

Aus dem Institut für Klinische Neurobiologie

der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. Michael Sendtner

**GlyT2-Mutationen als zweithäufigste Ursache bei Hyperekplexie
- Pathologischer Mechanismus der Mutation P429L -**

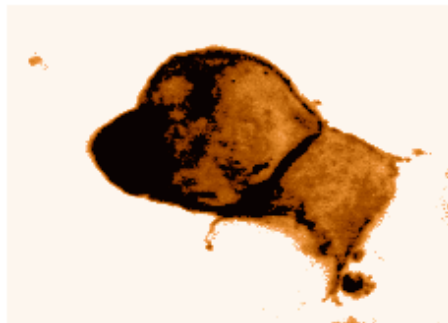
Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von

Alexandra Kitzenmaier

aus Schwäbisch Gmünd

Würzburg, Januar 2019

Referentin: Prof. Dr. Carmen Villmann
Korreferent: Prof. Dr. Erhard Wischmeyer
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 18. November 2019

Die Promovendin ist Zahnärztin

*Es ist der Reiz des Lebens,
dass man nicht alles für
selbstverständlich hält,
sondern noch bereit ist,
sich zu wundern.*

Loriot

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hyperekplexie	1
1.2	GlyT2-Mutationen und humane Hyperekplexie.....	1
1.3	Glycin als inhibitorischer Neurotransmitter	3
1.4	<i>SLC6 (Solute Carrier 6)</i>	4
1.4.1	GlyT2	6
1.4.2	Proteinstruktur	6
1.4.3	Lokalisation und Funktion	8
1.5	Identifizierung einer neuen Patientenmutation – <i>missense</i> Mutation P429L	9
2	Material und Methoden	11
2.1	Organismen	11
2.1.1	Patientenblutproben.....	11
2.1.2	Zelllinien	11
2.1.3	Bakterien	12
2.2	Chemikalien.....	12
2.2.1	Vektoren	13
2.2.2	Primer	13
2.2.3	Enzyme.....	14
2.2.4	Kits	15
2.2.5	Antikörper	16
2.2.6	Größenstandards.....	17
2.2.7	Zellkulturlösungen und Medien	17
2.2.8	Zelltransfektionsreagenzien.....	18
2.2.9	Bakterienkulturmedien	18
2.3	Standardlösungen	19
2.3.1	DNA-Lösungen	19
2.3.2	Lösungen und Reagenzien der Proteinbiochemie	19
2.3.3	Lösungen und Reagenzien für Immuncytochemie.....	20
2.3.4	Lösungen und Reagenzien für [³ H]-Glycin <i>Uptake Assay</i>	21
2.4	Verbrauchsmaterialien.....	21
2.5	Geräte	22
2.6	Methoden der Zellkultur.....	24
2.6.1	Passagieren der Zelllinien	24
2.6.2	Beschichtung der 96- <i>well</i> Platten mit Gelatine	25

2.6.3	Aceton-Behandlung der Deckgläschen	25
2.6.4	Transfektion von HEK293 Zellen mit Lipofectamine2000	25
2.6.5	Transfektion von HEK293 Zellen mittels Calciumphosphatpräzipitation	26
2.6.6	Transfektion von COS7 Zellen mit DEAE-Dextran	26
2.7	Methoden der Molekularbiologie	27
2.7.1	Isolation genomischer DNA (gDNA) aus Patientenvollblutproben	27
2.7.2	DNA Konzentrationsbestimmung	28
2.7.3	Primerdesign	29
2.7.4	Analyse der <i>Annealing</i> -Temperatur	29
2.7.5	Polymerase Kettenreaktion	30
2.7.6	Herstellung eines GlyT2-Klons mit Mutation P429L (PCR-Mutagenese)	31
2.7.7	Allelsequenzierung	35
2.7.8	Nachweis der PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese	37
2.7.9	Blindes Ausschneiden von Fragmenten zur Verbesserung der Ligationseffizienz	37
2.7.10	Aufreinigung von DNA-Fragmenten und DNA-Gelextraktion	38
2.7.11	Restriktionsverdau	39
2.7.12	Ligation	39
2.7.13	Transformation	41
2.7.14	Herstellung von Ampicillin-Agarplatten	41
2.7.15	Kolonie PCR	42
2.7.16	Präparation von Plasmid-DNA (Minipräparation)	43
2.7.17	DNA-Sequenzierung	44
2.8	Methoden der Proteinbiochemie	45
2.8.1	Herstellung von Zelllysaten der HEK293 Zellen	45
2.8.2	Quantifizierung von Proteinen nach Bradford	45
2.8.3	Expressionsanalyse mittels SDS-Page und Western Blot	46
2.8.4	Biotinylierung der Oberflächenproteine	50
2.8.5	Funktionsanalyse mittels [³ H]-Glycin <i>Uptake Assay</i>	53
2.9	Methoden der Immunocytochemie	54
2.9.1	Permeabilisationsmethode mit Triton X-100	55
2.9.2	Konfokale Mikroskopie	56
2.10	Strukturanalyse basierend auf einem GlyT2-Homologiemodell	56
3	Ergebnisse	57
3.1	Stammbaumanalyse der Familie	57
3.2	Allelanalyse der Familienmitglieder	59

3.3	Klonierung: Herstellung des GlyT2 ^{P429L} -Klons	63
3.4	Expressions- und Lokalisationsanalyse der GlyT2-Variante	66
3.5	Signifikante erniedrigte Expression von GlyT2 ^{P429L}	69
3.6	Charakterisierung der Transportfunktion des GlyT2 ^{P429L}	72
3.7	Strukturanalyse auf Basis des Homologiemodells	76
4	Diskussion	78
4.1	Genetische Risikoabschätzung	79
4.2	Folgen der Prolin-Substitution auf die Proteinexpression.....	81
4.3	Die Mutation P429L führt zum Verlust der Transportfunktion	85
4.4	α -helikale Struktur geht durch die Mutation P429L verloren.....	90
5	Zusammenfassung	92
6	Verzeichnis	94
6.1	Literaturverzeichnis.....	94
6.2	Abbildungsverzeichnis	100
6.3	Tabellenverzeichnis.....	101
6.4	Abkürzungsverzeichnis	103

1 Einleitung

1.1 Hyperekplexie

Die neurologische Erkrankung Hyperekplexie (*startle disease, stiff baby syndrome*, OMIM 149400) ist eine motorische Bewegungsstörung, die auf einer defizienten glycinergen Neurotransmission beruht, welche für die schnelle synaptische Inhibition verantwortlich ist. Folge der gestörten inhibitorischen Erregungsleitung sind übermäßige Schreckreaktionen auf ungeahnte taktile oder akustische Reize (Andermann et al., 1980; Saenz-Lope et al., 1984), Hypertonie sowie lebensbedrohliche neonatale Apnoeepisoden (Kirstein and Silfverskiold, 1958; Nigro and Lim, 1992).

Die Beschwerden werden gewöhnlich durch die Einnahme von Clonazepam, was die inhibitorische GABA_A-Rezeptorfunktion verstärkt, symptomatisch behandelt (Andermann et al., 1980; Ryan et al., 1992; Bakker et al., 2009).

Häufigste Ursache der Hyperekplexie sind Mutationen im *GLRA1*-Gen, welches für die α 1-Untereinheit des inhibitorischen Glycinrezeptors (GlyRs) codiert (Shiang et al., 1993; Brune et al., 1996). Mutationen anderer postsynaptischer Proteine, wie der Glycinrezeptor β -Untereinheit (*GLRB*-Gen) (Rees et al., 2002; Al-Owain et al., 2012) oder der Clustering-Proteine Gephyrin (*GPHN*-Gen) (Rees et al., 2003) und Collybistin (*ARHGEF9*-Gen) (Harvey et al., 2004) werden ebenfalls mit Hyperekplexie in Verbindung gebracht. Jedoch weisen einige der an Hyperekplexie erkrankten Patienten keine Defekte in den genannten Genen auf, welche für diese postsynaptischen Proteine codieren (Vergouwe et al., 1997).

Stattdessen finden sich hier Mutationen im präsynaptischen Glycintransporter 2 (GlyT2, Gen *SLC6A5*), welcher als zweithäufigste Ursache von Hyperekplexie (OMIM 604159) diskutiert wird (Carta et al., 2012).

1.2 GlyT2-Mutationen und humane Hyperekplexie

In Untersuchungen von 83 an Hyperekplexie erkrankten Patienten ohne Mutationen in den Genen *GLRA1*, *GLRB*, *GPHN* und *ARHGEF9* konnte nachgewiesen werden, dass diese GlyT2-Mutationen überwiegend als zusammengesetzte Heterozygotie vorkommen. Zusammengesetzte Heterozygotie entsteht, wenn beide Eltern Träger jeweils einer Mutation sind und die betroffenen Allele beider Eltern an die Kinder zusammen weitergegeben werden. Da die Hyperekplexie-Symptomatik häufiger bei Homozygotie als bei Heterozygotie auftritt,

bedeutet, dass *SLC6A5* überwiegend mit rezessiver Hyperekplexie assoziiert ist (Rees et al., 2006).

Die Sequenzierung aller 16 codierenden Exone des *SLC6A5*-Gens zeigte dabei eine Vielfalt von *missense*, *frameshift* und *nonsense* Mutationen (Abbildung 1), die den präsynaptischen Glycintransport beeinflussen. Da alle Patienten mit Mutationen in *SLC6A5* klassische Hyperekplexie-Symptome aufweisen, muss *SLC6A5* als ein weiteres Kandidatengen für diese Erkrankung angesehen werden (Rees et al., 2006).

Eine weitere Studie mit GlyT2-*knockout*-Mäusen identifizierte das GlyT2-Gen unabhängig als ein mögliches Kandidatengen bei Hyperekplexie-Patienten (Gomez et al., 2003b). Homozygote GlyT2-*knockout*-Mäuse erscheinen bei der Geburt als gesund, sterben jedoch am Ende der zweiten postnatalen Woche, nachdem sie im Durchschnitt ab dem zehnten postnatalen Tag schwere neuromotorische Störungen aufweisen, die den klinischen Symptomen menschlicher Hyperekplexie ähneln (Gomez et al., 2003b).

Patient	globaler Ursprung	parentaler Ursprung	Substitution	Exon	Mutation	subzelluläre Lokalisation	Glycintransport	Mechanismus
1	Kanada	paternal maternal	C1131A G1294T + Ins[T]1295	7 8	Y377X V432F+fs97	Zytoplasma Zytoplasma	aufgehoben aufgehoben	in <i>frame</i> Stopp-Codon, Proteinstrangverkürzung <i>missense</i> + <i>frameshift</i> , Proteinstrangverkürzung
2	USA	unbekannt	A1472G C1888T	9 13	Y491C Q630X	Zelloberfläche Zytoplasma	aufgehoben aufgehoben	<i>missense</i> , funktionell inert in <i>frame</i> Stopp-Codon, Proteinstrangverkürzung
3	Australien	unbekannt	delC(319- 324) T1444C	2 9	P108L+fs25 W482R	Zytoplasma Zelloberfläche	aufgehoben aufgehoben	<i>missense</i> + <i>frameshift</i> , Proteinstrangverkürzung <i>missense</i> , Glycinbindestelle (W482R)
4	Niederlande	paternal maternal	C916G A1526G	5 10	L306V N509S	Zelloberfläche Zelloberfläche	aufgehoben in L306V+N509S	<i>missense</i> , Natriumbindestelle (N509S), zusammengesetzt rezessiv
5	Niederlande	paternal maternal	C1274T C1274T	8 8	T425M T425M	Zelloberfläche	aufgehoben	<i>missense</i> , funktionell inert
6	UK	maternal	T1530G	10	S510R	Zytoplasma	aufgehoben	<i>missense</i> Mutation, S510R bildet große intrazelluläre Aggregate, dominant-negativ

Abbildung 1 Mutationen im hGlyT2-Gen (*SLC6A5*) bei Patienten mit Hyperekplexie

Missense, *nonsense* und *frameshift* Mutationen wurden in 6 Patienten unterschiedlichen globalen Ursprungs untersucht. Substitutionen in unterschiedlichen Exonen führten zu unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen. Folgen der Mutationen waren hauptsächlich Proteinstrangabbrüche sowie

Störungen der Glycin- und Natriumbindestellen, die mit einer aufgehobenen Glycintransportfähigkeit einhergehen. Modifiziert nach (Rees et al., 2006).

1.3 Glycin als inhibitorischer Neurotransmitter

Glycin ist neben GABA der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS). Glycin wird dabei hauptsächlich von inhibitorischen Neuronen im Rückenmark und Hirnstamm verwendet (Legendre, 2001).

Die Übertragung von Nervenimpulsen zwischen Neuronen des ZNS erfolgt in der Regel durch chemische Synapsen. Erreicht ein Aktionspotenzial eine präsynaptische Axonendigung, wird ein Neurotransmitter aus seinem Speicher, den synaptischen Vesikeln, in den synaptischen Spalt freigesetzt. Der Transmitter bindet an postsynaptische Rezeptoren und löst ein elektrisches Signal in Form einer Membranpotenzialänderung aus. In Abhängigkeit vom Rezeptor, auf den die Neurotransmitter treffen, erzeugen sie ein erregendes oder hemmendes Signal. Das heißt, im Gegensatz zu elektrischen Synapsen können durch chemische Synapsen Signale und Informationen moduliert werden.

An glycinergen, inhibitorischen Synapsen bindet der Neurotransmitter Glycin an GlyRs, ligandengesteuerte Ionenkanäle in der postsynaptischen Membran, und führt zu Konformationsänderungen im Rezeptor, die final zur Kanalöffnung führen. Aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen zwischen extrazellulärem und intrazellulärem Raum strömt Chlorid in die postsynaptische Zelle ein und hyperpolarisiert sie. Folglich entfernt sich das Membranpotenzial vom Schwellenwert, was eine erneute Depolarisation und damit die Ausbreitung eines Aktionspotenzials erschwert (Lynch, 2004). Somit wird durch die Hyperpolarisation am folgenden Dendriten die Reizweiterleitung behindert. Man spricht dann auch von einem inhibitorischen postsynaptischen Potential (IPSP). Im Gegensatz dazu steht das exzitatorische postsynaptische Potential (EPSP), das durch depolarisierende Ströme an erregenden Synapsen das Aktionspotential auslöst und damit die Signalweiterleitung gewährleistet ist. Für kontrollierte Bewegungen ist das Zusammenspiel von Signalweiterleitung (EPSP) und Signalhemmung (IPSP) vom Rückenmark zu den Muskelgruppen essentiell. Bei fehlender inhibitorischer Signalvermittlung wird das Gleichgewicht zwischen Erregung und Hemmung auf die Seite der Erregung verschoben. Folglich ist der dämpfende Reiz auf die Motoneuronen gestört, Muskelfasern werden übererregt und beginnen zu krampfen. Da die glycinergen Synapsen nicht nur im Rückenmark, sondern auch im Hirnstamm und Kleinhirn vorkommen (Zafra et al., 1995), wo unter anderem das Atemzentrum lokalisiert ist, äußert sich die Hyperekplexie zudem in einer pathologischen Störung des Atemrhythmus, die durch

Apnoe-Episoden bis hin zum plötzlichen Kindstod (SIDS, *sudden infant death syndrome*) führen kann (Vigevano et al., 1989; Nigro and Lim, 1992).

Tatsächlich wird die Effizienz der Glycin-induzierten synaptischen Inhibition nicht nur durch die Anzahl und Verfassung der postsynaptischen GlyRs bestimmt, sondern ist auch von der Aktivität der präsynaptischen GlyTs abhängig, denn GlyTs vermitteln die Glycinaufnahme in Gliazellen (GlyT1) und in inhibitorische terminale Nervenendigungen von Interneuronen aus dem synaptischen Spalt (GlyT2) (Aragon and Lopez-Corcuera, 2005; Eulenburg et al., 2005). Dass GlyTs im ZNS eine essentielle Rolle spielen, wurde bereits in GlyT-*knockout*-Mäusen gezeigt. GlyT1- und GlyT2-*knockout*-Mäuse sind bei der Geburt zunächst gesund, sterben aber am ersten postnatalen Tag bzw. in der zweiten postnatalen Woche. Daraus folgt, GlyT1 und GlyT2 sind während der Embryonalentwicklung nicht essentiell, jedoch sind sie für die postnatale Entwicklung und ZNS-Funktion notwendig (Gomez et al., 2003a; Gomez et al., 2003b; Eulenburg et al., 2010)

1.4 *SLC6 (Solute Carrier 6)*

GlyTs sind Mitglieder der *SLC6*-Familie (Smith et al., 1992). Die *SLC*-Transporter umfassen insgesamt ca. 350 Transporter, die wiederum in 55 Familien (*SLC1-SLC55*) unterteilt werden (He et al., 2009). Die *SLC6*-Transporterfamilie ist eine der größten im menschlichen Genom, wofür 19 codierende Gene existieren. Basierend auf der Sequenzähnlichkeit und dem Substrat, das sie transportieren, werden sie in vier Untergruppen unterteilt (Abbildung 2). Die monoaminen Transporter (Dopamin (DAT), Serotonin (SERT) und Noradrenalin (NET)), die GABA-Transporter (GAT1, GAT2, GAT3 und BGT1) und die Aminosäuregruppe I mit GlyT1 und GlyT2 sowie die Aminosäuregruppe II (Broer and Gether, 2012). *SLC6*-Transporter bestehen aus membranüberspannenden Proteinen und sind sekundär-aktive Co-Transporter (Symport oder Antiport). Das heißt, das Substrat wird entlang eines Konzentrationsgradienten, der zuvor unter Energieverbrauch (Na^+/K^+ -ATPase) aufgebaut wurde, transloziert. Mitglieder der *SLC6*-Familie zählen zu den Na^+/Cl^- -abhängigen Transportern, ebenso bekannt als Neurotransmitter-Sodium-Symporter (NSS) (Nelson, 1998; Beuming et al., 2006). Sie nutzen den elektrochemischen Natrium- und Chloridgradienten, um ihr Substrat über die Phospholipiddoppelschicht zu bewegen (Chen et al., 2004).

In Untersuchungen wurde gezeigt, dass Störungen in *SLC6*-Transportern unterschiedliche Erkrankungen verursachen können. Beispielsweise führen Mutationen in den Transportern für

Dopamin (DAT, *SLC6A3*) oder für Norepinephrin (NET, *SLC6A2*) zu infantiler Dystonie (Blackstone, 2009) bzw. orthostatischer Intoleranz (Shannon et al., 2000; Lin et al., 2015). Desweiteren werden Störungen in GlyT2 mit Hyperekplexie, aber auch mit Schizophrenie in Verbindung gebracht (Bogdanik et al., 2012) oder beispielsweise mit veränderter Schmerzwahrnehmung bei Störungen im GlyT1 (Harvey and Yee, 2013).

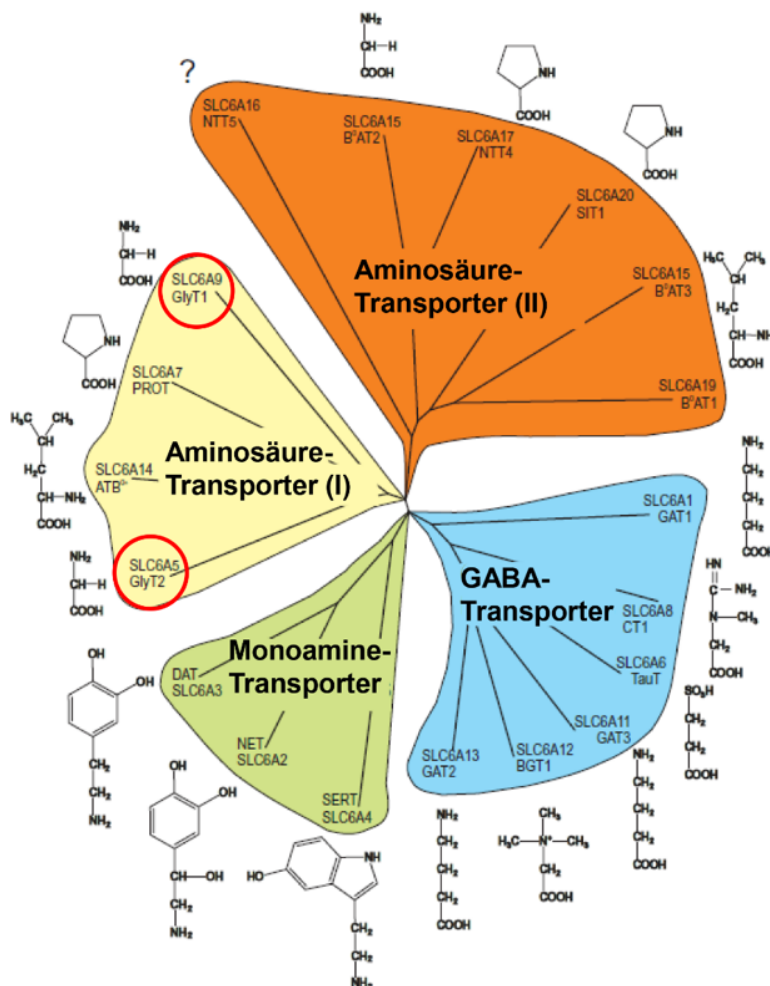


Abbildung 2 *SLC6*-Transporterfamilie

Peptidsequenzen aller menschlichen *SLC6*-Mitglieder wurden unter Verwendung von *T-Coffee* ausgerichtet (Notredame et al., 2000), und Ähnlichkeiten wurden mit *Treeview* (Page, 1996) visualisiert. Das Hauptsubstrat für jeden Transporter wird neben dem Namen angezeigt. Bezogen auf die Substratspezifität und die Substratsequenzähnlichkeit lässt sich die *SLC6*-Familie in vier Untergruppen unterteilen: Die Monoamine-Transporter, die GABA-Transporter und die zwei Aminosäuren-Transportergruppen I und II. Es existieren zwei Transporter für Glycin (GlyT1 und GlyT2), die von zwei unterschiedlichen Genen codiert werden (*SLC6A9* und *SLC6A5*) und mit einem roten Kreis markiert sind. Modifiziert nach (Broer and Gether, 2012).

1.4.1 GlyT2

GlyTs gehören zur Familie der Na⁺/Cl⁻-abhängigen Neurotransmittertransporter (*SLC6* NTTs) und sind für die Regulation der exakten Glycinkonzentration an zentralen Synapsen verantwortlich.

1.4.2 Proteinstruktur

Die Röntgenstruktur der GlyT2 ist bisher nicht bekannt. Die bisherigen Erkenntnisse nutzen die Struktur eines bakteriellen Homologs aus *Aquifex aeolicus* dem Leucintransporter LeuT_{Aa}. Mit seinem Substrat Leucin und seinen zwei Na⁺-Ionen gibt der LeuT_{Aa} eine molekulare Einsicht in die Architektur der Familie der Na⁺/Cl⁻ abhängigen Neurotransmittertransporter (Yamashita et al., 2005). Gemäß dieser Kristallstruktur setzen sich Glycintransporter aus insgesamt 12 helikalen Transmembrandomänen (TMs) mit zytoplasmatischen N- und C-terminalen Enden zusammen (Lopez-Corcuera et al., 1998; Yamashita et al., 2005). Die ersten 10 TMs formen den Proteinkern. Dabei bilden TM1 bis TM5 und TM6 bis TM10 Strukturmodule, die zur Membranebene in entgegengesetzter Orientierung ausgerichtet sind. Die sogenannte „5+5 umgekehrte Wiederholungsfaltung“ (Yamashita et al., 2005) ist ein Strukturkennzeichen, das in mehreren Familien der sekundär-aktiven Transporter vorkommt (Lolkema et al., 2008; Lolkema and Slotboom, 2008). TM1 und TM6 enthalten in etwa auf mittlerer Höhe der Membranschicht einen Bruch in ihrer helikalen Struktur, sodass jeweils zwei Segmente (TM1a, TM1b, TM6a und TM6b) entstehen. Gemeinsam mit TM3 und TM8 bilden sie einen inneren Ring und umfassen die Substrat- und die Na⁺-Ionenbindestelle im Kern des Transporters (Gomez et al., 2003b). Die Dichte an konservierten Aminosäureresten (Abbildung 3, A) ist in den Bindungsbereichen am höchsten und verdeutlicht deren Wichtigkeit für die Struktur und die Funktion. In diesem Substratbindungsbereich besitzen LeuT und *SLC6* NTTs eine Sequenzübereinstimmung von 55-67 %, während die der Gesamtsequenz bei lediglich 20-25 % liegt (Yamashita et al., 2005; Beuming et al., 2006). Alle TMs sind über kurze intra- und extrazelluläre Loops, die wiederum α -helikale Elemente enthalten, verbunden (Abbildung 3, B). Die TM3 und TM4 sind über eine große extrazelluläre Schleife (extrazellulärer Loop, EL2) verbunden. EL2 enthält vier Asparagin Aminosäurereste, die im reifen GlyT2 an ihren N-Termini glykosyliert sind. (Wang et al., 1995; Martinez-Maza et al., 2001).

Im Jahr 2001 beschrieb Horiuchi *et al.* GlyT1 und GlyT2 als Monomere in der Plasmamembran (Horiuchi et al., 2001). Jedoch haben neuere Studien inzwischen gezeigt, dass glykosylierte GlyTs als Dimer (Yamashita et al., 2005; Bartholomäus et al., 2008) oder Oligomer (Just et al., 2004; Fernandez-Sanchez et al., 2008) an der Zelloberfläche vorliegen. Beide Monomere sind

parallel zueinander orientiert. Insgesamt bestehen GlyTs aus ca. 800 Aminosäuren und in 48 % stimmt die GlyT2-Sequenz mit der des GlyT1 überein (Chen et al., 2004).

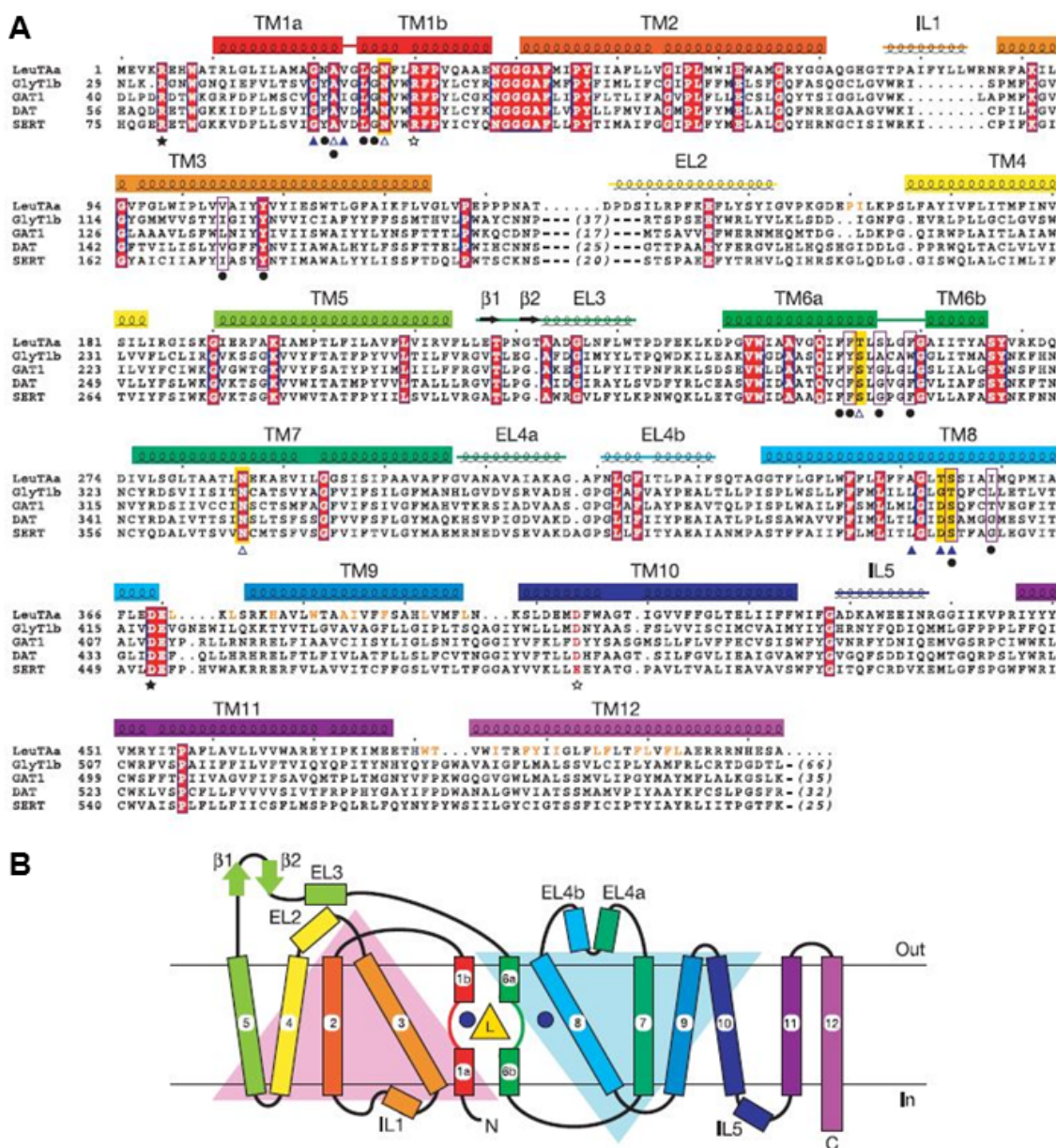


Abbildung 3 Aminosäuresequenz und Sekundärstruktur des LeuT_{Aa}
 (A) Aminosäuresequenz des bakterielle LeuT aus *A. aeolicus* (LeuT_{Aa}) mit dem humanen Glycintransporterhomolog (GlyT1b), GABA (GAT1), Dopamin (DAT), und Serotonin (SERT). Die Abbildung wurde mittels Psi-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) und manueller Einstellung hergestellt. Hoch konservierte Reste sind rot hervorgehoben. α -Helices und β -Stränge in LeuT_{Aa} sind als Spulen und Pfeile dargestellt. Die offenen und gefüllten blauen Dreiecke zeigen Reste, die die Bindung der Natriumionen Na1 und Na2 koordinieren. Die Reste, deren Seitenkettenatome mit den Natriumionen wechselwirken, werden zusätzlich mit gelb hervorgehoben. Die gefüllten schwarzen Kreise zeigen die Reste an, die an der Substratbindung (hier: Leucin) beteiligt sind und die Reste, deren Seitenketten mit dem Leucin wechselwirken, sind von lila Kästchen umgeben. Die offenen und gefüllten Sterne zeigen die geladenen Reste an den extrazellulären und zyttoplasmatischen Zugängen an. Die Reste

der LeuT_{Aa}-Dimer-Schnittstelle sind mit orangefarbenen Buchstaben gekennzeichnet. Zwischen TM3 und TM4 ist die Anzahl der abgeschnittenen Reste in Klammern angegeben. (B) Die LeuT_{Aa}-Topologie. Die Positionen von Leucin und den zwei Natriumionen sind als ein gelbes Dreieck und blaue Kreise dargestellt. Das rote und das blaue Dreieck im Hintergrund versinnbildlichen die „invertierte 5+5 Faltung“. Modifiziert nach (Yamashita et al., 2005)

1.4.3 Lokalisation und Funktion

In Abhängigkeit von der Lokalisation und Funktion unterscheidet man zwei GlyT-Subtypen (Abbildung 4), die von verschiedenen Genen (*SLC6A9* und *SLC6A5*) codiert werden.

Untersuchungen haben gezeigt, dass GlyT1 (Gen *SLC6A9* auf Chromosom 1p34.1) vorwiegend in Gliazellen, insbesondere in Astrozyten des kaudalen ZNS (Zafra et al., 1995) vorkommt und hauptsächlich für die Entfernung des Glycins aus dem synaptischen Spalt und somit für die Regulation der extrazellulären Glycinkonzentration verantwortlich ist (Gomez et al., 2003a; Gomez et al., 2003b). Für diese Aufgaben ist eine 2Na⁺/1Cl⁻/1Glycinmolekül-Stöchiometrie sowie ein bidirektionaler Glycintransport angemessen (Supplisson and Roux, 2002). Bisher wurden für den GlyT1 fünf Isoformen mit Spleißvariationen in ihren N-Termini (GlyT1a, -1b, -1c) und C-Termini (GlyT1d und -1e) identifiziert (Supplisson and Roux, 2002; Chen et al., 2004). GlyT1-Spleißvarianten wurden nicht nur im ZNS, sondern auch in weiteren Geweben, wie beispielsweise in der Retina, nachgewiesen (Chen et al., 2004).

GlyT2 (Gen *SLC6A5* auf Chromosom 11p15.1-11p15.2 (Morrow et al., 1998)) wird vorwiegend in den präsynaptischen Axonendigungen glycinerner Neuronen in Rückenmark, Hirnstamm und Kleinhirn exprimiert (Zafra et al., 1995). Seine Aufgabe an inhibitorischen glycinergen Synapsen ist eine ausreichende Glycinkonzentration in den präsynaptischen Nervenendigungen bereitzustellen, damit eine effektive Füllung der synaptischen Vesikel durch VIAAT (vesikulärer inhibitorischer Aminosäuretransporter, Gen *SLC32A1*) garantiert ist (Gomez et al., 2003b). Da VIAAT unspezifisch und niedrig-affin ist, geht man davon aus, dass die Wiederauffüllung von inhibitorischen synaptischen Vesikeln von der relativen Glycinkonzentration im Zytosol des präsynaptischen Endes abhängt (Supplisson and Roux, 2002; Aubrey et al., 2007; Aubrey, 2016). Bisher wurden in Ratten zwei GlyT2-Spleißvarianten, GlyT2a und GlyT2b, die sich am N-Terminus in fünf Aminosäuren unterscheiden, nachgewiesen (Ponce et al., 1998). Ebihara *et al.* beschrieb in Mäusen sogar drei GlyT2-Spleißvarianten, die nachweislich in Hirnstamm und Rückenmark exprimiert wurden (Ebihara et al., 2004). GlyT2 weisen beim Symport von Natriumionen, Chloridionen und Substrat eine Stöchiometrie von 3Na⁺/1Cl⁻/1Glycinmolekül auf. Das Verhältnis aus zwei

Ladungen pro Glycinmolekül stellt eine höhere Triebkraft dar und erlaubt es, den hohen präsynaptischen Pool an Glycin aufrechtzuerhalten. Zusätzlich ist die umgekehrte Aufnahme von Glycin beim GlyT2 nicht möglich (Roux and Supplisson, 2000).

