

Aus dem Leibniz - Institut für Molekulare Pharmakologie und dem  
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin - Buch

DISSERTATION

Die Bedeutung von CIC-3 für die Neurotransmission

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dorothea Anni Deuschel

aus Wangen im Allgäu

Datum der Promotion: 27.02.2015

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis .....	V
Akürzungsverzeichnis .....	VI
Abstract (deutsch) .....	IX
Abstract (englisch) .....	XI
1 Einleitung.....	1
1.1 Ionentransport.....	1
1.2 Chloridkanäle.....	3
1.3 Die CIC – Familie: eine Familie von $\text{Cl}^-$ -Kanälen und $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauschern.....	4
1.3.1 Molekulare Struktur .....	6
1.3.2 CIC-3 – ein $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher auf synaptischen Vesikeln und endosomalen Kompartimenten.....	12
1.3.2.1 Gewebeverteilung und subzelluläre Lokalisation von CIC-3.....	12
1.3.2.2 Physiologische Rolle.....	13
1.3.3 CIC-4.....	16
1.3.4 Knockout- und Knockin-Mausmodelle von CIC-3 und CIC-4 .....	17
1.3.5 Beginn der hippocampalen Neurodegeneration in $\text{Clcn3}^{-/-}$ -Mäusen.....	20
1.4 Synaptische Transmission .....	21
1.4.1 Synaptische Vesikel .....	21
1.4.2 Quantale Beschaffenheit der synaptischen Transmission .....	22
1.5 Der Hippocampus .....	24
1.6 Fragestellung .....	25
2 Material und Methoden.....	27
2.1 Material.....	27

2.1.1	Lösungen und Medien .....	27
2.1.2	Oligonukleotide .....	28
2.1.2.1	Primer für Genotypisierung .....	28
2.1.3	Mauslinien .....	28
2.2	Methoden .....	29
2.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	29
2.2.1.1	Alkalische Lyse von Schwanzbiopsien zur DNA-Extraktion ( <i>Hot-shot</i> -Methode) . .....	29
2.2.1.2	PCR (Polymerase-Kettenreaktion) .....	29
2.2.1.3	DNA-Gelelektrophorese .....	30
2.2.2	Elektrophysiologie .....	30
2.2.2.1	Prinzip der <i>Patch-Clamp</i> -Technik .....	30
2.2.2.2	Geräte .....	31
2.2.2.3	Elektrophysiologie an hippocampalen Akutschnitten .....	32
2.2.2.3.1	Präparation von transversalen Akutschnitten des Hippocampus für Elektrophysiologie .....	32
2.2.2.3.2	<i>Patch-Clamp</i> -Messungen an Pyramidenzellen im Hippocampus .....	32
2.2.2.3.3	Messung inhibitorischer postsynaptischer Miniaturströme ( <i>mIPSCs</i> ) .....	33
2.2.2.3.4	Messung exzitatorischer postsynaptischer Miniaturströme ( <i>mEPSCs</i> ) .....	34
2.2.2.4	Statistische Auswertung .....	34
3	Ergebnisse .....	35
3.1	Inhibitorische postsynaptische Miniaturströme in <i>Clcn3</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen sind nicht verändert..	35
3.2	Inhibitorische postsynaptische Miniaturströme im <i>C1C-3unc</i> -Mausmodell .....	37
3.2.1	Inhibitorische postsynaptische Miniaturströme in <i>Clcn3</i> <sup>unc/unc</sup> und <i>Clcn4</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen .	37
3.2.2	Inhibitorische postsynaptische Miniaturströme in <i>Clcn3</i> <sup>unc/unc</sup> / <i>Clcn4</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	39

3.3	Exzitatorische postsynaptische Miniaturströme im CIC-3 <i>unc</i> -Mausmodell .....	41
3.4	Heterodimerisierung von CIC-3 und CIC-4.....	43
4	Diskussion.....	47
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	47
4.2	CIC-3 – wichtige Cl <sup>-</sup> -Leitfähigkeit im Modell der vesikulären Neurotransmitteraufnahme? .....	47
4.2.1	Inhibitorische synaptische Transmission im <i>Clcn3</i> <sup>-/-</sup> .....	49
4.2.2	Rolle von CIC-3 als Cl <sup>-</sup> /H <sup>+</sup> -Austauscher für die inhibitorische synaptische Transmission .....	53
4.2.3	Rolle von CIC-3 als Cl <sup>-</sup> /H <sup>+</sup> -Austauscher für exzitatorische synaptische Transmission	54
4.3	CIC-3 stabilisiert die Expression von CIC-4 .....	56
4.4	Ausblick.....	57
5	Zusammenfassung.....	61
6	Literaturverzeichnis .....	63

Eidesstattliche Versicherung

Lebenslauf

Danksagung

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b>	Struktur der CLCs.....	8
<b>Abbildung 2</b>	Ionentransportpfad der CLCs.....	11
<b>Abbildung 3</b>	CIC-3 lokalisiert auf GABAergen und glutamatergen synaptischen Vesikeln. ....	13
<b>Abbildung 4</b>	Modell der vesikulären Ansäuerung und Neurotransmitteraufnahme. ....	15
<b>Abbildung 5</b>	Neuronaler Phänotyp der <i>Clcn3<sup>-/-</sup></i> -Maus. ....	18
<b>Abbildung 6</b>	Expression von CIC-4 im Gehirn in <i>Clcn3<sup>-/-</sup></i> - und <i>Clcn3<sup>unc/unc</sup></i> -Mäusen verglichen mit <i>Clcn3<sup>+/+</sup></i> -Mäusen. ....	19
<b>Abbildung 7</b>	Neuronaler Schaltkreis des Hippocampus.....	24
<b>Abbildung 8</b>	Vereinfachtes Schaltbild eines <i>Patch-Clamp</i> -Verstärkers bei einer <i>Patch-Clamp</i> -Ableitung in Ganzzellkonfiguration.....	31
<b>Abbildung 9</b>	Degeneration des Hippocampus in <i>Clcn3<sup>-/-</sup></i> -Mäusen.....	21
<b>Abbildung 10</b>	Inhibitorische Miniaturströme ( <i>mIPSCs</i> ) in CA1-Pyramidenzellen von <i>Clcn3<sup>+/+</sup></i> - und <i>Clcn3<sup>-/-</sup></i> -Mäusen.....	36
<b>Abbildung 11</b>	Inhibitorische Miniaturströme ( <i>mIPSCs</i> ) in CA1-Pyramidenzellen von <i>Clcn3<sup>unc/unc</sup></i> - und <i>Clcn3<sup>+/+</sup></i> -Mäusen.....	38
<b>Abbildung 12</b>	Inhibitorische Miniaturströme ( <i>mIPSCs</i> ) in CA1-Pyramidenzellen von <i>Clcn4<sup>-/-</sup></i> - und <i>Clcn4<sup>+/+</sup></i> -Mäusen.....	39
<b>Abbildung 13</b>	Inhibitorische Miniaturströme ( <i>mIPSCs</i> ) in CA1-Pyramidenzellen von <i>Clcn3<sup>+/+</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup></i> - und <i>Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup></i> -Mäusen. ....	40
<b>Abbildung 14</b>	Exzitatorische Miniaturströme ( <i>mEPSCs</i> ) in CA1-Pyramidenzellen von <i>Clcn3<sup>+/+</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup></i> - und <i>Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup></i> -Mäusen.....	42
<b>Abbildung 15</b>	Subzelluläre Lokalisation von CIC-3 und CIC-4. ....	44
<b>Abbildung 16</b>	Koimmunpräzipitation von CIC-3 und CIC-4.....	45
<b>Abbildung 17</b>	Modell der vesikulären Neurotransmitteraufnahme.....	48

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1</b>	Die wichtigsten freien Ionen einer Säuger-Skelettmuskelzelle.....	3
<b>Tabelle 2</b>	Die ClC - Familie der Säuger. ....	5
<b>Tabelle 3</b>	Lösungen und Medien. ....	27
<b>Tabelle 4</b>	Primer für Genotypisierung. ....	28
<b>Tabelle 5</b>	PCR-Protokoll. ....	29

## Abkürzungsverzeichnis

+/+	Wildtyp
-/-	Knockout
A	Ampere
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ACSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basen
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
C	Kapazität
CBS	<i>Cystathionine-Beta-Synthase</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CA1	Cornu ammonis, Region im Hippocampus
CA3	Cornu ammonis, Region im Hippocampus
CFTR	Cystische-Fibrose-Transmembran-Leitfähigkeits-Regulator
COS-7-Zellen	Fibroblasten-Zelllinie, aus Nierengewebe der grünen Meerkatze ( <i>Cercopithecus aethiops</i> ) gewonnen
$\Delta\text{pH}$	pH-Gradient über der Membran
$\Delta\Psi$	elektrischer Gradient über der Membran
D-AP5	D-(-)-2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ER	endoplasmatisches Reticulum
g	Gramm
G	giga

GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Hz	Hertz
I	Strom
k	kilo
KO	Knockout
KS-Test	Kolmogorov-Smirnov-Test
l	Liter
<i>LDCVs</i>	große elektronendichte Vesikel
LoxP	<i>Locus of X-ing Over</i> , Erkennungssequenz der <i>Cre</i> -Rekombinase
m	mili
M	molar
$\mu$	micro
<i>mEPSCs</i>	exzitatorische postsynaptische Miniaturströme
min	Minute
<i>mIPSCs</i>	inhibitorische postsynaptische Miniaturströme
mm	Milimeter
mmHg	Milimeter Quecksilbersäule
n	nano bzw. Anzahl
N	Anzahl
N-Terminus	Amino-Terminus
NBQX	<i>2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline-2,3-dione</i>
$\Omega$	Ohm
osml	osmol
PC12-Zellen	Von einem Phäochromozytom des Nebennierenmarks einer Ratte abstammende Zellen
R	elektrischer Widerstand
p	pico bzw. Signifikanzwert
P	Alter der Maus in Tagen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ROS	reaktive Sauerstoffspezies

s	Sekunde
S.E.M.	Standardfehler
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
<i>SSVs</i>	kleine synaptische Vesikel
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>TMD</i>	transmembranäre Domäne
TTX	Tetrodotoxin
U	Spannung
unc/unc	entkoppelte Mutante (vgl. Kap. 1.3.1)
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
V	Volt
WT	Wildtyp

### Abstract (deutsch)

CIC-3, ein  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher, der auf endosomalen Kompartimenten und synaptischen Vesikeln von Neuronen lokalisiert ist, scheint im Gehirn eine bedeutende Rolle zu spielen, da die Abwesenheit von CIC-3 im Knockout-Mausmodell zu Neurodegeneration mit vollständigem Verlust des Hippocampus führt. Es wird angenommen, dass CIC-3 einen Ausgleichsstrom aus negativ geladenen Chloridionen für die elektrogen arbeitende Protonenpumpe liefert und so zur Akkumulation von  $\text{Cl}^-$ -Ionen in synaptische Vesikel und zu deren Ansäuerung und dadurch zur vesikulären Neurotransmitteraufnahme beiträgt. Die genaue Funktion von CIC-3 im Gehirn, insbesondere seine Rolle bei der GABAergen und glutamatergen Neurotransmission, ist umstritten. Zur Untersuchung dieser wurden in der vorliegenden Arbeit anhand von Knockout- und Knockin-Mausmodellen von CIC-3 und -4 unter Verwendung der *Patch-Clamp*-Technik elektrophysiologische Experimente an hippocampalen Akutschnitten durchgeführt und GABAerge sowie glutamaterge postsynaptische Miniaturströme (*mIPSCs/ mEPSCs*) an hippocampalen CA1-Pyramidenzellen abgeleitet.

Um die Bedeutung von CIC-3 für die GABA-Aufnahme in synaptische Vesikel von Neuronen und seinen Einfluss auf die Quantengröße von inhibitorischen Synapsen zu untersuchen, wurden zunächst *mIPSCs* in CA1-Pyramidenzellen in *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäusen abgeleitet. Um außerdem die physiologische Relevanz der  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher-Funktion von CIC-3 für die GABAerge synaptische Transmission zu untersuchen, sollten *mIPSCs* in einer CIC-3-*unc*-Mutante untersucht werden, in welcher CIC-3 anstelle seiner  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher-Funktion eine reine  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit aufweist. Dafür wurden *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäuse verwendet. In *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäusen kann CIC-4 jedoch vermutlich für die Abwesenheit der  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher-Funktion von CIC-3 kompensieren. Aus diesem Grund wurden außerdem *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäuse generiert, die nun tatsächlich eine CIC-3-*unc* – Mausmutante darstellen sollten, da CIC-4 fehlt und die  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher-Funktion von CIC-3 nicht mehr ausgleichen kann. *mIPSCs* wurden in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen, sowie in den einfachen *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*- und *Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mausmodellen, abgeleitet. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Amplitude der *mIPSCs*, die ein Maß für die vesikuläre GABA-Konzentration darstellt, in keinem der untersuchten Mausmodelle verändert war. Auch die Frequenz der *mIPSCs*, ein Maß für die Anzahl der Synapsen und für die Wahrscheinlichkeit der spontanen Vesikelentleerung, war unverändert. Einzig in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen war die Frequenz der *mIPSCs* leicht vermindert,

was wahrscheinlich auf bereits einsetzende neurodegenerative Prozesse zurückzuführen war. Auch die glutamatergen exzitatorischen Miniaturströme, die an CA1-Pyramidenzellen von *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen abgeleitet wurden, waren in ihrer Amplitude im Vergleich zu *Clcn3<sup>+/+</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen unverändert. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass CIC-3 für die Aufnahme von GABA und Glutamat in synaptische Vesikel keine bedeutende Rolle spielt. Für die stabile Expression von CIC-4 im Gehirn spielt das Vorhandensein von CIC-3 eine wichtige Rolle, die aber nicht auf dessen Funktion als  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher beruht, da die Expression von CIC-4 in *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäusen, nicht aber in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäusen, deutlich vermindert war.

### Abstract (englisch)

CIC-3, a  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -exchanger, is located on endosomal compartments and synaptic vesicles in neurons. It seems to play a pivotal role in the brain, as the absence of CIC-3 in the knockout mouse model leads to a severe neurodegeneration involving the complete loss of the hippocampus. It is assumed that CIC-3 provides a countercurrent of negative chloride ions for the electrogenic  $\text{H}^+$ -ATPase thereby contributing to the vesicular  $\text{Cl}^-$  accumulation, to the acidification of synaptic vesicles and finally to the neurotransmitter uptake into synaptic vesicles. The precise function of CIC-3 in the brain and particularly its role in the GABAergic and glutamatergic neurotransmission is controversial. For its further investigation electrophysiological experiments using the patch-clamp technique were performed on hippocampal acute slices of CIC-3 and CIC-4 knockout and knockin mouse models and miniature GABAergic as well as glutamatergic postsynaptic currents (mIPSCs/mEPSCs) were recorded from hippocampal CA1 pyramidal cells.

To investigate the role of CIC-3 in the GABA uptake into synaptic vesicles of neurons and its impact on the quantal size at inhibitory synapses, mIPSCs were initially recorded in *Clcn3*<sup>-/-</sup> mice. To furthermore examine the physiological relevance of the putative function of CIC-3 as a  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -exchanger for the GABAergic synaptic transmission, mIPSCs were supposed to be analyzed in a CIC-3<sup>unc</sup> mutant in which CIC-3 shows a pure  $\text{Cl}^-$  conductance instead of a  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -exchange function. For this purpose *Clcn3*<sup>unc/unc</sup> mice were used. However in *Clcn3*<sup>unc/unc</sup> mice CIC-4 may presumably compensate for the absence of the  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -exchange function of CIC-3. For this reason *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup> mice were generated, actually constituting a CIC-3<sup>unc</sup> mutant now as CIC-4 is absent and cannot compensate for the  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -exchange function of CIC-3 anymore. mIPSCs were recorded in *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup> mice as well as in the single *Clcn3*<sup>unc/unc</sup> and *Clcn4*<sup>-/-</sup> mouse models. In the present study the amplitude of the mIPSCs which is a measurement for the vesicular GABA concentration was not changed in any of the analyzed mouse models. Also the frequency of the mIPSCs, constituting a measurement for the number of synapses and for the probability of the spontaneous release of synaptic vesicles was not changed. Only in *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup> mice the frequency of the mIPSCs was slightly reduced, likely being explained by the beginning process of neurodegeneration. Also the miniature glutamatergic postsynaptic currents that were recorded from CA1 pyramidal cells of *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup> mice were not changed compared to *Clcn3*<sup>+/+</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup> mice. The results of the present study suggest that CIC-3 does not play an important role neither in

the uptake of GABA nor in the uptake of glutamate into synaptic vesicles. It was shown that the presence of ClC-3 plays an important role in the stable expression of ClC-4 in the brain. But this does not rely on the putative  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -exchange function of ClC-3 as the expression of ClC-4 was strongly reduced in *Clcn3*<sup>-/-</sup> mice but not in *Clcn3*<sup>unc/unc</sup> mice. The important function of ClC-3 in the brain underlying the considerable neurodegeneration in the absence of ClC-3 remains unexplained. However, in the present study it could be shown that the quantal size at GABAergic and glutamatergic synapses is neither affected by the absence of ClC-3 nor by the loss of its  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -exchange function.

# 1 Einleitung

## 1.1 Ionentransport

Die Zelle stellt die kleinste lebende Einheit dar. Durch ihre Zellmembran grenzt sie ihr inneres Milieu vom Extrazellularraum ab. Die Zellmembran ist eine Lipid-Doppelschicht aus amphiphatischen Lipiden, die nur für lipophile Moleküle und Gase, sowie für kleine polare Moleküle wie beispielsweise Wasser und Harnstoff durchlässig ist. Größere polare Moleküle sowie Moleküle mit elektrischen Ladungen, wie z. B. Ionen, können diese Lipid-Doppelschicht nicht passieren. Daneben sind aber Proteine in die Lipid-Doppelschicht der Zellmembran eingelagert, die unterschiedliche grundlegende Zellfunktionen wie z.B. den Ionentransport oder Signaltransduktionsprozesse ermöglichen. Ionenkanäle und Transporter sind transmembranäre Proteine, die den selektiven Ionentransport über die Zellmembran ermöglichen. Die Ausstattung der Zelle mit verschiedenen Ionenkanälen und Transportern macht die Zellmembran für unterschiedliche Ionen selektiv permeabel und führt zu einer asymmetrischen Verteilung der Ionen zwischen Intra- und Extrazellularraum (Tabelle 1). Dies hat zur Folge, dass ein Ionenkonzentrationsgradient über die Zellmembran entsteht. Für jedes Ion kann anhand der Nernst-Gleichung (1.1) ein Gleichgewichtspotenzial berechnet werden, bei welchem sein elektrisches und sein chemisches Potenzial gleich groß und entgegengesetzt gerichtet sind. Die Differenz zwischen Membranpotential und dem Gleichgewichtspotential eines Ions bestimmt dessen Triebkraft über die Membran. Die dominierenden Ionen für das Membranpotential von Säugetierzellen sind Kalium ( $K^+$ ), Natrium ( $Na^+$ ) und Chlorid ( $Cl^-$ ). Da im Ruhezustand der Zelle, die Permeabilität der Zellmembran für Kalium am größten ist, wird das Ruhemembranpotential, dass bei den meisten Neuronen etwa -70 mV beträgt, vor allem vom  $K^+$ - Gleichgewichtspotenzial bestimmt.

Ionenkanäle verfügen über eine Ionen-selektive Pore, durch die bis zu  $10^7$  bis  $10^9$  Ionen pro Sekunde über die Membran geleitet werden können. Sie leiten die Ionen passiv, d.h. die Ionen fließen durch Diffusion entlang ihres elektrochemischen Gradienten über die Membran. Häufig besitzen Ionenkanäle die Eigenschaft verschiedene Leitfähigkeitsstufen einnehmen zu können und so ihre Ionenleitfähigkeit zu ändern, was als *Gating* bezeichnet wird. Die Leitfähigkeitsstufen eines Ionenkanals sind offen, geschlossen oder Zwischenzustände. Sie ändern sich in

spannungsabhängigen Ionenkanälen mit der Membranspannung. Spannungsabhängige Ionenkanäle, wie z. B. der schnelle  $\text{Na}^+$ -Kanal, welcher der Entstehung von Aktionspotenzialen zugrunde liegt, verfügen über einen intramembranär gelegenen Spannungssensor, der sich bei Spannungsänderung bewegt und so eine Konformationsänderung des Ionenkanals bewirkt. Diese Konformationsänderung führt zu einer veränderten Leitfähigkeit des Ionenkanals. Aber auch die Bindung von Liganden an Rezeptoren von Liganden-gesteuerten Ionenkanälen kann zu einer Konformationsänderung und zu einer veränderten Leitfähigkeit von Ionenkanälen führen. Daneben gibt es auch Ionenkanäle, deren Ionenleitfähigkeit durch mechanische oder thermische Stimuli gesteuert wird.

Neben dem passiven Fluss durch Ionenkanäle können Ionen auch durch Transporter über die Zellmembran gelangen. Ionentransporter nehmen die Ionen auf der einen Seite der Membran auf und geben sie nach Konformationsänderung auf der anderen Seite der Membran frei. Die notwendige Konformationsänderung der Transporter bedingt die viel geringere Ionentransportrate von etwa  $10^2$  bis  $10^4$  Ionen pro Sekunde. Im Gegensatz zu Ionenkanälen, können Transporter Ionen jedoch nicht nur passiv mit dem elektrochemischen Gradienten, sondern sie auch aktiv entgegen ihres elektrochemischen Gradienten transportieren. Primär aktive Transporter, wie z.B. die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase transportieren Ionen entgegen ihres elektrochemischen Gradienten unter Verbrauch von ATP. Sekundär aktive Transporter, wie Symporter oder Kotransporter, nutzen hingegen den elektrochemischen Gradienten eines Ions um ein anderes Ion entgegen seinen elektrochemischen Gradienten zu transportieren. Auch die Aktivität von Transportern kann auf unterschiedliche Weise wie beispielsweise durch Spannungsänderung, den pH-Wert oder Bindung von Liganden beeinflusst werden <sup>1</sup>.

Ionenkanäle und Transporter ermöglichen also den Fluss von Kationen und Anionen über die Zellmembran und sind für eine reguläre Zellfunktion wesentlich. In höheren Organismen bilden sie die Grundlage elektrischer Prozesse für komplexe Zellfunktionen, wie beispielsweise Nervensignalweiterleitung und Muskelzellkontraktion.

## 1.2 Chloridkanäle

Chlorid ( $\text{Cl}^-$ ) ist das physiologisch am häufigsten vorkommende anorganische Anion im Organismus. Deshalb werden Chlorid-leitende Anionenkanäle auch als Chloridkanäle bezeichnet, obwohl sie meist auch Permeabilitäten für verschiedene andere Anionen wie Iodid, Bromid und Bikarbonat zeigen. Die extrazelluläre Chloridkonzentration in tierischen Zellen ist meist sehr viel höher als die intrazelluläre (Tabelle 1). Berechnet nach Nernst (1.1) liegt das Gleichgewichtspotenzial für Chlorid meist nahe dem Ruhemembranpotenzial. Deshalb spielen Chloridkanäle in Skelettmuskelzellen und den meisten Neuronen eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Ruhemembranpotentials und bei der Repolarisation von depolarisierten Zellen. Wichtig sind sie außerdem für die intrazelluläre pH-Regulation, die Zellvolumenregulation und für den transepithelialen Transport<sup>2</sup>. Chloridkanäle wurden in fast allen Säugertierzellen gefunden und kommen in Zellmembranen und auf intrazellulären Kompartimenten vor. Häufig werden die Chloridkanäle aufgrund ihrer biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften anstatt, wie es nah liegen würde, nach ihrer genetischen Verwandtschaft eingeteilt. Der Grund dafür liegt darin, dass den bekannten Genen, die für Ionenkanäle kodieren, häufig noch keine funktionellen Korrelate zugeordnet werden konnten, erschwert durch die Anwesenheit von endogenen Ionenkanälen in den verschiedenen Expressionssystemen<sup>3</sup>. So sind beispielsweise die genetischen Korrelate für den schwellungsaktivierten Chloridstrom  $I_{\text{C,swell}}$  nach wie vor ungeklärt.

**Tabelle 1 Die wichtigsten freien Ionen einer Säuger-Skelettmuskelzelle**

mit den extra- und intrazellulären Konzentrationen und dem Gleichgewichtspotenzial nach Nernst. Adaptiert von Referenz<sup>1</sup>.

Ion	extrazelluläre Konzentration (mM)	Intrazelluläre Konzentration (mM)	Nernst-potenzial (mV)
$\text{Na}^+$	145	12	+67
$\text{K}^+$	4	155	-98
$\text{Ca}^{2+}$	1.5	$100 \cdot 10^{-6}$	+129
$\text{Cl}^-$	123	4.2	-90

$$E_x = -\frac{R*T}{z*F} * \ln \frac{[x]_i}{[x]_a} \quad (1.1)$$

**Nernstgleichung zur Berechnung des Gleichgewichtspotenzials eines Ions.**

$E_x$  = Gleichgewichtspotenzial des Ions  $x$ ,  $R$  = Gaskonstante,  $T$  = absolute Temperatur,  $F$  = Faradaykonstante,  $Z$  = Ladung des Ions  $x$ ,  $[x]_i$  und  $[x]_a$  = intrazelluläre und extrazelluläre Konzentration des Ions  $x$ . Referenz <sup>1</sup>.

Drei Chloridkanalfamilien sind jedoch gut bekannt. Die größte dieser Familien stellt die Gruppe der Liganden-gesteuerten Chloridkanäle dar, die vor allem an chemischen, meist inhibitorischen Synapsen im Nervensystem vorkommen und die durch die Bindung von den Neurotransmittern GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) oder Glycin aktiviert werden <sup>3</sup>. Ein weiterer bekannter Chloridkanal ist der CFTR, der auf der Suche nach der Erbkrankheit der Zystischen Fibrose (CF) durch positionelles Klonen entdeckt wurde und durch Phosphorylierung bei der Hydrolyse von ATP voll aktiviert wird <sup>4</sup>. Er gehört zur Familie der ABC-Transporter. Dieser Kanal wird besonders in der apikalen Zellmembran von Epithelien des Darms, der Luftwege, von sekretorischen Drüsen, der Gallengänge und dem Nebenhoden exprimiert und hat eine wichtige Funktion beim transepithelialen Transport für die Sekretion von Salz und Flüssigkeit.

Die dritte bekannte Familie stellen die CICs dar, eine Familie von  $Cl^-$ -Kanälen und  $Cl^-/H^+$ -Austauschern, auf die im folgenden Kapitel näher eingegangen wird.

### **1.3 Die CIC – Familie: eine Familie von $Cl^-$ -Kanälen und $Cl^-/H^+$ -Austauschern**

Die Entdeckung der CIC-Familie von  $Cl^-$ -Kanälen und  $Cl^-/H^+$ -Austauschern begann 1979 mit der Identifizierung eines  $Cl^-$ -Kanals im elektrischen Organ der Zitterrochenart *Torpedo californica*, heute als CIC-0 bekannt <sup>4,5</sup>. Die Expressionsklonierung dieses Kanals im Jahr 1990 legte den Grundbaustein für die nachfolgende Identifizierung der gesamten Genfamilie <sup>5</sup>. Die CIC-Proteine sind über alle Phyla hinweg konserviert. Bei den Säugern gibt es neun Mitglieder, die anhand ihrer Sequenzhomologie in drei Gruppen aufgeteilt werden (Tabelle 2).

## Tabelle 2 Die CIC - Familie der Säuger.

Phylogenetischer Stammbaum der CIC-Cl<sup>-</sup>-Kanäle und -Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher mit ihrer Gewebeverteilung, ihrer Funktion sowie assoziierte Erkrankung von Mensch und Maus bei Funktionsverlust. In rot sind die jeweiligen β-Untereinheiten dargestellt. Adaptiert von Referenz <sup>6</sup>.

