypothese wurde durch die differentielle Expression beziehungsweise Aktivität der Chloridtransporter NKCC1 und KCC2 in neuronalem Gewebe gestützt (Rivera et al., 1999; Hubner et al., 2001a; Stein et al., 2004; Rivera et al., 2004). Die hier vorgestellten Ergebnisse liefern die erste direkte, nicht-invasive Darstellung des postnatalen Chloridgradienten und bestätigen damit die These, dass die intrazelluläre Chloridkonzentration entwicklungsabhängig reguliert ist.

Anhand der Problemstellung der entwicklungsabhängigen intrazellulären Chloridkonzentration von Neuronen sollte die Anwendbarkeit von Clomeleon auf die Messung von Chloridkonzentrationen in Gewebe getestet werden. Dazu wurde an akuten Hirnschnitten gearbeitet, die von Tieren der Linie *Thy1*-Clomeleon gewonnen wurden.

Da Neurone auf Stress mit einer Umpolung der mit der intrazellulären Chloridkonzentration verknüpften GABA-Antwort reagieren (Payne et al., 2003), wurde größter Wert darauf gelegt, während der Präparation der Gehirnschnitte so schonend wie möglich vorzugehen. Eine große Rolle spielte dabei die Verwendung von Sucrose-Ringer. Durch die Substitution von Na^+ durch Sucrose kommt die elektrische Aktivität im Schnitt zum Erliegen, weil keine Aktionspotenziale mehr gefeuert werden können. Die so erhaltenen parasagittalen Schnitte sahen in der DIC-Betrachtung deutlich besser aus als in normaler Ringer-Lösung geschnittene Präparate. Nach einer halbstündigen Inkubation bei 35 °C wurden die Schnitte bei Raumtemperatur gehalten. Die Messung erfolgte ebenfalls bei Raumtemperatur. Der Versuch geschädigte Zellen mit Sulfo-Rhodamin 101, einem hydrophilen Farbstoff, sichtbar zu machen verlief erfolglos. Um das Ausbleichen der Proben zu minimieren wurden zur Festlegung des Bildausschnittes Such-Stapel, d.h. Bildstapel kurzer Belichtungszeit und großer Ebenenabstände (100 ms, 10 µm), aufgenommen. Die endgültigen Aufnahmen erfolgten mit einer Belichtungszeit von 500 ms bis 5000 ms je nach Alter des Tieres und betrachtetem Areal. Das dabei auftretende Ausbleichen der Fluorophore war vernachlässigbar. Anschließend nach jedem Bildstapel wurde noch die Beleuchtungsstärke gemessen.

Die Wildtyp-Tiere für die Ermittlung der Kalibrierungskurve wurden identisch behandelt, nur dass in diesem Fall jeder Bilderstapel mit verschiedenen Belichtungszeiten wiederholt wurde.

Mit dem Nipkow-Scheiben Mikroskop wurde bei einer Anregung mit der 457 nm Laserlinie eine Eindringtiefe von rund 50 µm in den Schnitt erhalten. Dadurch, dass die aufgenommenen Neurone verhältnismäßig oberflächlich liegen, besteht die Gefahr, dass insbesondere ihre basalen Dendriten beim Schneiden verletzt werden und daraufhin die Zelle mit einer Stressantwort und mit untypisch hohem intrazellulärem Chlorid reagiert. Deshalb wurden die Neurone nach strengen morphologischen Kriterien geprüft und für die Auswertung ausgewählt. In die Auswertung gingen schließlich nur hippokampale Pyramidenzellen des Cornu ammonis Region 1 ein.

Zur Auswertung wurden um einzelne Neurone ROIs gelegt und die Fluoreszenz für jeden der beiden Emissionskanäle ausgelesen. Die zu subtrahierenden Hintergründe wurden über die an Wildtyp-Gewebe erhaltenen Kalibrierungskurven erhalten. Da die Kalibrierung der Messapparatur für einen intrazellulären pH-Wert von 7,25 erfolgt war, viele Veröffentlichungen aber einen pH-Wert von 7,1 für derartige Schnittpräparationen in Ringer-Lösung beschreiben (Pond et al., 2006; Xiong et al., 2000; Knopfel et al., 1998; Amos et al., 1996; Amos and Richards, 1996; Gaillard and Dupont, 1990), wurde unter dieser Annahme der pH-korrigierte K_D^{korr} aufgrund der beschriebenen pH-Abhängigkeit von Clomeleon errechnet (Kuner and Augustine, 2000).

Die ermittelten Chloridwerte wurden für die einzelnen Alterstufen als Histogramm aufgetragen und mit einer Gaußkurve gefittet. Die Form der Darstellung als Histogramm wurde gewählt, um die Verteilung der Werte beurteilen zu können. So wurden für die Altersstufe P5 zwei Populationen von Chloridkonzentrationen gefunden. Über die Zeit sinkt der Schwerpunkt der Verteilung ab und die Verteilung wird schmaler. Vorteil dieser Art der Darstellung ist auch, dass einzelne Ausreißer, die vermutlich unphysiologische Chloridwerte aufgrund von Verletzung zeigen, nicht so sehr ins Gewicht fallen, wie bei der Berechnung eines arithmetischen Mittelwertes. Wegen der Vermutung des unphysiologischen Verhaltens wegen Beschädigung und weil sie nicht Teil eines Populationsschwerpunktes sind, wurden Werte über 40 mM Chlorid von der Berechnung des arithmetischen Mittels der Chloridkonzentrationen ausgeschlossen.

Die so erhaltenen Werte führen unter Vernachlässigung des Hydrogencarbonat-Stromes und der Annahme eines RMP von -68 mV zu einer Umpolung einer depolarisierenden auf eine hyperpolarisierende GABA-Antwort bei P14. Der depolarisierende Hydrogencarbonat-Strom durch die GABA_A-Rezeptoren hingegen wird das Absinken von E_{GABA} unter das Ruhe-Membranpotenzial noch etwas verzögern. Im adulten Tier scheint sich die intrazelluläre Chloridkonzentration bei 5 mM zu stabilisieren. Der Verlauf der Chloridkonzentrationen ist in guter Übereinstimmung mit Werten, die mit Gramicidin-perforierten Ableitungen (Owens et al., 1996) und in einem anderen Laboratorium ebenfalls mit Clomeleon (Pond et al., 2006) erhalten wurden.

Der beobachtete Verlauf geht sehr gut mit der Expression der relevanten CCCs zusammen (Abb. 3.1). Der Chloridimporter NKCC1 wird postnatal nur noch gering exprimiert (Hubner et al., 2001a). Die Expression des Chloridexporters KCC2 erreicht bei P15 das Niveau adulter Tiere und die Aktivierung des Transporters durch Phosphorylierung (Kelsch et al., 2001) verläuft parallel mit der Expression von KCC2 (Stein et al., 2004).



Abb. 3.1: Die entwicklungsabhängige Umpolung der GABAergen Antwort durch Absinken der intrazellulären Chloridkonzentration verläuft parallel der Expression des Chlorid-Exporters KCC2.

Der Entwicklungsgradient entspricht mit einer Abnahme der Chloridkonzentration von 64 % in der Größenordnung dem in der ersten veröffentlichten Arbeit zu Clomeleon (Kuner and Augustine, 2000) an primären hippokampalen Kulturen gezeigten Entwicklungsgradienten von 56 % (48 mM bei P5, 21 mM bei P14). Die unterschiedliche absolute Konzentration mag von einer nicht ausreichenden Korrektur des pH-Fehlers beruhen (korrigiert für pH_{ist} = 7,1 und pH_{Kal} = 7,4 betragen die Chloridkonzentrationen 29 mM bei P5 und 13 mM bei P14). Die übrige Differenz mag auf die artifiziellen Bedingungen der Zellkultur zurückzuführen sein. Theoretisch wäre es auch denkbar, dass eine Änderung des pH-Wertes um eine halbe Einheit

gradienten vortäuscht. Dafür wäre aber eine Änderung des pH-Wertes um eine halbe Einheit nötig. Dies ist angesichts der strikten Kontrolle des pH-Wertes in Neuronen unwahrscheinlich.

Die sehr breite Streuung der Chloridkonzentrationen bei P5 nimmt über die Entwicklung ab. Das mag damit erklärbar sein, dass im jungen Tier noch Maturierung der Neurone stattfindet. Dabei befinden sich Neurone in unterschiedlichen Stadien der Reifung, was in einer breiten Konzentrations-Verteilung seinen Niederschlag findet. Mit fortschreitendem Alter schließen die Neurone ihre Reifung ab, wobei alle Neurone vergleichbare Endkonzentrationen erreichen. Die Bedeutung der zweiköpfigen Verteilung bei P5 legt nahe, dass besagte Reifungsprozesse in zwei Gruppen stattfinden. Die funktionelle Bedeutung entzieht sich einer Erklärung und bedarf weiterer Untersuchungen.

Eine weitere Erklärung für die Breite der Verteilung der Chloridkonzentrationen könnte in der Mannigfaltigkeit der Rollen von Chlorid für die Physiologie der Zelle zu sehen sein. Die Regulation des Zellvolumens erfolgt über Chlorid-Kanäle, wobei Wasser osmotisch folgt, und die Regulation des pH-Wertes erfolgt über Protonen-Pumpen, wobei Chlorid nachfolgt, um Elektroneutralität zu erreichen. Eine wesentliche Funktion bei der Kontrolle des pH-Werts haben auch die Natrium-abhängigen Anionen-Austauscher bzw. Natrium-unabhängigen Anionen-Austauscher, die durch den Austausch von HCO₃⁻ gegen Cl⁻ die intrazelluläre HCO₃⁻ -Konzentration regulieren. Da Chlorid also an mehreren Regulationsmechanismen beteiligt ist, erscheint eine breitere Chloridverteilung nicht unplausibel.