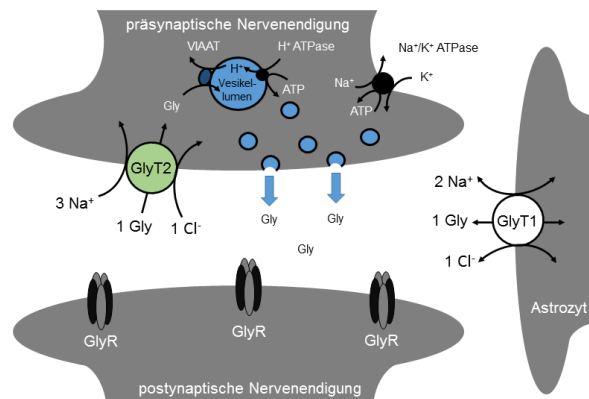


Abbildung 4 Inhibitorische glycinerge Synapse

Der vesikuläre inhibitorische Aminosäuretransporter (VIAAT) fördert die Akkumulation des Neurotransmitters Glycin innerhalb kleiner synaptischer Vesikel durch H^+ ATPase. Synaptische Vesikel verschmelzen mit der Plasmamembran und setzen den Neurotransmitter in den synaptischen Spalt frei. Glycin bindet postsynaptisch an Glycinrezeptoren (GlyR) und ist für das inhibitorische postsynaptische Potential verantwortlich. Die synaptische Wirkung des Transmitters endet mit seiner Wiederaufnahme durch Na^+/Cl^- -abhängige Transporter, die in der neuronalen (GlyT2) und glialen (GlyT1) Plasmamembranen lokalisiert sind. Die $3Na^+/1Cl^-/1Glycinmolekül$ -Stöchiometrie des GlyT2 ermöglicht die Aufrechterhaltung eines Glycin-reichen Pools innerhalb der präsynaptischen Axone. Die hohe Glycinkonzentration liefert ausreichend Substrat für den vesikulären Glycin-Transporter (VIAAT) mit niedriger Glycin-Affinität. Die (Na^+/K^+ -ATPase) ermöglicht den sekundär-aktiven Transport von Glycin in die Präsynapse.

1.5 Identifizierung einer neuen Patientenmutation – *missense* Mutation P429L

In der vorliegenden Arbeit wird die Mutation P429L im Exon 8 des hGlyT2-Gens (*SLC6A5*) im Fall eines an Hyperekplexie erkrankten Patienten untersucht. Die *missense* Mutation P429L des Patienten geht mit einer Substitution von Prolin (CCG) zu Leucin (CTG) in Aminosäureposition 429 des hGlyT2-Gens (*SLC6A5*) einher. Dieser Aminosäureaustausch ist auf eine einzelne Basensubstitution in der Nukleotidsequenz zurückzuführen. Durch DNA-Sequenzanalyse wurde das pathologische Basentriplett CTG, das fälschlich für die Aminosäure Leucin codiert, identifiziert (c.1286 C > T). Im Wildtyp des hGlyT2 liegt ursprünglich das Basentriplett CCG im Genom vor und codiert im Gesunden für die Aminosäure Prolin. In Abbildung 5, A ist der mutierte DNA-Abschnitt chromatographisch dargestellt und macht den Nukleotid- bzw. Aminosäureaustausch in der Polypeptidkette deutlich.

Familienstammbaum (Abbildung 5, B): Patient 5 war das dritte Kind (weiblich) eines vermutlich blutsverwandten Elternpaares. Während die Eltern phänotypisch unauffällig waren, wies deren drittes Kind (Patient 5) Hyperekplexie-Merkmale auf. Bereits der erstgeborene Sohn (Patient 3) war an Hyperekplexie erkrankt und war im Säuglings-/Kindesalter daran verstorben. Die DNA-Sequenzanalyse ergab, dass beide erkrankten Kinder (3 und 5) die *missense* Mutation P429L in Exon 8 des hGlyT2-Gens trugen. Obwohl beide Elternteile Allelträger der Mutation P429L waren, wiesen sie keine phänotypischen Merkmale auf. Interessanterweise waren Vater und Mutter für eine weitere Mutation im selben Exon ebenfalls heterozygot. Dabei handelte es sich um die *missense* Mutation D463N, die nur 100 bp von der ersten Mutation P429L auf dem DNA-Strang entfernt war (c.1387 G > A). Die zweite Mutation D463N wurde lediglich an das zweite Kind (4), das einzige gesunde Kind, weitergegeben. Somit trug das zweite Kind (4) wie die Eltern beide Mutationen (P429L und D463N) im Exon 8 und war aufgrund von Heterozygotie an beiden Positionen ohne phänotypische Hyperekplexie-Merkmale. Allerdings wurde die zweite Mutation D463N nicht an die erkrankten Kinder (3, 5) weitergegeben. Patienten 3 und 5 waren für die Mutation P429L homozygot. Das heißt, die Mutation P429L scheint die Ursache für die Erkrankung zu sein und wird deshalb in dieser Arbeit untersucht.

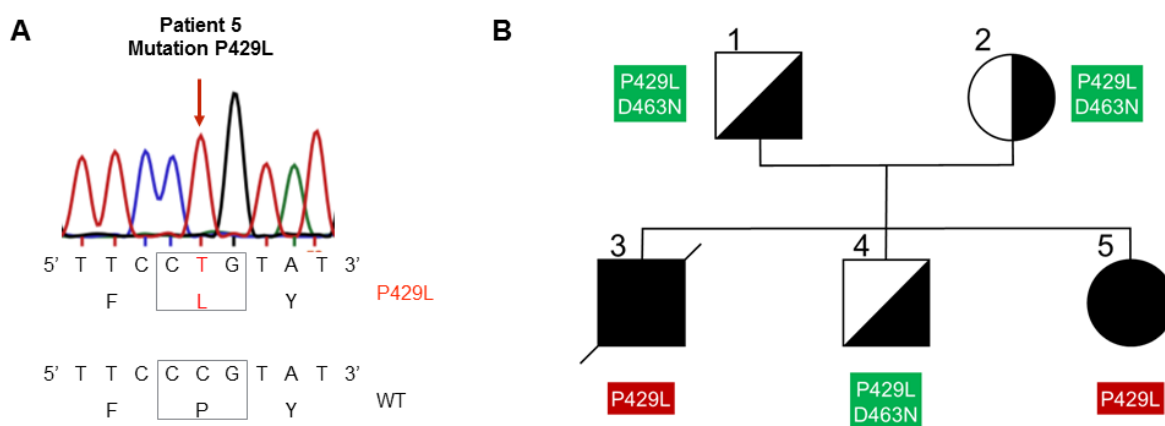


Abbildung 5 Sequenzanalyse und Familienstammbaum

(A) Im Exon 8 des GlyT2-Gens (*SLC6A5*) ist die pathologische Hyperekplexie-Variante P429L dargestellt. Die Punktmutation P429L wird in ihrer Nukleotidsequenz und in ihrer Peptidnomenklatur jeweils in *sense*- (5'-3'-) Richtung angegeben. Der Vergleich zum hGlyT2-Wildtyp zeigt die *missense* Mutation im betroffenen Patienten 5. Die Mutation ist rot markiert, das betroffene Basentriplett sowie die Aminosäureänderung sind durch einen Rahmen gekennzeichnet. Die Mutation wurde durch Klonierung von PCR-Produkten und Allelsequenzierungen in Plasmidvektoren zur Trennung der Allele bestätigt.

(B) Familienstammbaum. Vater 1, Mutter 2, Geschwister 3, 4 und 5. Quadrate und Kreise stehen für männliche und weibliche Individuen. Verschattete Symbole: Homozygotie. Halb verschattete Symbole: Heterozygotie. Die an Hyperekplexie erkrankten Kinder 3 und 5 tragen die Mutation P429L in homozygoter Form (mit rot markiert), während die beiden Elternteile 1 und 2 und das gesunde Kind 4 die Mutation P429L sowie eine weitere Mutation (D463N) jeweils in heterozygoter Form aufweisen (mit grün markiert). Patient 3 ist verstorben.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen

2.1.1 Patientenblutproben

Blutproben von Patienten, die mit Hyperekplexie diagnostiziert wurden, wurden bei -80°C gelagert. Diese Proben wurden zur Gewinnung von humaner genomischer DNA (gDNA) verwendet. Für die verwendeten Proben lag eine Beschreibung der Symptomatik durch den behandelnden Arzt Herrn Dr. Tilman Polster vor. Das Projekt wurde durch die Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt (2016011301).

2.1.2 Zelllinien

COS7 Zellen:

COS Zellen entsprechen einer CV-1 Zelllinie, die von Nierenzellen äthiopischer Grünmeerkatzen (*Cercopithecus aethiopicus*) abstammen. Die Nierenzelllinie dieser Primatengruppe wurde mit viralem Genom der SV40-Mutante (Simian Virus 40) infiziert, die nicht mehr replikationsfähig sind (Gluzman, 1981).

HEK293 Zellen:

HEK293 Zellen stammen aus der primären embryonalen menschlichen Niere, die mit fragmentierter menschlicher Adenovirus-Typ-5-DNA transformiert wurde (Graham et al., 1977). Die adenoviralen Gene ermöglichen den HEK (*human embryonal kidney*) Zellen sehr hohe Mengen an rekombinanten Proteinen zu produzieren.

Beide Zelllinien wurden von ATCC (ATCC – Global Biosource Center, Manassas, VA, USA) bezogen.

Tabelle 1 Zelllinien

Zelllinie	Hersteller (Art.Nr.)
COS7 Zellen	ATCC (CRL-1651)
HEK293 Zellen	ATCC (CRL-1573)

2.1.3 Bakterien

NEB5 α sind kompetente *E.coli* Zellen, die für die Transformation im Klonierungsexperiment eingesetzt wurden. Um eine optimale Transformationseffizienz zu erreichen, wurden sie nach Angaben des Forschungsunternehmens New England Biolabs (NEB – Frankfurt am Main, Deutschland) in SOC Medium inkubiert.

Tabelle 2 Bakterien

Bakterien	Hersteller (Art.Nr.)
NEB5 α	New England Biolabs (C2987I)

2.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, Deutschland), Sigma Aldrich Chemie (Schnelldorf, Deutschland), AppliChem (Darmstadt, Deutschland) und Nippon Genetics Europe (Düren, Deutschland) bezogen.

Tabelle 3 Allgemein verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller (Art.Nr.) / Zusammensetzung	Verwendung
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific (840004)	Agarosegel
Midori Green Advance DNA Stain	Nippon Genetics Europe (MG04)	Agarosegel
10 % APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Roth (9592)	Sammel-/Trenngel
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin, 1,2- Bis(dimethylamino)-ethan)	Roth (2367)	Sammel-/Trenngel
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Roth (6367)	Biotin
DTT (Dithiothreitol)	Roth (6908)	Probenpuffer
β -Mercaptoethanol	Roth (4227)	Probenpuffer
Agar-Agar, Kobe I, pulv.	Roth (5210.3); pH 5,0-8,0	Agar-Ampicillin-Platten
DNA-Blaumarker/Probenpuffer	30 % Glycerin; 0,2 M EDTA, ca. 0,05 % Bromphenolblau; ca. 0,05 % Xylencyanol FF	Ladepuffer für Agarosegele
Mowiol 4-88	Sigma Aldrich (81381)	ICC
TritonX-100	AppliChem (A4975)	ICC, Biotin Assay

2.2.1 Vektoren

Tabelle 4 **Verwendete Vektoren**

Vektor	Insert	Hersteller
Myc-GlyT2-pRK5	Humanes <i>SLC6A5</i> -Gen, Ampicillinresistenz, Myc-Tag	Prof. Robert Harvey (University of the Sunshine Coast, School of Health and Sports Sciences, London, GB)
pRK5	Hohe Proliferationsrate durch CMV und Sp6 Promotor; Ampicillinresistenz, Myc-Tag	P. Seeburg, MPI für Medizinische Forschung, Heidelberg, Deutschland
pRK7	Hohe Proliferationsrate durch CMV und Sp6 Promotor; Ampicillinresistenz	P. Seeburg, MPI für Medizinische Forschung, Heidelberg, Deutschland
pEGFP-N1	Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)	Clontech Laboratories
pDsRed-ER	Protein aus ER-Markerprotein (Calreticulin) und rot fluoreszierendem Protein	Clontech Laboratories
pDsRed-Monomer- Mem	Protein aus Membranmarkerprotein (GAP-43) und rot fluoreszierendem Protein	Clontech Laboratories

2.2.2 Primer

Alle Oligonukleotide wurden von der AG Villmann (Würzburg, Deutschland) designiert und von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) hergestellt. Sie dienten als Mutageneseprimer (Tabelle 5), als hGlyT2-Insertprimer für das Exon 8 mit eingebauten Restriktionsschnittstellen (Tabelle 6) oder als Sequenzier-/Vektorprimer für pRK5/pRK7 (Tabelle 7).

Tabelle 5 ***Sense* und *antisense* Mutageneseprimer für hGlyT2-Klon mit integrierter Mutation P429L**

Mutageneseprimer	Sequenz in 5'-3'-Richtung	bp	Annealing- Temperatur
GlyT2_P429L_ <i>sense</i> #366	G GCC ACG TTC <u>CTG</u> TAT GTC GTA CT	24	54 °C
GlyT2_P429L_ <i>antisense</i> #367	G TAC GAC ATA <u>CAG</u> GAA CGT GGC C	23	54 °C

Tabelle 6 *Sense und antisense hGlyT2-Exon 8-Primer mit angehängten Restriktionssequenzen für Allelsequenzierung*

Primer hGlyT2 Exon8 Cat No/ID No.	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Sequenz Schnittstelle	bp	Annealing- Temperatur
EcoRI_hGlyT2_ex8F 10336-022/R7998E01 #423	GGAATTCCA <u>CTCTGCAG</u> GGC TGCTTCT	PstI: CTGCA G	27	62,8 °C
Clal_hGlyT2_ex8R 10336-022/R8566/H02 #425	GCATCGATGCC <u>CCAGGG</u> CTG GTTATAGAT	Clal: AT CGAT	29	64,3 °C

Tabelle 7 *Sense und antisense pRK5/pRK7-Vektorprimer*

pRK5/pRK7 Vektorprimer	Sequenz in 5'-3'-Richtung	bp	Annealing- Temperatur
<i>sense</i> pRK5/pRK7 692873/R8566G12 #43	TAG GTG ACA CTA TAG AAT AAC ATC	24	50,6 °C
pRK-Cis3 <i>antisense</i> 778400/E7853F12 #70	GTA ACC ATT ATA AGC TGC AAT AAA CAA GTT	30	54,8 °C
#42 384 pRK-Cis3 <i>reverse</i>	AAC CAT TAT AAG CTG CAA TAA AC	23	48,1 °C

2.2.3 Enzyme

Verwendete Enzyme stammen unter anderem von Roche Diagnostics (Rotkreuz, Schweiz) und der Firma Promega (Mannheim, Deutschland).

Tabelle 8 **Verwendete Enzyme**

Enzym	Hersteller (Art.Nr.)	Verwendung
RNase A (100 mg/ml)	Roth (7156.1)	Isolation gDNA aus Vollblutproben, Minipräparation
GoTaqG2-Polymerase mit GoTaq Green Puffer 5x und MgCl ₂	Promega (M74423)	Kolonie PCR
HotStar HighFidelity DNA- Polymerase	Qiagen (202602)	PCR gDNA für Sequenzierung

T4 DNA Ligase und 10x Puffer mit 10 mM ATP	New England Biolabs (M0202)	Ligation
Protease Inhibitor Tablette	Roche (04693132001)	Biotin

Tabelle 9 Restriktionsenzyme und ihre Puffer

Name	Hersteller (Art.Nr.)	Erkennungs- sequenz 5'-3'	Puffer (Art.Nr.) Aktivität	Verwendung
PstI-HF	New England Biolabs (R3140)	CTGCA G	CutSmart Puffer 10x (B7204) 100 %	Allelsequenzierung
ClaI	New England Biolabs (R0197)	AT CGAT	CutSmart Puffer 10x (B7204) 100 %	Mutagenese, Allelsequenzierung,
HindIII	New England Biolabs (R0140)	A AGCTT	CutSmart Puffer 10x (B7204) 50 %	Mutagenese

2.2.4 Kits

Eingesetzte Kits wurden unter anderem von den Firmen Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland), Macherey Nagel (Düren, Deutschland), Novagen/Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Qiagen (Hilden, Deutschland) und Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Tabelle 10 Verwendete Kits

Kits/Protokoll	Hersteller (Art.Nr.)	Verwendung
SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific (34577)	WB: ECL-Reaktion
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific (34096)	Biotin: ECL-Reaktion
CytoBuster Protein Extraction Reagent	Novagen (71009-4)	Lysate
Bradford Reagenz	Bio-Rad (500-0006)	Proteinkonzentrationsbestimm ung
DNA Blood Mini Kit	Qiagen (51104)	Isolation gDNA

Gel and PCR Clean-up Macherey Nagel (740609.250) DNA-Aufreinigung nach PCR,
Gelextraktion

2.2.5 Antikörper

Verwendete Primärantikörper wurden von den Firmen abcam (Cambridge, GB), Becton Dickinson Biosciences (BD – Heidelberg, Deutschland), Biozol Gene Tex (Eching, Deutschland), Cell Signaling Technology (Cambridge, GB), Enzo Life Sciences (Lörrach, Deutschland), OriGene Technologies (Herford, Deutschland), Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Alle verwendeten Sekundärantikörper stammen von der Firma Dianova (Hamburg, Deutschland).

2.2.5.1 Primärantikörper

Tabelle 11 Verwendete Primärantikörper

Name	Spezies	Hersteller (Art. Nr.)	Verwendung
Myc-Antikörper: ab9106	Kaninchen polyklonal	abcam (9106)	ICC 1:500
Myc-Antikörper: A7	Maus monoklonal	OriGene (TA100010)	ICC 1:500
ER-Membran-Marker: Calnexin	Kaninchen polyklonal	abcam (22595)	ICC 1:200
ER-Golgi-Kompartiment: ERGIC53	Maus monoklonal	Enzo Life Sciences (ALX-804-602-C100)	ICC 1:250
Cis-Golgi: GM130	Maus monoklonal	BD Biosciences (610822)	ICC 1:250
β-Actin	Maus monoklonal	Biozol, Gene Tex (GTX26276)	WB 1:10 000
Pan-Cadherin	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling (4068)	Biotin 1:1 000
GlyT2 (B-4)	Maus monoklonal	Santa Cruz (sc-390090)	WB 1:500 Biotin 1:500

2.2.5.2 Sekundärantikörper

Tabelle 12 Verwendete Sekundärantikörper

Peroxidase/Fluoreszenz	Wirt	Ziel	Hersteller (Art.Nr.)	Verwendung
------------------------	------	------	-------------------------	------------

Alexa Fluor 488	Ziege	anti Kaninchen	Dianova (111-546-003)	ICC 1:250
Cy 3	Ziege	anti Maus	Dianova (115-165-003)	ICC 1:500
HRP (<i>horseradish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase)	Ziege	anti Kaninchen	Dianova (111-036-003)	Biotin 1:10 000
HRP (<i>horseradish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase)	Ziege	anti Maus	Dianova (115-035-146)	WB 1:10 000

2.2.6 Größenstandards

Tabelle 13 Größenstandards für die Protein- und DNA-Auftrennung

Größenstandard	Hersteller (Art.Nr.)	Verwendung
Blue Protein Standard, Broad Range	New England Biolabs (P7706)	Protein-Leiter, 11–190 kDa
ColorPlus Prestained Protein Marker, Broad Range (CPM)	New England Biolabs (P7711)	Protein-Leiter, 10–230 kDa
pRK7 Plasmid, Hinf I verdaut	AG Villmann	DNA-Leiter, 100–1500 bp

2.2.7 Zellkulturlösungen und Medien

Tabelle 14 Zellkulturlösungen und Medien

Zellkulturlösung	Hersteller (Art.Nr.)
MEM (Minimum Essential Medium)	Thermo Fisher Scientific (21090-055)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Thermo Fisher Scientific (11960-044)
FBS (Fetal Bovine Serum)	Thermo Fisher Scientific (10270-106)
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Thermo Fisher Scientific (15140-122)
GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific (35050-038)
Sodiumpyruvat	Thermo Fisher Scientific (11360-039)
StemPro Accutase	Thermo Fisher Scientific (A1110501)
Zellkulturmedium	Zusammensetzung
HEK293 Zellmedium	87 % MEM, 10 % FBS, 1 % Pen/Strep, 1 % GlutaMAX, 1 % Sodiumpyruvat
COS7 Zellmedium	87 % DMEM, 10 % FBS, 1 % Pen/Strep, 1 % GlutaMAX, 1 % Sodiumpyruvat

2.2.8 Zelltransfektionsreagenzien

Tabelle 15 Zelltransfektionsreagenzien für HEK293 und COS7 Zellen

Zelltransfektionsreagenz HEK293 Zellen	Hersteller (Art.Nr.) / Zusammensetzung
0,1x TE Puffer (X100) pH 8,0	AppliChem (A0973.0500)
2x HBS (HEPES gepufferte Kochsalzlösung)	50 mM HEPES; 12 mM D-Glucose; 10 mM KCl; 280 mM NaCl; 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; pH 6,95
CaCl ₂	2.5 M CaCl ₂ ; pH 7,0
Opti-MEM (Reduced Serum Medium)	Thermo Fisher Scientific (31985-062)
Lipofectamine2000, 1,5 mg/ml	Invitrogen (11668-019)
Transfektionsreagenz COS7 Zellen	
DPBS (Dulbecco's Phosphate gepufferte Kochsalzlösung)	Thermo Fisher Scientific (14190-094)
DEAE-Dextran (Diethylaminoethyl-Dextran)	Sigma Aldrich (D9885) / 10 mg/ml in PBS
Chloroquindiphosphat	Sigma Aldrich (C6628) / 10 mM in PBS

2.2.9 Bakterienkulturmedien

Tabelle 16 Bakterienkulturmedien

Medium	Hersteller (Art.Nr.)
2xYT Medium für die Molekularbiologie	Roth (X966.2)
SOC Outgrowth Medium	New England Biolabs (B9020)

Tabelle 17 Antibiotikum

Antibiotikum	Hersteller (Art.Nr.)
Ampicillin (100 mg/ml in H ₂ O)	Roth (HP62.1)

Tabelle 18 Zusammensetzung der Ampicillin-Agarplatten

Agar-Gel (1,5 % Gelstärke)	Zusammensetzung
	31 g/l 2x YT-Medium; 15 g/l Agar-Agar; Ampicillin 1:500

2.3 Standardlösungen

Die jeweiligen Lösungen wurden mit entsalztem und gereinigtem Wasser durch das Reinstwassersystem der Firma Sartorius (Göttingen, Deutschland) verdünnt.

2.3.1 DNA-Lösungen

Tabelle 19 DNA-Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
TE-Puffer (Tris-EDTA)	10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8
TBE-Puffer (Tris-Borsäure-EDTA)	89 mM Tris; 89 mM Borsäure; 2mM EDTA; pH 8,3

Tabelle 20 Puffer für Minipräparation der Plasmid-DNA aus Bakterien

Puffer	Zusammensetzung	Bemerkung
Puffer P1 (Resuspendierungspuffer)	50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris-HCl; pH 8	
Puffer P2 (Lysepuffer)	200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS	Immer frisch angesetzt
Puffer P3 (Neutralisierungspuffer)	3 M Kaliumacetat; 11,5 % (w/v) Essigsäure	

Tabelle 21 Zusammensetzung eines 1% Agarosegels

1% Agarosegel	Zusammensetzung
	150 ml TBE-Puffer (1x); 1,5 g Agarose; 8 µl Midori

2.3.2 Lösungen und Reagenzien der Proteinbiochemie

Tabelle 22 Lösungen und Reagenzien für SDS Page, Western Blot und Biotin Assay

Medium	Zusammensetzung
PBS (<i>Phosphate buffered saline</i>)	137 mM NaCl; 3 mM KCl; 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ x 3 H ₂ O; pH 7,4
TBS / TBS-T (<i>Tris buffered saline</i>)	50 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 8 / 50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween 20
Blockierungslösung	TBS-T; 5 % (w/v) BSA (<i>bovine serum albumin</i>)
SDS Laufpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,3

2x SDS Probenpuffer	90 mM Tris-HCl; 20 % (v/v) Glycerin; 4 % (w/v) SDS; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau, 100 mM DTT
4x β -Mercaptoethanol	240 mM Tris-HCl; 40 % (v/v) Glycerin; 8 % (w/v) SDS; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau;
Probenpuffer	5 % β -Mercaptoethanol
Blot-Transferpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 10 % Ethanol
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl; 0,4 % (w/v) SDS; pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl; 0,4 % (w/v) SDS; pH 6,8
Quenching Puffer	192 mM Glycin; 25 mM Tris
Lyse Puffer	1 % Triton X-100; 2 mM EDTA pH 8; 0,1 mM PMSF; 10 mg/ml Proteaseinhibitor; in TBS pH 8
EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin	Thermo Fisher Scientific (21335)
Pierce Streptavidin Agarose Resin	Thermo Fisher Scientific (20353)

Tabelle 23 Zusammensetzung eines 9 % Polyacrylamidgels (PAA-Gel)

Gel	Zusammensetzung
9 % Trenngel	2,7 ml 30 % PAA; 2,25 ml Trenngelpuffer pH 8,8 (4x TrisCl/SDS); 4,05 ml H ₂ O; 6 μ l TEMED; 30 μ l 10 % APS
Sammelgel	325 μ l 30% PAA; 625 μ l Sammelgelpuffer pH 6,8 (4x Tris Cl/SDS); 1,55 ml H ₂ O; 2,5 μ l TEMED; 12,5 μ l 10 % APS

2.3.3 Lösungen und Reagenzien für Immuncytochemie

Tabelle 24 Lösungen und Reagenzien für Immuncytochemie

Lösung/Reagenz	Hersteller (Art.Nr.) / Zusammensetzung
4 % PFA 4 % Sucrose in PBS	Roth (0335.3); AppliChem (A1122)
Blockierungslösung	5 % (v/v) NGS in PBS pH 7,4
Block- und Permeabilisierungslösung	5 % (v/v) NGS, 0,2 % (v/v) Triton X-100 in PBS pH 7,4
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)	Thermo Fisher Scientific (D1306)

2.3.4 Lösungen und Reagenzien für [³H]-Glycin Uptake Assay

Radioaktiv markiertes Glycin stammte von PerkinElmer (Hamburg, Deutschland) und die Glutaraldehydlösung von der Firma SERVA (Heidelberg, Deutschland).

Tabelle 25 **Lösungen und Reagenzien für [³H]-Glycin Uptake Assay**

Lösung	Hersteller (Art.Nr.) / Zusammensetzung
Glycinpulver	Roth (3790.3)
[2- ³ H]-Glycin, 20,9 µM	PerkinElmer (NET004001MC) / Glycin, [2- ³ H]- Ethanol:Wasser (2:98)
Rotiszint® eco plus, LSC- Universalcocktail	Roth (0016.3)
HBS-Puffer	5 mM KCl; 1 mM MgSO ₄ ; 10 mM HEPES-Tris; 10 mM Glucose; 1 mM CaCl ₂ ; 150 mM NaCl pH 7,4; steril filtriert
Gelatinelösung	Sigma Aldrich (G1890-019) / 0,2 % (w/v) Gelatinepulver in Ampuwa auf Heizplatte bei ca. 80 °C lösen; steril filtriert
Glutaraldehydlösung, 25 % in H ₂ O	SERVA (23114.01) / 0,5 % (v/v) Glutaraldehyd in Ampuwa

Tabelle 26 **Glycinkonzentrationsreihe des Transportmediums**

Finale Glycinkonzentration	[³H]-Glycin	10mM Glycin in HBS	HBS-Puffer
1 mM	50 µl 20,9 µM Stock	99,9 µl	850 µl
750 µM	750 µl 1 µM	75,18 µl	174 µl
500 µM	500 µl 1 µM	50 µl	450 µl
250 µM	250 µl 1 µM	24,9 µl	725 µl
100 µM	100 µl 1 µM	9,9 µl	890 µl
50 µM	50 µl 1 µM	4,9 µl	945 µl
25 µM	25 µl 1 µM	2,49 µl	972 µl
0 µM	0 µl	0 µl	1 ml

2.4 Verbrauchsmaterialien

Die aufgelisteten Verbrauchsmaterialien stammen unter anderem von den Firmen Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), Greiner Bio-One (Kremsmünster, Oberösterreich), Röntgen Bender (Baden-Baden, Deutschland), Fresenius Kabi (Bad Homburg, Deutschland), VWR (Darmstadt, Deutschland), R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland) und Agfa (Mortsel, Belgien).

Tabelle 27 **Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Verbrauchsmaterialien	Hersteller (Art.Nr.)
TC-Schalen (35 / 100) Standard	Sarstedt (83.3900 / 83.3902)
96-well Platte Nunclon Delta Surface	Thermo Scientific Nunc (167008)
Agarplatten/Petrischale	Sarstedt (82.1473.001)
Deckgläser Φ 13 mm	VWR (631-0149)
Röhrchen (15 ml / 50 ml)	Greiner Bio-One (188271 / 227261)
Röhre (13 ml)	Sarstedt (62.515.006)
SafeSeal Reagiergefäße (1,5 ml / 2 ml)	Sarstedt (72.706 / 72.695.500)
Halb-Mikro-Küvette, Polystyrol	Sarstedt (67.742)
Biosphere Filter Tips (0,1–20 μ l / 1250 μ l)	Sarstedt (70.1114.210 / 70.1186.210)
SafeSeal Tips (200 μ l)	Biozym (770200)
Parafilm	Sigma Aldrich (BR701611)
Nitrocellulosemembran	Bio-Rad (162-0112)
Rotilabo-Blottingpapiere, Dicke 0,35 mm	Roth (CL67.1)
Röntgenfilm Fuji RX-N	Röntgen Bender (40064)
Filtropur V50	Sarstedt (83.1826.001)
Injectomat-Spritze 50 ml	Fresenius Kabi (9000701)
Objektträger	R.Langensbrinck (ISO8037/1)
Standardentwickler	Agfa (G153)
Standardfixierer	Agfa (G354)

2.5 Geräte

Geräte wurden unter anderem von den Firmen Binder (Tuttlingen, Deutschland), New Brunswick Scientific (Nürtingen, Deutschland), HP-Labortechnik (Oberschleißheim, Deutschland), Leica (Wetzlar, Deutschland), Olympus (Hamburg, Deutschland), A. Hartenstein (Würzburg, Deutschland), Kern & Sohn (Balingen, Deutschland), Scientific Industries (Bohemia, NY, USA), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Wolflabs (York, GB), Bosch (Stuttgart, Deutschland), Biometra (Göttingen, Deutschland) und Canon (Krefeld, Deutschland) verwendet.

Tabelle 28 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Inkubator	Binder (11-13758), Temp. 37 °C, CO ₂ 5 %; New Brunswick Scientific, Innova 42 Incubator Shakers (M1335-0002)
Dampfsterilisator	HP-Labortechnik, Varioklav (SN98161104)
Mikroskop	Leica, S40/0.45 Olympus, IX-81 Olympus, Fluoview FV1000
Neubauer-Zählkammer	A. Hartenstein (ZK06)
Waagen	Kern EMB 220-1 Sartorius VWR-124
Vortex-Gerät	Scientific Industries, Vortex- Genie 2
Zentrifugen	Eppendorf, mini Spin Heathrow Scientific Biozym Eppendorf, Centrifuge 5702 VWR, Micro Star 17R Eppendorf, Centrifuge 5424 (Standort 4 °C)
Reinstwassersystem	Sartorius arium 611 UV
Heizblöcke	Wolflabs, Stuart block heater SBH130D Eppendorf, Thermomixer comfort
Mikrowelle	Bosch, AM925ELS
UV-Belichtungsgerät	Biometra, BioDoc Analyze
Spiegelreflexkamera	Canon, EOS 1100D Canon, EOS 650D
Thermalpapierdrucker Mitsubishi P95	Biometra
Photometer	Eppendorf, BioPhotometer plus
SDS-Page	Bio-Rad, Mini Protean Tetra Cell 552BR Bio-Rad, Power Pac 300
Western Blot	Bio-Rad, Mini Protean 3 Cell 67S Bio-Rad, Power Pac Basic
Überkopfschüttler	Manufac, LABINCO EV
Schwenktisch	Biometra, WT 12
Flüssigszintillationsanalysator	PerkinElmer, (Tri-Carb 2910TR)
Professional PCR Thermocycler	Biometra (070-000)
Spectrophotometer NanoDrop1000	Thermo Fisher Scientific (G729)

Röntgenfilmentwicklungsmaschine	Agfa-Gevaert NV-Mortsel (Modellnummer:
Agfa CP1000	206/846)
Software ApE (A Plasmid Editor)	Version 2.0.49, M. Wayne Davis
Software Fiji	Version 4.2.2.9, Schindelin
Adobe Photoshop	CS6 (64bit), Adobe Systems
Software OriginPro 2019	Version 9.6, OriginLab Corporation
Software PyMOL	Version 2.0, Schrödinger, LLC
Software NanoDrop 1000	Version 3.8.1, Thermo Fisher Scientific

2.6 Methoden der Zellkultur

Alle Schritte wurden unter einer Sicherheitswerkbank mit sterilen Lösungen und Medien durchgeführt. Medien wurden vor Gebrauch für ca. 30 min in einem Wasserbad auf eine Temperatur von 37 °C erwärmt. Die Transfektion der Zelllinien fand in der Regel 24 h nach dem Aussäen der Zellen in Medium statt.

2.6.1 Passagieren der Zelllinien

Um eine Konfluenz von 75–100 % nicht zu überschreiten, wurden HEK293 Zellen und COS7 Zellen zweimal in der Woche gesplittet und letztendlich nach der maximal 30. Passage entsorgt. Nach dem Absaugen des Mediums wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen und anschließend mit StemPro Accutase für 5 min bei 37 °C inkubiert, um die Zellen von der Oberfläche zu lösen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Medium gestoppt und zur Erleichterung der späteren Zellzählung durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren eine Einzelzellsuspension hergestellt. Nach der Zentrifugation für 6 min bei 1400 rpm und der Abnahme des Überstands wurden die Zellen in vorgewärmtem Medium resuspendiert und die Zellzahl pro ml mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt, um die Zellen in der gewünschten Dichte in den Schalen oder *well* Platten auszusäen (Tabelle 29). Die Zellen wurden als Monoschicht in adhärenter Kultur in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellkulturmedien für HEK293 Zellen und COS7 Zellen und deren Zusätze sind in Tabelle 14 gezeigt.