	Expression	Funktion	Humane Erkrankung	Maus Modell	
Cl <sup>-</sup> -Kanäle der Plasmamembran	CIC-1	Skelettmuskel	Stabilisierung des Membranpotenzials	Myotonia congenita	Myotonia congenita ( <i>adr</i> Maus)
	CIC-2	weit verbreitet	Transepithelialer Transport ?		Retina-/Testesdegeneration Leukodystrophie
	CIC-Ka/ Barttin	Niere, Innenohr	Transepithelialer Transport	Verlust von barttin oder beider CIC-Ks: Bartter-Syndrom Typ IV	Diabetes insipidus
	CIC-Kb/ Barttin	Niere, Innenohr	Transepithelialer Transport	Bartter-Syndrom Typ III	
Cl <sup>-</sup> /H <sup>+</sup> -Austauscher von intrazellulären Vesikeln	CIC-3	weit verbreitet	Ansäuerung von synaptischen Vesikel/ Endosomen		Retina-/ Hippocampusdegeneration
	CIC-4	weit verbreitet	?		
	CIC-5	v. a. Niere	Endosomale Cl <sup>-</sup> Akkumulation/ Ansäuerung	Dent'sche Erkrankung	Defekt der renalen Endozytose
Cl <sup>-</sup> /H <sup>+</sup> -Austauscher von intrazellulären Vesikeln	CIC-6	Nervensystem	Spät-endosomale Ansäuerung		lysosomale Speicherung (NCL)
	CIC-7/ Ostm1	weit verbreitet	Lysosomale Cl <sup>-</sup> -Akkumulation, Ansäuerung der Resorptionslakune von Osteoklasten	Osteopetrose, Retinadegenration, lysosomale Speicherung (NCL) wie bei CIC-7	Osteopetrose, Retinadegenration, lysosomale Speicherung (NCL) wie bei CIC-7

CIC-1, CIC-2, CIC-Ka und CIC-Kb bilden die Gruppe der CIC-Cl<sup>-</sup>-Kanäle, die überwiegend an der Plasmamembran lokalisiert sind. CIC-1 ist fast ausschließlich in Skelettmuskelzellen exprimiert, wo dieser Kanal für die Stabilisierung des Ruhemembranpotenzials sorgt und zur Repolarisation beiträgt <sup>7</sup>. Mutationen in *Clcn1* führen zu verschiedenen Formen der Myotonia congenita <sup>8</sup>. Beim Menschen wird zwischen der autosomal dominant vererbten Thomsen Myotonie und der rezessiv vererbten Becker Myotonie unterschieden. Dem breit exprimierten CIC-2-Kanal werden verschiedene Funktionen zugeordnet. Er soll an der Regulation der neuronalen Erregbarkeit <sup>9,10</sup>, der extrazellulären Ionen-Homöostase <sup>10,11</sup> und dem transepithelialen Transport <sup>12</sup> beteiligt sein. Möglicherweise ist CIC-2 in die Pathogenese der megalenzephalen zystischen Leukodystrophie (*MLC*) involviert, einer neonatal bzw. im Kleinkindalter auftretenden Leukodystrophie mit subkortikaler Zystenbildung <sup>13</sup>. Die physiologische Bedeutung der CIC-K-Proteine und ihrer β-

Untereinheit Barttin liegt im transepithelialen  $\text{Cl}^-$ -Transport in der Niere und im Innenohr. Mutationen dieser Gene führen beim Menschen zum Bartter-Syndrom<sup>14</sup>, ein autosomal-rezessiv vererbtes Salzverlustsyndrom aufgrund verminderter Natriumresorption im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife.

Die Mitglieder des zweiten (ClC-3, -4 und -5) und dritten (ClC-6 und ClC-7) Homologiezweiges der ClC-Familie stellen  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher dar. Sie sind überwiegend auf intrazellulären Kompartimenten des endosomalen-lysosomalen Pfades und auf synaptischen Vesikeln lokalisiert. Diese  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher tragen über die Bereitstellung eines Gegenstroms für die vesikuläre Protonenpumpe und durch luminalen  $\text{Cl}^-$ -Akkumulation über sekundär aktiven Transport zur Regulation der vesikulären Ionen-Homöostase bei<sup>15-17</sup>. Die physiologische Funktion von ClC-3 und -4 wird in Kapitel 1.3.2 und 1.3.3 behandelt.

Durch den Funktionsverlust von ClC-5, tritt seine physiologische Bedeutung bei der proximaltubulären Endozytose und Ansäuerung von Endosomen zu Tage<sup>18</sup>. Beim Menschen führt der Verlust von funktionellem ClC-5 zur Dent'schen Erkrankung<sup>19</sup>. Diese seltene X-chromosomale, rezessiv vererbte Erkrankung betrifft die proximalen Nierentubuli und ist durch das Auftreten von Calcium-Nierensteinen, tubulärer Proteinurie, Hypercalcurie und Hyperphosphaturie gekennzeichnet. ClC-6 ist auf späten Endosomen in Neuronen exprimiert und möglicherweise mit einer leichten Form der neuronalen Ceroid-Lipofuszinose, einer lysosomalen Speicherkrankheit, assoziiert<sup>20</sup>.

Auch ClC-7, ein Mitglied der dritten Homologie-Gruppe, ist mit einer humanen Krankheit, nämlich einer vererbaren Form der Osteopetrose, assoziiert. Diese Krankheit ist durch eine gestörte Knochenresorption gekennzeichnet, da die Resorptionslakune der Osteoklasten nur unzureichend ausgebildet wird und ein Ansäuerungsdefekt der Resorptionslakune vorliegt<sup>21</sup>.

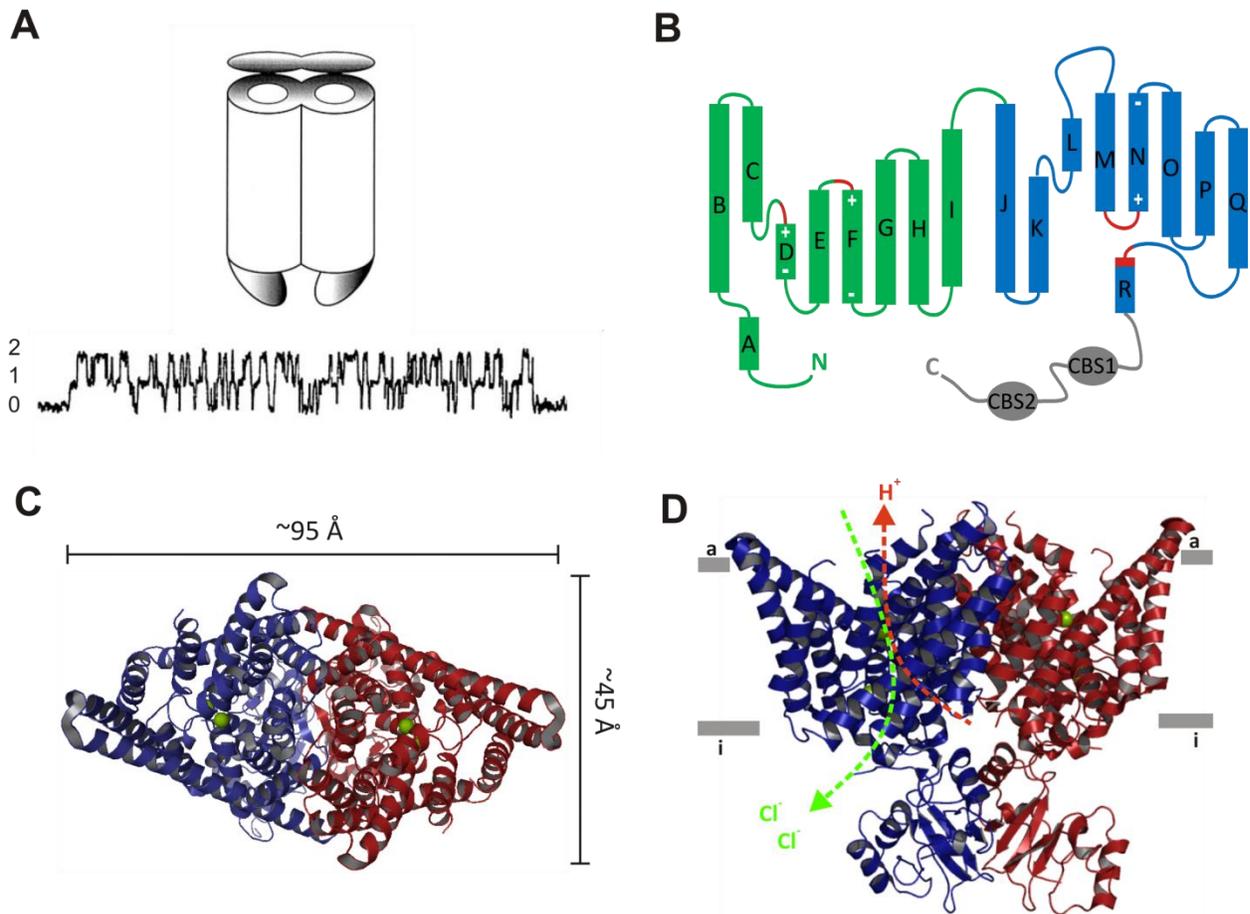
### 1.3.1 Molekulare Struktur

ClC- $\text{Cl}^-$ -Kanäle und ClC- $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher sind funktionelle (Homo-) Dimere, die durch Zusammenlagerung von zwei ClC-Proteinuntereinheiten zustande kommen<sup>22-24</sup>. ClC-Proteine können auch funktionelle Heteromere aus verschiedenen Untereinheiten desselben

Homologiezweiges ausbilden, doch ist deren biologische Relevanz noch nicht aufgeklärt<sup>25</sup>. Jede der beiden ClC-Untereinheiten eines Dimers bildet eine eigenständige Pore aus. Diese Struktur, das sogenannte *double-barrel*-Modell, wurde vom Schaltverhalten mittels Einzelkanaluntersuchungen abgeleitet (Abb. 1.A)<sup>26</sup>. Die beiden Poren können sowohl unabhängig voneinander als auch gemeinsam öffnen und schließen, da neben den beiden eigenständigen *gates*, auch ein gemeinsames *gate* existiert, das simultan auf beide Poren wirkt. Die beiden unabhängigen *gates* zeigen ein schnelles, das gemeinsame *gate* ein langsames Schaltverhalten.

Die bisherigen Annahmen zur molekularen Struktur konnten mithilfe der Röntgenstrukturanalyse von zwei prokaryotischen ClC-Proteinen, EcClC-1 aus *Escherichia coli* und StClC aus *Salmonella typhimurium*<sup>27</sup>, und eines eukaryotischen ClC-Proteins, CmClC der thermophilen Rotalge *Cyanidioschyzon merolae*<sup>28</sup>, bestätigt und genauer erforscht werden (Abb. 1.C,D). Diese drei ClC-Proteine sind alle Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher. Aufgrund ihrer Homologie zu den Cl<sup>-</sup>-Kanälen, kann für diese aber eine ähnliche Struktur angenommen werden.

Eine ClC-Proteinuntereinheit setzt sich aus einer komplexen Transmembranregion, einem kurzen, zytosolischen N-Terminus und einem langen, zytosolischen C-Terminus zusammen (Abb. 1.B). Vom Extrazellulärraum aus betrachtet bilden die ClC-Untereinheiten je eine dreieckige Struktur, die zum Dimer zusammengelagert die Form eines Rhombus ergibt (Abb. 1.C). Die Transmembranregion wird von den 18 transmembranären Domänen gebildet.



### Abbildung 1 Struktur der CICs.

(A) Das vom Schaltverhalten des  $\text{Cl}^-$ -Kanals CIC-0 abgeleitete *double-barrel*-Modell. Die Einzelkanalableitungen lassen zwei Leitfähigkeitsstufen unterscheiden. Ist das gemeinsame *gate* offen, können entweder beide unabhängige *gates* geschlossen (0), nur eines der beiden geöffnet (1) oder beide unabhängige *gates* geöffnet sein (2). (B) Topologiemodell einer CIC-Untereinheit mit 18  $\alpha$ -Helices und zwei C-terminalen CBS-Domänen (grau). C- und N-Termini sind intrazellulär gelegen. Die N-terminalen  $\alpha$ -Helices ( $\alpha\text{A} - \alpha\text{I}$ ) sind grün, die C-terminalen ( $\alpha\text{J} - \alpha\text{R}$ ) blau markiert. Poren-auskleidende Abschnitte sind rot markiert. (C) und (D) zeigen die durch Röntgenstrukturanalyse erstellte Quartärstruktur des  $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauschers CmCIC in der Aufsicht (C) und der Seitenansicht (D). Beide Untereinheiten des CIC-Dimers (rot und blau) sind mit je einem  $\text{Cl}^-$ -Ion (grün) im Porenbereich dargestellt. Die  $\text{H}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Transportwege werden in einem (blau) der beiden CmCIC-Untereinheiten durch gestrichelte Linien hervorgehoben. Adaptiert von Referenz <sup>3</sup> und <sup>28</sup>.

## Die Transmembranregion - Ionentransportpfade und *gates*

Der Ionentransportpfad durch die Transmembranregion hat die Form einer Sanduhr, mit zwei wassergefüllten Einbuchtungen von der extra- und intrazellulären Seite, die über einen Engstelle miteinander verbunden sind. Innerhalb der Pore gibt es drei  $\text{Cl}^-$ -Bindungsstellen; eine externe Bindungsstelle  $S_{\text{ex}}$ , die zur extrazellulären Seite hin gelegen ist, eine zentrale  $S_{\text{cen}}$  und eine interne  $S_{\text{in}}$ , die zur intrazellulären Seite hin gelegen ist (Abb. 2). Wichtig für die Koordination von  $S_{\text{cen}}$  im Molekül sind die Hydroxylgruppen eines zentralen Tyrosins  $\text{Tyr}_{\text{cen}}$  und Serins  $\text{Ser}_{\text{cen}}$ <sup>28</sup>.

Die Chloridbindungsstellen sind von großer Bedeutung, da durch sie die Spannungsabhängigkeit der  $\text{ClC-Cl}^-$ -Kanäle und  $-\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher erklärt werden kann. Denn spannungsabhängiges Schaltverhalten von Ionenkanälen und -transportern muss über eine Ladung im Inneren des transmembranären Kanalproteins vermittelt werden, welche bei Spannungsänderung bewegt werden kann. Eine solche Ladung wird deshalb als Schaltladung bezeichnet. Durch ihre Bewegung bei Spannungsänderung kommt es zu einer Konformationsänderung im Protein, die zu einer veränderten Ionentransportrate führt. In  $\text{ClC}$ -Proteinen konnten keine geladenen Aminosäuren im Proteininneren gefunden werden, welche diese Schaltladung bereitstellen könnten. Stattdessen fungieren vermutlich die transportierten Ionen selbst, also die negativ geladenen Chloridionen mittels der Chloridbindungsstellen in der Pore, als Schaltladung<sup>29,30</sup>.

Daneben sind zwei negativ geladene Glutamatreste für den Ionentransports durch die Pore wichtig. Einerseits ein sowohl in  $\text{ClC-Cl}^-$ -Kanälen als auch in  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauschern, hochkonserviertes Glutamat  $\text{Glu}_{\text{ex}}$ , das von der extrazellulären Seite über eine Seitenkette in die Pore hineinragt. Andererseits gibt es bei den  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauschern ein zusätzliches, intrazellulär gelegenes Glutamat  $\text{Glu}_{\text{in}}$ . In  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauschern sind beide, sowohl  $\text{Glu}_{\text{ex}}$  als auch  $\text{Glu}_{\text{in}}$ , für die Kopplung des  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{H}^+$ -Transports essentiell. Die  $\text{ClC-Cl}^-$ -Kanäle haben an Stelle von  $\text{Glu}_{\text{in}}$  ein neutrales Alanin.

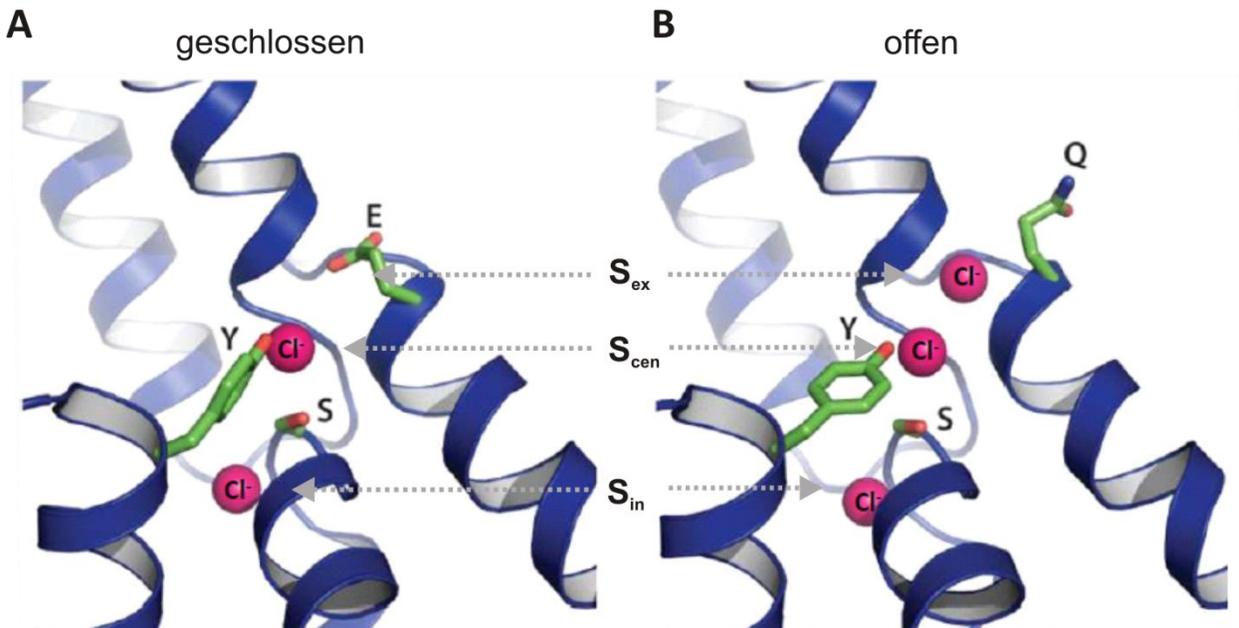
Für die Spannungsabhängigkeit der  $\text{ClCs}$  spielt das  $\text{Glu}_{\text{ex}}$  eine wichtige Rolle und ist das molekulare Korrelat des „schnellen“ *gates* und wird auch *gating*-Glutamat genannt. Das *gating*-Glutamat konkurriert durch seine negativ geladene Hydroxylgruppe mit  $\text{Cl}^-$  um dessen zentrale Bindungsstelle ( $S_{\text{cen}}$ ) und behindert dadurch den Durchtritt von  $\text{Cl}^-$ -Ionen. Beim Ionenfluss durch die Pore, muss diese Glutamatseitenkette zunächst von einem durchtretenden  $\text{Cl}^-$ -Ion verdrängt

werden bevor weitere  $\text{Cl}^-$ -Ionen die Pore passieren können. Das  $\text{Glu}_{\text{ex}}$  schwingt dann nach außen weg.

Bei diesem Mechanismus fungieren die  $\text{Cl}^-$ -Ionen, durch ihre Bindungsstellen in der Pore, selbst als Schaltladung (s.o.). Dies erklärt auch die Abhängigkeit des Schaltverhaltens der ClC-Kanäle und -Transporter von der  $\text{Cl}^-$ -Konzentration <sup>31</sup>. Ihr Schaltverhalten ist aber auch von der  $\text{H}^+$ -Konzentration abhängig und könnte auch direkt von Protonen gesteuert werden <sup>32</sup>.

Für den  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austausch wird ein Zyklus vermutet, bei dem  $\text{Glu}_{\text{ex}}$  protoniert wird, dadurch nach außen schwingt und die Pore für den  $\text{Cl}^-$ -Transport frei macht <sup>28</sup>. Außen soll  $\text{Glu}_{\text{ex}}$  wieder deprotoniert werden und damit ein Proton nach außen abgeben. Das deprotonierte  $\text{Glu}_{\text{ex}}$  wird dann wieder zurück in die Pore schwingen und diese für die  $\text{Cl}^-$ -Ionen wieder verschließen. Das Proton wird von  $\text{Glu}_{\text{in}}$  bereitgestellt, welches als intrazellulärer  $\text{H}^+$ -Akzeptor fungiert, und deshalb auch als Protonenglutamat bezeichnet wird. Der Mechanismus des  $\text{H}^+$ -Transfers von  $\text{Glu}_{\text{in}}$  nach  $\text{Glu}_{\text{ex}}$ , ist noch unklar.

Für dieses Modell spricht die Beobachtung, dass durch Neutralisierung von  $\text{Glu}_{\text{ex}}$  in ClC -  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauschermutanten der  $\text{Cl}^-$ -Transport vom  $\text{H}^+$ -Transport entkoppelt wird und eine reine  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit mit linearer Strom-Spannungskurve resultiert <sup>33-35</sup>. Für die Neutralisierung wird  $\text{Glu}_{\text{ex}}$  durch eine neutrale Aminosäure ersetzt. Diese neutralisierte Seitenkette, ist konstitutiv nach außen verlagert und kann nicht mehr de-/protoniert werden (Abb. 2). Das bedeutet, dass  $\text{Cl}^-$  ungehindert passieren kann und der  $\text{H}^+$ -Transport aufgehoben ist. Diese Mutationen werden als *unc*-Mutationen (*uncoupled*) bezeichnet. Wird hingegen  $\text{Glu}_{\text{in}}$  neutralisiert verliert der Austauscher jegliche Transportaktivität (*transport-deficient*-Mutanten). Solche Mutationen, die die Transporteigenschaften der ClC- $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher verändern, eignen sich gut um ein besseres Verständnis für deren Funktion zu erlangen.



### Abbildung 2 Ionentransportpfad der CLCs.

Nahaufnahmen des Ionentransportpfads von EcCIC, dem  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher von *E. coli* (durch Röntgenstrukturanalyse erstellte Quartärstruktur, *ribbon*-Darstellung.) (A) zeigt die Wildtyp-Form von EcCIC im geschlossenen Zustand.  $S_{\text{ex}}$  wird von  $\text{Glu}_{\text{ex}}$ , E, besetzt und verhindert dadurch den Durchtritt der  $\text{Cl}^-$ -Ionen. Die E148Q-Mutante von EcCIC (B) stellt den offenen Zustand der  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher dar. Die transiente Neutralisierung von  $\text{Glu}_{\text{ex}}$  durch Protonierung bei der Ionentranslokation der  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher wird bei der Mutante durch die Mutation von  $\text{Glu}_{\text{ex}}$  zur neutralen Aminosäure Glutamin, Q, erreicht, sodass der Ionentransportpfad für  $\text{Cl}^-$  konstitutiv freigegeben und vom  $\text{H}^+$ -Transport entkoppelt ist. Die beiden Aminosäuren  $\text{Tyr}_{\text{cen}}$ , Y, und  $\text{Ser}_{\text{cen}}$ , S, sind wichtig für die Formation von  $S_{\text{cen}}$ .  $\text{Cl}^-$ -Ionen sind rot, wichtige Aminosäuren für den Ionentransportpfad mit negativen Molekülgruppen (orange) und der Aminogruppe (blau) sind in grün dargestellt. Adaptiert von Referenz <sup>28</sup>.

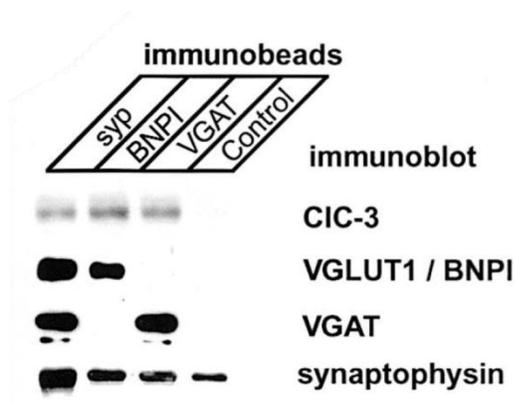
Das strukturelle Korrelat für das gemeinsame „langsame“ *gate* ist noch weitgehend unverstanden. Für die eukaryotischen CLCs wird eine Beteiligung des langen intrazellulären C-Terminus vermutet, der zwei CBS-Domänen an jeder CLC-Proteinuntereinheit enthält <sup>36-39</sup>. Die Abkürzung CBS leitet sich von **C**ystathion-**B**eta-**S**ynthase ab, dem Protein in welchem diese Domäne zum ersten Mal beschrieben wurde <sup>40</sup>. Die CBS-Domänen haben vermutlich verschiedene regulatorische Funktionen auf die Transmembrandomäne <sup>28,41</sup>.

### **1.3.2 CIC-3 – ein $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher auf synaptischen Vesikeln und endosomalen Kompartimenten**

Die drei CIC-Proteine der zweiten Unterfamilie sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 80% homolog. Sie sind  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher mit einer Stöchiometrie von  $2\text{Cl}^-$  zu  $1\text{H}^+$ . Die Funktion des  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauschs konnte unter den Mitgliedern des zweiten CIC-Homologiezweigs bisher jedoch nur für CIC-4 und CIC-5<sup>33,42</sup> sowie für die beiden Mitglieder der dritten CIC-Unterfamilie, CIC-6 und -7<sup>34,43</sup> formal gezeigt werden. Die Stöchiometrie von zwei  $\text{Cl}^-$ -Ionen im Austausch gegen ein  $\text{H}^+$ -Ion wurde bisher für CIC-5 und CIC-7 sowie für ecCIC1 nachgewiesen<sup>35,44,45</sup>. Die Funktion des  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauschs sowie die Stöchiometrie von  $2\text{Cl}^-:1\text{H}^+$  kann aufgrund seiner starken Homologie zu CIC-4 und CIC-5 und in Gegenwart eines Protonenglutamates auch für CIC-3 angenommen werden. Alle drei Mitglieder der zweiten CIC-Unterfamilie wurden auf Vesikeln des endosomalen Pfades lokalisiert, wo sie teilweise überlappend exprimiert werden<sup>6</sup>.

#### **1.3.2.1 Gewebeverteilung und subzelluläre Lokalisation von CIC-3**

CIC-3 wird breit exprimiert und konnte im Gehirn, der Retina, der Nebenniere, dem Pankreas, im Nebenhoden, in Niere und Leber, sowie in der Skelettmuskulatur und im Herz nachgewiesen werden<sup>46-49</sup>. Im Gehirn wird CIC-3 besonders stark im Hippocampus, Cerebellum, olfaktorischen Kortex und Bulbus olfactorius exprimiert<sup>46,47</sup>. Anhand subzellulärer Fraktionierung und immunhistologischer Untersuchungen wurde gezeigt, dass CIC-3 hauptsächlich auf endosomalen Kompartimenten, auf GABAergen und glutamatergen Vesikeln in Neuronen (Abb. 3) und auf *SLMVs* (*synaptic-like microvesicles*) in PC12-Zellen, chromaffinen Zellen und  $\beta$ -Zellen des Pankreas lokalisiert ist<sup>48-51</sup>. Die Lokalisation von CIC-3 auf *LDCVs* (*large dense core vesicles*) ist fraglich<sup>52-54</sup> und konnte durch Knockout-kontrollierte Untersuchungen nicht bestätigt werden<sup>49</sup>.



### Abbildung 3 CIC-3 lokalisiert auf GABAergen und glutamatergen synaptischen Vesikeln.

Westernblot von immunisolierten synaptischen Vesikeln. Die synaptischen Vesikel, die mit Hilfe von Antikörperbeschichteten Mikroperlen (*immunobeads*) mit Antikörpern gegen den Vesikelmarker Synaptophysin, den vesikulären Glutamattransporter VGLUT1/BNPI und den vesikulären GABA-Transporter VGAT isoliert wurden, sind positiv für CIC-3. Referenz <sup>48</sup>.

Mittels Kotransfektion und Koimmunpräzipitation von CIC-3 mit CIC-4 bis -7 konnte gezeigt werden, dass heterolog exprimiertes CIC-3 mit CIC-4 und -5, nicht aber mit CIC-6 und -7, subzellulär kolokalisiert und Heterodimere bilden kann <sup>55</sup>. Möglicherweise passiert CIC-3, zumindest bei Überexpression, auf seinem Weg bis zum intrazellulären Bestimmungsort die Plasmamembran <sup>56</sup>. Einige Untersuchungen, die CIC-3 der Plasmamembran zuordnen, wurden ohne Knockout-Kontrollen durchgeführt oder basieren auf heterologer Überexpression von CIC-3 <sup>46,57-61</sup>. Immunhistologische, Knockout-kontrollierte Untersuchungen der subzellulären Lokalisation von CIC-3 im nativen Gewebe der Maus zeigen CIC-3 auf intrazellulären Vesikeln und die Kolokalisation von CIC-3 mit Synaptophysin, einem Marker für synaptische Vesikel, im Gehirn <sup>49</sup>.

