

Neuronale Expressionsmuster von CIC2 Cl⁻-Kanälen

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Naros, Andreas

2015

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. H. Lerche

2. Berichterstatter:

Professor Dr. B. Wissinger

In Liebe und Dankbarkeit meiner Familie gewidmet

NEURONALE EXPRESSIONSMUSTER VON CIC2 CL-KANÄLEN

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung	4
1.1 Chlorid-Kanäle.....	5
1.2 Die Familie der CIC-Kanäle	6
1.3 Molekulare Struktur der CIC-Kanäle	9
1.3.1 Dimere Kanalstruktur	9
1.3.2 Topologie von CIC-Kanälen	10
1.4 Physiologische Bedeutung	13
1.4.1 Expressionsmuster und Splice-Varianten von CIC-2.....	13
1.4.2 Funktionelle Eigenschaften und physiologische Funktion.....	14
1.4.3 CIC-2 Knockout-Mäuse.....	16
1.4.4 CIC-2 und Genetische Epilepsie	17
1.5 Ziel der Dissertation	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Antikörper.....	21
2.1.1 CIC-2 Antikörper	21
2.1.2 Weitere Primärantikörper	22
2.1.3 Sekundärantikörper.....	23
2.2 Vektoren.....	24
2.3 Zellkulturen.....	25
2.3.1 HEK-Zellen	25
2.3.2 SH-Zellen.....	27
2.3.3 Neuronale Zellkultur	27
2.4 Genotypisierung	31
2.4.1 DNA Isolation.....	31

2.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	31
2.4.3 Agarosegelelektrophorese von DNA	32
2.5 Kryoschnitte	33
2.6 Immunofluoreszenz (IF).....	33
2.6.1 IF an Zellen.....	34
2.6.2 IF an Schnitten.....	35
2.7 Immunofluoreszenzmikroskopie	37
2.8 Lösungen und Medien	38
2.9 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	39
3 Ergebnisse	40
3.1 CIC-2 Antikörpertestung an transfizierten HEK-Zellen mit WT CIC-2	40
3.2 Expression in SH-Zellen	43
3.3 Kolokalisation in Neuronen	46
3.4 Kolokalisation in Kryoschnitten	50
3.5 Ontogenetische Expressionsmuster von CIC-2	53
3.5.1 Cortex.....	53
3.5.2 CA1.....	54
3.5.3 CA3.....	54
3.6 Expression in primären hippocampalen Neuronen	58
3.7 CIC2-4 Antikörperfärbungen in CIC-2 Knockout-Mäusen.....	60
3.7.1 Wildtyp.....	60
3.7.2 Knockout.....	60
4 Diskussion	62
4.1 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.....	62
4.2 Prüfung der neuen polyklonalen CIC-2 Antikörper	62
4.3 CIC-2 Expression in Neuronen	65
4.4 Bedeutung für die Funktion von CIC-2 Kanälen	67
4.5 Ausblick.....	69

5 Zusammenfassung	70
6 Abbildungsverzeichnis.....	72
7 Literaturverzeichnis	76
Danksagung	87

1 EINLEITUNG

Die Neurophysiologie und insbesondere deren Teilbereich, die Elektrophysiologie, beschäftigt sich mit elektrochemischen Signalübertragungen im Nervensystem. Dabei kommt den Ionen und deren Verteilung im Intra- und Extrazellularraum eine entscheidende Rolle zu, die bei vielen physiologischen Funktionen von Zellen, Organen und Organismen von essentieller Bedeutung ist. So kann an Zellen des menschlichen Organismus ein Ruhepotential gefunden werden, das größtenteils auf die Verteilung von Na^+ - und K^+ -Ionen zurückzuführen ist und maßgeblich durch aktiven Transport mittels Na^+ - K^+ -ATPase aufrechterhalten wird. Weiterhin von Bedeutung sind neben Natrium und Kalium auch Ca^{2+} sowie die negativ geladenen Cl^- , HCO_3^- und große Anionen, wie zum Beispiel Proteine.

Neben dem schon genannten aktiven Transport mittels „Ionenpumpen“ kommt den Ionenkanälen eine tragende Rolle zu. Hierbei handelt es sich um integrale Membranproteine, die geladenen Teilchen eine passive Diffusion entlang des bestehenden elektrochemischen Gradienten ermöglichen. Sie bilden wassergefüllte Poren in ansonsten lipophilen Biomembranen und befähigen so die Ionen diese Barriere zu überwinden. Daher werden sie häufig auch als Kanal- oder Tunnelproteine bezeichnet. Die Unterteilung erfolgt nach Selektivität in Kationenkanäle und Anionenkanäle sowie der Gliederung in hochspezifische und relativ unspezifische Kationenkanäle. Dabei sinkt die Leitfähigkeit der geöffneten Pore für andere Ionen mit steigender Selektivität des Kanals. Bleibt zu erwähnen, dass die meisten Anionenkanäle für mehrere Anionen permeabel sind. Da jedoch Cl^- das am häufigsten vorkommende Anion darstellt und damit auch überwiegend von Anionenkanälen geleitet wird, werden diese häufig auch als Chloridkanäle bezeichnet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das komplexe Zusammenspiel und Gleichgewicht von Ionen elementare Grundlage nahezu aller physiologischen Vorgänge von synaptischer Übertragung, Muskelkontraktion,

Herzmuskelerregung, bis hin zum Säure- Base- und Wasserhaushalt, sowie komplexen kognitiven Leistungen in einem Organismus ist. Somit bringt ihre Erforschung große und nicht zuletzt notwendige physiologische, patho-physiologische und letztendlich klinische Erkenntnisse hervor.

1.1 Chlorid-Kanäle

Chloridkanäle unterliegen unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen. So können Sie durch die Bindung von Signalmolekülen (Liganden-aktivierte Kanäle), durch das Membranpotential (spannungsgesteuerte Kanäle), durch verschiedene andere Ionen (wie z.B. Ca^{2+}), durch Volumenveränderungen der Zelle, durch pH-Veränderungen, durch die Bindung und Hydrolyse von ATP, oder durch Phosphorylierung aktiviert werden. Jedoch lassen sich die verschiedenen Chloridkanäle, die sich in ihrem Aktivierungsmechanismus, ihren biophysikalischen Eigenschaften, dem Expressionsmuster und letztlich durch ihre physiologischen Funktionen voneinander unterscheiden, nach Lokalisation, Einzelkanalleitfähigkeit oder Regulationsmechanismus auf Grund vieler Überschneidungen nur ungenügend einteilen. Daher ist eine Untergliederung nach ihrer molekularen Struktur wohl die bislang sinnvollste Möglichkeit (Jentsch et al. 2002).

Zu den bekanntesten Gen-Familien gehören die CIC-Kanäle, der CFTR-Kanal (cystic fibrosis conductance regulator), die Ca^{2+} -aktivierten Chloridkanäle, maxi- Cl^- -Kanäle, oder Kanäle, welche durch die Zunahme des Zellvolumens aktiviert werden (Verkman & Galiotta 2009). Eine weitere Gen-Familie bilden die ligandengesteuerten GABA- und Glycinrezeptor- gekoppelten Chloridkanäle, welche aus 5 Untereinheiten (Heteropentamer) bestehen, wobei jeweils vier Transmembrandomänen gemeinsam eine Pore bilden (Betz et al., 1999; Bormann, 2000; Chebib & Johnston, 1999).

Die genannten Chloridkanäle bilden eine große und heterogene Gruppe, die im gesamten Organismus verteilt, unterschiedlichste und größtenteils lebensnotwenige Funktionen übernehmen. Sie kommen dabei sowohl an

Zellmembranen als auch an den Membranen intrazellulärer Organellen vor. Ihre an die Plasmamembran gekoppelte Funktion lässt sich grob in drei Teile untergliedern:

1. Die Regulation von Zellvolumen und ionaler Homöostase findet im Zusammenspiel mit vielen Ionentransportern, Pumpen, Cotransportern und weiteren Ionenkanälen statt. So sind bei der Azidifizierung bestimmter intrazellulärer Kompartimente mittels H^+ -ATPase für einen elektroneutralen Transport, gleichzeitig Cl^- -Kanäle notwendig.

2. Beim transepithelialen Transport spielen Chloridkanäle in vielen Geweben, wie dem Lungenepithel, aber auch in Drüsenzellen und in der Henle-Schleife der Niere eine elementare Rolle in der Sekretion und Reabsorption von Chloridionen.

3. Zahlreiche Erkrankungen, die durch Mutationen in Chloridkanalgenen verursacht werden, wie die Myotonien, aber auch Epilepsien spiegeln die Wichtigkeit von Chloridkanälen in der Regulierung der elektrischen Erregbarkeit von Nerven- und Muskelzellmembranen wider.

Darüber hinaus haben an intrazellulären Organellen gekoppelte Kanäle weiterreichende Funktionen, zu denen unter anderem der Transport anionischer Substrate, wie zum Beispiel Phosphate und Sulfate aus dem Golgi-Apparat oder den Lysosomen, oder auch die Volumenregulation von Organellen, wie den Mitochondrien, zählen (Verkman & Galletta 2009).

1.2 Die Familie der ClC-Kanäle

Ursprünglich wurde die Familie der ClC-Kanäle durch die Klonierung des spannungsgesteuerten Cl^- -Kanals aus dem elektrischen Organ des marinen Zitterrochens *Torpedo marmorata* entdeckt (Jentsch et al. 1990). In den darauffolgenden Jahren wurden in zahlreichen anderen Geweben und Spezies weitere ClC-Kanäle identifiziert und mit zahlreichen Pathologien in Verbindung gebracht, sodass heute in nahezu allen Organismen, von Wirbeltieren und

Wirbellosen bis hin zu Pflanzen und Prokaryoten, CIC-Kanäle nachgewiesen wurden (Stauber et al. 2012).

Die bisher bekannten neun CIC-Gene bei Säugetieren können anhand ihrer Sequenzhomologie und funktionellen Eigenschaften in drei weitere Untergruppen eingeteilt werden (Abb. 1). In der ersten Gruppe, welche die Isoformen CIC-1, CIC-2, CIC-Ka und CIC-Kb umfasst, befinden sich diejenigen Kanäle, die ausschließlich in der Zellmembran lokalisiert sind, wohingegen die Kanäle aus den zwei weiteren Untergruppen hauptsächlich in den intrazellulären Membranen vorkommen und die so genannten Chlorid-Protonen-Austauscher (Cl^-/H^+ exchanger) darstellen (Stauber et al. 2012). Desweiteren lassen sich unterschiedliche Expressionsmuster unterscheiden. Während einige Kanäle ubiquitär vorkommen, wie CIC-2, CIC-3, CIC-6 und CIC-7 (Brandt and Jentsch 1995; Thiemann et al. 1992), konnten die beiden CIC-K Isoformen, CIC-4 und CIC-5, nur in spezifischen Geweben nachgewiesen werden (Estévez et al., 2001; Fisher et al., 1994; Kawasaki et al., 1994; Pannabecker, Dahlmann, Brokl, & Dantzer, 2000; Van Slegtenhorst et al., 1994). Die Expression von CIC-1 ist fast ausschließlich auf die Skelettmuskulatur begrenzt (Steinmeyer et al. 1991)

		Expression	Function	Human disease	Mouse model
Cl ⁻ channels of the plasma membrane	CIC-1	Skeletal muscle	Stabilization of membrane potential	Myotonia congenita	Myotonia congenita (<i>adr</i> mouse)
	CIC-2	Broad	Intra/extracellular ion homeostasis		Degeneration of retina and testes/leukodystrophy
	CIC-Ka/ barttin	Kidney, ear	Transepithelial transport	Bartter III (renal salt loss)	Diabetes insipidus
	CIC-Kb/ barttin	Kidney, ear	Transepithelial transport		
Cl ⁻ /H ⁺ exchangers of intracellular vesicles	CIC-3	Broad (brain, kidney, liver...)	Acidification of synaptic vesicles, endosomes		Degeneration: retina/hippocampus
	CIC-4	Broad (brain, kidney, muscle...)	?		
	CIC-5	Kidney (also: intestine...)	Cl ⁻ accumulation into endosomes/acidification of endosomes	Dent's disease	Defect in renal endocytosis
Cl ⁻ /H ⁺ exchangers of intracellular vesicles	CIC-6	Nervous system	Acidification of late endosomes?		Lysosomal storage (NCL)
	CIC-7/ Ostm1	Broad	Cl ⁻ accumulation into lysosomes/acidification of resorption lacuna	Osteopetrosis, retinal degeneration, lysosomal storage (NCL) Same as for CIC-7	Osteopetrosis, retinal degeneration, lysosomal storage (NCL) Same as for CIC-7

Abbildung 1: Dendrogramm der CIC-Familie in Säugern (aus Stauber et al. 2012)

Einige CIC-Kanäle (z.B. CIC-0, CIC-1 und CIC-2) zeigen große Ströme, wenn sie allein exprimiert werden. CIC-K Kanäle hingegen benötigen für eine volle Funktionalität die β -Untereinheit „Barttin“.

Allen CIC-Kanälen gemeinsam ist ihre spannungsabhängige Aktivierung. Bei einigen Kanälen kommt eine zusätzliche Modulation durch Anionen und pH-Wert hinzu. In dieser Hinsicht und bezüglich ihrer Proteinstruktur unterscheiden sich CIC-Kanäle entscheidend von anderen Ionenkanälen. Im Gegensatz zu anderen Kanalproteinen werden die Poren von CIC-Kanälen nicht von mehreren, ringförmig angeordneten, sondern von einzelnen Untereinheiten geformt. CIC-Kanäle besitzen außerdem keinen internen Spannungssensor wie das S4-Segment der spannungsgesteuerten Kationenkanäle (Bezanilla, 2000; Y Jiang et al., 2003; Youxing Jiang, Ruta, Chen, Lee, & MacKinnon, 2003; Stühmer et al., 1989). Die Spannungsabhängigkeit des Schaltverhaltens in CIC-Kanälen kommt nicht durch eine Bewegung von Ladungen innerhalb des Proteins, sondern durch die Bewegung des permeierenden Anions durch das transmembrane elektrische Feld zustande (Chen & Miller 1996; Chen 2003; Engh et al. 2007).

Die große physiologische und pathophysiologische Bedeutung dieser Kanalfamilie wird anhand von Erbkrankheiten, die auf Defekte in CIC-Genen zurückzuführen sind, verdeutlicht (Blanz and Zdebik 2008; Bösl et al. 2001; Koch et al. 1992; Kornak et al. 2001; Lloyd et al. 1996; Matsumura et al. 1999; Piwon et al. 2000; Simon et al. 1997; Stauber et al. 2012; Stobrawa et al. 2001; S. Wang et al. 2000). Außerdem kommt es durch Defekte in der β -Untereinheit „Barttin“ zu zahlreichen weiteren Erkrankungen (Abb. 1) (Birkenhäger et al. 2001; Estévez et al. 2001, Blanz & Zdebik, 2008).

1.3 Molekulare Struktur der CIC-Kanäle

Elektrophysiologische Untersuchungen und Strukturanalysen haben über die letzten Jahrzehnte zu kontroversen Diskussionen über Struktur und Funktion der CIC-Kanäle geführt. Sie haben aber auch ein immer besseres Verständnis und tiefere Einblicke in diese Kanalfamilie gefördert. Erst die Arbeit von Dutzler et al. (2002) schaffte mehr Klarheit.

1.3.1 Dimere Kanalstruktur

Zahlreiche Versuche mit Koexpression von Wildtyp (WT) und mutierten Untereinheiten sowie mutierten/WT-Einzelkanalanalysen deuteten bisher einstimmig auf eine dimere Struktur der CIC-Kanäle hin (Accardi and Picollo 2010; Fahlke et al. 1997; Ludewig et al. 1996; Middleton et al. 1996; Steinmeyer et al. 1994). Vereinzelt Hinweise auf eine tetramere Struktur (Ramjeesingh et al., 2000) konnten durch die zweidimensionale Projektion der Kristallstruktur (Mindell, Maduke, Miller, & Grigorieff, 2001) sowie die hochauflösende dreidimensionale Strukturanalyse (R Dutzler, Campbell, Cadene, Chait, & MacKinnon, 2002) widerlegt werden. Obwohl Dutzler et al. auf CIC-Kanäle der beiden Bakterien *S. typhimurium* (StCIC) und *E. coli* (EcCIC) zurückgreift, kann auf Grund der Homogenität innerhalb der CIC-Kanalfamilie davon ausgegangen werden, dass es sich bei allen bisher bekannten CIC-Kanälen um funktionelle Dimere handelt. Weitere Experimente zeigten außerdem das Vorhandensein von zwei identischen, unabhängig funktionierenden Ionenporen (Saviane et al., 1999; Weinreich & Jentsch 2001). Dabei scheint jede dieser Poren aus einem eigenen CIC-Protein geformt zu sein (Dutzler et al. 2002; Ludewig et al., 1996; Weinreich & Jentsch, 2001) und nicht, wie zum Teil angenommen, aus der Schnittstelle zwischen den einzelnen Untereinheiten (Fahlke et al. 1998) (Abb. 2).

Millers biophysikalische Analyse resultierte in einem „double-barrel“ Model mit zwei identischen Poren. Weiter konnte gezeigt werden, dass jede Pore unabhängig öffnen und schließen kann, was auf Grund der höheren Geschwindigkeit als *fast gate* der Einzelporen bezeichnet wird. Jedoch existiert

noch ein sogenanntes *slow gate*, das das gleichzeitige öffnen und schließen beider Poren beschreibt (Miller, 1982).

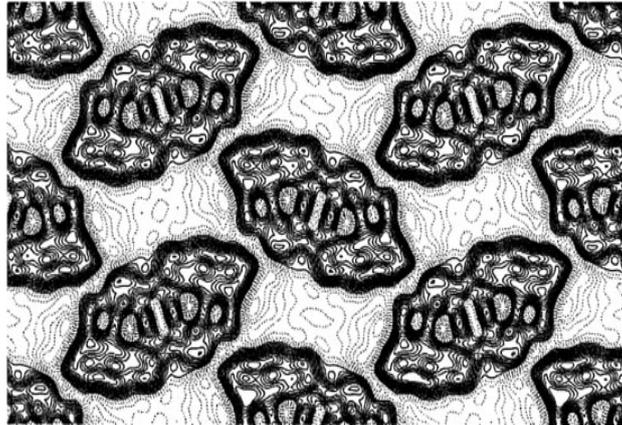
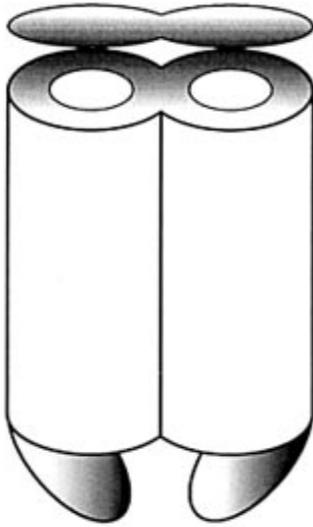


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines CIC-Kanals; Dimere Struktur mit zwei unabhängigen Poren, die von jeweils einer Untereinheit gebildet werden (aus Jentsch et al. 2002)

Abbildung 3: Zweidimensionale Projektionen der Kristallstruktur des EriC-Proteins (EcClCa); Zeigt eine symmetrische Struktur mit zwei dezentralen Regionen verminderter Elektronendichte, was Hinweis auf zwei unabhängige Poren des dimeren Kanals sein kann (aus Mindell et al. 2001).

Diese Erkenntnisse konnten, wie bereits erwähnt, anhand der zweidimensionalen Projektion der Kristallstruktur des EriC-Proteins (EcClCa) von Mindell et al., die eine symmetrische Struktur mit zwei exzentrischen weniger elektronendichten Arealen nachweisen konnten (Mindell et al., 2001) (Abb. 3), sowie der hochauflösenden dreidimensionalen Strukturanalysen gefestigt werden (Dutzler et al. 2002).

1.3.2 Topologie von CIC-Kanälen

Durch die dreidimensionale Strukturanalyse der zwei bakteriellen CIC-Kanäle (StCIC von *S. typhimurium* und EcCIC von *E. coli*) konnten grundlegende strukturelle Eigenschaften von CIC-Kanälen charakterisiert werden (Dutzler et al., 2002). Die zwei identischen Untereinheiten des Kanals liegen an einer zweifachen Symmetrieachse senkrecht zur Ebene der Zellmembran nebeneinander. Dabei bilden sie funktionelle Dimere mit zwei unabhängigen Poren.

Die 18 α -Helices der ClC-Untereinheiten werden systematisch mit A-R benannt (Abb. 4). Die Helices J-Q, auch C-terminale Hälfte genannt, stellen eine strukturelle Wiederholung der N-terminalen Hälfte (Helices B-I) dar. Innerhalb der Zellmembran sind die beiden Hälften entlang einer zweifachen Symmetrieachse gegenläufig angeordnet, wobei nicht alle transmembranen Helices die Biomembran vollständig durchdringen und somit keine „transmembranen Helices“ im klassischen Sinne sind.

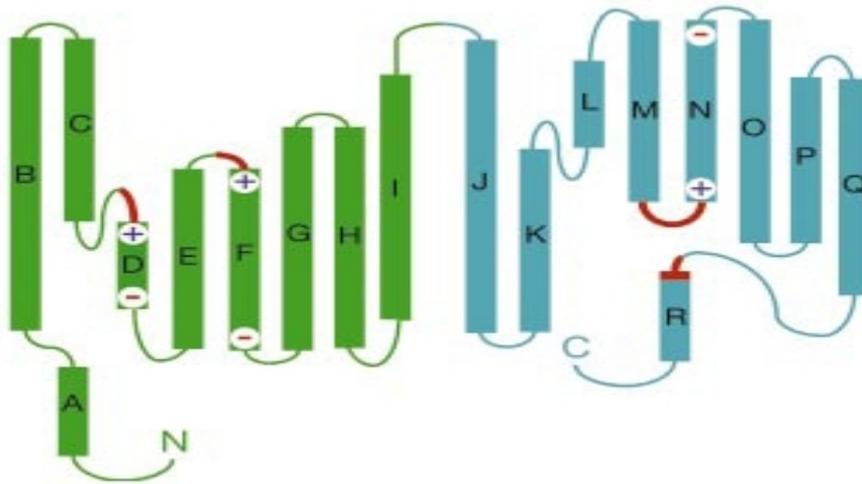


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Struktur einer StClC Untereinheit. Die als Zylinder dargestellten α -Helices (A-R) sind gemäß den Untereinheiten in grün und blau dargestellt. Die roten Regionen entsprechen den Cl^- -Selektionsfilter-bildende Bereichen. Die mit + und - markierten Areale entsprechen den Partialladungen an den Enden der Helices, welche an der Bindung von Cl^- beteiligt sind, was die Dipolfunktion dieser Gebiete verdeutlichen soll (aus Dutzler et al. 2002).

Durch ihre unterschiedliche Länge und die stark gekippte Anordnung werden hoch konservierte Aminosäuren aus vier separaten Regionen zusammengebracht und erhalten so funktionelle Eigenschaft (Abb. 5 LINKS). Die Gleichrichtung der positiv geladenen aminoterminalen Enden der α -Helices D, F und N führen zu einer elektrostatisch vorteilhaften Umgebung, welche die Bindung von Anionen fördert. Aufgrund des Auffindens von Cl^- bzw. Br^- -Ionen in dieser Region, deuteten Dutzler et al. diese als Selektivitätsfilter der Pore (Abb. 5 MITTE). Unterstützt durch partielle positive Ladungen von Helix-Dipolen und stabilisierenden Wasserstoffbrücken, können Ionen schnell durch die Pore gelangen. Gestärkt wird dieser Effekt außerdem noch von einem elektrostatischen Feld, welches vermutlich die Cl^- -Ionen in Richtung der Pore leitet. Dieses Feld wird durch positiv geladene Aminosäuren (z.B. R147 und

R451) aus wassergefüllten Vorhöfen gebildet, die aus der extrazellulären und intrazellulären Seite in einen etwa 12 Å langen Tunnel ragen, in den die N-Termini der Helices D, F und N gerichtet sind.