Tabelle 29 Ausgesetzte Zellzahl

Schale / Platte	HEK293 Zellen	COS7 Zellen
3 cm Schale	150 x 10 ³	100 x 10 ³
10 cm Schale	2,3 x 10 ⁶	-
96- <i>well</i> Platte	15 x 10 ³	-

2.6.2 Beschichtung der 96-well Platten mit Gelatine

96-well Platten wurden vor dem Aussetzen der HEK293 Zellen mit Gelatine beschichtet, um ein Ablösen der Zellen durch mehrere Waschschriffe zu verhindern. Vorerst wurde eine 0,2 % Gelatinelösung hergestellt und steril filtriert sowie eine 0,5 % Glutaraldehydlösung angesetzt. Nachdem 80 µl der 0,2 % Gelatinelösung in jedes *well* pipettiert und die Platte anschließend für 1 h bei Raumtemperatur (RT) geschwenkt wurde, folgte eine dreimalige Waschung mit sterilem PBS. Um die Gelatine auszuhärten, folgte die Zugabe von 80 µl einer 0,5 % Glutaraldehydlösung pro *well* und die Inkubation für 15 min auf dem Schwenktisch. Nach dreimaliger Waschung mit sterilem PBS wurde die Platte bei 4 °C in Alufolie geschützt gelagert. Am Tag vor dem Aussetzen der HEK293 Zellen wurden die *wells* mit jeweils 250 µl Opti-MEM-Medium befüllt und die 96-well Platte in den Brutschrank (37 °C) gestellt.

2.6.3 Aceton-Behandlung der Deckgläschen

Um die Adhäsion der HEK293 und COS7 Zellen auf den Deckgläschen zu verbessern, wurden diese mit Aceton inkubiert. Nach 5 min wurde das Aceton von den Deckgläschen entfernt, anschließend heiß sterilisiert und bei RT gelagert.

2.6.4 Transfektion von HEK293 Zellen mit Lipofectamine2000

Die Transfektion von HEK293 Zellen auf Gelatine-beschichteten 96-well Platten für den Glycin *Uptake Assay* fand 24 h nach dem Aussetzen (15 000 Zellen in 250 µl Medium pro *well*) statt. Für die Transfektion wurde Lipofectamine2000 eingesetzt, welches der Plasmid-DNA eine hydrophobe Komponente verleiht, um die Zellmembran zu überwinden. Letztendlich exprimiert die Zelle nach DNA-Integration das entsprechende Protein (Varianten des GlyT2) (Felgner et al., 1987; Felgner and Ringold, 1989).

Pro *well* wurde zum einen 0,07 µl DNA (1 µg/µl) mit 25 µl Opti-MEM (Ansatz A), zum anderen 0,14 µl Lipofectamine2000 mit 25 µl Opti-MEM (Ansatz B) vermengt und für 5 min bei RT inkubiert. Es folgte die Vereinigung beider Ansätze (A + B) und die Inkubation für weitere 5 min. In der Inkubationszeit wurden 125 µl Medium pro *well* von den Zellen abgenommen und danach 50 µl des Transfektionsansatzes in jedes *well* pipettiert.

Die Co-Transfektion von GlyT2-Mutante und GlyT2-Wildtyp erfolgte im Verhältnis 1:1 und 1:10. Die gesamte DNA-Menge zur Lipofectamine2000-Menge ergab demnach bei der Co-Transfektion ein 1:1 Verhältnis.

Nach 48 h Inkubation im Brutschrank wurden die transfizierten Zellen für den [³H]-Glycin-Bindungstest verwendet. Das Pipettierschema pro *well* ist in Tabelle 30 gezeigt.

Tabelle 30 Transfektionsansätze von HEK293 Zellen mit Lipofectamine2000

	Ansatz A		Ansatz B	
96-well	Plasmid-DNA (µg/µl)	0,07 µl	Lipofectamine2000	0,14 µl
Platte	Opti-MEM	25 µl	Opti-MEM	25 µl

2.6.5 Transfektion von HEK293 Zellen mittels Calciumphosphatpräzipitation

24 h nach dem Aussetzen der HEK293 Zellen wurden die Zellen mittels Calciumphosphatpräzipitation nach modifiziertem Protokoll von Chen und Okayama transfiziert (Chen and Okayama, 1987). Ziel dieser Methode ist, dass die DNA-Calciumphosphatpräzipitate von der Zelle aufgenommen werden und durch die eingeschleuste Plasmid-DNA das entsprechende Protein effizient exprimiert wird.

Nachdem die DNA, 0,1x TE-Puffer und 2,5 M CaCl₂ gemischt wurden, erfolgte die Zugabe von 2x HBS-Puffer tropfenweise (Tabelle 31). Nach 20 min Inkubation bei RT haben sich ausreichend DNA-Calciumphosphatpräzipitate gebildet und konnten vorsichtig auf die Zellen gegeben werden. 5 h nach der Transfektion wurden die Zellen einmal mit MEM gewaschen und frisches Medium hinzugegeben. Es folgte die Inkubation für 48 h im Inkubator.

Die Co-Transfektion von Plasmid-DNA der GlyT2-Varianten und der PM-Marker bzw. ER-Marker wurde in einem 2:1 Verhältnis zugunsten der GlyT2-Variante durchgeführt.

Tabelle 31 Pipettierschema für Transfektion mittels Calciumphosphatpräzipitation

Lösung/Reagenz	3 cm Schalen	10 cm Schalen
Plasmid-DNA (µg/µl)	1 µl	10 µl
0,1x TE-Puffer pH 7,4	89 µl	440 µl
2,5 M CaCl ₂	10 µl	50 µl
2x HBS-Puffer	100 µl	500 µl

2.6.6 Transfektion von COS7 Zellen mit DEAE-Dextran

COS7 Zellen wurden mit Hilfe von DEAE-Dextran 24 h nach dem Aussetzen transfiziert. DEAE ist ein kationisches Polymer, welches dem Zuckermolekül Dextran eine positive Ladung verleiht (Lieber et al., 1987; Holter et al., 1989). Dies wiederum ermöglicht die Bindung zu den negativen Phosphatgruppen der DNA und somit die endozytotische Aufnahme der

DNA-Zuckermoleküle in die Zelle (Ryser, 1967; Yang and Yang, 1997). Der Transfektionsansatz (Tabelle 32) wurde nach dem Mischen direkt auf die Zellen tropfenweise gegeben. Nach 30-minütiger Inkubationszeit im Brutschrank wurde das Medium von den Zellen abgenommen und durch DMEM + Chloroquin ersetzt. Chloroquin erhöht die Transfektionseffizienz von COS7 Zellen, da es den pH-Wert im Vesikel neutralisiert und somit die lysosomalen DNasen hemmt (Luthman and Magnusson, 1983). Nach 3 h Inkubation mit Chloroquin wurde das Medium abgesaugt und frisches DMEM hinzugefügt.

Die Co-Transfektion von Plasmid-DNA der GlyT2-Varianten und der PM-Marker bzw. ER-Marker erfolgte im Verhältnis 1:1.

Nach 48 h Inkubation im Brutschrank wurden die transfizierten COS7 Zellen geerntet und für immunzytochemische Färbungen verwendet.

Tabelle 32 Pipettierschema für Transfektion von COS7 Zellen mit DEAE-Dextran

Lösung/Reagenz	3 cm Schale
Plasmid-DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1 μl
DPBS	30 μl
DEAE-Dextran	62 μl
DMEM + Chloroquin	3 ml + 12 μl

2.7 Methoden der Molekularbiologie

Unter molekularbiologischen Techniken versteht man im Allgemeinen das Arbeiten mit Nukleinsäuren. Dazu gehören die Erforschung bzw. Manipulation von Genen, DNA und RNA. Die genetische Information wird in der DNA gespeichert und mit Hilfe von RNA in biologisch wirksame Proteine umgesetzt. Gen-Defekte können demnach zu Fehlern in der Peptidsequenz führen, die wiederum die Proteinfunktion beeinflussen können und sich in phänotypischen Merkmalen oder Erkrankungen äußern.

2.7.1 Isolation genomischer DNA (gDNA) aus Patientenvollblutproben

Mit Hilfe des DNA Blood Mini Kit der Firma Qiagen wurde gDNA aus antikoagulierten Patientenvollblutproben gewonnen. Die aufgereinigte DNA, frei von Proteinen, Nukleasen und anderen Kontaminationen oder Inhibitoren, war Voraussetzung für die folgenden PCRs.

Um an die Erbinformation im Zellkern heranzukommen, erfolgte im ersten Schritt die Zellyse. Dafür wurden 400 μ l antikoaguliertes humanes Vollblut mit 40 μ l Protease, sowie 8 μ l RNase A (100 mg/ml) vermenget. Anschließend wurden zum Verdau 400 μ l Lysepuffer AL pipettiert und für 15 s pulsierend gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 56 °C erreicht die Lyse ihr Maximum. 400 μ l Ethanol 100 % reinst wurden hinzugegeben und nochmals für 15 s pulsierend gevortext, um am Ende ein Gesamtvolumen von ca. 1300 μ l Blutlysate zu erhalten.

Dieses wurde in mehreren Schritten auf die Mini Spin-Säule geladen. Der Lysepuffer enthält chaotrope Salze und ermöglichte damit die Bindung der DNA an die Kieselsäure-Membran während kurzer Zentrifugation (1 min, 10 000 rpm). Proteine und andere Verunreinigungen wurden dagegen nicht zurückgehalten.

Restverunreinigungen wurden durch zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte mit zwei unterschiedlichen Waschpuffern, AW 1 und AW 2, komplett entfernt, ohne die DNA-Bindung zu beeinträchtigen. Um die letzten Ethanolreste zu entfernen, wurden die Säulen nochmals für 3 min bei 14 000 rpm trocken zentrifugiert. Der Durchlauf wurde nach jedem Zentrifugationsschritt verworfen.

Für die Elution der gDNA wurden 20 μ l Elutionspuffer AE (10 mM Tris Cl; 0,5 mM EDTA; pH 9,0) mittig auf die Membran gegeben und nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT für 1 min bei 10 000 rpm zentrifugiert. Die DNA wurde in einem neuen Gefäß aufgefangen. Um eine höhere Ausbeute zu erzielen, wurde das Eluat erneut auf die Säule gegeben, wieder 5 min bei RT inkubiert und nochmals 1 min bei 10 000 rpm zentrifugiert. Die aufgereinigte gDNA konnte direkt weiterverwendet oder bei 4 °C gelagert werden.

2.7.2 DNA Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der gDNA aus Vollblutproben sowie der Plasmid-DNA aus NEB5 α -Bakterien fand unter Verwendung des NanoDrop1000 statt. Der Messbereich des Spektrophotometers liegt zwischen 2 und 3700 ng/ μ l. Für die Messung waren lediglich 1 μ l-2 μ l jeder Probe nötig.

Vor der Konzentrationsbestimmung wurde das Spektrophotometer auf 0 ng/ μ l durch den Einsatz entsprechender Pufferlösungen geeicht. Beim Bluteluat wurde der Elutionspuffer AE

verwendet. Für die Plasmid-DNA-Konzentrationsbestimmung nach der DNA-Minipräparation diente der TE-Puffer pH 8 als Referenz.

2.7.3 Primerdesign

Primer sind Oligonukleotide, die komplementär zu einer DNA-Zielsequenz sind. Ihre Aufgaben sind die Amplifikation einer *Template*-DNA sowie die Einführung bestimmter Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme.

Für die Herstellung der Mutageneseprimer (Tabelle 5) wurden bestimmte Basen ausgetauscht, sodass der modifizierte Primer die gewünschte Punktmutation in der Mitte der Oligonukleotidsequenz trug. Damit die PCR-Produkte später in der *Overlap Extension* PCR im mutierten Bereich überlappten, wurden zwei zueinander komplementäre Primer designt (*forward* und *reverse*). Ein Anhängen von Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme war in diesem Fall nicht nötig, da die Schnittstellen über die flankierenden Vektorprimer in der *Overlap Extension* PCR mit eingebaut wurden.

Für die Allelsequenzierung wurden den *forward* und *reverse* hGlyT2-Exon 8-Primern (Tabelle 6) Restriktionssequenzen für EcoRI und ClaI angehängt, damit durch die Restriktionsenzyme überhängende Fragmentenden („*sticky ends*“) generiert werden konnten. Gleichzeitig war im *forward* hGlyT2-Exon 8-Primer bereits eine PstI-Schnittstelle, die von der ClaI-Schnittstelle in der *multiple cloning site* des Vektors ausreichend entfernt lokalisiert war, was einen Doppelverdau von PstI-HF und ClaI möglich machte.

2.7.4 Analyse der *Annealing*-Temperatur

Die Bestimmung der *Annealing*-Temperatur für das jeweilige PCR-Programm wurde mit Hilfe des Rechenprogramms *OligoCalc*, einem online verfügbaren Oligonukleotidkalkulationsprogramm der Northwestern University (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>), errechnet. Für die Kalkulation der Schmelztemperatur (T_m) von Sequenzen mit einer Länge von mehr als 13 Nukleotidbasen diente folgende Gleichung:

$$\text{(Formel 1)} \quad T_m = 64,9 + 41 * (yG+zC-16,4)/(wA+xT+yG+zC).$$

Die *Annealing*-Temperatur hängt dabei hauptsächlich von der Basengesamtzahl sowie vom Guanin-Cytosin-Anteil des Oligonukleotidprimers ab. Da es sich bei den Rechenprogrammen lediglich um eine Kalkulation handelt, wurde die *Annealing*-Temperatur zusätzlich mit einer Gradienten PCR empirisch ermittelt.

2.7.5 Polymerase Kettenreaktion

Die Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion, abgekürzt PCR (engl. *polymerase chain reaction*), durch Kary B. Mullis war ein bedeutender Fortschritt in der genetischen Forschung (Mullis et al., 1986). Die Methode ermöglicht die Vervielfältigung der DNA *in vitro* ohne den Einsatz von Mikroorganismen und ist im Prinzip mit der Replikation vergleichbar. Mittels PCR können Nukleotidsequenzen von selbst kleinsten DNA-Fragmenten in kurzer Zeit isoliert und mit Hilfe von thermostabilen Polymerasen exponentiell vermehrt werden. Die Methode beruht auf zyklischer Abfolge von thermischer Denaturierung der DNA und DNA-Synthese.

Der Zyklus startete mit einem Denaturierungsschritt, wobei die *Template*-DNA auf 94 °C für ca. 1 min erhitzt wurde, um die beiden DNA-Stränge voneinander zu trennen und die Polymerase zu aktivieren. Anschließend wurde im Anlagerungsschritt die Temperatur auf die *Annealing*-Temperatur von ca. 50 °C für 1 min gesenkt, damit sich die Primer an die einzelsträngige *Template*-DNA anlagern konnten. Danach wurde im Elongationsschritt für 1 min die Temperatur für die Zweitstrangsynthese auf das Arbeitsoptimum der Polymerase auf 72 °C erhöht. Nach 30–40 Zyklen erfolgte eine finale Elongation von 10 min bei 72 °C, um die Arbeit der Polymerase nicht vorzeitig abubrechen. Abschließend wurde die Reaktion auf 4 °C gekühlt. Vor dem Start des Zyklus, wurde eine initiale Denaturierung für 5 min bei 95 °C durchgeführt, die sicher stellte, dass alle DNA-Stränge aufgetrennt und die Polymerase aktiviert wurde. Das PCR-Programm ist in Tabelle 33 im Überblick zusammengefasst und wurde im T Professionell Gradient Thermocycler der Firma Biometra durchlaufen. Für die PCR wurde das Hot Star HiFidelity Polymerase Kit von Qiagen verwendet. Bei der Hot Star HiFidelity Polymerase (*Pyrococcus* Stamm) handelte es sich um ein thermostabiles Enzym mit 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, gewöhnlich auch als *proofreading*-Aktivität bezeichnet. Dieser Korrekturmechanismus erkennt und entfernt fehlerhaft eingebaute Desoxynukleotide.

Tabelle 33 PCR-Zyklus-Programm zum HotStar HiFidelity Polymerase Kit

	Zeit	Temperatur	Bemerkungen
Initiale Denaturierung	5 min	95 °C	HotStar HiFidelityDNA wird durch die Hitze aktiviert
3-Schritt Zyklus:			
Denaturierung	15 sec	94 °C	
<i>Annealing</i>	1 min		In Abhängigkeit von GC-/AT-Primergehalt
Elongation	1 min	72 °C	PCR-Produkte < 2kb benötigen eine Elongationszeit von 1 min pro kb DNA
Zyklusanzahl	30 - 40		In Abhängigkeit von der Menge an <i>Template</i> -DNA, der Enzymkonzentration und der zu erwartenden Länge der PCR-Produkte
Finale Elongation	10 min	72 °C	
Ende des PCR-Programms	unbegrenzt	4 °C	Generell wird ein Haltepunkt von 4 °C am Ende empfohlen

2.7.6 Herstellung eines GlyT2-Klons mit Mutation P429L (PCR-Mutagenese)

Ziel der Mutagenese ist die Einführung einer spezifisch veränderten DNA-Sequenz in einen Vektor, der die Transformation und somit die massenhafte Vermehrung dieser manipulierten DNA sowie die Transfektion in unterschiedliche Zelllinien ermöglicht. Bei den Vektoren handelt es sich in der Regel um Plasmide mit zirkulärer, doppelsträngiger DNA. In dieser Arbeit kamen für die Mutagenese hGlyT2-Wildtyp-Plasmide zum Einsatz. Dabei handelte es sich um pRK5-Vektoren. Das Insert hGlyT2 war zusätzlich am N-Terminus mit einem Myc-Epitop versehen. Dieses bot die Möglichkeit hGlyT2-Proteine über einen Myc-Antikörper nachzuweisen. Am Ende des Mutageneseverfahrens erhielt man einen mutierten Klon in einem stabilen Vektorgerüst, der sich für alle weiteren Experimente eignete.

2.7.6.1 Synthese zweier DNA-Ausgangsfragmente

Um die Modifikation P429L in die hGlyT2-DNA-Sequenz einzubauen, mussten zunächst insgesamt drei PCR-Reaktionen durchgeführt werden. Die ersten beiden PCRs wurden in getrennten Reaktionsansätzen (Tabelle 34) mit jeweils einem Mutageneseprimer und einem parentalen Primer durchgeführt. Während die Mutageneseprimer die gewünschte Mutation

trugen, enthielten die flankierenden parentalen Primer die Erkennungssequenz für die Restriktionsenzyme ClaI und HindIII. Diese Schnittstellen waren für die Integration des mutierten PCR-Produkts in den Expressionsvektor notwendig. Aus den zwei PCRs resultieren zwei neusynthetisierte DNA-Fragmente (Fragment I und II), deren Enden durch die parentalen und Mutageneseprimer bestimmt waren. Nachdem das PCR-Programm (Tabelle 33) mit einer *Annealing*-Temperatur von 56 °C durchlaufen war, wurde das resultierende PCR-Produkt gelelektrophoretisch nachgewiesen (2.7.8). Anschließend wurden die Fragmente für die darauffolgende *Overlap Extension* PCR aufgereinigt (2.7.10).

Tabelle 34 Reaktionsansätze für die Synthese zweier Ausgangsfragmente für *Overlap Extension* PCR

Komponente	Volumen (µl) pro Gefäß	2,5x Volumen	2,5x Volumen
5x HotStar HiFidelity	20 µl	50 µl	50 µl
PCR Puffer (enthält dNTPs)			
<i>forward</i> Primer (10 pmol/µl)	1 µl	2,5 µl # 366 hGlyT2_P429L_ <i>sense</i>	2,5 µl # 43 pRK5/pRK7_ <i>sense</i>
<i>reverse</i> Primer (10 pmol/µl)	1 µl	2,5 µl # 70 pRK5/pRK7_ <i>antisense</i>	2,5 µl # 367 hGlyT2_ P429L_ <i>antisense</i>
HotStar HiFidelity DNA Polymerase (2,5 units/µl)	1 µl	2,5 µl	2,5 µl
RNase-freies Wasser	76 µl	190 µl	190 µl
Template-DNA #464 myc_hGlyT2_pRK5 (100 ng/µl)	1 µl		
Gesamtvolumen	100 µl	2x (99 µl Ansatz + 1 µl Template-DNA)	2x (99 µl Ansatz + 1 µl Template-DNA)
		Rest: Negativkontrolle	Rest: Negativkontrolle

2.7.6.2 *Overlap Extension* PCR

Da die beiden Mutagenese-Primer komplementär zueinander waren, ergaben sich im Bereich der eingefügten Punktmutation überlappende DNA-Abschnitte in einer Länge von ca. 25 bp. Durch diese Überlappung konnten in einer dritten darauffolgenden PCR, der *Overlap Extension*

PCR, die Fragmente I und II zu einem Fragment ergänzt und auf die Länge des jeweils anderen Fragments zum Doppelstrang vervollständigt werden (Abbildung 6). Für die Vervielfältigung der überlappenden Fragmente wurde zuerst ein PCR-Programm bestehend aus drei Teilschritten durchlaufen: Denaturierung bei 95 °C, *Annealing* bei 50 °C und letztendlich Elongation bei 72 °C für jeweils 5 min. Nach diesen drei Vorzyklen haben sich Fragment I und II zu einem Fragment ergänzt. Ein 100 µl Reaktionsansatz setzte sich aus jeweils 3 µl Fragment I und II, 20 µl 5x HotStar HiFidelity PCR Puffer, 1 µl HotStar HiFidelity DNA Polymerase und 71 µl DNase und RNase freiem Wasser zusammen. Ab dem vierten Zyklus wurden die aufgefüllten Fragmente durch Zugabe zweier parentaler Primer, die an den Enden der Fragmente am 3'- und 5'-Ende hybridisierten, vervielfältigt. Hierfür wurden *forward* Primer ClaI (#43) und *reverse* Primer HindIII (#42) zu je 1 µl (100 pmol/µl) hinzugegeben. Letztendlich erhielt man ein DNA-Konstrukt, das die Mutation (CTG) und angrenzend die Restriktionsschnittstellen enthielt. Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 33 zusammengefasst und wurde mit einer *Annealing*-Temperatur von 50 °C durchgeführt.

Die Identifizierung und Überprüfung der *Overlap* DNA-Fragmente erfolgte gelelektrophoretisch (2.7.8). Die richtigen Banden wurden blind ausgeschnitten (2.7.9) und aus dem Gel eluiert (2.7.10).

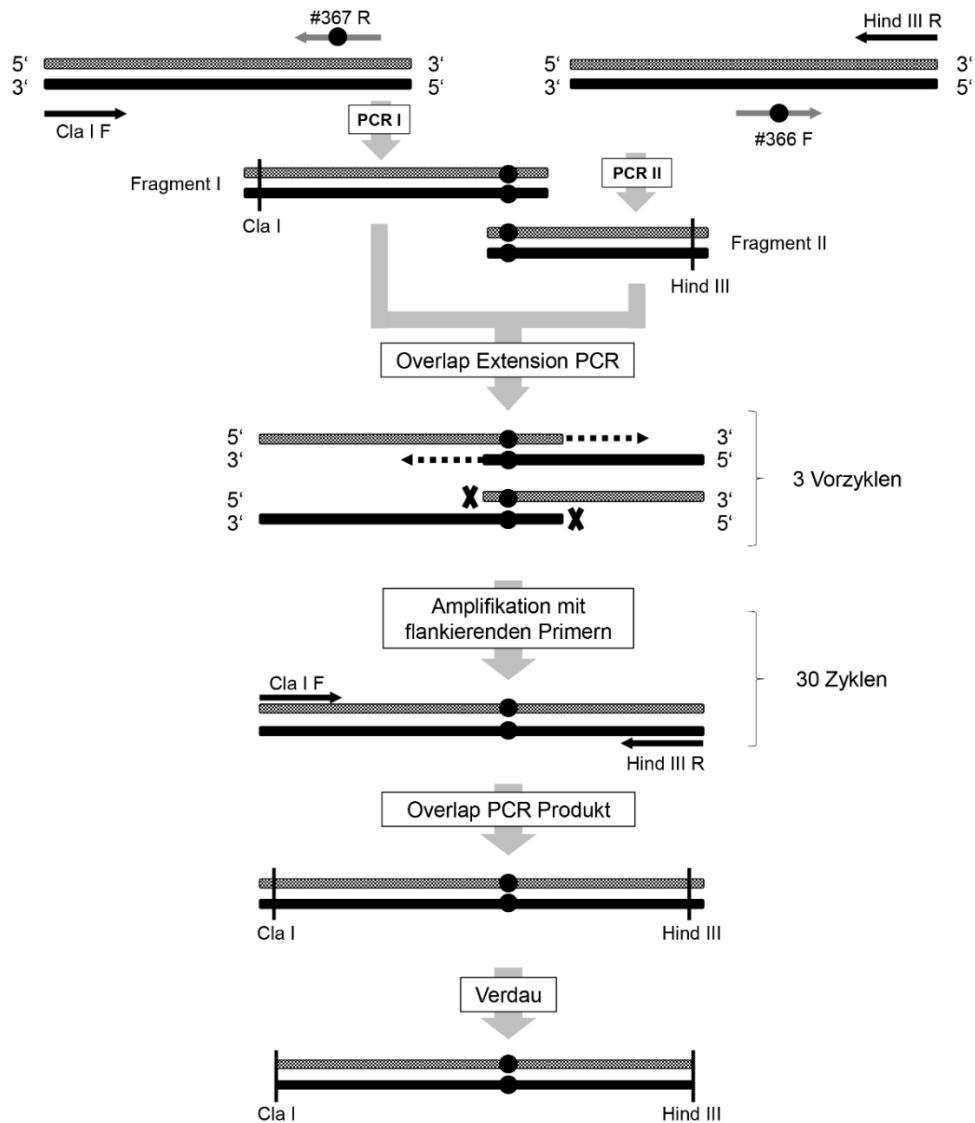


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Mutagenese nach der *Overlap Extension*-Methode („Verlängerung aufgrund von Überlappungssequenzen“)

In PCR I und PCR II wird die Mutation in die Ausgangsfragmente I und II eingebaut. In der 3. *Overlap Extension* PCR werden die Fragmente I und II im Überlappungsbereich zu einem DNA-Strang verknüpft. Dieser wird über Vektorprimer komplettiert und amplifiziert. Über die flankierenden parentalen Vektorprimer werden Ziel-Sequenzen für die Restriktionsenzyme eingebaut (ClaI, HindIII), die für die weitere Klonierung notwendig sind.

2.7.7 Allelsequenzierung

Ziel der Allelsequenzierung ist die Analyse der Verteilung der mutierten Allele auf die beiden Chromosomen für die Mutation in Exon 8 des hGlyT2-Gens jedes Familienmitglieds. Die Allelverteilung soll wiederum Aufschluss über den genetischen Erbgang sowie über das Risiko weiterer Nachkommen für die genetisch-bedingte Hyperekplexie-Erkrankung geben. Letztendlich lassen sich Vererbungsmuster der Mutation erkennen und Rückschlüsse vom Phänotyp auf den Genotyp ziehen.

Die Amplifikation des hGlyT2 Exon 8 DNA-Abschnitts aus gDNA erfolgte mittels PCR gemäß 2.7.5. Der Ablauf der Allelsequenzierung ist in Abbildung 7 gezeigt. Von jedem Familienmitglied wurden 10–12 amplifizierte Proben sequenziert. Die verwendeten Sequenzierprimer für das Exon 8 sind in der Tabelle 6 aufgelistet. Das Pipettierschema für ein Reaktionsvolumen von 100 µl ist der Tabelle 35 zu entnehmen. Alle Komponenten wurden in einem Prä-PCR-Raum unter einer Werkbank mit Absaugung und unter Verwendung von Filterspitzen zusammengegeben, um eine DNA-Verunreinigung zu verhindern.

Tabelle 35 Pipettierschema für HotStar HiFidelity-Mastermixansatz

Komponente	Volumen (µl) pro Gefäß	Endkonzentration
5x HotStar HiFidelity PCR Puffer (enthält dNTPs)	20 µl	1x
5x Q-Solution	20 µl	1x
<i>forward</i> Primer #423 (10 pmol/µl)	10 µl	1 µM
<i>reverse</i> Primer #425 (10 pmol/µl)	10 µl	1 µM
HotStar HiFidelity DNA Polymerase (2,5 units/µl)	2 µl	2,5 units
DNase und RNase freies Wasser	37–34 µl	-
Template-DNA (50–200 ng/µl)	1–4 µl	200 ng
Gesamtvolumen	100 µl	

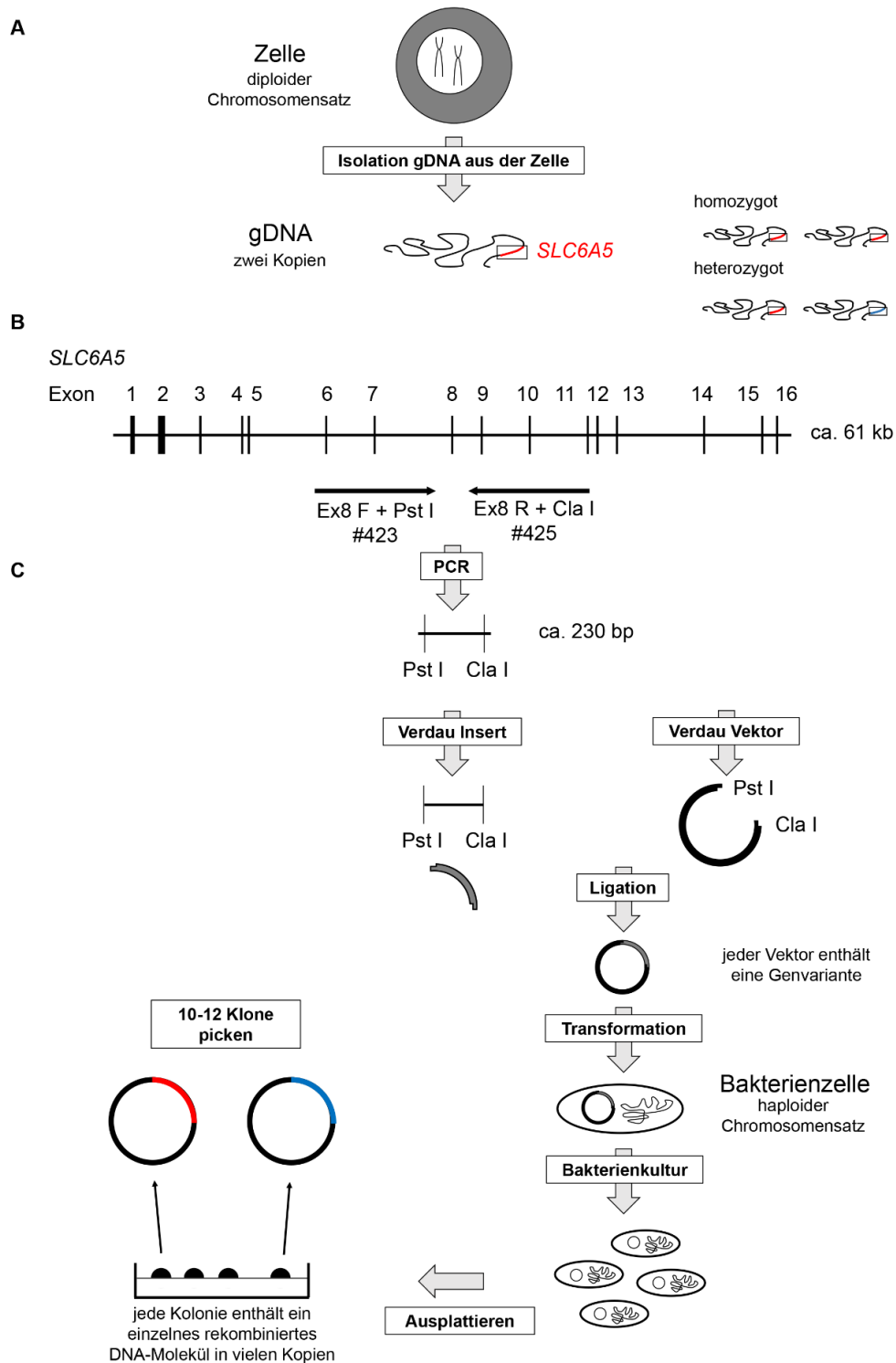


Abbildung 7 Schema zum Ablauf der Allelsequenzierung

(A) Isolation gDNA aus Vollblutproben. Aufgrund des diploiden Chromosomensatzes liegt das Gen (*SLC6A5*) in jeder Zelle doppelt vor. Dabei kann entweder immer nur eine Variante des Gens (homozygot, nur Variante rot) oder zwei verschiedene Allele an einem Genlocus eines homologen Chromosomenpaars vorhanden sein (heterozygot, Varianten rot und blau). (B) *SLC6A5*-Genabschnitt bestehend aus 16 Exonen. *Forward* und *reverse* Insertprimer mit angehängten Restriktionserkennungssequenzen PstI und ClaI (#423, #425) erlauben die Vervielfältigung des Exon 8. (C) PCR-Produkt (Insert) und Vektor werden jeweils mit PstI und ClaI verdaut, um für die Ligation komplementäre Enden zu generieren. Der Plasmidring kann immer nur eine Genvariante (rot oder blau)

aufnehmen, sodass letztendlich in jede Bakterienzelle nur ein Allel eingeschleust wird (Transformation). Ein Gen für Antibiotika-Resistenz erlaubt die selektive Vermehrung in einer ersten Kultur. Durch Ausplattieren der Bakterienkultur auf Agarplatten (Petrischalen) wird eine zweite Kultur angelegt. 10-12 Klone werden gepickt und sequenziert. Abschließend erfolgt die Auszählung der Allelvarianten.

2.7.8 Nachweis der PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode, DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe aufgrund der Siebstruktur der Agarose voneinander zu trennen und zu identifizieren. Große DNA-Fragmente durchlaufen das Agarosegel langsamer als kleine, denn je größer das DNA-Fragment, desto mehr Widerstand bieten die Poren des Agarosegels den Fragmenten.

Für ein 1 % Agarosegel wurden 1,5 g Agarose in 150 ml TBE-Puffer in einer Mikrowelle unter gelegentlichem Schwenken erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Zum Visualisieren der DNA-Fragmente im Agarosegel wurden 8 µl des DNA-Farbstoffs MidoriGreen in die auf ca. 60 °C abgekühlte Lösung gegeben und mit Hilfe eines Gelschlittens und eines Kamms ein Gel mit Ladetaschen gegossen. Sobald das Agarosegel nach ca. 30 min erstarrte, wurde es in die Elektrophorese-Kammer gelegt, mit TBE-Puffer vollständig bedeckt und die DNA-Probeflösungen in die Ladetaschen pipettiert. Durch die Zugabe des Probenpuffers zum PCR-Produkt kann zum einen die DNA während des Gellaufens besser verfolgt werden und zum anderen das PCR-Produkt eine höhere Dichte als der Elektrophoresepuffer erreichen mit dem Vorteil, dass die Probe sanft in die Tasche sinkt. Als Referenz der Bandengröße diente der Marker pRK7/Hinfl, dessen Fragmentgrößen bekannt waren. Nachdem die Gelelektrophorese für 40 min bei einer Spannung von 130 V gelaufen war, wurde die Fluoreszenz von MidoriGreen durch UV-Licht angeregt und somit die DNA-Banden detektiert und fotografisch protokolliert.

