

Zusammenfassung

Calcium (Ca^{2+}) ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff, der eine Vielzahl zellulärer Reaktionen reguliert bzw. moduliert. In vielen physiologischen Prozessen spielen vor allem lokale Änderungen der Calciumkonzentration eine Schlüsselrolle. Die experimentelle Aufklärung der zeitlichen und räumlichen Dynamik solcher Signale ist eine Voraussetzung, intrazelluläre Signalverarbeitungsprozesse und den Einfluss von Ca^{2+} auf diese Prozesse besser zu verstehen. Daher gewinnt die optische Darstellung von Ca^{2+} Signalen immer mehr an Bedeutung. Als optische Ca^{2+} Indikatoren standen bis vor kurzem nur synthetische, Ca^{2+} -sensitive Farbstoffe wie z.B. Fluo-4 oder Fura-2 zur Verfügung. Alternativ werden seit einigen Jahren genetisch kodierte Ca^{2+} Indikatoren z.B. GCaMP3.0 eingesetzt. Die Expression von GCaMP3.0 in eukaryotischen Zellen führt zu einer homogenen Verteilung des Proteins im Zytoplasma. Um lokale Ca^{2+} Signale in verschiedenen subzellulären Kompartimenten messen zu können, wurde GCaMP3.0 in dieser Arbeit gezielt gentechnisch modifiziert. Durch das Anfügen kurzer Lokalisierungssequenzen gelang es das Sensorprotein an die Plasmamembran, in die Matrix und die Außenmembran von Mitochondrien sowie in den Golgi-Apparat zu lenken. Zusätzlich wurde eine GCaMP3.0 Variante untersucht, die vorwiegend nukleär lokalisiert ist.

Die biophysikalische Charakterisierung der Sensorvarianten zeigte, dass die Fluoreszenzeigenschaften *in vitro* durch das Anfügen zusätzlicher Peptidsequenzen nicht beeinträchtigt werden. Darüber hinaus wurden HEK293-Zellen als Modellsystem für die genaue Analyse der subzellulären Lokalisierung und Funktionalität von GCaMP3.0 verwendet. Die modifizierten Varianten sollten weiterhin genutzt werden, um die räumliche und zeitliche Dynamik von Ca^{2+} Signalen in Neuronen zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die modifizierten GCaMP3.0 Konstrukte daher in einen Vektor kloniert, mit dem rekombinante Adeno-assoziierte Viren (rAAV) verschiedener Serotypen hergestellt werden konnten. Diese rAAV eignen sich als Genfähren, um GCaMP3.0 in kultivierten kortikalen Neuronen funktionell zu exprimieren. Die spezifische Lokalisierung der GCaMP3.0 Varianten sowohl in HEK293-Zellen als auch in kortikalen Neuronen ermöglichte die zeitaufgelöste Messung lokaler Ca^{2+} Signale.