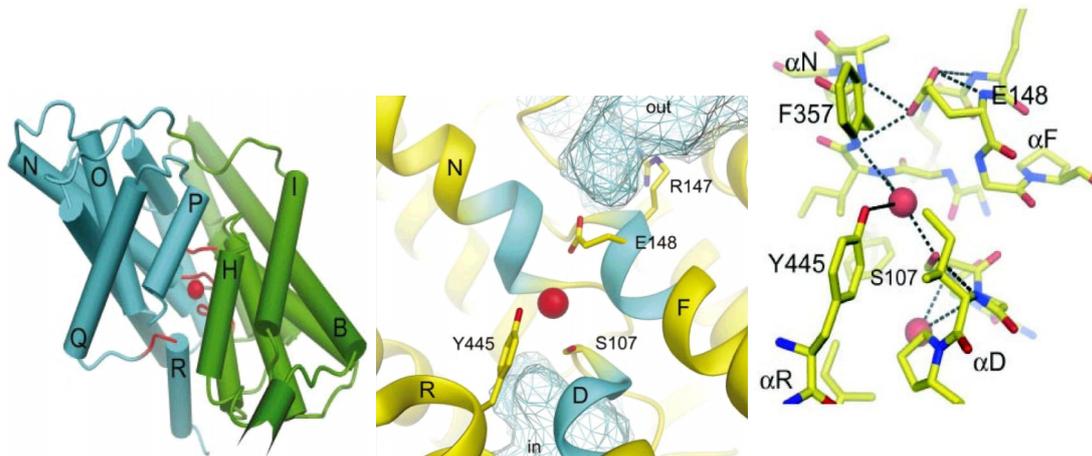


Abbildung 5: LINKS: Schematische Darstellung der Struktur einer StCIC Untereinheit mit mutmaßlicher Lagebeziehung in der Membran. Die als Zylinder dargestellten α -Helices (A-R) sind gemäß den Untereinheiten in grün und blau dargestellt. Das permeierende Cl^- -Ion wird durch den roten Ball symbolisiert. Die roten Regionen entsprechen den Cl^- -Selektionsfilter-bildenden Bereichen. MITTE: Die Ionenbindungsstelle aus Sicht der Kontaktregion der beiden Untereinheiten. Die α -Helices sind hier als Bänder dargestellt. Die Seitenketten einzelner relevanter Aminosäuren sind stabförmig eingezeichnet. Die positiv geladenen N-Termini der Helices D, F und N sind blau gefärbt. Die wassergefüllten Vorhöfe, die von der extra- und der intrazellulären Seite bis zu dem Selektivitätsfilter reichen, sind als blaues Netz gezeichnet, das Cl^- -Ion als roter Ball. RECHTS: Gleiche Ansicht der Ionen-Bindungsstellen wie in der MITTE. Nur ausgewählte Aminosäuren und ihre Seitenketten in der Nähe der gebundenen Cl^- -Ionen sind stabförmig gestellt. Wasserstoffbrückenbindungen werden durch gestrichelte Linien und die Cl^- -Ionen durch rote Bälle symbolisiert (LINKS & MITTE aus: Dutzler et al. 2002; RECHTS aus: Dutzler et al., 2003)

Anders als bei den ersten Kristallstrukturen (Dutzler et al. 2002), in denen lediglich eine zentrale Bindungsstelle im Selektivitätsfilter identifiziert wurde, konnte bei Untersuchungen mit höherer Auflösung (Dutzler et al., 2003) eine weitere, unabhängige Bindungsstelle lokalisiert werden. Diese liegt weiter zytoplasmatisch, wo der wassergefüllte Vorhof von der intrazellulären Seite bis zum Selektivitätsfilter reicht (Abb. 5 RECHTS). Am anderen Ende des Selektivitätsfilters ragt eine negativ geladene Glutamat-Seitenkette in die Pore. Die Wasserstoffbrücken der Carboxylgruppe verbinden die Enden der α -Helices F und N, wodurch die Pore versperrt wird. Dies könnte als *fast gate* der ClC-Kanäle gedeutet werden.

1.4 Physiologische Bedeutung

CIC-Kanäle wurden in fast allen Organismen und in fast allen Geweben nachgewiesen. Ihnen kommen tragende Funktionen zu, die von ihrem spezifischen Expressionsmuster abhängig sind. Genauere Erkenntnisse über die physiologische Bedeutung von Ionenkanälen bringen jedoch häufig erst Erbkrankheiten durch Genmutationen hervor. Durch anschließende elektrophysiologische Untersuchungen heterologer, klonierter Kanäle können durch die Veränderung der Funktionsweise durch die Mutationen Rückschlüsse auf die Bedeutung des Wildtyp-Kanals gezogen werden. Desweiteren haben verschiedene Tiermodelle mit Knockout-Mäusen ein genaueres Bild über die physiologische Bedeutung dieser Kanalfamilie gefördert (Lehmann-Horn & Jurkat-Rott, 1999).

Abbildung 1 bietet eine grobe Übersicht über die bekannten Forschungsergebnisse. Im Folgenden soll der Fokus auf die von uns untersuchten CIC-2 Kanäle gelegt werden.

1.4.1 Expressionsmuster und Splice-Varianten von CIC-2

CIC-2 ist ein ubiquitär vorkommender Kanal, dessen mRNA in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden konnte. Eine Regulation der Expression konnte für Aldosteron (Ornellas, Nascimento, Christoph, Guggino, & Morales, 2002), Östrogen (Nascimento et al., 2003) und Thyroxin (Santos Ornellas et al., 2003) nachgewiesen werden. Gehirn, Niere und Intestinaltrakt exprimieren dabei besonders große Mengen an CIC-2 Kanälen (Thiemann et al., 1992). Im Gehirn wird CIC-2 in den Pyramidalzellen des Hippocampus und in den Purkinjezellen des Cerebellums (Smith et al. 1995) stärker exprimiert als in anderen Neuronen oder in Glia, ausgenommen den astrozytischen Endstrecken („astrocytic endfeet“) (Sik et al. 2000). Im Auge konnten sowohl in der Retina, wobei hier die bipolaren Zellen besonders betroffen scheinen, als auch im Pigmentepithel Proteine nachgewiesen werden (Bösl et al. 2001; Enz et al., 1999).

Es werden unterschiedliche Splice¹-Varianten beschrieben, von denen einige gewebespezifisch zu sein scheinen (Chu & Zeitlin 1997; Chu et al. 1996; Loewen et al. 2000). Die meisten führen jedoch zu verkürzten, nicht funktionalen Proteinen (Cid, Niemeyer, Ramírez, & Sepúlveda, 2000), deren physiologische Bedeutung nicht bekannt ist.

1.4.2 Funktionelle Eigenschaften und physiologische Funktion

Bezüglich der physiologischen Funktion von CIC-2 Kanälen herrscht noch große Uneinigkeit. Eine Ursache hierfür sind unter anderem sich widersprechende elektrophysiologische Erkenntnisse und Untersuchungen mit Knockout-Mäusen (Bösl et al., 2001; Nehrke et al., 2002). Es scheint gesichert, dass die CIC-2 Kanäle, ähnlich wie die anderen Mitglieder ihrer Familie, sowohl durch Hyperpolarisation (Thiemann et al., 1992) und Zellvolumen (Gründer, Thiemann, Pusch, & Jentsch, 1992) als auch durch extrazelluläre Azidifizierung aktiviert werden und dass die größte Selektivität für Cl⁻-Ionen allen CIC-Kanälen gemein ist (Furukawa et al. 1998; Jordt & Jentsch 1997; Schwiebert et al. 1998; Thiemann et al. 1992).

Neben der ungeklärten Frage nach der Osmosensitivität (Bond, Ambikapathy, Mohammad, & Valverde, 1998; Carew & Thorn, 1996; Fritsch & Edelman, 1997; Gründer et al., 1992), herrscht auch bei der Frage nach der Beteiligung der CIC-2 Kanäle an der Volumenregulation der Zellen, trotz einiger befürwortenden Stimmen, (Furukawa et al. 1998; Xiong et al. 1999) weiterhin Uneinigkeit, was nicht zuletzt daran liegt, dass bei Speicheldrüsenzellen von CIC-2 Knockout-Mäusen eine normale Volumenregulation gezeigt werden konnte (Nehrke et al., 2002).

In weiteren Drüsenzellen wie der *Glandula parotis*, dem Pankreas, oder in den Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes, werden die CIC-2 Kanäle auf Grund der Chloridsekretion, mit dem transepithelialen Transport in Verbindung gebracht (Gyömörey, Yeger, Ackerley, Garami, & Bear, 2000; Mohammad-

¹ Spleißen beschreibt einen wichtigen Vorgang in der Prozessierung von prä-mRNA zu reifer mRNA, wobei noch enthaltene Introns entfernt werden und angrenzende Extrons miteinander verknüpft werden.

Panah et al., 2001). Inwiefern sie bei der Kontrolle der Erregbarkeit des Herzens eine Rolle spielen, ist Gegenstand aktueller Forschung (Duan et al. 2000).

Durch den gleichzeitigen immunhistochemischen Nachweis von CIC-2 Kanälen in apikalen Membranen fetaler Lungen, welche nach der Geburt herunter reguliert werden (Murray et al. 1996; Murray et al. 1995) und die Tatsache, dass unter anderem durch eine Absenkung des extrazellulären pH-Wertes ein transmembraner Cl⁻-Strom gemessen werden konnte, was eine Eigenschaft der CIC-2 Kanäle darstellt, wurde Ihnen ein Einfluss auf die fetale Lungenentwicklung beigemessen, die nicht zuletzt von der Cl⁻-sowie Flüssigkeitssekretion abhängig ist (Blaisdell et al. 2000). Jedoch zeigten Clcn2^{-/-} Mäuse eine normale Lungenentwicklung (Bösl et al., 2001). Dennoch werden die Kanäle aufgrund ihrer Kolo-kalisation mit CFTR-Kanälen als alternatives Ziel einer pharmakologischen Behandlung bei Patienten mit Zystischer Fibrose gesehen (Kirk, 2000; Schwiebert et al., 1998).

Für die gegenwärtige Arbeit ist der Zusammenhang von CIC-2 mit der GABAergen Hemmung und GABA_A Rezeptoren in hippocampalen Zellen von Bedeutung (Smith et al. 1995). Durch eine Überexpression von CIC-2 in den Pyramidenzellen wird eine intrazelluläre Akkumulation von Cl⁻-Ionen und damit auch eine exzitatorische GABA-Antwort der GABA_A Rezeptoren verhindert (Smith et al. 1995; Staley 1994; Staley et al. 1996). Somit könnte den CIC-2 Kanälen eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der GABAergen synaptischen Inhibition zukommen. In einer theoretischen Studie wurde jedoch nur ein geringer direkter Einfluss des Kanals auf die Chloridionenkonzentration der Zellen berechnet (Ratté et al. 2011). Ratté et al. gehen eher von einem grundsätzlich indirekten Einfluss des Ionenkanals auf die Erregbarkeit der Zellen, durch Beeinflussung der Hintergrundleitfähigkeit, aus.

In einer neueren Studie (Depienne et al., 2013) zeigte sich, dass Mutationen im CLCN2-Gen, das für den CIC-2 Kanal kodiert, eine spezifische Form der menschlichen Leukoenzephalopathie verursachen. Desweiteren bindet CIC-2 an GlialCAM, ein Protein, das in einer Untergruppe von Patienten mit

megalenzephaler Leukoenzephalopathie mit subkortikalen Zysten mutiert ist, wodurch sich die subzelluläre Lokalisierung und die Kanaleigenschaften von CIC-2 in heterologen Expressionssystemen ändern.

1.4.3 CIC-2 Knockout-Mäuse

Der Phänotyp der Knockout-Mäuse mit ausgeschaltetem CLCN2-Gen bestätigte überraschenderweise die oben genannten und erwarteten Ergebnisse nur begrenzt (Bösl et al., 2001; Nehrke et al., 2002). Es konnte weder eine fehlerhafte Lungenentwicklung, wie sie auf Grund der angenommenen Bedeutung der CIC-2 Kanäle bei der Cl⁻- und Flüssigkeitssekretion erwartet wurde (Blaisdell et al. 2000; Murray et al. 1995), noch eine Störung der Volumenregulation beobachtet werden. Auch die Magensäureproduktion war entgegen anderer Erwartungen nicht gestört (Malinowska, Kupert, Bahinski, Sherry, & Cuppoletti, 1995).

Stattdessen fiel auf, dass sämtliche männlichen Versuchstiere, nicht aber die weiblichen, unfruchtbar waren. Dies basiert auf einer testikulären Degeneration, die zur Fehlentwicklung der Leydig- und Sertolizellen und letztendlich zu funktionslosen Spermatozyten führt. Die Infertilität der männlichen Versuchstiere sowie die zusätzlich auftretende Blindheit, durch eine Degeneration der Photorezeptoren in der Retina, werden auf Störungen der Interaktion zwischen degenerierten Zellen und den sie umgebenden Stützzellen zurückgeführt (Bösl et al., 2001).

Es konnten ebenfalls keine spontanen Anfälle bei den Tieren beobachtet werden, die aufgrund des Einflusses von CIC-2 Kanälen auf die inhibitorische GABA-Antwort bei *Clcn2*^{-/-} erwartet wurden (Sík et al 2000; Smith et al. 1995; Staley et al. 1996). Auch in anderen Versuchen konnte keine phänotypische Übereinstimmung zwischen menschlicher Pathologie und Tierversuch gefunden werden (Labarca et al., 2001; Ross et al., 2000).

In anderen Versuchen wurden anderweitige zentrale Veränderungen aufgefunden. So kommt es durch das Ausschalten des CLCN2-Gens zur Leucoencephalopathie mit Bildung von ausgedehnten, flüssigkeitsgefüllten

Vakuolen in der weißen Substanz des Gehirns (Blanz et al., 2007), was in Zusammenhang mit der neue Studie von Depienne et al. (2013; siehe 1.4.2) auf eine entscheidende Rolle des CIC-2 Kanals für die Entstehung einer Leucoenzephalopathie bei Menschen hindeutet.

1.4.4 CIC-2 und Genetische Epilepsie

In zahlreichen Veröffentlichungen wurde ein Zusammenhang zwischen einer Vielzahl an Mutationen in Genen, die für spannungsgesteuerte oder ligandengesteuerte Ionenkanäle kodieren und bekannten Epilepsieformen gefunden (Gardiner & Lehesjoki 2000; Heron et al. 2007; Kullmann 2002; Mulley et al. 2003; Weber & Lerche, 2008). Die daraus resultierenden Kanalopathien von Na⁺-, K⁺- und Ca²⁺-Kanälen (Kullmann, 2002) oder GABA-Rezeptoren (Kananura et al., 2002) führen entweder durch „Gain-of-Function“ oder „Loss-of-Function“ zu einer der Epilepsie zugrundeliegenden erhöhten Exzitabilität des neuronalen Systems. Diese Epilepsieformen werden als idiopathische oder genetische Epilepsien bezeichnet.

Im Jahr 2000 fiel bei dem ambitionierten Versuch das menschliche Genom von 130 Familien, die von unterschiedlichsten Subtypen idiopathisch generalisierter Epilepsie (IGE) betroffen waren, auf einen gemeinsamen prädisponierenden Locus für IGE hin zu untersuchen auf, dass der detektierte IGE-Locus in der chromosomalen Region 3q26 der Region entspricht, in der auch das CLCN2-Gen für den CIC-2 Kanal lokalisiert ist (Protopopov et al. 1996; Sander et al. 2000). Daraufhin wurden mehrere unabhängige Familien mit unterschiedlichen IGE-Formen auf gemeinsame Mutationen im CLCN2-Gen hin untersucht, wobei fünf Mutationen gefunden wurden, die einen Zusammenhang zwischen IGE und CLCN2-Genmutationen nahe legten (D'Agostino et al., 2004; Saint-Martin et al., 2009). Jedoch wurden zwei dieser Mutationen kurz darauf auch bei Patienten ohne Epilepsie nachgewiesen (Blanz et al., 2007; Stogmann et al., 2006). Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass es in größer angelegten Studien mit größeren Patientengruppen nicht möglich war, Mutationen zu identifizieren

(Everett et al., 2007; Stogmann et al., 2006), führten dazu, dass die Bedeutung der ClC-2 Kanäle bei IGE in Frage gestellt wurde.

Um die begründete Vermutung der Beteiligung von CLCN2-Mutationen zu verstehen, sollte die Funktion und elektrophysiologische Bedeutung der ClC-2 Kanäle für die Zelle, auch im Zusammenspiel mit der Rolle der inhibitorischen GABA-Antwort auf das neuronale System, nochmals näher beleuchtet werden (Rinke et al. 2010). Die für einen Großteil der idiopathischen generalisierten Epilepsien grundlegende pathophysiologische Bedeutung des GABAergen Systems, welches die wichtigste synaptische Inhibition des adulten ZNS darstellt, konnte anhand von Tierexperimenten sowie pharmakologischen Untersuchungen mittels GABA-Agonisten und GABA-Antagonisten dargestellt werden (Treiman, 2001). Außerdem wurden in mehreren Familien mit CAE (*Absence Epilepsie in der Kindheit*), GEFS⁺ (*Generalisierte Epilepsie mit fiebrigen Anfällen plus*) und JME (*Juvenile myoklonische Epilepsie*), Mutationen in verschiedenen Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors identifiziert (Weber & Lerche, 2008). Ursächlich für die neuronale Übererregbarkeit ist eine gestörte synaptische Inhibition durch die ligandengesteuerten GABA-Kanäle. Physiologischerweise kommt es beim Erwachsenen durch Ausschüttung von GABA zur Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren und somit zu einem Cl⁻-Einstrom. Dieser hyperpolarisiert das Neuron, was dessen Erregbarkeit reduziert (Misgeld, Deisz, Dodt, & Lux, 1986). Diese Funktion ist jedoch an den intrazellulären Cl⁻-Gehalt gekoppelt. Ist der elektrochemische Gradient für Cl⁻ hoch und die intrazelluläre Cl⁻ Konzentration niedrig, kommt es zum erwähnten Cl⁻-Einstrom und der aus der Hyperpolarisation resultierenden inhibitorischen Antwort. Umgekehrt jedoch führt eine erhöhte intrazelluläre Cl⁻ Konzentration zum Cl⁻-Ausstrom und damit zu einer exzitatorischen Wirkung (Kaila et al. 1997; Staley et al. 1995). Auch in der embryonalen und frühen postnatalen Phase lässt sich diese exzitatorische Wirkung von GABA-Kanälen wegen des physiologisch erhöhten intrazellulären Chloridgehaltes beobachten. Jedoch kommt es während der Entwicklung, durch die ontogenetische Abnahme der intrazellulären Cl⁻-Konzentration, zu einer physiologischen Umstellung der exzitatorischen Wirkung auf eine inhibitorische (Miles, 1999). Ein Mechanismus

zur Aufrechterhaltung der gewünschten Cl^- -Konzentration stellt der aktive Transport mittels KCl oder $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ Kotransportern dar (Hübner et al. 2001; Miles 1999). In diesem Kontext könnten den ClC-2 Kanäle eine Bedeutung zukommen. Die unter Ruhebedingungen und bei Aktionspotentialen oder exzitatorischen postsynaptischen Potentialen geschlossenen Kanäle, werden bei Erhöhung der intrazellulären Cl^- -Konzentration aktiviert und vermitteln wegen der fehlenden zeit- oder spannungsabhängigen Inaktivierung, solange einen Cl^- -Ausstrom, bis der ursprüngliche elektrochemische Gradient wieder hergestellt ist (Rinke et al., 2010; Staley 1994). Somit stellen die ClC-2 Kanäle einen wichtigen Mechanismus zur Aufrechterhaltung einer niedrigen intrazellulären Cl^- -Konzentration dar. Außer in hippocampalen Neuronen konnte dies auch bei Neuronen mit sehr schnellen Feuerungsraten („*fast-spiking*“) an GABA_A -rezeptorvermittelten Synapsen gezeigt werden (Földy, Lee, Morgan, & Soltesz, 2010). Dies ist von besonderer Relevanz, da hier ein erhöhtes Risiko der intrazellulären Akkumulation von Cl^- -Ionen herrscht, was einen GABA -vermittelten Cl^- -Ausstrom und damit eine exzitatorische Antwort zur Folge hätte (Smith et al. 1995; Staley 1994). Interessanterweise stellte sich heraus, dass die ClC-2 Kanäle im neonatalen Gehirn zunächst in einer nicht-funktionellen Form vorliegen und ihre Expression in den Pyramidalzellen des Hippocampus zeitgleich mit der Umschaltung der GABA -Antwort hochreguliert wird (Clayton, Staley, Wilcox, Owens, & Smith, 1998; Miles, 1999; Mladinić, Becchetti, Didelon, Bradbury, & Cherubini, 1999). Beim Erwachsenen zeigt sich eine erhöhte Expression in eben diesen Zellen mit verstärkter inhibitorischer GABA -Aktivität, was als Hinweis gewertet wird, dass ihnen eine besondere Rolle in der Kontrolle neuronaler Erregbarkeit zukommt (Smith et al. 1995; Staley et al. 1996). Desweiteren wurde gezeigt, dass durch adenoviralen Transfer von ClC-2 Kanälen in Neurone des dorsalen Rückenmarkganglions eine Änderung der sonst depolarisierend-exzitatorischen GABA -Antwort in eine hyperpolarisierend-inhibitorische stattfindet (Staley et al. 1996). Diese Erkenntnis wird durch einen weiteren Versuch gestützt, bei dem ClC-2 Kanäle in Interneuronen ausgeschaltet wurden. Dadurch kam es wie erwartet zu einer erhöhten Erregbarkeit dieser Interneurone, was zu einer erhöhten Inhibition der

Hauptneurone führte. Dies wiederum resultiert in einer erniedrigten Exzitabilität des gesamten Netzwerkes (Rinke et al., 2010). Basierend auf diesen Ergebnissen, der Bedeutung der CIC-2 Kanäle für die Sicherstellung einer inhibitorischen GABA-Antwort, kann davon ausgegangen werden, dass ein Verlust von CIC-2 Kanälen zu einer neuronalen Übererregbarkeit führen kann. Damit erscheint eine Beteiligung an der Entstehung idiopathischer generalisierter Epilepsien möglich.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass, auch wenn diese Resultate eine Beteiligung der CLCN2-Mutationen an der Pathogenese von IGE, aufgrund der möglichen intrazellulären Cl⁻-Akkumulation und der daraus resultierenden neuronalen Hyperexzitabilität stütze, das inhomogene Auftreten der Mutationen innerhalb der betroffenen Gruppen und das gleichzeitig Auffinden in gesunden Individuen den Schluss nahe legen, dass eine CLCN2-Mutation alleine nicht ausreicht um Epilepsien zu verursachen. Jedoch ist im Zusammenspiel mit weiteren genetischen Faktoren eine pathogene Rolle der CIC-2 Kanäle möglich.

1.5 Ziel der Dissertation

Ziel meiner Arbeit war es, vier neue, für CIC-2 Kanäle entwickelte Antikörper in unterschiedlichen Expressionssystemen zu untersuchen, inklusive neuronalen Zellkulturen und Gehirnschnitten. Zur Prüfung der Antikörperspezifität wurden ebenfalls CIC-2 Knockout-Mäuse verwendet. In Folgeexperimenten sollten dann die Expressionsmuster der CIC-2 Kanäle sowie die Kolo-kalisation mit den GABA_A-Rezeptoren immunhistochemisch nachgewiesen werden. Daraus sollten neben der Prüfung der Antikörperspezifität Erkenntnisse über die neuronale Expression und pathophysiologische Bedeutung von CIC-2 Kanälen gewonnen werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Antikörper

Alle verwendeten Primärantikörper wurden 1-2 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Verwendete Verdünnungen werden im Text explizit genannt.

2.1.1 CIC-2 Antikörper

Bevor Primärantikörper entwickelt werden können, muss erst eine Analyse der infrage kommenden Epitope erfolgen. Die Epitop-Analyse des CIC-2 Proteins (in freundlicher Zusammenarbeit mit Pineda, Antikörper-Service, Berlin) ergab mehrere mögliche Bindungsstellen für die Entwicklung von CIC-2 Antikörpern, von denen zwei Gensequenzen ausgewählt wurden.

Seq 1a: CRIRLGGPEPWKGGSPSARATPELL

Seq 12: CWGPRSRHGLPREGTPSDSDDK

Beide Sequenzen kodieren einen intrazellulär liegenden Bereich der CIC-2 Kanäle. Außerdem sollten im Gegensatz zur Sequenz 1a, die mit Sequenz 12 entwickelten Antikörper auch den humanen CIC-2 Kanal binden.

Zur Herstellung polyklonaler Antikörper wurden daraufhin zwei Kaninchen (T1 = Tier 1; T2 = Tier 2) mit den entsprechenden Peptiden, welche mCIC2-1a und mCIC2-12 genannt wurden, immunisiert (Pineda Antibody- Service, Berlin, Germany). Zur besseren Übersichtlichkeit werden die polyklonalen Antikörper in der vorliegenden Arbeit zusätzlich fortlaufend durchnummeriert. Daraus ergibt sich folgende Nomenklatur der verwendeten Antikörper:

CIC2-1:	Rabbit T1 mCIC2-1a
CIC2-2:	Rabbit T2 mCIC2-1a
CIC2-3:	Rabbit T1 mCIC2-12
CIC2-4:	Rabbit T2 mCIC2-12

2.1.2 Weitere Primärantikörper

2.1.2.1 GABA-GFP

GABA-Kanäle sind Liganden-gesteuerte Ionenkanäle. Ihre in Vektoren codierten Untereinheiten wurden mit einem GFP (*green fluorescent protein*) versehen. Dieses kann durch einen, aus Kaninchen isolierten Antikörper spezifisch gebunden werden.

Rabbit anti GFP (Chemicon: AB3080)

2.1.2.2 MAP-2

Das Mikrotubuliassoziierte Protein 2, kurz MAP-2, ist ein Protein, welches die Stabilität von Mikrotubuli und deren Assoziation mit anderen Zellstrukturen beeinflusst. Es übernimmt damit eine wichtige Funktion in der Neurogenese. In der Immunhistochemie wird es bevorzugt als Dendritenmarker verwendet.

Anti-MAP-2 rabbit (Chemicon: AB 5622)

Anti-MAP-2 mouse (BD PharMingen: 556320)

2.1.2.3 Ankyrin G

Ankyrine sind Cytoskelett-Proteine, die über Interaktion mit integralen Membranproteinen, deren Verteilung innerhalb der Zellmembran beeinflussen. Ankyrin G (ANK-3) im Speziellen ist im Nervensystem vor allem an neuromuskulären Synapsen, den Ranvier'schen Schnürringen und dem axonalen Initialsegment (AIS) lokalisiert. Letzteres befindet sich direkt am Axonhügel und ist Ort der Entstehung von Aktionspotentialen. Ankyrin ist hier für die strukturelle Organisation zuständig.

Anti-Ankyrin G mouse (Calbiochem: NB20)

2.1.2.4 Gephyrin

Gephyrin ist ein Protein, welches Bestandteil des postsynaptischen Netzwerkes inhibitorischer Synapsen darstellt. Da es für den Transport von GABA_A-Rezeptoren hin zur inhibitorischen Synapse zuständig ist und danach auch weiterhin dort verweilt, ist eine positive Anfärbung von Gephyrin an Synapsen gleichbedeutend mit der Präsenz von Glyzin- oder GABA_A-Rezeptoren. Es stellt somit einen wichtigen Baustein im Nachweis einer Kollokalisierung zwischen CIC-2 und GABA_A-Rezeptoren dar.