2.7.9 Blindes Ausschneiden von Fragmenten zur Verbesserung der

Ligationseffizienz

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde gezielt die korrekte DNA-Bande aus dem Gelbandenmuster ausgeschnitten, um PCR-Nebenprodukte zu entfernen und fehlerhafte Sequenzierungsergebnisse zu verhindern. Dafür mussten 1 % Agarosegele mit doppelt so großem Ladetaschenvolumen gegossen werden, um das komplette Restvolumen an PCR-Produkt auf zwei Ladetaschen gleichmäßig verteilen zu können. Somit erhielt man pro Probe zwei nebeneinanderliegende Banden. Eine Bande wurde unter UV-Licht

(Referenzbande, diente als Schnittschablone) und die andere blind (Probenbande) ausgeschnitten. Grund für das blinde Ausschneiden ist, dass DNA sehr empfindlich auf UV-Licht reagiert und es zu DNA-Manipulationen (Strangbrüche, Depurinierungen, Mutationen) kommen kann. Anschließend wurden die ausgestanzten Gel-Banden einzeln in 1,5 ml Gefäße überführt und die jeweiligen Gelmassen bestimmt, indem das Gewicht der 1,5 ml Gefäße vom Gesamtgewicht subtrahiert wurde.

2.7.10 Aufreinigung von DNA-Fragmenten und DNA-Gelextraktion

Für die Gel-Extraktion wurde das NucleoSpin Gel and PCR Cleanup Kit von Macherey-Nagel benutzt. Neben der spezifischen DNA-Gewinnung diente die Aufreinigung gleichzeitig der Entfernung von überschüssigen Primern, Puffersubstanzen, der entstandenen Nebenprodukte sowie der PCR-Enzyme, die einen Restriktionsverdau oder eine Ligation negativ beeinflussen würden. Die angewandte Methode beruht auf der Bindung der DNA an eine Silikatmembran in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze (Guanidinisothiocyanat), die für die Denaturierung der DNA-Hydrathülle verantwortlich und für die Membranbindung notwendig sind.

Je Probenvolumen wurde die doppelte Menge Bindungspuffer NTI eingesetzt. Speziell für die Gelextraktion wurden pro 100 mg Gel 200 µl NTI Puffer zum jeweiligen gelgebundenen DNA-Fragment hinzugegeben. Anschließend wurden die Gelstücke bei 50 °C erhitzt und alle 3 min kurz gevortext bis sich nach 10 min die Agarose komplett aufgelöst hat. Nachdem die Proben auf die NucleoSpin-Säulen geladen und zentrifugiert wurden, konnte die DNA an die Silikatmembran binden. Alle Zentrifugationsschritte fanden bei 11 000 x g für 1 min statt. Der anfallende Durchfluss wurde jeweils im Sammelgefäß aufgefangen und verworfen. Um die Membran von den Salzen wieder zu befreien, erfolgte die Zugabe von 700 µl NT3 Waschpuffer und es wurde zentrifugiert. Damit keine reaktionshemmende Ethanolreste vom NT3 Puffer zurückblieben, wurde die Membran trocken zentrifugiert. Abschließend wurde die DNA nach einer Inkubationszeit von 1 min in 15 µl NE Puffer eluiert. Um die DNA-Ausbeute von DNA-Fragmenten mit Größen von über 1000 bp zu erhöhen, wie es bei den Vektoren (~4700 bp) der Fall war, wurde der NE Puffer vor der Applikation auf die Silikatmembran auf 70 °C erhitzt und die Inkubationszeit auf 5 min verlängert. Das Vorhandensein der DNA-Fragmente im Eluat wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft (2.7.8).

2.7.11 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonukleasen, die spezifische DNA-Zielsequenzen in der DNA-Doppelhelix erkennen und schneiden. Diese Eigenschaften nutzen Bakterien zur Abwehr von Bakteriophagen, indem sie spezifische Methylierungsmuster bakterieneigener DNA von fremder DNA unterscheiden können. In der Molekularbiologie wird diese Fähigkeit für die gezielte Klonierung bestimmter DNA-Fragmente genutzt. Als Beispiel sind in Abbildung 8 derartige Enzyme aufgeführt. Restriktionsenzyme erzeugen am PCR-Produkt, dem Insert, und an der Vektor-DNA komplementäre Überhänge („*sticky ends*“), die für die Ligation (2.7.12) notwendig waren. Die aus der Minipräparation (2.7.16) gewonnene Plasmid-DNA wurde zusätzlich einem Kontrollverdau unterworfen. Dieser diente der Überprüfung der Schnittstellen und kontrollierte die Größe des eingebauten Inserts in das Vektorgerüst. Da die verwendeten Restriktionsenzyme jeweils eine Aktivität von 100 % im CutSmart Puffer aufwiesen und deren Restriktionsschnittstellen in der *multiple cloning site* des Vektors ausreichend entfernt voneinander lagen, war ein gleichzeitiger Verdau beider Enzyme (Doppelverdau) problemlos.

Pro μg DNA wurden 2–5 Units Enzym eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei einer optimalen Enzymarbeitstemperatur von 37 °C. Nach der Aufreinigung der Ansätze mit dem NucleoSpin Gel and PCR Cleanup Kit von Macherey-Nagel folgte die Gelelektrophorese-Analyse (2.7.8).

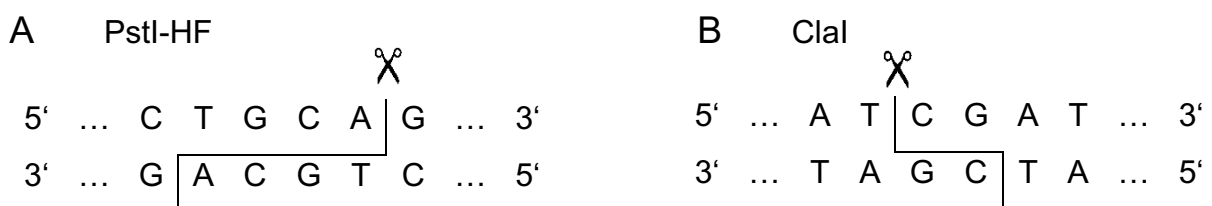


Abbildung 8 Restriktionsenzyme, die *sticky ends* erzeugen am Beispiel von PstI-HF und ClaI
Erkennungssequenzen beider Restriktionsenzyme sind dargestellt. Restriktionsschnittstellen sind durch durchgezogene Linien gekennzeichnet. Es entstehen DNA-Stränge mit unterschiedlicher Länge. (A) PstI-HF generiert einen 3'-Überhang, während (B) ClaI einen 5'-Überhang erzeugt.

2.7.12 Ligation

Die Ligation diente dem Einbau der Passagier-DNA bzw. des Insertfragments in ein Vektorgerüst, um die Transformation in Bakterien über die Ausbildung eines Plasmidrings zu ermöglichen. T4 DNA-Ligase, vom Genom des Phagen T4, katalysierte die Verknüpfung über

Phosphorsäurediesterbindungen zwischen der 3'OH- und 5'-Phosphatenden beider Fragmente. Fehlte dagegen das Insert-Fragment im Ligationsansatz (Negativkontrolle), bildeten sich üblicherweise keine doppelsträngige DNA-Ringstrukturen (Plasmid) und eine Transformation blieb ohne Erfolg. So konnten auf den selektiven Ampicillin-Agarplatten lediglich Bakterienkolonien mit erfolgreicher Insertintegration kultiviert werden. Das Verhältnis zwischen der Kolonieanzahl von Vektor mit Insert nach Ligation und der Kolonieanzahl von Vektor ohne Insert (Kontrollplatte) nach Ligation ließ die Anzahl der Einzelkolonien mit korrekt ligierten Plasmiden abschätzen. Je höher die Anzahl der Kolonien nach Ligation von Vektor mit Insert im Vergleich zur Vektorkontrolle (Stimulation), desto höher die Qualität der Klonierung.

Für einen Ligationsansatz von 10 µl wurden 0,5 µl verdauter Vektor, 7,5 µl verdautes DNA-Fragment, sowie 1 µl T4 DNA-Ligase Puffer 10x und 1 µl T4 DNA-Ligase gemischt. Der Negativkontrolle wurde anstatt verdaulichem Insert-Fragment 7,5 µl RNase und DNase freies Wasser zugeführt. Das 1:15 Vektor:Insert Verhältnis wurde zugunsten des Inserts gewählt, aufgrund der hohen Konzentration des Vektors im Vergleich zum Insert, und um die Wahrscheinlichkeit der Insertintegration in das Vektorgerüst zu erhöhen, indem man den Vektor mit Insertfragment sättigte. Ligiert wurde über Nacht bei einer Temperatur von 4 °C.

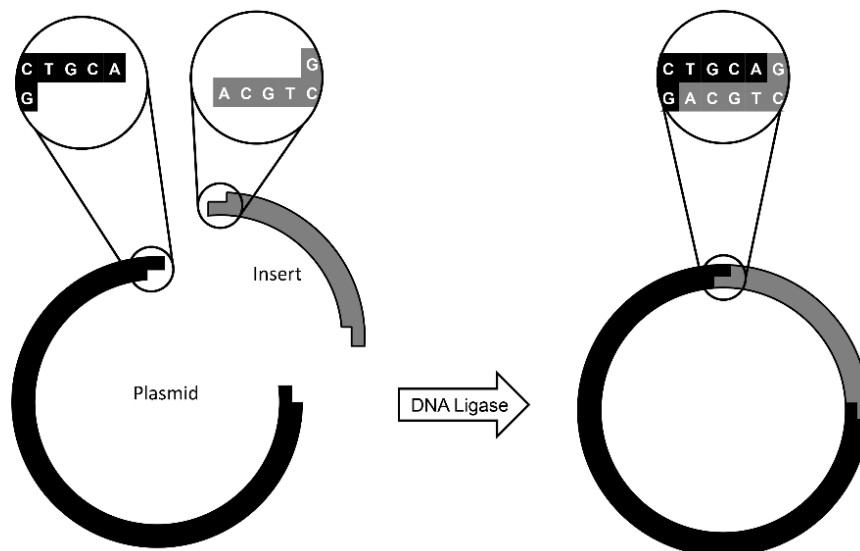


Abbildung 9 Schematische Darstellung der Verknüpfung von Vektor-/Plasmid- und Insertfragment

Die Ligation ist auf Sequenzebene der PstI-HF Restriktionsstelle beispielhaft dargestellt. Nach erfolgreichem Restriktionsverdau von Vektor und Insert mit PstI-HF und ClaI wurden kongruente Überhänge („sticky ends“) generiert und mittels T4 DNA-Ligase kovalent verknüpft. Die Verwendung zweier unterschiedlicher Restriktionsenzyme für jeweils beide Enden von Insert- und Vektor-DNA garantiert, dass das Insert in nur einer Richtung in den Vektor ligiert werden kann.

2.7.13 Transformation

Die Transformation ist ein Prozess, bei dem Bakterien Fremd-DNA aus ihrer Umgebung aufnehmen (Kompetenz) und kultiviert werden, um die zu transformierende Plasmid-DNA in ausreichender Menge zu replizieren. Als kompetente Zellen wurden die chemisch kompetenten NEB 5-alpha *E. coli*-Zellen, Derivate des DH5α *E. coli*-Bakterienstamms von Douglas Hanahan, verwendet.

5 µl des Ligationsansatzes wurden mit 50 µl kompetenten Zellen, nachdem sie auf Eis aufgetaut waren, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein kurzer Hitzeschock der Bakterien bei 42 °C für 30 s, wodurch Poren in der Bakterienmembran entstehen. Die zuvor an der Zelloberfläche angelagerte Plasmid-DNA soll durch die entstandenen Poren in die Wirtszelle aufgenommen werden. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien nochmals für 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden zur Regeneration der Bakterien jeweils 950 µl auf RT vorgewärmtes SOC-Medium zu den Zellen hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C bei 300 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurden die Bakterien auf selektiven Nährböden, 2xYT-Ampicillin-Agarplatten, ausplattiert. Durch ein Gen für Antibiotika-Resistenz im Vektor konnte kontrolliert werden, ob die Passagier-DNA tatsächlich in die Bakterienzelle eingeschleust wurde. Jeweils 200 µl und 100 µl des DNA-Bakterienzellgemischs wurden mit einem Drigalskispatel gründlich auf dem Nährboden verteilt und über Nacht bei 37 °C im Brutschank inkubiert. Nach erfolgreicher Koloniebildung wurden am Folgetag für jeweils 10–12 gepickte Klone die DNA-Minipräparation angeimpft und die Kolonie PCR durchgeführt.

2.7.14 Herstellung von Ampicillin-Agarplatten

Für die Herstellung der 2xYT-Ampicillin-Agarplatten wurden 2xYT-Medium mit Agar gemischt (Tabelle 18), auf 500 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und anschließend autoklaviert. Sobald die Lösung auf ca. 50 °C abgekühlt war, wurde Ampicillin (100 mg/ml) im Verhältnis 1:500 hinzugefügt. Zuletzt wurde das Medium unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegossen und getrocknet. Die Lagerung war bei 4 °C und luftdicht für mehrere Wochen möglich. Vor dem Ausplattieren wurden die Platten auf 37 °C vorgewärmt.

2.7.15 Kolonie PCR

Sinn der Kolonie PCR ist die schnelle Überprüfung der Einzelkolonien auf Insertintegration in den Plasmidring. Der dafür verwendete GoTaq G2 Green Master Mix ist eine vorgemischte, gebrauchsfertige Lösung, die GoTaq G2 DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl₂ und Reaktionspuffer in optimaler Konzentration enthält. Reaktionen mit GoTaq G2 Green Master Mix können auf Agarosegele direkt beladen werden, da sie eine ausreichende Dichte haben. Die GoTaq G2 DNA-Polymerase wurde aus dem hitzestabilen Bakterienstamm *Thermus aquaticus* isoliert und weist keine *proofreading* Aktivität auf. Darauf konnte verzichtet werden, da die Kolonie PCR keinen Aufschluss über die Qualität des Inserts oder die Übergänge zwischen Vektor und Insert gibt. Es entsteht lediglich ein PCR-Produkt definierter Länge. Aufgrund der Primerwahl von einem *forward* Vektor- und einem *reverse* Insert-Primer muss bei richtiger Orientierung des Inserts relativ zum Vektorgerüst das Kolonie PCR-Produkt größer als das reine Insertfragment sein.

Für die Kolonie PCR und Plasmid Präparation wurden jeweils 10–12 Kolonien gepickt. Jede Kolonie wurde mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte abgenommen und in 20 µl des GoTaq Green Master Mix-Ansatzes als *Template*-DNA für die Kolonie PCR durch kurzes Auf- und Abpipettieren überführt. Abschließend wurde die Spitze in ein Bakterienröhrchen gefüllt mit 4 ml 2xYT-Medium und Ampicillin (1:500) abgeworfen. Diese zweite Kultur wurde für die Plasmidpräparation angeimpft und inkubierte über Nacht bei 37 °C und 180 rpm. Das PCR-Pipettierschema ist der Tabelle 36 zu entnehmen. Sobald das PCR-Programm (Tabelle 37) durchlaufen war, wurden die positiven Klone über Agarosegelelektrophorese (2.7.8) identifiziert. Eine Verunreinigung der Master Mix-Komponenten konnte durch eine Negativkontrolle (reiner Master Mix-Ansatz ohne *Template*-DNA) gelelektrophoretisch ausgeschlossen werden.

Tabelle 36 Mastermix GoTaq G2 für Kolonie PCR

Komponente	Volumen (µl) pro Gefäß	Endkonzentration
2x GoTaq® G2 Green Master Mix	10 µl	1 x
#43 <i>forward</i> Vektor-Primer, 10 pmol	0,4 µl	0,1–1 µM
#425 <i>reverse</i> Insert-Primer, 10 pmol	0,4 µl	0,1–1 µM
DNase und RNase freies Wasser	9,2 µl	N.A.
Reaktionsvolumen	20 µl	

Tabelle 37 PCR-Programm für Kolonie PCR mit GoTaq G2 Green Master Mix

	Zeit	Temperatur
Initiale Denaturierung	5 min	95 °C
3-Schritt Zyklus:		
Denaturierung	1 min	50,6 °C
<i>Annealing</i>	1 min	56 °C
Elongation	1 min	72 °C
Zyklusanzahl	30	
Finale Elongation	10 min	72 °C
Ende des PCR-Programms	unbegrenzt	4 °C

2.7.16 Präparation von Plasmid-DNA (Minipräparation)

Jede einzelne Bakterienkolonie wurde in 4 ml 2xYT-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (Ampicillin 1:500) überführt und über Nacht bei einer Temperatur von 37 °C im Inkubator bei 180 rpm geschüttelt. Nach ca. 20 h war eine erfolgreiche Kultivierung der NEB5 α Bakterien angesichts der Trübung des 2xYT-Mediums erkennbar. Für die Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde die Methode der Minipräparation mittels alkalischer Lyse durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde das Pellet von 3 ml der jeweiligen Bakterienkultur in 200 μ l kaltem Puffer P1 (50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris HCl; pH 8) und 4 μ l RNase A (10 mg/ml) durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und im Anschluss für 5 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde die bakterielle Zellmembran durch die Zugabe von 400 μ l alkalischem Puffer P2 (200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS) zerstört und nach vorsichtigem Mischen für 5 min auf Eis inkubiert. Das entstandene Bakterienlysat war an der leicht schleimigen, Fäden-ziehenden Konsistenz erkennbar. Danach wurden zum Lysat 300 μ l Puffer P3 (3 M Kaliumacetat; 11,5 % (w/v) Essigsäure) zur Neutralisierung hinzugegeben, es wurde nochmals vorsichtig gemischt und die Reaktionsgefäße wiederum für 5 min auf Eis gestellt. Dabei wurde die Flüssigkeit wieder klar und es bildeten sich Flocken von Kalium-SDS. Durch die nachfolgende Zentrifugation bei 4 °C und ca. 15 000 rpm entledigte man sich neben diesen SDS-Flocken größtenteils der bakteriellen Proteine und Membranen sowie der bakteriellen chromosomalen DNA. Während diese aufgrund ihrer Größe, Struktur und Verankerung gemeinsam mit den Zellresten abzentrifugiert wurden, blieben die kleineren und freieren Plasmid-Moleküle im Überstand. Von diesem Überstand wurden 800 μ l in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt und die DNA mit 800 μ l Isopropanol gefällt. Anschließend wurde

vorsichtig gemischt, für 5 min bei RT inkubiert und bei 13 000 rpm für 5 min zentrifugiert sowie der Überstand abgesaugt. Das DNA-Pellet wurde mit 300 µl 70 % Ethanollösung gewaschen, für 3 min wieder abzentrifugiert und nach Abpipettieren des Ethanolüberstands für ca. 15 min bei 37 °C auf dem Heizblock getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl TE-Puffer pH 8 aufgenommen und 3 µl für den Kontrollverdau entnommen. Der Rest an DNA wurde bei -20 °C gelagert. Die Zusammensetzungen der einzelnen Puffer sind im Überblick der Tabelle 20 zu entnehmen.

2.7.17 DNA-Sequenzierung

Zur Bestimmung der Nukleotidsequenz diente das Kettenabbruch- bzw. Didesoxyverfahren nach Sanger und Coulson (Sanger et al., 1977). Die Methode beruht auf dem Einbau von 2'-3'-Didesoxynukleotiden (ddNTPs). Die fehlende 3'-Hydroxylgruppe an der Desoxyribose führt zum Abbruch der Polymerisationsreaktion, da eine Veresterung des DNA-Rückgrats nicht mehr möglich ist. Voraussetzung des Verfahrens sind einzelsträngige DNA-Moleküle, die als Matrize zur Synthese eines komplementären zweiten Stranges dienen. Je nachdem, ob die Polymerase die übliche Desoxy- oder die Didesoxyvariante einbaut, entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die immer mit ddNTPs enden. Dabei erfolgt der Kettenabbruch an jedem Nukleotid mit gleicher Wahrscheinlichkeit. Mittels unterschiedlicher Farbmarkierung der vier ddNTPs kann aus dem Bandenmuster nach gelelektrophoretischer Fraktionierung die DNA-Sequenz abgeleitet werden.

Die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) übernahm die Sequenzierung der einzelnen Plasmid-DNA-Proben für die Allelanalyse sowie zur Kontrolle der erfolgreichen Mutagenese. Jede Probe wurde nach Herstellerangaben in der empfohlenen Konzentration und Volumen vorbereitet. Pro Sequenzierung waren 100 ng/µl Plasmid-DNA in einem Endvolumen von 15 µl notwendig. Für die Allelsequenzierung wurden 10–12 Klone pro individueller Probe eingeschickt. Pro Sequenzierungsprobe war ein Primervolumen (*forward* Vektorprimer #43, Tabelle 7) von 15 µl für jede erste, sowie 5 µl für jede weitere Sequenzierung nötig. Somit wurden die Vektorprimer in einem separaten Reaktionsgefäß auf eine Konzentration von 10 pmol/µl mit RNase und DNase freiem Wasser verdünnt. Dabei empfiehlt Eurofins Genomics für erfolgreiche Sequenzierungsergebnisse folgende Primerkonditionen: Ein optimaler Primer hat eine Länge von 16–25 Basen mit einem GC-Gehalt von 35–60 % und einer Schmelztemperatur (T_m) zwischen 50–62 °C. Zudem sollte ein Primer keine

Phosphorylierungen oder Fluoreszenzfarbstoffe enthalten. Idealerweise ist am 3'-Primerende ein G oder C lokalisiert, wobei die Anzahl der 3' Nukleotide G oder C maximal zwei sein sollten. Nach Möglichkeit sollten mehr als drei aufeinanderfolgende identische Basen vermieden werden.

2.8 Methoden der Proteinbiochemie

2.8.1 Herstellung von Zelllysaten der HEK293 Zellen

Zur Analyse der Proteinexpression in der gesamten Zelle dienen die Zelllysate. Deren Herstellung erfolgte 48 h nach Transfektion der GlyT2-Varianten in HEK293 Zellen unter Verwendung des Proteinextraktionsreagenz CytoBuster. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die transfizierten Zellen einmal mit PBS pH 7,4 gewaschen. Anschließend wurden 500 µl CytoBuster pro 10 cm Schale auf die Zellen gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Um eine maximale Ausbeute an Zellextrakt zu erhalten, wurden die Zellen mit einem Schaber abgekratzt und im Proteinextraktionsreagenz gesammelt. Nach der Zentrifugation von 5 min bei 4 °C und 16 000 x g konnte der Überstand mit dem enthaltenden Zellextrakt gewonnen und direkt für die Versuche verwendet werden. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.8.2 Quantifizierung von Proteinen nach Bradford

Bradford Protein *Assay* ist eine Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösung, die auf der Bindung des Coomassie-Brillantblau G250 Farbstoffs an Protein beruht. Dabei liegt unter sauren Bedingungen überwiegend die kationische rote Form ($A_{\max} = 470 \text{ nm}$) vor. Bindet der Farbstoff jedoch an Protein, wird dieser in die unprotonierte blaue Form ($A_{\max} = 595 \text{ nm}$) umgewandelt (Reisner et al., 1975). In Gegenwart von Proteinen verschiebt sich somit das Absorptionsmaximum proportional zur Menge an gebundenem Farbstoff von 470 nm in saurem Milieu nach 595 nm. Diese Verschiebung kann unter Verwendung eines Photometers nachgewiesen und anschließend anhand einer Referenzkurve die Proteinkonzentration in einer Probe bestimmt werden.

Der Proteinstandard wurde mit Konzentrationen von 1; 2,5; 5; 10; 15 und 25 µg/ml BSA angesetzt und diente der Kalibrierung des Photometers bzw. zur Aufzeichnung der Referenzkurve vor den Messungen. Für die Messung wurde jeweils 1 µl der Proteinprobe mit 1 ml BioRad-Reagenz in einer Küvette (10x4x45 mm) gemischt und für 5 min bei RT inkubiert.

2.8.3 Expressionsanalyse mittels SDS-Page und Western Blot

2.8.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page; engl.: *sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ist eine Methode zur Trennung von geladenen Proteinen gemäß ihrer Größe im elektrischen Feld (Zewert and Harrington, 1993).

Für die Gelelektrophorese wurde das bekannteste Verfahren, das diskontinuierliche Lämmli-System mit Tris-Glycin-Puffern verwendet (Laemmli, 1970). Die PAA-Gele dienten analog zu den Agarosegelen als gröbenselektierendes Sieb, deren Porengröße von der Polyacrylamid-Konzentration sowie dem Vernetzungsgrad durch Bisacrylamid abhängt. Da der hGlyT2 in zwei Proteingrößen von 90–110 kDa vorkommt, wurden Trenngele mit 9 % PAA-Gehalt gegossen.

Für die Herstellung der diskontinuierlichen PAA-Gele wurde zuerst das Trenngel gegossen und direkt danach mit Isopropanol überschichtet, um die Bildung einer Sauerstoffinhibitionsschicht, die mit einer unvollständigen Polymerisation des Gels einhergeht, zu unterbinden. Nach ca. 30 min Polymerisationszeit konnte letztendlich das Sammelgel mit Kamm für die Ladetaschen auf das auspolymerisierte Trenngel gegeben werden. Einen Überblick über die Zusammensetzung des diskontinuierlichen 9 % PAA-Gels gibt Tabelle 23. Die verwendeten Lösungen und Reagenzien sind Tabelle 22 zu entnehmen. Gegossene Gele wurden in die Kammer gesetzt und SDS-Laufpuffer zugegeben. Eine Lagerung der Gele war für mehrere Wochen bei 4 °C in feuchter Umgebung möglich.

Bevor die Zellysate auf ein PAA-Gel aufgetragen werden konnten, mussten die Proteinproben mit β -Mercaptoethanol-Probenpuffer für 30 min bei 30 °C inkubiert werden, um die Proteine zu solubilisieren. Dabei denaturierte SDS die Proteine, vor allem nach Reduktion der Disulfidbrücken zwischen Cysteinen mittels β -Mercaptoethanol. Auf diese Weise konnten Wechselwirkungen, die an der Proteinaggregation beteiligt waren, unterbunden werden. Zusätzlich führte die Negativladung des SDS zu einer Maskierung der Eigenladung der Proteine, sodass für die Auftrennung des Proteingemischs im elektrischen Feld lediglich die Proteingröße bestimmend war. Letztendlich entstanden nach dieser Probenvorbereitung entfaltete, linearisierte, negativ geladene SDS-Protein-Komplexe, die als Antwort auf ein angelegtes elektrisches Feld zum Pluspol wanderten. Dabei bewegten sich kleinere Proteine schneller durch die Porenstruktur des Gels als größere Proteine.

Die erforderliche Proteinmenge von 20 µg–80 µg konnte nach erfolgter Bradford-Proteinkonzentrationsbestimmung (2.8.2.) in die Geltaschen geladen werden. 7 µl des Blue Prestained Protein Standard oder des Page Ruler Plus dienten als Größenstandard des Molekulargewichts. Vorerst lief die Gelelektrophorese bei 80 V für 20 min bis die Proben vollständig ins Sammelgel gelaufen waren. Anschließend wurde die Gelelektrophorese in ca. 70 min bei 150 V durchgeführt. Unmittelbar danach wurde das proteinhaltige Gel für den Western Blot benutzt.

2.8.3.2 Western Blot und Immunfärbung

Der Western Blot ist ein Verfahren zum Nachweis spezifischer Proteine durch Antikörper. Bei dieser Methode werden die bereits gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine (2.8.3.1) als Replikat des Gels auf eine Membran übertragen („*blotting*“ = „abklatschen“). Durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld wandern die negativ geladenen Proteine zur positiv geladenen Anodenseite und binden über hydrophobe und ionische Wechselwirkungen an die Nitrozellulosemembran mit Polybren beschichteten Glasfasern.

Der Western Blot erfolgte in Biorad-Miniblot Apparaturen im Nassverfahren. Für den Blotaufbau wurde die Nitrozellulosemembran zur Anodenseite der Halterungskassette gerichtet auf das proteinhaltigen PAA-Gel gelegt. Dabei wurden die Membran und das Proteingel jeweils von drei Filterpapieren sowie einem Schwamm umgeben. Beim Zusammenstellen des Blots ist darauf zu achten, dass Luftblasen ausgestrichen werden, da sie einen Proteintransfer behindern. Alle Komponenten des Blotsandwichs wurden vor dem Blotten 10 min lang in Blot-Transferpuffer equilibriert, um vor allem verbliebene SDS-Reste aus dem Gel zu waschen. Auf diese Weise wurden Proteine vom SDS getrennt, sodass die Proteine teilweise renaturierten. Durch die wieder eingenommenen Proteinstrukturen (Primär- und Sekundärstruktur) wurde die Bindung spezifischer Primärantikörper erleichtert. Anschließend wurde das Blotsandwich in die mit kaltem Blottransferpuffer gefüllte Elektrodenkammer eingesetzt und eine Stromstärke von 200 mA für 3 h bzw. für 5 h (*Biotin Assay*) angelegt. Eine Umgebungstemperatur von 4 °C verhinderte ein Überhitzen des Blottransferpuffers bzw. das Schmelzen des PAA-Gels.

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran auf Höhe der ~55 kDa-Bande des PBS-Markers in zwei Teile geteilt. Die obere Membranhälfte enthielt die GlyT2-Proteine, die untere die des β-Actins als Ladekontrolle. Vor der Reaktion des Blots mit primären Antikörpern wurden die

restlichen Epitope (Proteinbindungsstellen) der Blotmembran mit Rinderserumalbumin (BSA) im Detergenz Tween 20 abgesättigt, um einer unspezifischen Bindung des primären Antikörpers vorzubeugen. Hierfür erfolgte die Inkubation für 1 h bei RT in Blockierungslösung (5 % BSA / TBS-T). Gleich darauf wurde die Nitrozellulosemembran mit den entsprechenden Primärantikörpern, die mittels spezifischer Sequenzen im nachzuweisenden Protein ihre Bindungsstelle fanden, bei 4 °C über Nacht am Überkopfschüttler geschwenkt. Die obere Membranhälfte wurde mit monoklonalem GlyT2-Primärantikörper (Ziege-anti-Maus, Santa Cruz, Heidelberg, Germany, 1:500 in 5 % BSA-TBS-T) inkubiert, die untere Membranhälfte dagegen mit β -Actin-Antikörpern (Ziege-anti-Maus, Biozol, Eching, Germany, 1:1000 in 5 % BSA-TBS-T) für den Ladekontrollnachweis. Da sich beim Biotin *Assay* die nachzuweisenden Proteinbanden von der Ladekontrollbande in einer Größe von lediglich 20 kDa unterschieden, wurde die Membran in diesem Fall nicht geschnitten. Die Nitrozellulosemembran inkubierte zuerst in Pan-Cadherin-Antikörpern (Ziege-anti-Kaninchen, Cell Signaling, Frankfurt am Main, Germany, 1:1000 in 5 % BSA-TBS-T) für den Ladekontrollnachweis und nach dreimaliger Waschung in TBS-T je 20 min in GlyT2-Antikörpern (Ziege-anti-Maus, Santa Cruz, Heidelberg, Germany, 1:500 in 5 % BSA-TBS-T). Beide Antikörper wurden jeweils über Nacht bei 4 °C am Überkopfschüttler inkubiert.

Am Folgetag wurde der Primärantikörper dreimal in TBS-T für jeweils 20 min gewaschen. Es folgte die Inkubation von 1 h bei RT mit entsprechenden Sekundärantikörpern (für GlyT2-Antikörper und β -Actin: Ziege-anti-Maus-HRP, Dianova, Hamburg, Germany, 1:10 000 in 5 % BSA-TBS-T; für Pan-Cadherin: Ziege-anti-Kaninchen-HRP, Dianova, Hamburg, Germany, 1:10 000 in 5 % BSA-TBS-T) und die erneute Waschung in TBS-T (dreimal je 20 min). Der sekundäre Antikörper ist spezifisch für die erste Antikörperspezies und erkennt dessen Fc-Fragment. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte HRP-Gruppe (Meerrettichperoxidase) macht das nachzuweisende Protein enzymatisch detektierbar, indem es die Chemilumineszenzoxidation von Luminol katalysiert.

Tabelle 22 gibt einen Überblick über die eingesetzten Materialien, Reagenzien und Konzentrationen. In Tabelle 11 und Tabelle 12 sind die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper aufgelistet.

2.8.3.3 Immundetektion der geblotteten hGlyT2-Proteine (ECL-Reaktion)

Die Entwicklung des Western Blots erfolgte mit Hilfe des SuperSignal West Pico PLUS Substrate (WB: scGlyT2-AK; β -Actin) oder SuperSignal West Femto Substrate (Biotin: scGlyT2-AK; Pan-Cadherin) Kits von Thermo Fisher Scientific durch ECL-Reaktion („enhanced chemiluminescent“). Unter Chemilumineszenz versteht man die Emission von Licht, durch chemische Reaktionen ausgelöst. Das Kit ist ein Zweikomponentensystem bestehend aus einer stabilen Peroxidlösung und einer verstärkenden Luminollösung. Kurz vor Gebrauch wurden dieselben Volumenmengen beider Komponenten vermischt. Bei 5-minütiger Inkubation mit dem Blot, an den HRP-gekoppelte Sekundärantikörper gebunden waren, katalysierte die Meerrettichperoxidase die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid in den angeregten Zustand. Kehrt das Luminol vom angeregten Zustand in den Ausgangszustand zurück, wird die überschüssige Energie in Form von Licht abgegeben. Das emittierte Licht wurde mit einem Röntgenfilm nach Exposition von 1 s–30 s eingefangen (Abbildung 10). Die Filmentwicklung erfolgte mit der Agfa CP1000 Tisch-Entwicklungsmaschine. Alle Schritte (Entwickler, Fixieren, Trocknung) waren programmiert und erfolgten automatisch.