Eine Verbreiterung durch erhöhtes Chlorid infolge Stressreaktion lässt sich natürlich auch nicht in letzter Konsequenz ausschließen. Versuche an Mäusen, bei denen die dazu führende Signalkaskade unterbrochen ist (Rivera et al., 2004), könnten Auskunft über den Beitrag dieser Komponente geben.

Die Linie *Thy1*-Clomelon hat ihre Fähigkeit unter Beweis gestellt, für die Beantwortung relevanter biologischer Fragestellungen einen wertvollen Beitrag zu leisten. Das quantitative Imaging stellte sich wegen der dichten Expression als sehr anspruchsvoll heraus, führte aber unter Beachtung der beschriebenen Kautelen wie rigoroser Kontrolle der Illuminationsbedingungen zu validen Ergebnissen.

3.9 Verbesserungen an Clomeleon

Für die Untersuchung dynamischer Prozesse ist eine Voraussetzung, dass innerhalb kurzer Zeit genug Licht gesammelt werden kann. Dazu muss das Präparat ausreichend stark markiert sein und der Versuchsaufbau entsprechend empfindlich. Eine zweite Voraussetzung ist, dass der Sensor in seinem zeitlichen Auflösungsvermögen dem zu untersuchenden Vorgang folgen kann. Für Untersuchen bei 20 °C besitzt Clomeleon eine Assoziationskonstante von 600 ms und ist damit mit Sicherheit zu träge, um einzelne postsynaptische Ereignisse auflösen zu können. Durch Einführen eines Aminosäureaustauschs in der YFP-Komponente war es möglich, die Kinetik auf 120 ms bei 20 °C bzw. 20 ms bei 37 °C zu steigern. Außerdem ist für diese Mutation in einem etwas anderen YFP-Hintergrund eine höhere Chloridaffinität beschrieben (Galietta et al., 2001), sodass für den physiologischen relevanten Bereich mehr Signaldynamik zu erwarten ist. Dies wird allerdings zu den Kosten einer größeren pH-Abhängigkeit erkauft. Diese Varianten von Clomeleon versprechen auch schnelle Ereignisse wie inhibitorische postsynaptische Ströme, die eine Zeitkonstante von 100 ms haben, aufzulösen.

3.10 Zusammenfassung und Ausblick

Die erzeugten Clomeleon Biosensor-Mauslinien haben bewiesen, dass sie geeignete Werkzeuge sind, um Fragestellungen zum Chlorid-Haushalt von Zellen in lebendem Gewebe zu beantworten. Besonders die Linie *Thy1*-Clomeleon hat sich durch ihre starke Expression in verschiedenen Mustern als "Arbeitspferd" empfohlen. Mit dieser Mauslinie durchgeführte Experimente konnten den lange vermuteten, aber experimentell nie direkt gezeigten, entwicklungsabhängigen Gradienten der intrazellulären Chloridkonzentration in Neuronen beweisen. Dadurch wurde eine Methode etabliert, die es erstmalig erlaubt, Konzentrationen dieses für die Physiologie so wichtigen Ions direkt ort- und zeitaufgelöst zu messen.

Eine weitere Ausbaustufe sind die Mausmodelle, die die Expression des Indikators durch konditionale Expressionssysteme auf genetisch definierte Zellpopulationen beschränken. Die ROSAC1 Maus ist durch die geringe Expression für intensitätsbasierte Messungen nur bedingt einsetzbar. Messungen auf Basis von Fluoreszenzlebenszeiten werden typischerweise in stark verdünnter Indikatorlösung durchgeführt. Dies eröffnet eine Einsatzmöglichkeit für diese Mauslinie. Ganglien Zellen des spinalen Hinterhorns sind ein interessantes Studienobjekt für den Chloridphysiologen, weil sie im Verdacht stehen, ein hohes Chlorid zu behalten. Um die Expression in diesen Neuronen zu initiieren, wurde die Linie ROSAC1 mit der Linie SNS-Cre verpaart (Agarwal et al., 2004). In Vorversuchen, die von Mitarbeitern von Prof. Stephan Frings an einem Fluoreszenzlebenszeit-Mikroskop mit 2-Photonen Anregung durchgeführt wurden, war es möglich die Fluoreszenzlebensdauer Clomelon-positiver Zellen vom Hintergrund zu separieren (Abb. 3.2). Autofluoreszenz hat typischerweise eine andere Fluoreszenzlebensdauer als die Fluoreszenz normaler Fluophore, die sich im Bereich einiger Nanosekunden befindet. Es ist zu erwarten, dass sich die Lebenszeit der CFP-Komponente in Clomeleon in Abhängigkeit der Chloridkonzentration ändert. So könnten durch eine Kalibrierung der Fluoreszenzlebenszeiten in Abhängigkeit der Chloridkonzentration Chlorid-Messungen durchgeführt werden. Durch die Expression des Indikators in definierten Neuronenpopulationen ist sicher gestellt, dass wenn die aus einem Voxel gesammelten Photonen im Intervall der Lebenszeiten liegen, die einen CFP-Fluorophor charakterisieren, diese Photonen auch aus der Zellpopulation stammen, die Gegenstand des Interesses ist.



Abb. 3.2: Falschfarbendarstellung der Fluoreszenzlebenszeit gemessen an Clomeleon-exprimierenden nozizeptiven Neuronen des spinalen Hinterhorns. Akuter Schnitt durch ein Spinalganglion.

Ein anderer Weg Expression in definierten Populationen zu erreichen, wurde mit der Kombination von Aktivator-Mauslinien und virus-vermitteltem Gentransfer sehr erfolgreich beschritten. Dabei lässt sich höchste Expression in wenigen Neuronen erreichen. So werden optimale Bedingungen für Imaging-Experimente geschaffen. Insbesondere sollte es mit dem floxSTOP-Konstrukt gelingen das gescheiterte GnRH-Projekt zum Erfolg zu führen (siehe Kapitel 2.1.2.6). Wegen der Injektion in Tiere nach der Geburt wird die Cre-Expression eher das Muster der endogenen GnRH-Promotoraktivität abbilden, sodass eine *post hoc* Identifikation eventuell obsolet wäre. Zweitens sind auch in dieser Population hohe Expressionsniveaus zu erwarten.

Auch das Indikatorprotein selber war Gegenstand von Verbesserungen. So konnte durch Einführen eines Aminosäureaustauschs die Bindekinetik von Chlorid signifikant beschleunigt werden.

Im Vergleich zu herkömmlichen Chlorid-Indikatoren weist Clomeleon viele Vorteile auf. Es ist zelltypspezifisch einsetzbar, ist untoxisch und zeigt einen vergleichbaren dynamischen Umfang mit den synthetischen Farbstoffen. Es kann somit als Standardmethode zur Bestimmung der intrazellulären Chloridkonzentration und deren Regulation herangezogen werden.

4 Material und Methoden

4.1 Genetische Techniken

4.1.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Standardmethoden der Molekularbiologie, wie Schneiden von DNS mittels Restriktionsendonukleasen, Gelelektrophorese, Ligation, Transformation, Kultivierung von *Escherichia coli*-Bakterien, Ethanol-Natrium-Acetat-Fällung, Phenol-Chloroform-Extraktion und Dephosphorylierung von DNS-Enden wurden nach Standardprotokollen des Laborhandbuchs von J. Sambrook, E.F. Fritsch und T. Maniatis "Molecular cloning: a laboratory manual." Band 1-3 (2. Auflage, 1989) durchgeführt. Diese Methoden werden im Folgenden nicht weiter erläutert.

4.1.2 Isolierung von Plasmid-DNS aus E. coli

Zur Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli* wurde für geringe DNS-Mengen (bis 10 µg) das "*QIAprep Miniprep Kit*", für größere Mengen (bis 500 µg) das "*QIAprep Maxiprep Kit*" (beides QIAgen) benutzt. Dabei wird die negativ geladene DNS nach dem Prinzip der Ionenaustausch-Chromatographie an das positiv geladene Säulenmaterial gebunden. Die so gewonnene DNS hat einen sehr hohen Reinheitsgrad und wurde direkt für weitere Schritte wie Sequenzierung, Transformation etc. verwendet.

4.1.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNS erfolgte nach Herstellerangaben mit dem "*Big Dye Terminator Mix V3.1*" (ABI) auf dem Kapillar-Sequenzierer "3100 Genetic Analyzer" (ABI). Typischerweise ergab sich eine lesbare Sequenzlänge von 400-600 bp.

4.1.4 Isolierung genomischer DNS aus ES-Zellen für PCR-Analyse

Für die Gewinnung genomischer DNS aus ES-Zellen für PCR-Analysen wurden Zellen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pelletiert in 50 µl ddH₂O aufgenommen, bei 95 °C aufge-

brochen und mit Proteinase K (1 μl, 10 mg/ml) 90 min bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 95 °C hitzeinaktiviert und die DNS bei -20 °C gelagert.

4.1.5 Hochmolekulare genomische DNS aus ES-Zellen für die Southern-Analyse

Die Zellen wurden pelletiert, in 600 µl TENS/Proteinase K aufgenommen und über Nacht verdaut. Dann wurde der Verdau einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterworfen und mit Isopropanol gefällt. Nach waschen in 70%igem Ethanol wurde die DNA in 500 µl TE gelöst und bei 4 °C gelagert.