Anti-Gephyrin mouse (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Joachim Kirsch; Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Heidelberg)

2.1.2.5 DAPI

Das blau fluoreszierende DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) ist ein Fluoreszenzfarbstoff zur Anfärbung von Zellkernen. Da es imstande ist auch intakte Zellmembranen zu durchdringen, ist eine zusätzliche Permeabilisierung nicht notwendig. In Verbindung mit doppelsträngiger DNA besitzt es ein Emissionsmaximum bei 461 nm, wodurch ein zusätzlicher Sekundärantikörper nicht notwendig ist. Somit kann DAPI sehr gut mit den unten aufgeführten Sekundärantikörpern kombiniert werden. Aufgrund der positiven Eigenschaften von DAPI muss lediglich eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert werden.

DAPI (Vector)

2.1.3 Sekundärantikörper

Sämtliche Sekundärantikörper wurden von der Firma Molecular Probes (Invitrogen, USA) bezogen. Sie wurden bei allen Färbungen im Verhältnis 1:500 verdünnt. Die Inkubationszeit betrug immer eine Stunde bei Raumtemperatur. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluoreszenzfarbstoffe wurde auf eine strikte Verdunkelung geachtet.

Die Wahl des Sekundärantikörpers ist abhängig von der gewünschten Farbe des emittierten Lichts und dem Tier, aus dem der Primärantikörper isoliert wurde.

1. Grün (488nm):

Alexa Fluor 488 donkey anti goat (Molecular Probes: A 110055)

Alexa Fluor 488 goat anti rabbit (Molecular Probes: A 11008)

Alexa Fluor 488 goat anti mouse (Molecular Probes: A 11001)

2. Rot (568nm):

Alexa Fluor 568 goat anti mouse (Molecular Probes: A 11004)

Alexa Fluor 568 goat anti rabbit (Molecular Probes: A 11011)

2.2 Vektoren

Zur Transfektion wurden folgende Vektoren verwendet:

a) pCI neo: eukaryotischer Expressionsvektor zur Expression in Säugerzellen (Promega, Mannheim).

rCIC-2 WT: Untereinheit des CIC-2 Kanals der Ratte (das Plasmid wurde freundlicherweise von J. E. Melvin zur Verfügung gestellt)

b) pBK/RSV: dualer Expressionsvektor zur Expression sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Zellen (Invitrogen, Karlsruhe)

hCIC-2: Untereinheit des humanen CIC-2 Kanals (das Plasmid wurde freundlicherweise von G. R. Cutting zur Verfügung gestellt)

c) pcDNA 3.1: eukaryotischer Expressionsvektor zur Expression in Säugerzellen (Invitrogen, Karlsruhe)

GABA_A-Konstrukte:

A2.9 h α_1 -Untereinheit WT GABRA1-pcDNA 3.1

B2.9 h β_2 -Untereinheit WT GABRB2-pcDNA 3.1

C2.9 h γ_2 -Untereinheit WT GABRG2-pcDNA 3.1

GA 7 m γ_2 -GFP GABRA1-EGFP-pcDNA 3.1

2.3 Zellkulturen

2.3.1 HEK-Zellen

2.3.1.1 Zelllinie

Als eukaryotische Trägerzellen zur Transfektion von Fremd-DNA wurde auf Zellen aus HEK293-Zelllinien (humane embryonale Nierenzellen, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) zurückgegriffen. Sie wurden zur Expression der zu untersuchenden Kanäle transfiziert (siehe 2.3.1.3) und daraufhin gefärbt (siehe 2.6.1).

2.3.1.2 Zellkultur

Alle Zellen wurden mittels Flask (Zellkulturkontainer, Falcon, Heidelberg) in einem Begasungsbrutschrank (Typ Heracell, Heraeus, Hanau) in wassergesättigter Luft bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Als Kulturmedium diente DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), welches mit 4,5g/l Glukose versetzt wurde. Außerdem wurden noch 10% hitzeinaktiviertes fetales Rinderserum (10% FBS) zugesetzt. Wenn der Zellrasen zu etwa 90% konfluent war, wurden die Zelle gesplittet und in neue Flask umgesetzt. Dazu wurden die Zellen nach dem Verwerfen des alten Mediums und kurzzeitigem waschen mit DPBS^{-/-} (-CaCl₂/-MgCl₂), mit Trypsin-EDTA vom Boden gelöst. Trypsin löst dabei die Zellverbände auf, ohne dabei die einzelnen Zellen zu zerstören. Durch mikroskopieren wurde die optimale Einwirkzeit kontrolliert. Nach der Inaktivierung des Trypsins mittels des angesetzten Mediums und der Auftrennung der Zellverbände durch auf und ab pipettieren, wurden die Zellen entweder auf neue Flask oder zur Transfektion auf Transfektionsschalen mit neuem Medium verteilt. Die geeignete Zellzahl von etwa 0,5 Mio Zellen wurde mittels Thoma-Zählkammer bestimmt. Alle Schritte fanden unter sterilen Bedingungen innerhalb einer Bench (Zellkulturwerkbank; Typ HeraSafe, Heraeus, Hanau) statt.

2.3.1.3 Transfektion

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in lebende eukaryotische Zellen, unter Zuhilfenahme eines Vektors. Diese exprimieren anschließend die codierten Proteine. Hierfür wurde in der vorliegenden Arbeit die Technik der Magnettransfektion, oder auch Magnetofection (Plank et al., 2003), verwendet. Die verwendeten Vektoren sind in Kapitel 2.2 aufgeführt.

Für die Magnettransfektion benötigt man 3µg der zu exprimierenden DNA. Sollten mehrere Plasmide vorhanden sein, müssen diese im Voraus im richtigen Verhältnis zueinander gemischt werden. Daraufhin muss das Gesamtvolumen auf 100µl ergänzt werden. Hierfür wird das Transfektionsmedium „Optimem“ verwendet. Im Weiteren wird die Transfektionslösung „PolyMag“, welche vor Gebrauch wegen Fällung gevortext werden muss, im Verhältnis 1:1 zur DNA-Masse hinzugefügt. Es folgt eine 30-minütige Inkubationszeit. Ebenfalls in den Inkubator kommt die desinfizierte Magnetplatte. Das hergestellte Gemisch wird dann auf die in einer Transfektionsschale befindlichen Zellen pipettiert. Nach einer weiteren 15-minütigen Inkubationszeit, diesmal mit der Transfektionsschale auf der Magnetplatte, wird die Platte entfernt und die Zellen verbleiben noch weitere 24-48 Stunden im Inkubator.

Am Folgetag werden die transfizierten Zellen wie in Kapitel 2.3.1.2 beschrieben, durch Trypsin-EDTA gelöst und auf Coverslips in 24-Well-Zellkulturplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) überführt. Hierfür werden in jedes Well, eine sog. Vertiefung in der Platte, Glasplättchen mit einem Durchmesser von 13mm hineingelegt. Die Glasplättchen wurden zuvor zweimal mit ca. 20ml vergälltem 99,9% Ethanol und anschließend einmalig mit 20ml Bidest in einem Erlenmeyer-Kolben gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Plättchen ausgebacken. Das Vorlegen eines Glasplättchens in ein Well erfolgte steril mit einer Pinzette unter dem Abzug der Zellkulturwerkbank (Typ HeraSafe, Heraeus, Hanau). Nach der Vorbehandlung mit Poly-L-Lysin und einer Stunde Inkubation, wird anschließend mit Wasser ausgewaschen und zuletzt die transfizierten Zellen überführt. Nach etwa 48 Stunden können die transfizierten Zellen gefärbt werden.

2.3.2 SH-Zellen

2.3.2.1 Zelllinie

Die SH-Zellen, genauer die SH-SY5Y Zelllinie ist eine vom Menschen abgeleitete Zelllinie. Die ursprüngliche Zelllinie SK-N-SH stammt aus einem Neuroblastom einer vierjährigen und wurde durch mehrfaches Klonen immer weiter für wissenschaftliche Zwecke optimiert. So konnten die für die Wissenschaft wünschenswerten Eigenschaften der Neuroblastomzellen, wie die hohen Replikationsrate und kurze Verdopplungszeit, beibehalten werden.

2.3.2.2 Zellkultur

Die SH-Zellkulturen werden analog zu den HEK-Zellkulturen gehandhabt (siehe 2.3.1.2). Jedoch wird als SH-Kulturmedium DMEM + 4,5% Glukose + 15% FKS verwendet.

2.3.3 Neuronale Zellkultur

2.3.3.1 Zelllinie

Für die neuronale Kultur wurden Pyramidenzellen verwendet, welche durch die Präparation embryonaler Hippocampi transgener Mäuse gewonnen wurden. Die anschließende Genotypisierung aus den eingefrorenen Schwänzchen lieferte die benötigte Information über die Art der CIC-2 Expression, der hierfür gezüchteten transgenen Mäusen.

2.3.3.2 CIC-2 Knockout-Mäuse

Bei den Mäusen handelt es sich um die sehr häufig in der Forschung verwendeten BALB/C-Maus. Sie ist ein im Labor gezüchteter Albino-Stamm der Hausmaus (*Mus musculus*), von der einige Substämme abgeleitet wurden. Sie gelten heute als die am häufigsten in der Forschung verwendeten Tieren. Die verwendete CIC-2 Knockout-Maus, CICn2^{-/-}-Stamm, wurde von J. E. Melvin gezüchtet und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Nehrke et al., 2002).

2.3.3.3 Haltung und Fütterung

Die Haltung und Fütterung der Mäuse erfolgte im Hertie-Institut für klinische Hirnforschung Tübingen, artgerecht gemäß den Tierschutz-Richtlinien der Universität Tübingen und dem deutschen Tierschutz-Gesetz.

2.3.3.4 Hippocampuspräparation zur Gewinnung neuronaler Kulturen

Präparation der Föten aus dem Uterus

Für die Präparation musste zunächst die trächtige Maus mit CO₂ eingeschlüpfert werden. Nach dem Desinfizieren mit 70% Ethanol wurde mit einer chirurgischen Pinzette und einer Schere der Bauch median von der Symphyse bis zum *Processus xyphoideus* eröffnet. Mit einer anatomischen Pinzette und einer kleineren Schere, wurde das Peritoneum eröffnet und der Uterus entnommen. Er wurde in eine sterile Gewebekulturschale gelegt und die darin enthaltenen Föten explantiert. Durchschnittlich zeigte eine gravide Maus 8 Föten. Die Wildtyp- [+/+], heterogenen [+/-] und Knockout- [-/-] Föten waren makroskopisch nicht voneinander unterscheidbar.

Präparation des Hippocampus der Mäuseföten

Nach der Decapitation und Entfernung der Schädelkalotte wurde das Gehirn aus dem Schädel herausgelöst und in eine beschriftete Gewebekulturschale mit 4°C kaltem HBSS eingebracht. Gleichzeitig wurde die zum Embryo gehörende Schwanzspitze mit einem Scherenschlag abgetrennt und in einem entsprechend beschrifteten Eppendorfgefäß zur späteren Genotypisierung des Embryos eingefroren.

Mit einer feinen Pinzette wurden die weichen Meningen entfernt. Zunächst wurde der *Bulbus olfactorius* vorsichtig abpräpariert, darauffolgend die beiden Hemisphären vorsichtig vom *Corpus callosum* ausgehend vom restlichen Gehirn entfernt. Das Abtrennen der Hemisphären ermöglicht die Sicht auf den Hippocampus, der sich in den abgetrennten Hemisphären als dunkles Band im Hirngewebe darstellt (Abb. 6). Dieser wird vorsichtig mit einer gebogenen, scharfen Pinzette an einem Stück herausgetrennt. Bis zur Aufarbeitung in der Zellkultur wird er auf Eis in 1ml kalter HBSS Lösung gelagert.

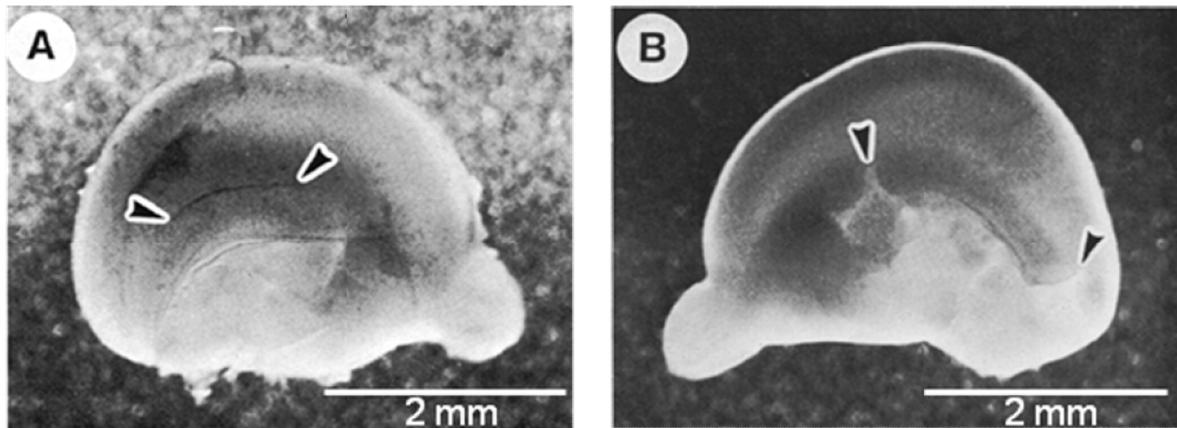


Abbildung 6: Lokalisation des embryonalen Hippocampus (Peacock, Rush, & Mathers, 1979) Die mediale Oberfläche der linken und rechten Hemisphäre eines Mäusefötus. **A** Bei vorhandenen Meningen zeigen typische Blutgefäße die Lage der hippocampalen Fissur (Pfeile) **B** Nach Entfernung der Meningen zeigt sich der Hippocampus als dunkles Band im Hirngewebe.

2.3.3.5 Zellkultur

Vorbereitung der Kulturgefäße

Als Kulturgefäße wurden 24-Well-Zellkulturplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) verwendet, die bereits steril geliefert werden. Analog zu Kapitel 2.3.1.3 wurde unter dem Abzug der Zellkulturwerkbank (Typ HeraSafe, Heraeus, Hanau) in jedes Well ein vorbehandeltes Coverslip vorgelegt. Als Beschichtung wurde pro Well 500µl Poly-L-Lysin (steril filtriert) aufgebracht und im Zellkultur-Inkubator für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Poly-L-Lysin wieder entfernt. Das Waschen der Wells erfolgte dreimalig mit autoklaviertem Bdest. Um die Beschichtung feucht zu halten, wurden 500µl HBSS (Invitrogen™, Karlsruhe, Germany) aufgebracht. Bis zu ihrer Verwendung am nächsten Tag blieben die Platten im Inkubator der Zellkultur bei 37°C.

Ansetzen der Zellkultur

Um unerwünschte Gewebereste zu entfernen, wurde das präparierte Hippocampusgewebe dreimalig mit 10ml angewärmtem HBSS vorsichtig gewaschen. Nachdem die Gewebestücke beim letzten Waschgang auf den Boden des 50ml Zentrifugenröhrchen gesunken waren, wurde der Überstand bis auf ein Restvolumen von 1,8ml abgenommen. Zu den nun gewaschenen

Gewebestücken wurden 200µl Trypsinlösung (2,5%ige Trypsin + 1.8ml HBSS) zugegeben und bei 37°C für 20 Minuten inkubiert. Trypsin löst die Zellverbände auf, ohne dabei die einzelnen Zellen zu zerstören. Anschließend wurde fünfmal mit HBSS gewaschen, indem ca. 8ml zugesetzt und wieder vorsichtig abgenommen wurden. Beim letzten Waschgang wurde das HBSS bis auf 1,6ml abgenommen und 400µl DNase-Lösung (400µl DNase + 1.6ml HBSS) zugesetzt (Endkonzentration 0,001%). DNase zerstört freigeordnete DNA aus den Zellen. Durch langsames Auf- und Abziehen lösen sich die Zellverbände ganz auf. Dies wurde solange wiederholt bis keine Zellverbände mehr erkennbar waren. Die entstandene Zellsuspension wurde abfiltriert und mit 2ml DMEM⁺ nachgespült. 10µl der Zellsuspension wurden zur Bestimmung der mittleren Zellzahl/ml in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Es wurden 16 Kleinquadrate ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter erhält man durch Division der Summe durch 4 und anschließender Multiplikation mit 10000. Anschließend wurde die Zellsuspension zum Aussäen mit DMEM verdünnt. Angestrebt wurden 70000-80000 Zellen für die Transfektion und 10000-20000 Zellen für die Immunhistofärbung.

Das HBSS in den Wells der vorbereiteten Kulturschalen wurde durch 500µl erwärmtem (37°C) DMEM⁺ pro Well ersetzt und die Neurone in der gewünschten Zellzahl aufgebracht. Die 24-Well-Zellkulturplatten wurden im Begasungsbrutschrank (Typ Heracell, Heraeus, Hanau) in wassergesättigter Luft bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Pflegen der neuronalen Kulturen

Nach ca. 24 Stunden findet ein Medienwechsel statt. Die aufgebrauchten Zellen haben sich nach dieser Zeit auf den beschichteten Glasplättchen angeheftet, die beschädigten Zellen sind sedimentiert und die ersten Abbauprodukte der neuronalen Kultur sind in das Medium abgegeben worden. Die DMEM⁺-Lösung wurde entnommen und durch 600µl angewärmte Neurobasal⁺-Lösung ersetzt. Anschließend wurde die Kultur wieder in den Inkubator bei gleichen Bedingungen zurückgestellt. Das Neurobasalmedium wurde nie ganz ausgetauscht, sondern den Zellen immer wieder etwas frisches Medium

hinzugegeben; das erste Mal, meist erst nach 2 Wochen. Dabei diente die Farbe des Mediums neben der Mikroskopie als geeigneter Indikator zur Abschätzung der Kulturqualität und möglicher Kontaminationen.

2.4 Genotypisierung

2.4.1 DNA Isolation

Zur Genotypisierung der Knockout-Mäuseföten wurden bei der Präparation der Hippokampi die dazugehörigen Fötusschwänze entsprechend beschriftet und eingefroren (siehe 2.3.3.4). Zu den Eppendorfgefäßen mit den aufgetauten Mäuseschwänzen wurden 500µl des Lysispuffers und 10µl Proteinase K gegeben und über Nacht bei 55°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 12000 rpm. Der Überstand wurde in ein weiteres Eppendorfgefäß überführt und 350µl 100%iges Isopropanol dazugegeben. Durch vorsichtiges Kippen erfolgte die Vermischung, sodass die DNA ausfiel. Nach 15min Zentrifugation bei 12000 rpm wurde das entstandene Pellet mit 350µl 70% Ethanol gewaschen. Nach weiteren 5min Zentrifugation bei 12000 rpm wurde das Pellet luftgetrocknet und anschließend in 50µl destilliertem Wasser gelöst.

2.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Genotypisierung wurde 1µl der gelösten DNA zum PCR-Ansatz vervollständigt (siehe unten) und die Reaktion in einer PCR-Maschine (T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen, Germany) durchgeführt. Die benötigten Primer wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Germany) zur Verfügung gestellt. Nach einem 3-minütigen Denaturierungsschritt bei 94°C, folgten 35 Zyklen mit 30s Denaturierung bei 94°C, 30s Primerannealing bei 60°C und 30s Extension bei 72°C. Nach Ablauf der Zyklen erfolgte ein Extensionsschritt für 3 min bei 72°C. Für die Größenauffrennung der DNA-Fragmente wurde die Agarosegelelektrophorese verwendet.

PCR-Ansatz

- 1 µl gelöste DNA
- 2 µl Primer 1/2/3 (10 pmol)
- 1,5 µl MgCl
- 1,5 µl 10xPuffer
- 0,5 µl dNTP's (100mM)
- 0,2 µl Tap Polymerase
- 14,3 µl dest. H₂O

2.4.3 Agarosegelelektrophorese von DNA

Mit der Agarosegelelektrophorese erfolgte das Auftrennen der DNA-Fragmente nach ihrer Anzahl an Basenpaaren. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose (2 %) in TBE Puffer kurz in der Mikrowelle aufgeköcht. Um die DNA Banden nach Durchführung der Elektrophorese im UV Licht sichtbar machen zu können, fügten wir nach Abkühlen des Gels auf 60°C 0,1 µg/ml Ethidiumbromid hinzu. Anschließend wurde das Gel in eine horizontale Kammer (Peglab, Erlangen, Deutschland) gegossen. Ein Kamm hielt dabei die zum Laden der DNA benötigten Taschen frei und wurde nach Aushärten des Gels vorsichtig entfernt. Um sicherzustellen, dass die DNA beim Laden in die Geltaschen einsinkt, wurde jede Probe mit 1/5 des Gesamtvolumens Ladepuffer vermischt. Die Größe der DNA-Fragmente konnte anhand eines zeitgleich mit den Proben aufgetragenen kb Markers abgeschätzt werden. Die angelegte Spannung lag zwischen 100-140 mV. Das zu Beginn beigemischte Ethidiumbromid interkalierte bei der Wanderung der Fragmente durch das Gel in die DNA und ermöglichte somit eine Sichtbarmachung sowie Fotodokumentation (Transluminator ImageMaster VDS, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) der DNA-Banden im UV-Licht.

2.5 Kryoschnitte

Zunächst wurden die Mäuse an unterschiedlichen postnatalen Tagen (P1, P3, P5, P8, P10, P15, P20, P30 und P40) durch CO₂-Inhalation betäubt. Sie wurden auf dem Rücken liegend fixiert und mit 70% Ethanol desinfiziert.

Nach der Präparation der Kopfschwarte und Entfernung der Schädelkalotte wurde das Gehirn mittels eines scharfen Löffels aus dem Schädel herausgelöst und umgehend in Flüssigstickstoff eingefroren und zum Schneiden bei -80°C gelagert.

Die 5µm dicken Schnitte wurden fortlaufend in einem Kryostat geschnitten und auf Superfrost Objektträger (Menzel GmbH, Germany) aufgetragen. Die frischen Schnitte mussten über Nacht bei Raumtemperatur trocknen und wurden danach wieder eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.6 Immunofluoreszenz (IF)

Die Immunofluoreszenz ist ein Verfahren der Immunhistochemie zum Antikörper-Antigen-Komplex-vermittelten Nachweis von Proteinen und anderen Zellbestandteilen in Zellen und in Geweben. Der Primärantikörper, der gegen das zu detektierende Antigen gerichtet ist, sollte dabei eine möglichst hohe Spezifität und Affinität besitzen, um mögliche Kreuzreaktionen mit ähnlichen Antigenen zu vermeiden. Zur Erreichung einer möglichst hohen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse dieser, durch viele Einflussfaktoren sehr sensiblen Nachweismethode, ist eine standardisierte Durchführung unabdingbar. Im Gegensatz zur sogenannten direkten Immunfluoreszenz, bei der nur ein Antikörper, also der Primärantikörper benötigt wird, braucht man bei der indirekten Immunfluoreszenz zusätzlich einen Sekundärantikörper. Der antigen-spezifische Primärantikörper bindet an das präsentierte Antigen, woraufhin der Sekundärantikörper, dem ein fluoreszierender Farbstoff angeheftet wurde, spezifisch an den Primären bindet. (Abb. 7)

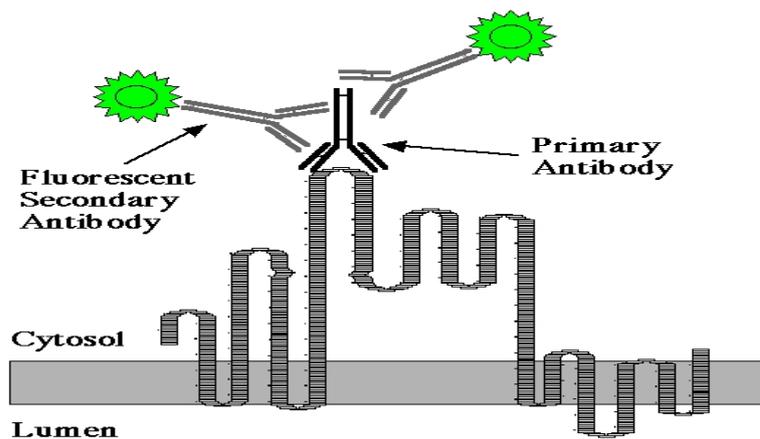


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Antikörper-Antigen-vermittelten Fluoreszenzfärbung. Spezifischer Primärantikörper bindet direkt an das präsentierte Antigen und wird seinerseits spezifisch von einem oder mehreren Sekundärantikörpern gebunden. Der angeheftete fluoreszierende Farbstoff wurde in grün dargestellt. (Quelle: <http://www.bio.davidson.edu>)

2.6.1 IF an Zellen

Zunächst wurden HEK-Zellen transfiziert und anschließend angefärbt. Später folgten sowohl SH-Zellen als auch Neurone. Die Zellen in den 24-Well-Zellkulturplatten werden zu Beginn zweimal mit 500µl kaltem PBS⁺⁺ (+CaCl₂/+MgCl₂) für fünf Minuten vorsichtig gewaschen. Danach werden die Zellen bei Raumtemperatur, 15 Minuten lang, mit je 500µl/Well 4%PFA+15% Saccharose fixiert und erneut dreimal mit PBS^{+/+} gewaschen. Daraufhin werden die Zellen mit 500µl 3%Ziegerserum (NGS) in PBS + 0,2% Triton geblockt und erneute mit PBS gewaschen.

Primärantikörper: Verdünnen der Primärantikörper in der jeweiligen gewünschten Konzentration in PBS + 0,2% Triton +1% NGS. Benötigt werden 150µl/Well.

CIC2-1/-2/-3/-4:	1:1000
MAP2:	1:300
GABA(α ₁ /β ₂ /γ ₂)-GFP:	1:200
Gephyrin:	1:500 (1:250 bei SH-Zellen)
AnkyrinG:	1:100

Inkubiert wird 1-2 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht. Es wird anschließend erneut mit PBS gewaschen.

Sekundärantikörper: Alle Folgeschritte müssen aufgrund des Fluoreszenzfarbstoffes abgedunkelt durchgeführt werden.