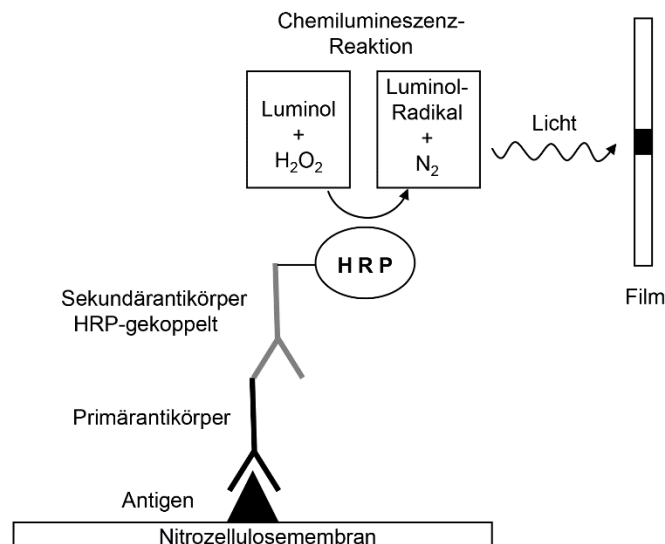


Abbildung 10 Prinzip der Immundetektion und Chemilumineszenz-Reaktion

Das auf die Nitrozellulosemembran fixierte hGlyT2-Protein (Antigen) wird vom Primärantikörper erkannt. Der Sekundärantikörper erkennt wiederum den Primärantikörper über die Spezies und bindet an dessen Fc-Fragment. Zum Nachweis des Proteins ist der Sekundärantikörper an eine Peroxidase (HRP-Gruppe) gekoppelt. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol mittels Wasserstoffperoxid (H₂O₂) unter alkalischen Bedingungen und löst eine Chemilumineszenz aus. Durch die Chemilumineszenz-Reaktion entsteht ein Luminol-Radikal (Dicarbonsäure), welches sich im angeregten Zustand befindet. Bei Rückkehr in den Ausgangszustand wird die überschüssige Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung abgegeben. Das emittierte Licht wird von einem Röntgenfilm eingefangen. Das Peroxid zerfällt und Stickstoff (N₂) wird freigesetzt.

Die Quantifizierung der CytoBuster-Lysate erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm Fiji (Rasband, W.S., Image J. U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) über die Messung der Pixeldichte der Proteinbanden (Schindelin et al., 2012). Insgesamt wurden fünf voneinander unabhängig durchgeführte Versuche aus insgesamt drei verschiedenen CytoBuster-Lysaten ausgewertet. Alle Werte wurden zur jeweiligen Ladekontrolle normalisiert. Die Signifikanzgrade wurden mittels *Student's t*-Test ermittelt. Der Mittelwert \pm SEM wurde gemäß den Formeln (2–5) berechnet (Altman and Bland, 2005) und in Balkendiagrammen mit Hilfe von Microsoft Excel 2018 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) graphisch dargestellt.

(Formel 2) Mittelwert: $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$; n = Anzahl der Messwerte

(Formel 3) Varianz: $Var(x) = \frac{\sum(x-\bar{x})^2}{(n-1)}$

(Formel 4) Standardabweichung (SD): $SD = \sqrt{Var(x)}$

(Formel 5) Standardfehler (SEM): $SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$

2.8.4 Biotinylierung der Oberflächenproteine

Die Biotinylierung ist eine Methode, um die Expression oder den endosomalen Transport von Oberflächenproteinen zu untersuchen. Sie ermöglichte die Quantifizierung der Proteinmenge an der Zelloberfläche in HEK293 Zellen der GlyT2^{P429L}-Mutante und GlyT2-Wildtyp im Vergleich. Als Biotinylierungsreagenz diente EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Abbildung 11, B) von Thermo Fisher Scientific. Dessen reaktive N-Hydroxysulfosuccinimid-Gruppe bindet unter alkalischen Bedingungen an primäre Aminogruppen (-NH₂), darunter Lysin-Seitenketten oder der N-Terminus jedes Polypeptids (Amidbindung) und ermöglicht auf diese Weise die Proteinmarkierung. Da das hydrophile Biotinylierungsreagenz aufgrund seiner negativen Ladung die hydrophobe Zellmembran nicht durchbrechen kann, wird die Biotinmarkierung auf die Oberfläche der Zelle beschränkt. Abschließend wird die hohe Affinität des Biotins für Streptavidin ausgenutzt, um die Biotin-markierten Membranproteine über die Reporter-konjugierte Streptavidinbindung nachzuweisen (Abbildung 11).

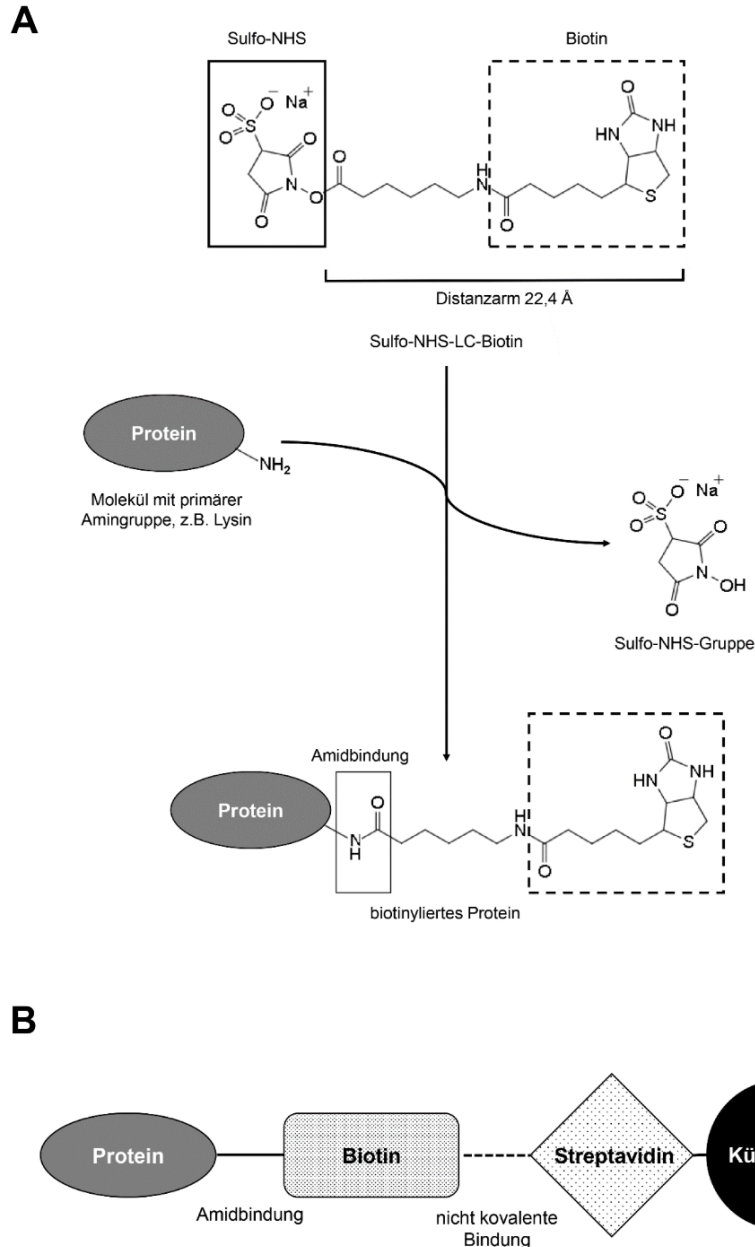


Abbildung 11 Biotinylierung auf chemischer Reaktionsebene

(A) Biotinmarkierung der Oberflächenproteine durch Kondensationsreaktion. Die Carboxyl-Gruppe des Sulfo-NHS-LC-Biotin reagiert mit primären Aminogruppen unter Abspaltung der Sulfo-NHS-Gruppe zur Amidbindung. Primäre Aminogruppen sind z.B. Lysin-Seitenketten oder der N-Terminus jedes Polypeptids der amphiphilen Phospholipiddoppelschicht. Aufgrund der hydrophoben Barriere bindet das geladene Biotinylierungsreagenz lediglich an die Oberflächenproteine. (B) Schematische Darstellung der Bindungstypen zwischen Protein und Biotin (Amidbindung) sowie zwischen Biotin und Streptavidin (nicht kovalente Bindung).

Für den Biotin *Assay* wurden HEK293 Zellen ($2,4 \times 10^6$ Zellen/10 cm Schale; 2 Schalen je Proteinprobe) 72 h nach dem Ausplattieren und 48 h nach der Transfektion mittels Calciumphosphatpräzipitationsmethode herangezogen. Nachdem die Zellen einmal vorsichtig mit eiskaltem PBS pH 8 gewaschen wurden, folgte die Inkubation mit 1 mg EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin in 1 ml PBS bei 4 °C unter leichtem Schütteln. Nach 30-minütiger Inkubationszeit wurden die Zellen ein weiteres Mal mit eiskaltem PBS pH 8 und danach mit eiskaltem Quenching-Puffer gewaschen, um nicht gebundenes Biotin zu entfernen. Um die letzten überschüssigen Biotinreste vollständig abzufangen, wurden die Zellen zusätzlich 10 min bei 4 °C in Quenching-Puffer inkubiert. Danach wurden die Zellen beider Schalen von den Platten abgeschabt, in 1 ml eiskaltem PBS-Puffer pH 8 gesammelt und in ein Gefäß überführt. Nach Zentrifugation von 1 min bei 4 °C und 1000 x g wurde das resultierende Pellet in 1 ml Lyse-Puffer homogenisiert. Dabei sollte PMSF mit einer Halbwertszeit von lediglich 35 min unter alkalischen Bedingungen stets unmittelbar vor Gebrauch zum Lyse-Puffer hinzugefügt werden. Anschließend wurde ein weiteres Mal 1 min bei 4 °C und 1000 x g zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen. Der gewonnene Überstand entsprach der Gesamtproteinmenge (G), wovon 80 µl in ein neues Gefäß überführt und bei -80 °C gelagert wurden. Zum restlichen Überstand wurden 50 µl Streptavidin-Agarose Kügelchen, die derweil dreimal mit TBS pH 8 gewaschen und 1:1 (w/v) in TBS gelöst wurden, für die Membranproteinmarkierung (M) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 4 °C am Überkopfschüttler haben die Streptavidin-Agarose Kügelchen an die biotinmarkierten Membranproteine gebunden und konnten im Anschluss 1 min bei maximaler Geschwindigkeit bei RT abzentrifugiert werden. Der Überstand enthielt den ungebundenen Proteinanteil und entsprach der intrazellulären Proteinmenge (IC), die bei -20 °C gelagert wurde. Das Pellet (Membranprotein gebunden an Kügelchen) wurde dreimal in jeweils 500 µl Lyse-Puffer gewaschen, anschließend in 60 µl 65 °C heißem 2x SDS Probenpuffer aufgenommen und 5 min auf 65 °C erhitzt. Die gewonnenen Membranproteinproben wurden bei -80 °C gelagert bis sie für den Western Blot verwendet wurden.

Zur Detektion der verschiedenen Proteinfractionen (G, IC, M) diente die SDS-Page (2.8.3.1) und der Western-Blot (2.8.3.2). Die Proteinkonzentration der Gesamtproteinmenge (G) wurde mittels Bradford Protein *Assay* (2.8.2) bestimmt. 30 µg der Gesamtproteinmenge (G) wurde in 2x SDS Probenpuffer aufgenommen und ein Endvolumen von 30 µl der Probe 5 min bei 65 °C inkubiert. Die Membranproteine wurden ebenso 5 min bei 65 °C auf den Heizblock gestellt, danach kurz anzentrifugiert und 20 µl des Überstands auf ein 9 % PAA -Gel aufgetragen.

Alle verwendeten Puffer und Reagenzien sind in Tabelle 22 gezeigt.

2.8.5 Funktionsanalyse mittels [³H]-Glycin *Uptake Assay*

Die Transportfunktion der GlyT2^{P429L}-Mutante im Vergleich zum GlyT2-Wildtyp wurde mit Hilfe des radioaktiv markierten Glycinbindungstests im Radioaktivlabor durchgeführt. Die aufgenommene Menge an radioaktiv markiertem Glycin wurde durch Szintillationsmessungen detektiert.

2.8.5.1 [³H]-Glycin *Uptake Assay*

Der [³H]-Glycin *Uptake Assay* dient der Untersuchung der Transportaktivität der Glycintransporter-Varianten (GlyT2-Wildtyp, GlyT2^{P429L} und der Co-Transfektion). Vor Versuchsbeginn wurden die 96-*well* Platten mit Gelatine beschichtet, 15 000 HEK293 Zellen pro *well* ausgesät und 24 h danach mit Hilfe von Lipofectamine2000, wie in Methoden der Zellkultur unter 2.6.2 und 2.6.4 beschrieben, transfiziert. Die zusätzliche Transfektion von GFP neben den Transfektionen der GlyT2-Varianten diente zum einen der Transfektionskontrolle, zum anderen als Negativkontrolle des Ligandenbindungstests. Die Co-Transfektion von GlyT2-Wildtyp und GlyT2^{P429L}-Mutante soll Aufschluss über die funktionelle Beeinflussung des Wildtyps auf die Mutante und umgekehrt geben. Für das gesamte Experiment wurde steril filtrierter HBS-Puffer pH 7,4 verwendet, um die gewünschte Na⁺- und Cl⁻-Konzentration zu erhalten. Die einzelnen HBS-Puffer-Komponenten sind in Tabelle 25 zusammengefasst.

Zunächst erfolgte die Herstellung der [³H]-Glycinkonzentrationsreihe als Transportmedium. Dafür wurde eine 20,9 µM [³H]-Glycinstocklösung der Firma PerkinElmer mit einer 10 mM „kalten“ Glycinlösung in HBS konzentriert, um Glycinkonzentrationen von 0 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM, 750 µM und 1 mM zu erreichen (Fornes et al., 2004; Gimenez et al., 2012). Das Pipettierschema für die Konzentrationsreihe des Transportmediums ist Tabelle 26 zu entnehmen.

48 h nach Transfektion konnte mit dem Transport-*Assay* begonnen werden. Nachdem die Zellen dreimal mit HBS gewaschen wurden, erfolgte die Zugabe von 80 µl des Transportmediums in jedes *well*. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 37 °C wurden die Zellen erneut dreimal mit HBS gewaschen, um nicht gebundenes Glycin zu eliminieren. Anschließend wurden die Zellen lysiert, indem 140 µl kaltes Aqua dest. pro *well* auf die Zellen pipettiert wurden. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wurden die lysierten Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vom Boden gelöst und homogenisiert.

Für die Messung des radioaktiv markierten Glycins durch den Flüssigszintillationsanalysator der Firma PerkinElmer wurden 100 µl des Lysates zu 4 ml Szintillationsflüssigkeit in ein Szintillationsröhrchen gegeben. Die Proteinbestimmung des Glycintransporters erfolgte mit Hilfe des Bradford Protein Assays wie unter 2.8.2 beschrieben und ermöglicht die Normalisierung der aufgenommenen [³H]-Glycinmenge zur eingesetzten Proteinmenge. Dafür wurden 20 µl des Lysates in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und mit 980 µl Bradford Reagenz vermischt.

Für die Auswertung wurden gemessene DPM-Werte (Anzahl der Messwerte: n = 8–10) aus vier voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten pro mg Protein und pro min verwendet. Aus den DPM-Messwerten wurde mit Hilfe der Datenanalyse- und Grafiksoftware OriginPro 2019 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) ein Glycinkonzentration-Glycintransport-Diagramm erstellt und die jeweiligen k_m -Werte und v_{max} -Werte gemäß der Formel 6 berechnet (Funktion: Hill, Kategorie: Growth/Sigmoidal). Mittelwerte ± SEM wurden entsprechend der Formeln (2–5) berechnet. Grade der Signifikanz wurden unter Verwendung des *Student's t*-Test ermittelt. Die Balkendiagrammdarstellung erfolgte mittels Microsoft Excel 2018 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

(Formel 6) $y = v_{max} * x^n / (k^n + x^n)$;

v_{max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit;

k = Michaelis-Menten-Konstante K_m ;

n = Hill-Koeffizient

2.9 Methoden der Immuncytochemie

Ziel der Immuncytochemie ist es, Aufschluss über die Expression und Lokalisation innerhalb der Zelle der GlyT2-Mutante im Vergleich zum GlyT2-Wildtyp zu erhalten. Dafür wurden HEK293 Zellen (150 000 Zellen / 3 cm Schale mit jeweils 2 Deckgläschen) und COS7 Zellen (100 000 Zellen / 3cm Schale mit jeweils 2 Deckgläschen) 60 h nach dem Aussäen und 48 h nach Transfektion verwendet. Alle Schritte wurden bei RT in einer feuchten Dunkelkammer durchgeführt. Die verwendeten Lösungen und Reagenzien sind in Tabelle 24 aufgelistet.

2.9.1 Permeabilisationsmethode mit Triton X-100

Für die immunocytochemische Färbungen der HEK293 und COS7 Zellen diente die Permeabilisationsmethode mit Triton X-100. Eine Permeabilisierung der Zellen war notwendig, da das zu detektierende Epitop des Zielproteins intrazellulär lokalisiert war. Die Deckgläschen mit Zellen wurden einmal vorsichtig in PBS getaucht, danach in eine feuchte, lichtgeschützte Kammer gelegt und anschließend für 20 min mit jeweils 50 µl 4 % PFA 4 % Sucrose Lösung fixiert. Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen, gefolgt von einer Inkubation mit 0,2 % Triton X-100 in Blockierungslösung (5 % (v/v) normales Ziegen Serum in PBS) für 30 min, um die Membran zu permeabilisieren und unspezifische Bindungen zu blocken. Um überschüssiges Triton X-100 zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit GlyT2 spezifischen Myc-Antikörper (ab9106, Ziege-anti-Kaninchen) in einer Konzentration von 1:500 in Blockierungslösung (5 % (v/v) normales Ziegen Serum in PBS) für 1 h. Nicht gebundener Primärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und es folgte die Inkubation mit dem sekundären Alexa488-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper in einer Konzentration von 1:250 in Blockierungslösung für 1 h. Nach dreimaliger Waschung in PBS wurde DAPI (1:5000 in PBS) für die Zellkernfärbung auf die Zellen pipettiert und nach 5 min durch dreimaliges Eintauchen der Deckgläschen in PBS entfernt. Um die Deckgläschen von restlichen Salzen zu befreien, wurden sie einmal in H₂O getaucht und abschließend mit Mowiol auf Objektträger eingedeckelt. Die Objektträger wurden im Dunkeln über Nacht bei RT getrocknet und im Kühlraum bei 4 °C gelagert.

Für eine bessere Darstellung der einzelnen Zellkompartimente dienten die COS7 Zellen. Als zusätzlicher Zwischenschritt wurde die Inkubation mit 50 mM NH₄Cl in PBS 10 min nach dem Fixierungsschritt eingefügt, um weniger Hintergrund und eine verbesserte Darstellung der einzelnen Zellkompartimente zu erreichen. Für die Markierung der einzelnen Zellkompartimente wurde Calnexin-anti-Kaninchen-AK (1:200) für das endoplasmatische Reticulum (ER), ERGIC53-anti-Maus-AK (1:250) für das Zwischenkompartiment zwischen ER und Golgi-Apparat und GM130-anti-Maus-AK (1:250) für den cis-Golgi verwendet. Die Zellen wurden anschließend mit PBS dreimal gewaschen und mit dem sekundären Alexa488-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:250) sowie dem sekundären Cy3-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:500) 1 h inkubiert. Bei co-transfizierten COS7 wurde lediglich der Myc-Antikörper Ziege-anti-Kaninchen ab9106 als Primärantikörper und Alexa488-Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper als Sekundärantikörper verwendet. Bei der

Färbung des ER mittels Calnexin-anti-Kaninchen-AK wurde der Myc-Antikörper A7 für die GlyT2-Markierung der Firma OriGene verwendet (1:500 in 5 % (v/v) normales Ziegen Serum in PBS).

2.9.2 Konfokale Mikroskopie

Die Bilder wurden mit einem invertierten Olympus IX-81 Fluoreszenz-Mikroskop, gekoppelt an ein konfokales Laser Scansystem Fluoview FW 1000 von Olympus (System Version: 4.2.2.9) sowie an einen FVD10 SPD Spektraldetektor aufgezeichnet. Es wurden drei Diodenlaser mit unterschiedlicher Wellenlänge benutzt: 405 nm (DAPI), 488 nm (Alexa Fluor 488) und 559 nm (Cy3). Dementsprechend lagen die Emissionswerte für DAPI bei 461 nm, für Alexa Fluor 488 bei 520 nm und für Cy3 bei 567 nm. Bilder von HEK293 Zellen wurden mit einem Olympus UPLSAPO 60x Objektiv (Öl, numerische Apertur: 1.35), Bilder von COS7 Zellen mit einem Olympus UPLSAPO 40x Objektiv (Öl, numerische Apertur: 1.35) aufgenommen. Anschließend wurden die Mikroskopbilder in Fiji (Rasband, W.S., Image J. U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) und Photoshop (Adobe Systems, San José, CA, USA) bearbeitet und zusammengestellt (Schindelin et al., 2012).

2.10 Strukturanalyse basierend auf einem GlyT2-Homologiemodell

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Hermann Schindelin im Rudolf-Virchow-Zentrum der Universität Würzburg konnten mit Hilfe von Herrn Dr. Vikram Kasaragod Einblicke in die dreidimensionale Struktur anhand von Homologiemodellen für den hGlyT2 mit den Mutationen P429L und D463N gewonnen werden. Das GlyT2-Homologiemodell wurde unter Verwendung von SWISS-MODEL (Arnold et al., 2006) und des Drosophila-Dopamintransporters (PDB:4XP4) (Wang et al., 2015), der als *Template* mit einer Sequenzidentität von ca. 49 % diente, erstellt. Die Darstellung des mutierten GlyT2 wurde mit COOT (Crystallographic Object-Oriented Toolkit) (Emsley and Cowtan, 2004), einem computerbasierenden Modellbildungswerkzeug für molekulare Graphiken, unter Berücksichtigung von Interaktionen mit umgebenden Resten und der Bewahrung der richtigen Stereochemie der mutierten Reste durchgeführt. Die dreidimensionale Strukturdarstellung wurden mit Hilfe der 3D-Grafiksoftware PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC, Mannheim, Deutschland) erstellt (Rigsby and Parker, 2016).

3 Ergebnisse

Hyperekplexie ist eine neuromotorische Erkrankung, die auf das Fehlen inhibitorischer glycinerner Neurotransmission zurückzuführen ist. Für die Erkrankung sind nicht nur Defekte im postsynaptischen GlyR, sondern auch im präsynaptischen GlyT2 verantwortlich. In dieser Arbeit konnte eine neue Mutation im humanen GlyT2-Gen (*SLC6A5*, OMIM 604159) in einem Patientenfall ermittelt und charakterisiert werden. Dabei handelt es sich um die *missense* Mutation P429L im Exon 8 des *SLC6A5*-Gens, die nach Sequenzierungsanalyse von Proben der betroffenen Familie einem autosomal-rezessiven Vererbungsmuster zuzuordnen ist. Der Aminosäureaustausch P429L führt vermutlich zu einer Proteinfehlfaltung, die den kompletten Verlust der Transporterfunktion zur Folge hat. Zusätzlich ergaben die Auswertungen aller experimentell erhobenen Daten eine verminderte Proteinexpression und einen vermehrten Proteinrückhalt innerhalb der Zellkompartimente verglichen zum GlyT2-Wildtyp. Dennoch war die GlyT2^{P429L}-Variante mit signifikant abgeschwächter Signalstärke an der Zelloberfläche nachweisbar.

3.1 Stammbaumanalyse der Familie

Aus dem *Screening* von Blutproben der Familienmitglieder 1–5 wurde die Mutation P429L im *SLC6A5*-Gen sowohl in homozygoter als auch in heterozygoter Konstitution ermittelt. Die homozygoten Familienmitglieder waren an Hyperekplexie erkrankt, während die Heterozygoten ohne phänotypische Auffälligkeiten waren. Gleichzeitig wurde bei den Heterozygoten eine weitere Mutation (D463N) im selben Exon identifiziert (Abbildung 12). Mutationen in Genen für den GlyR (*GLRA1*, *GLRA3*, *GLRB*) wurden bereits ausgeschlossen.

Die Patienten 3 und 5 waren für die Mutation P429L homozygot. Eine einzelne Punktmutation an Position 1286 (c.1286 C > T) der Nukleotidbasensequenz im Exon 8 führte zu einer *missense* Mutation. Der Basenaustausch resultierte in einer Aminosäuresubstitution von Prolin (CCG) zu Leucin (CTG) in Aminosäureposition 429 des hGlyT2-Gens (*SLC6A5*). Die Sequenzierungsergebnisse der Patienten 3 und 5 sind in Abbildung 12 D und F chromatographisch dargestellt.

Die DNA-Sequenzanalyse der phänotypisch unauffälligen Eltern (Familienmitglieder 1 und 2) sowie des einzig gesunden Kindes (Familienmitglied 4) zeigten die Mutation P429L in heterozygoter Form. Interessanterweise waren diese drei Familienmitglieder ebenso heterozygot für eine weitere Mutation. Der Nukleotidaustausch des codierenden Basentriplets

GAT zu AAT (c.1387 G > A) führte zum Aminosäureaustausch D463N. Somit codierte das mutierte Basentriplett AAT für die Aminosäure Aspargin in Aminosäureposition 463 anstelle der Asparginsäure im hGlyT2-Wildtyp (GAT). Diese weitere Mutation D463N lag nur 100 bp von der ersten Mutation P429L auf dem DNA-Strang entfernt, sodass beide *missense* Mutationen im selben Exon lokalisiert waren (Abbildung 12, B–C, E). Obwohl die Familienmitglieder 1, 2 und 4 dieselbe Mutation P429L in heterozygoter Form aufwiesen, zeigten sie im Gegensatz zu den Patienten 3 und 5 keine typischen Hyperekplexie-Symptome. Zusätzlich trat die Erkrankung geschlechtsunabhängig auf. Aus diesen beiden Gründen konnte die Mutation P429L als autosomal-rezessive Mutante charakterisiert werden. Die zweite Mutation D463N führte in heterozygoter Form ebenso nicht zu phänotypischen Auffälligkeiten.

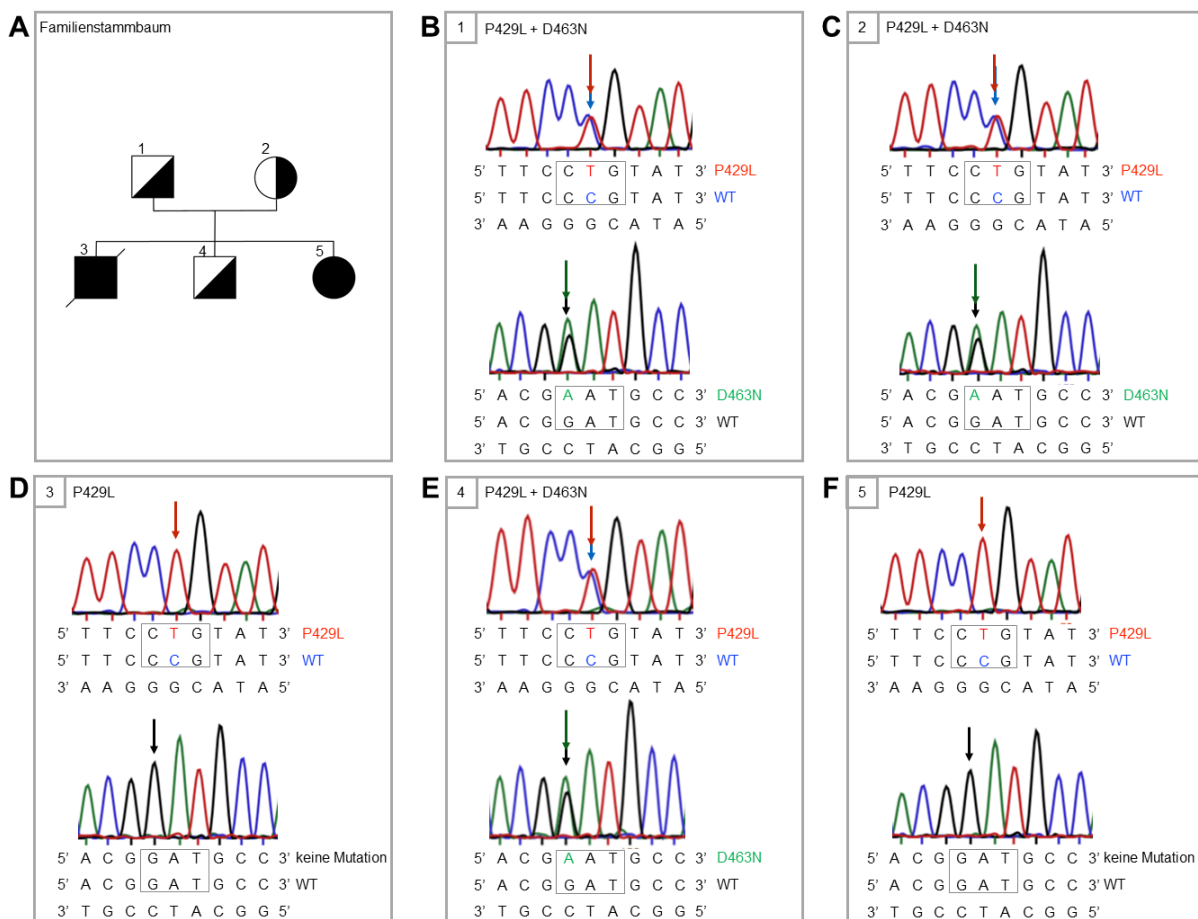


Abbildung 12 DNA-Sequenzanalyse der Familie mit Mutationen P429L und D463N im Exon 8 des hGlyT2-Gens (SLC6A5)

(A) Familienstammbaum. Vater 1, Mutter 2, Geschwister 3, 4 und 5. Quadrate und Kreise stehen für männliche und weibliche Individuen. Verschattete Symbole versinnbildlichen homozygote Allelträger = Merkmalsträger, halb verschattete Symbole heterozygote Allelträger. Die an Hyperekplexie erkrankten Kinder 3 und 5 trugen die Mutation P429L in homozygoter Form, während die beiden Elternteile 1 und 2 und das einzig gesunde Kind 4 die Mutation P429L sowie eine weitere Mutation (D463N) jeweils in heterozygoter Form aufwiesen. Patient 3 ist verstorben. (B–F) Chromatographische Darstellung jeweils zweier DNA-Teilsequenzen in einem Abstand von 100 bp aus Exon 8 der

Familienmitglieder 1–5. Grün, blau, rot und schwarz repräsentieren die Basen Adenin, Cytosin, Thymin und Guanin. Pfeile zeigen auf den jeweiligen Basenaustausch. Jeweils die oberen Teilsequenzen zeigen, dass die Patienten 3 und 5 die Mutation P429L in homozygoter Form trugen, während die Mutation P429L bei den gesunden Familienmitgliedern 1, 2 und 4 heterozygot war. Jeweils die unteren Teilsequenzen zeigen bei den Familienmitgliedern 1, 2 und 4 die zweite heterozygote Mutation D463N. Bei den Patienten 3 und 5 lag keine zweite Mutation in diesem Sequenzabschnitt vor.

3.2 Allelanalyse der Familienmitglieder

In einer typischen PCR-basierten Sequenzierung werden DNA-Proben aus einem diploiden Organismus verwendet und beide Kopien des Allels gleichzeitig sequenziert (Abbildung 12). Das bedeutet, bei identischen Allelen (Homozygotie) resultiert ein Peak-Signal, das eigentlich das Ergebnis von beiden Allelen kombiniert ($2n$). Das Fluoreszenzsignal ist also die Summe beider Peak-Signale der haploiden DNA (n) und es kann von einer doppelten Signalstärke (Peak-Höhe) ausgegangen werden. Bei Heterozygotie beträgt demnach die zu erwartende Peak-Höhe beider unterschiedlicher Allele jeweils ungefähr nur noch 50 % der homozygoten Peak-Höhe. Um genaue Aussagen über die Allelhäufigkeiten jedes Individuums und über die Verteilung verschiedener Allele auf beide Chromosomen treffen zu können, wurde das Allelsequenzierungsexperiment durchgeführt. Nach Auswertung der Allelverteilung konnte die Aussage zum Vererbungsmuster aus dem Screening bestätigt sowie das Risiko, die Erkrankung an weitere Nachkommen zu vererben, abgeschätzt werden.

Zunächst wurde von jedem Individuum gDNA aus Blutproben isoliert und der jeweilige Exon 8 DNA-Abschnitt sequenziert. Als Beispiel sind die Ergebnisse der einzelnen Allelklonierungsschritte des Patienten 3 der Reihe nach in Abbildung 13, A–D gezeigt. Nach PCR-Amplifikation über die hGlyT2 Exon 8-Primer (*forward* #423 und *reverse* #425) waren DNA-Fragmente mit einer Größe von ~230 bp zu erwarten (Abbildung 13, A). Die Bande wurde blind aus einem 1 % Agarosegel ausgeschnitten (Abbildung 13, B) und aufgereinigt. Zur Kontrolle wurden 3 μ l des aufgereinigten PCR-Produkts auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen (Abbildung 13, C). Es folgte die Kolonie-PCR. Bei erfolgreicher Insertintegration in den Vektor war nach der PCR-Amplifikation über einen flankierenden parentalen Vektorprimer (*forward* #43) und einen hGlyT2 Exon 8 Insertprimer (*reverse* #425) mit einer Fragmentgröße größer als die reine Insertbande zu rechnen, da einer der Primer außerhalb des Inserts hybridisierte. Nach der Kolonie-PCR in Abbildung 13, D konnte bei allen 10 gepickten Bakterienkolonien von einer erfolgreichen Insertintegration ausgegangen werden, die anschließend über die Sequenzierung bestätigt wurde (Abbildung 14, A). Gleichzeitig wurde

durch die Primerwahl von Vektor- und Insertprimer der Inserteinbau in korrekter Richtung bestätigt. Bei falscher Insertorientierung zum Vektor hätte man sonst eine zusätzliche Bande mit ~230 bp entsprechend der Insertbande erhalten. Da der Schwerpunkt dieses Experiments lediglich auf der Auszählung unterschiedlicher Allelvarianten lag, wäre ein Inserteinbau in falscher Richtung allerdings nicht weiter relevant gewesen.