4.1.6 Southern Blot-Analyse

Für eine Southern Blot-Analyse wurde genomische DNS in einem entsprechenden Volumen mit EcoRV nach einem Standardprotokoll über Nacht inkubiert. Nach einem kompletten Verdau wurde die DNS mit dem 2,5-fachen Volumen von 100%igem Ethanol und dem 0,1 fachen Volumens von 3M Na-Acetat-Lösung präzipitiert und mit 70% igem Ethanol gewaschen. Das DNS-Pellet wurde getrocknet und in 30 µl Wasser gelöst. Anschließend erfolgte eine RNase-Behandlung. Hierfür wurde 1 U RNase zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von Ficoll-Probenpuffer wurde die Lösung für 10 min bei 55 °C inkubiert und auf einem 1%igen Agarosegel bei 25 V für 24 h aufgetrennt. Für eine Gelbildaufnahme mit Maßstabsanzeige wurde das Agarosegel in einem 0,01%igem Ethidiumbromid-Bad für 10 min gefärbt. Anschließend wurde das Gel zuerst für 30 min in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 N NaOH) und danach 30 min in Reneutralisierungslösung (1,5 M NaCl; 1,5 M Trishydroxyaminomethan, pH 7,4) inkubiert. Eine Nylonembran (Parablot, Macherey-Nagel) und Whatman-Papiere wurden in entsprechender Größe zugeschnitten. Für den Aufbau der Blot-Apparatur wurde das Gel auf eine Whatman-Papier-"Brücke", getränkt in 20x SSC, luftblasenfrei platziert. Es folgt die Nylonmembran, getränkt in Wasser und 10x SSC, danach drei Lagen Whatmanpapier, getränkt in 10x SSC und anschließend mehrere Lagen an trockenen Whatmanpapier, sowie einem 500g schweren Gewicht. Die Whatmanpapierbrücke hatte ständigen Kontakt mit 20x SSC. Nach dem Transfer über Nacht wurde die Nylonmembran in 5x SSC gewaschen, luftgetrocknet und zum Quervernetzen der DNS zweimal mit UV-Licht behandelt.

4.1.7 Radioaktive Markierung von Sonden und Hybridisierung

Die DNS-Sonde wurde entsprechend des Protokolls des "Random Primed DNA Labeling Kit" (Roche Diagnostics) radioaktiv markiert und über ein Bio Spin 30 Säulchen (Bio-Rad) dem mitgelieferten Protokoll entsprechend aufgereinigt. Die geblottete und quervernetzte Nylonmembran wurde kurz in ddH₂O gewaschen und mit der radioaktiv markierten DNS-Sonde in einer entsprechenden Menge von "Quickhyb Hybridisation Solution" (Stratagene) hybridisiert. Alle weiteren Schritte wurden dem beiliegenden Protokoll entnommen.

4.1.8 Genotypisierung der mutanten Mauslinien mittels PCR

Mausschwanzbiopsien wurden mit Proteinase K (1 mg/ml) in TENS-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS) bei 55 °C verdaut. Nach Präzipitation in 1 Volumen Isopropanol und Waschen in 70%igem Ethanol wurde die genomische DNA in 300 μ l ddH₂O durch Erhitzen auf 55 °C für 30 min gelöst und für die Genotypisierung durch PCR-Analyse eingesetzt. Ein 25 μ l PCR-Ansatz enthielt PCR-Puffer (GibcoBRL), 2 mM MgCl₂, dNTP-Mix (0.2 mM bezogen auf jedes Nukleotid), spezifische Sinn und Gegensinn-Oligonukleotide (jeweils 0.4 μ M), 0.2-0.5 U *Taq*-Polymerase, ddH₂O und 1 μ l Matrizen-DNA-Lösung (10-100 ng/ μ l). Einer initialen Denaturierung (3 min, 94 °C) folgten 20-35 Zyklen mit je 20 s, 94 °C (Denaturierung), 30 s, 55 °C (Oligonukleotid-Anlagerung), 1 min/kbp, 72 °C (Extension). Nach dem letzten Zyklus wurde eine finale Extension (10 min bei 72 °C) durchgeführt. Die erwarteten Größen der PCR-Produkte wurden anschließend durch Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

Für eine Genotypisierung der verschiedenen mutanten Mauslinien wurden folgende Oligonukleotide benutzt:

Thy1-Clomeleon Mäuse: 550 bp

- Thy1F1 (S) TCTgAgTggCAAAggACCTTAgg
- C24Trev (AS) gTCgTCCTTgAAgAAgATggTgC

ROSA26-floxSTOP-Clomeleon: wt 580 bp, KI 320 bp

- ROSAFA (S) AAAgTCgCTCTgAgTTgTTAT
- ROSARA (AS) ggAgCgggAgAAATggATATg

SpliAcB (AS) CATCAAggAAACCCTggACTACTg

Neomycin-Phosphotransferase: 620 bp

- neo4 (S) ggCTATTCggCTATgACTgggC
- neo5 (AS) gggTAgCCAACgCTATgTCCTg

Cre: 200 bp	
Cre1 (S)	ACCAggTTCgTTCACTCATgg
Cre2 (AS)	AggCTAAgTgCCTTCTCTACAC
GnRH-iCre: 350 bp	
GnRH51 (S)	gAAgTACTCAACCTACCAACggAAg
iCre32 (AS)	CACAgACAggAgCATCTTCCAg

4.2 Protein Biochemie

4.2.1 Isolierung von Proteinen aus E. coli

Die cDNS des Proteins wurde in den bakteriellen Expressionsvektor pQE-30 (QIAgen) kloniert. Dieser kodiert für einen C-terminalen His-tag (6x Histidin). Bakterien (XL10-Blue, Stratagene), die den lac-Repressor exprimieren, wurden transformiert und in der log-Phase wurden 200 ml Kultur (LB-Medium) mit 1 mM Isopropyl-ß-thiogalactosid (IPTG) induziert. Nach 3 h bei 37 °C wurden die Kulturen über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt, um die Proteinfaltung zu begünstigen. Die Zellen wurden pelletiert, in Lyse-Puffer aufgenommen und mit Ultra-Schall aufgebrochen. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und der Überstand über eine Ni-NTA Säule (QIAgen) aufgereinigt. Das Eluat wurde gegen 200 mM KCl/20 mM HEPES (pH 7,2) dialysiert. Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

4.2.2 Kinetische Messungen mit Hilfe des Stopped-Flow-Apparates

Um Geschwindigkeiten chemischer Reaktionen bestimmen zu können, muss die zeitliche Änderung eines oder mehrerer Reaktionsteilnehmer gemessen werden. Entscheidend ist dabei, die Ausgangsstoffe möglichst schnell und homogen zu durchmischen, denn hierdurch werden die Anfangsbedingungen der kinetischen Gleichung festgelegt, durch die die jeweilige Reaktion beschrieben wird. Um Reaktionen mit Zeitkonstanten im Bereich von unter einer Sekunde zu verfolgen, wurde der Stopped-Flow-Apparat entwickelt. Im Prinzip handelt es sich um ein Fluoreszenzspektrometer mit eingebauter Mischkammer. Das eine Reaktandengefäß (B) eines SF61-DX Stopped-Flow-Apparates (Hi-Tech, GB) wurde mit einer Lösung von Protein in 200 mM Kalium-Gluconat, 20 mM HEPES (pH 7,1) gefüllt, das andere (B) mit einer Lösung 200 mM KCl, 20 mM HEPES (pH 7,1). Durch Druck auf die Kolben hin (A)

gelangen die Lösungen durch die Mischkammer (D) in die Messzelle (E, Quarz, 10 mm Lichtweg) und verdrängen den Kolben im Aufnahmegefäß (F). Die Dreiwegehähne (C) erlauben das Befüllen, Leeren und Spülen der Apparatur. Alle diese Bauteile werden durch einen Wasserumlaufthermostaten auf konstanter Temperatur gehalten. Als Lichtquelle diente dazu eine 75 W Xe/Hg-Lampe. Das emittierte Licht wurde durch einen Monochromator und einen Quarz-Lichtleiter zur Beobachtungszelle geleitet. Hier wurde das Licht zur Anregung einer spezifischen Fluoreszenz genutzt. Das von dem Fluorophor emittierte Licht wurde mit Hilfe eines passenden Filters von der Anregungsstrahlung diskriminiert und über einen Photomultiplier detektiert (G). Die Totzeit der Apparatur beträgt 2 ms. Die Auswertung der Messungen, d.h. die Anpassung von Exponentialfunktionen an den Signalverlauf und die Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten und Amplituden wurde mit der Software von Hi-Tech Scientific durchgeführt.



Abb. 4.1: Schematische Darstellung eines Stopped-Flow-Apparates

4.2.3 Protein-Präparation aus Hirngewebe und Proteinkonzentrationsbestimmung

Alle Präparationsschritte wurden bei 4 °C in Anwesenheit von Proteinase-Inhibitoren (Complete, EDTA-free, Roche Diagnostics) durchgeführt. Das Gehirn von Mäusen wurde durch dispergieren mit einem Ultra-Turrax T8 (Ika) in 25 mM HEPES (pH 7,4) homogenisiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Homogenate wurden durch Zentrifugation bei 900 g für 5 min (4 °C) von Zellkernen und großen Zelltrümmern getrennt und bei –70 °C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch die Bradford-Methode (Bio-Rad). Hierfür wurden die Proteinlösungen 1:10 in 25 mM HEPES (pH 7,4) mit Proteinase-Inhibitoren verdünnt und 10 μ l davon mit 1 ml einer 1:5 verdünnten Bradfordlösung in H₂O für 20 min bei RT inkubiert und anschließend wurde bei 595 nm die OD bestimmt.