Der Sekundärantikörper, der immer gegen das Tier gerichtet ist, aus dem der Primärantikörper isoliert wurde, wird immer im Verhältnis 1:500 in PBS + 0,2% Triton +1% NGS verdünnt. Benötigt werden wieder 150µl/Well. Es folgt eine erneute einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Weiterhin ist auf eine durchgängige Verdunklung zu achten.

Sowohl vor dem Einfärben der Zellkerne mit 500µl/Well DAPI (Verdünnung 1:20000 in PBS⁻) als auch danach, wird erneut mehrmalig mit PBS gewaschen und die Wells zum Schluss mit destilliertem Wasser bedeckt. Unter Zuhilfenahme von Prolong Antifade (Invitrogen) werden die Deckgläser nach dem Entnehmen aus den Wells auf den Objektträgern fixiert.

Direkt im Anschluss kann Mikroskopiert werden. Die Färbung bleicht nach etwa 2 Wochen aus.

Für Färbungen, bei denen die Permeabilisierung der Zellmembran nicht erwünscht ist, kann in den entsprechenden Schritten auf die Zugabe von Triton verzichtet werden.

2.6.2 IF an Schnitten

Die eingefrorenen Kryoschnitte werden nach 30-minütigem Aufwärmen unter dem Abzug für 10 Minuten mit 100% Aceton (-20°C, frisch) bei -20°C fixiert und anschließend wieder unter dem Abzug für 30 Minuten getrocknet. Es folgt das umrunden mit PAP PEN (Sigma-Aldrich) und erneutes 15-minütiges Trocknen unter dem Abzug. Nach mehrmaligem Waschen mit 0,05M TBS werden die Schnitte eine Stunde bei Raumtemperatur mit 3%Ziegen Serum (NGS) in TBS + 0,3%Triton geblockt und anschließend erneut mehrmals mit TBS gewaschen.

Primärantikörper: Verdünnen der Primärantikörper in der jeweiligen gewünschten Konzentration in TBS + 0,3% Triton + 1% NGS. Benötigt werden 500µl/Schnitt.

CIC2-1/-2/-3/-4: 1:500

Gephyrin: 1:200

AnkyrinG: 1:100

Inkubiert wird bei 4°C über Nacht. Am Folgetag wird erneut mit 0,05M TBS gewaschen.

Sekundärantikörper: Alle Folgeschritte müssen aufgrund des Fluoreszenzfarbstoffes abgedunkelt durchgeführt werden.

Der Sekundärantikörper, der immer gegen das Tier gerichtet ist, aus dem der Primärantikörper isoliert wurde, wird immer im Verhältnis 1:500 in TBS + 0,3% Triton +1% NGS verdünnt. Benötigt werden wieder 500µl/Schnitt. Es folgt eine erneute einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Weiterhin ist auf eine durchgängige Verdunklung zu achten.

Sowohl vor dem Einfärben der Zellkerne mit 500µl/Schnitt DAPI (Verdünnung 1:10000 in TBS⁻) als auch danach wird erneut mehrmals mit TBS gewaschen und die Schnitte zum Schluss mit destilliertem Wasser abgespült. Anschließend lässt man die Schnitte trocknen, bevor sie mit Vectashield Mounting Medium (Vektor) eingedeckt werden.

2.7 Immunofluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie. Physikalische Grundlage ihrer Wirkungsweise ist der Effekt der Fluoreszenz. Dabei werden fluoreszierende Stoffe, Fluorochrome, mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, wodurch diese wenige Nanosekunden später aufgrund des sogenannten „*Stokes shift*“ in der Regel langwelliges Licht emittieren. Spezielle Filter für bestimmte Wellenlängen stellen dabei sicher, dass nur das emittierte Licht beobachtet wird.

Bei den Fluoreszenzmikroskopen, die den Auflichtmikroskopen angehören, wird das Objekt, anders als bei herkömmlichen Durchlichtmikroskopen, nicht durchstrahlt, sondern beleuchtet. Als Lichtquellen werden in der Regel Quecksilberdampflampen oder Laser eingesetzt. Aus dem von der Xenon- oder Quecksilberdampflampe emittierten Licht wird durch einen Anregungsfilter die für das entsprechende Fluorochrom geeignete Wellenlänge herausgefiltert. Dieses wird über einen dichroischen Spiegel durch das Objektiv auf das Objekt umgeleitet, welches zu fluoreszieren beginnt. Das reflektierte Licht wird nun erneut im Objektiv gesammelt. Der darüber liegende dichroische Spiegel übernimmt nun die Funktion eines Farbteilers. Licht mit einer kleineren Wellenlänge als der sogenannten kritischen Wellenlänge wird reflektiert, Licht mit einer größeren jedoch durchgelassen. Das emittierte, langwelligere Licht des Fluorochrom gelangt somit alleine durch das Okular ins Auge, beziehungsweise auf eine Fotokamera.

In unseren Versuchen wurden das Fluoreszenzmikroskop, die Kamera (AxioCam MRm), sowie die Software (AxioVision) der Firma Carl Zeiss verwendet.

2.8 Lösungen und Medien

Alle für die Zellkultur verwendeten Medien und Substanzen wurden, sofern im Text nicht anders erwähnt, bei der Firma Gibco, Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Sämtliche Kulturmedien und Lösungen wurden vor ihrer Verwendung mit einem 0,22 µm Sterilfilter (Millipore, Bedford, MA, USA) filtriert.

<u>DNA Ladepuffer:</u>	30% (v/v) Saccharose, 50 mM EDTA, 0,25% Bromphenolblau, 0.1% SDS
<u>DMEM:</u>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium Invitrogen™, Karlsruhe, Germany
<u>DMEM⁺:</u>	5 ml fetales Kälberserum 500µl Glutamin 500µl Penicillin / Streptomycin auf 50 ml mit DMEM (Invitrogen™, Karlsruhe, Germany)
<u>DPBS (+ CaCl₂/MgCl₂):</u>	Invitrogen™, Karlsruhe, Germany
<u>DPBS (- CaCl₂/MgCl₂):</u>	Invitrogen™, Karlsruhe, Germany
<u>HAM's F-12:</u>	Biochrom AG, Berlin, Germany (w/o Glutamin)
<u>HBSS (- Ca²⁺/Mg²⁺):</u>	Hank's balanced salt solution, (Invitrogen™, Karlsruhe, Germany)
<u>Kulturmedium (HEK):</u>	DMEM + 4,5g/l Glukose + 10% FBS (hitzeakt. Fötales Rinderserum)
<u>Kulturmedium (SH):</u>	DMEM + 4,5g/l Glukose + 10% FKS (hitzeakt. Fötales Rinderserum)
<u>Lysispuffer:</u>	5 ml 1 M Tris-HCL (pH 7,5) 10 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 2 ml 5 M NaCl 0,5 ml 1 M DDT 50 µl 1 M Spermidin 20 ml 10% SDS 62,45 ml H ₂ O
<u>Neurobasal⁺:</u>	1 ml Vitamin B27 250 µl Glutamin

	500 µl	Penicillin/Streptomycin
	auf 50 ml	mit Neurobasal (w/o Glutamine)
		(Invitrogen™)
<u>Optimem:</u>		Invitrogen™, Karlsruhe, Germany
<u>PBS⁺⁺(+CaCl₂/MgCl₂):</u>		Phosphate-buffered saline (Invitrogen™, Karlsruhe, Germany)
<u>PolyMag:</u>		Transfektionslösung (OZ Bioscience)
<u>RTG Stock-Lösung:</u>	1 mmol	Retigabin (RTG)
	10 µl	Dimethylsulfid (DMSO)
<u>500 µM RTG Lösung:</u>	5 µl	RTG Stock-Lösung
	auf 2 ml	mit HAM's F-12
		Die DMSO Konzentration lag bei 2,5%.
<u>TBE:</u>	5 mM	Tris-Borsäure, 1mM EDTA, pH 8.0
<u>Trypsin Lösung:</u>		Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%, in PBS, w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺)
		Biochrom AG, Berlin, Germany

2.9 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle Chemikalien entsprachen der Güteklasse „*pro analysi*“ und wurden, wenn im Text nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma (Steinheim), Merck (Darmstadt) oder Fluka (Seelze) bezogen.

3 ERGEBNISSE

Die Aufgabe in dieser Dissertation bestand zunächst darin, aus den vier zur Verfügung stehenden Anti-CIC2 Antikörpern, diejenigen mit der höchsten Spezifität auszusuchen. Diese Antikörper wurden zuerst in transfizierten HEK-Zellen und anschließend sowohl in humanen Glioblastomzellen (SH-Zellen) als auch in primären hippocampalen Neuronen und Kryoschnitten getestet. Zur Überprüfung der Spezifität wurden außerdem noch Kulturen sowie Kryoschnitte transgener Mäuse hergestellt und weitergehend untersucht.

Bei allen dargestellten Abbildungen handelt es sich um repräsentative Färbungen der jeweiligen Versuchsreihen.

3.1 CIC-2 Antikörpertestung an transfizierten HEK-Zellen mit WT CIC-2

In unserer ersten Versuchsreihe sollten aus den vier zur Verfügung stehenden Anti-CIC2 Antikörpern die ausgesucht werden, die in transfizierten HEK-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) die höchste Spezifität aufweisen. Hierfür wurden den angelegten HEK-Zellen mittels Magnettransfektion Vektoren eingebracht, die für Wildtyp (WT) CIC-2 Kanäle kodieren (siehe 2.3.1.3). Die mit WT CIC-2 transfizierten Zellen wurden anschließend mit Anti-CIC2 Antikörpern gefärbt und mit der jeweiligen Kontrollgruppe verglichen (Abb. 8). Als Kontrollgruppe dienten nicht-transfizierte (N.T.) HEK-Zellen, die nach gleichem Protokoll gefärbt wurden.

Bei der Betrachtung von Abbildung 8 fällt der deutliche Unterschied zwischen der Färbung transfizierter HEK-Zellen und der Kontrollgruppe, den nicht-transfizierten (N.T.) Zellen auf. In allen CIC-2 Färbungen ist eine deutliche zytoplasmatische Fluoreszenzfärbung zu erkennen, die für den Anti-CIC2-3 Antikörper vergleichsweise schwach ausfällt. Dem gegenüber stehen die Kontrollfärbungen, in denen eine detaillierte und deutlich ausdifferenzierte Anfärbung, wie in den transfizierten Zellen, nicht zu beobachten ist. Punktuelle

Intensivierungen der Färbung sind weder im Zytoplasma noch an der Zellmembran zu beobachten. Demgegenüber sieht man für Anti-CIC2-1 Antikörper, dass sich das gesamte Zytoplasma intensiv rot anfärben lässt. Dabei weist die Färbung keine homogene, sondern eine körnige Struktur auf. Verglichen damit ist die Färbung für Anti-CIC2-4 ebenfalls intensiv hellrot. Sie präsentiert sich bei diesem Antikörper sehr konzentriert. Die punktuelle, teils konfluierende Färbung zeigt sich kernnah und nicht Zellmembran-assoziiert.

Da die Rotfärbung für Anti-CIC2-2 kernnah, aber weniger intensiv sowie weniger scharf ausdifferenziert und in Anti-CIC2-3 eher schwach und wolkig im Zytoplasma erscheint, haben wir uns entschieden, die darauffolgenden Versuchsanordnungen lediglich mit den Anti-CIC2 Antikörpern Anti-CIC2-1 und Anti-CIC2-4 fortzusetzen.

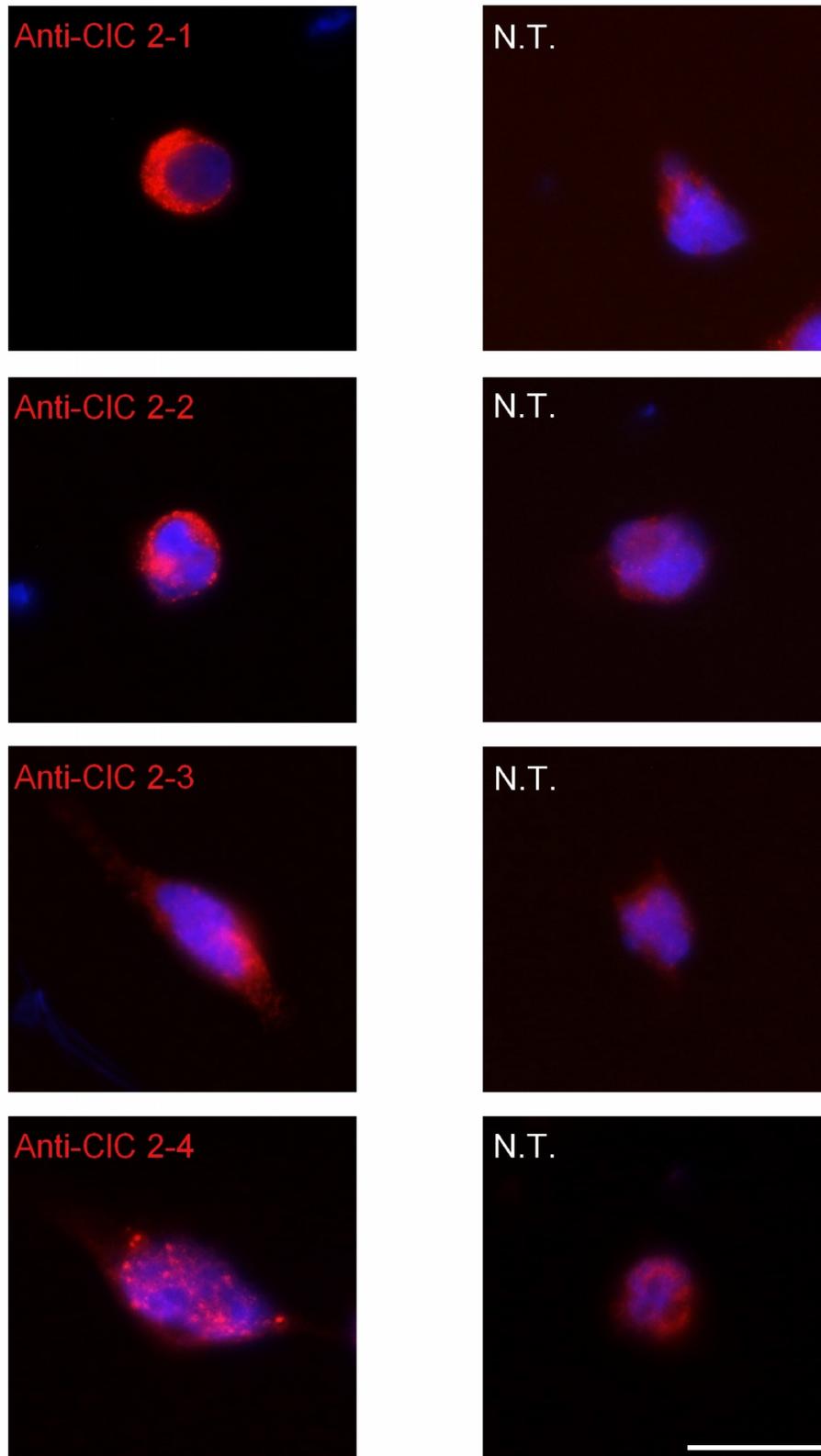


Abbildung 8: Färbung mit WT-CIC2 transfizierter HEK-Zellen. Von oben nach unten wurden folgende Primärantikörper verwendet: Anti-CIC2-1; Anti-CIC2-2; Anti-CIC2-3; Anti-CIC2-4. Rot dargestellt ist der jeweilige Anti-CIC-2 Antikörper. Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (Blau). Maßstab 10µm

3.2 Expression unterschiedlicher Ionenkanäle und Kanalkomponenten in SH-Zellen

In einem zweiten Ansatz sollten die in der ersten Versuchsreihe ausgewählten Anti-CIC-2 Antikörper in einer neuronalen Zelllinie weitergehend untersucht werden. Als Zellen dienten in unserer Versuchsanordnung SH-Zellen (humane Neuroblastom Zelllinie), die physiologisch Ionenkanäle exprimieren. Dadurch wurde eine weitere Transfektion unnötig, womit mögliche Einflüsse schwankender Transfektionsraten ausgeschlossen werden konnten. Desweiteren wurden ebenfalls Gephyrin und γ_2 -Untereinheiten der GABA_A-Rezeptoren angefärbt. Gephyrin organisiert die Lokalisation von GABA_A-Rezeptoren in inhibitorischen Synapsen und stabilisiert diese. Dadurch ist eine positive Anfärbung von Gephyrin gleichbedeutend mit der Präsenz von Glyzin- oder GABA_A-Rezeptoren.

Als Kontrollgruppe dienten Färbungen mit Alexa 488 goat anti rabbit und Alexa 488 goat anti mouse, ohne den Primärantikörper. Damit sollte ein unspezifisches Anfärben der Sekundärantikörper ausgeschlossen werden.

Den HEK-Zellen analog kann in Abbildung 9 ein deutlicher Unterschied zwischen den Färbungen und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Dies legt die spezifische Anfärbung der CIC-2 Kanäle mittels Anti-CIC2 Antikörpern nahe und stützt die in Kapitel 3.1 gewonnenen Erkenntnisse.

Für Anti-CIC2-1 Antikörper sehen wir eine deutlich grüne Färbung, die sich diffus im gesamten Zytoplasma manifestiert. Abgesehen von der Intensivierung an der Zellmembran am unteren Zellpol, färbt der Anti-CIC2-1 Antikörper diffus verteilt und erscheint körnig. Im Gegensatz dazu kann in CIC2-4 eine deutlich intensivere, perinukleäre Färbung beobachtet werden. Die punktuelle, teils konfluierende Färbung zeigt sich kernnah und nicht Zellmembran-assoziiert. Aufgrund des vermuteten Zusammenhangs zwischen CIC-2 Kanälen und GABA_A-Rezeptoren wurden hier ebenfalls die GABA_A-Rezeptoruntereinheit γ_2 angefärbt. Neben der wolkigen, zytoplasmatischen Anfärbung, fällt eine intensive Sprenkelung über die gesamte Zelle auf. Eine zusätzliche Assoziation

mit der Zellmembran ist nicht nachweisbar. Entsprechend zur Färbung mit Y_2 sehen wir bei Gephyrin erneut eine wolkig, inhomogene Färbung des Zytoplasmas. Der genaue Zusammenhang zwischen CIC-2 und Gephyrin wurde anschließend in einem weiteren gemeinsamen Ansatz detaillierter untersucht. (siehe 3.3)

Auffallend ist der starke Kontrast der bisher genannten Färbungen zu den durchgeführten Kontrollgruppen. Sowohl die Kontrolle *goat anti mouse*, als auch die Kontrolle *goat anti rabbit* zeigt so gut wie keinerlei Grünfärbung.

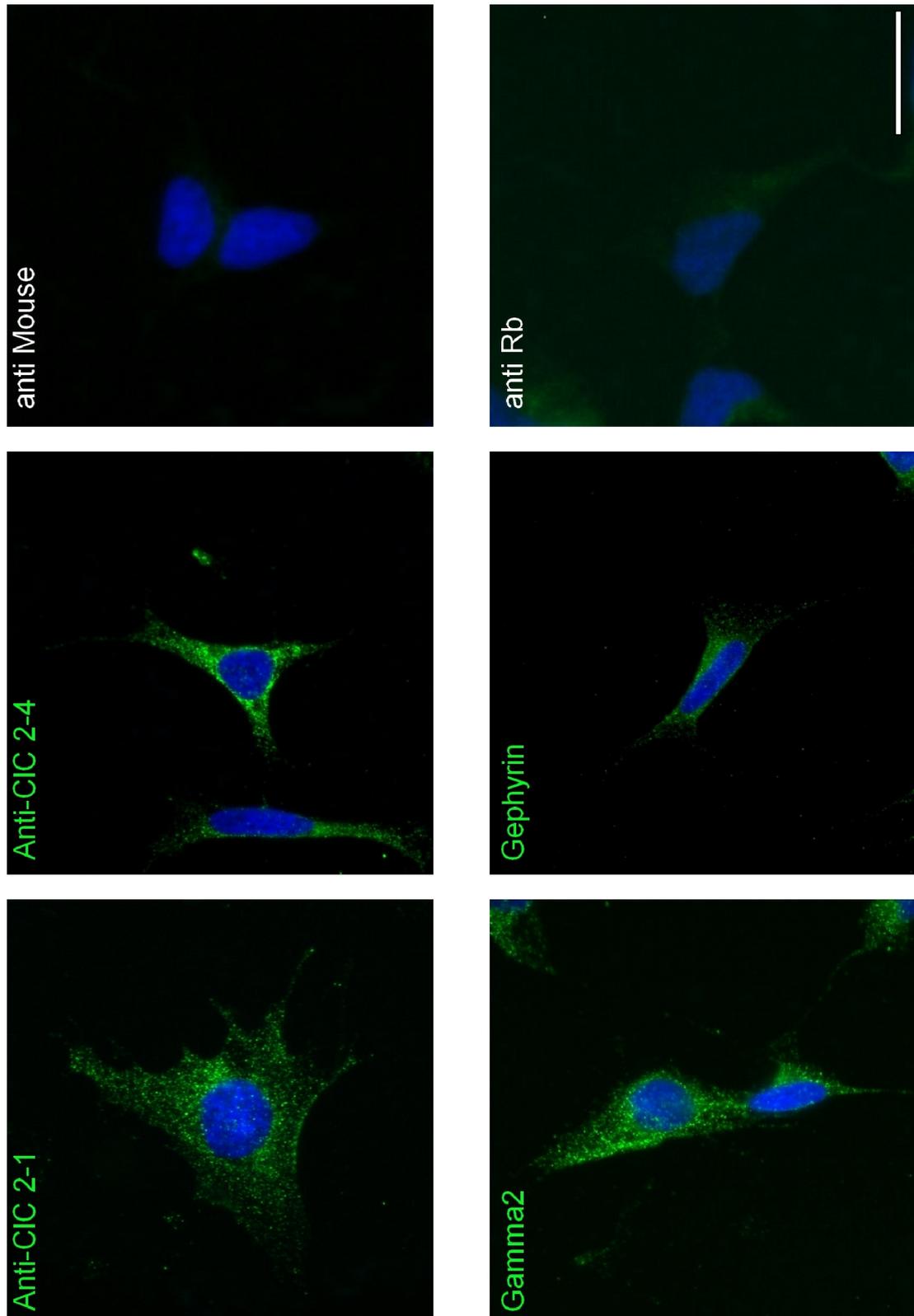


Abbildung 9: Färbung unterschiedlicher Ionenkanäle und Kanalkomponenten in SH-Zellen. Grün dargestellt sind die verwendeten Primärantikörper Anti-CIC2-1; Anti-CIC2-4; Gamma2; Gephyrin; sowie die Kontrollen *goat anti mouse* und *goat anti rabbit*. Die Kernfärbung mittels DAPI ist blau dargestellt. Maßstab 10µm

3.3 Kolokalisation in Neuronen

Expression von CIC-2 und Gephyrin in Div7 WT-Neurone, primär hippocampaler Kulturen

Zur näheren Betrachtung der bereits aufgeführten Bedeutung der CIC-2 Kanäle bei der inhibitorischen GABA-Antwort setzten wir einen Kolokalisationsansatz zur Untersuchung der Lagebeziehung zwischen CIC-2 Kanälen und GABA_A-Rezeptoren an. Hierfür wurden in ersten Versuchsreihen zuerst CIC-2 Kanäle mit Anti-CIC2-1 und Anti-CIC2-4 Antikörpern sowie Gephyrin separat angefärbt. Wie in Versuch 3.2 bereits beschrieben, ist aufgrund ihrer physiologischen Eigenschaften das Anfärben von Gephyrin an Synapsen gleichbedeutend mit der Präsenz von Glyzin- oder GABA_A-Rezeptoren. Zur besseren Darstellung der Neurone wurde gleichzeitig MAP2 angefärbt. MAP2 ist das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2, welches die Stabilität von Mikrotubuli und deren Assoziation mit anderen Zellstrukturen beeinflusst. Es übernimmt damit eine wichtige Funktion in der Neurogenese und wird in der Immunhistochemie bevorzugt als somato-dendritischer Marker von Neuronen verwendet. Erst anschließend wurden Anti-Gephyrin und Anti-CIC2-4 Antikörper gleichzeitig angefärbt und direkt miteinander verglichen. Zur besseren Darstellung wurden die Nuclei erneut mit DAPI angefärbt.

Für diese Färbung verwendeten wir Neurone, die aus der Präparation embryonaler Hippocampi von BALB/C WT-Mäusen gewonnen wurden. Zur Gewährleistung der bestmöglichen Vergleichbarkeit der Ergebnisse und zum Ausschluss des Einflusses ontogenetischer Veränderung der Kanalexpressionen, wurden ausschließlich Div7 (days in vitro) Neurone verwendet. (Abb. 10)

Anti-CIC2-1 zeigt eine intensive, perinukleär gelegene Färbung, die ansonsten schwach ausgeprägt erscheint. Darüber hinaus sind Axon und Dendriten kaum angefärbt. Mit Anti-CIC2-4 sehen wir intensivere Färbung der gesamten Zelle. Besondere Bedeutung kommt der erhöhten Antikörperaffinität im axonalen Initialsegment (AIS) sowie des gesamten Axons zu. Bei dem AIS handelt es sich um den Ort der Aktionspotentialentstehung am Axonhügel der Zelle.

Darüber hinaus sind, wenn auch etwas schwächer ausgeprägt, ebenfalls Soma und Dendriten angefärbt. Interessanterweise ergibt sich bei der Färbung mit Anti-Gephyrin ein analoges Bild zu der oben beschriebenen Färbung mit Anti-CIC2-4. Zu erkennen ist eine deutliche Antikörperaffinität im Initialsegment sowie entlang des Axons. Neben dem Axon werden vereinzelt auch Dendriten dargestellt. Außerdem kann man bei genauer Betrachtung ebenfalls eine perinukleäre Intensivierung beobachten.