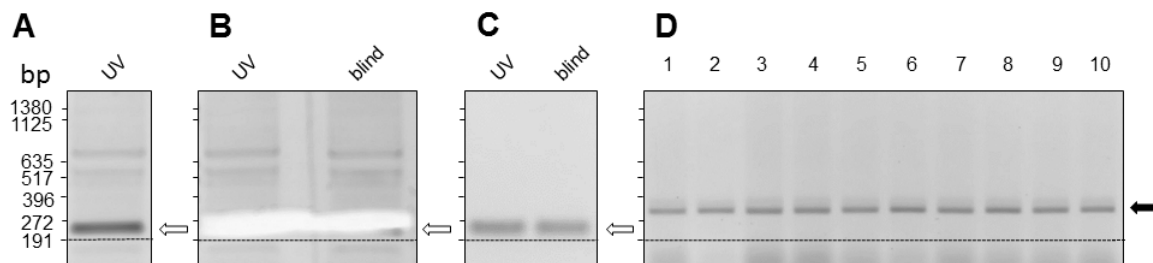


Abbildung 13 Isolierung eines DNA-Abschnitts, Ergebnisse nach Agarosegelelektrophorese

(A) hGlyT2 Exon 8 DNA-Fragments am Beispiel des Familienmitglieds 3 nach PCR. Die relevante Exon 8 DNA-Bande von ~230 bp ist mit weißen Pfeilen markiert. (B) Gel-Extraktion. Ausschneiden der Referenzbande unter UV-Licht. Die entstandene Schnittschablone ermöglichte das blinde Ausschneiden der Probenbande ohne UV-Licht. (C) Kontrolle der aufgereinigten DNA-Fragmente nach Gel-Extraktion. Lediglich die Exon 8-Bande ohne Nebenprodukte ist deutlich zu erkennen. (D) Kolonie PCR-Produkt von 10 gepickten Bakterienkolonien (schwarzer Pfeil). Aufgrund der PCR-Amplifikation über den flankierenden Vektorprimer war bei richtiger Insertintegration mit einer DNA-Bande größer als die des reinen Inserts zu rechnen. Die eingezeichnete Hilfslinie soll den Fragmentgrößenunterschied zwischen PCR-Produkt des reinen Inserts und des Kolonie-PCR-Produkts mit zusätzlichem Vektorfragment verdeutlichen.

Für die Quantifizierung der Allelvarianten und um die Allelverteilung auf das homologe Chromosomenpaar abschätzen zu können, war die Sequenzierung von 10–12 Exon 8 DNA-Abschnitten erforderlich. Folglich wurden pro Individuum aus insgesamt 10–12 Bakterienkolonien die Plasmid-DNA auf die Mutationen P429L und D463N im Exon 8 untersucht. Da während der Ligation in das Vektorgerüst stets nur jeweils eine Allelvariante eingebaut werden konnte, gab die Auszählung der jeweiligen Allelvarianten pro Individuum Aufschluss über die Allelhäufigkeit verschiedener Allele und deren quantitative Verteilung auf beide homologen Chromosomen.

Die Auszählung der Allelvarianten mit den Mutationen P429L oder D463N ist dem gestapelten Säulendiagramm in % der Abbildung 14, A zu entnehmen. Die absoluten Werte der Genvarianten und die entsprechend prozentuale Häufigkeit sind in der Tabelle 38 im Überblick

aufgelistet. Dabei wurde bei allen 5 Familienmitgliedern entweder die erste Mutation P429L (Abbildung 14, B, b) oder die zweite Mutation D463N (Abbildung 14, B, c) im Exon 8 nachgewiesen. GlyT2-Wildtyp ist in Abbildung 14, B, a vollständigshalber dargestellt.

Bereits vorangegangene Sequenzierungen der gDNA der Patienten 3 und 5 ergaben einen homozygoten Genotyp für das hGlyT2-Gen mit *missense* Mutation P429L. Die Allelsequenzierung bestätigte das Ergebnis. 100 % der gepickten Bakterienkolonien besaßen in ihrer Plasmid-DNA ein identisches Allel mit der Mutation P429L. Anders bei den Heterozygoten (Familienmitglieder 1, 2 und 4), wo zwei verschiedene Allele des GlyT2s vorlagen und somit der heterozygote Genotyp aus der Gesamt-Pool-Analyse verifiziert wurde. Grundsätzlich würde man bei den Heterozygoten von einer 50:50 Verteilung beider Allelvarianten ausgehen. Tatsächlich wurde bei allen Heterozygoten in über 80 % der Sequenzierungsergebnisse die Mutation P429L nachgewiesen. Die Mutation D463N, die bei allen Heterozygoten eine Häufigkeit von unter 20 % aufwies, ist als ein sehr seltenes Ereignis zu betrachten. Gleichzeitig bedeutet dies, dass die zu 20 % auftretende D463N-Allelvariante für einen funktionsfähigen Glycintransport ausreichend ist, da die Heterozygoten (Familienmitglieder 1, 2 und 4) keine Symptomatik einer Hyperekplexie zeigten. Die für die Hyperekplexie-Erkrankung ursächliche Allelvariante mit der Mutation P429L lag deutlich häufiger vor als die Mutation D463N. Da die P429L-Variante bei beiden Elternteile bei ~80 % lag und die Kinder jeweils ein Allel von jedem Elternteil erben, ist das Risiko, dass zwei P429L-Allelvarianten aufeinander treffen deutlich höher, als dass eine P429L- und eine D463N-Allelvariante (wie im Fall 4) vererbt werden oder zwei D463N-Allelvarianten.

Die Auswertung des Allelsequenzierungsexperiments ergab, es existierten zwei verschiedene Allelvarianten auf demselben Genlocus der DNA-Sequenz, die auf beide homologen Chromosomen verteilt waren. Abbildung 14, B macht deutlich, dass entweder die Mutation P429L (Abbildung 14, B, b) oder die Mutation D463N (Abbildung 14, B, c) ermittelt wurden. In keinem der über 50 Allelsequenzierungsergebnisse wurden beide Mutationen gleichzeitig gefunden. Dennoch waren beide Mutationen bei den Heterozygoten (Familienmitglieder 1, 2 und 4) im Gesamtpool nachweisbar. Dies bedeutete: Es existierten bei den Heterozygoten zwei verschiedene Allelvarianten, die jedoch auf das Chromosomenpaar verteilt lokalisiert waren. Sobald zwei Mutationen *in-trans* vorliegen, das heißt auf beiden unterschiedlichen Chromosomen vorkommen, spricht man auch von einer *Compound*-Heterozygotie.

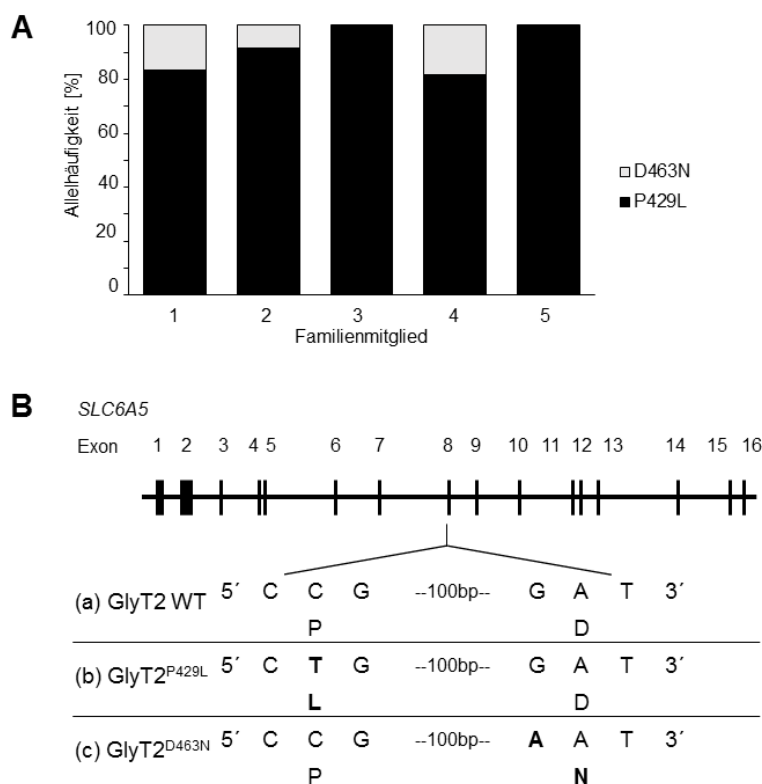


Abbildung 14 Quantifizierung der Allelvarianten der 5 Familienmitglieder (1–5)

(A) Die Häufigkeit beider Allelvarianten P429L und D463N ist aus dem gestapelten Säulendiagramm (100 %) und der Tabelle 38 abzulesen. n = Anzahl auswertbarer Proben / Gesamtanzahl untersuchter Proben. Bei den Homozygoten, den Patienten 3 und 5, wurde ausschließlich die Mutation P429L im Exon 8 des *SLC6A5*-Gens ermittelt (100 % für P429L). Bei den Heterozygoten, den nicht-erkrankten Familienmitgliedern 1, 2 und 4, war die Mutation P429L zu 82 %–92 % nachweisbar. Gleichzeitig war die zweite Mutation D463N mit nur 8 %–18 % ein selteneres Ereignis. Insgesamt wurde die Plasmid-DNA aus 10–12 Bakterienkulturen sequenziert. (B) Schematische Darstellung des *SLC6A5*-Gens. Die für den GlyT2 16 codierenden Exone sind mit schwarzen Boxen dargestellt. Die schwarzen Verbindungslinien zwischen den Boxen skizzieren die intronischen Sequenzen. Positionen des Nukleotid- und Proteinaustauschs sind mit fetten Buchstaben gekennzeichnet. Die Sequenzierung bestätigte, dass im Exon 8 entweder die Allelvariante P429L (B, b) oder die Allelvariante D463N (B, c) exprimiert wurde. Beide Mutationen sind nur 100 bp auf dem DNA-Strang entfernt. Die Situationen (B, b) und (B, c) waren nie auf demselben Allel gleichzeitig nachweisbar. Dieses Ergebnis beweist, dass die Mutationen zwar auf demselben Genlocus, aber auf unterschiedlichen Chromosomen lagen. (B, a) zeigt die ursprüngliche DNA-Sequenz des GlyT2-Wildtyps.

Tabelle 38 Häufigkeit der Allelvarianten P429L und D463N

Familienmitglied	GlyT2 ^{P429L}	Prozent [%]	GlyT2 ^{D463N}	Prozent [%]	n
1	10	83	2	17	12/12
2	11	92	1	8	12/12
3	10	100	0	0	10/10
4	9	82	2	18	11/12
5	10	100	0	0	10/10

n = Proben mit auswertbaren Ergebnissen / untersuchte Gesamtproben

3.3 Klonierung: Herstellung des GlyT2^{P429L}-Klons

Für die Herstellung des Klons mit eingebauter Punktmutation P429L wurden zunächst zwei Standard-PCRs (siehe 2.7.6) durchgeführt, in denen durch die Mutageneseprimer die Mutation P429L in die DNA eingeschleust wurde (Abbildung 6, PCR I und PCR II). Als Ausgangsmaterial diente die pRK5-Plasmid-DNA des hGlyT2-Wildtyps mit eingebautem Myc-Epitop nahe dem N-Terminus. Die ersten zwei PCR-Ansätze generierten die Fragmente I und II mit Fragmentgrößen von ca. 1600 bp und ca. 1000 bp. Durch Überlappung beider Fragmente im Bereich der inserierten Punktmutation war in einer dritten PCR, der *Overlap Extension* PCR, die Verlängerung der DNA-Stränge nach links und rechts über flankierende parentale Primer möglich. Es resultierte das *Overlap* PCR Produkt, das sich aus Fragment I und II zusammensetzte und folglich eine Fragmentgröße größer als beide Einzelfragmente von ca. 2600 bp zu erwarten war (Abbildung 15, A). Die zwei schwachen DNA-Banden unterhalb des *Overlap* PCR Produkts auf Höhe der Fragmente I und II entsprechen nicht-hybridisierten Fragmenten. Die relevante *Overlap* PCR Produkt-Bande wurde von diesen PCR-Restprodukten durch blindes Ausschneiden (siehe 2.7.9) und Gel-Extraktion (siehe 2.7.10) isoliert. Das Resultat nach dem Ausschneiden der gewünschten Banden aus einem Agarosegel ist in Abbildung 15, B an einem verdauten Vektor beispielhaft dargestellt.

Das mittels *Overlap Extension* PCR generierte Insert trug mittig in der DNA-Sequenz die Mutation P429L. Zu beiden Seiten der Mutation waren die Restriktionsschnittstellen lokalisiert, die durch flankierende parentale Primer eingebaut wurden. Diese Schnittstellen ermöglichten nach erfolgreichem Restriktionsverdau die Klonierung der GlyT2^{P429L}-Variante, des Inserts, in das hGlyT2-Wildtyp pRK5-Plasmid, den sogenannten Vektor. Nach dem Verdau mit ClaI und HindIII betrug die Fragmentgröße des Vektors ~4700 bp, die des Inserts entsprechend des *Overlap* PCR Produkts ca. 2600 bp. Nach dem Verdau wurden die Fragmente auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen, die Banden der richtigen Größe blind ausgeschnitten (siehe 2.7.9) und aufgereinigt (siehe 2.7.10). Abbildung 15, C zeigt die aufgereinigten Vektor- und Insertbanden. Gleichzeitig wurde ein unverdauter Vektor auf das Agarosegel zum Vergleich aufgetragen. Anschließend wurde in einem Vektor : Insert Verhältnis von 1:15 ligiert. Zur Kontrolle der Mutagenese wurden Übernachtskulturen angesetzt (Abbildung 17) und eine Mini-Plasmidpräparation durchgeführt. Mit Hilfe eines Kontrollverdaus und Sequenzierung konnte die Mutation überprüft werden (Abbildung 16).

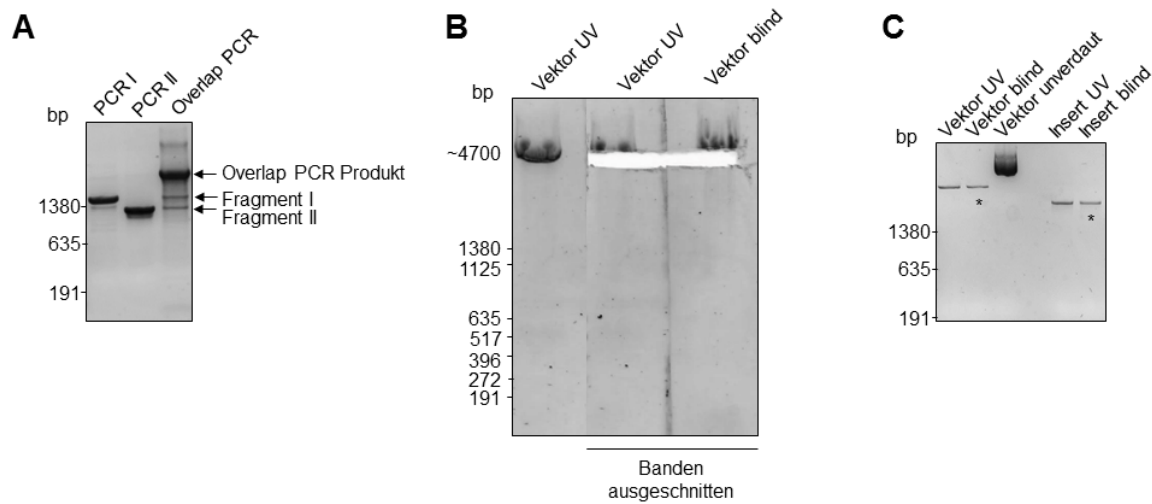


Abbildung 15 Mutagenese

(A) *Overlap Extension* PCR Produkt bestehend aus Fragment I und II. Agarose-Gelelektrophorese zeigt die Größenunterschiede der einzelnen Fragmente I und II im Vergleich zum *Overlap* PCR-Produkt. Nach der Hybridisierung beider mutierter Ausgangsfragmente im Überlappungsbereich ist eine Verlängerung der DNA-Stränge zu beiden Seiten der Mutation durch flankierende parentale Primer möglich. Die zwei schwachen Bänder unterhalb des *Overlap* PCR Produkts entsprechen einem kleinen Anteil nicht-hybridisierter Ausgangsfragmente. (B) Agarosegelelektrophorese. Ausschneiden des verdauten Plasmid-Vektors unter UV-Licht und blind ohne UV-Licht. (C) Identifizierung und Überprüfung der eluierten Fragmente nach Gel-Extraktion. Mit *Cla*I und *Hind*III verdaut Vektor- und Insertfragmente nach Aufreinigung. Die Sternchen (*) markieren die blind ausgeschnittenen Fragmente, die für die Ligation eingesetzt wurden.

Nach der Ligation wurde ein Kontrollverdau durchgeführt, der die Häufigkeit der durch den Vektor alleine verursachten Transformationsereignisse abschätzen lässt. Mögliche Gründe für eine spontane Re-Ligation des Vektors wären beispielsweise eine Verknüpfung nicht-komplementärer DNA-Enden während der Ligation oder bereits ein unvollständiger Restriktionsverdau. Der Verdau überprüfte, ob das eingebaute Insert die richtige Größe hatte, und ob in der isolierten Plasmid-DNA die eingebauten Restriktionsstellen intakt waren. Das Ergebnis des Kontrollverdaus mit *Cla*I und *Hind*III der Plasmid-DNA aus der Minipräparation ist in Abbildung 16, A dargestellt. Durch die Restriktionsenzyme wurde das Insert aus dem Vektor wieder herausgeschnitten, vorausgesetzt die Restriktionsschnittstellen blieben nach der Ligation erhalten. Dies ist nur dann der Fall, wenn das Insert in richtiger Orientierung zum Vektor eingebaut wurde. Ergibt der Verdau nach gelelektrophoretischer Auftrennung zwei Bänder mit den zu erwarteten Fragmentgrößen, die der Insert- und Vektorgröße entsprechen, kann von positiven Klonen ausgegangen werden. Insgesamt wurden 12 Kolonien der Übernachtskultur gepickt und dem Kontrollverdau unterworfen. Der Abbildung 16, A ist zu

entnehmen, dass bei allen 12 Kolonien von einer inserierten GlyT2^{P429L}-Variante ausgegangen werden konnte. Letzte Sicherheit für eine erfolgreiche Mutagenese gab das Sequenzierungsergebnis (Abbildung 16, B).

Eine weitere Sequenzierung über den flankierenden parentalen Vektorprimer (*forward* #43) stellte sicher, dass das Myc-Epitop ebenso in der Plasmid-DNA vorlag (Abbildung 16, C).

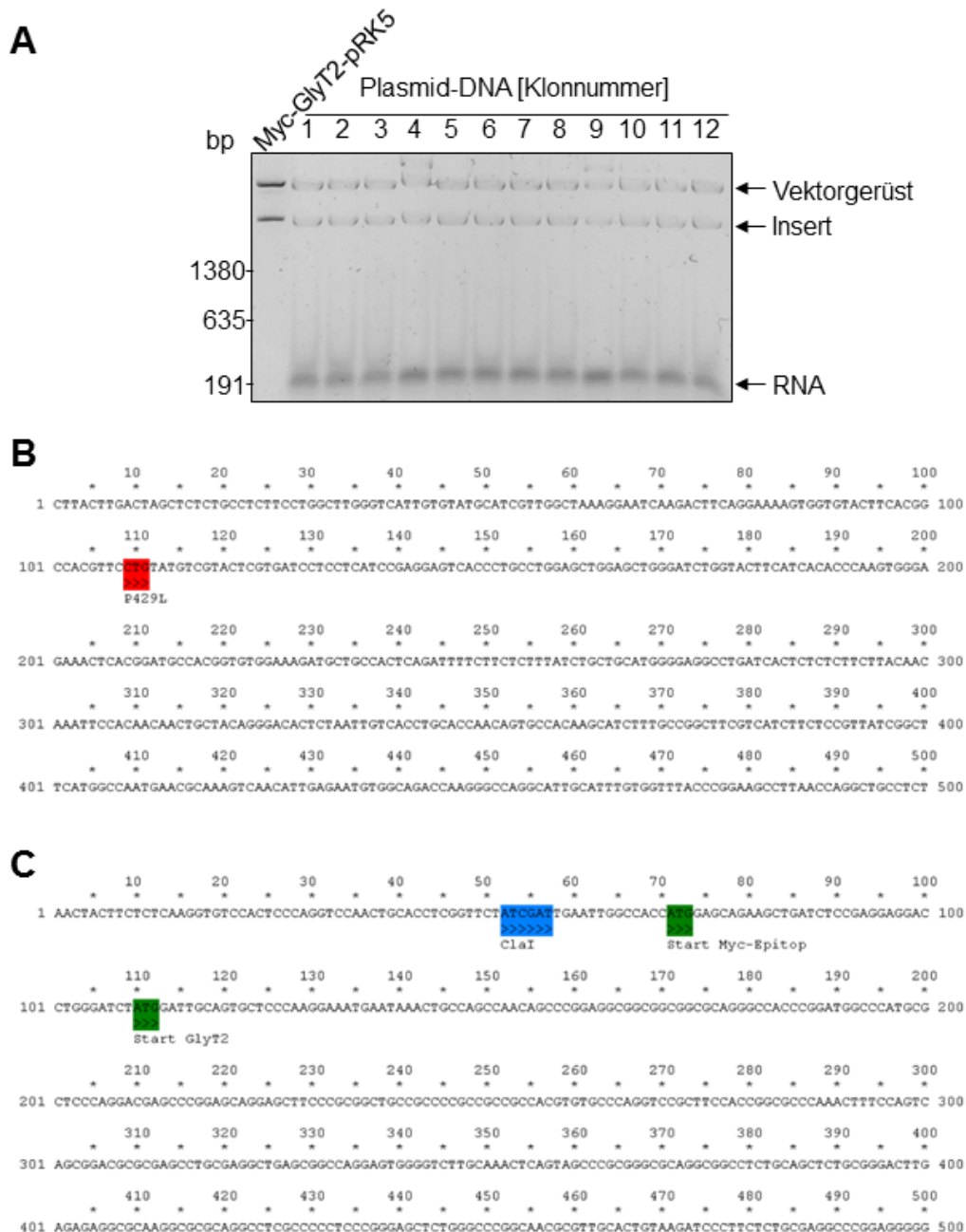


Abbildung 16 Kontrollverdau und Sequenzierungsergebnisse

(A) Kontrollverdau der Plasmid-DNA der Minipräparation. Nach dem Verdau wird das zuvor integrierte Insert aus dem Vektorgerüst durch die Enzyme ClaI und HindIII herausgeschnitten. Die Größen der Vektor- und Insertbande entsprechen den Größen vor der Ligation. (B) DNA-Sequenzabschnitt des

hGlyT2^{P429L}-Klons. Durch die Sequenzanalyse wurde die Mutagenese des hGlyT2^{P429L}-Klons auf Nukleotidebene überprüft. In rot ist das mutierte Basentriplett CTG dargestellt. (C) Für den Nachweis des Myc-Epitops wurde eine weitere Sequenzierung über den *forward* Vektorprimer #43 durchgeführt. Grün kennzeichnen die Start-Codons (ATG) für Myc und GlyT2. Blau markiert die ClaI Schnittstelle. Die Sequenzierung übernahm die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland). Die graphische Darstellung erfolgte mittels ApE Software (A Plasmid Editor 2.0.49 – M. Wayne Davis, University of Utah Biology Department).

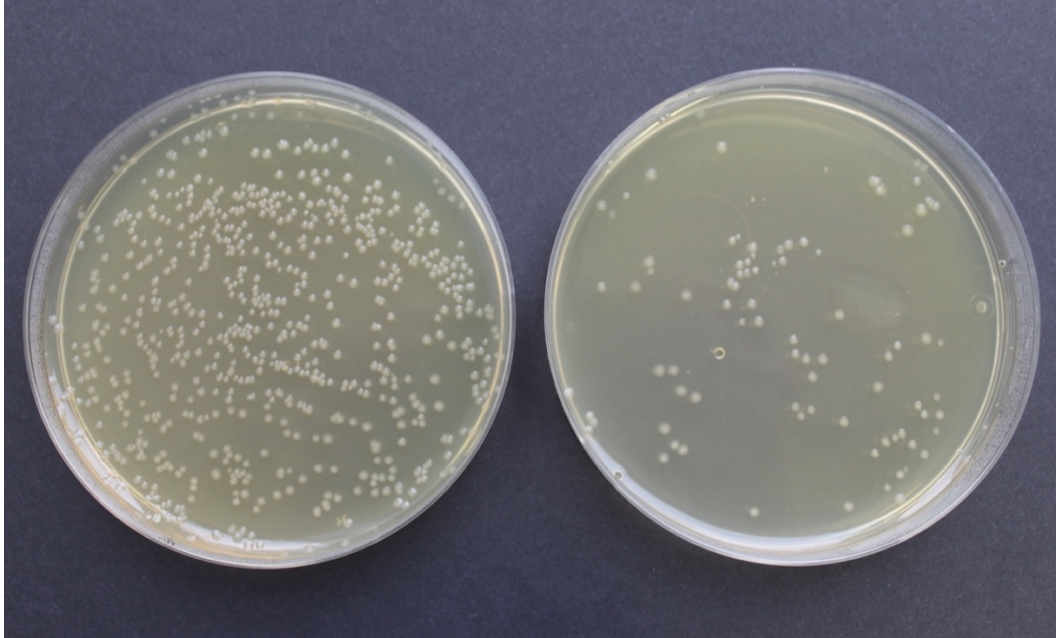


Abbildung 17 Transformation: Bakterienkolonien auf Ampicillin-Agarplatten

Links: Kolonienzahl Probe. Rechts: Kolonienzahl Negativkontrollplatte. Die Negativkontrolle zeigte vereinzelt Bakterienkolonien, die durch eine spontane Re-Ligation des Vektorgerüsts ohne Insert oder einen unvollständigen Verdau entstehen können. Die Kolonienzahl der Negativkontrolle lässt die erfolgreiche Ligation der Probe abschätzen. Foto: Canon, EOS 650D.

3.4 Expressions- und Lokalisationsanalyse der GlyT2-Variante

Immuncytochemische Färbungen transfizierter HEK293 Zellen und COS7 Zellen wurden durchgeführt, um Informationen über die Proteinexpression und den zellulären Proteintransport zu gewinnen. Primäre Myc-Antikörper wurden für den Nachweis der GlyT2-Proteine verwendet, die nahe des N-Terminus das zu erkennende Myc-Epitop trugen. Da der N-Terminus und damit die Myc-Zielsequenz intrazellulär lagen, war die Permeabilisierung der Membran durch Triton X-100 Voraussetzung für die Bindungsmöglichkeit der primären Myc-Antikörper an das entsprechende Epitop.

Eine Co-Lokalisation von GlyT2-Varianten mit gleichzeitig transfizierten Fusionsproteinen aus pDsRed und dem ER-Markerprotein Calreticulin bzw. dem Plasmamembranmarker GAP-43,

war durch ein gelbes Signal bei Überlagerung des grünen (GlyT2-Protein) und roten (Markerprotein) Kanals zu erkennen (Abbildung 18, *merge*).

Bereits immunocytochemische Färbungen co-transfizierter HEK293 Zellen mit GlyT2-Wildtyp bzw. GlyT2^{P429L}-Mutante und Plasmamembranmarker bzw. dem ER-Markerprotein Calreticulin zeigten, dass die GlyT2^{P429L}-Mutante zwar bis an die Zelloberfläche transportiert wurde, allerdings viel mehr Protein im ER als beim GlyT2-Wildtyp zurückblieb (Abbildung 18, A–B). Oft werden Proteine mit Strukturdefekten in den einzelnen Stationen der Biosynthese, wie beispielsweise dem ER, akkumuliert und von dort direkt der Degradation zugefügt (Bajaj et al., 2007). Dies würde das verstärkte Signal innerhalb der Zelle bei der hGlyT2^{P429L}-Mutante erklären.

Um genauere Aussagen über den Proteintransport zwischen den Zellorganellen machen zu können, wurde die Zellkompartimentanalyse in COS7 Zellen durchgeführt (Abbildung 18, C–D). Aufgrund deren relativ großen Zytoplasmas, sind die einzelnen Zellkompartimente auf eine größere Fläche verteilt und deshalb in immunocytochemischen Färbungen besser zu detektieren. Bei immunocytochemisch gefärbten COS7 Zellen (Abbildung 18, C–D) fällt ebenso wie in HEK293 Zellen (Abbildung 18, A–B) auf, dass im Gegensatz zum GlyT2-Wildtyp von der GlyT2^{P429L}-Mutante viel mehr Protein innerhalb der Zelle blieb, dennoch in einigen Zellen in der Membran nachweisbar war. Allerdings war das Signal an der Membran deutlich schwächer im Vergleich zum hGlyT2-Wildtyp. Die Co-Lokalisation von hGlyT2^{P429L}-Mutante mit den einzelnen Kompartimentmarkern für das ER, das Zwischenkompartiment ERGIC und den cis-Golgi, einzelne Stationen der Proteinsynthese, spricht grundsätzlich für kein Proteintransportproblem. Zusammengefasst kann man sagen, die hGlyT2^{P429L}-Mutante wurde zwar bis in die äußere Plasmamembran transloziert, aber insgesamt wurde deutlich weniger Protein an der Oberfläche exprimiert (siehe 3.5, Proteinbiochemie). Ein Grund für die geringe Proteinexpression könnte eine reduzierte Proteinsynthese aufgrund einer Proteinfehlfaltung des hGlyT2^{P429L} (siehe 3.7, Strukturanalyse) sein.

Dass der PM-Marker nicht nur die Plasmamembran, sondern auch Kompartimente innerhalb der Zelle markiert, ist auf die Permeabilisationsmethode zurückzuführen, da auch intrazelluläre Membranen den Marker exprimieren. Zudem ist das Zytoplasmavolumen der COS7 Zellen im Vergleich zur Plasmamembranoberfläche größer als das der HEK293 Zellen, was die COS7 Zellen fragiler macht und das zerklüftete Erscheinungsbild nach Permeabilisation der Membran erklärt.

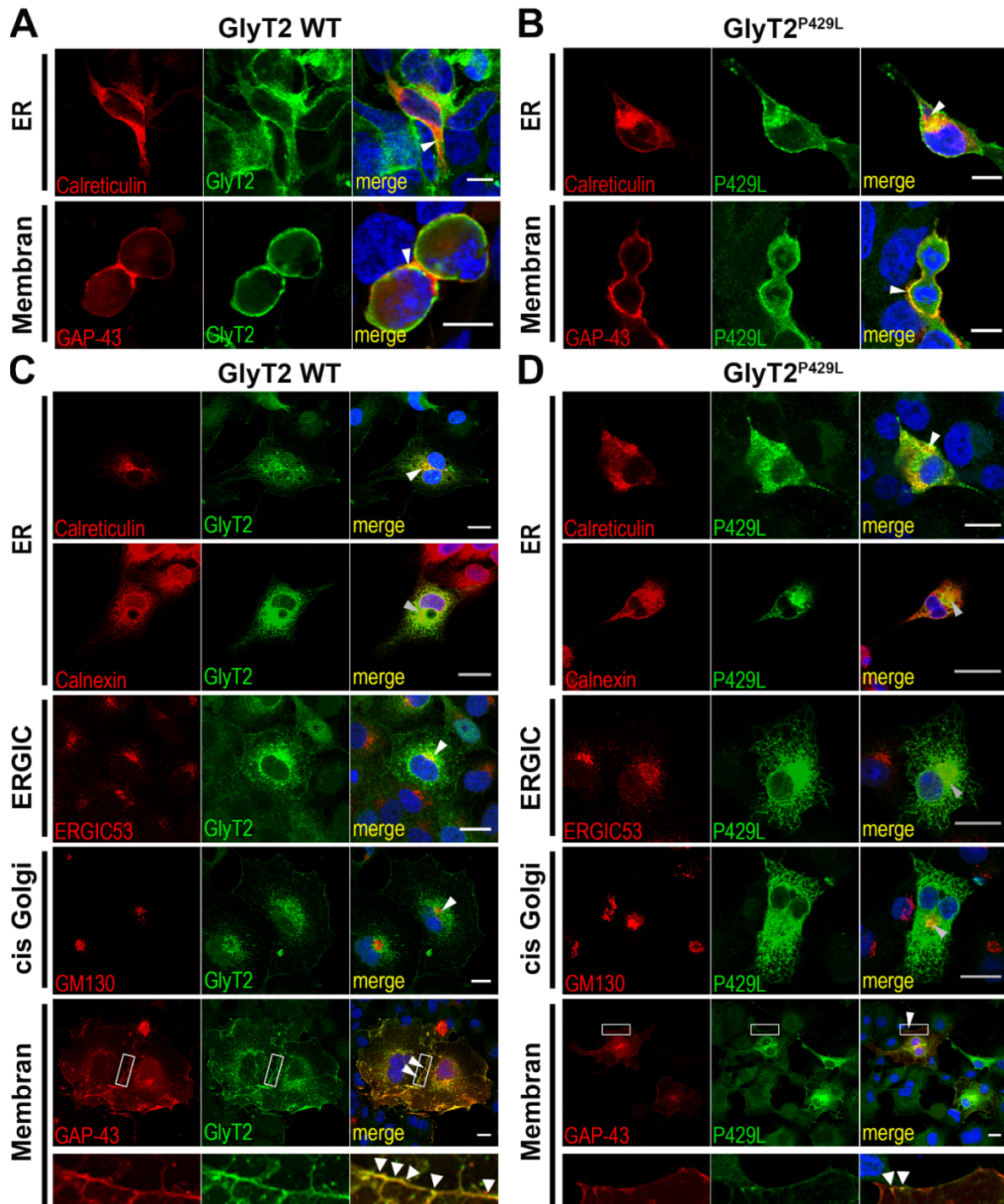


Abbildung 18 Konfokale Mikroskopie immuncytochemischer Färbungen

48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 4 % PFA 4 % Sucrose Lösung fixiert und die Membran mit 0,2 % Triton X-100 permeabilisiert. GlyT2-Protein wurde durch N-terminale Myc-Antikörper (grün) visualisiert, die Zellkerne durch DAPI (blau). Co-Lokalisationen von GlyT2-Protein und jeweiligem Zellkompartiment erscheinen gelb durch Überlagerung des grünen (Protein) und roten (Marker) Kanals. (A–B) HEK293 wurden mit GlyT2-Protein (hGlyT2-Wildtyp oder hGlyT2^{P429L}) und dem Calreticulin-Marker (pDsRed-ER) oder dem Plasmamembranmarker pDsRed-Monomer-Mem (Gap-43) co-transfiziert. Weißer Balken entspricht 10 μ m. (C–D) COS7 Zellen wurden zusätzlich mit entsprechenden Primäntikörpern, die gegen Proteine, die bestimmte Zellkompartimente markieren, gerichtet waren, inkubiert. Calnexin für das ER, ERGIC53 für das Zwischenkompartiment und GM130

markiert den cis-Golgi. Die hGlyT2^{P429L}-Mutante war zwar in der Membran nachweisbar, allerdings mit deutlich abgeschwächtem Signal (siehe Bildausschnitt, untere Zeile in C–D). Dagegen war das hGlyT2^{P429L}-Protein mit angezeigten Zellorganellen co-lokalisiert und innerhalb der Zelle deutlich mehr angereichert verglichen zum hGlyT2-Wildtyp. Maßstab weißer Balken: 20 µm.