4.2.4 Western Blot

Je nach Experiment wurden unterschiedliche Proteinmengen (bis zu 10 µg) aus Proteinpräparationen in 2x SDS-Ladepuffer für 5 min bei 95 °C denaturiert und durch 10% ige SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (Mini-Protean 3, Bio-Rad). Der Naß-Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte bei 30 V, 90 mA für 16 h (Protran BA 85, Schleicher & Schuell; Mini Trans-Blot, Bio-Rad) in Transferpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glyzin; 20 % Methanol). Die Membranen wurden mit Block-Puffer (0.1 % Tween 20; 8 % Magermilchpulver in PBS pH 7,4) für 2-3 h bei RT geblockt. Die Inkubation mit den spezifischen Primärantikörpern (anti-GFP-Kaninchen Verdünnung: 1/10000, Serum. MoBiTec) erfolgte in PBS/0,1 % Tween 20 (PBS-T) für 2 h bei Raumtemperatur. Nach viermaligem Waschen für jeweils 10 min in PBS-T erfolgte die Detektion der Primärantikörper durch spezien-spezifische Meerrettich-Peroxidase gekoppelte anti-IgG Sekundärantikörper (anti-Kaninchen IgG; Dianova) für 45 min in PBS-T (Verdünnung: 1:20000). Die Detektion der Antigen-Antikörperreaktionen erfolgte durch "Verstärkte Chemilumineszenz" (ECL+Plus, Amersham Pharmacia).

4.3 Immunhistochemie

4.3.1 Immunohistochemische Untersuchungen von Vibratom-Gewebeschnitten

Die Vibratom-Schnitte wurden zur Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität in 2% ig H₂O₂/PBS für 15 min inkubiert. Nach 3-maligem Waschen in PBS für je 10 min wurden die Schnitte für 1 h zur Reduktion unspezifischer Antikörper-Reaktionen in Tag1-Puffer (1 % Rinderserum-Albumin (BSA), 0,3 % Triton X-100 in PBS) mit 4 % Normalserum (NS) blockiert. Das Normalserum entspricht der Spezies, in der der 2. Antikörper gewonnen wurde. Die Inkubation mit Primärantikörpern erfolgte in Tag1-Puffer/1 % NS über Nacht bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen in Tag2-Puffer (0,3 % BSA, 0,1 % Triton X-100 in erfolgte die Inkubation mit Meerretichperoxidase-gekoppelte PBS) Anti IgG-Sekundär-antikörper (1:600, Vektor) für 1 h bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen in Tag2-Puffer und zweimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte in 0,05 % DAB (Diaminobenzidin-Hydrochlorid, Sigma) in 20 mM Tris-HCL (pH 7,6)/0,01 % H₂O₂ entwickelt. Nach zweimaligem Waschen in PBS und einmaliger kurzer Inkubation in 10 mM Tris-HCl (pH 7,6) wurden die Schnitte auf Objektträger überführt und bei Raumtemperatur über Nacht luftgetrocknet. Anschließend wurden die Schnitte nach kurzer Inkubation in Xylol mit Eukitt (Kindler) eingebettet. Eine Verstärkung des DAB-Signals kann durch Anwendung von ABC (Vector) erreicht werden. Hierfür wurden die Schnitte nach Inkubation des Primärantikörpers und dreimaligem Waschen in Tag2-Puffer mit Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper (1:600, Vector) in Tag2-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur behandelt. Nach dreimaligem Waschen in Tag 2-Puffer wurden die Schnitte für 1 h in ABC-Lösung (1:400, Vektor) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte je zweimal in Tag2-Puffer und in PBS gewaschen und in 0,05 % DAB in 20 mM Tris-HCl (pH 7,6)/0,01 % H₂O₂ entwickelt. Nach zweimaligem Waschen in PBS und einmaliger kurzer Inkubation in 10 mM Tris-HCl (pH 7,6) wurden die Schnitte auf Objektträger überführt und bei Raumtemperatur über Nacht luftgetrocknet. Anschließend wurden die Schnitte nach kurzer Behandlung mit Xylol in Eukitt (Kindler) eingebettet.

4.4 Virale Techniken

4.4.1 Herstellung rekombinanter Sindbis-Virenpartikel

Die cDNA von Clomeleon wurde in den pSinRep5-lacZ Vector (Invitrogen) kloniert. Die rekombinanten Sindbis-Virenpartikel wurden von Tatjana Schweizer hergestellt Von den Plasmiden pSinRep5- Δ lacZ-Clomeleon und DH26S wurde durch SP6 Polymerase *in vitro* RNS produziert. Diese RNS wurde in BHK-21 Zellen elektroporiert und diese wurden 24–48 h inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Überstand abgenommen und über eine Amicon Ultra Säule (100 kDa Ausschluß, Millipore) abzentrifugiert. Die so erhaltene Suspension aufkonzentrierter Viruspartikel (etwa 100 µl) wurde im Methanol/Trockeneis-Bad schock-gefroren und bei -70 °C aufbewahrt. Virustiter wurden durch Infektion kultivierter hippo-kampaler Neurone bestimmt. Wenn 1 µl einer 1/10000 bzw. 1/1000 Verdünnung zu den 500 µl Medium einer Kammer einer 24-Muldenplatte gegeben, 10 bzw. 100 fluoreszente Zellen verursacht, entspricht dies einem Titer von 10⁸ infektiösen Partikeln/ml.

4.4.2 Herstellung rekombinanter adenoassoziierter Viren

Die cDNA von Clomeleon wurde in den pAM-Vektor kloniert. Für die Herstellung der Viruspartikel wurden die Helfer-Plasmide DP1 und DP2 in äquimolarem Verhältnis eingesetzt, sodass die entstandenen Viruspartikel Chimäre der Serotypen1 und 2 waren. Für die Kalzium-Phosphat-Transfektion wurde die HEK-Zelllinie AAV293 (Stratgene)

verwendet. Drei Tag nach der Tranfektion wurden die Zellen geerntet, durch dreimaliges Einfrieren-Auftauen aufgeschlossen und das Lysat wurde über eine Heparin-Agarose-Säule (Sigma) aufgereinigt. Die im Lysat befindlichen Virus-Partikel binden bei niedriger Salzkonzentration an das Säulenmaterial und wurden bei hoher Salzkonzentration eluiert. Anschließend erfolgte Dialyse gegen PBS-Puffer. Die Suspension wurde durch Zentrifugieren in Amicon-Säulen (Millipore) konzentriert. Zur Bestimmung des Titers erfolgte Infektion von HT1080-Zellen (Stratagene) in verschiedenen Verdünnungen der Suspension. Fluoreszente Zellen wurden ausgezählt und der Titer berechnet. Typischerweise entspricht der Titer 10⁷ infektiöser Partikel/ml.

4.4.3 Stereotaktische Injektionen

Stereotaktische Injektionen in den Hippokampus und das Kleinhirn der Maus zur Infektion dieser Hirnareale mit rekombinantem Virus wurden von Dr. Verena C. Wimmer und Dr. Leena S. Knight durchgeführt (Wimmer et al., 2004).

4.5 Zellkultur und ES-Zellkultur

4.5.1 Primäre hippokampale Zellkultur der Ratte

Primäre hippokampale Neuronen wurden aus Embryonen (E18) von Sprague–Dawley Ratten gewonnen (Banker and Cowan, 1977). Dazu wurde das schwangere Muttertier anästhesiert und dekapitiert. Die Embryonen wurden isoliert und dekapitiert. Das Gehirn wurde entnommen, von der Dura befreit und die Hippokampi wurden herauspräpariert. Anschließend wurden die Hippocampi durch Trypsinieren und Trituieren vereinzelt und in einer Dichte von 200000 Zellen/ml auf Poly-L-Lysin imprägnierten Deckgläschen in 24-Mulden-Platten (250 µl Plattiermedium entsprechen dabei 500 Neuronen/mm²) ausgesät. Nach 5 Tagen in Kultur wurde Ara-C zugegeben, um das Gliawachstum zu unterdrücken. Beim Ersetzen des Kulturmediums wurde darauf geachtet, immer nur die Hälfte des Volumens zu ersetzen, um Nährfaktoren zu erhalten.

4.5.2 Gene Targeting

Für ein effizientes Targeting des ROSA26-Lokus wurde eine Kassetten-Klonierungstrategie gewählt (Srinivas et al., 2001). Die cDNA von Clomeleon wurde über NheI und XhoI in den pBigT-Vektor kloniert. Die induzierbare Kassette wurde anschließend über PacI und AscI in den pROSA28PA gesetzt (Dr. Verena C. Wimmer). Pluripotente embryonale R1-Stammzellen (Nagy et al., 1993) der Maus wurden in ES-Zellmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 4500 mg/l Glucose, 2 mM Glutamin, 0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 0,1 mM β-Mercaptoethanol; 20 % fötales Kälberserum, 50 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 1000 U/ml Leukämie Inhibierungsfaktor) kultiviert. Die Zellen wurden auf Mitomycin C behandelten Mausfibroblasten ("Feeder") kultiviert. Der Targeting-Vektor wurde durch KpnI Verdau linearisiert, ethanolisch gefällt und in 75 µl PBS aufgenommen. Eine weitere Reinigung erfolgte über eine mit PBS umgepufferte Gelfiltrationssäule (Chroma Spin TE-1000). Linearisierter, gereinigter Vektor (30 µg) wurde unter Verwendung eines Elektoporators (BioRad) mit 500 µF und 240 V in R1-ES-Zellen elektroporiert. Die transformierten Zellen wurden für 11 Tage mit G418 (Genticin, 250 µg/ml) auf Gelatine-Platten selektioniert. G418-resistente Klone wurden isoliert expandiert. Ein Teil der Zellen wurde für die Isolierung genomischer DNS zur PCR-Analyse verwendet, ein Teil wurde auf Feeder-Zellen weiter expandiert. Für die Analyse wurden je sechs Einzelklone vereinigt und gemeinsam mittels genesteter PCR (GC-rich Kit, Roche Diagnostics) auf Integration des Transgens untersucht. Im Falle eines positiven Resultates wurden die sechs Einzelklone getrennt untersucht.