Zur weiterführenden Untersuchung färbten wir nun die Neurone gleichzeitig sowohl mit dem Anti-CIC2-4 als auch mit dem Gephyrin-Antikörper (Abb.11). Bei dieser Färbung handelt es sich um den eigentlichen Kollokalisationsansatz. Hierbei wurde auf die Färbung mit MAP2 als somato-dendritischer Marker verzichtet.

Vergleichbar mit den bereits beschriebenen Ansätzen sehen wir bei der Gephyrin-Färbung eine deutliche Darstellung sowohl des Initialsegments als auch des Axons. Auffallend ist dabei das gesprenkelte Erscheinungsbild aus scharf abgrenzbaren, intensiven, teils diffus verteilten, teils perlschnurartig aneinandergereihten Fluoreszenzen.

Für Anti-CIC2-4 zeigt sich eine intensivere Färbung. Besonders das axonale Initialsegment weist eine deutlichere Anfärbung auf. Außerdem fällt, wie in allen bisher gezeigten Ansätzen mit Anti-CIC2-4, eine starke perinukleäre Fluoreszenz auf.

Betrachten wir das Vergrößerungsfenster beider Färbungen genauer, ergibt sich ein Bild mit annähernder Deckungsgleichheit. Das Bild imponiert mit einer deutlichen Darstellung des axonalen Initialsegments sowie einer perinukleären Intensivierung der Färbung, wobei beide Antikörper ein näherungsweise identisches zelluläres Verteilungsmuster aufzuweisen scheinen.

Aufgrund der vorhergehend dargestellten Spezifität sowohl in HEK- als auch in SH-Zellen, sowie der Übereinstimmung der Anti-CIC2-4 und Gephyrin-Antikörperfärbung im Initialsegment bei Div7 WT-Neuronen beschlossen wir, uns bei den anschließenden Versuchsanordnungen auf den vielversprechendsten Antikörper Anti-CIC2-4 zu konzentrieren.

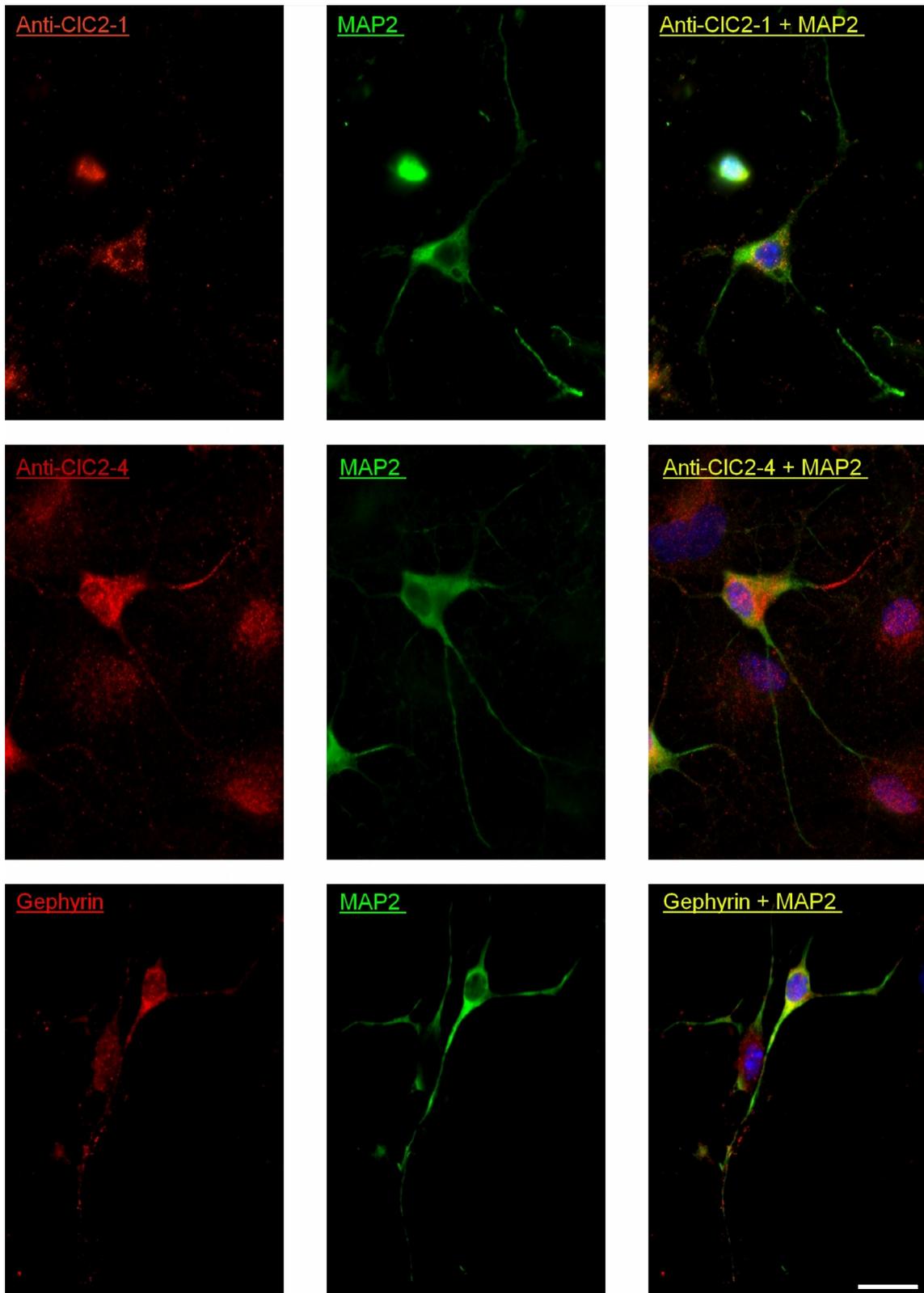


Abbildung 10: Kolokalisationsansatz in Div7 alten WT- Neuronen. Von links nach rechts sind die Färbungen Anti-CIC2-1; Anti-CIC2-4; Gephyrin; sowie MAP2 einzeln aufgeführt. In der rechten Spalte befindet sich die überlagerte Darstellung. Rot zeigen sich von oben nach unten die Färbungen Anti-CIC2-1; Anti-CIC2-4 sowie Gephyrin. Grün wird MAP2 dargestellt. Maßstab 10µm.

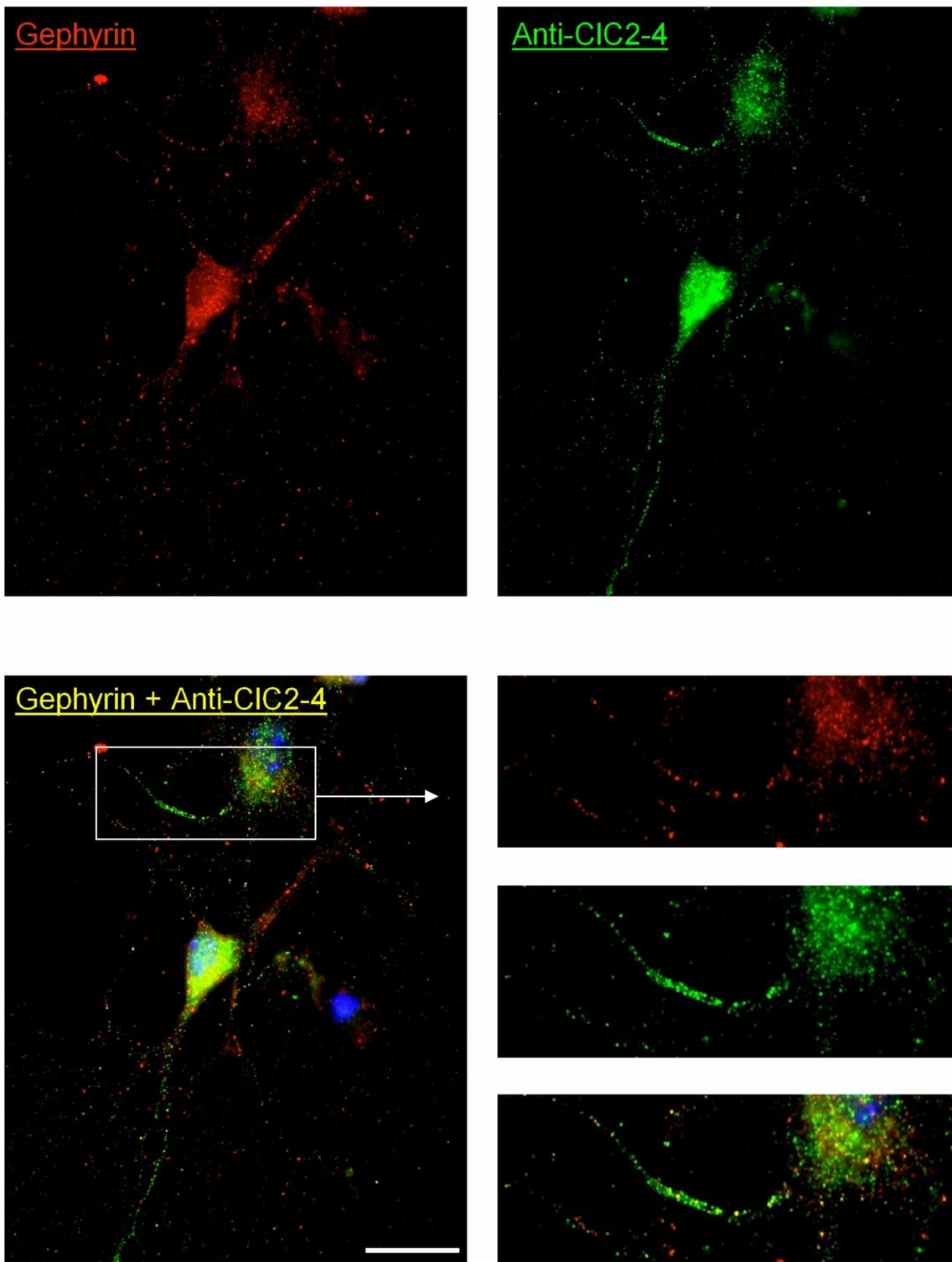


Abbildung 11: Kolokalisationsansatz von Gephyrin und CIC2-4 in Div7 alten WT-Neuronen. Zu sehen sind die Einzelnen sowie die überlagerte Darstellung der Färbungen. Rot zeigen sich Gephyrin, Grün Anti-CIC2-4. Der weiße Kasten zeigt das Vergrößerungsfenster in regio des axonalen Initialsegments. Die Vergrößerungen sind in der rechten Spalte dargestellt. Maßstab 10µm.

3.4 Kolokalisation in Kryoschnitten

Expression von CIC-2 und Ankyrin G in unterschiedlichen Hirnregionen von adulten Mäusen (P40)

Zur genaueren Untersuchung der oben beschriebenen Kolokalisation von Gephyrin und CIC-2 im Initialsegment, sollte in einem weiteren Schritt dieser Sachverhalt in unterschiedlichen Hirnregionen adulter Mäuse näher untersucht werden.

Zur Gegenüberstellung der Hirn- und Hippocampusregionen wurden in allen Ansätzen Kryoschnitte (siehe 2.5) adulter (P40) WT-Mäuse angefärbt. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass die ontogenetische Veränderung der Kanalexpression keinen Einfluss auf die hier erhobenen Ergebnisse hat (Vgl. 3.5). Dies ermöglicht eine Vereinheitlichung der Daten und gewährleistet die Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Dabei wurden der Neokortex (Ctx), die hippocampalen Regionen CA1, CA3 sowie DG näher betrachtet und miteinander verglichen.

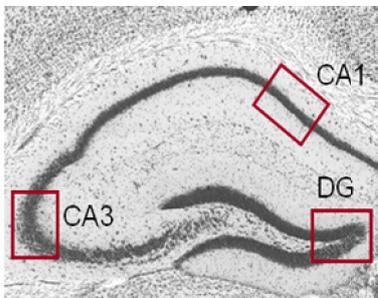


Abbildung 12: Mikroskopische Bild der hippocampalen Region und Markierung der Regionen CA1/3 (Cornu ammonis) und DG (Gyrus dentatus)

In Abbildung 12 ist zur besseren Erläuterung der unterschiedlichen Regionen eine lichtmikroskopische Aufnahme eines Hippocampus abgebildet. Das hippocampale Areal umfasst im Wesentlichen 7 Regionen. Den *Gyrus dentatus*

(DG), die eigentlichen hippocampalen Unterstrukturen CA1, CA2, CA3 und CA4 (CA: *Cornu ammonis*; lat. *Ammonshorn*), den subicularen Komplex sowie dem entorhinalen

Cortex. Die eigentliche anatomische Struktur des Hippocampus begrenzt sich im Wesentlichen auf die CA1-4 Unterstrukturen und den sich zytoarchitektonisch davon abgrenzbaren DG. Die Hauptneuronenpopulationen bilden in den CA Regionen die Pyramidenzellen und im DG die Körnerzellen. Im Hippocampus existieren drei wesentliche afferente Verbindungswege, die sich

vom entorhinalen Cortex bis zur CA1 Region erstrecken (Amaral & Witter, 1989).

Die Schnitte wurden mit dem, in den Voruntersuchungen ausgewählten und bereits bekannten Anti-CIC2-4 sowie mit dem Ankyrin G Antikörper angefärbt. Ankyrine sind Cytoskelett-Proteine, die durch Interaktion mit integralen Membranproteinen deren Verteilung innerhalb der Zellmembran beeinflussen. Ankyrin G (ANK-3) im Speziellen ist im Nervensystem vor allem an neuromuskulären Synapsen, den Ranvier'schen Schnürringen und dem axonalen Initialsegment (AIS) lokalisiert. Letzteres befindet sich direkt am Axonhügel und ist Ort der Entstehung von Aktionspotentialen. Außerdem wurden die Zellkerne erneut mit DAPI angefärbt.

Grundsätzlich lassen sich Strukturunterschiede der einzelnen Hirnregionen beschreiben (vgl. Abb. 13), die sich zum Teil durch das unterschiedliche Anschneiden der Axone bei der Präparation der Gehirne erklären lassen. Cortex zeigt regelmäßig verteilte Nuklei und fadenförmig parallel verlaufende Axone, wohingegen sich in CA1 die Zellkerne strangförmig konzentriert und unregelmäßigere Axon-Verläufe präsentieren. Die CA3 Färbung zeigt eine geringere Zellkerndichte. Darüber hinaus imponiert CA3 durch ungeordnete und teils fraktioniert erscheinende Axone. Der gewohnt lineare Verlauf der Axone ist hier nicht zu beobachten, da diese hier teilweise quer und nicht längs angeschnitten wurden. Zuletzt kann beim *Gyrus dentatus* (DG) eine sehr hohe Zellkerndichte, mit in zwei parallelen Strängen formierten Nuklei, beobachtet werden. (Abb. 13)

In allen Regionen zeigt sich eine Deckungsgleichheit in der Ankyrin G und CIC-2 Färbung im Initialsegment. Dies stützt die bereits gewonnen Erkenntnisse und indiziert die Lokalisierung des CIC2-Kanals im AIS. Vergleicht man die Hirnregionen untereinander so fällt, abgesehen von den beschriebenen Strukturunterschieden, auf, dass sowohl die Ankyrin G als auch CIC-2 Färbung ihre höchste Intensität in CA3 aufweisen. Erwähnenswert ist außerdem die deutliche Abschwächung der CIC2-4 Färbung in der CA1 Region sowie in Cortex. (Abb. 13)

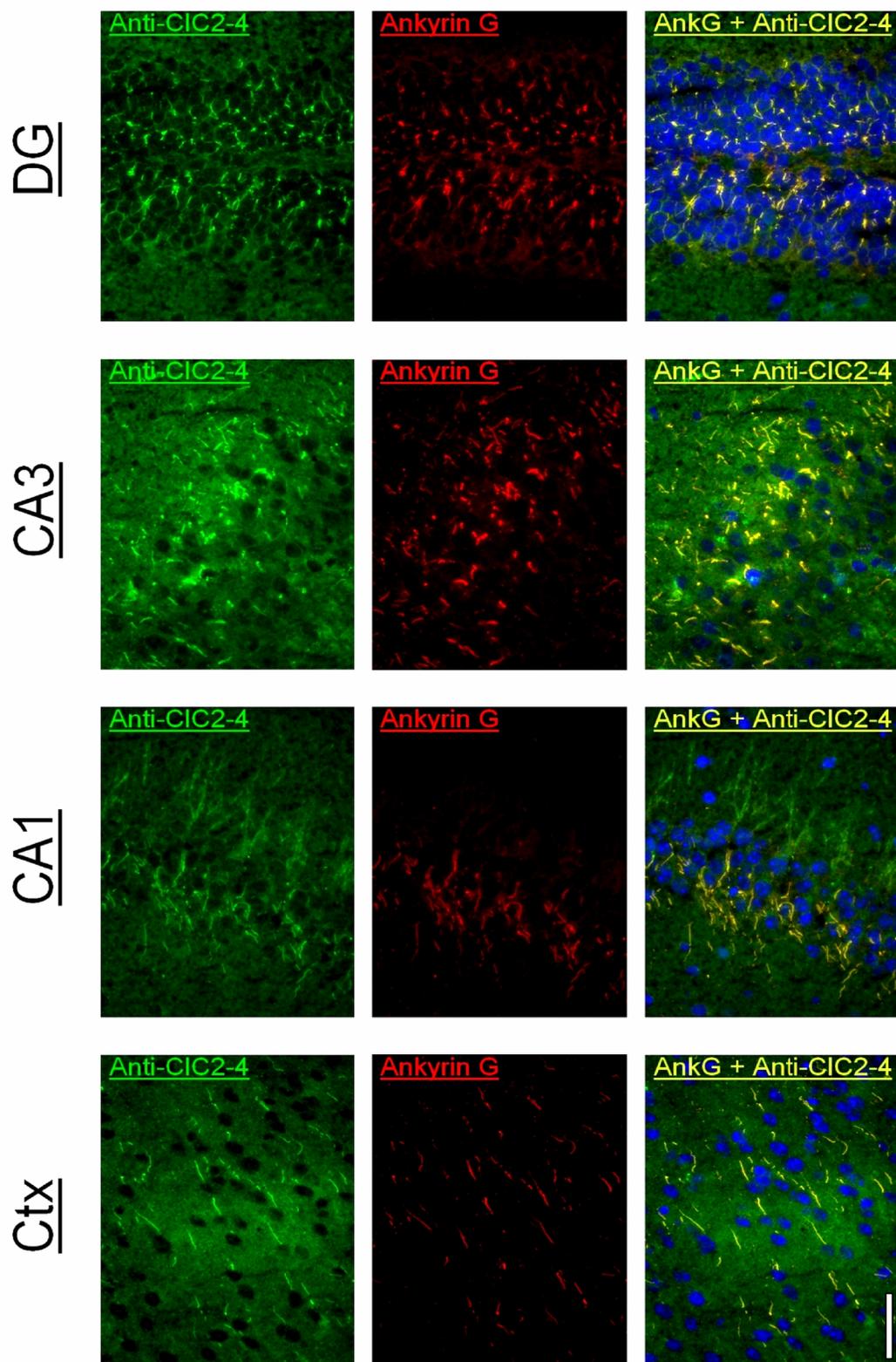


Abbildung 13: Kolokalisation von CIC2 und Ankyrin G in unterschiedlichen Hirnregionen von P40 alten WT-Mäusen. Von unten nach oben sind die Hirnregionen Ctx; CA1; CA3 sowie DG abgebildet. Von links nach rechts betrachtet sieht man grün dargestellt Anti-CIC2-4 sowie Ankyrin G (rot) und die überlagerte Darstellung. Die blaue Kernfärbung erfolgte mittels DAPI. Maßstab 10µm.

3.5 Ontogenetische Expressionsmuster von CIC-2 in unterschiedlichen Hirnregionen

Wie bereits beschrieben besteht interessanterweise ein Zusammenhang zwischen der Expression von CIC-2 Kanälen in den Pyramidalzellen des Hippocampus und der Umschaltung der GABA-Antwort von exzitatorisch auf inhibitorisch. Dabei sollen die CIC-2 Kanäle im neonatalen Gehirn zunächst in einer nicht-funktionellen Form vorliegen und ihre Expression, zeitgleich mit der Umschaltung der GABA-Antwort, hochreguliert werden (Clayton et al., 1998; Miles, 1999; Mladinić et al., 1999). Somit soll den CIC-2 Kanälen eine besondere Rolle in der Kontrolle neuronaler Erregbarkeit zukommen (Smith et al. 1995; Staley et al. 1996).

Zur Untersuchung dieses Sachverhaltes färbten wir unterschiedliche Hirn- und Hippocampusregionen in Kryoschnitten (siehe Kapitel 2.5) in Abhängigkeit des jeweiligen postnatalen Alters, um einen Überblick über die ontogenetischen Veränderungen der Kanalexpression in den jeweiligen Hirnregionen zu gewinnen.

Untersucht wurden Kryoschnitte aus WT-Mäusen im postnatalen Alter von P5, P10, P20, P40. Dabei wurden der Neokortex (Ctx), die hippocampalen Regionen CA1, CA3 sowie DG (siehe oben) näher betrachtet und miteinander verglichen.

3.5.1 Cortex

Sowohl in der Ankyrin G (AnkG) als auch in der Anti-CIC2-4 Färbung (Abb. 14) präsentieren sich, entsprechend den Axonverläufen, fadenförmig parallel verlaufende, intensiv angefärbte Strukturen. Bei der Überlagerung beider Färbungen zeigt sich erneut eine exakte Übereinstimmung der AnkG und Anti-CIC2-4 Färbung im Initialsegment. Betrachtet man die Intensität der Fluoreszenz in Abhängigkeit des Alters, so scheint ein Maximum bei P20 erreicht zu sein. In P40 schwächt sich vor allem die CIC2-4, aber auch die AnkG-Färbung wieder ab.

3.5.2 CA1

Grundsätzlich ist in der Region CA1 eine höhere Zelldichte und damit höhere Axondichte als im Neocortex zu beobachten (Abb. 15). Die Axone scheinen kürzer, aber gleich intensiv gefärbt zu sein. Analog zum Cortex sehen wir eine Kolokalisation von AnkG und CIC2-4 im axonalen Initialsegment mit Fluoreszenzmaximum in P20 sowohl in CIC2-4 als auch AnkG, sowie in ähnlicher Weise eine Fluoreszenzminderung in P40.

3.5.3 CA3

Anders als den beiden oben beschriebenen Ansätzen zeigt sich kein eindeutiges Intensitätsmaximum in P20 (Abb. 16). Der Abfall der Intensität ist in dieser Region nicht darstellbar. Auffallend ist, im Gegensatz zu den vorrausgehenden Färbungen, die Veränderung der Axonstruktur, die sich durch die Präparation und dem damit verbundenen Anschnitt der Axone erklären lässt. Die sonst fadenförmig parallel verlaufenden Axone erscheinen in diesem Versuch ungeordneter und fraktionierter.

Die in allen Hirnregionen beobachtete Kolokalisierung der Ankyrin G und CIC2-4 Färbung stützt die in den anderen Versuchsanordnungen gewonnenen Ergebnisse und indiziert die Lokalisierung der CIC-2 Kanäle im axonalen Initialsegment. Mit Ausnahme von CA3, ist allen Regionen ebenfalls das Fluoreszenzmaximum in P20 gemein. Der Abfall in CA3 ist nicht konsistent.

Ctx:

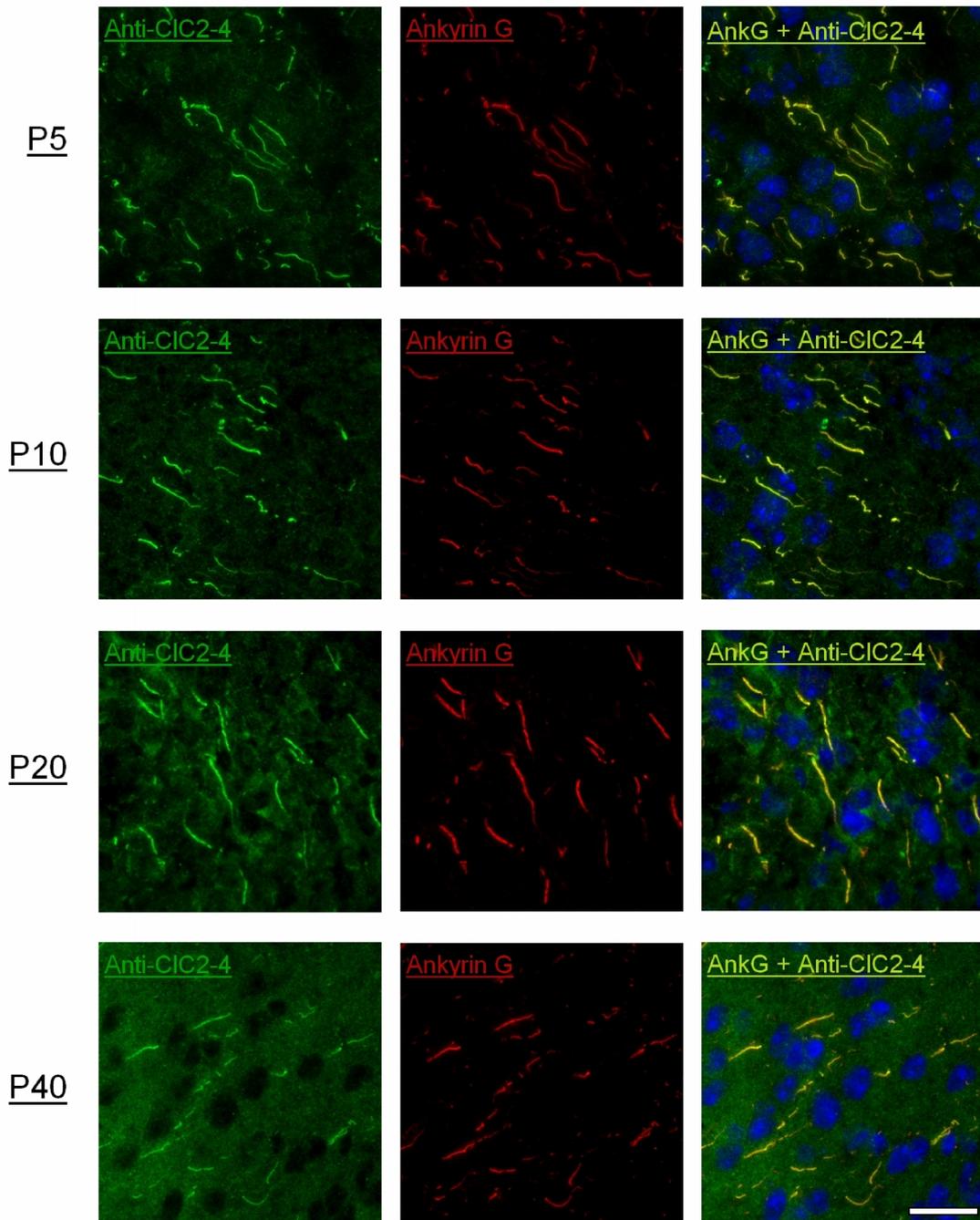


Abbildung 14: Färbung des Ctx (Neokortex) in Kryoschnitten unterschiedlichen Alters von WT Mäusen. Von oben nach unten P5; P10; P20; P40. Grün dargestellt ist Anti-CIC2-4, rot Ankyrin G. Von links nach rechts sind die Färbungen einzeln aufgeführt. In der rechten Spalte befindet sich die überlagerte Darstellung. Blau erscheint die Kernfärbung mittels DAPI. Maßstab 10µm.