3.5 Signifikante erniedrigte Expression von GlyT2^{P429L}

Um weitere Informationen zur Proteinexpression der GlyT2-Varianten nach der immunocytochemischen Analyse zu gewinnen, wurde das CytoBuster-Gesamtzelllysate transfizierter HEK293 Zellen dem Western Blot Verfahren unterworfen. Der verwendete GlyT2-Antikörper (sc-390090) bindet an ein Epitop, das sich in der Nähe des N-Terminus auf den Aminosäurepositionen 50–204 des humanen GlyT2 befand. Im Western Blot erschien der GlyT2 in zwei Proteinbanden. Die 100 kDa-Bande markierte die reife Form des Transporters, die nach Arrabas-Gonzales *et al.* 2013 bis zur Plasmamembran wandert (Lopez-Corcuera *et al.*, 1998; Arribas-Gonzalez *et al.*, 2013). Die unreife, hypoglykosilierte Transporterkomponente war bei 75 kDa als Proteinbande detektierbar (Lopez-Corcuera *et al.*, 1998). GFP-tranfizierte HEK293 Zellen dienten als Negativkontrolle. β -Actin (46 kDa) und Pan-Cadherin (~135 kDa) wurden als Ladekontrollen verwendet. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte durch ECL-Reaktion mit Hilfe von HRP-gekoppelter Sekundärantikörpern. Die Auswertung bzw. Quantifizierung des Gesamtproteins wurde mit Hilfe der Software Fiji (Rasband, W.S., Image J. U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) anhand der Pixeldichte durchgeführt (Schindelin *et al.*, 2012).

Abbildung 19, A zeigt die zwei Banden der P429L Mutation, die im Vergleich zum GlyT2-Wildtyp deutlich schwächer ausgeprägt waren. Erst mit verlängerter Belichtungszeit und vermehrter aufgetragener Proteinmenge waren die Banden der Mutante zunehmend detektierbar (Abbildung 19, B). Die Quantifizierung der CytoBuster-Gesamtzelllysate ergab eine signifikante Reduktion des mutierten GlyT2 im Vergleich zum GlyT2-Wildtyp. Die Expression von GlyT2^{P429L} entsprach demnach nur noch 51,43 % \pm 10,46** (** $p < 0,01$) des GlyT2-Wildtyps (Abbildung 19, E). Dabei wies die 100 kDa-Bande des reifen Transporterproteins eine stärkere Reduktion im Vergleich zur 75 kDa-Bande des unreifen Proteins auf (Abbildung 19, F). Die Expression der 100 kDa-Bande wurde auf 38,67 [%WT] \pm 9,16** (** $p < 0,01$) vermindert, die der 75 kDa-Bande auf nur 65,97 [%WT] \pm 9,45* (* $p < 0,05$). Der Quotient aus reifer/unreifer Transporter (100 kDa/75 kDa) verdeutlicht die ungleichmäßige Reduktion beider Banden in der P429L-

Variante. Da bei der Mutation im Vergleich zum GlyT2-Wildtyp die reife Transporterform stärker reduziert ist als die unreife Form, entspricht der Quotient reifer/unreifer Transporter der Mutante nur noch $54,31 \% \pm 9,48$ des GlyT2-Wildtyps ($100\text{kDa}/75\text{kDa} \pm \text{SEM}: 1,16 \pm 0,08$ für GlyT2-Wildtyp; $0,63 \pm 0,11^{**}$ ($**p < 0,01$) für GlyT2^{P429L}) (Abbildung 19, C–D). Dieses Ergebnis war mit den Ergebnissen der immunocytochemischen Experimente deckungsgleich. Reife Proteine werden ohne Einschränkungen bis zur Membran transloziert, während unreife, defekte Proteine oftmals auf dem sekretorischen Weg zur Membran in bestimmten Zellorganellen zurückgehalten werden und der Degradation zugefügt werden. In mehr als drei voneinander unabhängigen Versuchen wurde diese verminderte Proteinexpression der Mutante bestätigt.

Als nächstes wurde eine Biotinylierung durchgeführt, um den Schwerpunkt der Expressionsanalyse auf die Membranproteine der GlyT2-Varianten in transfizierten HEK293 Zellen zu legen und gleichzeitig mit der Expression der Gesamtproteine zu vergleichen. Beim Biotinylierungsexperiment wurden Membranproteine durch die Bindung von Sulfo-NHS-LC-Biotin markiert und im Anschluss durch Kopplung an Streptavidin-Agarose-Kügelchen vom intrazellulären Protein isoliert. Aus dem Western Blot des Biotinylierungsexperiments ist ersichtlich, dass die Gesamtproteinmenge der Mutation P429L gemäß den CytoBuster-Gesamtzelllysaten stark reduziert war (Abbildung 20, A). Beide Banden (100 kDa und 75 kDa) der Mutante sind im Vergleich zum Wildtyp in der Expression vermindert, wobei die 100 kDa-Bande davon stärker betroffen war als die 75 kDa-Bande. Dieses rein visuell beurteilte Ergebnis ist mit der Quantifizierung der CytoBuster-Gesamtzelllysate identisch. Nach der ebenso rein qualitativen Betrachtung der Membranproteine war bei der GlyT2^{P429L}-Variante im Vergleich mit dem GlyT2-Wildtyp eine deutlich reduzierte 100 kDa-Bande des reifen Transporters innerhalb der Plasmamembran nachweisbar (Abbildung 20, B). Mit einer unreifen 75 kDa-Bande im Membranprotein war nicht zu rechnen, da diese unreife Form die Membran nicht erreicht (Lopez-Corcuera et al., 1998). Das erklärt das Fehlen der unreife Transporterform (75 kDa) im Membranproteinanteil sowohl im GlyT2^{P429L} also auch im GlyT2-Wildtyp.

Da die Proteinmenge des P429L-Gesamtzelllysats signifikant reduziert war ($51,43 \% \pm 10,46$ des GlyT2-Wildtyps) und generell gerade einmal ein Zehntel des Gesamtzelllysats die Membran erreicht, erklärt die Schwierigkeit, einen reifen Transporter an der Zelloberfläche nachzuweisen. Die Proteinanhäufung innerhalb der Zelle, dargestellt in immunocytochemischen Kompartimentfärbungen, und die schwer nachweisbare reife 100 kDa-Proteinbande legen nahe, dass wahrscheinlich der Proteintransport entlang des sekretorischen Weges durch die *missense*

Mutation behindert wird. Dennoch war in immunocytochemischen Färbungen die hGlyT2^{P429L}-Variante, wenn auch in deutlich reduzierter Form, mit dem Plasmamembranmarker co-lokalisiert.

Die starke verminderte Expression der 100 kDa-Bande des hGlyT2^{P429L} im Gesamtzelllysat und der schwach nachweisbare reife Transporter in der Membran im Biotinylierungsexperiment, lässt eine Beeinträchtigung der Transporterfunktion vermuten, die im Folgenden durch den [³H]-Glycin *Uptake Assay* getestet wurde.

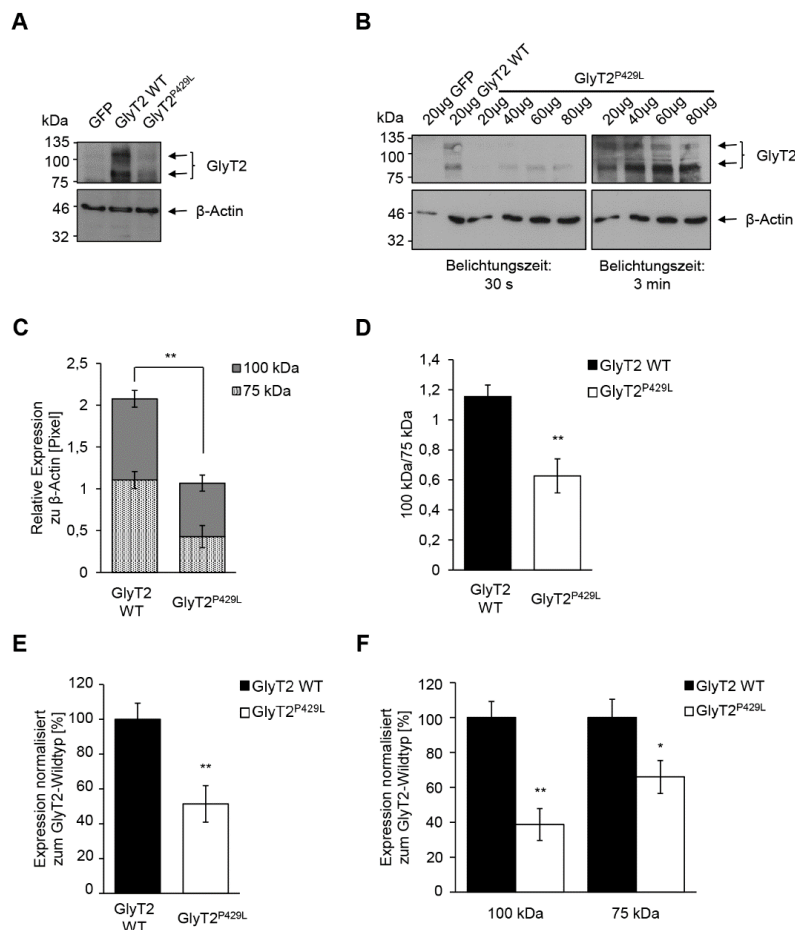


Abbildung 19 Quantifizierungsergebnisse der CytoBuster-Lysate

(A–B) Western Blot der CytoBuster-Lysate aus transfizierten HEK293 Zellen. (A) 30 µg jeder Proteinprobe wurden auf ein 9 % PAA-Gel geladen und mit GlyT2-Antikörper (100 kDa- und 75 kDa-Proteinbande) inkubiert. (B) 20–80 µg für GlyT2^{P429L} pro Spur. (C–F) Die Quantifizierung erfolgte aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten aus drei verschiedenen CytoBuster-Lysaten. (C–D) Absolute Werte [Pixel] mit Hilfe von Fiji ermittelt. (C) Relative Proteinexpression zu β-Actin [Pixel]. (D) Verhältnis reifer/unreifer Transporter (100 kDa/75 kDa). (E–F) Relative Proteinexpression normalisiert zum GlyT2-Wildtyp [%WT]. (E) Prozentsatz des kompletten Transportproteins GlyT2^{P429L} (75 kDa + 100 kDa) zum GlyT2-Wildtyp. (F) Prozentsatz des reifen (100 kDa) und unreifen (75 kDa) Transporters GlyT2^{P429L} zum GlyT2-Wildtyp. Fehlerbalken zeigen Standardfehler (SEM). Grade der Signifikanz (*p*-Wert) durch *Student's t*-Test ermittelt: *, „signifikant“, 0,01 ≤ *p* < 0,05. **, „sehr signifikant“, 0,001 ≤ *p* < 0,01.

Tabelle 39 Proteinexpression von GlyT2-Wildtyp und GlyT2^{P429L}

GlyT2-Variante	unnormalisierte Expression [Pixel]	100kDa/75kDa ± SEM	normalisierte Expression ± SEM [% WT]	normalisierte Expression 100 kDa ± SEM [% WT]	normalisierte Expression 75 kDa ± SEM [% WT]
GlyT2 WT	2,08 ± 0,19	1,16 ± 0,08	100 ± 9,27	100 ± 9,23	100 ± 10,41
GlyT2 ^{P429L}	1,07 ± 0,22**	0,63 ± 0,11**	51,43 ± 10,46**	38,67 ± 9,16**	65,97 ± 9,45*

Grade der Signifikanz (p -Wert) mittels *Student's t*-Test ermittelt: *, „signifikant“, $0,01 \leq p < 0,05$. **, „sehr signifikant“, $0,001 \leq p < 0,01$.

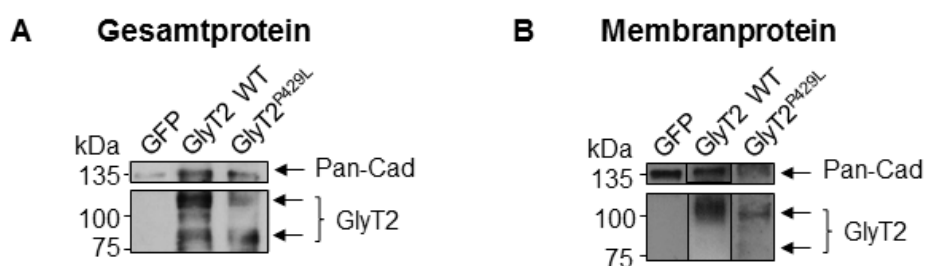


Abbildung 20 Biotinylierungsergebnisse

Vergleich der Gesamtproteinmenge (A) zur Membranproteinmenge (B) des GlyT2-Wildtyps und der GlyT2^{P429L}-Mutante. Transfizierte HEK293 Zellen wurden dem Biotinylierungsexperiment unterworfen und anschließend mit Hilfe des Western Blot Verfahrens unter Verwendung des GlyT2-Antikörpers (100 kDa- und 75 kDa-Proteinbande) analysiert. Als Ladekontrolle diente Pan-Cadherin-Antikörper (135 kDa). Vertikale Linien in (B) zeigen, dass die Proteinbanden des GlyT2-Wildtyps von einem anderen Gel als die des GlyT2^{P429L} und der GFP-Negativkontrolle stammen. Auffällig ist die reduzierte Proteinexpression des GlyT2^{P429L} sowohl im Gesamtprotein als auch im Membranprotein. Insbesondere die 100 kDa-Bande des reifen Transporters ist im Vergleich zu der des GlyT2-Wildtyps sowohl im Gesamt- als auch Membranprotein sichtlich reduziert.

3.6 Charakterisierung der Transportfunktion des GlyT2^{P429L}

Die vorangestellten Proteinexpressionsexperimente haben gezeigt, dass das hGlyT2^{P429L}-Protein im Vergleich zum hGlyT2-Wildtyp weniger exprimiert wurde. Da die Proteinmutante dennoch in einzelnen Zellen nach immunocytochemischen Färbungen in der Membran nachweisbar war, folgte die Untersuchung der Transporterfunktion der GlyT2-Varianten im [³H]-Glycin *Uptake Assay*. Die Glycintransportkapazität wurde in transfizierten HEK293 Zellen bei 37 °C für 10 min getestet. Unterschiedliche [³H]-Glycinkonzentrationen von 25 - 1000 μM Glycin (kaltes + heißes Glycin) des Transportmediums erlaubten die Analyse kinetischer Parameter. Nach Flüssigszintillationsanalyse und Bradford *Assay* (2.8.2) wurde der Mittelwert aus jeweils 8–10 Proben pro GlyT-Variante bestimmt und die aufgenommene

[³H]-Glycinmenge pro mg Protein und pro min errechnet. Die gemessenen DPM-Werte pro GlyT-Variante stammten aus mindestens drei verschiedenen Transfektionsansätzen.

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse der Transportkapazitäten aller GlyT2-Varianten (GlyT2-Wildtyp, GlyT2^{P429L}, 1:1 Co-Transfektion, 1:10 Co-Transfektion) zusammengefasst. Die Messungen der aufgenommenen [³H]-Glycinmenge ergaben, dass die Mutation P429L im GlyT2-Gen einen kompletten Verlust der Transportaktivität verursachte.

Die Abbildung 21, A–B und F zeigen, dass die Mutante keine signifikante [³H]-Glycintransportaktivität in HEK293 Zellen verglichen mit der des GlyT2-Wildtyps aufwies. Unabhängig von der [³H]-Glycinkonzentration des Transportmediums wurde von der GlyT2^{P429L}-Mutante stets eine signifikant reduzierte [³H]-Glycinmenge im Vergleich zum Wildtyp transportiert. Mit dem Vergleich zwischen GlyT2^{P429L} und GlyT2-untransfizierten HEK293 (GFP-Negativkontrolle) war sogar der komplette Funktionsverlust des GlyT2^{P429L} (Abbildung 21, A–B) bewiesen. Das Balkendiagramm in Abbildung 21, G verdeutlicht, dass GlyT2-untransfizierte und GlyT^{P429L}-transfizierte HEK293 Zellen meistens keine signifikanten Unterschiede erreichten. Die gemessenen Transportwerte für die einzelnen [³H]-Glycinkonzentrationen waren sogar bei der GlyT2^{P429L}-Mutante stets niedriger als die der Negativkontrolle. In Abbildung 21, B ist der Totalausfall der Mutante P429L bei einer Transportmediumkonzentration von 250 nM heißem [³H]-Glycin im Balkendiagramm exemplarisch dargestellt.

Der [³H]-Glycin *Uptake Assay* beweist, dass das mutierte Allel ein funktionsloses Protein herstellt, das im kompletten Verlust der Transportaktivität resultiert. Dieser Defekt ist wahrscheinlich auf eine fehlerhafte Proteinfaltung zurückzuführen, die während der Proteinreifung über mehrere Zellorganellen (ER, ERGIC, Golgi) nicht erkannt wird und daher ein vorzeitiger endosomaler Proteinabbau ausbleibt (siehe 3.4, ICC). Ein weiterer negativer Einfluss ist die verminderte Proteinexpression, besonders in der Zelloberfläche (siehe 3.5, WB). Die Co-Transfektionen von GlyT2^{P429L}-Protein und des hGlyT2-Wildtyps (Abbildung 21, C-D) bestätigen die aus der Allelanalyse entwickelte Annahme für einen rezessiven Erbgang sowie für einen bi-allelischen Verlust der GlyT2-Funktion im Fall der erkrankten Kinder (Patient 3 und 5). Die kinetischen Parameter zeigen bezogen auf die ermittelten k_m -Werte, dass die [³H]-Glycinaufnahmekapazität durch eine Co-Transfektion von Wildtyp und Mutante in einem 1:1 Verhältnis im Vergleich zum GlyT2-Wildtyp nicht signifikant verändert wurde. Analog verhielt sich die 1:10 Co-Transfektion von Wildtyp:Mutante im Vergleich zur Mutante alleine. Vergleicht man dagegen die K_m -Werte der 1:1 Co-Transfektion zur Mutante bzw. der 1:10

Co-Transfektion zum Wildtyp war beides mal ein signifikanter Unterschied festzustellen (Abbildung 21, D). In Abbildung 21, D bzw. Tabelle 40 sind die aus OriginPro 2019 (OriginLab, Northampton, MA, USA) ermittelten K_m -Werte aller GlyT2-Varianten nochmals im Überblick tabellarisch aufgelistet. Daraus ist der deutliche Anstieg des K_m -Werts für Glycin bei der Mutante P429L im Vergleich zum Wildtyp direkt ablesbar (K_m : 239 nM \pm 33 für GlyT2-Wildtyp, K_m : 420 nM \pm 27 für GlyT2^{P429L}). Bei einer 1:1 Co-Transfektion (K_m : 272 nM \pm 14) ist lediglich ein leichter Anstieg des K_m -Werts verglichen zum Wildtyp zu beobachten, während er bei der 1:10 Co-Transfektion (K_m : 393 nM \pm 16) nur noch ca. 15 % von dem der Mutante P429L entfernt ist. Im Fall der Heterozygoten (Familienmitglieder 1, 2 und 4) wurde lediglich \sim 1/5 der D463N-Allelvariante ermittelt (siehe 3.2). Demnach wären *in vivo* gerade einmal 20 % für einen funktionsfähigen Glycintransport ausreichend. Bezogen auf das Transporterfunktionsexperiment, würde man auf jeden Fall von einer verminderten Transportkapazität verglichen zum Wildtyp ausgehen. Da aber alle drei Heterozygoten keine Hyperekplexie-Symptome zeigten, kann man davon ausgehen, dass es eventuell im Organismus zur Adaptation kommt und es einen kompensatorischen Mechanismus gibt, der dieses Defizit der Mutante P429L ausgleicht oder sogar einfach ein verminderter Glycintransport in gewissem Maß ohne bemerkenswerte phänotypische Auffälligkeiten bleibt.

Vergleicht man die gemessenen Werte der Transportkapazität des Wildtyps bei einer applizierten Transportmediumskonzentration von 750 nM [³H]-Glycin und 1 mM [³H]-Glycin, ist ein deutlicher Verlust der Transportaktivität zu erkennen (Abbildung 21, A, C). Das heißt, bei einer [³H]-Glycinkonzentration von 1 mM des Transportmediums war die Transportkapazität vermutlich ausgeschöpft.

In Abbildung 21, E sind die mit Hilfe der Software OriginPro 2019 (OriginLab, Northampton, MA, USA) ermittelten v_{max} -Werte aller GlyT2-Varianten im Verhältnis zur maximalen erreichten Reaktionsgeschwindigkeit des GlyT2-Wildtyps im Balkendiagramm dargestellt. Während für den GlyT2-Wildtyp und die 1:1 Co-Expression ähnliche K_m -Werte ermittelt wurden (Abbildung 21, D), ergab sich im Vergleich der v_{max} -Werte ein signifikanter Unterschied. Der v_{max} -Wert des Glycintransports für eine 1:1 Co-Expression von GlyT2-Wildtyp und GlyT2^{P429L} lag nach dem errechneten Origin-Fit bei 6,92 pmol/mg x min \pm 0,41** (** p <0,01) und wurde verglichen mit dem GlyT2-Wildtyp (v_{max} : 8,81 pmol/mg x min \pm 0,54) um ca. 20 % reduziert (v_{max} : 100 [%WT] \pm 6,13 für GlyT2-Wildtyp; v_{max} : 78,55 [%WT] \pm 4,66** mit (** p <0,01) für 1:1 Co-Expression). Die GlyT2^{P429L}-Mutante erreichte v_{max} -Werte von 36,67 [%WT] \pm 3,75 und die der 1:10 Co-Expression

62,09 [%WT] \pm 2,84 des GlyT2-Wildtyps. Somit waren alle GlyT2-Varianten in der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit verglichen zur v_{max} des GlyT2-Wildtyps signifikant reduziert (Abbildung 21, E). Dieses Ergebnis spricht für eine irreversible Hemmung des Transporters durch die Mutation P429L. Selbst durch eine Erhöhung der Substratkonzentration (Glycin) konnte aufgrund der nichtkompetitiven Hemmung des Transporters die maximale Geschwindigkeit des GlyT2-Wildtyps nicht mehr erreicht werden.

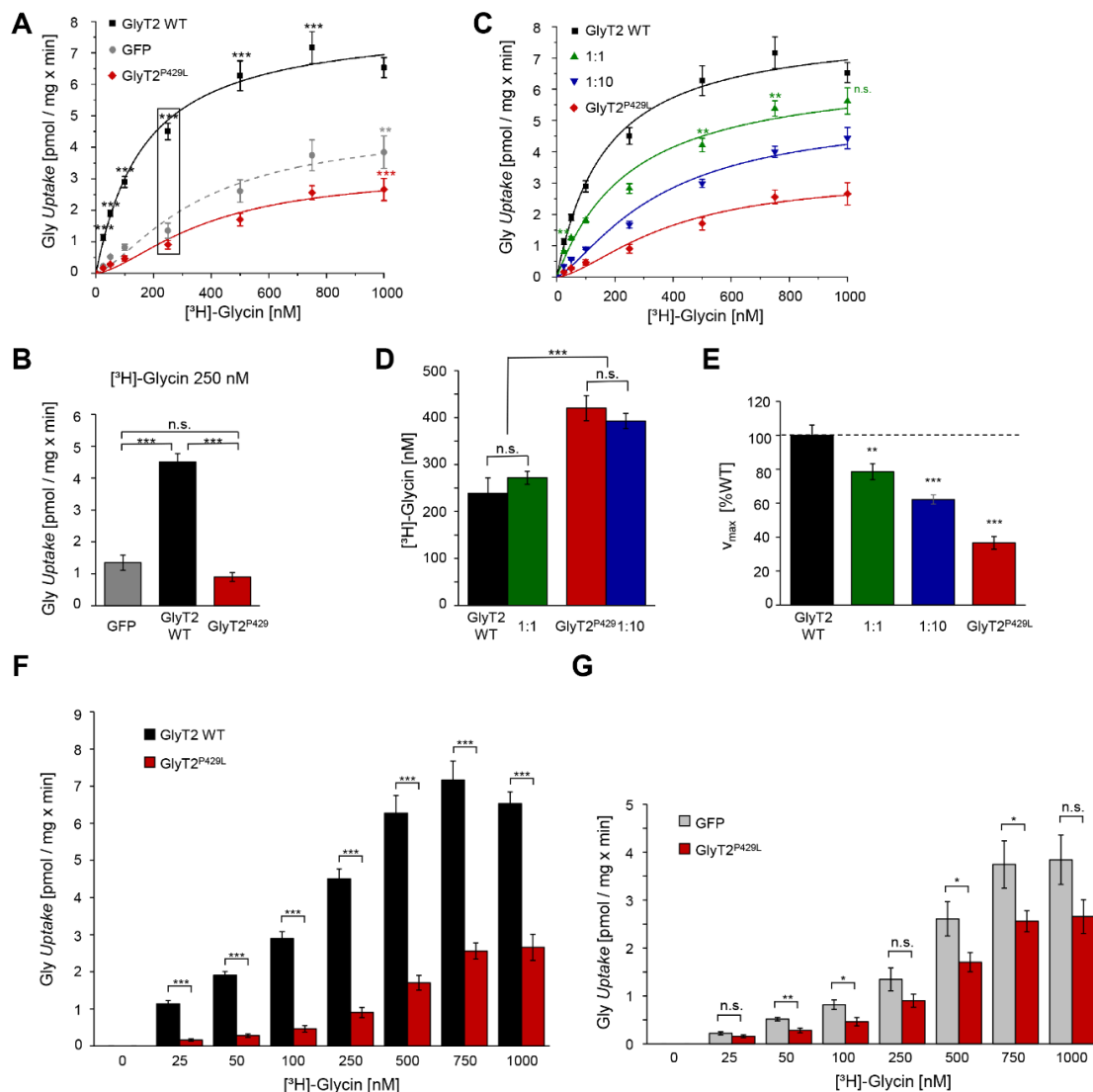


Abbildung 21 Kompletter Funktionsverlust des GlyT2^{P429L}

(A–B) Vergleich der GlyT2^{P429L}-Variante mit GlyT2-Wildtyp und der Negativkontrolle (GFP). (B) zeigt die [³H]-Glycintransportaktivität beispielsweise bei einer [³H]-Glycinkonzentration von 250 nM. (C–E) Co-Transfektion von GlyT2-Wildtyp und GlyT2^{P429L} im Verhältnis 1:1 bzw. 1:10. (D) K_m -Werte wurden durch den Origin Fit generiert. (F–G) Gruppierte Säulendiagramme erlauben den direkten Vergleich der P429L-Mutante zum GlyT2-Wildtyp (F) bzw. zur Negativkontrolle (G) für alle [³H]-Glycinkonzentrationen des Transportmediums auf einem Blick. (F) zeigt die relative Transportaktivität der GlyT2^{P429L}-Variante verglichen zur maximal gemessenen Transportaktivität des GlyT2-Wildtyps [%WT]. Aus (G) ist der Totalausfall der P429L-Mutante im Vergleich mit GFP transfizierten Zellen direkt ablesbar. Fehlerbalken zeigen Standardfehler (SEM). Grade der Signifikanz (p -Wert) durch

Student's t-Test ermittelt: *, „signifikant“, $0,01 \leq p < 0,05$. **, „sehr signifikant“, $0,001 \leq p < 0,01$. ***, „höchst signifikant“, $p < 0,001$. n.s. = nicht signifikanter Unterschied zweier Werte.

Tabelle 40 $[^3\text{H}]$ -Glycin *Uptake Assay*

Bedingungen	GlyT2 WT	GlyT2 WT : GlyT2 ^{P429L} 1:1	GlyT2 ^{P429L}	GlyT2 WT : GlyT2 ^{P429L} 1:10	GFP
0 [nM]	0	0	0	0	0
25 [nM]	1,14 ± 0,09	0,80 ± 0,04	0,16 ± 0,03	0,35 ± 0,01	0,22 ± 0,03
50 [nM]	1,91 ± 0,10	1,24 ± 0,06	0,28 ± 0,05	0,57 ± 0,03	0,52 ± 0,04
100 [nM]	2,90 ± 0,18	1,80 ± 0,07	0,47 ± 0,09	0,90 ± 0,03	0,82 ± 0,10
250 [nM]	4,50 ± 0,26	2,83 ± 0,16	0,90 ± 0,14	1,67 ± 0,10	1,35 ± 0,24
500 [nM]	6,27 ± 0,47	4,21 ± 0,22	1,70 ± 0,20	2,99 ± 0,14	2,61 ± 0,36
750 [nM]	7,16 ± 0,51	5,38 ± 0,25	2,56 ± 0,22	4,00 ± 0,18	3,74 ± 0,49
1000 [nM]	6,53 ± 0,32	5,62 ± 0,42	2,66 ± 0,35	4,44 ± 0,34	3,84 ± 0,52
k_m [nM]	239 ± 33	272 ± 14	420 ± 27	393 ± 16	431 ± 28
v_{max} [pmol/mg x min]	8,81 ± 0,54	6,92 ± 0,41	3,23 ± 0,33	5,47 ± 0,24	5,03 ± 0,60
v/v_{max} [%WT]	100 ± 6,13	78,55 ± 4,66	36,67 ± 3,75	62,09 ± 2,84	57,09 ± 6,81

DPM-Werte ± SEM (Standardfehler): aufgenommene $[^3\text{H}]$ -Glycinkonzentration. K_m - und v_{max} -Werte: Software OriginPro 2019 (OriginLab, Northampton, MA, USA): (Formel 6) $y = v_{max} * x^n / (k^n + x^n)$.

3.7 Strukturanalyse auf Basis des Homologiemodells

Um Einblick in den Einfluss der Mutation P429L auf struktureller Ebene zu erhalten, wurde mit Hilfe von Herrn Dr. Vikram Kasaragod der Arbeitsgruppe Schindelin ein Homologiemodell von GlyT2 erstellt. Beide Mutationen P429L und D463N wurden auf die Struktur abgebildet (Abbildung 22). P429, der Prolinrest der Mutation P429L, ist in der α -Helix 5 lokalisiert. Die zweite Mutationsstelle D463N liegt in der Schleife, die die α -Helices 5 und 6a verbindet. Die Aminosäurereste P429 und D463 sind im Transportermodell markiert (Abbildung 22, A). Diese Darstellung dient lediglich der Beurteilung der Lagebeziehung beider Aminosäurereste im Transporter zueinander und entspricht nicht der nachgewiesenen Situation aus dem Allelsequenzierungsexperiment (siehe 3.2). Da in den Allelproben entweder die Mutation D463N oder P429L nachgewiesen wurde, können beide Mutationen nicht gleichzeitig in einem Protein auftreten. In Abbildung 22, B–C ist die Wechselwirkung der Reste P429 und L429 mit umgebender α -Helix 8 in vergrößerter Ansicht dargestellt. Das Prolin an Position 429 erzeugt nicht nur einen Knick in der α -Helix, sondern beeinflusst auch die Beweglichkeit der benachbarten α -Helix 8. Interessanterweise zeigte eine multiple Sequenzanordnung von humanem GlyT2, Drosophila DAT und prokaryotischem LeuT, dass P429 in beiden eukaryotischen Transportern konserviert ist (Abbildung 22, F). Die Untersuchung von D463

ergab, dass dieser Rest eine Salzbrücke mit K460 in der Schleife zwischen α -Helix 5 und α -Helix 6a bildet (Abbildung 22, D). Die Mutation von D463 zu Asparagin (N463) würde diese Salzbrücke abschaffen, während die Fähigkeit zur Bildung einer Wasserstoffbrücke bestehen bleibt (Abbildung 22, E).