1. Primerpaar: 1,5 kbp

ROSA26-OUT	CCCACCgCCCCACACTTATTg
SA-OUT	gACCgCgAAgAgTTTgTCCTCAAC

2. Primerpaar: 1,5 kbp
 ROSA28-IN
 SA-IN
 CATCAAgAAgAggCTgTgCTTTgg
 CATCAAggAAACCCTggACTACTg

Die PCR-positiven Klone wurden expandiert, tiefgefroren (5 * 10⁶ Zellen/ml; 1 Stunde bei -20 °C, dann 12 h bei -70 °C) und anschließend bis zur Injektion in C57Bl/6-Mausblastozysten in flüssigem Stickstoff gelagert. Die positiven Klone wurden mittels Southern-Analyse auf die korrekte Rekombination des Transgens in den ROSA26 Lokus sowie zufällige Integration geprüft.

4.5.3 Transfektion von pMC-Cre zur Cre-vermittelten Rekombination in vitro

Das Plasmid pMC-Cre ($30 \mu g$) wurde unter Verwendung eines Elektoporators (BioRad) mit 500 μ F und 240 V in einen rekombinierten Klon R1-ES-Zellen (#1.9) transfiziert.

4.5.4 Blastozysteninjektion

Mausblastozysten-Injektionen und Embryo-Transfers wurden im Transgenlabor des ZMBH, Heidelberg bzw. der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung der Universität Heidelberg (IBF) von Frank Zimmermann und Sascha Dlugosz durchgeführt. Es wurden hierbei je 15-20 ES-Zellen in Mausblastozysten des Inzuchtstammes C57Bl/6 injiziert. Jeweils 8-10 Blastozysten wurden in scheinschwangere C57Bl/6-Mäuse transplantiert. Hochchimäre Tiere wurden in den C57Bl/6-Stamm zurückgekreuzt.

4.6 Kalibrierung

4.6.1 Kalibrierung durch patch-clamp

Die Kalibrierung wurde an einem Nipkow-Scheiben Mikroskop vorgenommen. Primäre hippokampale Neurone wurden mit rekombinantem Sindbis-Virus, das Clomeleon exprimiert, infiziert. Neurone wurden zwölf Stunden nach der Infektion mehrmals mit PBS gewaschen und in eine Aufnahmekammer transferiert. Dort wurden sie mit Ringerlösung (Biometra, Göttingen) überspült (in mM): 125 NaCl, 25 NaHCO₃, 2,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 25 Glucose, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, (pH 7,4 bei Begasung mit 95 % O₂/5 % CO₂, v/v). Pipetten mit 4-8 MΩ Widerstand wurden aus Borosilikatglas (Ø innen 1 mm, Ø außen 2 mm) auf einem Horizontal-Puller (P-97, Sutter Company, USA) gezogen. Neurone wurden im Infrarot DIC Bild identifiziert und mit interner Pipettenlösung gegebener [Cl] gepatcht (4, 10, 25, 50, 125 mM) bzw. [F⁻] (125 mM). Die jeweiligen Cl⁻-Lösungen wurden durch geeignete Verdünnung einer 125 mM Cl-Lösung mit einer 125 mM Gluconat-Lösung hergestellt. Die Ausgangslösungen bestanden aus (in mM): 125 KCl bzw. 125 K-Gluconat bzw. 125 KF, 5 NMG-HEDTA, 20 HEPES (pH 7,25). Abgeleitet wurde mit einem EPC-7 Patch-Clamp-Verstärker (List Medical Electronics, Darmstadt). Nach dem Entstehen des Giga-seals wurde durch leichtes Saugen an der Pipette der Membranfleck zum Kollabieren gebracht und der Zugang zur Zelle ermöglicht. Bilder wurden 60 s bis 120 s nach dem Einbrechen aufgenommen, um eine vollständige Äquilibrierung des pH-Wertes und der Chloridkonzentration zu gewährleisten. Fluoreszenzintensitäten F_{YFP} und F_{CFP} wurden aus ROIs um das Soma bestimmt. Für jeden Kanal wurde ein Hintergrund H_{YFP} und H_{CFP} aus dem gleichen Bild bestimmt. Daraus ergibt sich das Verhältnis der Akzeptor- zu der Donorfluoreszenz:

$$R = \frac{F_{\rm YFP} - H_{\rm YFP}}{F_{\rm CFP} - H_{\rm CFP}}$$

Die Beziehung von [Cl⁻] und R wird durch folgende Beziehung beschrieben:

$$[Cl^{-}] = K_{D} \cdot \left(\frac{R_{\max} - R}{R - R_{\min}}\right)$$

 R_{max} und R_{min} sind die Verhältnisse in 0 mM Chlorid bzw. in sättigender Chlorid-Lösung. Um die Osmolarität in Grenzen zu halten, wurde in praxi als sättigende Lösung eine 125 mM Fluoridlösung genommen. Die effektive Dissoziationskonstante K_D ' konnte durch Fit folgender Gleichung an die aus der Kalibrierungsmessung erhaltenen erhalten werden.

$$R = \frac{K_D' \cdot R_{\max} + [Cl^-] \cdot R_{\min}}{[Cl^-] + K_D'}$$

4.6.2 Kalibrierung über Ionophore

Die jeweiligen Cl⁻-Lösungen (0 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM bzw. 143,6 mM) wurden durch geeignete Verdünnung einer 143,6 mM Cl⁻-Lösung mit einer 143,6 mM Gluconat-Lösung hergestellt (Tab. 4.1). Für die Ermittlung von R_{min} wurde eine 120 mM Fluorid-Lösung genommen. Die Einstellung des intrazellulären pH-Wertes und der Chlorid-Konzentration erfolgte durch Äquilibrierung mit der Badlösung durch die Ionophore Tributylzinnchlorid (Cl⁻/OH⁻ Antiporter) und Nigericin (H⁺/K⁺ Antiporter). Die Fluoreszenzdaten wurden ausgewertet wie unter "Kalibrierung durch patch-clamp" beschrieben.

Konzentrationen in mM	Gluconat	Chlorid	Fluorid
NaCl		20	20
KCl		120	
KF			120
Na-Gluconat	20		
K-Gluconat	120		
MgCl ₂		0,6	
CaCl ₂		1,2	
Mg-Gluconat ₂	0,6		
Ca-Gluconat ₂	1,2		
HEPES (pH = 7,25)	25	25	25
D-(+)-Glucose	5	5	5
Tributylzinnchlorid/µM	20	20	20
Nigericin/µM	20	20	20

 Tab. 4.1: Zusammensetzung der zur Kalibrierung durch Ionophore verwendeten Lösungen.

4.7 Quantitatives Imaging an akuten Schnitten

4.7.1 Akute parasagittale Hirnschnitte

Mäuse der Linien CLM1 bzw. CLM11 wurden anästhesiert und dekapitiert. Das Gehirn wurde schnell aus der Schädelkalotte entfernt und in fein zerstoßener gefrorener Ringer-Lösung folgender Zusammensetzung abgekühlt und dissektiert (in mM): 240 Sucrose, 2,5 KCl, 28 NaHCO₃, 1,25 NaH₂PO₄, 7 Glucose, 1 CaCl₂ and 7 MgCl₂, 1 Ascorbinsäure, 3 Na-Pyruvat (pH 7,4 bei Begasung mit 95 % O₂/5 % CO₂, v/v). Mit einem HR2-Vibratom (Sigmann Elektronik). wurden parasagittale Schnitte mit einer Dicke zwischen 250 µm und 350 µm angefertigt. Die Schnittparameter waren 42 Hz, 1 mm Amplitude, 0,8 mm/s Vorschub bei einem Klingenfreiwinkel von 16°. Die vertikale Schwingung der jeweiligen Klinge wurde vor jedem Experiment mithilfe einer *Vibroprobe* (Geiger et al., 2002) überprüft und lag immer unter ±1 µm gegenüber Schnittebene.

Vor der Messung wurden die Schnitte in einer Begasungskammer 30 min bei 35 °C inkubiert (in mM): 125 NaCl, 25 NaHCO₃, 2,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 1 MgCl₂, 25 Glucose and 2 CaCl₂, 3 myo-Inositol, 2 Na-Pyruvat, 0,4 Ascorbinsäure (pH 7,4 bei Begasung mit 95 % $O_2/5$ % CO_2 , v/v). Für die Messungen wurden die Schnitte bei Raumtemperatur mit folgender Lösung überspült (in mM): 125 NaCl, 25 NaHCO₃, 2,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 25 Glucose, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂ (pH 7,4 bei Begasung mit 95 % $O_2/5$ % CO_2 , v/v).