CA1:

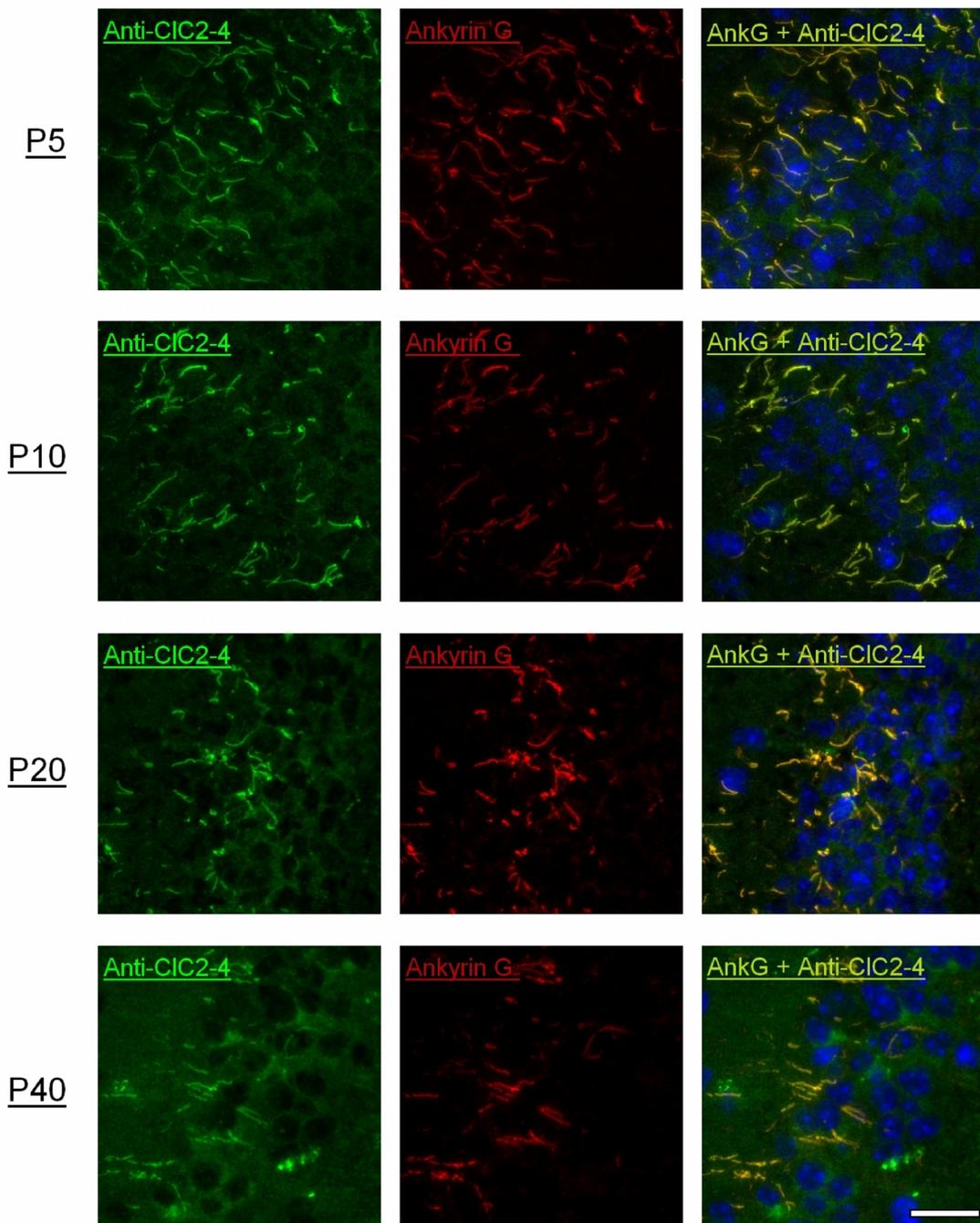


Abbildung 15: Färbung der Region CA1 (Cornu ammonis) in Kryoschnitten unterschiedlichen Alters von WT Mäusen. Von oben nach unten P5; P10; P20; P40. Grün dargestellt ist Anti-CIC2-4, rot Ankyrin G. Von links nach rechts sind die Färbungen einzeln aufgeführt. In der rechten Spalte befindet sich die überlagerte Darstellung. Blau erscheint die Kernfärbung mittels DAPI. Maßstab 10µm.

CA3:

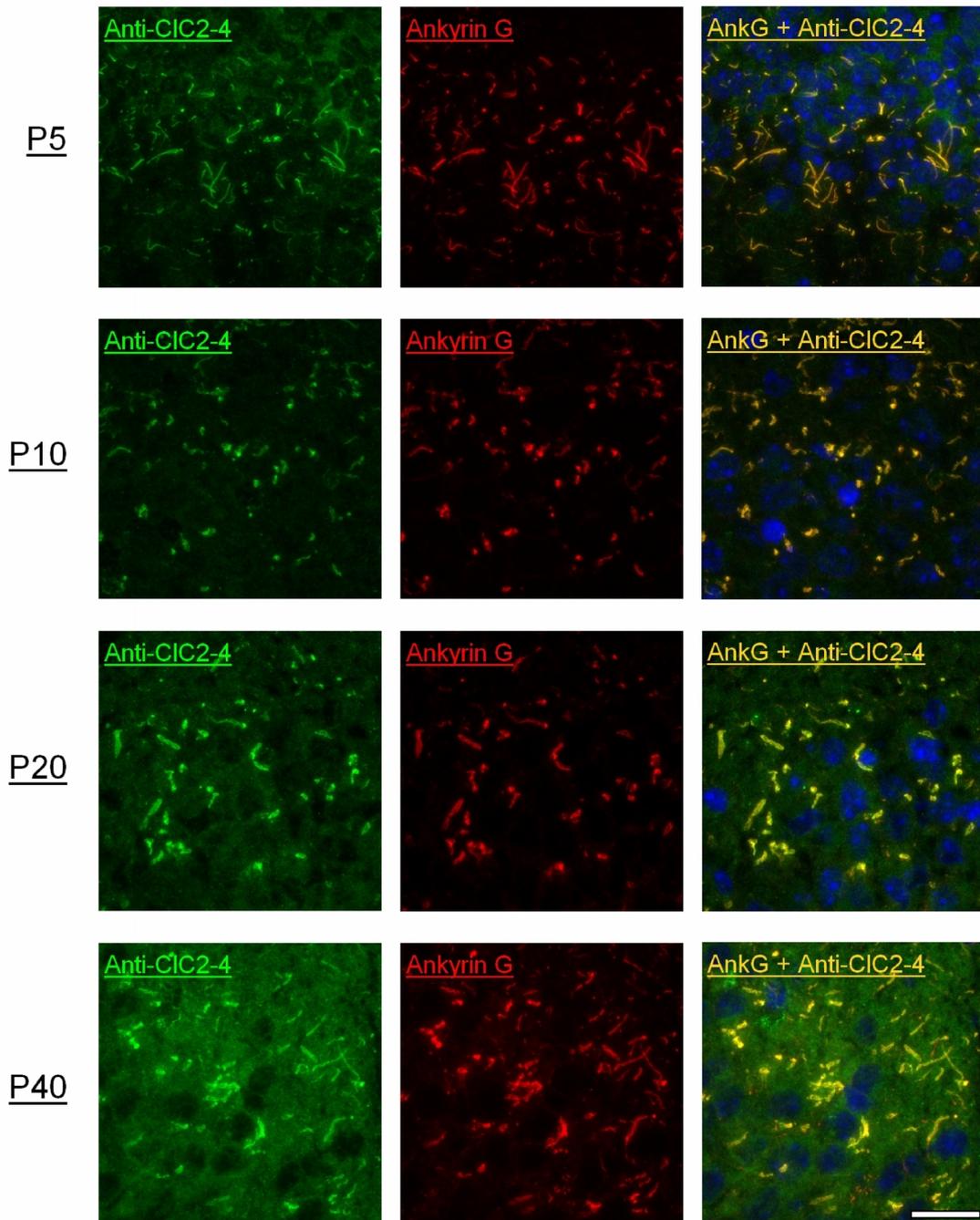


Abbildung 16: Färbung der Region CA3 (Cornu ammonis) in Kryoschnitten unterschiedlichen Alters von WT Mäusen. Von oben nach unten P5; P10; P20; P40. Grün dargestellt ist Anti-CIC2-4, rot Ankyrin G. Von links nach rechts sind die Färbungen einzeln aufgeführt. In der rechten Spalte befindet sich die überlagerte Darstellung. Blau erscheint die Kernfärbung mittels DAPI. Maßstab 10µm.

3.6 Expression von CIC-2 Kanälen

in primären hippocampalen Neuronen von WT (+/+), (+/-) und K.O.(-/-) Mäusen

Zur Prüfung der Spezifität unserer Antikörper ist es notwendig Neurone unterschiedlicher Kanalexpression zu färben. Für diese Färbung verwendeten wir Neurone, die aus der Präparation embryonaler Hippocampi transgener Mäuse gewonnen wurden. Die anschließende Genotypisierung der Schwänzchen lieferte die benötigte Information über die Art der CIC-2 Expression der hierfür gezüchteten transgenen Mäuse. Unterschieden werden kann zwischen Wildtyp (WT), hemizygotische Expression (+/-) sowie keiner Expression bei Knockout (K.O.) Mäusen (-/-). Als Primärantikörper wurde Anti-CIC2-4 zum Chloridkanalnachweis verwendet. Außerdem wurde zur besseren Darstellung der verwendeten Div18 und Div25 Neurone erneut MAP2 als somato-dendritischer Marker verwendet sowie die Nuklei mittels DAPI angefärbt.

Sowohl in Div18 als auch in Div25 zeigten die Wildtypfärbungen eine deutliche Anfärbung im Bereich des Zytoplasmas mit teils diffus verteilten, teils konfluierenden Arealen. Die hemizygotische Expression (+/-) präsentiert ein ähnliches Erscheinungsbild, wobei eine Abnahme der Intensität zu beobachten ist. Bei beiden Expressionen zeigt sich die Verteilung sowohl perinukleär als auch bis an die Zellmembran reichend. (vgl Abb. 17)

Bei den Knockout Mäusen ist jedoch bei kritischer Betrachtung der Fluoreszenzfärbung eine gleichmäßige zytoplasmatische Färbung zu sehen. Der erwartete Ausfall der Fluoreszenzfärbung, wie er in nicht-transfizierten HEK-Zellen (siehe Kapitel 3.1) beobachtet wurde, konnte in hippocampalen Knockout-Neuronen (-/-) nicht reproduziert werden. (siehe Diskussion)

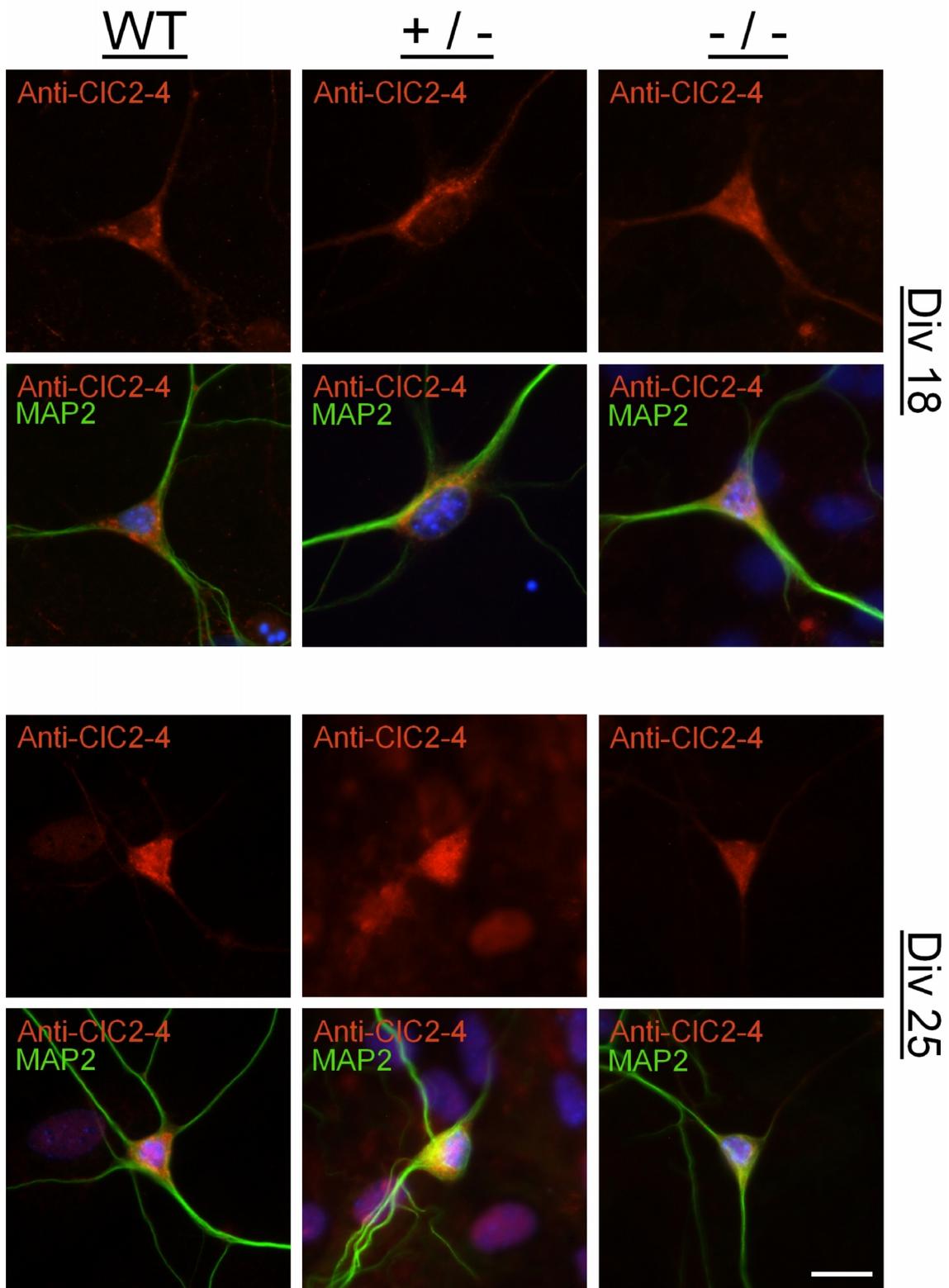


Abbildung 17: Färbung primärer, hippocampaler Neuronen mit unterschiedlicher CIC-2 Kanalexpression. Von links nach rechts aufgelistet sind WT (+/+); (+/-) und K.O(-/-). Die Abbildung ist in zwei Blöcken unterteilt. Oben Div18 Neurone , unten Div25. Als Anti-CIC-2 Antikörper wurde Anti-CIC2-4 (rot) verwendet. Grün erscheint die MAP2 Färbung. Die blau dargestellten Zellkerne wurden erneut mittel DAPI angefärbt. Maßstab 10µm.

3.7 CIC2-4 Antikörperfärbungen in CIC-2 Knockout-Mäusen

Analog zum Ansatz 3.6 wurden zur Prüfung der Spezifität, neben den Neuronen transgener Mäuse, ebenfalls Kryoschnitte unterschiedlicher Expressionen angefärbt. Zu erwarten wäre erneut ein Ausbleiben der CIC2-Färbung bei CIC2-K.O.Mäusen.

Als Anti-CIC2 Primärantikörper diente erneut Anti-CIC2-4. Desweiteren verwendeten wir Ankyrin G als AIS-Marker. Auf eine Färbung der Nuklei wurde in diesem Zusammenhang verzichtet (Abb. 18).

3.7.1 Wildtyp

Zu sehen sind deutlich angefärbte, fadenförmige, gleichgerichtet verlaufende Axone. Die Ankyrin G Färbung entspricht damit den bereits beschriebenen Ergebnissen. Auffallend ist jedoch das Intensitätsdefizit der CIC2-4 Färbung bei gleichzeitig massivem Anstieg des Hintergrundrauschens. Die spezifisch angefärbten Strukturen verlaufen dabei Deckungsgleich zur Ankyrin G Färbung und entsprechen den Axonenverläufen.

3.7.2 Knockout

Die Färbung mittels Ankyrin G ergab erneut eine deutliche Darstellung der Axone.

In den CIC-2 Färbungen ist paradoxerweise eine sehr intensive Markierung der Axone äquivalent zur Ankyrin G Färbung zu beobachten. Der erwartete Fluoreszenzausfall konnte erneut nicht dargestellt werden. Auf mögliche Ursachen dieser Ergebnisse soll in der Diskussion näher eingegangen werden.

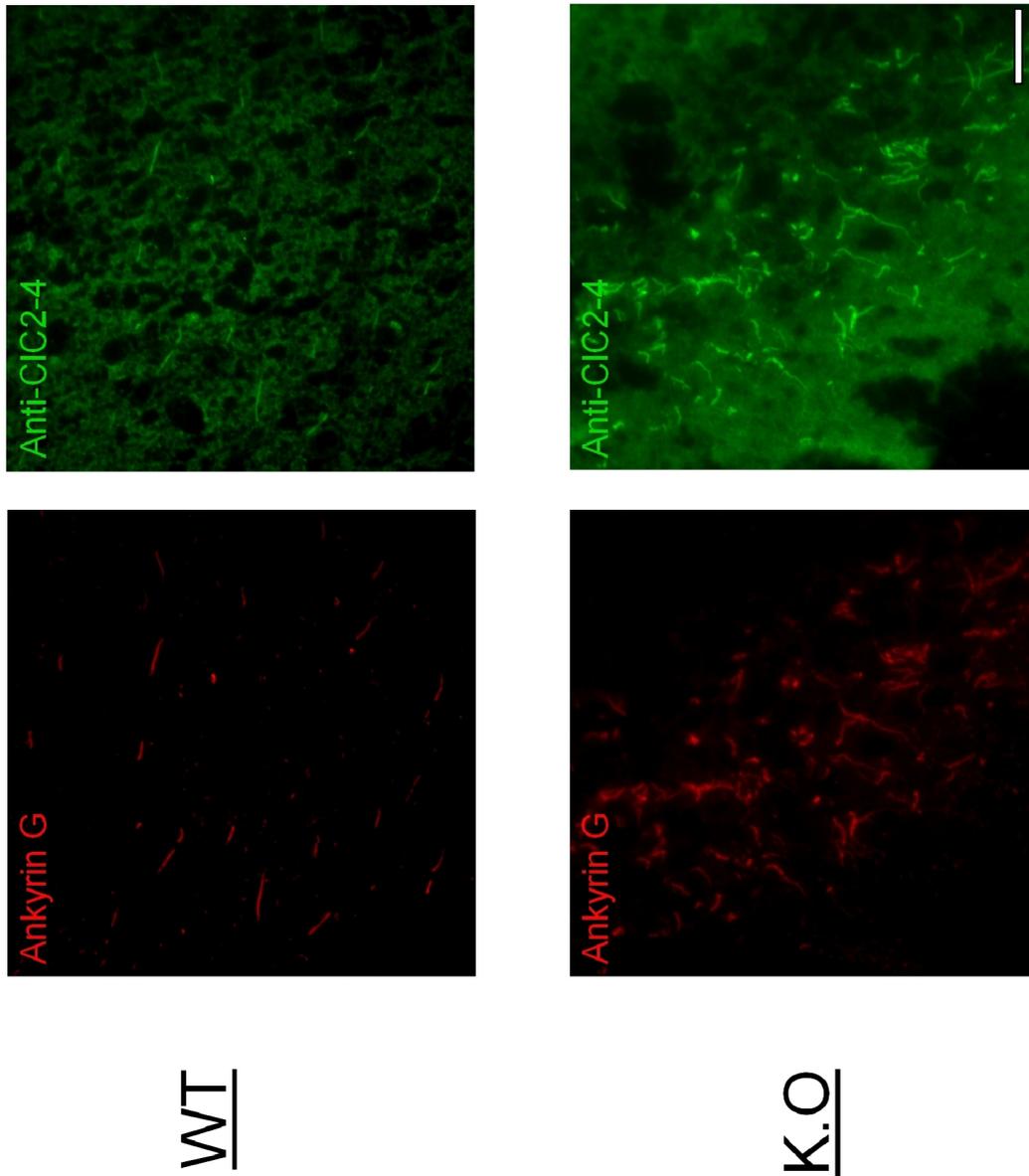


Abbildung 18: CIC2-4 Färbung von Kryoschnitten unterschiedlicher CIC-2 Kanalexpression. Dargestellt ist oben Wildtyp (+/+) sowie K.O. (-/-) unten. Von oben nach unten ist grün Anti-CIC2-4 und rot Ankyrin G zu sehen. Maßstab 10µm.

4 DISKUSSION

4.1 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

In dieser Dissertation konnte mittels eigens angefertigter polyklonaler Antikörper das Expressionsmuster der CIC-2 Kanäle sowohl in transfizierten humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-Zellen), in SH-Zellen (humane Neuroblastom Zelllinie), als auch in primären hippocampalen Neuronen und Maushirnschnitten untersucht werden. Die Analogie der Ankyrin G und Anti-CIC-2 Färbung in den hippocampalen Regionen CA1-3 sowie in *Gyrus dentatus* (DG) und Neokortex (Ctx) der untersuchten Kryoschnitte adulter WT-Mäuse (P40), suggeriert zunächst eine Lokalisation der CIC-2 Kanäle im axonalen Initialsegment (AIS). Darüber hinaus wurde eine Kolo-kalisation der Anti-CIC-2 und Anti-Gephyrin Antikörperfärbungen im AIS primärer hippocampaler WT-Neurone beobachtet. Außerdem konnten bei der Untersuchung des ontogenetischen Expressionsmusters Hinweise auf ein Fluoreszenzmaximum bei P20 in einigen Hirnregionen gewonnen werden.

4.2 Prüfung der neuen polyklonalen CIC-2 Antikörper

Zur Prüfung der Antikörperspezifität ist das Färben von Kontrollgruppen unabdingbar. In der ersten Versuchsanordnungen mit den eigens entwickelten polyklonalen Antikörpern, zeigten sowohl die mit CIC-2 WT-Kanal transfizierten humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-Zellen) als auch SH-Zellen (humane Neuroblastom Zelllinie), welche physiologisch CIC-2 Ionenkanäle exprimieren, spezifisch aussehende Färbungen für CIC-2. Die Kontrollgruppen waren in beiden Fällen deutlich Fluoreszenz-negativ (Abb. 8 und Abb. 9). Die dargelegten Ergebnisse veranlassten uns für die weiteren Versuchsreihen mit den Anti-CIC2-1 und Anti-CIC2-4 Antikörpern in weiteren Systemen fortzufahren (siehe 4.3.).

Die Untersuchung der im weiteren Verlauf dieser Dissertation zur Verfügung stehenden CIC-2 Knockout Mäuse, ermöglichte uns die Antikörperspezifität in Mausneuronen, die diesen Kanal nicht exprimieren sollten, zu testen. Die Wildtyp-Mäuse (+/+) sowie die Mäuse mit hemizygotischer Expression (+/-) zeigten eine zytoplasmatisch dominierte Fluoreszenzfärbung sowohl in primären Kulturen als auch in Hirnschnitten. Leider konnte der erwartete Ausfall der Fluoreszenzfärbung, wie er in nicht-transfizierten HEK-Zellen (siehe 3.1) beobachtet wurde, weder in hippocampalen Neuronen in Kultur noch in Kryoschnitten von (-/-) Mäusen reproduziert werden (Abb. 17 und Abb. 18).

Die Diskrepanz bezüglich der Antikörperspezifität zwischen den HEK-Zellen und den untersuchten Neuronen könnte unterschiedlichste Ursachen haben. Einerseits, wie später näher erläutert wird, das unspezifische Binden gegen verwandte, strukturähnliche Epitope. Hierbei könnten unsere Antikörper gegen weitere Proteine binden, die sich ebenfalls in Knockout-Mäusen befinden. Die Untersuchungen von Nehrke et al. 2002 zeigten mittels Westen Blot, dass in Knockout-Mäuse kein CIC-2 Protein nachgewiesen werden kann. Dieses wurde in unserem Labor bestätigt, sowohl mit einem RT-PCR als auch mit elektrophysiologischen Ableitungen (unpublizierte Daten). Dies war wichtig zu bestätigen, da die Knockout-Mäuse durch Manipulation der Promotorregion und ersten Exonen des CLCN2 generiert wurden (Nehrke et al., 2002). Andererseits muss in Betracht gezogen werden, dass es sich bei den HEK-Zellen um einen transfizierten humanen Klon handelt.