#### 1.3.2.2 Physiologische Rolle

Die physiologische Rolle von CIC-3 wird seit der erstmaligen Klonierung <sup>46,47</sup> nach wie vor kontrovers diskutiert. Biophysikalische Untersuchungen an transfizierten Zellen waren aufgrund der geringen Oberflächenexpression schwierig. Das hat häufig zu widersprüchlichen Ergebnissen verschiedener Studien geführt. Zur weiteren Aufklärung wurden in unterschiedlichen Laboratorien unabhängig voneinander drei CIC-3 Knockout-Mäuse generiert (s.u.) <sup>48,62,63</sup>. Mit ihrer Hilfe wurde gezeigt, dass CIC-3 nicht, wie zuvor angenommen <sup>64-66</sup>, das molekulare Korrelat der schwellungsaktivierten Chloridströme  $I_{c,swell}$  darstellt. Im CIC-3-Knockout-Modell waren diese schwellungsaktivierten Chloridströme in keinem der untersuchten Zelltypen beeinträchtigt. Auch  $Ca^{+}$ -abhängige, CaMKII-aktivierte  $Cl^{-}$ -Ströme wurden CIC-3 zugeschrieben, welche u. a. eine Rolle bei der Regulation der exzitatorischen neuronalen Transmission spielen sollen <sup>60</sup>. Eine

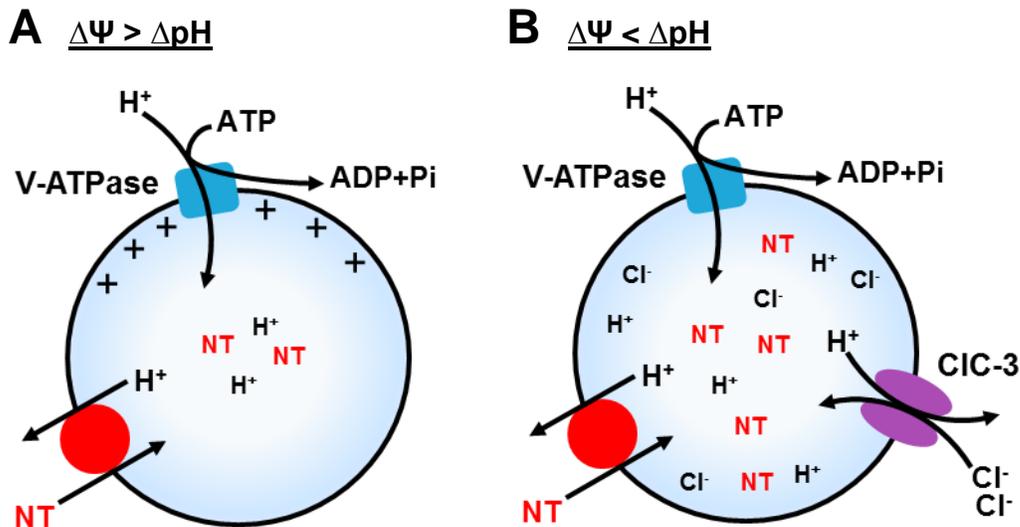
Voraussetzung dafür wäre allerdings die Lokalisation von CIC-3 an der Plasmamembran, was im Hinblick auf die Annahme seiner intrazellulären Funktion in Homologie zu CIC-4 und -5 eher widersprüchlich ist. Es wurde auch gezeigt, dass  $\text{Ca}^{+}$ -aktivierte  $\text{Cl}^{-}$ -Ströme in Speicheldrüsen von *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht beeinträchtigt sind<sup>67</sup>.

Untersuchungen an heterolog exprimiertem CIC-3 sprechen dafür, dass CIC-3 ein  $\text{Cl}^{-}/\text{H}^{+}$ -Austauscher ist<sup>68</sup>. So konnten Ströme mit einer höheren Leitfähigkeit für  $\text{Cl}^{-}$  als für  $\text{I}^{-}$  und mit starker Auswärtsrektifizierung nachgewiesen werden<sup>69,70</sup>, was für die CIC- $\text{Cl}^{-}/\text{H}^{+}$ -Austauscher charakteristisch ist. Die auswärtsrektifizierenden Ströme konnten durch Neutralisierung des *gating*-Glutamats aufgehoben werden<sup>70</sup>, wie es auch für CIC-4 bis -7 gezeigt wurde<sup>33-35,71</sup>. Möglicherweise kann eine Entkopplung des  $\text{Cl}^{-}$ -Transports vom  $\text{H}^{+}$ -Transport bei CIC-3 auch durch einen stark sauren pH-Wert erfolgen<sup>72</sup>.

Im Gehirn und in der Retina scheint CIC-3 eine wichtige Rolle zu spielen, da *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäuse starke Neurodegeneration zeigen, die zum kompletten Verlust des Hippocampus sowie der Degeneration von Photorezeptoren der Retina führt<sup>48</sup>. Die verringerte Ansäuerung von synaptischen Vesikeln von *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen *in vitro* ließe vermuten, dass CIC-3 zum Ladungsausgleich der elektrogen arbeitenden  $\text{H}^{+}$ -ATPase an synaptischen Vesikeln und damit zur Aufnahme von Neurotransmitter in synaptische Vesikel beiträgt<sup>48</sup>. Da die Ansäuerung auch im *Clcn3*<sup>-/-</sup> nicht vollständig aufgehoben und immer noch  $\text{Cl}^{-}$ -abhängig war, kann CIC-3 jedoch nicht die einzige  $\text{Cl}^{-}$ -Leitfähigkeit an synaptischen Vesikeln darstellen.

Die Aufnahme von Neurotransmittern in synaptische Vesikel ist vom elektrochemischen  $\text{H}^{+}$ -Gradienten abhängig, der unter Verbrauch von ATP erzeugt wird. Der elektrochemische  $\text{H}^{+}$ -Gradient setzt sich aus zwei Komponenten, dem pH-Gradienten ( $\Delta\text{pH}$ ) und dem elektrischen Gradienten ( $\Delta\Psi$ ), zusammen. Durch die Aktivität der  $\text{H}^{+}$ -Pumpe nimmt  $\Delta\Psi$  über die Vesikelmembran schnell zu und hemmt die  $\text{H}^{+}$ -Pumpe in ihrer Aktivität (Abb. 4, A). Das verhindert die weitere Zunahme von  $\Delta\text{pH}$ , also die weitere Ansäuerung des Vesikels. CIC-3 könnte jedoch, getrieben durch den  $\text{H}^{+}$ -Gradienten, negative Chloridionen ( $\text{Cl}^{-}$ ) ins Vesikellumen transportieren und

so eine Ausgleichladung für die positiven  $H^+$ -Ionen liefern, sodass  $\Delta\Psi$  klein bleiben würde und eine weitere Ansäuerung durch die V-ATPase erfolgen könnte (Abb. 4, B).



**Abbildung 4 Modell der vesikulären Ansäuerung und  $\Delta pH$ -abhängigen Neurotransmitteraufnahme.**

Neurotransmittertransporter (rot), NT=Neurotransmitter, vakuoläre  $H^+$ -ATPase (blau), CIC-3 (lila), In diesem Modell ist die Neurotransmitteraufnahme von  $\Delta pH$  abhängig. Zu (A): Fehlt CIC-3 zur Bereitstellung eines Ausgleichstroms, erfolgt keine weitere Ansäuerung des Vesikels, da die V-ATPase durch den großen elektrischen Gradienten ( $\Delta\Psi$ ) gehemmt wird. Die Neurotransmitteraufnahme ist vermindert. Zu (B): Der Ausgleichstrom durch CIC-3 vermindert  $\Delta\Psi$  und ermöglicht die weitere Ansäuerung (Zunahme von  $\Delta pH$ ) und dadurch die weitere Neurotransmitteraufnahme.

Der Transport der unterschiedlichen Neurotransmitter in das Vesikellumen hängt unterschiedlich stark von den beiden Komponenten des elektrochemischen  $H^+$ -Gradienten ab. Für die Aufnahme von Monoamintransmittern und Acetylcholin ist  $\Delta pH$ <sup>73,74</sup>, für die Aufnahme von Glutamat  $\Delta\Psi$ , ausschlaggebend<sup>75,76</sup>, während die Aufnahme von GABA etwa in gleichem Maße von  $\Delta pH$  und  $\Delta\Psi$  abhängig ist<sup>77,78</sup>. Durch den verringerten Ladungsausgleich der elektrogen arbeitenden  $H^+$ -ATPase in Abwesenheit von CIC-3 im Knockout-Modell, sollte  $\Delta pH$  vermindert und  $\Delta\Psi$  erhöht sein. Demzufolge wäre die Aufnahme von Monoaminen und Acetylcholin vermindert und die Glutamataufnahme erhöht. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Aufnahme des Monoamins Dopamin im *Clcn3*<sup>-/-</sup> nicht verringert und die Glutamataufnahme nicht erhöht sondern sogar

vermindert war. Letzteres wurde dem Verlust von glutamatergen Vesikeln oder Neuronen zugeschrieben <sup>48</sup>. Elektrophysiologische Untersuchungen zur exzitatorischen synaptischen Transmission an CA1-Pyramidenzellen des Hippocampus anhand der Ableitung exzitatorischer Miniaturströme (*mEPSCs* = *miniature excitatory postsynaptic currents*) zeigten nämlich, in Übereinstimmung mit der Annahme einer erhöhten vesikulären Glutamataufnahme aufgrund von erhöhtem  $\Delta\Psi$  im *Clcn3*<sup>-/-</sup>, eine Verschiebung der kumulativen Stromamplituden zu höheren Amplituden im *Clcn3*<sup>-/-</sup> <sup>48</sup>.

Die Rolle von CIC-3 an GABAergen Synapsen wird kontrovers diskutiert. Anhand von Untersuchungen an *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen postulierte Riazanski *et al.*, 2011 für CIC-3 eine bedeutende Rolle bei der inhibitorischen synaptischen Transmission <sup>79</sup>. Die Amplitude von GABAergen inhibitorischen, postsynaptischen Miniaturströmen (*mIPSCs* = *miniature inhibitory postsynaptic currents*), die sowohl präsynaptisch vom GABA-Gehalt der Vesikel als auch von der postsynaptischen GABA-Rezeptordichte abhängt, war in Pyramidenzellen der CA1-Region im Hippocampus im *Clcn3*<sup>-/-</sup> verringert. Dies wurde auf eine verminderte Aufnahme von GABA in synaptische Vesikel aufgrund reduzierter Vesikelansäuerung in inhibitorische Interneuronen zurückgeführt <sup>79</sup>. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Stobrawa *et al.*, 2001, die keine Unterschiede der *mIPSCs* zwischen *Clcn3*<sup>+/+</sup>- und *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten <sup>48</sup>.

Daneben wird angenommen, dass CIC-3 im Pankreas eine Rolle bei der Insulinsekretion spielt, da die Sekretion der Insulin-haltigen *LDCVs* in *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen vermindert ist <sup>49,53,54</sup>. CIC-3 ist dabei vermutlich nicht an der Ansäuerung der *LDCVs*, sondern möglicherweise indirekt an ihrer Sekretion beteiligt <sup>49</sup>. Der genaue Mechanismus ist noch unverstanden. Ob CIC-3 möglicherweise auch bei *ROS* (*reactive oxygen species*) –Signalwegen <sup>80</sup> und für den Zellzyklus und die Zellmigration eine Rolle <sup>81</sup> spielt, bleibt fragwürdig.

### 1.3.3 CIC-4

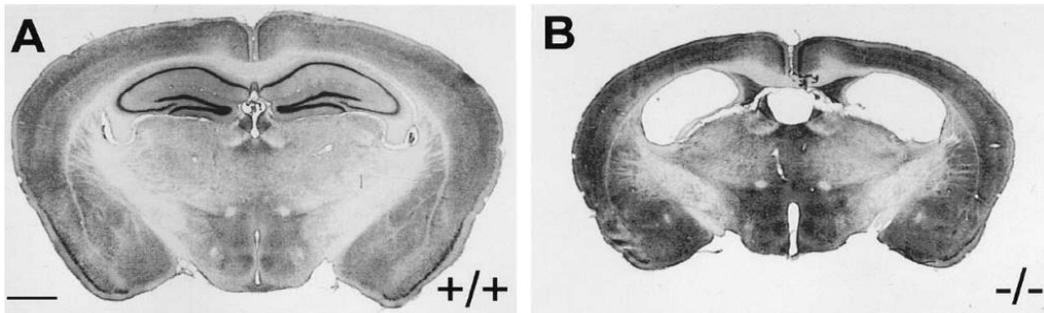
Über die physiologische Rolle des Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Austauschers CIC-4 ist immer noch wenig bekannt. Das Gen *Clcn4* wurde bei der Analyse der chromosomalen Region Xp22.3 entdeckt <sup>82</sup>. Im Menschen wird CIC-4 vor allem in der Skelettmuskulatur, im Herzen und im Gehirn exprimiert, in der Maus

hingegen in Gehirn, Darm und Niere<sup>83,84</sup>. Bei der algerischen Hausmaus *Mus spretus* ist *Clcn4* wie auch beim Menschen auf dem X-Chromosom lokalisiert, während es sich beim Labormausstamm *Mus musculus* auf Chromosom 7 befindet. CIC-4 ist hauptsächlich an intrazellulären Vesikeln lokalisiert, gelangt in heterologer Expression aber auch an die Plasmamembran und ist aufgrunddessen für biophysikalische Analysen gut zugänglich. In heterologer Expression zeigt CIC-4 stark auswärtsrektifizierende Ströme, die im sauren pH-Bereich abnehmen<sup>85</sup>. Durch die Neutralisierung des *gating*-Glutamats wird eine reine Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit mit einer linearen Strom-Spannungskurve erreicht<sup>85</sup>. CIC-4 bildet möglicherweise Heterodimere mit CIC-3 und -5 aus<sup>55</sup>. Durch Kreuzungen zwischen *Mus spretus* und *Mus musculus*<sup>86</sup> konnten *Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäuse generiert werden. Diese Hybride sind zwar infertil, zeigen darüber hinaus aber keinen auffälligen Phänotyp. Auch die auf konventionellem Wege erzeugten *Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäuse haben keinen auffälligen Phänotyp<sup>87</sup>. Die Vermutung, CIC-4 habe eine ähnliche Funktion wie CIC-5 konnte anhand der *Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäuse somit nicht bestätigt werden<sup>87</sup>.

Subzellulär ist CIC-4 vor allem auf Endosomen<sup>55,84</sup>, aber auch im ER (endoplasmatischen Reticulum)<sup>88</sup> lokalisiert. Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass bei heterologer Überexpression von CIC-4 in COS-7-Zellen CIC-4 im ER verbleibt. Die Kotransfektion mit CIC-3, welches bei heterologer Überexpression auf vesikulären Strukturen, die vermutlich späte Endosomen darstellen<sup>48</sup>, lokalisiert, führt aber zur Kolo-kalisation von CIC-4 mit CIC-3 in Vesikeln. CIC-3 scheint also wichtig dafür zu sein, dass CIC-4 das ER verlassen kann um zu anderen vesikulären Kompartimenten, z.B. in Endosomen, zu gelangen.

#### **1.3.4 Knockout- und Knockin-Mausmodelle von CIC-3 und CIC-4**

*Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäuse sind kleiner als ihre Wildtypgeschwister, erblinden aufgrund der Degeneration ihrer retinalen Photorezeptoren und zeigen eine starke Neurodegeneration. Die Neurodegeneration beginnt im Hippocampus und führt schließlich zu dessen kompletten Verlust.



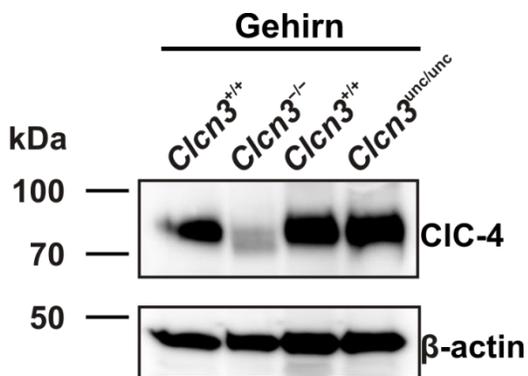
**Abbildung 5 Neuronaler Phänotyp der *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Maus.**

Nissl-Färbung, frontale Gehirnschnitte von sieben Monate alten Mäusen. Es ist das Gehirn einer *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Maus (B) nach kompletter Degeneration des Hippocampus im Vergleich zum Gehirn einer Wildtyp-Maus (A) dargestellt. Referenz<sup>48</sup>.

Es gibt drei *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mausmodelle die in drei unterschiedlichen Laboren unabhängig voneinander generiert wurden<sup>48,62,63</sup>. Eine der drei *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mausmodelle stammt aus unserer Arbeitsgruppe<sup>48</sup>. Die drei *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mausmodelle sind in ihrem Phänotyp leicht verschieden. So setzt beispielsweise die Neurodegeneration zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in verschiedenen Regionen des Hippocampus ein. Die Neurodegeneration der *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäuse in unserem Labor setzt etwa am postnatalen Tag P15, in der CA1-Region des Hippocampus beginnend, ein und schreitet in den darauffolgenden Wochen rasch bis zum kompletten Verlust des Hippocampus fort. Die Neurodegeneration der *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäuse aus dem Labor von F.S. Lamb setzte zu einem späteren Zeitpunkt, zwischen P23 und P73, ein und schritt über Monate fort<sup>62</sup>. Sie begann im Gyrus dentatus und breitete sich über die CA3- zur CA1-Region des Hippocampus aus. Eine der *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigt Merkmale der lysosomalen Speicherkrankheit Ceroid-Lipofuszinose<sup>63,89</sup>. Eine mögliche Ursache für die Unterschiede im Phänotyp der drei *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mausmodelle könnten Unterschiede im genetischen Hintergrund und die unterschiedlichen Knockout-Strategien der Labore darstellen. Die *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Maus aus unserer Arbeitsgruppe wurde anhand der Deletion von Exon 3 von *Clcn3* generiert. Exon 3 kodiert die erste transmembranäre Domäne (*TMD1*) von *Clcn3*<sup>48</sup>. Im Labor von F.S. Lamb wurden hingegen Exon 6 und 7 deletiert, die Teile der zweiten (*TMD2*) sowie die dritte und vierte transmembranäre Domäne (*TMD3*, *TMD4*) von *Clcn3* kodieren<sup>62</sup>. Im Labor von S.

Sasaki wurden Exon 5 und 6 deletiert, die für die zweite bis vierte transmembranäre Domäne (*TMD2 - TMD4*) kodieren <sup>63</sup>.

Zur weiteren Aufklärung der physiologischen Rolle von CIC-3 wurden in unserem Labor zusätzlich CIC-3 Knock-in-Mäuse generiert, die *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäuse. Diese sollen an Stelle des funktionellen CIC-3 Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Austauschers, ein vom H<sup>+</sup>-Transport entkoppeltes CIC-3-Protein mit einer konstitutiven Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit besitzen, was durch Neutralisierung von Glu<sub>ex</sub> erreicht werden sollte (s. Kapitel 1.3.1). Der Phänotyp dieser CIC-3*unc*-Mutante sollte es ermöglichen, Rückschlüsse auf die biologische Relevanz der Kopplung des Cl<sup>-</sup>-Transports an den H<sup>+</sup>-Gradienten zu ziehen. Interessanterweise zeigen die *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäuse, anders als die entsprechenden Mausmutanten von CIC-5 und CIC-7 <sup>16,17</sup>, keine Ähnlichkeit zum Phänotyp der *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäuse. *Clcn5<sup>unc/unc</sup>* - wie auch *Clcn7<sup>unc/unc</sup>*-Mäuse zeigen einen nahezu ebenso schwerwiegenden Phänotyp wie die entsprechenden Knockout-Mausmutanten. Das bedeutet, dass die Kopplung des Cl<sup>-</sup>-Transports an den H<sup>+</sup>-Gradienten für die physiologische Rolle der endosomalen/lysosomalen Cl<sup>-</sup>-Akkumulation von CIC-5 bzw. -7 essentiell ist und durch eine konstitutive Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit nicht ersetzt werden kann. Anders bei CIC-3: *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäuse sind, im Gegensatz zu *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäusen, auf den ersten Blick phänotypisch völlig unauffällig. Da CIC-3 mit CIC-4 Heterodimere bilden kann <sup>55</sup>, könnte CIC-4 in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäusen möglicherweise eine kompensatorische Rolle für die Funktion des Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Austauschs von CIC-3 einnehmen. Diese Vermutung stützt sich auch auf der Beobachtung, dass die Expression von CIC-4 in *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäusen, nicht jedoch in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäusen, drastisch vermindert ist (Abb. 6).



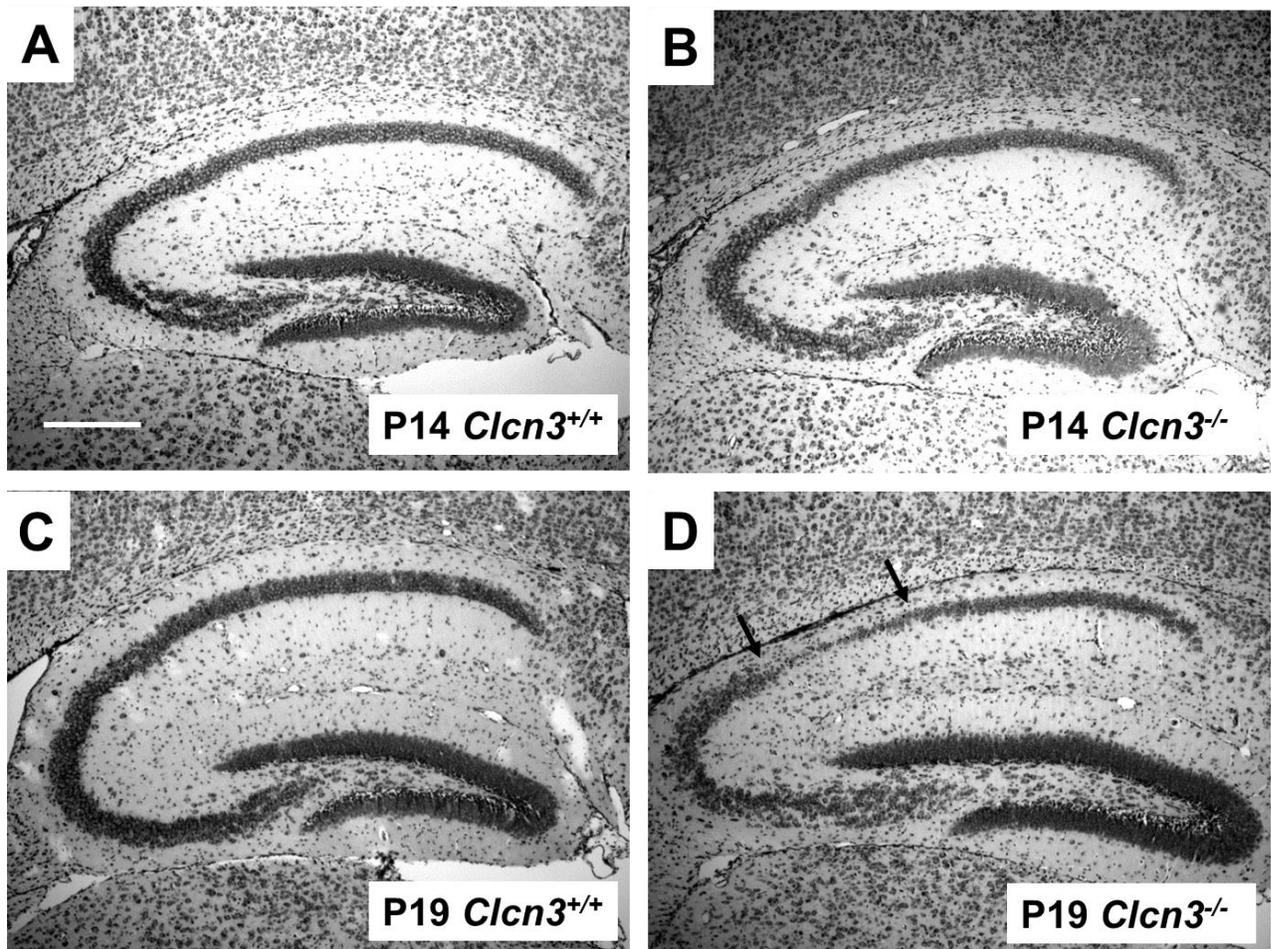
**Abbildung 6 Expression von CIC-4 im Gehirn in *Clcn3<sup>-/-</sup>*- und *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäusen verglichen mit *Clcn3<sup>+/+</sup>*-Mäusen.**

Westernblots aus Membranpreparationen von Gehirngewebe aus *Clcn3<sup>-/-</sup>*- und *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäusen jeweils im Vergleich zu *Clcn3<sup>+/+</sup>*-Geschwistern. In *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäusen, nicht aber in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäusen, ist die Expression von CIC-4 vermindert. Stefanie Weinert, AG Jentsch.

Unter Annahme einer kompensatorischen Funktion von ClC-4 in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäusen und um nun tatsächlich eine reine Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäusen zu betrachten, wurden in unserem Labor zusätzlich *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäuse generiert. Der Phänotyp der *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäuse ähnelt dem der *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäuse und ist noch stärker ausgeprägt. Dies zeigt sich beispielsweise in der noch früher einsetzenden Neurodegeneration und der erhöhten Mortalität dieser Mäuse.

### **1.3.5 Beginn der hippocampalen Neurodegeneration in *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäusen**

Um sicherzustellen, dass mögliche Unterschiede der in der vorliegenden Arbeit abgeleiteten inhibitorischen postsynaptischen Miniaturströme zwischen *Clcn3<sup>-/-</sup>* und *Clcn3<sup>+/+</sup>* nicht durch die Neurodegeneration in *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäusen bedingt, sondern tatsächlich auf die Abwesenheit von ClC-3 in *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäusen zurückgeführt werden konnte, wurde der Hippocampus von *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäusen zuvor histologisch untersucht (durchgeführt von Stefanie Weinert). Dafür wurden Nissl-Färbungen von Sagittalschnitten des Hippocampus angefertigt und die Morphologie der Hippocampi von *Clcn3<sup>-/-</sup>*- und *Clcn3<sup>+/+</sup>*-Mäusen im Alter von 14 und 19 Tagen miteinander verglichen (Abb.9). Die dunkleren Streifen der Gehirnschnitte in Abbildung 9 entsprechen dem Stratum pyramidale bzw. dem Stratum granulare und bestehen hauptsächlich aus den dicht gepackten Zellkörpern der Pyramidenzellen der CA1 und CA3-Region im Hippocampus bzw. der Körnerzellen im Gyrus dentatus (Vgl. Kapitel 1.5.). Am Tag P14 war morphologisch kein Unterschied zwischen den Hippocampi von *Clcn3<sup>-/-</sup>*- und *Clcn3<sup>+/+</sup>*-Mäusen detektierbar (Abb. 9.A, B), die Pyramidenzellschicht hatte an P14 in *Clcn3<sup>-/-</sup>*- und *Clcn3<sup>+/+</sup>*-Mäusen die gleiche Breite und Zelldichte. Am Tag P19 war die Neurodegeneration in *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäusen jedoch histologisch sichtbar, die Zelldichte der Pyramidenzellschicht der CA1-Region des Hippocampus war in *Clcn3<sup>-/-</sup>*- im Vergleich zu *Clcn3<sup>+/+</sup>*-Mäusen deutlich verringert (Abb. 9.C,D). Die Pyramidenzellschicht in *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäusen zeigte sich deutlich verschmälert und war abschnittsweise nur ein bis zwei Zellkörper breit (Abb. 9.C, Pfeile). Aufgründessen wurden für die elektrophysiologischen Messungen für alle Genotypen jüngere Mäuse, im Alter von 14-16 Tagen, verwendet, die histologisch keine Neurodegeneration zeigten.



**Abbildung 7 Degeneration des Hippocampus in *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

Nissl-Färbung von Sagittalschnitten des Hippocampus. An P14 (postnataler Tag 14) ist im Hippocampus von *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen histologisch noch keine Neurodegeneration erkennbar (B). An P19 hat die Neurodegeneration des Hippocampus mit einer Abnahme der Anzahl an CA1-Pyramidenzellen (D, Pfeile) bereits eingesetzt. In (A, C) sind im Vergleich hippocampale Schnitte von *Clcn3*<sup>+/+</sup>-Mäusen dargestellt. Maßstabsbalken: 0,5 mm. Stefanie Weinert, AG Jentsch

## 1.4 Synaptische Transmission

### 1.4.1 Synaptische Vesikel

Während der Reizweiterleitung zwischen Neuronen wird ein elektrisch kodiertes Signal mittels präsynaptischer Freisetzung von Transmittern in ein chemisches Signal umgewandelt und über postsynaptische Rezeptoraktivierung schließlich wieder in ein elektrisches Signal zurückgewandelt.

Die Transmittermoleküle werden in synaptischen Vesikeln gespeichert und während der Neurotransmission exozytotisch freigesetzt. Es gibt zwei Hauptgruppen von Vesikeln in Neuronen: große, elektronendichte Vesikel, *LDCVs*, und kleine synaptische Vesikel, *SSVs* (*small synaptic vesicles*). Die beiden Gruppen von Vesikeln unterscheiden sich in Größe, Transmitterart und sekretorischem Weg voneinander. Die *LDCVs* sind größer, enthalten Neuropeptide und biogene Amine und werden am Trans-Golgi-Netzwerk im Soma gebildet. Die *SSVs* enthalten nicht-peptidartige Neurotransmitter wie GABA und Glutamat und stellen den häufigsten sekretorischen Vesikeltypus an chemischen Synapsen dar. Sie entstehen durch Abschnürung von frühen Endosomen oder durch direktes Recycling im *Synaptischen Vesikel Zyklus* an der Präsynapse<sup>90</sup>. Die *SSVs* werden in zwei funktionelle Gruppen unterteilt, dem *RRP* (*readily releasable pool*), der unmittelbar zur Exozytose bereit steht und dem *RP* (*reserve pool*), der als Reserve dient. Ein Vesikel gelangt vom *RP* über das Andocken (*Docking*) an die Plasmamembran und dem *Priming*, bei dem es für die Fusion mit der Plasmamembran kompetent gemacht wird, zum *RRP*<sup>91</sup>. Erreicht ein Aktionspotenzial die präsynaptische Endigung, kommt es aufgrund der Depolarisation zum  $\text{Ca}^+$ -Einstrom durch spannungsabhängige  $\text{Ca}^+$ -Kanäle und zur Exozytose der Vesikel des *RRP*. Bei der Exozytose kann das Vesikel entweder vollständig exozytiert werden, es kann aber auch zu einer nur teilweisen Transmitterentleerung nach Formation einer transienten Fusionspore gemäß dem „*Kiss-and-run*“ – Mechanismus kommen<sup>92</sup>. Anschließend wird das vollständig entleerte Vesikel Clathrin-vermittelt endozytiert und entweder direkt, oder über den Umweg über das Endosom recycelt. Die exozytierten Neurotransmittermoleküle im synaptischen Spalt binden an die postsynaptischen Rezeptoren, was im Fall der exzitatorischen Neurotransmission zu einer postsynaptischen Depolarisation, im Fall der inhibitorischen Neurotransmission zu einer postsynaptischen Hyperpolarisation oder zu Shunting führt.