4.7.2 Quantitatives Chloridimaging

Der gesamte Messtand war auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Newport) montiert. Ein Nipkow-Scheiben Modul (QLC-100, Yokogawa) wurde auf ein aufrechtes Epifluoreszenz-Mikroskop DM RXA2 (Leica Microsystems) aufgesetzt. Als Lichtquelle diente ein Innova 70C-Spectrum Argon/Krypton-Ionen Laser (Coherent). Die 457,9 nm Laserlinie wurde über einen akusto-optisch stimmbaren Filter (Visitech) selektiert und faseroptisch in das konfokale Modul eingekoppelt. Als Objektiv wurde ein Leica HCX Apo L 63x/0,9 W U-V-I Tauchobjektiv gewählt. Nach dem Durchgang des Emissionslichts durch den Hauptstrahlteiler (457/514, Reflektion 480/20 und 540/30) und das konfokale Modul werden die beiden Detektionskanäle durch einen dichroischen Strahlteiler (Q505lp) getrennt. Nach Durchtritt durch zwei Barrierefilter (485/30 bzw. 535/30) wurde das Fluoreszenzlicht durch zwei gekühlten (-11 °C) CCD-Kameras Sensicam QE (PCO) simultan aufgezeichnet. Die Kameras wurden in der Regel im "low-light" Modus mit 8x8 Binning betrieben. Eine dritte Sensicam QE diente zur Aufnahme von Infrarot DIC ("differential interference contrast") Bildern. Der Aufbau wurde über die "Z-stack" Erweiterung (v2.4b, Visitech) für Image-Pro Plus (v4.5.1, Media Cybernetics) gesteuert. Die Intensität des Anregungslichtes wurde zwischen konfokalem Modul und Objektiv mit einem Messgerät erfasst (Optical Powermeter 840, Newport), das nach jeder Aufnahme in den Strahlengang geschoben und beleuchtet wurde. So konnte für beide Kanäle eine Eichkurve erstellt werden, die es erlaubte, für jede Altersstufe von untersuchten Tieren eine Fluoreszenzintensität/Pixel/(ms Belichtungszeit)/(µW Beleuchtunsleistung) zu ermitteln. So konnten verschiedene Messungen miteinander verglichen und Wildtyp Hintergründe subtrahiert werden.

Für den Dunkelstrom pro Super-Pixel (8x8-Binning) wurde nach linearer Regression folgende Abhängigkeit von der Belichtungszeit *x* gefunden:

 $Dunkelstrom/Pixel = a \cdot x + b$

	а	b
Kamera1/Akzeptor	0,0002566	20,80
Kamera2/Donor	0,0003987	48,51

Für die Autofluoreszenz pro Super-Pixel (8x8-Binning) wurde nach linearer Regression folgende Abhängigkeit von der Belichtungszeit x bei einer Beleuchtungsstärke von 50 μ W gefunden:

Autofluoreszenz/Pixel = $\alpha \cdot x + \beta$

	P5		P10		P15		P20	
	α	β	α	β	α	β	α	β
Kamera1/Akzeptor	0,008373	1,324	0,009551	1,700	0,01334	2,240	0,01334	2,240
Kamera2/Donor	0,004717	1,024	0,005270	1,022	0,006640	1,330	0,006640	1,330

4.7.3 pH-Korrektur

Da die Fluoreszenz von Clomeleon nicht nur von der Chlorid-Konzentration abhängig ist sondern auch vom pH-Wert der Lösung, muss für die pH-Differenz zwischen der Kalibrierung und der eigentlichen Messung korrigiert werden. Es wurde beobachtet, dass die Dissoziationskonstante für Chlorid K_D nach folgender Beziehung vom pH-Wert abhängt (Kuner and Augustine, 2000):

$$K_D = 10^{0,82 \cdot pH_{korr} - 3,81}$$

Mit der so erhaltenen Dissoziationskonstante K_D^{korr} kann die pH-Wert korrigierte effektive Dissoziationskonstante K_D^{korr} berechnet werden:

$$\begin{split} K_{D}^{korr} &:= K_{D}^{korr} \cdot \left(\frac{K_{D}}{K_{D}}\right) \\ [Cl^{-}]_{korr} &= K_{D}^{korr} \cdot \left(\frac{R_{\max} - R_{Messung}}{R_{Messung} - R_{\min}}\right) \end{split}$$

Die Dissoziationskonstante K_D wurde aus Messungen an rekombinantem Clomeleon-Protein in Küvette bestimmt.

4.7.4 Zwei-Photonen-geführte Patch-Clamp-Ableitungen

Zur Sichtbarmachung der Clomeleon exprimierenden Neurone wurde die IR-Abtastungs-Gradienten-Kontrast-Methode in Verbindung mit einem Zwei-Photonen Mikroskop verwendet (Wimmer et al., 2004). Diese Methode erlaubt die simultane Darstellung der Fluoreszenz und Morphologie bei minimaler Beleuchtung.

5 Abkürzungsverzeichnis

Å	entspricht 10^{-10} m = 0,1 nm
AAV	adenoassoziierter Virus
AOI	area of interest
bp	Basenpaare
CaMKII	Calzium/Calmodulin abhängige ProteinkinaseII
FLIM	fluorescence lifetime imaging microscopie
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GABA	γ-Aminobuttersäure
GFP	green fluorescent protein
GnRH	gonadotropin releasing hormone
GOI	gene of interest
HEPES	$N-(2-Hydroxyethyl) piperazin-N'-ethan sulfons \" aure$
ITR	invertierte terminale Wiederholung
kbp	Kilobasenpaare
LIF	leukaemia inhibitory factor
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
RMP	Ruhemembranpotenzial
ROI	region of interest
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SCN	suprachiasmatischer Nukleus
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Lösung
TENS	Tris-EDTA-Natriumchlorid-SDS-Puffer
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

6 Referenzen

Agarwal,N., Offermanns,S., and Kuner,R. (2004). Conditional gene deletion in primary nociceptive neurons of trigeminal ganglia and dorsal root ganglia. Genesis. *38*, 122-129.

Alger, B.E. and Nicoll, R.A. (1979). GABA-mediated biphasic inhibitory responses in hippocampus. Nature 281, 315-317.

Aller, M.I., Jones, A., Merlo, D., Paterlini, M., Meyer, A.H., Amtmann, U., Brickley, S., Jolin, H.E., McKenzie, A.N., Monyer, H., Farrant, M., and Wisden, W. (2003). Cerebellar granule cell Cre recombinase expression. Genesis. *36*, 97-103.

Alvarez-Leefmans, F.J., Gamino, S.M., Giraldez, F., and Nogueron, I. (1988). Intracellular chloride regulation in amphibian dorsal root ganglion neurones studied with ion-selective microelectrodes. J. Physiol *406*, 225-246.

Amos,B.J., Pocock,G., and Richards,C.D. (1996). On the role of bicarbonate as a hydrogen ion buffer in rat CNS neurones. Exp. Physiol *81*, 623-632.

Amos,B.J. and Richards,C.D. (1996). Intrinsic hydrogen ion buffering in rat CNS neurones maintained in culture. Exp. Physiol *81*, 261-271.

Andersen, P., Dingledine, R., Gjerstad, L., Langmoen, I.A., and Laursen, A.M. (1980). Two different responses of hippocampal pyramidal cells to application of gamma-amino butyric acid. J. Physiol *305*, 279-296.

Andersson, C. and Roomans, G.M. (2002). Determination of chloride efflux by X-ray microanalysis versus MQAE-fluorescence. Microsc. Res. Tech. *59*, 531-535.

Ault,B. and Hildebrand,L.M. (1994). GABAA receptor-mediated excitation of nociceptive afferents in the rat isolated spinal cord-tail preparation. Neuropharmacology *33*, 109-114.

Banker,G.A. and Cowan,W.M. (1977). Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. Brain Res. *126*, 397-42.

Barker, J.L. and Ransom, B.R. (1978). Amino acid pharmacology of mammalian central neurones grown in tissue culture. J. Physiol *280*, 331-354.

Baron,U., Freundlieb,S., Gossen,M., and Bujard,H. (1995). Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. Nucleic Acids Res. *23*, 3605-3606.

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

Bormann, J. and Feigenspan, A. (1995). GABAC receptors. Trends Neurosci. 18, 515-519.

Boshart,M., Weber,F., Jahn,G., Dorsch-Hasler,K., Fleckenstein,B., and Schaffner,W. (1985). A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. Cell *41*, 521-530.

Breitinger,H.G. and Becker,C.M. (2002). The inhibitory glycine receptor-simple views of a complicated channel. Chembiochem. *3*, 1042-1052.

Caroni, P. (1997). Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. J. Neurosci. Methods *71*, 3-9.

Cherubini, E., Gaiarsa, J.L., and Ben Ari, Y. (1991). GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. Trends Neurosci. *14*, 515-519.

DeFazio,R.A., Heger,S., Ojeda,S.R., and Moenter,S.M. (2002). Activation of A-type gammaaminobutyric acid receptors excites gonadotropin-releasing hormone neurons. Mol. Endocrinol. *16*, 2872-2891.

Duebel, J., Haverkamp, S., Schleich, W., Feng, G., Augustine, G.J., Kuner, T., and Euler, T. (2006). Two-Photon Imaging Reveals Somatodendritic Chloride Gradient in Retinal ON-Type Bipolar Cells Expressing the Biosensor Clomeleon. Neuron *49*, 81-94.

Durand,G.M., Kovalchuk,Y., and Konnerth,A. (1996). Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. Nature *381*, 71-75.

During,M.J., Young,D., Baer,K., Lawlor,P., and Klugmann,M. (2003). Development and optimization of adeno-associated virus vector transfer into the central nervous system. Methods Mol. Med. *76*, 221-236.

ECCLES, J.C. (1964). IONIC MECHANISM OF POSTSYNAPTIC INHIBITION. Science 145, 1140-1147.

Ehrengruber, M.U., Lundstrom, K., Schweitzer, C., Heuss, C., Schlesinger, S., and Gahwiler, B.H. (1999). Recombinant Semliki Forest virus and Sindbis virus efficiently infect neurons in hippocampal slice cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *96*, 7041-7046.