Bösl et al. (2001) konnten mit einem eigenen Anti-CIC-2 Antikörper das fehlende Signal in Knockout Mäusen zeigen. Da sich diese Studie nicht mit neuronalen Expressionsmustern befasst hat und uns die Antikörper nicht zur Verfügung standen, haben wir uns entschieden die Ergebnisse von Sik et al. (2000) durch unseren neuen Ansatz zu reproduzieren und in einzelnen wichtigen Punkten, wie der Kolokalisation mit GABA_A-Rezeptoren sowie der Lokalisation im AIS zu erweitern. In dieser Arbeit wurden Kaninchen mit einem Glutathion-S-Transferase (GST) gekoppelten Protein, bestehend aus den Aminosäuren 20-68 des CIC-2 Kanals, injiziert und die Seren anschließend, zur Gewinnung des polyklonalen Anti-CIC-2 Antikörpers, gereinigt. Diese Sequenz

entspricht unserem N-terminalen Epitop (Anti-CIC2-1 und Anti-CIC2-2 Antikörper).

Ein durchgeführter *Western Blot* aus transfizierten HEK-Zellen, nicht-transfizierten HEK-Zellen sowie WT-Neuronen aus Ratten zeigte, dass die Kontrollgruppe aus nicht-transfizierten HEK-Zellen keine Bande aufweist, wohingegen bei den anderen beiden eine gemeinsame Bande bei etwa 100,000 mol zu erkennen ist. Darüber hinaus imponiert die Linie aus WT-Neuronen mit einer weiteren Bande bei etwa 60,000 mol (Abb. 19). (Sik et al., 2000)

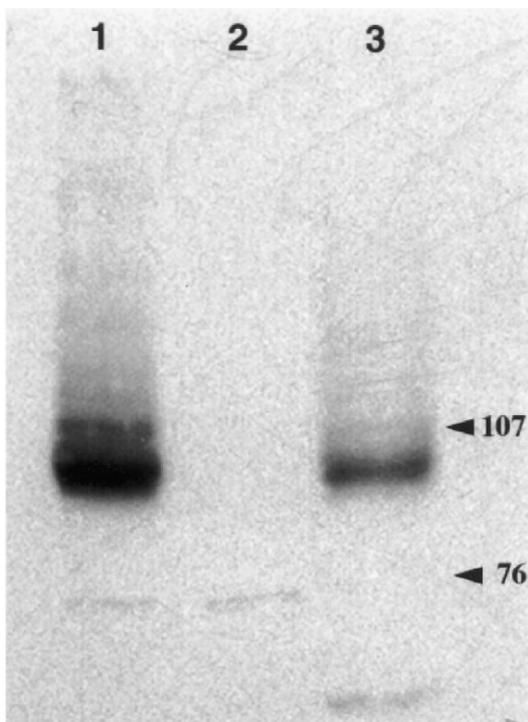


Abbildung 19: CIC-2 Westen Blot Analyse in 1) transfizierten HEK-Zellen, 2) Kontrollgruppe, und 3) WT-Neuronen aus Ratten (Sik et al., 2000).

Diese zweite Bande könnte möglicherweise ein Hinweis auf Abbauprodukte des CIC-2 Kanals, oder auf verwandte Antigene sein, gegen die die Antikörper unspezifisch binden. Die Autoren verweisen darauf, dass Kontrollversuche mit Antigenblockierung durch Fusionsproteine nur inkonklusive Ergebnisse lieferten. Außerdem gehen sie davon aus, dass unterschiedliche Epitope häufiger im *Western Blot* als in immunhistochemischen Untersuchungen gefunden werden. Da die Antikörper aber in der Lage wären sowohl in Rattenhirnen als auch in HEK-Zellen gegen WT-Proteine mit 100,000 mol zu

binden, wurden sie trotz allem für die weiteren Untersuchungen verwendet (Sík et al., 2000). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt besaßen sie jedoch nicht die Möglichkeit anhand von Knockout-Modellen ihren Ansatz zu kontrollieren.

In der vorliegenden Dissertation konnten anfänglich gute Ergebnisse bei den Kontrollgruppen mit nicht-transfizierten HEK-Zellen sowie SH-Zellen erzielt werden, sodass eine Reihe an Experimenten in neuronalen Primärkulturen mit zwei ausgewählten Antikörper durchgeführt wurde. Einer von diesen Antikörpern (CIC2-4), der gegen die C-terminale Sequenz gerichtet ist, wurde für die Analyse der Mausschnitte weiterverwendet um die Ergebnisse von Sik et al. (2000) zu bestätigen. Dies wird im nächsten Abschnitt im Detail diskutiert.

4.3 CIC-2 Expression in Neuronen

Bereits im Jahr 2000 wurde mittels polyklonaler Antikörper (siehe Kapitel 4.2) versucht, die hippocampalen Strukturen spezifisch auf CIC-2 hin zu untersuchen (Sík et al., 2000). Nach dem Nachweis von CIC-2 mRNA in einigen pyramidalen, aber auch nicht-pyramidalen Neuronen (Smith et al. 1995), sollte nun ein Blick auf das laminäre und subzelluläre Verteilungsmuster der funktionalen Proteine geworfen werden. In den zuerst durchgeführten lichtmikroskopischen Untersuchungen des Hippocampus (Sík et al., 2000) konnten perinukleäre und im proximalen Zytoplasma der Dendriten gelegene immunoreaktive Granula in Pyramidenzellen der CA1-CA3 Region nachgewiesen werden. Die genauere subzelluläre Untersuchung ergab den Nachweis großer Mengen an CIC-2 Proteinen in den zellulären Transportsystemen, wie den Zellkörperchen, dem Golgi-Apparat und den angrenzenden Sacculae im Soma und den proximalen Dendriten (Sík et al., 2000). Dies deckt sich mit den ersten Hinweisen auf die intrazellulären Verteilungsmuster, die wir aus der Untersuchung transfizierter HEK-Zellen sowie SH-Zellen gewonnen haben. Es zeigten sich punktuelle, teils konfluierende Fluoreszenzen, die sich kernnah und nicht Zellmembran-assoziiert präsentierten. Dabei schien es sich um CIC-2 Proteine zu handeln, die in Vesikel des intrazellulären Transportsystems verpackt sind (Abb. 8 und

Abb. 9). Möglicherweise liegen die CIC-2 Kanäle darin in nicht physiologischer Form vor, oder konnten aus anderen, nicht näher bekannten Gründen, nicht in die Zellmembran eingebaut werden.

Desweiteren zeigten sich mittels Anti-CIC-2 Antikörpern, Fluoreszenzen in der Plasmamembran des Soma, der proximalen Dendriten und an symmetrischen, inhibitorischen Synapsen des Initialsegments von Axonen. Daraus wurde nur indirekt auf die mutmaßliche Kolo-kalisierung mit GABA_A-Ionenkanälen geschlossen, diese jedoch nicht direkt nachgewiesen (Sík et al., 2000).

Wir wollten diesen Umstand genauer erforschen und vertieften die Untersuchung des AIS.

Zunächst konnte in sämtlichen untersuchten hippocampalen Regionen (CA1-3 und DG) sowie im Neokortex, übereinstimmende Anti-Ankyrin G und Anti-CIC-2 Antikörperfärbungen im AIS dargestellt werden (Abb. 13). Im nächsten und hierbei entscheidenden Schritt, konnten wir im Kolo-kalisationsansatz eine deutliche Antikörper-Färbung des AIS zeigen. Weitergehende Untersuchungen zeigten eine näherungsweise Deckungsgleichheit mit Gephyrin, ein Protein, das GABA_A Rezeptoren in inhibitorischen postsynaptischen Regionen organisiert und stabilisiert (Tretter et al., 2012). Damit kann eine Kolo-kalisation von GABA_A-Rezeptoren und CIC-2 Kanäle im Initialsegment suggeriert werden (Abb. 11).

Als weiteren Baustein zur Erweiterung und Vertiefung bereits publizierter Daten, untersuchten wir das ontogenetische Expressionsmuster (siehe 3.5) von CIC-2 Kanälen in unterschiedlichen hippocampalen Regionen sowie dem Neokortex. Diese Versuchsreihen erbrachten mit Ausnahme von CA3, ein Expressionsmaximum bei P20 (Abb. 14-16). Dies deckt sich mit den Ergebnissen früherer Studien, die CIC-2 bereits in frühen Stadien in unterschiedlichsten Hirnregionen nachweisen konnten. Die Expression wies dabei regionale Unterschiede auf (Clayton et al., 1998). Bei unserer Auswertung handelt es sich um eine rein qualitativ-deskriptive Analyse der gewonnen Versuchsreihen. Eine quantitative Datenauswertung war anhand der vorhandenen Rohdaten nicht möglich und steht weiter aus.

4.4 Bedeutung für die Funktion von CIC-2 Kanälen

Wie bereits ausgeführt (siehe Kapitel 1.4), konnte die mRNA des ubiquitär vorkommenden CIC-2 Kanals in allen untersuchten Geweben nachgewiesen und auf unterschiedlichste Regulationsmechanismen der Expression hingewiesen werden. Im Gehirn im Speziellen wird CIC-2 in den Pyramidalzellen des Hippocampus, in den Purkinjezellen des Cerebellums (Smith et al. 1995) und astrozytischen Endstreifen (astrocytic endfeet) (Sik et al., 2000) exprimiert. Bezüglich der physiologischen Funktion von CIC-2 Kanälen herrscht jedoch weiterhin große Uneinigkeit. Eine Ursache hierfür sind unter anderem sich widersprechende elektrophysiologische Erkenntnisse und Untersuchungen mit Knockout-Mäusen (Bösl et al., 2001; Nehrke et al., 2002). Der alleinige Nachweis von mRNA in Geweben ist nicht zuletzt aufgrund unterschiedlicher gewebespezifischer Splice-Varianten nicht gleichbedeutend mit einer funktionellen Bedeutung für die Zellen (Chu & Zeitlin 1997; Chu et al. 1996; Loewen et al. 2000). Neben den diskutierten Funktionen bei der Volumenregulation (Furukawa et al. 1998; Nehrke et al. 2002), dem transepithelialen Transport (Xiong et al., 1999) und dem Einfluss in der fetalen Lungenentwicklung (Bösl et al., 2001), ist für die vorliegende Dissertation vor allem der Einfluss von CIC-2 auf GABA-Kanäle in hippocampalen Zellen von größerer Bedeutung (Smith et al. 1995). Vermutet wird eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der GABAergen synaptischen Inhibition, was bei dem Ausfall von CIC-2 und der daraus resultierenden nervalen Übererregbarkeit, eine Ursache epileptischer Anfälle sein könnte (Rinke et al, 2010).

Immunhistochemische Untersuchungen, die diese Hypothese auf zellulärer Ebene erforschen, zeigen dass funktionelle CIC-2 Kanäle vorzugsweise mit, oder in der Nähe GABAerger Synapsen in Dendriten, Somata und dem axonalen Initialsegment von Pyramidenzellen nachgewiesen werden (Sik et al., 2000). In der vorliegenden Dissertation ergaben sich darüber hinaus mittels Anti-CIC2 Antikörperfärbungen und dem Markerprotein Ankyrin G, immunhistologisch Hinweise auf eine Kolo-kalisation von CIC-2 und GABA_A-Kanäle im AIS. Desweiteren deuten wir die überlappende Expression mit Gephyrin als Hinweis auf die Funktion von CIC-2 Kanälen in inhibitorischen

GABAergen Synapsen, in denen sie, durch Hyperpolarisation-induzierten Cl^- -Ausstrom, die niedrige intrazelluläre Cl^- -Konzentration wiederherstellen und somit eine wichtige Rolle in der Sicherstellung der neuronalen Erregbarkeit übernehmen könnten. Damit wäre bei einem Verlust der funktionalen CIC-2 Kanäle im neuronalen Netzwerk und der damit verbundenen erhöhten Exzitabilität des Systems durch die intrazelluläre Akkumulation von Cl^- -Ionen, eine Beteiligung bei der Pathogenese von idiopathisch generalisierten Epilepsien (IGE) denkbar.

Genauere Untersuchungen des zentralen Nervensystems (ZNS) von Knockout-Mäusen zeigten jedoch überraschenderweise die Entstehung ausgedehnter, spongiformer, flüssigkeitsgefüllter Vakuolen in der weißen Substanz des Gehirns und des Rückenmarks bei älteren Mäusen. Somit führte das Ausschalten des CLCN2-Gens bei den untersuchten Mäusen zur Leucoencephalopathie, was jedoch weder neurologische Defizite noch epileptische Anfälle nach sich zog. Diese Ergebnisse setzten die Funktion von CIC-2 in Gliazellen in einen Zusammenhang mit anderen Ionen und Wassertransportproteinen, die am elektrochemischen Gleichgewicht im ZNS beteiligt sind. Es liegt nahe, dass der Ausfall von CIC-2 Kanälen durch das Zerstören des elektrochemischen Gleichgewichts des oligodendrozytären-astrozytären Netzwerkes zur Bildung von myelinen Vakuolen führt. Hierfür vermitteln CIC-2 Kanäle im Zusammenspiel mit K^+ -Ionen, einen Cl^- -Ausstrom an den astrozytären Endstrecken (Blanz et al., 2007).

Die Bedeutung der CIC-2 Kanäle in Gliazellen wird zusätzlich durch den direkten immunhistochemischen Nachweis der Kanäle sowohl in den Endstrecken der Astrozyten im Neuropil, welches aus den nichtmyelinisierten Dendriten der benachbarten Zellen und Gliazellfortsätzen besteht, als auch um kleine Blutgefäße herum gestützt (Sík et al., 2000). Die CIC-2 Mutationen, die bei spezifischen Formen der menschlichen Leukoencephalopathie beschrieben werden (Depienne et al., 2013), bringen diese Rolle des Kanals in Gliazellen erneut zur Geltung.

4.5 Ausblick

Sämtliche in dieser Dissertation dargestellten Publikationen konnten CIC-2 Kanäle in unterschiedlichsten Systemen nachweisen und in den Zusammenhang mit wichtigen Funktionen stellen. Durch mehrere Studien haben sich die CIC-2 Kanäle als sehr wichtig für die Funktion von Gliazellen erwiesen. Ob und welche Rolle sie dabei in Neuronen spielen, bleibt weiterhin unklar. Die in dieser Dissertation gewonnenen Daten geben weitere Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen CIC-2 Kanälen und neuronalen Aktivitäten im Zusammenspiel mit dem GABAergen System. Die Expression im AIS (Sik et al. 2000), ein Teil des Axons an dem die Aktionspotentiale generiert werden, konnte hier nicht spezifisch nachgewiesen werden.

Zur Gewinnung neuer Kenntnisse ist die Möglichkeit des genauen und zuverlässigen Nachweises der Kanäle unabdingbar. Es können weiterhin neue Antikörperstudien durchgeführt sowie Knockout- Modell-Studien ausgeweitet werden. Hierfür wird das Generieren von fluoreszenz- oder Flag/Myc-markierten CIC2 Proteinen, das Expressieren dieser in Mausmodellen oder transfizierten Neuronen, *in vitro* und *in vivo*, und Entwickeln neuer, spezifischer Antikörper von Nöten sein.

5 ZUSAMMENFASSUNG

CIC-2 ist ein ubiquitär vorkommender Chloridkanal, der sowohl durch Hyperpolarisation und Zellvolumen als auch durch extrazelluläre Azidifizierung aktiviert werden kann und größte Selektivität für Cl⁻-Ionen beweist. In Neuronen sorgt der durch eine hyperpolarisierende Spannung aktivierte CIC-2 Strom dafür, dass die intrazelluläre Chloridionenkonzentration wieder erniedrigt wird. Dies spielt eine entscheidende Rolle bei der Gewährleistung der inhibitorischen GABA-Antwort. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von CIC-2 in Pyramidenzellen durch das Verhindern einer intrazellulären Akkumulation von Cl⁻-Ionen zu einer Verhinderung der exzitatorischen GABA-Antwort führt, womit den CIC-2 Kanälen eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der GABAergen synaptischen Inhibition zukommt. Desweiteren konnten in genetischen Studien CIC-2 Mutationen bei einigen Patienten, die an Idiopathischer Generalisierter Epilepsie (IGE) leiden, gefunden werden. Auch wenn hier die genetischen Daten nicht eindeutig sind, wird die Rolle des CIC-2 Kanals in Bezug auf die Regulierung der neuronalen Erregbarkeit von mehreren Gruppen nachgewiesen. In einer neueren Studie wurde gezeigt, dass Mutationen in CIC-2 eine spezifische Form der menschlichen Leukoenzephalopathie verursachen, was zusammen mit den Knockout-Maus-Daten auf eine mögliche Rolle des Kanals in Gliazellen hindeutet.

Ziel dieser Arbeit war es, vier neu entwickelte CIC-2 Antikörper zu testen und für die Untersuchung von Expressionsmustern in neuronalen Zellen zu verwenden. Nach dem Test in transfizierten HEK-Zellen und in einer Glioblastoma-Zelllinie wurde eine Reihe an Experimenten in neuronalen Primärkulturen mit zwei ausgewählten Antikörpern durchgeführt. Eine Kolokalisation mit Ankyrin G, einem Marker des axonalen Initialsegmentes (AIS) sowie mit Gephyrin, einem essentiellen postsynaptischen Anker-Protein in GABA_A-Rezeptor enthaltenden Synapsen, wurde immunhistochemisch für einen dieser Antikörper nachgewiesen. Dieser ist gegen die C-terminale Sequenz des CIC-2 Kanals gerichtet und wurde für die Analyse der

Mausschnitte weiterverwendet. Dabei wurde eine Expression der CIC-2 Kanäle im AIS suggeriert. Außerdem konnten bei der Untersuchung der ontogenetischen CIC-2 Expression in unterschiedlichen Hirnregionen frühe und relativ gleichmäßige Muster gezeigt werden. Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurden schließlich CIC-2 Knockout-Mäuse verwendet. Der erwartete Ausfall der Fluoreszenzfärbung konnte in hippocampalen Knockout-Neuronen in Kultur und in Kryoschnitten jedoch nicht reproduziert werden, was auf ein unspezifisches Binden der Antikörper hinweist.

Zur Gewinnung neuer Kenntnisse über die Rolle des CIC-2 Kanals in Neuronen sollten weitere Expressionsstudien durchgeführt werden.

6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Dendrogramm der CIC-Familie in Säugern (aus Stauber et al. 2012)	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines CIC-Kanals; Dimere Struktur mit zwei unabhängigen Poren, die von jeweils einer Untereinheit gebildet werden (aus Jentsch et al. 2002)	10
Abbildung 3: Zweidimensionale Projektionen der Kristallstruktur des EriC-Proteins (EcClCa); Zeigt eine symmetrische Struktur mit zwei dezentralen Regionen verminderter Elektronendichte, was Hinweis auf zwei unabhängige Poren des dimeren Kanals sein kann (aus Mindell et al. 2001).....	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Struktur einer StCIC Untereinheit. Die als Zylinder dargestellten α -Helices (A-R) sind gemäß den Untereinheiten in grün und blau dargestellt. Die roten Regionen entsprechen den Cl^- -Selektionsfilter-bildende Bereichen. Die mit + und - markierten Areale entsprechen den Partialladungen an den Enden der Helices, welche an der Bindung von Cl^- beteiligt sind, was die Dipolfunktion dieser Gebiete verdeutlichen soll (aus Dutzler et al. 2002).	11
Abbildung 5: LINKS: Schematische Darstellung der Struktur einer StCIC Untereinheit mit mutmaßlicher Lagebeziehung in der Membran. Die als Zylinder dargestellten α -Helices (A-R) sind gemäß den Untereinheiten in grün und blau dargestellt. Das permeierende Cl^- -Ion wird durch den roten Ball symbolisiert. Die roten Regionen entsprechen den Cl^- -Selektionsfilter-bildenden Bereichen. MITTE: Die Ionenbindungsstelle aus Sicht der Kontaktregion der beiden Untereinheiten. Die α -Helices sind hier als Bänder dargestellt. Die Seitenketten einzelner relevanter Aminosäuren sind stabförmig eingezeichnet. Die positiv geladenen N-Termini der Helices D, F und N sind blau gefärbt. Die wassergefüllten Vorhöfe, die von der extra- und der intrazellulären Seite bis zu dem Selektivitätsfilter reichen, sind als blaues Netz gezeichnet, das Cl^- -Ion als roter Ball. RECHTS: Gleiche Ansicht der Ionen-Bindungsstellen wie in der MITTE. Nur ausgewählte Aminosäuren und ihre Seitenketten in der Nähe der gebundenen Cl^- -Ionen sind stabförmig gestellt. Wasserstoffbrückenbindungen	

werden durch gestrichelte Linien und die Cl⁻-Ionen durch rote Bälle symbolisiert (LINKS & MITTE aus: Dutzler et al. 2002; RECHTS aus: Dutzler et al., 2003) 12

Abbildung 6: Lokalisation des embryonalen Hippocampus (Peacock, Rush, & Mathers, 1979) Die mediale Oberfläche der linken und rechten Hemisphäre eines Mäusefötus. *A* Bei vorhandenen Meningen zeigen typische Blutgefäße die Lage der hippocampalen Fissur (Pfeile) *B* Nach Entfernung der Meningen zeigt sich der Hippocampus als dunkles Band im Hirngewebe. 29

Abbildung 7: Schematische Darstellung der Antikörper-Antigen-vermittelten Fluoreszenzfärbung. Spezifischer Primärantikörper bindet direkt an das präsentierte Antigen und wird seinerseits spezifisch von einem oder mehreren Sekundärantikörpern gebunden. Der angeheftete fluoreszierende Farbstoff wurde in grün dargestellt. (Quelle: <http://www.bio.davidson.edu>)..... 34

Abbildung 8: Färbung mit WT-CIC2 transfizierter HEK-Zellen. Von oben nach unten wurden folgende Primärantikörper verwendet: Anti-CIC2-1; Anti-CIC2-2; Anti-CIC2-3; Anti-CIC2-4. Rot dargestellt ist der jeweilige Anti-CIC-2 Antikörper. Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (Blau). Maßstab 10µm..... 42

Abbildung 9: Färbung unterschiedlicher Ionenkanäle und Kanalkomponenten in SH-Zellen. Grün dargestellt sind die verwendeten Primärantikörper Anti-CIC2-1; Anti-CIC2-4; Gephyrin; sowie die Kontrollen *goat anti mouse* und *goat anti rabbit*. Die Kernfärbung mittels DAPI ist blau dargestellt. Maßstab 10µm 45

Abbildung 10: Kolokalisationsansatz in Div7 alten WT- Neuronen. Von links nach rechts sind die Färbungen Anti-CIC2-1; Anti-CIC2-4; Gephyrin; sowie MAP2 einzeln aufgeführt. In der rechten Spalte befindet sich die überlagerte Darstellung. Rot zeigen sich von oben nach unten die Färbungen Anti-CIC2-1; Anti-CIC2-4 sowie Gephyrin. Grün wird MAP2 dargestellt. Maßstab 10µm..... 48

Abbildung 11: Kolokalisationsansatz von Gephyrin und CIC2-4 in Div7 alten WT-Neuronen. Zu sehen sind die Einzelnen sowie die überlagerte Darstellung der Färbungen. Rot zeigen sich Gephyrin, Grün Anti-CIC2-4. Der weiße Kasten zeigt das Vergrößerungsfenster in regio des axonalen Initialsegments. Die Vergrößerungen sind in der rechten Spalte dargestellt. Maßstab 10µm. 49

Abbildung 12: Mikroskopische Bild der hippocampalen Region und Markierung der Regionen CA1/3 (Cornu ammonis) und DG (Gyrus dentatus)	50
Abbildung 13: Kolokalisation von CIC2 und Ankyrin G in unterschiedlichen Hirnregionen von P40 alten WT-Mäusen. Von unten nach oben sind die Hirnregionen Ctx; CA1; CA3 sowie DG abgebildet. Von links nach rechts betrachtet sieht man grün dargestellt Anti-CIC2-4 sowie Ankyrin G (rot) und die überlagerte Darstellung. Die blaue Kernfärbung erfolgte mittels DAPI. Maßstab 10µm.	52
Abbildung 14: Färbung des Ctx (Neokortex) in Kryoschnitten unterschiedlichen Alters von WT Mäusen. Von oben nach unten P5; P10; P20; P40. Grün dargestellt ist Anti-CIC2-4, rot Ankyrin G. Von links nach rechts sind die Färbungen einzeln aufgeführt. In der rechten Spalte befindet sich die überlagerte Darstellung. Blau erscheint die Kernfärbung mittels DAPI. Maßstab 10µm.	55
Abbildung 15: Färbung der Region CA1 (Cornu ammonis) in Kryoschnitten unterschiedlichen Alters von WT Mäusen. Von oben nach unten P5; P10; P20; P40. Grün dargestellt ist Anti-CIC2-4, rot Ankyrin G. Von links nach rechts sind die Färbungen einzeln aufgeführt. In der rechten Spalte befindet sich die überlagerte Darstellung. Blau erscheint die Kernfärbung mittels DAPI. Maßstab 10µm.	56
Abbildung 16: Färbung der Region CA3 (Cornu ammonis) in Kryoschnitten unterschiedlichen Alters von WT Mäusen. Von oben nach unten P5; P10; P20; P40. Grün dargestellt ist Anti-CIC2-4, rot Ankyrin G. Von links nach rechts sind die Färbungen einzeln aufgeführt. In der rechten Spalte befindet sich die überlagerte Darstellung. Blau erscheint die Kernfärbung mittels DAPI. Maßstab 10µm.	57
Abbildung 17: Färbung primärer, hippocampaler Neuronen mit unterschiedlicher CIC-2 Kanalexpression. Von links nach rechts aufgelistet sind WT (+/+); (+/-) und K.O(-/-). Die Abbildung ist in zwei Blöcken unterteilt. Oben Div18 Neurone , unten Div25. Als Anti-CIC-2 Antikörper wurde Anti-CIC2-4 (rot) verwendet. Grün erscheint die MAP2 Färbung. Die blau dargestellten Zellkerne wurden erneut mittel DAPI angefärbt. Maßstab 10µm.	59