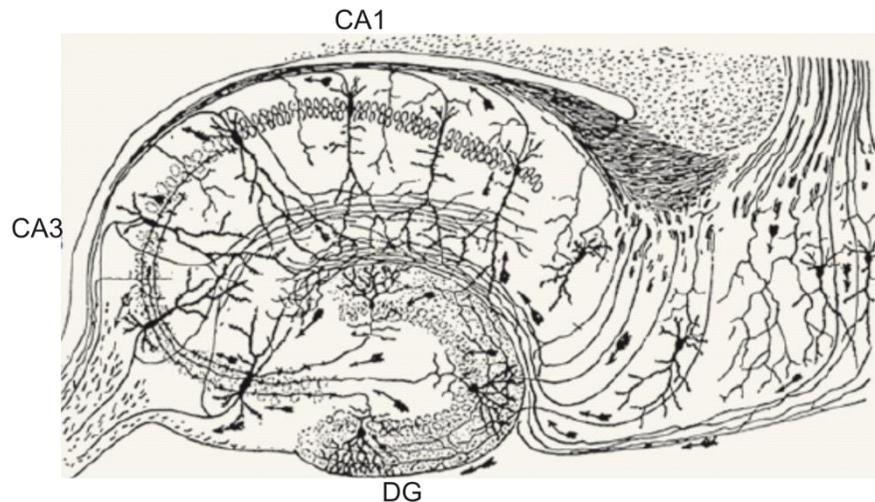
#### **1.4.2 Quantale Beschaffenheit der synaptischen Transmission**

Anhand von Analysen der postsynaptischen Antworten an der neuromuskulären Endplatte wurde von Katz *et al.*, 1971 der Transmittergehalt eines einzelnen Vesikels als elementare Einheit (Quantum) der synaptischen Transmission identifiziert<sup>93</sup>. Die postsynaptisch gemessene Antwort einer einzelnen Vesikelentleerung als der kleinste Betrag der synaptischen Transmission, wird als

Miniaturereignis bezeichnet. Miniaturereignisse geschehen spontan und unabhängig von Aktionspotenzialen. Miniaturereignisse sind sowohl an exzitatorischen als auch an inhibitorischen Synapsen zu messen. Die Frequenz von Miniaturereignissen, die an einem Neuron abgeleitet werden, hängt einerseits von der Wahrscheinlichkeit der synaptischen Vesikelentleerung und andererseits von der Anzahl der Synapsen dieses Neurons ab. Die Amplitude der Miniaturereignisse wird als Quantengröße bezeichnet und wird sowohl präsynaptisch vom Transmittergehalt der Vesikel, als auch postsynaptisch von der Rezeptordichte und –sensitivität bestimmt. Als Voraussetzung für den Einfluss des präsynaptischen Transmittergehalts eines Vesikels auf die Quantengröße darf die Entleerung eines einzelnen Vesikels nicht zur Sättigung der postsynaptischen Rezeptoren führen. Eine Vielzahl von Untersuchungen an verschiedenen Synapsentypen des Nervensystems haben gezeigt, dass es zwar Unterschiede im Sättigungsgrad der postsynaptischen Rezeptoren an verschiedenen Synapsen gibt, doch dass die meisten Synapsen physiologischerweise im nicht-gesättigten Bereich arbeiten<sup>94,95</sup>. Deshalb können sich Mechanismen, die die vesikuläre Transmitteraufnahme beeinflussen auf die Quantengröße auswirken. Zu diesen präsynaptischen Mechanismen gehören beispielsweise die Regulation der zytosolischen Transmitterkonzentration, der elektrochemische  $H^+$ -Gradient an der Vesikelmembran, der den Neurotransmittertransport antreibt, die vesikulären Ionenleitfähigkeiten, die diesen Gradienten beeinflussen und die Neurotransmittertransporter. Daneben gehören auch die Vesikelgröße, sowie die Regulation der Vesikelfusion zu den Faktoren, die die Quantengröße präsynaptisch beeinflussen.

Die Quantengröße einer Synapse ist keine starre Größe, sondern aktivitätsabhängig modulierbar. Die Aktivitätsabhängigkeit der Quantengröße trägt zu verschiedenen Formen von synaptischer Plastizität bei, wie beispielsweise der LTP (*long term potentiation*), ein grundlegender Mechanismus von Lernen und Gedächtnis.

## 1.5 Der Hippocampus



**Abbildung 8 Neuronaler Schaltkreis des Hippocampus.**

Eine Illustration von Ramón y Cajal. *Gyrus dentatus* (DG), *Cornu ammonis* (CA). Adaptiert von Referenz <sup>96</sup>.

Da CIC-3 im Hippocampus besonders stark exprimiert wird und der Hippocampus diejenige Gehirnstruktur darstellt, welche durch die Abwesenheit von CIC-3 im Knockout – Mausmodell am stärksten betroffen ist (Neurodegeneration), wurde in der vorliegenden Arbeit diese Gehirnregion untersucht.

Der Hippocampus ist im basalen Temporallappen lokalisiert. Er stellt eine zentrale Schaltstelle des limbischen Systems dar und wird mit emotionalen, viszeralen und endokrinen Vorgängen in Zusammenhang gebracht. Der Hippocampus hat eine besonders wichtige Funktion für Lernen und Gedächtnis und spielt eine bedeutende Rolle bei der Überführung von Informationen ins deklarative Langzeitgedächtnis. Dies wurde bei der Untersuchung des Patienten H.M. in den fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts erkannt <sup>97</sup>. Zur Behandlung von Epilepsie wurden H.M. beidseits die medialen Teile des Temporallappens und damit beide Hippocampi entfernt. Dies führte bei diesem Patienten zu anterograder Amnesie, also zur Unfähigkeit neue Information im Langzeitgedächtnis abzuspeichern. H.M. war jedoch weiterhin in Lage sich an Ereignisse vor der Operation zu erinnern sowie neue motorische Fertigkeiten zu erlernen.

Eingehende Informationen des entorhinalen Kortex durchlaufen den Hippocampus über den internen trisynaptischen Schaltkreis, über den der Hippocampus in den Papez-Neuronenkreis eingebunden wird. Die erste Synapse wird durch die Projektion der *Tractus-perforans*-Fasern auf die Körnerzellen des *Gyrus dentatus* gebildet. Die Axone der Körnerzellen, die sog. Moosfasern, projizieren dann auf die Pyramidenzellen der CA3-Region des Hippocampus (zweite Synapse), die über Schaffer-Kollaterale CA1-Pyramidenzellen (dritte Synapse) innervieren. CA1-Pyramidenzellen projizieren weiter über den *Tractus alveans* zum Neokortex oder zurück zum Subiculum und den entorhinalen Kortex. Diese Verbindungen sind alle exzitatorisch durch Glutamat vermittelt. Sie sind in der Lage das experimentelle Phänomen der Langzeitpotenzierung, einer Form von synaptischer Plastizität, zu erzeugen: nach kurzer, hochfrequenter präsynaptischer Stimulation kommt es zu einer lang anhaltenden Veränderung der synaptischen Übertragung mit erhöhter Effizienz<sup>98</sup>. Dies könnte die physiologische Grundlage für Gedächtnisprozesse darstellen<sup>99</sup>.

Inhibitorische Eingänge auf die Pyramidenzellen des Hippocampus werden durch den Neurotransmitter GABA vermittelt. Sie spielen eine wichtige Rolle für die Synchronisierung gleichzeitig aktiver Neuronenpopulationen und die daraus resultierende Generierung von intrinsischen Oszillationen des Hippocampus, wie beispielsweise dem Theta-Rhythmus<sup>100</sup>. Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher inhibitorischer Interneuronentypen im Hippocampus. Die Interneurone können morphologisch, neurochemisch aufgrund ihres unterschiedlichen Gehalts an Neuropeptiden und Calcium-bindenden Proteinen, elektrophysiologisch und aufgrund ihres Innervationsmusters eingeteilt werden<sup>101</sup>. Korbzellen bilden beispielsweise an den Somata der Pyramidenzellen inhibitorische Synapsen, Kandelaberzellen dagegen bilden spezielle axo-axonale Synapsen am Axoninitialsegment der Pyramidenzellen aus.

## 1.6 Fragestellung

Untersuchungen an *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen haben gezeigt, dass der Verlust von CIC-3 zu starker Neurodegeneration mit komplettem Verlust des Hippocampus führt. Dies deutet darauf hin, dass CIC-3 eine bedeutende Rolle im Gehirn spielt. CIC-3 ist in Neuronen intrazellulär auf synaptischen Vesikeln lokalisiert, wo dieses Protein möglicherweise als Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher an der Ansäuerung von synaptischen Vesikeln und so an der vesikulären Neurotransmitteraufnahme beteiligt ist. Es

spielt somit folglich eine wichtige Rolle bei der Neurotransmission. Die Bedeutung von CIC-3 für die GABAerge inhibitorische Neurotransmission ist umstritten. Elektrophysiologische Untersuchungen von Riazanski *et al.*, 2011 an *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen, zeigten eine reduzierte Amplitude und Frequenz der *mIPSCs* in *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen und führten dies auf die wichtige Funktion von CIC-3 für die vesikuläre GABA-Aufnahme zurück <sup>79</sup>. In der Studie von Stobrawa *et al.*, 2001 wurden hingegen keine Unterschiede beschrieben <sup>48</sup>. Gegenstand dieser Arbeit ist es, diese widersprüchlichen Aussagen zu überprüfen und die Rolle von CIC-3 bei der inhibitorischen Neurotransmission elektrophysiologisch zu untersuchen. Einerseits soll die Rolle von CIC-3 für die inhibitorische Transmission im Hinblick auf dessen vollständigen Verlust anhand von *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht werden, und andererseits im Hinblick auf die Funktion als Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher anhand einer *CIC-3unc* – Mausmutante, bei der CIC-3 anstelle des Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Austauschs eine reine Cl<sup>-</sup> Leitfähigkeit zeigt.

Dafür sollen anhand von hippocampalen Akutschnitten der verschiedenen Knockout- bzw. Knockinmäuse *mIPSCs* an CA1-Pyramidenzellen des Hippocampus abgeleitet werden. Die Amplitude der *mIPSCs*, die vom vesikulären Transmittergehalt abhängig ist, sowie ihre Frequenz, die von der Anzahl der Synapsen und von der Wahrscheinlichkeit der spontanen Vesikelfusion abhängig ist, sollen analysiert werden.

Auch die exzitatorische Neurotransmission in der *CIC-3unc*-Maus, anhand von *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen, wird betrachtet. Dafür sollen analog zu den *mIPSCs* exzitatorische Miniaturströme (*mEPSCs*) in hippocampalen CA1-Pyramidenzellen abgeleitet und die Amplitude analysiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Soweit nicht anders erwähnt, wurden Standardchemikalien der Qualität „p.a.“ bzw. „reinst“ der Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Rapidozym (Berlin), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen) und Tocris (Bristol) verwendet. Enzyme wurden von Eurx (Gdansk) bezogen, Oligonukleotide von Biomers (Ulm).

Besondere Chemikalien und Ausstattung werden im entsprechenden Methodenteil in Kapitel 2.2 aufgeführt.

#### 2.1.1 Lösungen und Medien

Für alle Lösungen wurde durch ein Milli-Q-System (Millipore, Eschborn) aufgereinigtes Reinstwasser verwendet. Die Osmolarität aller bei der Elektrophysiologie verwendeten Lösungen wurde mit dem Gefrierpunkt-Osmometer OSMOMAT 030 (Gonotec, Berlin) bestimmt.

**Tabelle 3 Lösungen und Medien.**

<b>Badlösung = ACSF (<i>artificial cerebrospinal fluid</i>) für hippocampale Akutschnitte</b>	131 mM NaCl; 28,8 mM NaHCO <sub>3</sub> ; 11 mM Glukose; 2,8 mM KCl; 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> ; 1,3 mM MgSO <sub>4</sub> ; 1,1 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; ca. 320 mosml/l
<b>DNA Ladepuffer</b>	0.25% (w/v) Bromphenolblau, 0.25% (w/v) Xylenzyanol, 30% (w/v) Glycerol
<b>Alkalischer Lysepuffer (DNA-Extraktion)</b>	25mM NaOH; 0,2mM EDTA; pH 12
<b>Neutralisationspuffer (DNA-Extraktion)</b>	40mM Tris-HCl; pH 5
<b>Intrazelluläre Lösung</b>	130mM CsCl; 10mM HEPES; 2mM MgATP; 2mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,2mM EGTA; ca. 280-290 mosml/l
<b>Sucroselösung</b>	87 mM NaCl; 75 mM Sucrose; 28,8 mM NaHCO <sub>3</sub> ; 11 mM Glukose; 7 mM MgSO <sub>4</sub> ; 2,5 mM KCl; 1,1 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,5 mM CaCl <sub>2</sub> ; 320-340 mosml/l
<b>TAE-Puffer (50x)</b>	200 mM Tris-Acetat; 10mM EDTA; pH 7,4

## 2.1.2 Oligonukleotide

### 2.1.2.1 Primer für Genotypisierung

**Tabelle 4 Primer für Genotypisierung.**

Mauslinie	Primersequenz	Länge des PCR-Produkts
<i>Clcn3</i> <sup>-/-</sup>	5'-CACAGTTCTGTAACCTGG-3'	604 bp WT-Allel
	5'-AGCCAAGCAAGATAAAGC-3'	301 bp LoxP-Allel
	5'-GCATGCTCCAGACTGCCTTG-3'	
<i>Clcn3</i> <sup>unc/unc</sup>	5'-GCATTTTCCTAGCAGGTG-3'	140 bp WT-Allel
	5'-AAGACTCCCAGAGACAATGAG-3'	195 bp LoxP-Allel
<i>Clcn4</i> <sup>-/-</sup>	5'-CCTGTAGGTTGCTTCAGTCG-3'	900 bp WT-Allel
	5'-TGGGATGAGGTAGAGACTCCG-3'	700 bp KO Allel
	5'-GGAAGACAATAGCAGGCATGC-3'	

### 2.1.3 Mauslinien

Alle verwendeten Mäuse wurden im Tierhaus des MDC-Berlin nach den institutionellen Richtlinien gehalten (Tag/Nacht-Zyklus mit Licht von 7:00 - 19:00Uhr, freier Zugang zu Futter und Wasser). Die Tierhaltung und Experimente erfolgten nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes. Folgende Mauslinien wurden für die Arbeit verwendet: *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäuse<sup>48</sup>, *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>-Mäuse, *Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäuse<sup>87</sup> und *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäuse.

Die verwendeten *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäuse der Arbeitsgruppe Jentsch, in Stobrawa *et al.*, 2001 noch im gemischten genetischen Hintergrund C57BL/6J-129/SvJ<sup>48</sup>, wurden mittlerweile in den 129/SvJ-Hintergrund rückgekreuzt. Die *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>-Mäuse, wurden von Stefanie Weinert (AG Jentsch) generiert und haben den genetischen Hintergrund der C57BL/6-Inzuchtlinie.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Alkalische Lyse von Schwanzbiopsien zur DNA-Extraktion (*Hot-shot*-Methode)

Für die routinemäßige Genotypisierung wurden die Schwanzbiopsien 45 min lang in 75 µl alkalischem Hot-Shot Lysepuffer bei 95 °C verdaut und danach auf 4 °C gekühlt. Anschließend wurde die Probe mit dem *Hot-Shot*-Neutralisationspuffer neutralisiert.

#### 2.2.1.2 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die PCR wurde routinemäßig zur DNA-Amplifikation für die Genotypisierung der Mäuse eingesetzt. Der Mastermix (50 µl – Ansatz) für die Standard-PCR enthielt: je 20 pmol der beiden Primer, 1 µl 10 mM dNTP-Mix, 2 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 µl 10x PCR-Puffer, 50-100 ng DNA und 1,5 U Taq-Polymerase. Die Primer sind in 2.1.2.1 aufgelistet. Für die PCR wurden Thermozykler der Firma Biometra (Professional Thermocycler) verwendet. In Abhängigkeit von den Primern und der Länge des PCR-Produkts, wurden die Einstellungen für die PCR-Zyklen auf folgendem PCR-Protokoll basierend abgewandelt:

**Tabelle 5 PCR-Protokoll**

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer	Anzahl der Zyklen
erste Denaturierung	94	5 min	
Denaturierung	94	30 s	38x
Anlagerung	52-62	30 s	
Elongation	72	1 min/kb	
letzte Elongation	72	10 min	
Lagerung	10	∞	

### 2.2.1.3 DNA-Gelelektrophorese

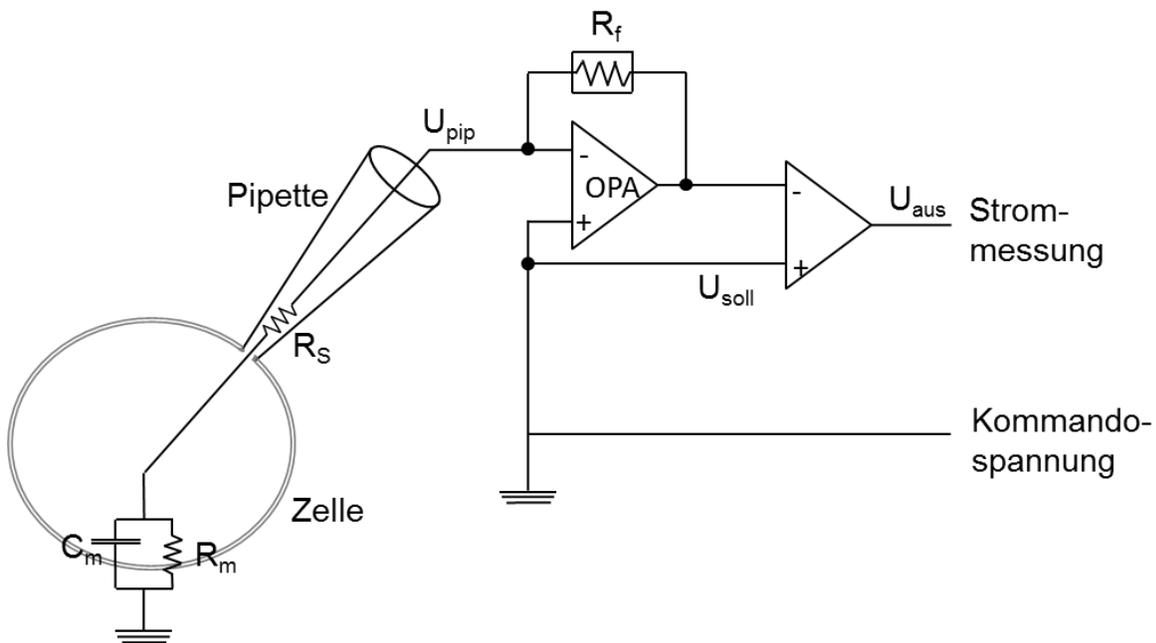
Zur DNA-Auftrennung wurden 0,7 - 2,0%ige Agarosegele verwendet, bei deren Herstellung Ethidiumbromid zugesetzt wurde. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Den DNA-Proben wurde DNA-Ladepuffer zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte in Flachbettkammern bei ca. 10 V/cm. Nach der Auftrennung wurden die Gele auf einem UV-Transilluminator bei 312 nm mit einem Videodokumentationssystem fotografiert.

## 2.2.2 Elektrophysiologie

### 2.2.2.1 Prinzip der Patch-Clamp-Technik

Neher und Sakman haben 1976<sup>102</sup> eine Methode entwickelt, die die Messung von Strömen durch einzelne Ionenkanäle in Membranen von lebenden Zellen ermöglichte, die sog. *Patch-Clamp*-Technik. Sie stellt eine Verfeinerung der Technik der Spannungsklemme (*voltage clamp*) dar, die bereits in den dreißiger Jahren von Cole und Curtis entwickelt worden war. Grundlage der *Patch-Clamp*- bzw. *Voltage-Clamp*-Technik ist die Konstanthaltung der Spannung über die Zellmembran, was durch Injektion eines Kompensationsstroms ermöglicht wird, der genauso groß ist, wie der Strom, der durch die Membran fließt und der ohne entgegengesetzten Kompensationsstrom zur Spannungsänderung führen würde (Abb. 8). Die Messung des Kompensationsstroms in *Patch-Clamp*-Experimenten erlaubt unmittelbare Rückschlüsse auf die Leitfähigkeit der Membran zu ziehen, die z.B. von Ionenkanälen bestimmt wird. Im Gegensatz zu anderen *Voltage-Clamp*-Verfahren wird bei der *Patch-Clamp*-Technik mit einer Glaspipette ein stabiler Kontakt zu einem kleinen Membranfleck (dem *Patch*) der Zellmembran hergestellt, sodass dieser Membranfleck durch einen hohen Abdichtwiderstand im GΩ-Bereich, dem *Gigaseal*, vom Bad getrennt wird und vom Hintergrundrauschen elektrisch isoliert ist. Dadurch resultiert eine extrem hohe Auflösung für die zu messenden Ströme im Membranbereich „unter“ der Pipette. Nach Erreichen des *Gigaseals*, was als *cell-attached*-Konfiguration bezeichnet wird, kann durch ruckartiges Anlegen und Loslassen eines Unterdrucks an die Pipette, der Membranbereich unter der Pipette zerstört werden, sodass die sog. Ganzzellkonfiguration erreicht wird. In der Ganzzellkonfiguration wird dann der Strom gemessen, der durch die gesamte verbleibende Membranoberfläche fließt, ohne den unmittelbaren Beitrag der einzelnen Ionenkanäle zu erkennen. Daneben tauscht sich in der Ganzzellkonfiguration nach kurzer

Zeit das Cytoplasma mit der Pipettenlösung aus. Dies ermöglicht einerseits, die (Ionen-) Zusammensetzung im Zellinneren genau zu kontrollieren. Andererseits ist die Zusammensetzung des Cytoplasmas nun nicht mehr die ursprüngliche bzw. natürliche, sodass es beispielsweise zum Verlust von intrazellulären Molekülen kommen kann, die wichtige regulatorische Funktionen auf Ionenkanäle ausüben<sup>103</sup>.



**Abbildung 9 Vereinfachtes Schaltbild eines *Patch-Clamp*-Verstärkers bei einer *Patch-Clamp*-Ableitung in Ganzzellkonfiguration.**

$C_m$ : Membrankapazität,  $R_m$ : Membranwiderstand,  $R_s$ : Serienwiderstand, OPA: Operationsverstärker,  $R_f$ : Rückkopplungswiderstand,  $U_{soll}$ : Kommando- oder Sollspannung,  $U_{pip}$ : Pipettenpotenzial,  $U_{aus}$ : Ausgangsspannung proportional zum Ionenstrom = Messgröße. Adaptiert von Referenz<sup>103</sup>.

### 2.2.2.2 Geräte

Für die elektrophysiologischen Messungen wurde der Signalverstärker Multiclamp 700B (Axon) und der Analog/Digitalkonverter Digidata 1440A (Axon) verwendet. Die optische Kontrolle erfolgte durch ein aufrechtes Mikroskop (Olympus BX51WI) mit DIC-Optik (Differential Interface Optic) über Videomikroskopie mit der Infrarot-Kamera VX55 (Till Photonics, Gräfelfing). Es wurde dabei

ein 4fach- oder 60fach-Vergrößerungsobjektiv genutzt. Zum Auffinden der Gehirnregion wurde mit dem 4fach-Vergrößerungsobjektiv, zur Identifizierung einer geeigneten Zelle mit einem 60fach-Vergrößerungsobjektiv gearbeitet. Die Messpipetten aus Borosilikatglas (Außendurchmesser 1,5 mm, Wandstärke 0,241 mm) wurden mit einem Horizontalpipettenzieher (Zeitz, München) gezogen. Die Messelektrode wurde mit Hilfe eines elektrischen Mikromanipulators SM 5 (Luigs & Neumann) positioniert. Die Temperatur der Messkammer wurde mit dem BadController V (Luigs & Neumann) kontrolliert. Um Akutschnitte des Hippocampus zu erhalten wurde ein Vibratom Leica VT 1200 S verwendet.

### **2.2.2.3 Elektrophysiologie an hippocampalen Akutschnitten**

#### **2.2.2.3.1 Präparation von transversalen Akutschnitten des Hippocampus für Elektrophysiologie**

Mäuse im Alter von 14 bis 16 Tagen (p14-p16) wurden durch zerebrale Dislokation getötet. Anschließend wurde der Kopf abgetrennt, die Schädeldecke geöffnet und das Gehirn entnommen. Das Gehirn wurde sagittal in seine beiden Hemisphären getrennt und die beiden Gewebeblöcke, die den Hippocampus enthielten, wurden in einer Vibratomkammer in eiskalter Sucroselösung mit Sekundenklebstoff fixiert und geschnitten. Die transversalen Gehirnschnitte mit der Dicke von 300µm wurden für 30 min in einem 34 °C warmen Sucrosebad gehalten. Anschließend wurden die Schnitte in ein ACSF-Bad mit Raumtemperatur transferiert, wo sie eine bis sieben Stunden aufbewahrt, bevor sie in die Messkammer übertragen wurden. Alle benutzten Lösungen wurden stetig mit Carbogen (5% CO<sub>2</sub> und 95% O<sub>2</sub>) begast.

#### **2.2.2.3.2 Patch-Clamp-Messungen an Pyramidenzellen im Hippocampus**

Für die *Patch-Clamp*-Messungen an Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippocampus wurden die Akutschnitte auf einem Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläschen in die Messkammer überführt. Die Pyramidenzellen wurden anhand ihrer Form und ihrer Lage in der Pyramidenzellschicht identifiziert. Als Mess- sowie als Badelektrode dienten chlorierte Silberdrähte. Die Messpipetten waren mit intrazellulärer Lösung gefüllt und hatten in der Badlösung einen Widerstand von 2,5 - 4 MΩ, der über kurze 5 mV - Testpulse bestimmt wurde. Während die

Messpipette im Schnitt zur ausgewählten Zelle navigiert wurde, wurde die Pipettenspitze durch einen konstanten Überdruck von ca. 70 mmHg offen gehalten. Außerdem wurde die Zelloberfläche der Pyramidenzelle durch den Überdruck vom umliegenden Gewebe befreit. Befand sich die Pipettenspitze nah an der glatten Zelloberfläche, wurde der Überdruck weggenommen, sodass sich die Pipettenspitze dicht mit der Zellmembran verband und ein Widerstand zwischen Bad- und Pipettenlösung im GOhm-Bereich entstand (*Gigaseal*). Durch ruckartiges Anlegen und Wegnehmen von Unterdruck an die Pipette, wurde die Zellmembran an der Pipettenspitze durchbrochen und die Verbindung zwischen Pipettenlösung und dem intrazellulären Kompartiment hergestellt (Ganzzellkonfiguration). Nach einer zweiminütigen Äquilibrationszeit wurden die im *Voltage-Clamp*-Modus gemessenen Ströme mit der Frequenz von 10 kHz aufgenommen, mit 2 kHz (*Low-pass*) gefiltert und mit pClamp 10.2 – Software (Molecular Devices, Sunnyvale) visualisiert. Für die Datenanalyse wurde ebenfalls pClamp 10.2 – Software und zudem Mini Analysis Program (Synaptosoft, Decatur) verwendet.

#### **2.2.2.3.3 Messung inhibitorischer postsynaptischer Miniaturströme (*mIPSCs*)**

GABAerge, inhibitorische postsynaptische Miniaturströme (*mIPSCs*) wurden im *Voltage-Clamp*-Modus bei einem angelegten Haltepotenzial von -70 mV an hippocampalen CA1-Pyramidenzellen abgeleitet. Die Temperatur der Badlösung wurde bei 34°C gehalten. Um Aktionspotenzialvermittelte Transmission auszuschließen, enthielt die extrazelluläre Lösung 1µM TTX (Tetrodotoxin). Sie enthielt außerdem 10 µM NBQX (*2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo[f]quinoxaline-2,3-dione*) und 50 µM D-AP5 (D-(-)-2-Amino-5-phosphonovaleriansäure) um die exzitatorische Neurotransmission zu verhindern. Die Pipettenlösung enthielt 130 mM Cl<sup>-</sup>, sodass es bei der postsynaptischen Aktivierung der GABA-Rezeptoren durch GABA nach einem Miniaturereignis zu einem Auswärtsstrom von Cl<sup>-</sup>-Ionen kam und die *mIPSCs* negative Ströme darstellten. Während der Aufnahme wurden zur Überprüfung des Zugangswiderstands 5 mV-Testpulse im Abstand von zwei Minuten appliziert. Pro Zelle wurden ca. 300 Miniaturstromereignisse ausgewertet.