Feng,G., Mellor,R.H., Bernstein,M., Keller-Peck,C., Nguyen,Q.T., Wallace,M., Nerbonne,J.M., Lichtman,J.W., and Sanes,J.R. (2000). Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. Neuron *28*, 41-51.

Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. Ann.Phys. 2, 55-75. 1948.

Friedrich, G. and Soriano, P. (1991). Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. Genes Dev. *5*, 1513-1523.

Frings,S., Reuter,D., and Kleene,S.J. (2000). Neuronal Ca2+ -activated Cl- channels--homing in on an elusive channel species. Prog. Neurobiol. *60*, 247-289.

Frolov,I., Frolova,E., and Schlesinger,S. (1997). Sindbis virus replicons and Sindbis virus: assembly of chimeras and of particles deficient in virus RNA. J. Virol. *71*, 2819-2829.

Frolova, E., Frolov, I., and Schlesinger, S. (1997). Packaging signals in alphaviruses. J. Virol. 71, 248-258.

Gaillard,S. and Dupont,J.L. (1990). Ionic control of intracellular pH in rat cerebellar Purkinje cells maintained in culture. J. Physiol *425*, 71-83.

Galietta,L.J., Haggie,P.M., and Verkman,A.S. (2001). Green fluorescent protein-based halide indicators with improved chloride and iodide affinities. FEBS Lett. *499*, 220-224.

Geiger, J.R., Bischofberger, J., Vida, I., Frobe, U., Pfitzinger, S., Weber, H.J., Haverkampf, K., and Jonas, P. (2002). Patch-clamp recording in brain slices with improved slicer technology. Pflugers Arch. *443*, 491-501.

Gossen, M. and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *89*, 5547-5551.

Grichtchenko,I.I., Choi,I., Zhong,X., Bray-Ward,P., Russell,J.M., and Boron,W.F. (2001). Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a human electroneutral Na(+)-driven Cl-HCO3 exchanger. J. Biol. Chem. *276*, 8358-8363.

Griffin,B.A., Adams,S.R., and Tsien,R.Y. (1998). Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. Science *281*, 269-272.

Grimm,D., Kay,M.A., and Kleinschmidt,J.A. (2003). Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6. Mol. Ther. *7*, 839-850.

Grimm,D., Kern,A., Rittner,K., and Kleinschmidt,J.A. (1998). Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. Hum. Gene Ther. *9*, 2745-2760.

Han,S.K., Abraham,I.M., and Herbison,A.E. (2002). Effect of GABA on GnRH neurons switches from depolarization to hyperpolarization at puberty in the female mouse. Endocrinology *143*, 1459-1466.

Hartl,M.G., Hutchinson,S., Hawkins,L.E., and Grand,D.J. (2001). The effects of sedimentassociated triorganotin compounds on the gills of the European flounder, Platichthys flesus (L.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. *261*, 75-91.

Hasan,M.T., Friedrich,R.W., Euler,T., Larkum,M.E., Giese,G., Both,M., Duebel,J., Waters,J., Bujard,H., Griesbeck,O., Tsien,R.Y., Nagai,T., Miyawaki,A., and Denk,W. (2004). Functional fluorescent Ca2+ indicator proteins in transgenic mice under TET control. PLoS. Biol. *2*, e163.

Haverkamp,S., Wassle,H., Duebel,J., Kuner,T., Augustine,G.J., Feng,G., and Euler,T. (2005). The primordial, blue-cone color system of the mouse retina. J. Neurosci. *25*, 5438-5445.

Hentschke, M., Wiemann, M., Hentschke, S., Kurth, I., Hermans-Borgmeyer, I., Seidenbecher, T., Jentsch, T.J., Gal, A., and Hubner, C.A. (2006). Mice with a Targeted Disruption of the Cl-/. Mol. Cell Biol. *26*, 182-191.

Hillen,W. and Berens,C. (1994). Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. Annu. Rev. Microbiol. *48*, 345-369.

Hoess,R.H., Wierzbicki,A., and Abremski,K. (1986). The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination. Nucleic Acids Res. *14*, 2287-2300.

Hoess,R.H., Ziese,M., and Sternberg,N. (1982). P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *79*, 3398-3402.

Hubner, C.A., Lorke, D.E., and Hermans-Borgmeyer, I. (2001a). Expression of the Na-K-2Clcotransporter NKCC1 during mouse development. Mech. Dev. *102*, 267-269.

Hubner, C.A., Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Meyer, T., Ballanyi, K., and Jentsch, T.J. (2001b). Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. Neuron *30*, 515-524.

Huguenard, J.R. and Alger, B.E. (1986). Whole-cell voltage-clamp study of the fading of GABA-activated currents in acutely dissociated hippocampal neurons. J. Neurophysiol. *56*, 1-18.

Isaac, J.T., Crair, M.C., Nicoll, R.A., and Malenka, R.C. (1997). Silent synapses during development of thalamocortical inputs. Neuron *18*, 269-280.

Jayaraman, S. and Verkman, A.S. (2000). Quenching mechanism of quinolinium-type chloridesensitive fluorescent indicators. Biophys. Chem. *85*, 49-57.

Jentsch, T.J., Hubner, C.A., and Fuhrmann, J.C. (2004). Ion channels: function unravelled by dysfunction. Nat. Cell Biol. *6*, 1039-1047.

Jentsch, T.J., Stein, V., Weinreich, F., and Zdebik, A.A. (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. Physiol Rev. *82*, 503-568.

Johnston, G.A. (1996). GABAc receptors: relatively simple transmitter -gated ion channels? Trends Pharmacol. Sci. *17*, 319-323.

Kaila,K. (1994). Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system. Prog. Neurobiol. *42*, 489-537.

Kaila,K., Pasternack,M., Saarikoski,J., and Voipio,J. (1989). Influence of GABA-gated bicarbonate conductance on potential, current and intracellular chloride in crayfish muscle fibres. J. Physiol *416*, 161-181.

Kaneko,H., Putzier,I., Frings,S., Kaupp,U.B., and Gensch,T. (2004). Chloride accumulation in mammalian olfactory sensory neurons. J. Neurosci. *24*, 7931-7938.

Karlin, A. and Akabas, M.H. (1995). Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. Neuron *15*, 1231-1244.

Kaupmann,K., Huggel,K., Heid,J., Flor,P.J., Bischoff,S., Mickel,S.J., McMaster,G., Angst,C., Bittiger,H., Froestl,W., and Bettler,B. (1997). Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. Nature *386*, 239-246.

Kelsch,W., Hormuzdi,S., Straube,E., Lewen,A., Monyer,H., and Misgeld,U. (2001). Insulinlike growth factor 1 and a cytosolic tyrosine kinase activate chloride outward transport during maturation of hippocampal neurons. J. Neurosci. *21*, 8339-8347.

Keppler, A., Pick, H., Arrivoli, C., Vogel, H., and Johnsson, K. (2004). Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *101*, 9955-9959.

Knopfel,T., Tozzi,A., Pisani,A., Calabresi,P., and Bernardi,G. (1998). Hypoxic and hypoglycaemic changes of intracellular pH in cerebral cortical pyramidal neurones. Neuroreport *9*, 1447-1450.

Kuner, T. and Augustine, G.J. (2000). A genetically encoded ratiometric indicator for chloride: capturing chloride transients in cultured hippocampal neurons. Neuron *27*, 447-459.

Kyrozis, A. and Reichling, D.B. (1995). Perforated-patch recording with gramicidin avoids artifactual changes in intracellular chloride concentration. J. Neurosci. Methods *57*, 27-35.

LoTurco, J.J., Owens, D.F., Heath, M.J., Davis, M.B., and Kriegstein, A.R. (1995). GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. Neuron *15*, 1287-1298.

Macdonald,R.L., Rogers,C.J., and Twyman,R.E. (1989). Kinetic properties of the GABAA receptor main conductance state of mouse spinal cord neurones in culture. J. Physiol *410*, 479-499.

Mantamadiotis, T., Lemberger, T., Bleckmann, S.C., Kern, H., Kretz, O., Martin, V.A., Tronche, F., Kellendonk, C., Gau, D., Kapfhammer, J., Otto, C., Schmid, W., and Schutz, G. (2002). Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. Nat. Genet. *31*, 47-54.

Martin,B.R., Giepmans,B.N., Adams,S.R., and Tsien,R.Y. (2005). Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity. Nat. Biotechnol. *23*, 1308-1314.

Massaro,E.J., Zucker,R.M., Elstein,K.H., Ting-Beall,H.P., and Easterling,R.E. (1989). Fixation of the plasma membrane/cytoplasm complex: a mechanism of toxic interaction of tributyltin with the cell. Biol. Trace Elem. Res. *21*, 305-312.

Maxwell,I.H., Harrison,G.S., Wood,W.M., and Maxwell,F. (1989). A DNA cassette containing a trimerized SV40 polyadenylation signal which efficiently blocks spurious plasmid-initiated transcription. Biotechniques *7*, 276-280.

Meyer,A.H., Katona,I., Blatow,M., Rozov,A., and Monyer,H. (2002). In vivo labeling of parvalbumin-positive interneurons and analysis of electrical coupling in identified neurons. J. Neurosci. *22*, 7055-7064.

Misgeld,U., Deisz,R.A., Dodt,H.U., and Lux,H.D. (1986). The role of chloride transport in postsynaptic inhibition of hippocampal neurons. Science *232*, 1413-1415.

Miyawaki,A., Llopis,J., Heim,R., McCaffery,J.M., Adams,J.A., Ikura,M., and Tsien,R.Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca2+ based on green fluorescent proteins and calmodulin. Nature *388*, 882-887.

Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T., Ichikawa, M., and Miyawaki, A. (2004). Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca(2+) by circularly permuted yellow fluorescent proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *101*, 10554-10559.

Nagy,A., Rossant,J., Nagy,R., Abramow-Newerly,W., and Roder,J.C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *90*, 8424-8428.

Nakai, J., Ohkura, M., and Imoto, K. (2001). A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. Nat. Biotechnol. *19*, 137-141.

Nguyen,A.W. and Daugherty,P.S. (2005). Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET. Nat. Biotechnol. *23*, 355-360.

Owens, D.F., Boyce, L.H., Davis, M.B., and Kriegstein, A.R. (1996). Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. J. Neurosci. *16*, 6414-6423.

Payne, J.A., Rivera, C., Voipio, J., and Kaila, K. (2003). Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. Trends Neurosci. *26*, 199-206.

Pinkney, A.E., Wright, D.A., Jepson, M.A., and Towle, D.W. (1989). Effects of tributyltin compounds on ionic regulation and gill ATPase activity in estuarine fish. Comp Biochem. Physiol C. *92*, 125-129.

Pond,B.B., Berglund,K., Kuner,T., Feng,G., Augustine,G.J., and Schwartz-Bloom,R.D. (2006). The chloride transporter Na(+)-K(+)-Cl- cotransporter isoform-1 contributes to intracellular chloride increases after in vitro ischemia. J. Neurosci. *26*, 1396-1406.

Reiff,D.F., Ihring,A., Guerrero,G., Isacoff,E.Y., Joesch,M., Nakai,J., and Borst,A. (2005). In vivo performance of genetically encoded indicators of neural activity in flies. J. Neurosci. *25*, 4766-4778.

Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L., and . (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science *245*, 1066-1073.

Rivera, C., Voipio, J., Payne, J.A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., and Kaila, K. (1999). The K+/Cl- co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. Nature *397*, 251-255.

Rivera, C., Voipio, J., Thomas-Crusells, J., Li, H., Emri, Z., Sipila, S., Payne, J.A., Minichiello, L., Saarma, M., and Kaila, K. (2004). Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. J. Neurosci. *24*, 4683-4691.

Rohrbough, J. and Spitzer, N.C. (1996). Regulation of intracellular Cl- levels by Na(+)dependent Cl- cotransport distinguishes depolarizing from hyperpolarizing GABAA receptormediated responses in spinal neurons. J. Neurosci. *16*, 82-91.

Romero,M.F., Henry,D., Nelson,S., Harte,P.J., Dillon,A.K., and Sciortino,C.M. (2000). Cloning and characterization of a Na+-driven anion exchanger (NDAE1). A new bicarbonate transporter. J. Biol. Chem. *275*, 24552-24559. Russell, J.M. (2000). Sodium-potassium-chloride cotransport. Physiol Rev. 80, 211-276.

Schild,D. and Restrepo,D. (1998). Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. Physiol Rev. *78*, 429-466.

Schonig,K., Schwenk,F., Rajewsky,K., and Bujard,H. (2002). Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase in vivo. Nucleic Acids Res. *30*, e134.

Schwenk,F., Baron,U., and Rajewsky,K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. Nucleic Acids Res. *23*, 5080-5081.

Shaner, N.C., Steinbach, P.A., and Tsien, R.Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. Nat. Methods 2, 905-909.

Shiang,R., Ryan,S.G., Zhu,Y.Z., Hahn,A.F., O'Connell,P., and Wasmuth,J.J. (1993). Mutations in the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor cause the dominant neurologic disorder, hyperekplexia. Nat. Genet. *5*, 351-358.

Shimshek,D.R., Kim,J., Hubner,M.R., Spergel,D.J., Buchholz,F., Casanova,E., Stewart,A.F., Seeburg,P.H., and Sprengel,R. (2002). Codon-improved Cre recombinase (iCre) expression in the mouse. Genesis. *32*, 19-26.

Slemmer, J.E., Matsushita, S., De Zeeuw, C.I., Weber, J.T., and Knopfel, T. (2004). Glutamateinduced elevations in intracellular chloride concentration in hippocampal cell cultures derived from EYFP-expressing mice. Eur. J. Neurosci. *19*, 2915-2922.

Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. Nat. Genet. 21, 70-71.

Srinivas,S., Watanabe,T., Lin,C.S., William,C.M., Tanabe,Y., Jessell,T.M., and Costantini,F. (2001). Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. BMC. Dev. Biol. *1*, 4.

Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Jentsch, T.J., and Hubner, C.A. (2004). Expression of the KCl cotransporter KCC2 parallels neuronal maturation and the emergence of low intracellular chloride. J. Comp Neurol. *468*, 57-64.

Stosiek, C., Garaschuk, O., Holthoff, K., and Konnerth, A. (2003). In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *100*, 7319-7324.

Szabadics, J., Varga, C., Molnar, G., Olah, S., Barzo, P., and Tamas, G. (2006). Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. Science *311*, 233-235.

Tabcharani, J.A., Rommens, J.M., Hou, Y.X., Chang, X.B., Tsui, L.C., Riordan, J.R., and Hanrahan, J.W. (1993). Multi-ion pore behaviour in the CFTR chloride channel. Nature *366*, 79-82.

Tenenbaum,L., Lehtonen,E., and Monahan,P.E. (2003). Evaluation of risks related to the use of adeno-associated virus-based vectors. Curr. Gene Ther. *3*, 545-565.

Thompson, S.M. and Gahwiler, B.H. (1989a). Activity-dependent disinhibition. I. Repetitive stimulation reduces IPSP driving force and conductance in the hippocampus in vitro. J. Neurophysiol. *61*, 501-511.

Thompson,S.M. and Gahwiler,B.H. (1989b). Activity-dependent disinhibition. II. Effects of extracellular potassium, furosemide, and membrane potential on ECl- in hippocampal CA3 neurons. J. Neurophysiol. *61*, 512-523.

Thompson, S.M. and Gahwiler, B.H. (1989c). Activity-dependent disinhibition. III. Desensitization and GABAB receptor-mediated presynaptic inhibition in the hippocampus in vitro. J. Neurophysiol. *61*, 524-533.

Tozuka, Y., Fukuda, S., Namba, T., Seki, T., and Hisatsune, T. (2005). GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. Neuron *47*, 803-815.

Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. Annu. Rev. Biochem. 67, 509-544.

Twyman,R.E., Rogers,C.J., and Macdonald,R.L. (1990). Intraburst kinetic properties of the GABAA receptor main conductance state of mouse spinal cord neurones in culture. J. Physiol *423*, 193-220.

Verkman, A.S. (1990). Development and biological applications of chloride-sensitive fluorescent indicators. Am. J. Physiol *259*, C375-C388.

Vidal, M., Morris, R., Grosveld, F., and Spanopoulou, E. (1990). Tissue-specific control elements of the Thy-1 gene. EMBO J. *9*, 833-840.

Wachter, R.M., Yarbrough, D., Kallio, K., and Remington, S.J. (2000). Crystallographic and energetic analysis of binding of selected anions to the yellow variants of green fluorescent protein. J. Mol. Biol. *301*, 157-171.

Wagner, S., Castel, M., Gainer, H., and Yarom, Y. (1997). GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. Nature *387*, 598-603.

Wagner, S., Sagiv, N., and Yarom, Y. (2001). GABA-induced current and circadian regulation of chloride in neurones of the rat suprachiasmatic nucleus. J. Physiol *537*, 853-869.

Washbourne, P. and McAllister, A.K. (2002). Techniques for gene transfer into neurons. Curr. Opin. Neurobiol. *12*, 566-573.

Wimmer, V.C., Nevian, T., and Kuner, T. (2004). Targeted in vivo expression of proteins in the calyx of Held. Pflugers Arch. *449*, 319-333.

Wong,R.K. and Watkins,D.J. (1982). Cellular factors influencing GABA response in hippocampal pyramidal cells. J. Neurophysiol. *48*, 938-951.

Xiong,Z.Q., Saggau,P., and Stringer,J.L. (2000). Activity-dependent intracellular acidification correlates with the duration of seizure activity. J. Neurosci. *20*, 1290-1296.

Zaccolo,M., De Giorgi,F., Cho,C.Y., Feng,L., Knapp,T., Negulescu,P.A., Taylor,S.S., Tsien,R.Y., and Pozzan,T. (2000). A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells. Nat. Cell Biol. *2*, 25-29.

Zambrowicz,B.P., Imamoto,A., Fiering,S., Herzenberg,L.A., Kerr,W.G., and Soriano,P. (1997). Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *94*, 3789-3794.

7 Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich allen danken, die am Gelingen dieser Arbeit ihren Anteil haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Kuner dafür, dass er mir dieses außerordentlich spannende Thema zur Verfügung gestellt hat. Seine stete Diskussionsbereitschaft und auch seine Geduld waren sehr wertvoll für mich.

Herrn Prof. Peter Seeburg danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Sein Interesse am Fortgang der Arbeit und seine Anregungen waren sehr motivierend.

Bei Herrn Dr. Günther Giese möchte ich mich für die Hilfe mit dem Mikroskop bedanken.

Herrn Dr. Frank Single danke ich für die Einführung in die ES-Zellkultur.

Tatjana Schweizer danke für die Hilfe mit den Tails, Viren...

Den Calyceans, aber auch den Seeburgern und Mollies, danke ich für ihre Bereitschaft ihr Wissen zu teilen und die gute Atmosphäre im Labor.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich während all der Jahre vorbehaltlos unterstützt haben.