Abbildung 18: CIC2-4 Färbung von Kryoschnitten unterschiedlicher CIC-2 Kanalexpression. Dargestellt ist oben Wildtyp (+/+) sowie K.O. (-/-) unten. Von oben nach unten ist grün Anti-CIC2-4 und rot Ankyrin G zu sehen. Maßstab 10µm.	61
Abbildung 19: CIC-2 Westen Blot Analyse in 1) transfizierten HEK-Zellen, 2) Kontrollgruppe, und 3) WT-Neuronen aus Ratten (Sík et al., 2000).	64

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Accardi, A., & Picollo, A. (2010). CLC channels and transporters: proteins with borderline personalities. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1798(8), 1457–1464.
- Amaral, D. G., & Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), 571–591. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2687721>
- Betz, H., Kuhse, J., Schmieden, V., Laube, B., Kirsch, J., & Harvey, R. J. (1999). Structure and functions of inhibitory and excitatory glycine receptors. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 868, 667–676. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb11343.x>
- Bezánilla, F. (2000). The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiological Reviews*, 80(2), 555–592. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10747201>
- Birkenhäger, R., Otto, E., Schürmann, M. J., Vollmer, M., Ruf, E. M., Maier-Lutz, I., ... Hildebrandt, F. (2001). Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nature Genetics*, 29(3), 310–314. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11687798>
- Blaisdell, C. J., Edmonds, R. D., Wang, X. T., Guggino, S., & Zeitlin, P. L. (2000). pH-regulated chloride secretion in fetal lung epithelia. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 278(6), L1248–L1255. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10835331>
- Blanz, J., Schweizer, M., Auberson, M., Maier, H., Muenscher, A., Hübner, C. a, & Jentsch, T. J. (2007). Leukoencephalopathy upon disruption of the chloride channel ClC-2. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(24), 6581–9. doi:10.1523/JNEUROSCI.0338-07.2007
- Blanz, J., & Zdebik, A. (n.d.). Krankheiten durch Mutationen in Chloridkanälen der ClC-Familie. *Biospektrum, ClC*.
- Bond, T. D., Ambikapathy, S., Mohammad, S., & Valverde, M. A. (1998). Osmosensitive Cl⁻ currents and their relevance to regulatory volume decrease in human intestinal T84 cells: outwardly vs. inwardly rectifying currents. *The Journal of Physiology*, 511(Pt 1), 45–54.
- Bormann, J. (2000). The “ABC” of GABA receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 21(1), 16–19. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10637650
- Bösl, M. R., Stein, V., Hübner, C., Zdebik, a a, Jordt, S. E., Mukhopadhyay, a K., ... Jentsch, T. J. (2001). Male germ cells and photoreceptors, both dependent on

- close cell-cell interactions, degenerate upon CIC-2 Cl⁻ channel disruption. *The EMBO Journal*, 20(6), 1289–99. doi:10.1093/emboj/20.6.1289
- Brandt, S., & Jentsch, T. J. (1995). CIC-6 and CIC-7 are two novel broadly expressed members of the CLC chloride channel family. *FEBS Letters*, 377(1), 15–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8543009>
- Carew, M. A., & Thorn, P. (1996). Identification of CIC-2-like chloride currents in pig pancreatic acinar cells. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 433(1-2), 84–90. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1007/s004240050252>
- Chebib, M., & Johnston, G. A. (1999). The “ABC” of GABA receptors: a brief review. *Clinical and Experimental Pharmacology Physiology*, 26(11), 937–940. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10561820>
- Chen, T. Y., & Miller, C. (1996). Nonequilibrium gating and voltage dependence of the CIC-0 Cl⁻ channel. *The Journal of General Physiology*, 108(4), 237–250. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2229332&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Chen, T.-Y. (2003). Coupling gating with ion permeation in CIC channels. *Sciences STKE Signal Transduction Knowledge Environment*, 2003(188), pe23.
- Chu, S., Murray, C. B., Liu, M. M., & Zeitlin, P. L. (1996). A short CIC-2 mRNA transcript is produced by exon skipping. *Nucleic Acids Research*, 24(17), 3453–3457.
- Chu, S., & Zeitlin, P. L. (1997). Alternative mRNA splice variants of the rat CIC-2 chloride channel gene are expressed in lung: genomic sequence and organization of CIC-2. *Nucleic Acids Research*, 25(20), 4153–4159. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=147000&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Cid, L. P., Niemeyer, M. I., Ramírez, A., & Sepúlveda, F. V. (2000). Splice variants of a CIC-2 chloride channel with differing functional characteristics. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 279(4), C1198–C1210.
- Clayton, G. H., Staley, K. J., Wilcox, C. L., Owens, G. C., & Smith, R. L. (1998). Developmental expression of CIC-2 in the rat nervous system. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 108(1-2), 307–18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9693808>
- Cossette, P., Liu, L., Brisebois, K., Dong, H., Lortie, A., Vanasse, M., ... Rouleau, G. A. (2002). Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nature Genetics*, 31(2), 184–189. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11992121>
- D'Agostino, D., Bertelli, M., Gallo, S., Cecchin, S., Albiero, E., Garofalo, P. G., ... Pandolfo, M. (2004). Mutations and polymorphisms of the CLCN2 gene in

- idiopathic epilepsy. *Neurology*, 63(8), 1500–1502. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15505175>
- Depienne, C., Bugiani, M., Dupuits, C., Galanaud, D., Touitou, V., Postma, N., ... van der Knaap, M. S. (2013). Brain white matter oedema due to ClC-2 chloride channel deficiency: an observational analytical study. *Lancet Neurology*, 12(7), 659–68. doi:10.1016/S1474-4422(13)70053-X
- Duan, D., Ye, L., Britton, F., Horowitz, B., & Hume, J. R. (2000). A novel anionic inward rectifier in native cardiac myocytes. *Circulation Research*, 86(4), E63–E71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10700456>
- Dutzler, R., Campbell, E. B., Cadene, M., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (2002). X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature*, 415(6869), 287–294. doi:10.1038/415287a 415287a
- Dutzler, R., Campbell, E. B., & MacKinnon, R. (2003). Gating the selectivity filter in ClC chloride channels. *Science*, 300(5616), 108–112. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12649487>
- Engh, A. M., Faraldo-Gómez, J. D., & Maduke, M. (2007). The Mechanism of Fast-Gate Opening in ClC-0. *The Journal of General Physiology*, 130(4), 335–349.
- Enz, R., Ross, B. J., & Cutting, G. R. (1999). Expression of the voltage-gated chloride channel ClC-2 in rod bipolar cells of the rat retina. *Journal of Neuroscience*, 19(22), 9841–9847. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10559393>
- Estévez, R., Boettger, T., Stein, V., Birkenhäger, R., Otto, E., Hildebrandt, F., & Jentsch, T. J. (2001). Barttin is a Cl⁻ channel beta-subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ secretion. *Nature*, 414(6863), 558–561. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11734858>
- Everett, K., Chioza, B., Aicardi, J., Aschauer, H., Brouwer, O., Callenbach, P., ... Gardiner, M. (2007). Linkage and mutational analysis of CLCN2 in childhood absence epilepsy. *Epilepsy Research*, 46(2), 145–153. Retrieved from <http://discovery.ucl.ac.uk/8217/>
- Fahlke, C., Knittle, T., Gurnett, C. A., Campbell, K. P., & George, A. L. (1997). Subunit Stoichiometry of Human Muscle Chloride Channels. *The Journal of General Physiology*, 109(1), 93–104. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2217051&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Fahlke, C., Rhodes, T. H., Desai, R. R., & George, A. L. (1998). Pore stoichiometry of a voltage-gated chloride channel. *Nature*, 394(6694), 687–690.
- Fisher, S. E., Black, G. C., Lloyd, S. E., Hatchwell, E., Wrong, O., Thakker, R. V., & Craig, I. W. (1994). Isolation and partial characterization of a chloride channel gene which is expressed in kidney and is a candidate for Dent's disease (an X-

- linked hereditary nephrolithiasis). *HumMolGenet*, 3(11), 2053–2059. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7874126>
- Földy, C., Lee, S.-H., Morgan, R. J., & Soltesz, I. (2010). Regulation of fast-spiking basket cell synapses by the chloride channel CIC-2. *Nature Neuroscience*, 13(9), 1047–9. doi:10.1038/nn.2609
- Fritsch, J., & Edelman, A. (1997). Osmosensitivity of the hyperpolarization-activated chloride current in human intestinal T84 cells. *American Journal of Physiology*, 272(3 Pt 1), C778–C786.
- Furukawa, T., Ogura, T., Katayama, Y., & Hiraoka, M. (1998). Characteristics of rabbit CIC-2 current expressed in *Xenopus* oocytes and its contribution to volume regulation. *American Journal of Physiology*, 274(2 Pt 1), C500–C512. Retrieved from <http://ajpcell.physiology.org/cgi/content/abstract/274/2/C500>
- Gardiner, R., & Lehesjoki, A. (2000). Genetics of the epilepsies. *Epilepsia*, 42 Suppl 5(2), 16–23. Retrieved from <http://discovery.ucl.ac.uk/24477/>
- Gardiner, R. M. (1999). Genetic basis of the human epilepsies. *Epilepsy Research*, 36(2-3), 91–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515157>
- Gründer, S., Thiemann, A., Pusch, M., & Jentsch, T. J. (1992). Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature*, 360(6406), 759–762. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1334533
- Gyömörey, K., Yeger, H., Ackerley, C., Garami, E., & Bear, C. E. (2000). Expression of the chloride channel CIC-2 in the murine small intestine epithelium. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 279(6), C1787–C1794. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11078693>
- Heron, S. E., Scheffer, I. E., Berkovic, S. F., Dibbens, L. M., & Mulley, J. C. (2007). Channelopathies in idiopathic epilepsy. *Neurotherapeutics the Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 4(2), 295–304. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17395140>
- Hübner, C. A., Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Meyer, T., Ballanyi, K., & Jentsch, T. J. (2001). Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron*, 30(2), 515–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11395011>
- Jentsch, T. J., Stein, V., Weinreich, F., & Zdebik, A. a. (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiological Reviews*, 82(2), 503–68. doi:10.1152/physrev.00029.2001
- Jentsch, T. J., Steinmeyer, K., & Schwarz, G. (1990). Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature*, 348(6301), 510–514. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2174129>

- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (2003). X-ray structure of a voltage dependent K⁺ channel. *Nature*, *423*(1 may 2003), 33–41.
- Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A., & MacKinnon, R. (2003). The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, *423*(6935), 42–48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12721619>
- Jordt, S. E., & Jentsch, T. J. (1997). Molecular dissection of gating in the CIC-2 chloride channel. *The The European Molecular Biology Organization Journal*, *16*(7), 1582–1592. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9130703
- Kaila, K., Lamsa, K., Smirnov, S., Taira, T., & Voipio, J. (1997). Long-lasting GABA-mediated depolarization evoked by high-frequency stimulation in pyramidal neurons of rat hippocampal slice is attributable to a network-driven, bicarbonate-dependent K⁺ transient. *Journal of Neuroscience*, *17*(20), 7662–7672. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9315888>
- Kananura, C., Haug, K., Sander, T., Runge, U., Gu, W., Hallmann, K., ... Steinlein, O. K. (2002). A splice-site mutation in GABRG2 associated with childhood absence epilepsy and febrile convulsions. *Archives of Neurology*, *59*(7), 1137–1141. Retrieved from <http://archneur.ama-assn.org/cgi/doi/10.1001/archneur.59.7.1137>
- Kawasaki, M., Uchida, S., Monkawa, T., Miyawaki, A., Mikoshiba, K., Marumo, F., & Sasaki, S. (1994). Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells. *Neuron*, *12*(3), 597–604. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8155321>
- Kirk, K. L. (2000). Chloride channels and tight junctions. Focus on “Expression of the chloride channel CIC-2 in the murine small intestine epithelium”. *American Journal of Physiology Cell Physiology*.
- Koch, M. C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M., ... Jentsch, T. J. (1992). The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science*, *257*(5071), 797–800. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1379744
- Kornak, U., Kasper, D., Bösl, M. R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., ... Jentsch, T. J. (2001). Loss of the CIC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell*, *104*(2), 205–215. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207362>
- Kullmann, D. (2002). Genetics of epilepsy. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *73* Suppl 2(Suppl 2), 1132–1135. Retrieved from <http://discovery.ucl.ac.uk/70380/>
- Kullmann, D. M. (2003). Epilepsy and genetics. *The Neurologist*, *123*(3), 317–321. Retrieved from <http://discovery.ucl.ac.uk/70412/>

- Labarca, C., Schwarz, J., Deshpande, P., Schwarz, S., Nowak, M. W., Fonck, C., ... Lester, H. A. (2001). Point mutant mice with hypersensitive alpha 4 nicotinic receptors show dopaminergic deficits and increased anxiety. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), 2786–2791. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=30217&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lehmann-Horn, F., & Jurkat-Rott, K. (1999). Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiological Reviews*, 79(4), 1317–1372. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10508236
- Lloyd, S. E., Pearce, S. H. S., Fisher, S. E., Steinmeyer, K., Schwappach, B., Scheinman, S. J., ... Thakker, R. V. (1996). A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature*, 379(6564), 445–449. doi:10.1038/379445a0
- Loewen, M. E., Macdonald, D. W., Gaspar, K. J., & Forsyth, G. W. (2000). Isoform-specific Exon Skipping in a Valiant Form of Clc-2. *Biochimica Et Biophysica Acta Gene Structure and Expression*, 1493(1-2), 284–288.
- Ludewig, U., Pusch, M., & Jentsch, T. J. (1996). Two physically distinct pores in the dimeric ClC-0 chloride channel. *Nature*, 383(6598), 340–343. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8848047>
- Malinowska, D. H., Kupert, E. Y., Bahinski, A., Sherry, A. M., & Cuppoletti, J. (1995). Cloning, functional expression, and characterization of a PKA-activated gastric Cl-channel. *American Journal of Physiology*, 268(1 Pt 1), C191–C200. Retrieved from <http://ajpcell.physiology.org/cgi/reprint/268/1/C191.pdf>
- Matsumura, Y., Uchida, S., Kondo, Y., Miyazaki, H., Ko, S. B., Hayama, A., ... Marumo, F. (1999). Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel. *Nature Genetics*, 21(1), 95–98. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9916798>
- Middleton, R. E., Pheasant, D. J., & Miller, C. (1996). Homodimeric architecture of a ClC-type chloride ion channel. *Nature*, 383(6598), 337–340. Retrieved from <http://www.nature.com/doi/10.1038/383337a0>
- Miles, R. (1999). Neurobiology. A homeostatic switch. *Nature*.
- Miller, C. (1982). Open-state substructure of single chloride channels from Torpedo electroplax. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences*, 299(1097), 401–411. Retrieved from <http://rstb.royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.1982.0140>
- Mindell, J. A., Maduke, M., Miller, C., & Grigorieff, N. (2001). Projection structure of a ClC-type chloride channel at 6.5 Å resolution. *Nature*, 409(6817), 219–223. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11196649

- Misgeld, U., Deisz, R. A., Dodt, H. U., & Lux, H. D. (1986). The role of chloride transport in postsynaptic inhibition of hippocampal neurons. *Science*, 232(4756), 1413–1415. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2424084>
- Mladinić, M., Becchetti, a, Didelon, F., Bradbury, a, & Cherubini, E. (1999). Low expression of the ClC-2 chloride channel during postnatal development: a mechanism for the paradoxical depolarizing action of GABA and glycine in the hippocampus. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 266(1425), 1207–13. doi:10.1098/rspb.1999.0764
- Mohammad-Panah, R., Gyomory, K., Rommens, J., Choudhury, M., Li, C., Wang, Y., & Bear, C. E. (2001). ClC-2 contributes to native chloride secretion by a human intestinal cell line, Caco-2. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 8306–8313. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11096079>
- Mulley, J. C., Scheffer, I. E., Petrou, S., & Berkovic, S. F. (2003). Channelopathies as a genetic cause of epilepsy. *Current Opinion in Neurology*, 16(2), 171–176. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12644745>
- Murray, C. B., Chu, S., & Zeitlin, P. L. (1996). Gestational and tissue-specific regulation of ClC-2 chloride channel expression. *American Journal of Physiology*, 271(5 Pt 1), L829–L837.
- Murray, C. B., Morales, M. M., Flotte, T. R., McGrath-Morrow, S. A., Guggino, W. B., & Zeitlin, P. L. (1995). ClC-2: a developmentally dependent chloride channel expressed in the fetal lung and downregulated after birth. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 12(6), 597–604.
- Nascimento, D. S., Reis, C. U., Goldenberg, R. C., Ortiga-Carvalho, T. M., Pazos-Moura, C. C., Guggino, S. E., ... Morales, M. M. (2003). Estrogen modulates ClC-2 chloride channel gene expression in rat kidney. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 446(5), 593–599.
- Nehrke, K., Arreola, J., Nguyen, H.-V., Pilato, J., Richardson, L., Okunade, G., ... Melvin, J. E. (2002). Loss of hyperpolarization-activated Cl(-) current in salivary acinar cells from Clcn2 knockout mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(26), 23604–11. doi:10.1074/jbc.M202900200
- Ornellas, D. S., Nascimento, D. S., Christoph, D. H., Guggino, W. B., & Morales, M. M. (2002). Aldosterone and high-NaCl diet modulate ClC-2 chloride channel gene expression in rat kidney. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 444(1-2), 193–201. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11976932>
- Pannabecker, T. L., Dahlmann, A., Brokl, O. H., & Dantzer, W. H. (2000). Mixed descending- and ascending-type thin limbs of Henle's loop in mammalian renal inner medulla. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 278(2), F202–F208.
- Peacock, J. H., Rush, D. F., & Mathers, L. H. (1979). Morphology of dissociated hippocampal cultures from fetal mice. *Brain Research*, 169(2), 231–246.

- Piwon, N., Günther, W., Schwake, M., Bösl, M. R., & Jentsch, T. J. (2000). CIC-5 Cl⁻ channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature*, 408(6810), 369–373. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11099045>
- Plank, C., Schillinger, U., Scherer, F., Bergemann, C., Rémy, J.-S., Krötz, F., ... Rosenecker, J. (2003). The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biological Chemistry*, 384(5), 737–747. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12817470>
- Protopopov, A. I., Gizatullin, R. Z., Vorobieva, N. V., Protopopova, M. V., Kiss, C., Kashuba, V. I., ... Zabarovsky, E. R. (1996). Human chromosome 3: high-resolution fluorescence in situ hybridization mapping of 40 unique NotI linking clones homologous to genes and cDNAs. *Chromosome Research an International Journal on the Molecular Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, 4(6), 443–447.
- Ramjeesingh, M., Li, C., Huan, L. J., Garami, E., Wang, Y., & Bear, C. E. (2000). Quaternary structure of the chloride channel CIC-2. *Biochemistry*, 39(45), 13838–47. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11076524>
- Rinke, I., Artmann, J., & Stein, V. (2010). CIC-2 voltage-gated channels constitute part of the background conductance and assist chloride extrusion. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(13), 4776–86. doi:10.1523/JNEUROSCI.6299-09.2010
- Ross, S. A., Wong, J. Y., Clifford, J. J., Kinsella, A., Massalas, J. S., Horne, M. K., ... Drago, J. (2000). Phenotypic characterization of an alpha 4 neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knock-out mouse. *Journal of Neuroscience*, 20(17), 6431–6441. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10964949>
- Saint-Martin, C., Gauvain, G., Teodorescu, G., Gourfinkel-An, I., Fedirko, E., Weber, Y. G., ... Depienne, C. (2009). Two novel CLCN2 mutations accelerating chloride channel deactivation are associated with idiopathic generalized epilepsy. *Human Mutation*, 30(3), 397–405. doi:10.1002/humu.20876
- Sander, T., Schulz, H., Saar, K., Gennaro, E., Riggio, M. C., Bianchi, A., ... Reis, A. (2000). Genome search for susceptibility loci of common idiopathic generalised epilepsies. *Human Molecular Genetics*, 9(10), 1465–1472. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10888596>
- Santos Ornellas, D., Grozovsky, R., Goldenberg, R. C., Carvalho, D. P., Fong, P., Guggino, W. B., & Morales, M. (2003). Thyroid hormone modulates CIC-2 chloride channel gene expression in rat renal proximal tubules. *The Journal of Endocrinology*, 178(3), 503–511. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12967341>
- Saviane, C., Conti, F., & Pusch, M. (1999). The Muscle Chloride Channel CIC-1 Has a Double-Barreled Appearance that Is Differentially Affected in Dominant and Recessive Myotonia. *The Journal of General Physiology*, 113(3), 457–468. Retrieved from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2222904&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Scheffer, I. E., & Berkovic, S. F. (2003). The problem of genetics in epilepsy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 10(8), 639–646. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614703001949>
- Schwiebert, E. M., Cid-Soto, L. P., Stafford, D., Carter, M., Blaisdell, C. J., Zeitlin, P. L., ... Cutting, G. R. (1998). Analysis of ClC-2 channels as an alternative pathway for chloride conduction in cystic fibrosis airway cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(7), 3879–3884. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9520461
- Sik, a, Smith, R. L., & Freund, T. F. (2000). Distribution of chloride channel-2-immunoreactive neuronal and astrocytic processes in the hippocampus. *Neuroscience*, 101(1), 51–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11068136>
- Simon, D. B., Bindra, R. S., Mansfield, T. A., Nelson-Williams, C., Mendonca, E., Stone, R., ... Lifton, R. P. (1997). Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nature Genetics*, 17(2), 171–178.
- Smith, R. L., Clayton, G. H., Wilcox, C. L., Escudero, K. W., & Staley, K. J. (1995). Differential expression of an inwardly rectifying chloride conductance in rat brain neurons: a potential mechanism for cell-specific modulation of postsynaptic inhibition. *Journal of Neuroscience*, 15(5 Pt 2), 4057–4067. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7751965>
- Staley, K. (1994). The role of an inwardly rectifying chloride conductance in postsynaptic inhibition. *Journal of Neurophysiology*, 72(1), 273–284. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7965011>
- Staley, K. J., Soldo, B. L., & Proctor, W. R. (1995). Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABAA receptors. *Science*, 269(5226), 977–981. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7638623>
- Staley, K., Smith, R., Schaack, J., Wilcox, C., & Jentsch, T. J. (1996). Alteration of GABAA receptor function following gene transfer of the CLC-2 chloride channel. *Neuron*, 17(3), 543–551. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627300801865>
- Stauber, T., Weinert, S., & Jentsch, T. J. (2012). Cell biology and physiology of CLC chloride channels and transporters. *Comprehensive Physiology*, 2(3), 1701–44. doi:10.1002/cphy.c110038
- Steinmeyer, K., Lorenz, C., Pusch, M., Koch, M. C., & Jentsch, T. J. (1994). Multimeric structure of ClC-1 chloride channel revealed by mutations in dominant myotonia congenita (Thomsen). *The European Molecular Biology Organization Journal*, 13(4), 737–743. Retrieved from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8112288

- Steinmeyer, K., Ortland, C., & Jentsch, T. J. (1991). Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature*, 354(6351), 301–304. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1659664>
- Stobrawa, S. M., Breiderhoff, T., Takamori, S., Engel, D., Schweizer, M., Zdebik, A. A., ... Jentsch, T. J. (2001). Disruption of ClC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron*, 29(1), 185–196. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11182090>
- Stogmann, E., Lichtner, P., Baumgartner, C., Schmied, M., Hotzy, C., Asmus, F., ... Zimprich, A. (2006). Mutations in the CLCN2 gene are a rare cause of idiopathic generalized epilepsy syndromes. *Neurogenetics*, 7(4), 265–268. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16932951>
- Striano, P., Bianchi, A., Zara, F., & Minetti, C. (1995). Genetics and epilepsy. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 49(3), 29–38. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18472482
- Stühmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X. D., Noda, M., Yahagi, N., ... Numa, S. (1989). Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature*, 339(6226), 597–603. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2543931>
- Thiemann, A., Gründer, S., Pusch, M., & Jentsch, T. J. (1992). A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature*, 356(6364), 57–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1311421>
- Treiman, D. M. (2001). GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia*, 42 Suppl 3(2), 8–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520315>
- Van Slegtenhorst, M. A., Bassi, M. T., Borsani, G., Wapenaar, M. C., Ferrero, G. B., De Conciliis, L., ... Ballabio, A. (1994). A gene from the Xp22.3 region shares homology with voltage-gated chloride channels. *Human Molecular Genetics*, 3(4), 547–552.
- Verkman, A. S., & Galletta, L. J. V. (2009). Chloride channels as drug targets. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 8(2), 153–171. doi:10.1038/nrd2780
- Wang, S. S., Devuyst, O., Courtoy, P. J., Wang, X. T., Wang, H., Wang, Y., ... Guggino, W. B. (2000). Mice lacking renal chloride channel, CLC-5, are a model for Dent's disease, a nephrolithiasis disorder associated with defective receptor-mediated endocytosis. *Human Molecular Genetics*, 9(20), 2937–2945. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11115837

- Weinreich, F., & Jentsch, T. J. (2001). Pores formed by single subunits in mixed dimers of different CLC chloride channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(4), 2347–2353. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11035003>
- Xiong, H., Li, C., Garami, E., Wang, Y., Ramjeesingh, M., Galley, K., & Bear, C. E. (1999). Membrane Biology ClC-2 Activation Modulates Regulatory Volume Decrease. *Regulation*, 221(3), 215–221. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9929373>

DANKSAGUNG

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. H. Lerche, für die Möglichkeit der Promotion im Hertie-Institut für klinische Hirnforschung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Snezana Maljevic für die Einführung in die experimentelle Medizin sowie für die liebevolle und tatkräftige Unterstützung während der gesamten Zeit.

Ebenfalls danken möchte ich Frau Tomoko Hemmi für die jahrelange Begleitung.