#### **2.2.2.3.4 Messung exzitatorischer postsynaptischer Miniaturströme (*mEPSCs*)**

Der Versuchsaufbau zur Aufnahme der exzitatorischen postsynaptischen Miniaturströme entsprach im Allgemeinen dem der Aufnahme der *mIPSCs*. Neben 1  $\mu\text{M}$  TTX (Tetrodotoxin) in der extrazellulären Badlösung zum Ausschluss der Aktionspotential – vermittelten Transmission, befand sich hier 20  $\mu\text{M}$  Bicuculline anstelle von D-AP5 und NBQX in der Badlösung um die inhibitorische Neurotransmission zu verhindern. Aufgrund der niedrigen Frequenz der *mEPSCs* von etwa 1/min wurde die Vesikelentleerung mittels Erhöhung der Osmolarität durch Zugabe von 200mM Sucrose stimuliert. Pro Zelle wurden ca. 230 Miniaturstromereignisse ausgewertet.

#### **2.2.2.4 Statistische Auswertung**

Alle Ergebnisse wurden, falls nicht anders vermerkt als Mittelwert mit Standardfehler (S.E.M.) angegeben. Fehlerbalken repräsentieren ebenfalls den Standardfehler. Um die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) zu überprüfen wurden die mittleren Amplituden und Frequenzen zunächst auf das Vorliegen der Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test geprüft. Bei Normalverteilung wurde der zweiseitige t-Test für ungepaarte Stichproben angewandt. Waren die Werte nicht normalverteilt wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz der kumulativen Amplituden und Frequenzen, wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test angewandt.

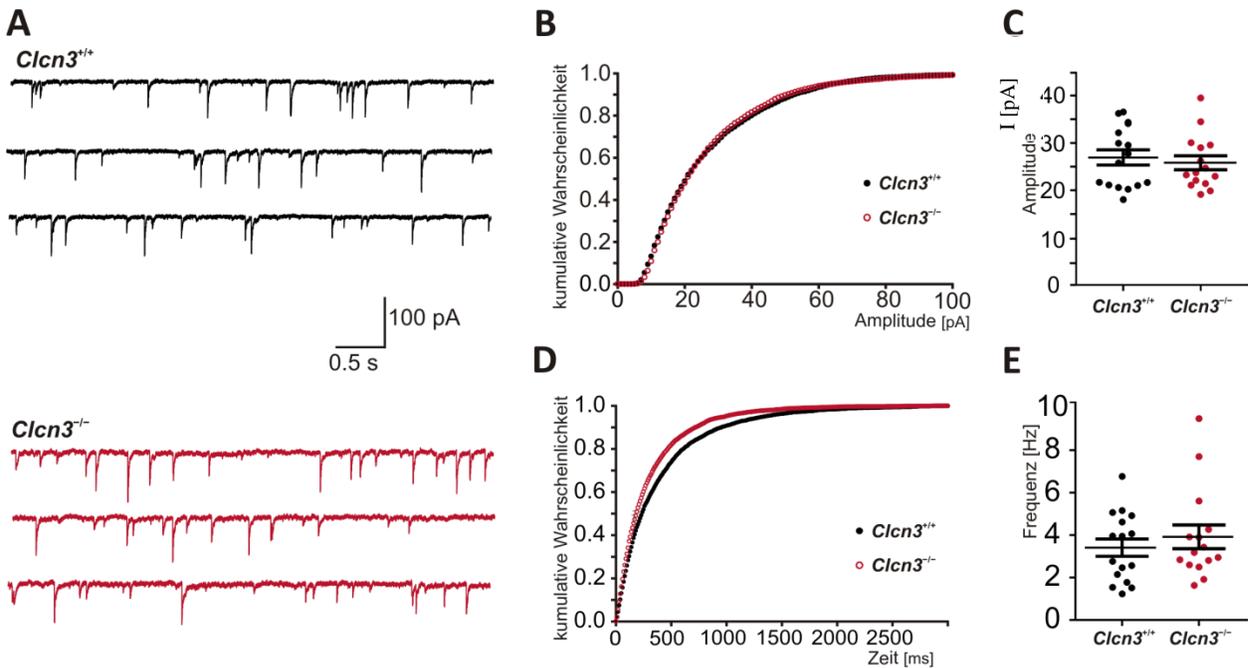
### 3 Ergebnisse

Zur Untersuchung der Rolle von CIC-3 bei der GABAergen synaptischen Neurotransmission wurden GABAerge inhibitorische postsynaptische Miniaturströme, *mIPSCs*, an Pyramidenzellen der CA1-Region im Hippocampus abgeleitet. Diese Ströme stellen die postsynaptische Antwort nach spontaner, d.h. nicht Aktionspotenzial getriggelter, präsynaptischer Entleerung einzelner Vesikel in den synaptischen Spalt dar. Es wurden die Amplitude und die Frequenz der *mIPSCs* analysiert. Die Amplitude der Ströme hängt dabei präsynaptisch vom Transmittergehalt der Vesikel, der möglicherweise von CIC-3 beeinflusst wird, und der Vesikelgröße sowie postsynaptisch von der Rezeptordichte und -sensitivität ab. Die Frequenz der *mIPSCs* stellt einerseits ein Maß für die Anzahl der inhibitorischen Synapsen der abgeleiteten Zelle dar und hängt andererseits von der Wahrscheinlichkeit der spontanen Vesikelentleerung an diesen Synapsen ab. Die Anwesenheit von TTX in der Badlösung zum Ausschluss von Aktionspotenzialen sowie von NBQX und d-AP5 zum Ausschluss exzitatorischer Ströme, ermöglichte es die *mIPSCs* zu isolieren. Für die Ableitung der *mIPSCs* in den verschiedenen CIC-3 und -4 Mausmodellen wurden stets drei Geschwisterpaare bestehend aus je einer Knockout- bzw. Knockin-Maus und einer Wildtyp-Maus gemessen, sodass insgesamt je drei Knockout- bzw. Knockin-Mäuse und drei Wildtypmäuse miteinander verglichen wurden. Es wurden für alle Genotypen Mäuse im Alter von 14-16 Tagen, verwendet, da diese histologisch keine Neurodegeneration zeigten (s. Kapitel 1.3.5). Pro Maus wurden mehrere Zellen gemessen. Es wurden nur Zellen ausgewertet, deren Zugangswiderstand  $\leq 30 \text{ M}\Omega$  betrug und deren Hintergrundstrom bei einem Haltepotenzial von  $-70\text{mV} \leq -150 \text{ pA}$  war.

#### 3.1 Inhibitorische postsynaptische Miniaturströme in *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen sind nicht verändert

Um die Bedeutung von CIC-3 für die GABAerge synaptische Transmission zu untersuchen und die diesbezüglich widersprüchlichen Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen zu überprüfen<sup>48,79</sup>, wurden zunächst *mIPSCs* an CA1-Pyramidenzellen des Hippocampus von *Clcn3*<sup>-/-</sup>- und von *Clcn3*<sup>+/+</sup>-Mäusen im Vergleich abgeleitet. Die Analyse von Amplitude und Frequenz der postsynaptischen Miniaturströme ergab keine Unterschiede zwischen *Clcn3*<sup>-/-</sup> und *Clcn3*<sup>+/+</sup> (Abb. 10). Die mittlere Amplitude der *mIPSCs* im *Clcn3*<sup>+/+</sup> betrug 26,9 pA ( $\pm 1,6$ , n=16) und im *Clcn3*<sup>-/-</sup> 26,6 pA ( $\pm 1,6$ , n=15) (p=0,89, t-Test) (Abb. 10.C). Die mittlere Frequenz der *mIPSCs* lag im

*Clcn3*<sup>+/+</sup> bei 3,41 Hz ( $\pm$  0,41, n=16) und im *Clcn3*<sup>-/-</sup> bei 4,03 Hz ( $\pm$  0,55, n=15) ( $p=0,48$ , Mann-Whitney-Test) (Abb. 10.E). Auch die kumulative Verteilung der Amplituden (Abb. 10.B) sowie die kumulative Verteilung der *Interevent*-Intervalle (Abb. 10.C) der *mIPSCs* unterschieden sich nicht signifikant zwischen *Clcn3*<sup>-/-</sup> und *Clcn3*<sup>+/+</sup> (KS-Test).



**Abbildung 10 Inhibitorische Miniaturströme (*mIPSCs*) in CA1-Pyramidenzellen von *Clcn3*<sup>+/+</sup>- und *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

Kein Unterschied in Stromamplitude und Frequenz von *mIPSCs*. (A) Beispielspuren der aufgenommenen *mIPSCs*. (B) Kumulatives Amplitudenhistogramm der *mIPSCs* und (C) *Dotplot* der mittleren Stromamplituden der *mIPSCs* der gemessenen Zellen mit Mittelwert und S.E.M. (D) Kumulatives Histogramm der *Interevent*-Intervalle der *mIPSCs* und (E) *Dotplot* der mittleren Frequenz der gemessenen Zellen mit Mittelwert und S.E.M. (*Clcn3*<sup>+/+</sup>: n=16 Zellen, N=3 Mäuse; *Clcn3*<sup>-/-</sup>: n=15 Zellen, N=3 Mäuse; 3 Geschwisterpaare).

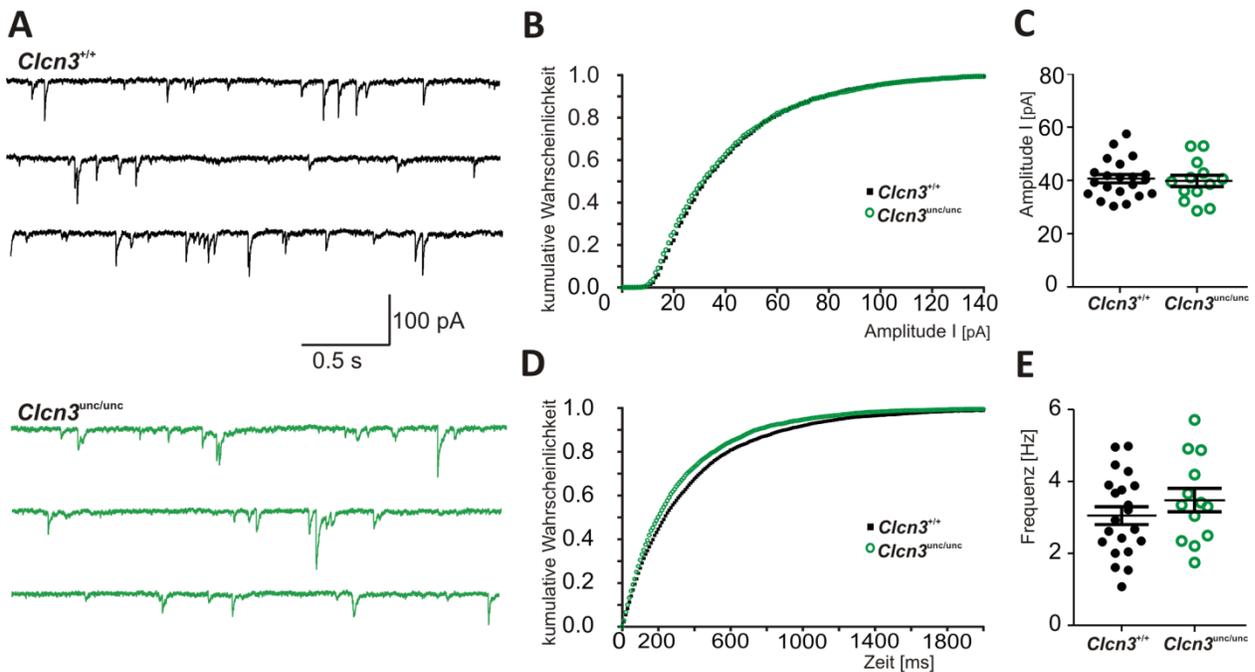
Diese Ergebnisse suggerieren, dass die Abwesenheit von CIC-3 keine Auswirkung weder auf die Quantengröße noch auf die Wahrscheinlichkeit der spontanen Vesikelentleerung und die Synapsenzahl von GABAergen Synapsen der CA1-Pyramidenzellen hat.

### 3.2 Inhibitorische postsynaptische Miniaturströme im CIC-3<sup>unc</sup>-Mausmodell

Im nächsten Schritt sollte die Bedeutung von CIC-3 in seiner Funktion als Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher für die GABAerge inhibitorische Neurotransmission untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden *mIPSCs* in CA1-Pyramidenzellen des Hippocampus an einem Mausmodell untersucht, in welchem die Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscherfunktion von CIC-3 durch eine reine, vom H<sup>+</sup>-Transport entkoppelte, Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit von CIC-3 ersetzt sein sollte. Die *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Maus wurde als ein solches Modell angenommen, da in den einfachen *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäusen CIC-4 die Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscherfunktion von CIC-3 vermutlich kompensieren kann. Zunächst wurden dafür in Vorexperimenten, die *mIPSCs* im Hippocampus in den einfachen Mausmutanten, d.h. in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*- und *Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen, untersucht.

#### 3.2.1 Inhibitorische postsynaptische Miniaturströme in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>* und *Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen

Um mögliche Auswirkungen der einfachen *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*- sowie der einfachen *Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mausmutanten auf die GABAerge synaptische Transmission auszuschließen, wurden vor der eigentlichen Untersuchung der *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäuse *mIPSCs* zunächst in den einfachen *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*- und *Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp-Mäusen untersucht. Zunächst wurden *mIPSCs* an CA1-Pyramidenzellen von *Clcn3<sup>unc/unc</sup>* und *Clcn3<sup>+/+</sup>*-Mäusen abgeleitet. Die Analyse von Frequenz und Amplitude der *mIPSCs* ergab keinen Unterschied zwischen *Clcn3<sup>+/+</sup>* und *Clcn3<sup>unc/unc</sup>* (Abb. 11). Die mittlere Stromamplitude der *mIPSCs* in *Clcn3<sup>+/+</sup>*-Mäusen betrug 40,7 pA (± 1,6, n=21) und 39,8 pA (± 2,2, n=13) für *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäusen (p=0,75, t-Test) (Abb. 11.C), die mittlere Frequenz 3,05 Hz (± 0,25, n=21) bzw. 3,48 Hz (± 0,33, n=13) (p=0,30, t-Test) (Abb. 11.E). Auch die kumulative Verteilung der Stromamplituden der *mIPSCs* ebenso wie die kumulative Verteilung der *Interevent*-Intervalle zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen *Clcn3<sup>+/+</sup>*- und *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäusen (KS-Test) (Abb. 11.B, D).



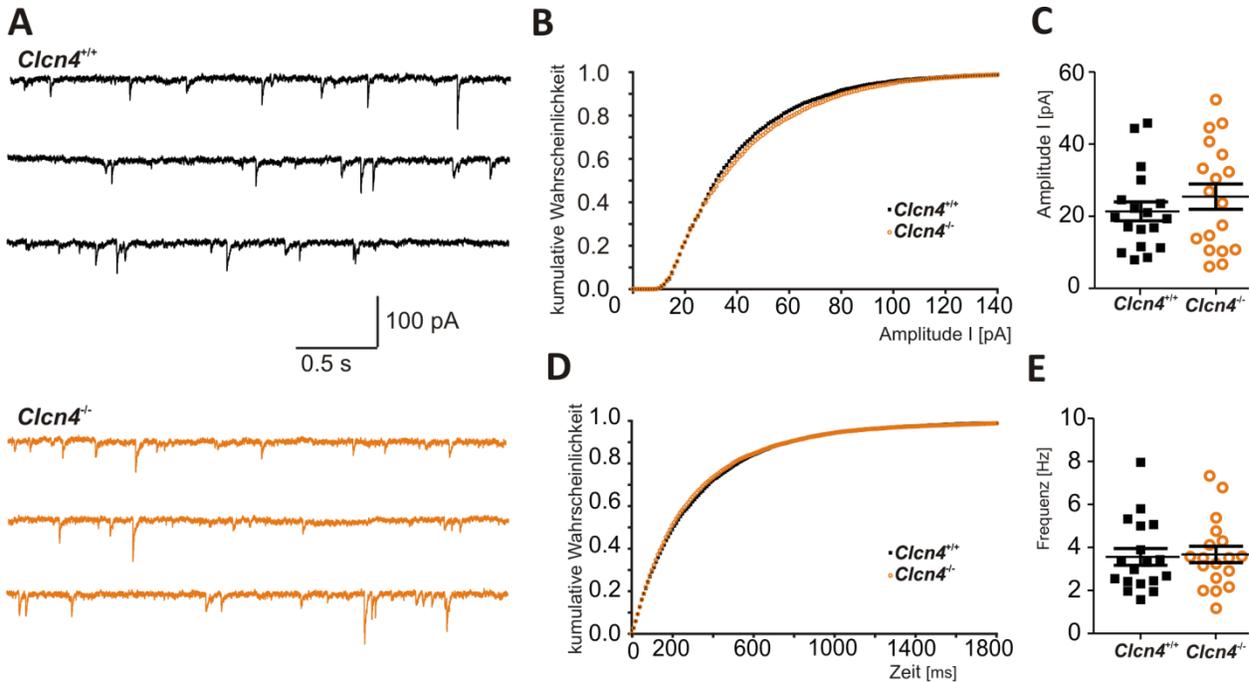
**Abbildung 11 Inhibitorische Miniaturströme (*mIPSCs*) in CA1-Pyramidenzellen von *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*- und *Clcn3<sup>+/+</sup>*-Mäusen.**

Kein Unterschied in Stromamplitude und Frequenz von *mIPSCs*. (A) Beispielspur der aufgenommenen *mIPSCs*. (B) Kumulatives Amplitudenhistogramm der *mIPSCs* und (C) *Dotplot* der mittleren Stromamplituden der gemessenen Zellen mit Mittelwert und S.E.M. (D) Kumulatives Histogramm der *Interevent-Intervalle* der *mIPSCs* und (E) *Dotplot* der mittleren Frequenz der gemessenen Zellen mit Mittelwert und S.E.M. (*Clcn3<sup>+/+</sup>*: n=21 Zellen, N=3 Mäuse; *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*: n=13 Zellen, N=3 Mäuse; 3 Geschwisterpaare).

Die in der einfachen *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mausmutante vermutete Entkopplung des Cl<sup>-</sup>-Transports vom H<sup>+</sup>-Transport von ClC-3, zeigte im Vergleich zu *Clcn3<sup>+/+</sup>*-Mäusen keinen Effekt auf die GABAerge synaptische Transmission.

Um zu untersuchen ob die Abwesenheit von ClC-4 die GABAerge synaptische Transmission beeinflusst, wurden anschließend *mIPSCs* in *Clcn4<sup>-/-</sup>*- und *Clcn4<sup>+/+</sup>*-Mäusen abgeleitet und deren Frequenz und Stromamplitude analysiert. Auch in *Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen verglichen mit *Clcn4<sup>+/+</sup>*-Mäusen konnte keine Veränderung, weder für die Frequenz, noch für die Amplitude der *mIPSCs* gezeigt werden (Abb. 12). Für *Clcn4<sup>+/+</sup>* bzw. *Clcn4<sup>-/-</sup>* ergab die mittlere Stromamplitude der *mIPSCs* einen

Wert von 40,6 pA ( $\pm 1,3$ , n=18) bzw. 42,7 pA ( $\pm 1,7$ , n=18) ( $p=0,36$ , t-Test), die mittlere Frequenz einen Wert 3,56 Hz ( $\pm 0,39$ , n=18) bzw. 3,67 ( $\pm 0,38$ , n=18) ( $p=0,60$ , Mann-Whitney-Test).



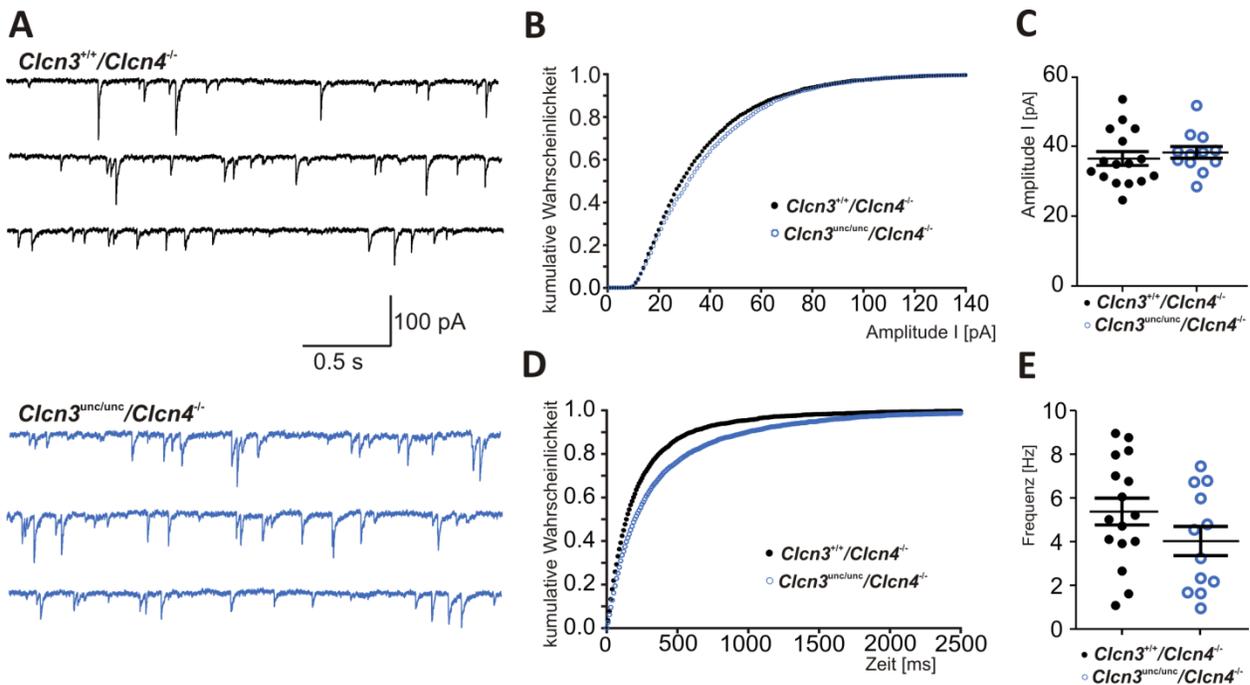
**Abbildung 12 Inhibitorische Miniaturströme (mIPSCs) in CA1-Pyramidenzellen von  $Clcn4^{-/-}$ - und  $Clcn4^{+/+}$ -Mäusen.**

Kein Unterschied in Stromamplitude und Frequenz von mIPSCs. (A) Beispielspur der aufgenommenen mIPSCs. (B) Kumulatives Amplitudenhistogramm der mIPSCs und (C) Dotplot der mittleren Stromamplituden der gemessenen Zellen mit Mittelwert und S.E.M. (D) Kumulatives Histogramm der Intervalle der mIPSCs und (E) Dotplot der mittleren Frequenz der gemessenen Zellen mit Mittelwert und S.E.M. ( $Clcn4^{+/+}$ : n=18 Zellen, N=3 Mäuse;  $Clcn4^{-/-}$ : n=18 Zellen, N=3 Mäuse; 3 Geschwisterpaare).

In diesen Messungen konnte ein Einfluss von Clcn-4 auf die Quantengröße und auf die Wahrscheinlichkeit der spontanen Vesikelentleerung bzw. die Synapsenzahl von GABAergen Synapsen der CA1-Pyramidenzellen nicht gezeigt werden.

### 3.2.2 Inhibitorische postsynaptische Miniaturströme in $Clcn3^{unc/unc}/Clcn4^{-/-}$ -Mäusen

Nachdem in den Vorexperimenten mit  $Clcn3^{unc/unc}$ - und  $Clcn4^{-/-}$ -Mäusen keine Auswirkung dieser Genotypen auf Amplitude und Frequenz der mIPSCs gezeigt werden konnte, wurden anschließend  $Clcn3^{unc/unc}/Clcn4^{-/-}$ -Mäuse untersucht und mit  $Clcn3^{+/+}/Clcn4^{-/-}$ -Mäusen verglichen.



**Abbildung 13 Inhibitorische Miniaturströme (*mIPSCs*) in CA1-Pyramidenzellen von *Clcn3*<sup>+/+</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>- und *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

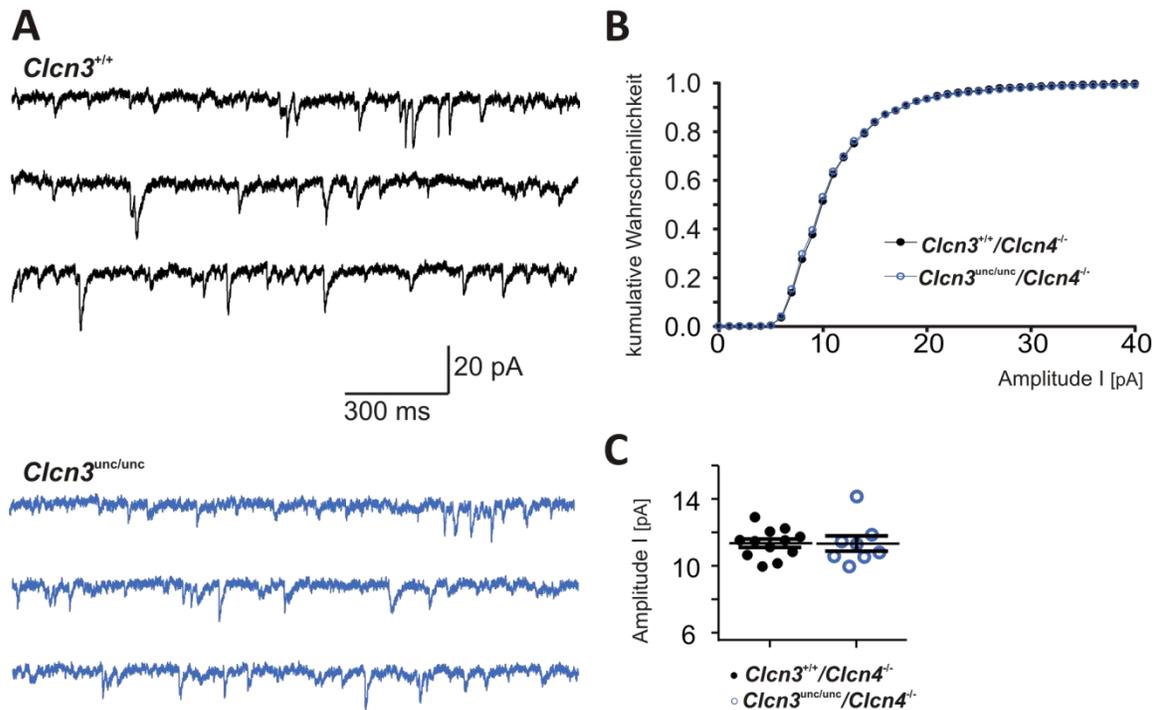
(A) Beispielspur der aufgenommenen *mIPSCs*. (B) Kumulatives Amplitudenhistogramm der *mIPSCs* und (C) Dotplot der mittleren Stromamplituden der *mIPSCs* der gemessenen Zellen mit Mittelwert und S.E.M. Kein signifikanter Unterschied in der mittleren und kumulativen Stromamplitude der *mIPSCs* in *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu *Clcn3*<sup>+/+</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Auch in der mittleren Frequenz (E) der *mIPSCs* unterscheiden sie sich nicht. (D) kumulatives Histogramm der *Interevent*-Intervalle der *mIPSCs*: Die kumulative Verteilung der *Interevent*-Intervalle der *mIPSCs* ist in *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen zu größeren *Interevent*-Intervallen hin verschoben. (*Clcn3*<sup>+/+</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>: n=16 Zellen, N=3 Mäuse; *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>: n=12 Zellen, N=3 Mäuse; 3 Geschwisterpaare).

Die Untersuchung der *mIPSCs* an CA1-Pyramidenzellen zeigte auch für die Entkopplung von CIC-3 im *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mausmodell keinen Unterschied der Stromamplitude verglichen zu *Clcn3*<sup>+/+</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Werte der mittlere Stromamplitude der *mIPSCs* betrug 36,5 pA ( $\pm 2,0$ , n=16) in *Clcn3*<sup>+/+</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen und 38,2 pA ( $\pm 1,7$ , n=15) in *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $p=0,53$ , t-Test) (Abb. 13.C). Auch die kumulative Verteilung der mittleren Stromamplituden der *mIPSCs* war nicht signifikant verschieden (KS-Test) (Abb. 11B). Während die mittleren Frequenzen der *mIPSCs* von *Clcn3*<sup>+/+</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup> und *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup> mit den Werten 5,36 Hz ( $\pm 0,61$ , n=16) und 3,91 Hz ( $\pm 0,67$ , n=15) statistisch nicht signifikant unterschiedlich waren ( $p=0,12$ , t-Test) (Abb.

13.E), war die kumulative Verteilung der *Interevent*-Intervalle der *mIPSCs* im  $Clcn3^{unc/unc}/Clcn4^{-/-}$  signifikant zu größeren *Interevent*-Intervallen, also zu einer verminderten Frequenz, hin verschoben ( $p < 0,05$ , Kolmogorov-Smirnov-Test) (Abb. 13.D). Die Analyse der *mIPSCs* zeigte, dass die Entkopplung von CIC-3 und zusätzlich die Abwesenheit von CIC-4 in  $Clcn3^{unc/unc}/Clcn4^{-/-}$ -Mäusen verglichen mit  $Clcn3^{+/+}/Clcn4^{-/-}$ -Mäusen die Quantengröße an GABAergen Synapsen von CA1-Pyramidenzellen nicht beeinflusst. Die Frequenz der *mIPSCs*, also die Wahrscheinlichkeit der spontanen Vesikelentleerung und/oder die Anzahl der GABAergen Synapsen der CA1-Pyramidenzellen war in  $Clcn3^{unc/unc}/Clcn4^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu  $Clcn3^{+/+}/Clcn4^{-/-}$ -Mäusen jedoch leicht vermindert.

### 3.3 Exzitatorische postsynaptische Miniaturströme im CIC-3 $^{unc}$ -Mausmodell

Von Stobrawa *et al.*, 2001 wurde in  $Clcn3^{-/-}$ -Mäusen bereits eine Verschiebung der Verteilung der kumulativen Stromamplituden von *mEPSCs* hin zu erhöhten Stromamplituden gezeigt<sup>48</sup>. Neben der Untersuchung der inhibitorischen synaptischen Neurotransmission anhand von *mIPSCs* sollte schließlich, anhand der Ableitung von glutamatergen exzitatorischen Miniaturströmen, *mEPSCs*, an CA1-Pyramidenzellen in  $Clcn3^{unc/unc}/Clcn4^{-/-}$ -Mäusen, die Bedeutung der Entkopplung von CIC-3 auf die exzitatorische Neurotransmission betrachtet werden. *mEPSCs* stellen das Pendant zu *mIPSCs* für die exzitatorische Neurotransmission dar. Um sie zu isolieren wurde die inhibitorische synaptische Transmission mit dem GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Blocker Bicuculline sowie die Entstehung von Aktionspotenzialen durch TTX verhindert. Die Anwesenheit von 200 mM Sucrose in der Badlösung war notwendig um die niedrige Frequenz der *mEPSCs* von etwa 1 /min zu erhöhen um genügend *mEPSCs* innerhalb der Zeit, in der der Kontakt zwischen Patchpipette und Pyramidenzelle stabil war (bis zu 30 Minuten), ableiten zu können. So konnten pro Zelle etwa 230 *mEPSCs* ausgewertet werden. Für die Ableitung der *mEPSCs* wurden zwei Geschwisterpaare bestehend aus je einer  $Clcn3^{+/+}/Clcn4^{-/-}$ -Maus und einer  $Clcn3^{unc/unc}/Clcn4^{-/-}$ -Maus gemessen, sodass insgesamt je zwei  $Clcn3^{+/+}/Clcn4^{-/-}$ - und zwei  $Clcn3^{unc/unc}/Clcn4^{-/-}$ -Mäuse miteinander verglichen wurden. Pro Maus wurden mehrere Zellen gemessen.



**Abbildung 14 Exzitatorische Miniaturströme (*mEPSCs*) in CA1-Pyramidenzellen von *Clcn3*<sup>+/+</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>- und *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

Kein Unterschied der Stromamplitude von *mEPSCs*. (A) Beispielspuren der aufgenommenen *mEPSCs*. (B) Kumulatives Amplitudenhistogramm der *mEPSCs* und (C) Dotplot der mittleren Stromamplituden der *mEPSCs* der gemessenen Zellen mit Mittelwert und S.E.M. (*Clcn3*<sup>+/+</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>: n=12 Zellen, N=2 Mäuse; *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>: n=8 Zellen, N=2 Mäuse; 2 Geschwisterpaare). (*Clcn3*<sup>+/+</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>: n=16 Zellen, N=3 Mäuse; *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>: n=12 Zellen, N=3 Mäuse; 3 Geschwisterpaare).

Die Stromamplituden der *mEPSCs* von *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>- und *Clcn3*<sup>+/+</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen unterschieden sich nicht (Abb. 14). Die mittlere Stromamplitude der *mEPSCs* hatte im *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup> einen Wert von 11,4 pA ( $\pm 0,2$ ) und einen Wert von 11,3 pA ( $\pm 0,5$ ) ( $p=0,97$ , t-Test) im *Clcn3*<sup>+/+</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup> (Abb 14.B). Auch die Verteilung der kumulativen Stromamplituden der *mEPSCs* war in *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen unverändert (Abb. 14.C, KS-Test). Diese Messungen zeigen, dass die Entkopplung von CIC-3 in der CIC-3unc-Mutante *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup> die exzitatorische Neurotransmission auf CA1-Pyramidenzellen nicht beeinflusst.

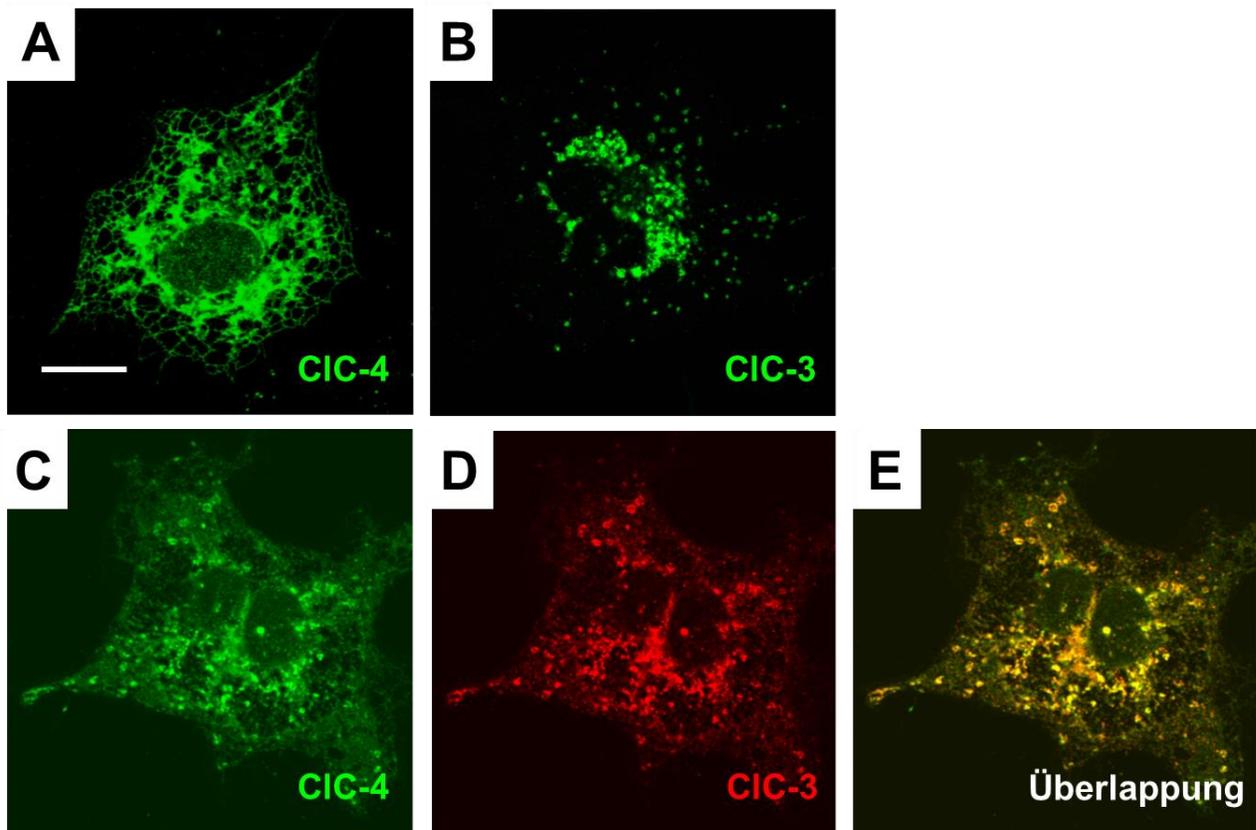
### 3.4 Heterodimerisierung von CIC-3 und CIC-4

Die Expressionsmuster von CIC-3 und -4 in den verschiedenen CIC-3- und -4-Knockin- und Knock-out-Mausmodellen, in denen die Funktion von CIC-3 und -4 für die vesikuläre Neurotransmitteraufnahme untersucht wurde, sowie die Phänotypen dieser Mausmodelle, führten zu der Vermutung, dass CIC-3 für die Expression von CIC-4 eine Rolle spielen und CIC-4 die Funktion des  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauschs von CIC-3 in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäusen übernehmen könnte.

Anders als die entsprechenden Mausmutanten von CIC-5 und CIC-7, deren *unc*-Mutanten einen ähnlich schwerwiegenden Phänotyp wie deren Knockout-Mutanten zeigten<sup>16,17</sup>, zeigten die *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäuse keine Ähnlichkeit zum Phänotyp der *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäuse. Die *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäuse wurden in unserem Labor generiert um die Funktion von CIC-3 als  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher zu untersuchen. Diese Mäuse besitzen anstelle des CIC-3-Proteins mit  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscherfunktion ein CIC-3-Protein, welches vermutlich eine reine  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit aufweist. Jedoch sind *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäuse, im Gegensatz zu *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäusen, auf den ersten Blick phänotypisch völlig unauffällig. Dies zusammen mit der Beobachtung, dass die Expression von CIC-4 im Gehirn von *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäusen, nicht jedoch in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäusen, stark vermindert war (Abb. 6), legte die Vermutung nahe, dass CIC-3 einerseits die Expression von CIC-4 stabilisieren könnte. Andererseits könnte CIC-4, möglicherweise durch Heterodimerisierung mit dem CIC-3<sup>unc</sup>-Homomer, die Funktion des  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauschs von CIC-3 in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäusen kompensieren. Außerdem ist bekannt, dass CIC-3 mit den weiteren Mitgliedern der zweiten CIC-Unterfamilie, CIC-4 und CIC-5, Heterodimere bilden kann<sup>55</sup>. Um nun tatsächlich die CIC-3<sup>unc</sup>-Mutante mit einer reinen  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit von CIC-3, ohne Kompensation durch CIC-4 zu betrachten, wurden *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäuse generiert, denen CIC-4 zusätzlich fehlt. Die einfachen *Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäuse sind, wie es auch bei den *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäusen der Fall ist, phänotypisch unauffällig. *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäuse haben jedoch einen ähnlichen und noch gravierenderen Phänotyp wie *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäuse. Die Überlebenszeit der Mäuse ist im Vergleich zu *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäusen geringer, die Neurodegeneration setzt früher ein und schreitet rascher fort.

Um der Vermutung nachzugehen, dass CIC-3 die Expression von CIC-4 möglicherweise durch Bildung von Heteromeren stabilisiert, wurden in unserer Arbeitsgruppe weitere Untersuchungen

durchgeführt. Die heterologe Überexpression von CIC-4 in COS-7-Zellen zeigte, dass CIC-4 im ER verbleibt (Abb. 15.A). Die Überexpression von CIC-3 in COS-7-Zellen zeigte hingegen ein vesikuläres Expressionsmuster (Abb. 15.B). Die Kotransfektion von CIC-4 mit CIC-3 führte aber zur Kollokalisierung von CIC-4 mit CIC-3 ebenfalls mit vesikulärem Expressionsmuster (Abb. 15.C-D). CIC-3 scheint also wichtig dafür zu sein, dass CIC-4 das ER verlassen kann um zu anderen vesikulären Kompartimenten, z.B. in Endosomen, zu gelangen.

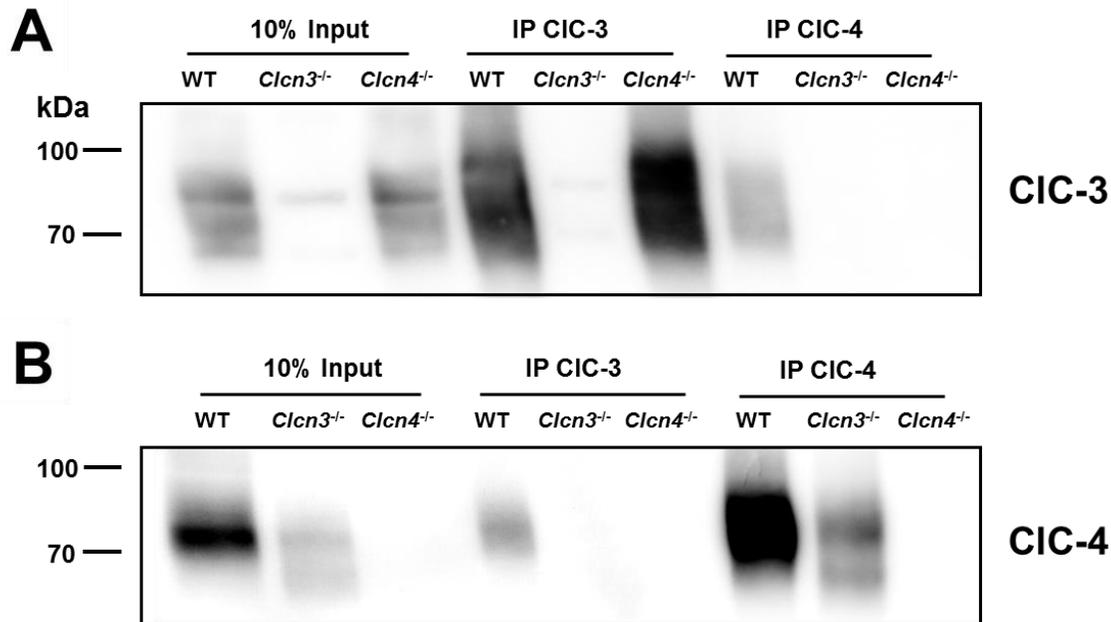


**Abbildung 15 Subzelluläre Lokalisation von CIC-3 und CIC-4.**

Heterologe Überexpression von CIC-3 und CIC-4 in Cos7-Zellen. Die alleinige Überexpression von GFP-markiertem CIC-4 zeigt ein ER-ähnliches Expressionsmuster für CIC-4 (A). Die alleinige Überexpression von GFP-markiertem CIC-3 zeigt hingegen ein vesikuläres Expressionsmuster für CIC-3 (B). Bei Kotransfektion von CIC-4 und CIC-3, ist sowohl CIC-4 als auch CIC-3 in Vesikeln lokalisiert (C, D) und CIC-3 und -4 werden überlappend exprimiert (E). Maßstabsbalken: 30µ. Stefanie Weinert, AG Jentsch.

Biochemische Untersuchungen zur Lokalisation von CIC-3 und -4 im Gehirn ergaben, dass CIC-3 und CIC-4 zusammen mit dem Vesikelmarker Synaptophysin in der LP2-Fraktion, die nach dem

Aufreinigungsprozess synaptischer Vesikel aus Gehirngewebe vor allem synaptische Vesikel enthält, vorkommt<sup>48</sup>. Dies weist darauf hin, dass CIC-3 und -4 gemeinsam auf synaptischen Vesikeln vorkommen. Zur Untersuchung der Heterodimerisierung wurden außerdem Koimmunpräzitationsexperimente durchgeführt, in denen gezeigt werden konnte, dass CIC-3 tatsächlich mit CIC-4 aus Gehirngewebe und umgekehrt kopräzitierte (Abb. 16).



**Abbildung 16 Koimmunpräzitation von CIC-3 und CIC-4.**

Western Blot von Membranpräparationen aus Gehirn von WT, *Clcn3*<sup>-/-</sup>- und *Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen (Spur 1 - 3) sowie Immunpräzipitaten solcher (Spur 4 - 9) gefolgt von Immundetektion von CIC-3 (A) und CIC-4 (B). Immunpräzipitation mit Hilfe von antikörper-gekoppelter Protein-A-Sepharose. Die Spuren 4-6 zeigen das Eluat nach Immunpräzipitation gegen CIC-3, die Spuren 7 - 9 nach Immunpräzipitation gegen CIC-4, je aus WT, *Clcn3*<sup>-/-</sup> und *Clcn4*<sup>-/-</sup> Präparationen. Die geladene Menge des Lysats betrug 10% der Immunpräzipitattmenge.

Immunpräzipitation gegen CIC-3 (Spur 4-6) führte zu Präzipitation von CIC-3 in Gehirnpräparationen aus WT und *Clcn4*<sup>-/-</sup> (A). Außerdem führte die Immunpräzipitation gegen CIC-3 zu Präzipitation von CIC-4 in WT-Präparationen (B). Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen CIC-4 (Spur 7-9) führte zu Präzipitation von CIC-3 in Gehirnpräparationen aus WT (A) und zur Präzipitation von CIC-4 aus WT und *Clcn3*<sup>-/-</sup> Präparationen (B). Die Gehirnpräparationen aus *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen stellen die Negativkontrolle für die Immun/Präzipitation gegen CIC-3 dar. Negativkontrolle für die Immun/Präzipitation gegen CIC-4 sind die Gehirnpräparationen aus *Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Stefanie Weinert, AG Jentsch.

Immunisoliertes CIC-4 aus Gehirnllysaten von Wildtyp-Mäusen kopräzipitierte mit CIC-3 (Abb. 16 A, Spur 7) und umgekehrt (Abb. 16 B, Spur 4). Als Kontrolle diente Gehirngewebe aus *Clcn3*<sup>-/-</sup>- bzw. *Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Diese Experimente zeigen außerdem, dass das Signal für CIC-4 auf Präparationen und auf CIC-4-Immunpräzipitaten aus Gehirn von *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp deutlich vermindert ist (Abb. 16 B, Spuren 1 und 2; 7 und 8). Dies lässt auf eine verminderte Expression von CIC-4 im Gehirn von *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen schließen. Im Gegensatz dazu ist das Signal für CIC-3 in *Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen und Wildtyp-Mäusen gleich stark (Abb. 16 A, Spuren 1 und 3; 4 und 6). Die Expression von CIC-3 ist in *Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen also nicht verändert.

Die Ergebnisse der Koimmunpräzipitationsexperimente, die für die Heterodimerisierung von CIC-3 mit CIC-4 sprechen, konnten durch *FRET* (*Förster resonance energy transfer*) –Messungen an transfizierten Zellen, die von Niclas Gimber durchgeführt wurden, bekräftigt werden.

## 4 Diskussion

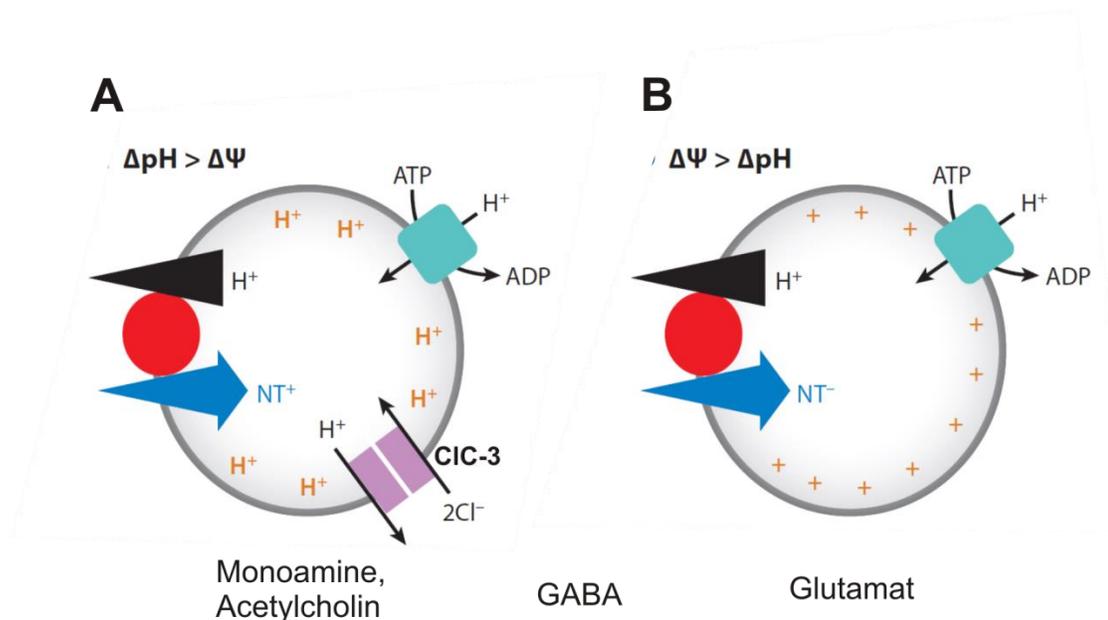
### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von CIC-3 für die inhibitorische und exzitatorische synaptische Neurotransmission untersucht. Zur Klärung der Frage welchen Einfluss der vermutliche  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher CIC-3 auf die vesikuläre Neurotransmitteraufnahme von GABA und damit auf die Quantengröße von GABAergen Synapsen hat, wurden *mIPSCs* in CA1-Pyramidenzellen an hippocampalen Akutschnitten im *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mausmodell und im *CIC-3unc*-Mausmodell, *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*, sowie in den einzelnen *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*- und *Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mausmodellen, elektrophysiologisch abgeleitet und die Stromamplitude sowie die Frequenz analysiert. In keinem der untersuchten Mausmodelle konnten Unterschiede im Hinblick auf Amplitude und Frequenz der *mIPSCs* gefunden werden. Einzig die kumulative Frequenzverteilung in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen war verglichen mit *Clcn3<sup>+/+</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen zu einer geringeren Frequenz hin verschoben. Um die biologische Relevanz der Kopplung des  $\text{Cl}^-$ -Transports an den  $\text{H}^+$ -Transport der  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscherfunktion von CIC-3 für die exzitatorische synaptische Neurotransmission zu betrachten, wurde die Amplitude der *mEPSCs* in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen untersucht, die im Vergleich zu *Clcn3<sup>+/+</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen nicht verändert war.

### 4.2 CIC-3 – wichtige $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit im Modell der vesikulären Neurotransmitteraufnahme?

Die Aufnahme von Neurotransmitter in synaptische Vesikel durch die Neurotransmittertransporter ist vom elektrochemischen  $\text{H}^+$ -Gradienten an der Vesikelmembran abhängig, der aus dem pH-Gradienten ( $\Delta\text{pH}$ ) und dem Membranpotential ( $\Delta\Psi$ ) besteht. Diese Gradienten werden durch die vakuoläre  $\text{H}^+$ -ATPase erzeugt. Die Zunahme von  $\Delta\Psi$ , vermindert jedoch die Aktivität der  $\text{H}^+$ -ATPase und limitiert dadurch die Zunahme von  $\Delta\text{pH}$ .  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeiten an synaptischen Vesikeln könnten jedoch einen Ausgleichsstrom aus negativ geladenen  $\text{Cl}^-$ -Ionen bei der Akkumulation der positiv geladenen  $\text{H}^+$  im Vesikel zu Verfügung stellen, der  $\Delta\Psi$  reduziert und die weitere Aktivität der  $\text{H}^+$ -ATPase und die Zunahme von  $\Delta\text{pH}$  auf diese Weise ermöglicht.

CIC-3, vermutlich ein  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher, wurde auf synaptischen Vesikeln gefunden und wird in diesem Zusammenhang als eine der wichtigsten  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeiten an synaptischen Vesikeln diskutiert. Er soll einen dominanten Einfluss auf die vesikuläre Neurotransmitteraufnahme haben (Abb. 4). Beim Verlust von CIC-3 in *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen sollte also  $\Delta\text{pH}$  vermindert,  $\Delta\Psi$  dagegen erhöht sein, was zu einer veränderten Neurotransmitterkonzentration in synaptischen Vesikeln führen sollte.



**Abbildung 17 Modell der vesikulären Neurotransmitteraufnahme.**

Vesikuläre Neurotransmittertransporter (rot) sind in unterschiedlichem Maße vom pH-Gradienten ( $\Delta\text{pH}$ ) und dem Membranpotential ( $\Delta\Psi$ ) des elektrochemischen  $\text{H}^+$ -Gradienten abhängig, der durch die vakuoläre  $\text{H}^+$ -ATPase (türkis) erzeugt wird. Die Aufnahme der Monoamine und von Acetylcholin ist hauptsächlich von  $\Delta\text{pH}$ , die Aufnahme von Glutamat vor allem von  $\Delta\Psi$  und die Aufnahme von GABA in ähnlichem Maße von  $\Delta\text{pH}$  und  $\Delta\Psi$  abhängig. Der  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher CIC-3 (lila) ermöglicht die weitere Zunahme von  $\Delta\text{pH}$  durch Dissipation von  $\Delta\Psi$ . Adaptiert von Referenz<sup>104</sup>.

Da die Aufnahme der verschiedenen Neurotransmitter unterschiedlich stark von  $\Delta\text{pH}$  und  $\Delta\Psi$  abhängig ist, wäre nach Verlust von CIC-3, anders als bei der spezifischen Inhibition der  $\text{H}^+$ -ATPase, die zu einer reduzierten Aufnahme aller Neurotransmitter führt<sup>105</sup>, mit unterschiedlichen Effekten an den verschiedenen Synapsentypen zu rechnen (Abb.15). Die Aufnahme des wichtigsten

exzitatorischen, negativ geladenen Neurotransmitters Glutamat, hängt vor allem von  $\Delta\Psi$  ab und sollte aufgrunddessen in  $Clcn3^{-/-}$ -Mäusen erhöht sein. Die Aufnahme von positiv geladenen Monoaminen hingegen ist hauptsächlich von  $\Delta\text{pH}$  abhängig und sollte in  $Clcn3^{-/-}$ -Mäusen vermindert sein. Entgegen dieser Vermutung war die Monoaminkonzentration in  $Clcn3^{-/-}$ -Mäusen jedoch unverändert<sup>48</sup>. Die vesikuläre Aufnahme von GABA ist etwa in gleichem Maße von  $\Delta\text{pH}$  und  $\Delta\Psi$  abhängig<sup>77,78</sup>. Es ist deshalb schwierig vorauszusagen, wie sich die vesikuläre GABA-Aufnahme im  $Clcn3^{-/-}$ -Mäusen verhält.

#### 4.2.1 Inhibitorische synaptische Transmission im $Clcn3^{-/-}$

Die Stromamplitude der abgeleiteten *mIPSCs*, die ein Maß für den präsynaptischen vesikulären GABA-Gehalt und damit für die Effizienz der präsynaptischen GABA-Aufnahme darstellt, war in  $Clcn3^{-/-}$ -Mäusen unverändert. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Ergebnisse vorangegangener elektrophysiologischer Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an  $Clcn3^{-/-}$ -Mäusen<sup>48</sup>, die ebenfalls keine Unterschiede in Stromamplitude und Frequenz der *mIPSCs* ergaben. Dies spricht dafür, dass die Cl-Leitfähigkeit von CIC-3 für die vesikuläre GABA-Aufnahme, und in diesem Zusammenhang für die GABAerge Neurotransmission keine wichtige Rolle spielt.

Diese Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu Untersuchungen einer anderen Studie<sup>79</sup>, die eine Verminderung von Amplitude und Frequenz der *mIPSCs* an CA1-Pyramidenzellen in  $Clcn3^{-/-}$ - verglichen mit  $Clcn3^{+/+}$ - Mäusen zeigten und dies darauf zurückführten, dass CIC-3 durch seinen Beitrag zur Ansäuerung von GABAergen synaptischen Vesikeln für die GABA-Aufnahme wichtig sei.

Möglicherweise spielt der genetische Hintergrund der verwendeten  $Clcn3^{-/-}$ -Mäuse sowie die unterschiedlichen Knockout-Strategien, mithilfe derer sie generiert wurden, für die widersprüchlichen Ergebnisse eine Rolle. Die  $Clcn3^{-/-}$ -Mäuse, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, wurden in unserer Arbeitsgruppe generiert. Sie entsprechen den Mäusen, die auch für die vorangegangenen Experimente in der Studie von Stobrawa *et al.* 2001 verwendet wurden<sup>48</sup>. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrem genetischen Hintergrund. Die Mäuse, die in dieser Arbeit verwendet wurden, haben durch die Rückkreuzung aus einem gemischten C57BL/6-129/Sv

Hintergrund, mittlerweile den reinen genetischen Hintergrund der 129/SvJ-Inzuchtlinie. Riazanski *et al.*, 2011 verwendeten *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäuse, die im Labor von F. S. Lamb generiert wurden und den gemischten genetischen Hintergrund C57BL/6J-129/S haben <sup>79</sup>. Die *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäuse aus dem Labor von F. S. Lamb wurden anhand der Deletion von Exon 6 und 7 von *Clcn3* generiert. Diese Exons kodieren Teile der zweiten (*TMD2*) sowie die dritte und vierte transmembranäre Domäne (*TMD3*, *TMD4*) von CIC-3 <sup>62</sup>. Unsere Arbeitsgruppe nutzte hingegen die Deletion von Exon 3 von *Clcn3* als Knockout-Strategie. Exon 3 kodiert die erste transmembranäre Domäne (*TMD1*) von CIC3 <sup>48</sup>. Die verschiedenen *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen auch ein räumlich und zeitlich verschiedenes Muster der Neurodegeneration. Die Neurodegeneration der *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäuse in unserem Labor setzt etwa am postnatalen Tag P15, in der CA1-Region des Hippocampus beginnend, ein und schreitet in den darauffolgenden Wochen rasch bis zum kompletten Verlust des Hippocampus fort. Die Neurodegeneration der *Clcn3*<sup>-/-</sup> - Mäuse aus dem Labor von F.S. Lamb setzte zu einem späteren Zeitpunkt, zwischen P23 und P73, ein und schritt über Monate fort. Sie begann im Gyrus dentatus und breitete sich über die CA3- zur CA1-Region des Hippocampus aus. Die Ableitungen der *mIPSCs* von Riazanski *et al.*, 2011 wurden im Unterschied zu dieser Arbeit an älteren Tieren, im Alter von 18 bis 25 Tagen, durchgeführt, mit der Angabe jedoch, dass zu diesem Zeitpunkt noch keine Neurodegeneration detektierbar war <sup>79</sup>. Auch wenn zu diesem Zeitpunkt histologisch noch keine Neurodegeneration erkennbar war, könnten die verringerte Frequenz und Stromamplitude der *mIPSCs* dennoch durch neurodegenerative Prozesse hervorgerufen worden sein, da sich diese bereits abspielen, bevor sie anhand der Nissl-Färbung histologisch sichtbar werden. Besonders die verringerte Frequenz kann auf Neurodegeneration hinweisen. Eine verringerte Frequenz von *mIPSCs* kann nämlich auf einer verminderten Anzahl von Synapsen beruhen, der eine verminderte Anzahl präsynaptischer Neurone aufgrund von Neurodegeneration zugrunde liegen kann. Die verminderte Amplitude der *mIPSCs* im *Clcn3*<sup>-/-</sup> kann jedoch weniger gut durch bereits einsetzende neurodegenerative Prozesse erklärt werden. Eine Möglichkeit um neurodegenerative Prozesse früher und quantitativ besser festzustellen, könnte die elektronenmikroskopische Beurteilung von Gehirnschnitten darstellen. Biochemisch könnte mithilfe von Antikörpern gegen den Synapsenmarker Synaptophysin die Synapsenzahl als Maß für die Neurodegeneration in

Präparationen definierter Gehirnregionen, z. B. Cortex, Cerebellum und Hippocampus, beurteilt werden.

Die Amplitude von postsynaptischen Miniaturströmen hängt nicht nur von der Transmitterkonzentration in den präsynaptischen Vesikeln ab, sondern ist auch von der Rezeptordichte und -sensitivität an der postsynaptischen Membran abhängig. Aufgrunddessen ist ein Rückschluss anhand von *mIPSCs* auf die Rolle von ClC-3 für die präsynaptische vesikuläre GABA-Aufnahme nur limitiert möglich. Ein verminderter GABA-Gehalt in synaptischen Vesikeln von *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen könnte z. B. durch eine erhöhte postsynaptische GABA-Rezeptordichte kompensiert werden, sodass die Amplitude der abgeleiteten *mIPSCs* in der Summe unverändert bliebe. Diese Möglichkeit ist denkbar. So zeigten Dickerson *et al.*, 2002 eine frühe Hochregulierung von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren auf Körnerzellen des Gyrus dentatus in *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen mit *Clcn3*<sup>+/+</sup>-Mäusen<sup>62</sup>. Die GABA<sub>A</sub>-Rezeptordichte im Stratum pyramidale der CA1- und CA3-Region des Hippocampus war in diesen Mäusen jedoch unverändert. Die Neurodegeneration setzte bei diesen *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Gyrus dentatus ein, in den *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, jedoch in der CA1-Region des Hippocampus. Möglicherweise könnte analog dazu die GABA-Rezeptordichte in den hier verwendeten *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen, anstelle auf Körnerzellen des Gyrus dentatus, auch auf CA1-Pyramidenzellen hochreguliert sein. Dies bleibt zu untersuchen.

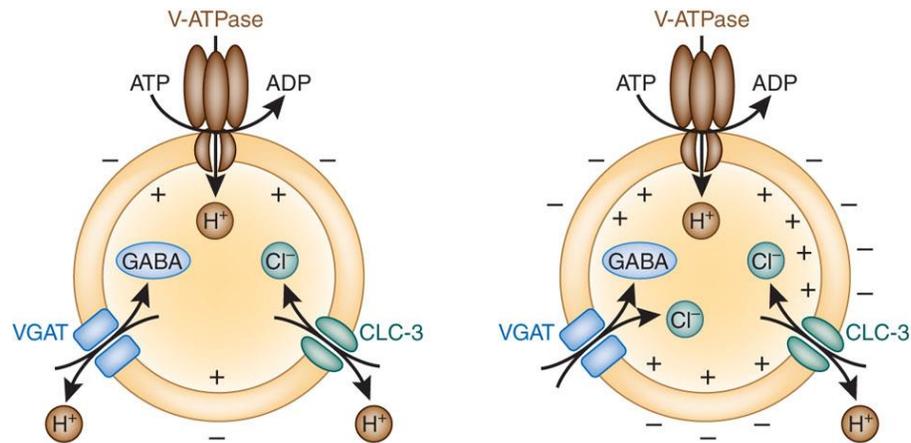
In der Annahme, dass die unveränderte Stromamplitude der *mIPSCs* in *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen tatsächlich auf eine unveränderte vesikuläre GABA-Aufnahme an der Präsynapse zurückgeht, hat ClC-3 keinen bedeutenden Einfluss auf die vesikuläre GABA-Aufnahme.

Dies könnte einerseits dadurch erklärt werden, dass im Fall einer verminderten Ansäuerung der GABAergen synaptischen Vesikel in *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen, die Abnahme von  $\Delta\text{pH}$  durch eine damit einhergehende Zunahme von  $\Delta\Psi$  ausgeglichen wird. Die vesikuläre GABA-Aufnahme, die etwa in gleichem Maß von  $\Delta\Psi$  und  $\Delta\text{pH}$  abhängt, könnte in der Summe also etwa gleich bleiben. Dies wäre eine Erklärung dafür, dass die Stromamplitude der *mIPSCs* in *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen mit *Clcn3*<sup>+/+</sup>-Mäusen, unverändert ist.

Es wurde gezeigt, dass in der LP2-Fraktion, die vor allem synaptische Vesikel enthält, die ATP-abhängige Ansäuerung in *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen vermindert war<sup>48</sup>. Allerdings enthält diese Vesikelfraktion nicht nur GABAerge Vesikel, sondern stellt eine transmitterunspezifische Fraktion an synaptischen Vesikeln des untersuchten Gehirngewebes dar. Diese Fraktion besteht vor allem aus glutamatergen Vesikeln, die im Gehirn quantitativ am häufigsten vorkommen. Aufgründessen kann hier keine spezifische Aussage zur Ansäuerung der GABAergen Vesikel in *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen getroffen werden. Darüber hinaus wurden die Ansäuerungsversuche dieser Studie in einem Alter durchgeführt, bei dem die *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäuse bereits Neurodegeneration zeigten. Die verminderte vesikuläre Ansäuerung könnte aus diesem Grund, anstatt auf der Abwesenheit von ClC-3, auch auf neurodegenerativen Prozessen beruhen. Die Studie von Riazanski *et al.*, 2011 zeigt im Gegensatz dazu keine Unterschiede der Ansäuerung der Neurotransmitter-unspezifischen LP2-Fraktionen aus *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen mit *Clcn3*<sup>+/+</sup>-Mäusen<sup>79</sup>. Sie beschreibt jedoch eine verminderte Ansäuerung in *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen, nachdem die glutamatergen, VGLUT1-positiven Vesikel aus dieser Fraktion entfernt worden waren, sodass der Anteil der GABAergen Vesikel in dieser Fraktion erhöht war. Diese Fraktion enthielt neben GABAergen Vesikeln aber immer noch synaptische Vesikel anderer Neurotransmitter. Aus der Studie geht zudem nicht hervor, ob diese Ansäuerungsexperimente vor oder nach Eintritt der Neurodegeneration durchgeführt wurden. Ob die Ansäuerung GABAerger synaptischer Vesikel in *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen tatsächlich vermindert ist, bleibt somit weiterhin ungeklärt.

Es besteht außerdem die Möglichkeit, dass  $\Delta pH$  an GABAergen Vesikeln von *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen gar nicht vermindert ist. Der Ausgleichsstrom für die H<sup>+</sup>-ATPase am Vesikel, der für die Generierung von  $\Delta pH$  zur vesikulären GABA-Aufnahme wichtig ist, könnte nämlich auch durch andere vesikuläre Membrantransporter, die eine Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit aufweisen oder durch Kationenleitfähigkeiten bereitgestellt werden. Für weitere Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeiten an synaptischen Vesikeln sprechen Ansäuerungsversuche, die zeigten, dass die Ansäuerung im *Clcn3*<sup>-/-</sup> nicht vollständig aufgehoben und immer noch Cl<sup>-</sup>-abhängig ist<sup>48</sup>. Eine Studie an Proteoliposomen, die den aufgereinigten vesikulären GABA-Transporter VGAT enthielten, zeigte, dass VGAT

möglicherweise als 2Cl<sup>-</sup>/GABA-Kotransporter fungiert, also selbst eine Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit aufweist<sup>106</sup>. Diese Funktion von VGAT ist jedoch umstritten (Abb.16)<sup>107</sup>.



**Abbildung 16 Zwei verschiedene Modelle zur Funktion von VGAT.**

(A) VGAT als H<sup>+</sup>/GABA-Austauscher: In diesem Modell hinge die GABA-Aufnahme sowohl von  $\Delta\text{pH}$  als auch von  $\Delta\Psi$  ab. (B) VGAT als Cl<sup>-</sup>/GABA-Kotransporter: In diesem Modell verfügt VGAT selbst über eine Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit. Die vesikuläre GABA-Aufnahme wäre hauptsächlich von  $\Delta\Psi$  abhängig. Adaptiert von Referenz<sup>107</sup>.

Riazanski *et al.*, 2011 nehmen für VGAT eine H<sup>+</sup>/GABA-Austauscherfunktion an<sup>79</sup>. Daneben könnten auch VGLUT2-Transporter, die auch auf GABAergen Vesikeln vorkommen<sup>108</sup>, eine Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit aufweisen.

#### 4.2.2 Rolle von ClC-3 als Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher für die inhibitorische synaptische Transmission

Die Ergebnisse der Untersuchung von Amplitude und Frequenz der *mIPSCs* in der *ClC-3unc-* Mutante entsprechen den Ergebnissen für die *mIPSCs* im *ClC-3*-Knockout-Mausmodell. Die Amplitude der *mIPSCs* war, wie im *ClC-3*-Knockout-Mausmodell, in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen im Vergleich zu *Clcn3<sup>+/+</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen unverändert. Auch die Amplituden der *mIPSCs* in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*- und *Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen waren im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp-Mäusen nicht

verschieden. Dies spricht dafür, dass CIC-3 und CIC-4 für die vesikuläre Aufnahme von GABA keine bedeutende Rolle spielen. Die leicht verringerte kumulative Frequenz der *mIPSCs* in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen könnte auf eine reduzierte Synapsenanzahl aufgrund von Neurodegeneration zurückgeführt werden, die in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen noch früher als in *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäusen einsetzt. In *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäusen war die Neurodegeneration am postnatalen Tag P19 histologisch schon deutlich erkennbar (Abb. 9), sodass neurodegenerative Prozesse an P15, dem Zeitpunkt der Experimente, in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen denkbar sind. Dafür spricht auch, dass in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen beim Navigieren der *Patch*-Pipette durch den Gehirnschnitt zum Auffinden einer geeigneten CA1-Pyramidenzelle für die Ableitung der *mIPSCs*, apoptotische Zellen im Stratum pyramidale auffielen. Diese apoptotischen Zellen unterschieden sich sichtbar von den durch die Akutschnitt-Präparation verursachten apoptotischen Zellen. Sie hatten ein abgerundetes Soma, welches Punkt-förmig gemustert war und waren dem Überdruck an der Pipette gegenüber sehr empfindlich, durch den sie leicht zerstört wurden. Die durch die Akutschnitt-Präparation verursachten apoptotischen Zellen waren hingegen angeschwollen, besaßen einen großen runden Zellkern und zeigten kein Punkt-förmiges Muster des Somas. Obwohl im Stratum pyramidale hauptsächlich die Zellkörper der exzitatorischen Pyramidenzellen liegen, kommen dort auch GABAerge Interneurone vor, die von der Neurodegeneration betroffen sein könnten. Zusätzlich könnten neurodegenerative Prozesse in der Umgebung der abgeleiteten Zelle, die GABAergen Synapsen allgemein beeinflussen und reduzieren.

#### **4.2.3 Rolle von CIC-3 als Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher für exzitatorische synaptische Transmission**

Wie die vesikuläre Aufnahme von GABA, hängt auch die Aufnahme des wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat in synaptische Vesikel von der Aktivität der vesikulären H<sup>+</sup>-ATPase und des resultierenden elektrochemischen H<sup>+</sup>-Gradienten ab. Die Glutamataufnahme wird dabei vor allem durch das Membranpotential  $\Delta\Psi$  und weniger durch  $\Delta\text{pH}$  angetrieben (Abb. 15) <sup>75,76</sup>. Verschiedene vesikuläre Ionenleitfähigkeiten, die  $\Delta\Psi$  und  $\Delta\text{pH}$  beeinflussen, wirken sich unterschiedlich auf die vesikuläre Glutamataufnahme aus. Vesikuläre Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeiten spielen für die Glutamataufnahme eine bedeutende Rolle. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die vesikuläre Glutamataufnahme eine biphasische Abhängigkeit von der extravesikulären Cl<sup>-</sup>-

Konzentration zeigt. Die Glutamataufnahme der vesikulären Glutamattransporter ist in Abwesenheit von  $\text{Cl}^-$  sowie bei hohen  $\text{Cl}^-$ -Konzentrationen (10-100mM) sehr gering, bei einer geringen  $\text{Cl}^-$ -Konzentration (2-4 mM) aber maximal<sup>109,110</sup>. Auch Kationenleifähigkeiten, wie z.B.  $\text{K}^+/\text{H}^+$ -Austauscher der NHE-Familie beeinflussen den elektrochemischen Protonengradienten und erleichtern durch Erhöhung von  $\Delta\Psi$  auf Kosten von  $\Delta\text{pH}$  die vesikuläre Glutamataufnahme<sup>111</sup>.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stromamplitude der *mEPSCs*, ein Maß für die Konzentration von Glutamat in synaptischen Vesikeln und damit für die vesikuläre Glutamataufnahme, in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen verglichen mit *Clcn3<sup>+/+</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen unverändert war. Vorangegangene Untersuchungen hatten im Unterschied dazu eine veränderte Stromamplitude der *mEPSCs* in *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäusen verglichen mit *Clcn3<sup>+/+</sup>*-Mäusen ergeben<sup>48</sup>. Die *mEPSCs* in CA1-Pyramidenzellen von *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäusen zeigten eine leichte Verschiebung der kumulativen Stromamplituden hin zu höheren Amplituden in *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäusen<sup>48</sup>. Dies wurde durch die theoretische Annahme der Erhöhung von  $\Delta\Psi$ , von dem die vesikuläre Glutamataufnahme hauptsächlich abhängt<sup>75,76</sup>, im *Clcn3<sup>-/-</sup>* erklärt. Aufgrund der Beobachtung, dass *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäuse einen sehr ähnlichen, aber verstärkten Phänotyp wie *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäuse zeigen, wäre eher eine, möglicherweise noch stärkere, Erhöhung der kumulativen Stromamplituden in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäuse verglichen mit *Clcn3<sup>+/+</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen zu erwarten gewesen.

Obwohl in dieser Arbeit keine Vorexperimente zur Stromamplitude der *mEPSCs* in den einfachen *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäusen und *Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen durchgeführt wurden, können von den Ergebnissen der untersuchten *mEPSCs* in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*- und *Clcn3<sup>+/+</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen, Rückschlüsse auf die Bedeutung der  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscherfunktion von CIC-3 gewonnen werden. Wäre die Stromamplitude der *mEPSCs* in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäusen im Vergleich zu *Clcn3<sup>+/+</sup>*-Mäusen verändert, hätte sich dies vermutlich auch in einer veränderten Stromamplitude der *mEPSCs* in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäuse verglichen mit *Clcn3<sup>+/+</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen gezeigt. Da CIC-4 sowohl in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen als auch in *Clcn3<sup>+/+</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen fehlt, können anhand des Vergleichs der Stromamplituden der *mEPSCs* in diesen Mäusen, keine Rückschlüsse über eine un/veränderte Stromamplitude der *mEPSCs* in *Clcn4<sup>-/-</sup>*- im Vergleich zu *Clcn4<sup>+/+</sup>*-Mäusen getroffen werden. Dies sollte durch weitere Experimente an *Clcn4<sup>-/-</sup>*- und *Clcn4<sup>+/+</sup>*-Mäusen überprüft werden. Eine veränderte Stromamplitude

der *mEPSCs*, die eine gestörte vesikuläre Aufnahme von Glutamat, des wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitters im Gehirn anzeigt, wäre jedoch sehr schwer mit den völlig unauffälligen Phänotypen, wie sie die *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*- und *Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäuse aufweisen, vereinbar. *VGlut1<sup>-/-</sup>*-Mäuse beispielsweise, bei denen die vesikuläre Glutamataufnahme gestört ist, da sie den vesikulären Glutamattransporter VGLUT1 nicht besitzen, zeigen einen ausgeprägten Phänotyp<sup>112</sup>. Sie bleiben im Wachstum zurück, zeigen neurologische Defizite in Form einer verminderten Reaktionsfähigkeit und sterben in der dritten postnatalen Woche, etwa zu dem Zeitpunkt nämlich, ab dem VGLUT1 zur wichtigsten Glutamattransporter-Isoform für die vesikuläre Glutamataufnahme in Neuronen wird. Es liegt also nahe, dass bei den unauffälligen Phänotypen der *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*- und *Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäuse, die vesikuläre Glutamataufnahme nicht gestört ist und der unveränderten Stromamplitude der *mEPSCs* in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen, auch eine unveränderte Stromamplitude der *mEPSCs* in den einfachen *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*- und *Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen zugrunde liegt.

Die unveränderte Stromamplitude der *mEPSCs* im *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>* spricht dafür, dass CIC-3 die vesikuläre Glutamataufnahme nicht beeinflusst. Die Glutamataufnahme ist dennoch wie oben beschrieben von der Cl<sup>-</sup>-Konzentration abhängig. Eine Studie, die Untersuchungen an synaptischen Vesikelfractionen aus *VGlut1<sup>-/-</sup>*-Mäusen und *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäusen und an Proteoliposomen mit aufgereinigtem VGLUT1 durchführte, führte die Cl<sup>-</sup>-Abhängigkeit der vesikulären Glutamataufnahme auf eine Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit des vesikulären Glutamattransporters VGLUT1 und nicht auf CIC-3 zurück<sup>113</sup>. Diese Studie ist jedoch sehr zweifelhaft. In dieser wird sogar angenommen, dass CIC-3 überhaupt nur auf jedem 2000sten synaptischen Vesikel vorkommt. Eine Studie, die die Proteinzusammensetzungen von immunisolierten VGLUT1- und VGAT-positiven die Vesikelsubpopulationen mit Hilfe von Massenspektrometriemessungen miteinander verglich, konnte CIC-3 jedoch auf beiden Vesikelsubpopulationen identifizieren<sup>114</sup>.

### **4.3 CIC-3 stabilisiert die Expression von CIC-4**

Die stabile Expression von CIC-4 ist von CIC-3 abhängig. Dafür spricht das Expressionsmuster von CIC-4 in den untersuchten CIC-3-Mausmodellen, nämlich die verminderte Expression von CIC-4 in Abwesenheit von CIC-3 in *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäusen und im Gegensatz dazu die unveränderte Expression von CIC-4 in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäusen. Auch die Ergebnisse die mittels heterologer Überexpression von

CIC-3 und CIC-4 in COS-7-Zellen gewonnen wurden, sowie die Koimmunopräzipitationsexperimente und *FRET*-Messungen, die zur Untersuchung der Heterodimerisierung von CIC-3 und CIC-4 durchgeführt wurden, sprechen dafür, dass CIC-3 für die Stabilisierung von CIC-4 wichtig ist. CIC-3 und -4 scheinen im Gehirn überlappende Funktionen zu übernehmen, wobei die Anwesenheit von CIC-3, nicht aber seine wahrscheinliche Funktion als  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher, für die stabile Expression von CIC-4 im Gehirn wichtig ist. Umgekehrt hat CIC-4 für die Expression von CIC-3 eher eine geringe Bedeutung, da *Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäuse phänotypisch unauffällig sind und die subzelluläre und quantitative Expression von CIC-3 in *Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen mit *Clcn4*<sup>+/+</sup>-Mäusen unverändert ist.

CIC-4 kann in den phänotypisch unauffälligen *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>-Mäusen vermutlich durch Heterodimerisierung mit CIC-3 für die vermutliche Funktion von CIC-3 als  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher kompensieren. Die tatsächliche CIC-3<sup>unc</sup>-Mutante, mit einer reinen  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit von CIC-3 anstelle des  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauschs ohne Kompensation durch CIC-4, kann also vermutlich erst durch den zusätzlichen Verlust von CIC-4 in *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen betrachtet werden. Diese Mäuse haben einen ähnlichen, aber noch gravierenderen Phänotyp als *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäuse. Ähnlichkeit und Ausprägung im Phänotyp von *Clcn3*<sup>-/-</sup>- und *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen sprechen dafür, dass die vermutliche  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscherfunktion von CIC-3 nicht durch eine konstitutive  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit ersetzt werden kann. Könnten *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäuse also theoretisch als ein doppeltes CIC-3- und CIC-4-Knockoutmausmodell angesehen werden? *Clcn3*<sup>-/-</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäuse, denen tatsächlich sowohl *Clcn3* als auch *Clcn4* fehlen, sind jedoch überhaupt nicht lebensfähig, sondern sterben vor der Geburt. *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäuse sind im Gegensatz dazu jedoch lebensfähig, weshalb sie nicht als doppeltes CIC-3- und CIC-4-Knockoutmausmodell angenommen werden können. Die konstitutive  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit von CIC-3<sup>unc</sup>, die in *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen noch vorhanden sein sollte, scheint also für die vermutliche  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscherfunktion von CIC-3 doch teilweise einspringen zu können und den Phänotyp der *Clcn3*<sup>-/-</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäuse zu retten.

#### 4.4 Ausblick

Die Mechanismen, die im Gehirn von *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen und *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen zu der schwerwiegenden Neurodegeneration führen, sind immer noch ungeklärt. Die Ergebnisse der

vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass die Neurodegeneration im Hippocampus nicht auf einer gestörten Neurotransmission an GABAergen und glutamatergen Synapsen beruht und dass der Verlust von CIC-3 sowie der vom  $H^+$ -Transport entkoppelte  $Cl^-$ -Transport der CIC-3 $^{unc}$ -Mutante, die Neurotransmitteraufnahme von GABA und Glutamat in synaptische Vesikel nicht beeinflusst. CIC-3 und -4 kommen im Gehirn nicht nur auf synaptischen Vesikeln, sondern auch auf Endosomen vor. Möglicherweise geht die Neurodegeneration in Abwesenheit von CIC-3 auf eine verminderte Funktion von Endosomen zurück. Eine reduzierte  $Cl^-$ -Akkumulation in Endosomen oder ihre verminderte Ansäuerung könnten zu Neurodegeneration führen. Ähnliches wurde im Gehirn von *Clcn7* $^{-/-}$ - und *Clcn7* $^{unc/unc}$ -Mäusen beobachtet<sup>17,115,116</sup>. In den beiden *Clcn7*-Mausmutanten kommt es, wie auch in *Clcn3* $^{-/-}$ -Mäusen, zu retinaler Degeneration. Bei ihnen prägt sich die Neurodegeneration ebenfalls besonders stark im Hippocampus, allerdings vor allem in der CA3-Region, aus. Es ist unklar, warum die Neurodegeneration in den Knockout- bzw. *unc*-Mausmodellen von CIC-3 und CIC-7, trotz ihrer breiten Expression in verschiedenen Gehirnregionen, gerade im Hippocampus so prominent ist. Möglicherweise ist der Hippocampus besonders sensitiv für die Fehlfunktion dieser Proteine. Konditionelle Knockout-Mäuse, denen CIC-7 spezifisch in Neuronen fehlt, überleben länger als *Clcn7* $^{-/-}$ -Mäuse. So konnte das Fortschreiten der Neurodegeneration in diesen länger verfolgt werden. Es wurde beobachtet, dass neben dem Hippocampus auch andere Gehirnregionen von Neurodegeneration betroffen waren<sup>117</sup>. *Clcn7* $^{-/-}$ - und *Clcn7* $^{unc/unc}$ -Mäuse zeigen charakteristische Merkmale lysosomaler Speicherkrankheiten im Gehirn. Auch eine der drei, von den verschiedenen Arbeitsgruppen generierten, *Clcn3* $^{-/-}$ -Mäuse zeigte eine neuronale Akkumulation der ATP-Synthase-Untereinheit c, die für die neuronale Ceroid-Lipofuszinose typisch ist<sup>63</sup>. In den *Clcn3* $^{-/-}$ -Mäusen, die im Labor von F. S. Lamb sowie in unserer Arbeitsgruppe generiert wurden konnten jedoch keine charakteristischen Merkmale lysosomaler Speicherkrankheiten detektiert werden<sup>48,62</sup>. Es bleibt zu untersuchen, ob die Neurodegeneration in Abwesenheit von CIC-3 möglicherweise auf eine verminderte Funktion von Endosomen, beispielsweise in Form einer Akkumulation von Speichermaterial in Neuronen, zurückzuführen ist.

Die Ansäuerung synaptischer Vesikel durch die vakuoläre  $H^+$ -ATPase ist  $Cl^-$ -abhängig. Transporter mit  $Cl^-$ -Leitfähigkeiten auf synaptischen Vesikeln sind wichtig für die Bereitstellung eines

Ausgleichsstroms, der die weitere Ansäuerung durch die vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase ermöglicht. Es ist nach wie vor umstritten, welche Rolle dem vermutlichen Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher CIC-3 für die Ansäuerung synaptischer Vesikel und endosomaler Kompartimente zukommt. Weitere Ansäuerungsexperimente an neurotransmitterspezifischen Subpopulationen von synaptischen Vesikeln, die z.B. positiv für VGLUT1 oder VGAT sind, und an Endosomenfraktionen aus Gehirngewebe der verschiedenen CIC-3 und CIC-4-Mausmodelle könnten weitere Aufschlüsse darüber geben.

Untersuchungen an *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäuse sowie an *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, ergaben eine neue Funktion für CIC-3, die in der Stabilisierung von CIC-4 liegt. CIC-4 kann für den Funktionsverlust von CIC-3 in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>*-Mäusen kompensieren. Daneben kann *Clcn3<sup>unc</sup>* im *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>* den Phänotyp der *Clcn3<sup>-/-</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäuse retten. Denn der doppelte *Clcn3<sup>-/-</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>* ist letal. Ob die Kompensation im *Clcn3<sup>unc/unc</sup>* tatsächlich auf der Bildung von Heterodimeren von CIC-4 mit dem CIC-3<sup>unc</sup>-Protein beruht oder ob beispielsweise CIC-4-Homomere für die Kompensation von CIC-3 verantwortlich sind, die mithilfe von CIC-3<sup>unc</sup>-Homomeren zum Vesikel gelangen, ist nicht sicher geklärt und sollte weiter untersucht werden. Sowohl die Funktionen von CIC-3 und CIC-4 im Gehirn als auch die Art und Weise wie diese miteinander zusammenhängen ist noch nicht verstanden. Es wäre auch interessant Mausmodelle zu untersuchen, in denen CIC-3 und -4 oder CIC-3<sup>unc</sup> nur teilweise vorhanden sind. Auf diese Weise könnten unterschiedliche Abstufungen der Ausprägung der bereits untersuchten Phänotypen betrachtet werden. Dies könnte relativ einfach durch Verpaarung der verschiedenen Mausmodelle erreicht werden. Es wäre beispielsweise interessant die Ausprägung und das Ausmaß der Neurodegeneration in *Clcn3<sup>-/-</sup>/Clcn4<sup>+/-</sup>*-Mäusen und *Clcn3<sup>+/-</sup>/Clcn4<sup>-/-</sup>*-Mäusen zu untersuchen. Außerdem könnten *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>+/-</sup>*-Mäusen analysiert werden, die quantitativ wahrscheinlich die Hälfte an CIC-4 verglichen mit *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>+/+</sup>*-Mäusen exprimieren. Die Expression von CIC-4 würde in *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>+/-</sup>*-Mäusen quantitativ vermutlich immer noch höher ausfallen als in *Clcn3<sup>-/-</sup>*-Mäusen. In *Clcn3<sup>unc/unc</sup>/Clcn4<sup>+/-</sup>*-Mäusen, würde die verbleibende Menge an CIC-4 mit Hilfe des *Clcn3<sup>unc</sup>*-Proteins vermutlich immer noch stabilisiert werden können und die endosomalen Kompartimente bzw. synaptischen Vesikel erreichen können. Dies würde weiteren Aufschluss

darüber geben, welche Bedeutung die quantitative Reduktion von CIC-4 an sich, im Gegensatz zu einer fehlenden Stabilisierung und falschen Lokalisation von CIC-4 wie vermutlich im Fall der *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen, hat. Umgekehrt könnte auch untersucht werden wie sich die partielle Entkopplung von CIC-3 im Gehirn in *Clcn3*<sup>+/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen ausprägt. Um die Bedeutung der Kopplung des Cl<sup>-</sup>-Transports an den H<sup>+</sup>-Transport von CIC-4 und CIC-3 besser zu verstehen, könnten, analog zu *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>-Mäusen, *Clcn4*<sup>unc/unc</sup>-Mäuse generiert werden. Vermutlich würden diese einen ähnlich unauffälligen Phänotyp wie *Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen. Die *Clcn4*<sup>unc/unc</sup>-Mäuse könnten darüber hinaus mit *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>-Mäusen verpaart werden um *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>unc/unc</sup>-Mäuse zu erhalten. *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>unc/unc</sup>-Mäuse würden ein elegantes Mausmodell darstellen um die biologische Relevanz der Kopplung des Cl<sup>-</sup>-Transports an den H<sup>+</sup>-Transport in CIC-3 und CIC-4 genauer zu untersuchen. Genauso wie in *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen könnte CIC-4 die Funktion des Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Austauschs von CIC-3 nicht mehr kompensieren. Doch anders als in *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen, würde CIC-4 nicht fehlen, sondern vermutlich genauso wie für CIC-3 angenommen, anstelle der Funktion als Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher über eine konstitutive Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit verfügen. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die Ausprägung im Phänotyp der *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>unc/unc</sup>-Mäuse dem der *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäuse ähnlich wäre oder ob die konstitutive Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit von CIC-4<sup>unc</sup> möglicherweise zu einem milderen oder anderen Phänotyp verglichen mit *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen führen würde. Die *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>unc/unc</sup>-Mäuse könnten, ähnlich wie in dieser Arbeit, elektrophysiologisch untersucht werden. Darüber hinaus könnten Ansäuerungsversuche an immunisolierten Transmittertransporter-spezifischen, synaptischen Vesikelpopulationen sowie an endosomalen Fraktionen von *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>unc/unc</sup>-Mäusen durchgeführt werden um die Bedeutung von CIC-3 und CIC-4 im Gehirn an den jeweiligen intrazellulären Kompartimenten besser zu verstehen.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik die Bedeutung von CIC-3 für die inhibitorische und exzitatorische synaptische Transmission anhand von Knockout- und Knockin-Mausmodellen von CIC-3 und -4 untersucht. Im Gehirn kommt CIC-3 eine bedeutende Rolle zu, was im Hinblick auf die ausgeprägte Neurodegeneration mit komplettem Verlust des Hippocampus in *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen deutlich wird. CIC-3, höchstwahrscheinlich ein Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher, der auf synaptischen Vesikeln und endosomalen Kompartimenten vorkommt, ist möglicherweise durch Bereitstellung eines Cl<sup>-</sup>-Ausgleichstroms für die vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase, bei der Ansäuerung und bei der Cl<sup>-</sup>-Akkumulation dieser intrazellulären Kompartimente beteiligt. An synaptischen Vesikeln kann der pH-Gradient zur Neurotransmitteraufnahme genutzt werden. Die Bedeutung von CIC-3 für die GABA-Aufnahme in synaptische Vesikel von Neuronen und sein Einfluss auf die Quantengröße von inhibitorischen Synapsen sind umstritten. Um dies zu untersuchen, wurden *mIPSCs* in CA1-Pyramidenzellen in *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen abgeleitet. Um außerdem die physiologische Relevanz der Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher-Funktion von CIC-3 für die GABAerge synaptische Transmission zu untersuchen, sollten *mIPSCs* in einer CIC-3*unc*-Mutante untersucht werden, in welcher CIC-3 vermutlich anstelle seiner Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher-Funktion eine reine Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit aufweist. Dafür wurden *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>-Mäuse verwendet. In *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>-Mäusen kann CIC-4 möglicherweise für die Abwesenheit der Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher-Funktion von CIC-3 kompensieren. Aus diesem Grund wurden *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäuse generiert, die nun tatsächlich eine CIC-3*unc* – Mausmutante darstellen, da CIC-4 fehlt und die Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscherfunktion von CIC-3 nicht mehr ausgleichen kann. *mIPSCs* wurden in *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen, sowie in den einfachen *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>- und *Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mausmodellen, abgeleitet. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Amplitude der *mIPSCs*, die ein Maß für die vesikuläre GABA-Konzentration darstellt, in keinem der untersuchten Mausmodelle verändert war. Auch die Frequenz der *mIPSCs*, ein Maß für die Anzahl der Synapsen und für die Wahrscheinlichkeit der spontanen Vesikelentleerung, war unverändert. Einzig in *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Frequenz der *mIPSCs* leicht vermindert, was wahrscheinlich auf bereits einsetzende neurodegenerative Prozesse zurückzuführen war. Auch die glutamatergen exzitatorischen Miniaturströme, die an CA1-Pyramidenzellen von *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen abgeleitet wurden, waren in ihrer Amplitude im Vergleich zu *Clcn3*<sup>+/+</sup>/*Clcn4*<sup>-/-</sup>-Mäusen

unverändert. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass CIC-3 für die Aufnahme von GABA und Glutamat in synaptische Vesikel keine bedeutende Rolle spielt. Für die stabile Expression von CIC-4 im Gehirn spielt das Vorhandensein von CIC-3 eine wichtige Rolle, die aber nicht auf dessen Funktion als  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher beruht, da die Expression von CIC-4 in *Clcn3*<sup>-/-</sup>-Mäusen, nicht aber in *Clcn3*<sup>unc/unc</sup>- Mäusen, deutlich vermindert war. Es ist immer noch unklar, welche wichtige Funktion CIC-3 im Gehirn zukommt, die für die ausgeprägte Neurodegeneration in Abwesenheit von CIC-3 ursächlich ist. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass in Abwesenheit von CIC-3 sowie bei dessen Funktionsverlust als  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher die Quantengröße von GABAergen und glutamatergen Synapsen unbeeinflusst bleibt.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Hille, B. Chapter 1, Introduction 1. In: *Ion channels of excitable membranes*. 3rd ed. Sunderland Massachusetts, U.S.A.: Sinauer, 1–22 (2001).
2. Hille, B. Chapter 5, Potassium channels and chloride channels. In: *Ion channels of excitable membranes*. 3rd ed. Sunderland Massachusetts, U.S.A.: Sinauer, 131–167 (2001).
3. Jentsch, T. J., Stein, V., Weinreich, F. & Zdebik, A. A. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol. Rev.* **82**, 503–568 (2002).
4. Riordan, J. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066–1073 (1989).
5. Jentsch, T. J., Steinmeyer, K. & Schwarz, G. Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature* **348**, 510–514 (1990).
6. Jentsch, T. J. CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **43**, 3–36 (2008).
7. Steinmeyer, K. *et al.* Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice. *Nature* **354**, 304–308 (1991).
8. Koch, M. C. *et al.* The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* **257**, 797–800 (1992).
9. Staley, K., Smith, R., Schaack, J., Wilcox, C. & Jentsch, T. J. Alteration of GABAA receptor function following gene transfer of the CLC-2 chloride channel. *Neuron* **17**, 543–551 (1996).
10. Rinke, I., Artmann, J. & Stein, V. CLC-2 voltage-gated channels constitute part of the background conductance and assist chloride extrusion. *J. Neurosci.* **30**, 4776–4786 (2010).
11. Bösl, M. R. *et al.* Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon CLC-2 Cl<sup>-</sup> channel disruption. *EMBO J.* **20**, 1289–1299 (2001).
12. Peña-Münzenmayer, G. *et al.* Basolateral localization of native CLC-2 chloride channels in absorptive intestinal epithelial cells and basolateral sorting encoded by a CBS-2 domain dileucine motif. *J. Cell. Sci.* **118**, 4243–4252 (2005).
13. Jeworutzki, E. *et al.* GlialCAM, a Protein Defective in a Leukodystrophy, Serves as a CLC-2 Cl<sup>-</sup> Channel Auxiliary Subunit. *Neuron* **73**, 951–961 (2012).
14. Simon, D. B. *et al.* Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nat. Genet.* **17**, 171–178 (1997).
15. Jentsch, T. J. Chloride and the endosomal-lysosomal pathway: emerging roles of CLC chloride transporters. *J. Physiol. (Lond.)* **578**, 633–640 (2007).
16. Novarino, G., Weinert, S., Rickheit, G. & Jentsch, T. J. Endosomal chloride-proton exchange rather than chloride conductance is crucial for renal endocytosis. *Science* **328**, 1398–1401 (2010).
17. Weinert, S. *et al.* Lysosomal pathology and osteopetrosis upon loss of H<sup>+</sup>-driven lysosomal Cl<sup>-</sup> accumulation. *Science* **328**, 1401–1403 (2010).
18. Günther, W., Piwon, N. & Jentsch, T. J. The CLC-5 chloride channel knock-out mouse - an animal model for Dent's disease. *Pflugers Arch.* **445**, 456–462 (2003).
19. Lloyd, S. E. *et al.* A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature* **379**, 445–449 (1996).

20. Poët, M. *et al.* Lysosomal storage disease upon disruption of the neuronal chloride transport protein CIC-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 13854–13859 (2006).
21. Kornak, U. *et al.* Loss of the CIC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* **104**, 205–215 (2001).
22. Middleton, R. E., Pheasant, D. J. & Miller, C. Purification, reconstitution, and subunit composition of a voltage-gated chloride channel from Torpedo electroplax. *Biochemistry* **33**, 13189–13198 (1994).
23. Steinmeyer, K., Lorenz, C., Pusch, M., Koch, M. C. & Jentsch, T. J. Multimeric structure of CIC-1 chloride channel revealed by mutations in dominant myotonia congenita (Thomsen). *EMBO J.* **13**, 737–743 (1994).
24. Ludewig, U., Pusch, M. & Jentsch, T. J. Two physically distinct pores in the dimeric CIC-0 chloride channel. *Nature* **383**, 340–343 (1996).
25. Lorenz, C., Pusch, M. & Jentsch, T. J. Heteromultimeric CLC chloride channels with novel properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 13362–13366 (1996).
26. Miller, C. Open-State Substructure of Single Chloride Channels from Torpedo Electroplax. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* **299**, 401 – 411 (1982).
27. Dutzler, R., Campbell, E. B., Cadene, M., Chait, B. T. & MacKinnon, R. X-ray structure of a CIC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* **415**, 287–294 (2002).
28. Feng, L., Campbell, E. B., Hsiung, Y. & MacKinnon, R. Structure of a Eukaryotic CLC Transporter Defines an Intermediate State in the Transport Cycle. *Science* **330**, 635 –641 (2010).
29. Chen, M.-F. & Chen, T.-Y. Side-chain Charge Effects and Conductance Determinants in the Pore of CIC-0 Chloride Channels. *J Gen Physiol* **122**, 133–145 (2003).
30. Miller, C. CIC chloride channels viewed through a transporter lens. *Nature* **440**, 484–489 (2006).
31. Pusch, M., Ludewig, U., Rehfeldt, A. & Jentsch, T. J. Gating of the voltage-dependent chloride channel CIC-0 by the permeant anion. *Nature* **373**, 527–531 (1995).
32. Lisal, J. & Maduke, M. The CIC-0 chloride channel is a ‘broken’ Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 805–810 (2008).
33. Picollo, A. & Pusch, M. Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CIC-4 and CIC-5. *Nature* **436**, 420–423 (2005).
34. Neagoe, I., Stauber, T., Fidzinski, P., Bergsdorf, E.-Y. & Jentsch, T. J. The late endosomal CIC-6 mediates proton/chloride countertransport in heterologous plasma membrane expression. *J. Biol. Chem* **285**, 21689–21697 (2010).
35. Leisle, L., Ludwig, C. F., Wagner, F. A., Jentsch, T. J. & Stauber, T. CIC-7 is a slowly voltage-gated 2Cl<sup>-</sup>/1H<sup>+</sup>-exchanger and requires Ostm1 for transport activity. *EMBO J.* **30**, 2140–2152 (2011).
36. Chen, T. Y. Extracellular zinc ion inhibits CIC-0 chloride channels by facilitating slow gating. *J. Gen. Physiol.* **112**, 715–726 (1998).
37. Fong, P., Rehfeldt, A. & Jentsch, T. J. Determinants of slow gating in CIC-0, the voltage-gated chloride channel of Torpedo marmorata. *Am. J. Physiol.* **274**, C966–973 (1998).

38. Estévez, R., Pusch, M., Ferrer-Costa, C., Orozco, M. & Jentsch, T. J. Functional and structural conservation of CBS domains from CLC chloride channels. *J. Physiol. (Lond.)* **557**, 363–378 (2004).
39. Bykova, E. A., Zhang, X.-D., Chen, T.-Y. & Zheng, J. Large movement in the C terminus of CLC-0 chloride channel during slow gating. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 1115–1119 (2006).
40. Alex, B. The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends in Biochemical Sciences* **22**, 12–13 (1997).
41. Meyer, S. & Dutzler, R. Crystal Structure of the Cytoplasmic Domain of the Chloride Channel ClC-0. *Structure* **14**, 299–307 (2006).
42. Scheel, O., Zdebik, A. A., Lourdel, S. & Jentsch, T. J. Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins. *Nature* **436**, 424–427 (2005).
43. Graves, A. R., Curran, P. K., Smith, C. L. & Mindell, J. A. The Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> antiporter ClC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes. *Nature* **453**, 788–792 (2008).
44. Accardi, A. & Miller, C. Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl<sup>-</sup> channels. *Nature* **427**, 803–807 (2004).
45. Zifarelli, G. & Pusch, M. Conversion of the 2 Cl<sup>-</sup>/1 H<sup>+</sup> antiporter ClC-5 in a NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/H<sup>+</sup> antiporter by a single point mutation. *EMBO J* **28**, 175–182 (2009).
46. Kawasaki, M. *et al.* Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells. *Neuron* **12**, 597–604 (1994).
47. Borsani, G., Rugarli, E. I., Tagliatela, M., Wong, C. & Ballabio, A. Characterization of a human and murine gene (CLCN3) sharing similarities to voltage-gated chloride channels and to a yeast integral membrane protein. *Genomics* **27**, 131–141 (1995).
48. Stobrawa, S. M. *et al.* Disruption of ClC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron* **29**, 185–196 (2001).
49. Maritzen, T., Keating, D. J., Neagoe, I., Zdebik, A. A. & Jentsch, T. J. Role of the vesicular chloride transporter ClC-3 in neuroendocrine tissue. *J. Neurosci.* **28**, 10587–10598 (2008).
50. Salazar, G. *et al.* AP-3-dependent mechanisms control the targeting of a chloride channel (ClC-3) in neuronal and non-neuronal cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 25430–25439 (2004).
51. Hara-Chikuma, M. *et al.* ClC-3 chloride channels facilitate endosomal acidification and chloride accumulation. *J. Biol. Chem.* **280**, 1241–1247 (2005).
52. Barg, S. *et al.* Priming of insulin granules for exocytosis by granular Cl<sup>-</sup> uptake and acidification. *J. Cell. Sci.* **114**, 2145–2154 (2001).
53. Deriy, L. V. *et al.* The granular chloride channel ClC-3 is permissive for insulin secretion. *Cell Metab.* **10**, 316–323 (2009).
54. Li, D.-Q. *et al.* Suppression of sulfonylurea- and glucose-induced insulin secretion in vitro and in vivo in mice lacking the chloride transport protein ClC-3. *Cell Metab.* **10**, 309–315 (2009).
55. Suzuki, T. *et al.* Intracellular localization of ClC chloride channels and their ability to form hetero-oligomers. *J. Cell. Physiol.* **206**, 792–798 (2006).
56. Zhao, Z., Li, X., Hao, J., Winston, J. H. & Weinman, S. A. The ClC-3 chloride transport protein traffics through the plasma membrane via interaction of an N-terminal dileucine cluster with clathrin. *J. Biol. Chem.* **282**, 29022–29031 (2007).
57. Kawasaki, M., Suzuki, M., Uchida, S., Sasaki, S. & Marumo, F. Stable and functional expression of the ClC-3 chloride channel in somatic cell lines. *Neuron* **14**, 1285–1291 (1995).

58. Huang, P. *et al.* Regulation of human CLC-3 channels by multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 20093–20100 (2001).
59. Isnard-Bagnis, C. *et al.* Detection of CIC-3 and CIC-5 in epididymal epithelium: immunofluorescence and RT-PCR after LCM. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **284**, C220–232 (2003).
60. Wang, X. Q. *et al.* CLC-3 channels modulate excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons. *Neuron* **52**, 321–333 (2006).
61. Mitchell, J. *et al.* An expanded biological repertoire for Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub> through its modulation of CIC-3 function. *Curr. Biol.* **18**, 1600–1605 (2008).
62. Dickerson, L. W. *et al.* Altered GABAergic function accompanies hippocampal degeneration in mice lacking CIC-3 voltage-gated chloride channels. *Brain Res.* **958**, 227–250 (2002).
63. Yoshikawa, M. *et al.* CLC-3 deficiency leads to phenotypes similar to human neuronal ceroid lipofuscinosis. *Genes Cells* **7**, 597–605 (2002).
64. Duan, D., Winter, C., Cowley, S., Hume, J. R. & Horowitz, B. Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature* **390**, 417–421 (1997).
65. Yamazaki, J. *et al.* Functional and molecular expression of volume-regulated chloride channels in canine vascular smooth muscle cells. *J. Physiol. (Lond.)* **507 ( Pt 3)**, 729–736 (1998).
66. Von Weikersthal, S. F., Barrand, M. A. & Hladky, S. B. Functional and molecular characterization of a volume-sensitive chloride current in rat brain endothelial cells. *J. Physiol. (Lond.)* **516 ( Pt 1)**, 75–84 (1999).
67. Arreola, J. *et al.* Secretion and cell volume regulation by salivary acinar cells from mice lacking expression of the Clcn3 Cl<sup>-</sup> channel gene. *The Journal of Physiology* **545**, 207–216 (2002).
68. Matsuda, J. J. *et al.* Overexpression of CLC-3 in HEK293T cells yields novel currents that are pH dependent. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **294**, C251–C262 (2008).
69. Li, X., Shimada, K., Showalter, L. A. & Weinman, S. A. Biophysical properties of CIC-3 differentiate it from swelling-activated chloride channels in Chinese hamster ovary-K1 cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 35994–35998 (2000).
70. Li, X., Wang, T., Zhao, Z. & Weinman, S. A. The CIC-3 chloride channel promotes acidification of lysosomes in CHO-K1 and Huh-7 cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **282**, C1483–1491 (2002).
71. Scheel, O., Zdebik, A. A., Lourdel, S. & Jentsch, T. J. Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins. *Nature* **436**, 424–427 (2005).
72. Matsuda, J. J., Filali, M. S., Collins, M. M., Volk, K. A. & Lamb, F. S. The CIC-3 Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> antiporter becomes uncoupled at low extracellular pH. *J. Biol. Chem.* **285**, 2569–2579 (2010).
73. Johnson, R. G., Jr. Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiol. Rev.* **68**, 232–307 (1988).
74. Parsons, S. M., Prior, C. & Marshall, I. G. Acetylcholine transport, storage, and release. *Int. Rev. Neurobiol.* **35**, 279–390 (1993).
75. Maycox, P. R., Deckwerth, T., Hell, J. W. & Jahn, R. Glutamate uptake by brain synaptic vesicles. Energy dependence of transport and functional reconstitution in proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* **263**, 15423–15428 (1988).

76. Bellocchio, E. E., Reimer, R. J., Freneau, R. T., Jr & Edwards, R. H. Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* **289**, 957–960 (2000).
77. Kish, P. E., Fischer-Bovenkerk, C. & Ueda, T. Active transport of gamma-aminobutyric acid and glycine into synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 3877–3881 (1989).
78. Hell, J. W., Maycox, P. R. & Jahn, R. Energy dependence and functional reconstitution of the gamma-aminobutyric acid carrier from synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* **265**, 2111–2117 (1990).
79. Riazanski, V. *et al.* Presynaptic CLC-3 determines quantal size of inhibitory transmission in the hippocampus. *Nat. Neurosci.* **14**, 487–494 (2011).
80. Matsuda, J. J., Filali, M. S., Moreland, J. G., Miller, F. J. & Lamb, F. S. Activation of swelling-activated chloride current by tumor necrosis factor-alpha requires CLC-3-dependent endosomal reactive oxygen production. *J. Biol. Chem.* **285**, 22864–22873 (2010).
81. Cuddapah, V. A. & Sontheimer, H. Molecular interaction and functional regulation of CLC-3 by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in human malignant glioma. *J. Biol. Chem.* **285**, 11188–11196 (2010).
82. Slegtenhorst, M. A. *et al.* A gene from the Xp22.3 region shares homology with voltage-gated chloride channels. *Human Molecular Genetics* **3**, 547–552 (1994).
83. Mohammad-Panah, R. *et al.* The chloride channel CLC-4 co-localizes with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and may mediate chloride flux across the apical membrane of intestinal epithelia. *J. Biol. Chem.* **277**, 566–574 (2002).
84. Mohammad-Panah, R. *et al.* The chloride channel CLC-4 contributes to endosomal acidification and trafficking. *J. Biol. Chem.* **278**, 29267–29277 (2003).
85. Friedrich, T., Breiderhoff, T. & Jentsch, T. J. Mutational analysis demonstrates that CLC-4 and CLC-5 directly mediate plasma membrane currents. *J. Biol. Chem.* **274**, 896–902 (1999).
86. Adler, D. A. *et al.* Evidence of evolutionary up-regulation of the single active X chromosome in mammals based on Clc4 expression levels in *Mus spretus* and *Mus musculus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 9244–9248 (1997).
87. Rickheit, G. *et al.* Role of CLC-5 in renal endocytosis is unique among CLC exchangers and does not require PY-motif-dependent ubiquitylation. *J. Biol. Chem.* **285**, 17595–17603 (2010).
88. Okkenhaug, H. *et al.* The human CLC-4 protein, a member of the CLC chloride channel/transporter family, is localized to the endoplasmic reticulum by its N-terminus. *FASEB J.* **20**, 2390–2392 (2006).
89. Ohtaki, H. *et al.* Accumulation of autofluorescent storage material in brain is accelerated by ischemia in chloride channel 3 gene-deficient mice. *Journal of Neuroscience Research* n/a–n/a (2012). doi:10.1002/jnr.23110
90. Südhof, T. C. The synaptic vesicle Cycle. *Annual Review of Neuroscience* **27**, 509–547 (2004).
91. Gundelfinger, E. D., Kessels, M. M. & Qualmann, B. Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 127–139 (2003).
92. Toledo, G. A. de, Fernández-Chacón, R. & Fernández, J. M. Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature* **363**, 554–558 (1993).
93. Katz, B. Quantal mechanism of neural transmitter release. *Science* **173**, 123–126 (1971).
94. Frerking, M., Borges, S. & Wilson, M. Variation in GABA mini amplitude is the consequence of variation in transmitter concentration. *Neuron* **15**, 885–895 (1995).

95. Ishikawa, T., Sahara, Y. & Takahashi, T. A single packet of transmitter does not saturate postsynaptic glutamate receptors. *Neuron* **34**, 613–621 (2002).
96. Kerchner, G. A. & Nicoll, R. A. Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nature Reviews Neuroscience* **9**, 813–825 (2008).
97. SCOVILLE, W. B. & MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr* **20**, 11–21 (1957).
98. Bliss, T. V. & Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol. (Lond.)* **232**, 331–356 (1973).
99. Bliss, T. V. & Collingridge, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31–39 (1993).
100. Buzsáki, G. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* **33**, 325–340 (2002).
101. Maccaferri, G. & Lacaille, J.-C. Interneuron Diversity series: Hippocampal interneuron classifications – making things as simple as possible, not simpler. *Trends in Neurosciences* **26**, 564–571 (2003).
102. Neher, E. & Sakmann, B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799–802 (1976).
103. Numberger, M. & Draguhn, A. 3. Die praktische Durchführung von Patch-Clamp-Experimenten. In: *Patch-Clamp-Technik*. Heidelberg, Germany: Spektrum Akademischer Verlag, 69-142 (1996).
104. Hnasko, T. S. & Edwards, R. H. Neurotransmitter Corelease: Mechanism and Physiological Role. *Annual Review of Physiology* **74**, 225–243 (2012).
105. Zhou, Q., Petersen, C. C. H. & Nicoll, R. A. Effects of reduced vesicular filling on synaptic transmission in rat hippocampal neurones. *The Journal of Physiology* **525**, 195–206 (2000).
106. Juge, N., Muroyama, A., Hiasa, M., Omote, H. & Moriyama, Y. Vesicular inhibitory amino acid transporter is a Cl<sup>-</sup>/gamma-aminobutyrate Co-transporter. *J. Biol. Chem.* **284**, 35073–35078 (2009).
107. Ahnert-Hilger, G. & Jahn, R. CLC-3 spices up GABAergic synaptic vesicles. *Nat. Neurosci.* **14**, 405–407 (2011).
108. Zander, J.-F. *et al.* Synaptic and Vesicular Coexistence of VGLUT and VGAT in Selected Excitatory and Inhibitory Synapses. *The Journal of Neuroscience* **30**, 7634–7645 (2010).
109. Naito, S. & Ueda, T. Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J. Neurochem.* **44**, 99–109 (1985).
110. Bai, L., Xu, H., Collins, J. F. & Ghishan, F. K. Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter. *J. Biol. Chem.* **276**, 36764–36769 (2001).
111. Goh, G. Y. *et al.* Presynaptic regulation of quantal size: K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange stimulates vesicular glutamate transport. *Nat. Neurosci.* **14**, 1285–1292 (2011).
112. Wojcik, S. M. *et al.* An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *PNAS* **101**, 7158–7163 (2004).
113. Schenck, S., Wojcik, S. M., Brose, N. & Takamori, S. A chloride conductance in VGLUT1 underlies maximal glutamate loading into synaptic vesicles. *Nat. Neurosci.* **12**, 156–162 (2009).

114. Grønberg, M. *et al.* Quantitative Comparison of Glutamatergic and GABAergic Synaptic Vesicles Unveils Selectivity for Few Proteins Including MAL2, a Novel Synaptic Vesicle Protein. *The Journal of Neuroscience* **30**, 2–12 (2010).
115. Kasper, D. *et al.* Loss of the chloride channel CIC-7 leads to lysosomal storage disease and neurodegeneration. *EMBO J.* **24**, 1079–1091 (2005).
116. Lange, P. F., Wartosch, L., Jentsch, T. J. & Fuhrmann, J. C. CIC-7 requires Ostm1 as a beta-subunit to support bone resorption and lysosomal function. *Nature* **440**, 220–223 (2006).
117. Wartosch, L., Fuhrmann, J. C., Schweizer, M., Stauber, T. & Jentsch, T. J. Lysosomal degradation of endocytosed proteins depends on the chloride transport protein CIC-7. *FASEB J.* **23**, 4056–4068 (2009).

## **Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Dorothea Anni Deuschel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Bedeutung von CIC-3 für die Neurotransmission“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

29.07.2013

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Thomas Jentsch für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Doktorarbeit in seinem Labor und für die Überlassung des Themas bedanken. Er bot mir die Möglichkeit in einer exzellenten wissenschaftlichen Atmosphäre zu arbeiten, und eine große Vielfalt wissenschaftlicher Methoden kennenzulernen.

Mein besonderer Dank gilt Pawel Fidzinski und Stefanie Weinert, für ihre jederzeit höchst kompetente Betreuung, ihr offenes Ohr für Fragen aller Art und für ihre stetige Bereitschaft zur Diskussion. Bei Pawel Fidzinski möchte ich mich ganz besonders für die methodische Einarbeitung in die Elektrophysiologie bedanken, der mich jederzeit mit großer Expertise bei elektrophysiologischen und inhaltlichen Fragestellungen unterstützte.

Kathrin Gödde und Patricia Seja danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft bei jeglichen Problemen, die sich mir am *Patch-Clamp-Setup* stellten und ganz besonders für die wunderbar humorvolle Atmosphäre in der Elektrophysiologie, wo ich mich sehr wohl fühlte!

Ich möchte mich bei Anyess von Bock für ihre tatkräftige Unterstützung, für die Einarbeitung in die molekularbiologischen Methoden sowie in die Arbeit mit Zellkulturen bedanken. Auch bei Kathrin Räbel bedanke ich mich für ihre tatkräftige Unterstützung.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Jentsch möchte ich mich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und große Hilfsbereitschaft bedanken. Ich habe die Zeit mit Euch im Labor sehr genossen und einige neue Freunde gefunden!

Meinen Freunden danke ich für die schönen Feierabende und Wochenenden nach langen Labortagen und -wochen und für ihre Unterstützung, selbst aus weiter Ferne.

Ich möchte mich herzlichst bei meinen Eltern und meinen Brüdern bedanken die mich während dieser Arbeit und meiner gesamten Studienzeit unterstützten. Danke!