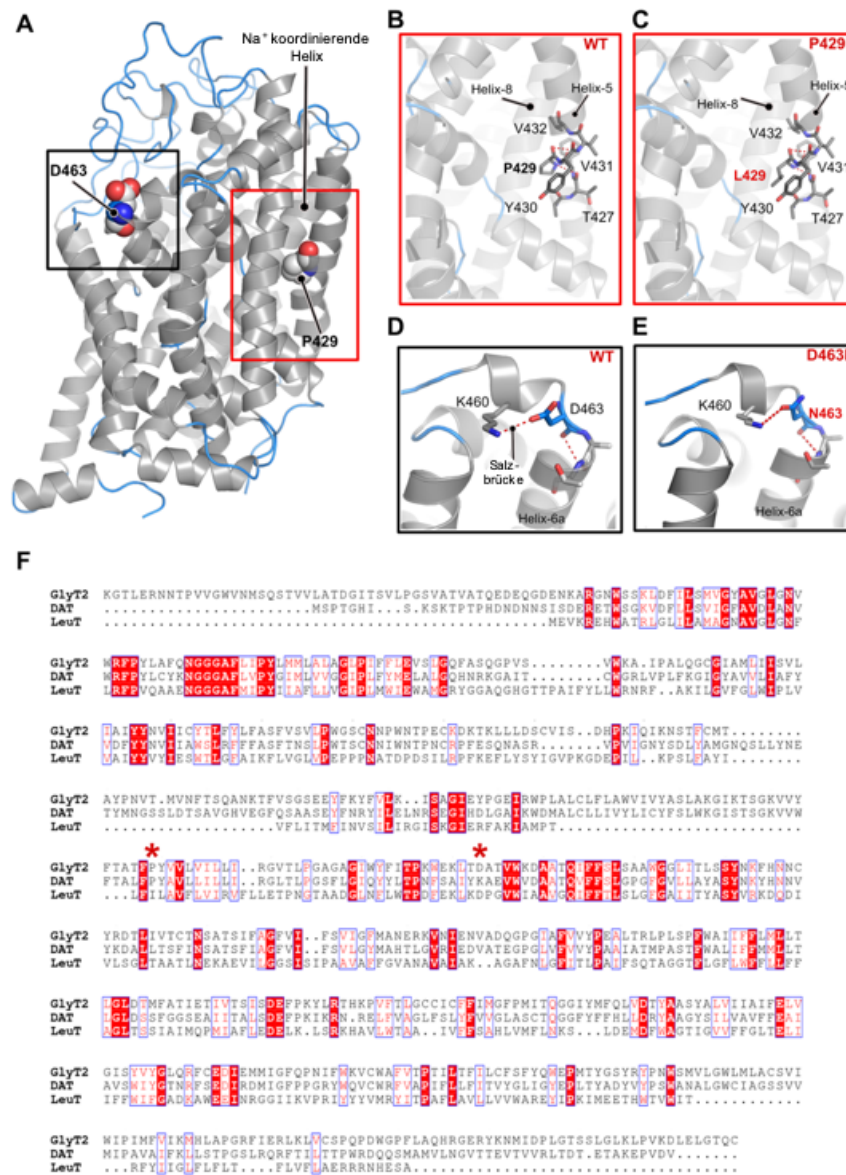


Abbildung 22 Strukturanalyse

(A) Cartoon-Darstellung der Gesamtarchitektur des GlyT2-Modells, wobei die Helices grau und die Schleifen braun gefärbt sind. Die Reste, die für die Mutationen verantwortlich sind, werden in einer raumfüllenden Darstellung angezeigt. (B–C) Vergrößerte Ansichten des P429 und der Mutante L429 mit den mit P/L429 wechselwirkenden Resten, die in einer Stabdarstellung dargestellt sind. (D–E) Vergrößerte Ansichten von D463 und der N463-Mutante, die die Unterbrechung der Salzbrücke zwischen D463 und K460 im Falle der Mutante (C) zeigt. Kritische Reste werden in Stick-Repräsentation dargestellt. (F) Multiple Sequenz-Alignment von humanem GlyT2, Drosophila DAT und bakteriellem LeuT, das durch ESPript erzeugt wurde. Die Stellen der Mutationen sind mit Sternchen markiert.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die *missense* Mutation P429L (c.1286 C > T) als eine neue rezessive Mutation für Hyperekplexie im humanen GlyT2-Gen (*SLC6A5*) identifiziert und beschrieben. In mehreren Studien wurden bereits unterschiedliche *missense*, *nonsense* und *frameshift* Mutationen im humanen GlyT2-Gen identifiziert und als zweithäufigste Ursache für Hyperekplexie (*startle disease*) erklärt (Eulenburg et al., 2006; Rees et al., 2006; Carta et al., 2012). Bislang bekannteste und häufigste Ursache für die neuromotorische Erkrankung sind jedoch Mutationen im Glycinrezeptor (GlyR) α 1-Gen (*GLRA1*) (Shiang et al., 1993; Shiang et al., 1995; Chung et al., 2010), gefolgt von Mutationen in *SLC6A5* (Carta et al., 2012) und *GLRB* (Gen für β -Untereinheit des GlyRs) (Rees et al., 2002; Al-Owain et al., 2012). Präsynaptische GlyT2-Defizite und postsynaptische GlyR-Störungen verursachen beim Menschen und in Nagern einen ähnlichen motorischen Phänotyp (Gomez et al., 2003b; Rees et al., 2006). Phänotypisch-genotypische Analysen zeigten, dass GlyT2-Mutationen im Menschen (Eulenburg et al., 2006; Rees et al., 2006) weniger schwerwiegendere Symptome auslösen als in Mäusen, Hunden oder Rindern (Gomez et al., 2003b; Charlier et al., 2008; Gill et al., 2011). Die Ursachen für Hyperekplexie sind auf neuronaler Ebene in einer gestörten glycinergen Neurotransmission im ZNS zu finden. Folge des gestörten präsynaptischen Glycintransports über GlyT2 bzw. des postsynaptischen veränderten Chlorideinstroms über den GlyR ist eine verminderte Inhibition der Reizweiterleitung vom Rückenmark zu den Muskelfasern. Dadurch werden Muskeln übererregt und verursachen die typischen Hyperekplexie-Symptome, wie Muskelkrämpfe und exzessive Schreckreaktionen auf unerwartete taktile oder akustische Signale (Saenz-Lope et al., 1984; Andermann and Andermann, 1986). Es ist bekannt, dass beim Menschen *SLC6A5*-Mutationen im Vergleich zu *GLRA1*-Mutationen schwerwiegendere klinische Symptome hervorrufen. Tatsächlich leidet die Mehrheit (über 90 %) der Kinder mit *SLC6A5*-assoziierter Hyperekplexie an wiederkehrender Neugeborener-Apnoe (Carta et al., 2012). In schweren Fällen kann die Hyperekplexie aufgrund von Apnoe-Episoden bis hin zum plötzlichen Kindstod (SIDS, *sudden infant death syndrome*) führen (Kirstein and Silfverskiöld, 1958; Nigro and Lim, 1992). In der zu untersuchenden Familie waren zwei der insgesamt drei Kinder an Hyperekplexie erkrankt. Eines der betroffenen Kinder ist bereits im Säuglings-/Kindesalter an der Erkrankung verstorben. SIDS könnte eine Erklärung für den frühen Tod des erstgeborenen Sohnes sein.

4.1 Genetische Risikoabschätzung

Entsprechend der Mehrheit der bislang charakterisierten humanen GlyT2-Mutationen zeigt auch die Mutation P429L ein rezessives Vererbungsmuster (Rees et al., 2006; Harvey et al., 2008; Carta et al., 2012). Vater und Mutter (Familienmitglieder 1 und 2) der Familie sind für die Mutation P429L heterozygot (Allelträger) und weisen keine phänotypischen Auffälligkeiten auf, während dagegen auftretende Homozygotie bei Nachkommen (Patient 3 und 5) zur Erkrankung führte. Obwohl beide Elternteile für eine zweite *missense* Mutation (c.1387 G > A) im selben Exon heterozygot sind, die zur *missense* Mutation D463N auf Proteinebene führt, wurde diese an die betroffenen Kinder (Patient 3 und 5) nicht weitergegeben. Kind 4 besaß denselben Genotyp wie die Eltern (Heterozygotie) und war ebenso symptomlos. Die Tatsache, dass es sich bei der Hyperekplexie um eine sehr seltene Erkrankung in der Bevölkerung handelt und gehäuft in homozygoter oder zusammengesetzt heterozygoter Form vorkommt (Carta et al., 2012), spricht ebenso für eine überwiegend rezessive Erbkrankheit. Weiter zeigten Verhaltenstests heterozygoter GlyT2-*knockout*-Mäuse in der phänotypischen Charakterisierung keinen Unterschied zu GlyT2-Wildtyp-Mäusen. Dies unterstützt die Aussage, dass die präsynaptisch ursächliche Hyperekplexie vorzugsweise mit rezessivem Vererbungsmuster assoziiert ist (Gomez et al., 2003b). Ein Vorkommen dominanter GlyT2-Mutationen ist aber dennoch nicht ausgeschlossen (Arribas-Gonzalez et al., 2015). Grundsätzlich werden rezessive Allele durch die heterozygoten Allelträger an die nächste Generation weitergegeben, bleiben aber stumm. Trifft ein Allelträger auf einen gesunden Partner, bleiben die Nachkommen immer phänotypisch unauffällig und können höchstens Allelträger werden. Bei nicht verwandten Eltern und rezessivem Erbgang liegt für jedes Kind das Risiko ein mutiertes Allel vererbt zu bekommen und zum Allelträger zu werden bei 50 % (Abbildung 23, A). Da beide Elternteile der in dieser Arbeit beschriebenen Familie annähernd dasselbe Verteilungsmuster beider Allelvarianten aufwiesen, ist eine Verwandtschaft nicht auszuschließen. Es ist bekannt, dass bei Verwandtenehen die Verschiebung der Genotypenhäufigkeit hin zu Homozygoten besonders für seltene Allele gefördert wird. Das Risiko, dass zwei abstammungsgleiche Allele aufeinandertreffen und deren homozygote Manifestation zur Ausprägung eines Merkmals oder gar zum Ausbruch der Erkrankung führen, ist deutlich erhöht. Das Ergebnis der Allelsequenzierung der Heterozygoten zeigte eine Häufigkeit der Allelvariante P429L von ca. 80 % und die der Allelvariante D463N lag gerade mal bei ca. 20 %. Diese ungleichmäßige Verteilung der Allelvarianten auf das homologe Chromosomenpaar ist aus humangenetischer Sicht nicht erklärbar. Grundsätzlich muss von einer 50:50 Verteilung beider Allelvarianten ausgegangen werden, da sich bei der geschlechtlichen Fortpflanzung zwei Gameten mit

haploidem Chromosomensatz zu einer diploiden Zygote vereinigen. Das bedeutet, dass Nachkommen immer ein maternales und ein paternales Allel vererbt bekommen. Mögliche Erklärungen für die Gleichgewichtsverschiebung beider Allelvarianten zugunsten der P429L-Variante könnte eine vermehrte Amplifikation oder eine häufigere Insertion der P429L-Allelvariante als die der D463N-Variante in das Vektorgerüst (Ligation) sein. Letztendlich sind beide Elternteile nachgewiesene Allelträger. Diese Situation entspricht einer Kreuzung innerhalb einer F₁-Generation. Nach der Spaltungsregel (2. Mendelsche Regel) erhält man bei der Kreuzung von Individuen der F₁-Generation in der F₂-Generation eine Aufspaltung der Allele im Zahlenverhältnis 3:1 bzw. 1:2:1. Demnach wäre das Risiko Nachkommen mit einer Hyperekplexie-Symptomatik zu bekommen bei 25 %. 50 % wären zumindest Allelträger und die restlichen 25 % würden von beiden Elternteilen jeweils das nicht weiter relevante D463N-Allel vererbt bekommen. Bei der Annahme, dass die Homozygotie für D463N keine Symptome verursacht, wäre die Chance auf gesunde Kinder bei 75 % (Abbildung 23, B).

Evans *et al.* konnte bereits 1999 die zweite Mutation D463N identifizieren und als DNA-Polymorphismus charakterisieren (Evans et al., 1999). Innerhalb der untersuchten Population von 312 US-Bürgern wurde das Allel, das das AAT-Codon anstelle des GAT-Codons (c.1387 G > A) enthält mit einer Häufigkeit von ca. 10 % gefunden, wobei 3 % der Probanden für die Mutation homozygot waren. Im Funktionstest wurden für die GlyT2^{D463N}-Variante und für den GlyT2-Wildtyp ähnliche K_m-Werte ermittelt (162 ± 33 µM für GlyT2^{D463N}; 160 ± 45 µM für GlyT2-Wildtyp). Es konnten somit keine wesentlichen Auswirkungen auf die funktionelle Aktivität des humanen GlyT2 durch die Mutation D463N festgestellt werden. Durch diese Studie wird die Chance auf gesunde Nachkommen der in dieser Arbeit untersuchten Familie mit einer Wahrscheinlichkeit von 75 % unterstützt (Evans et al., 1999).

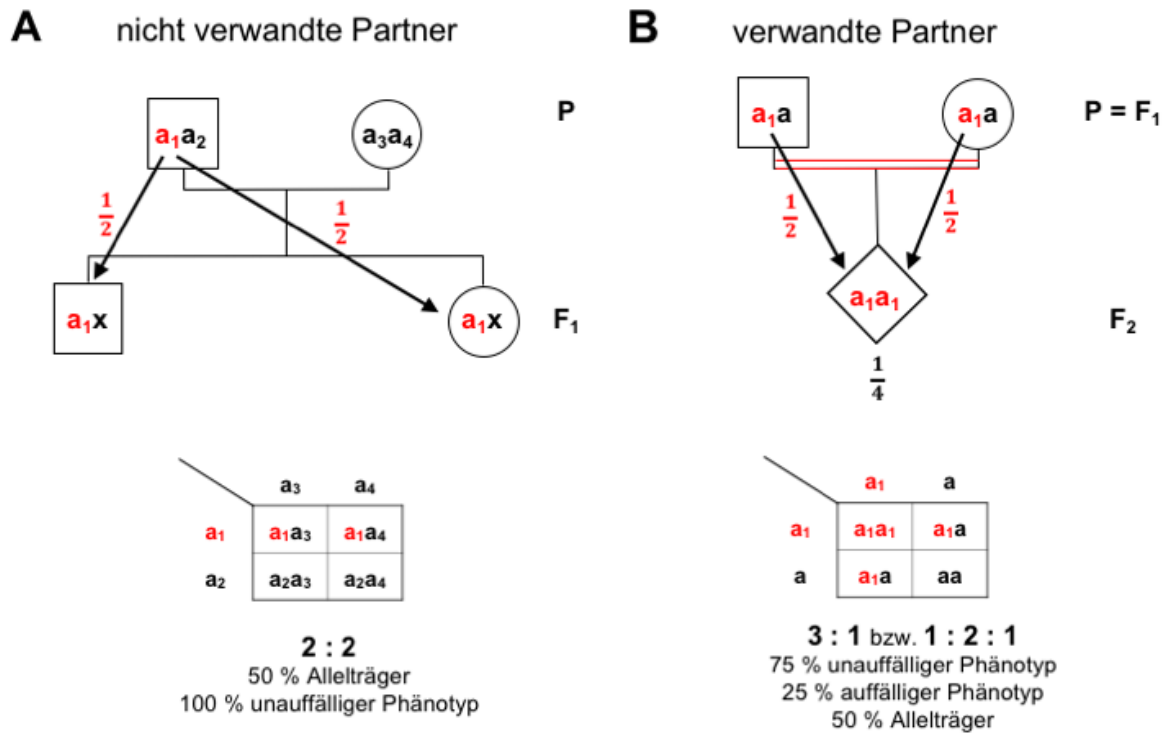


Abbildung 23 Genetische Risikoabschätzung bei rezessivem Vererbungsmuster.

P: Parentalgeneration bzw. Elterngeneration, F₁: 1. Filialgeneration bzw. Tochtergeneration, F₂: 2. Filialgeneration. a_1 , a_2 , a_3 und a_4 stehen für beliebige autosomale Allelvarianten eines bestimmten Gens. Das mutierte Allel a_1 ist zusätzlich mit rot markiert. x symbolisiert ein beliebiges nicht betroffenes Allel (a_2 , a_3 oder a_4). Brüche zeigen an, mit welcher Wahrscheinlichkeit das betroffene Allel a_1 an die nächste Generation vererbt wird. (A) Bei nicht verwandten Partnern liegt die Wahrscheinlichkeit, dass ein betroffenes Allel an die Nachkommen weitergegeben wird bei 50 %. Dabei können diese 50 % bei rezessivem Erbgang höchstens Allelträger werden. Aus dem Kombinationsquadrat ist die Häufigkeit der zwei unterschiedlichen Genotypen gezeigt und das Verhältnis von 2:2 direkt ablesbar. (B) Verwandte Partner besitzen dieselben Allelvarianten, sodass die Parentalgeneration der Situation einer F₁-Generation entspricht. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein betroffenes Allel a_1 des jeweiligen Elternteils an die Nachkommen vererbt wird, ergibt sich aus dem Produkt der Wahrscheinlichkeit, damit $\frac{1}{4}$. Dieselbe Wahrscheinlichkeit für phänotypisch auffällige Nachkommen ergibt sich aus dem Kombinationsquadrat (3:1). Zusätzlich ist daraus die Wahrscheinlichkeit auf Allelträger von 50 % (1:2:1 = a_1a_1 : a_1a : aa) abzulesen.

4.2 Folgen der Prolin-Substitution auf die Proteinexpression

Prolin-Reste in Transmembranhelices spielen für eine richtige Proteinfaltung eine wichtige Rolle. Prolin gehört zu den heterozyklischen Aminosäuren, deren Aminostickstoff Teil einer Ringstruktur ist, sodass es keine Wasserstoffatome zur Ausbildung einer Peptidbindung besitzt. In Membranproteinen erzeugen Prolin-Reste daher Knicke in der α -Helix, die für das enge Packen von Transmembrandomänen unerlässlich sind und eine Stabilisierung des gesamten

Transmembran-Komplexes garantieren (Schmidt et al., 2016). Diese strukturelle Funktion des Prolins ermöglicht wiederum zahlreiche interhelikale Wechselwirkungen. Diese Tatsache macht den Einbau von Prolin an die richtige Position in der Aminosäuresequenz deutlich. Dass sowohl eine Insertion als auch eine Elimination von Prolin-Resten in Transmembranhelices einen signifikanten Effekt auf die lokale Strukturfestigkeit haben, bestätigte die Untersuchung der Mutation L237P und P234T (Carta et al., 2012).

Die in der vorliegenden Arbeit zu untersuchende Mutation P429L des GlyT2 induziert ebenso eine Prolin-Substitution. Anstelle des Prolins wird fälschlicherweise die Aminosäure Leucin an Aminosäureposition 429 des humanen GlyT2-Gens eingebaut. Dadurch entstehen neue Wechselwirkungen zu benachbarten Helices, die fehlgefaltete Proteine mit defekten Proteinstrukturen zur Folge haben können. Oft resultiert diese Proteinfehlfaltung in einer vermehrten Degradation und Aggregation der mutierten Proteine (Bajaj et al., 2007). Generell durchlaufen sekretorische Proteine während der Biosynthese bestimmte Zellkompartimente hintereinander und werden zu reifen Proteinen modifiziert. Im Rahmen dieser Veränderung werden die Proteine zunächst ins Lumen des ER hineinsynthetisiert und dort beispielsweise desaminiert, hydroxyliert oder glykosyliert. Daher erscheint der humane GlyT2, bestehend aus einer reifen glykosylierten 100 kDa-Bande und einer unreifen hypoglykosylierten 75 kDa-Bande, im Western Blot als zwei Proteinbanden (Lopez-Corcuera et al., 1998; Gimenez et al., 2012). Im Lumen des ER erhalten die Proteine ihre native Form und werden danach über Vesikel zum Golgi-Apparat weiter transportiert. Im Golgi-Apparat wird die Proteinmodifizierung beendet. Zusätzlich werden die Proteine im Golgi-Apparat in Vesikel verpackt und mit Signalen markiert, um über das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) an ihren Einsatzort zu gelangen. ER und Golgi-Apparat bilden demnach eine funktionelle Einheit, die den Proteinverkehr regelt. Das heißt, jedes Protein, das seine Aufgabe nicht im Zytosol erfüllt, durchläuft diese Zellkompartimente und wird von dort bei korrekter Proteinstruktur an seinen Zielort geschickt. Gesteuert wird der Proteinverkehr mit Hilfe kleiner G-Proteine und *Coating*-Proteinen. Proteine, die zum Beispiel aufgrund einer Mutation im Genom fehlgefaltet werden und funktionslos sind, bestehen die Qualitätskontrolle der Proteinbiosynthese nicht. Defekte Proteine werden aus dem ER wieder heraustransportiert, dort ubiquitiniert und den Proteasomen zum Abbau zugeführt.

Immuncytochemische Färbungen lassen Rückschlüsse auf die Proteinexpression und Proteinverteilung in der Zelle der GlyT2-Variante im Vergleich zum GlyT2-Wildtyp ziehen. Besonders die Kompartimentanalyse in COS7 Zellen ergab Einblicke in die einzelnen

Stationen, die das GlyT2-Protein während der Reifung durchläuft. Dabei wurde die Co-Lokalisationen des GlyT2 mit den einzelnen Kompartimentmarkern für das endoplasmatische Retikulum, das Zwischenkompartiment ERGIC und den cis-Golgi sowohl beim GlyT2-Wildtyp als auch bei der GlyT2^{P429L}-Mutante bestätigt. Die Unterschiede in den Signalintensitäten innerhalb der Zelle und in der Plasmamembran bei der GlyT2^{P429L}-Mutante im Vergleich zum GlyT2-Wildtyp deuten auf eine verminderte Proteinexpression hin. Es ist denkbar, dass die GlyT2^{P429L}-Mutante aufgrund der Proteinfehlfaltung in der Zelle zurückgehalten und das Protein in seiner unreifen Form größtenteils der Degradation zugeführt wird. Dennoch war die P429L-Variante vereinzelt in der Plasmamembran nachweisbar. Dies deutet auf einen generell funktionierenden Proteintransport hin.

Die immunocytochemischen Ergebnisse zur Proteinexpressionsanalyse und zum Proteintransport innerhalb der Zelle konnten mittels proteinbiochemischer Methode im Western Blot-Verfahren verifiziert werden. Die Expressionsanalyse der Proteinlysate hat gezeigt, dass GlyT2^{P429L} im Vergleich zum GlyT2-Wildtyp in seiner gesamten Proteinmenge signifikant reduziert ist. Tatsächlich ergab die Quantifizierung der reifen und unreifen Transporterform (100 kDa + 75 kDa) eine signifikante Reduktion der Mutante auf $51,43 [\%WT] \pm 10,46$ des hGlyT2-Wildtyps. Daraus folgt, die Mutation P429L in GlyT2 behindert signifikant die Proteinsynthese in HEK293 Zellen. Zudem ergab der Quotient aus reifem zu unreifem Transporter (100 kDa/75 kDa) (Lopez-Corcuera et al., 1998) beim GlyT2-Wildtyp $1,16 \pm 0,08$, während der Quotient der GlyT2^{P429L}-Variante bei lediglich $0,63 \pm 0,11$ lag. Das Verhältnis von reifem zu unreifem Transporter ist beim GlyT2-Wildtyp nahezu ausgeglichen. Da der Quotient mit $1,16 \pm 0,08 > 1$ ist, überwiegt der Anteil des reifen Transporters, wie es bei einer erfolgreichen Proteinbiosynthese zu erwarten ist. Aus dem Quotienten der Mutation P429L $0,63 \pm 0,11 < 1$ ist dagegen abzulesen, dass die unreife Transporterform (75 kDa-Bande) der P429L-Variante in etwa doppelt so häufig verglichen zur reifen Form (100 kDa-Bande) vorliegt. Die vermehrte Expression des unreifen Transporters der P429L-Variante indiziert entsprechend den immunocytochemischen Färbungen eine Störung in der Proteinbiosynthese zum reifen Transporter. Zusammengefasst lässt sich aus der Expressionsanalyse der immunocytochemischen und proteinbiochemischen Experimente sagen, dass die P429L-Mutante des GlyT2 einen vermutlich fehlgefalteten Transporter erzeugt, der größtenteils innerhalb der Zelle zurückgehalten wird und den verminderten Membranproteinnachweis für die Mutante erklärt.

Expressionsanalysen bisheriger Studien ergaben vergleichbare Ergebnisse. Beispielsweise zeigte die Mutation Y705C (Gimenez et al., 2012) in immuncytochemischen Färbungen von co-transfizierten MDCK Zellen mit GlyT2-Varianten und Plasmamembranmarker eine signifikante Reduktion in der Membranproteinexpression. Der Prozentsatz der Co-Lokalisation der Y705C-Variante mit Plasmamembranmarker ergab $76,8 \% \pm 2,3$ des GlyT2-Wildtyps. Ebenso zeigte die Mutation Y705C einen höheren Anteil an unreifem Transporter verglichen zum GlyT2-Wildtyp, sodass das Verhältnis ähnlich der in dieser Arbeit untersuchten Variante P429L zwischen reifem und unreifem Transporter (100 kDa/75 kDa) für die Y705C-Mutante bei 50 % des GlyT2-Wildtyps lag.

Anhand der Tatsache, dass von der Zelle signifikant weniger Gesamtprotein für die Mutante im Vergleich zum GlyT2-Wildtyp synthetisiert wird, ist eine Reduktion des Membranproteinanteils eine schlüssige Konsequenz. Deutlich weniger Membranprotein wurde für die GlyT2^{P429L}-Variante qualitativ bestimmt.

In allen proteinbiochemischen Analysen lag die Detektion der GlyT2^{P429L}-Mutante an der Detektionsgrenze. Eine mögliche Ursache kann die starke Verankerung des Transporters mit insgesamt 12 TM-Domänen in der Membran sein und dies könnte sich somit ungünstig auf dessen Solubilisierung aus der Membran auswirken. Zusätzlich liegt der GlyT2 als Dimer vor. Eine Alternative wäre die Herstellung der Lysate über die Membranpräparation. Durch diese Methode wäre garantiert, dass die Membranproteine von der Membran gelöst werden würden und danach besser detektiert werden könnten. Eine weitere Ursache für die Nachweisproblematik speziell der GlyT2^{P429L}-Membranproteine könnte in der ermittelten geringen Toleranz des mutierten Transporters für hohe Temperaturen liegen. Für das Lösen der nicht kovalenten Bindung Streptavidin-Biotin werden vom Hersteller Temperaturen von 90 °C empfohlen. Allerdings führen diese hohen Temperaturen beim GlyT2^{P429L} zur Proteindegradation, sodass der GlyT2-Antikörper sein Epitop möglicherweise nicht mehr erkennt. Die höchsttolerante Temperatur lag bei 65 °C, besser waren allerdings 37 °C. Nach Herstellerangaben wird bei Temperaturen von 90 °C und 65 °C eine Elutionseffizienz von ca. 96 % erreicht. Bei Temperaturen von 37 °C liegt diese bei gerade mal 41,9 %.

Die mutierte Variante P429L wurde eindeutig in der Plasmamembran lokalisiert. Daher sollte ein Glycinaufnahmetest Aufschluss über die Funktionalität des membranständigen mutierten GlyT2 geben.

4.3 Die Mutation P429L führt zum Verlust der Transportfunktion

Veränderungen interhelikaler Wechselwirkungen durch Prolin-Substitutionen verursachen nicht nur Proteinfehlfaltungen und Proteininstabilitäten, sondern beeinflussen auch die Substrataffinität. Durch den Aminosäureaustausch entstehen unter den Transmembrandomänen neue Konfigurationen oder sogar Konformationen, sodass für den Substrattransport essentielle Bindungsstellen im Kern des Transporters abgeschafft werden. Da GlyT2 den Na⁺/Cl⁻-abhängigen Transportern angehören bzw. Mitglieder der NSS (Neurotransmitter Sodium Symporter) -Familie sind, benötigen sie den elektrochemischen Gradienten für Natrium und Chlorid, um ihr Substrat über die Phospholipiddoppelschicht zu bewegen (He et al., 2009). Das heißt, für den Symport sind die zwei Ionen Natrium und Chlorid essentiell. Deshalb wurde der [³H]-Glycin *Uptake Assay* unter Verwendung des HBS-Puffers pH 7,4 (5 mM KCl; 1 mM MgSO₄; 10 mM HEPES-Tris; 10 mM Glucose; 1 mM CaCl₂; 150 mM NaCl) durchgeführt, um in der Reaktionsumgebung für eine optimale Konzentration an Natrium und Chlorid zu garantieren. In der Kristallstrukturanalyse des bakteriellen Homologs LeuT_{Aa} wurden bisher zwei Natriumbindestellen, Na1 und Na2, identifiziert (Yamashita et al., 2005). Es wird vermutet, dass Na1 als häufig vorkommende und sehr konservierte Bindestelle in allen Mitgliedern der NSS-Familie vorkommt (Yamashita et al., 2005). In GAT1, SERT (Penado et al., 1998) und DAT (Chen and Reith, 2003) wurden für die Natriumbindung involvierten Strukturelemente TM1, TM6 und TM7 bereits identifiziert. Transporter mit einer 2:1 (GlyT1) oder 3:1 (GlyT2) Stöchiometrie besitzen weitere Natriumbindestellen. Dabei ist die Na2-Bindestelle im Gegensatz zu Na1-Bindestelle weniger konserviert und die Lokalisation für das dritte Natriumion ist bis jetzt unbekannt. Basierend auf der LeuT_{Aa}-Struktur legt die enge Lagebeziehung von Natrium- und Substratbindestelle im Kern des Transporters nahe, dass zwischen dem Natriumion und dem Substrat eine direkte oder zumindest eine indirekte Interaktion existiert (Yamashita et al., 2005). Yamashita *et al.* vermuten, dass durch die Bindung des Natriumions die Substratbindestelle erst organisiert wird, um eine angemessene Substrataffinität zu erreichen (Yamashita et al., 2005). Die Natriumbindung ist somit Voraussetzung für die Substratbindung mittels Kopplungsmechanismus. Das bedeutet, sobald eine Mutation im *SLC6A5*-Gen einen negativen Effekt auf die Natriumbindungsstelle hat, ist die Transportfunktion eingeschränkt bis defekt. Im Gegensatz dazu wird dem Chloridion eine geringere Relevanz zugeschrieben, da der [³H]-Leucin-Transport durch LeuT_{Aa} keine Chlorid-Abhängigkeit zeigte (Yamashita et al., 2005). Allerdings wurde diese Aussage bereits durch die Charakterisierung der Mutation S513I widerlegt (Carta et al., 2012).

Unsere Tests auf funktioneller Ebene zeigten bei der GlyT2^{P429L}-Variante einen kompletten Verlust der Transportaktivität. Im Vergleich zu GlyT2-untransfizierten HEK293 Zellen (Negativkontrolle) war die GlyT2^{P429L}-Variante im [³H]-Glycin *Uptake Assay* zu keiner signifikanten [³H]-Glycin-Aufnahme fähig. Die bisherigen immunocytochemischen und proteinbiochemischen Untersuchungsergebnisse der P429L-Mutation sprechen übereinstimmend für eine Problematik in der Proteinexpression, jedoch nicht im Proteintransport zur Plasmamembran während der Proteinbiogenese. Basierend auf diesen bisherigen Ergebnissen ist die Annahme auf eine reduzierte Transportfunktion nachvollziehbar und berechtigt. Jedoch wurde diese schlüssige Konsequenz im [³H]-Glycin *Uptake Assay* nicht bestätigt und es konnte lediglich ein kompletter Verlust der Transportaktivität der P429L-Variante festgestellt werden.

Vorherige Studien haben gezeigt, dass der Verlust des Substrattransports in unterschiedlichen pathologischen Mechanismen begründet ist. Eine Ursache für den kompletten Funktionsverlust des Transporters ist beispielsweise ein vorzeitiger Proteinstrangabbruch der GlyT2-Polypeptidkette während der Proteinbiosynthese. Eulenburg *et al.* zeigte, dass die *missense* Mutation Y377X im Einbau eines vorzeitigen Stopp-Codons resultiert (Eulenburg *et al.*, 2006). Dieses verursacht wiederum einen vorzeitigen Proteinstrangabbruch innerhalb der EL2-Domäne. Es entsteht ein Proteinfragment des GlyT2, das entsprechend den Ergebnissen des [³H]-Glycin *Uptake Assay* die Fähigkeit für den Glycintransport komplett verliert. Jedoch ist der vorzeitige Proteinstrangabbruch als Ursache für einen funktionslosen Transporter nicht für den GlyT2 mit der Mutation P429L zutreffend, da molekulargenetische Untersuchungen weder den Einbau eines Stopp-Codons ergaben noch in der proteinbiochemischen Analyse kleinere Proteinfragmente nachgewiesen wurden.

Es muss also weitere pathologische Mechanismen für den kompletten Ausfall der Transportaktivität geben, die tatsächlich bereits in vorherigen Studien beschrieben wurden. Beispielsweise untersuchten und beschrieben Rees *et al.* bereits 2006 zwei Mutationen im GlyT2, die trotz Erreichen der Plasmamembran, nicht funktionsfähig waren (Rees *et al.*, 2006). Dabei handelte es sich um die Mutationen W482R in TM6 und N509S in TM7. Rees *et al.* vermuteten damals Störungen in der Koordination der Glycinbindestelle (W482R) bzw. der Natriumbindestelle (N509S) für den Funktionsverlust (Rees *et al.*, 2006).

Die Untersuchung weiterer Mutationen im *SLC6A5*-Gen durch Carta *et al.* ergab, dass für Störungen der Transportfunktion die Bindestellen für Natrium und Glycin nicht immer direkt betroffen sein müssen (Carta *et al.*, 2012). Folgende pathologische Mechanismen werden in

funktionslosen Transporter-Varianten durch unterschiedliche Mutationen vermutet: negativer Effekt auf die Konformation der TM2 (L237P, P243T), indirekte Beeinflussung der Glycinbindestelle (A275T, E248K) oder der Natriumbindestelle (A275T, S513I), direkter Effekt auf die Chloridbindestelle (S513I), Einschränkung der Beweglichkeit des EL (*external loop*) 4 (F547S) sowie die Substitutionen innerhalb der intrazellulären TM10-TM11-Schleife (Y656H, G657A), die zu weiteren Interaktionen führen und dadurch die Transportfunktion einstellen. Interessanterweise konnte in dieser Studie mit der Mutation S513I, anders als von Yamashita *et al.* auf Basis des LeuT_{Aa} vorhergesagt, bestätigt werden, dass die Chloridbindestelle für den Transport wie die Natriumbindestelle eine Schlüsselrolle erfüllt (Carta *et al.*, 2012). Diese Annahme ist nicht weit hergeholt, wenn man bedenkt, dass es sich beim GlyT2 um einen Na⁺/Cl⁻-abhängigen Transporter handelt (He *et al.*, 2009).

Nachdem die Funktionstests den Totalausfall der Transportaktivität für die Mutation P429L zeigten, erfolgte dasselbe Experiment mit GlyT2-Wildtyp und GlyT2^{P429L} co-transfizierten HEK293 Zellen. Das 1:1 Verhältnis zwischen GlyT2-Wildtyp und GlyT2^{P429L} entsprach der Transportersituation der Eltern und des einzig gesunden Kindes (Familienmitglieder 1, 2 und 4) unter der Annahme, dass die zweite heterozygote Mutation D463N keine Hyperekplexie-Symptome auslöst und demnach in der Funktion dem GlyT2-Wildtyp entspricht (Evans *et al.*, 1999). Beide Elternteile und Kind 4 sind phänotypisch unauffällig. Die Co-Expression von GlyT2-Wildtyp und GlyT2^{P429L} in einem 1:1 Verhältnis zeigten bezogen auf den k_m -Wert keinen signifikanten Effekt auf die Transportfunktion. Dieses Ergebnis bestätigt zum einen erneut die Aussage, dass die Mutation P429L ein rezessives Vererbungsmuster aufweist. Weiter kann man vermuten, dass durch die Co-Expression von GlyT2-Wildtyp-Protein und P429L-Protein insgesamt ein funktionsfähiger Transporter entsteht, wobei der Totalausfall des P429L-Proteins durch das Vorhandensein von 50 % des GlyT2-Wildtyps ausgeglichen wird.

Entsprechend der LeuT_{Aa} Kristallstruktur bilden GlyT2 Dimere bestehend aus zwei Transporter-Untereinheiten (Monomere), die zueinander eine parallele Orientierung einnehmen (Yamashita *et al.*, 2005; Bartholomäus *et al.*, 2008). Nach dem LeuT_{Aa}-Homologiemodell bildet sich die Dimer-Grenzfläche aus den Strukturelementen EL2, TM9 und TM12, wobei TM9 und TM12 mit ihren jeweiligen Symmetriepartnern ein Bündel aus vier α -Helices bilden (Yamashita *et al.*, 2005). Diese Quartärstruktur wurde unter anderem bereits in SERT-Transportern zwischen TM11 und TM12 beobachtet (Just *et al.*, 2004). Nicht auszuschließen ist, dass NSS- (Neurotransmitter-Sodium-Symporter) Mitglieder sich zu Oligomeren zusammenschließen können (Just *et al.*, 2004; Fernandez-Sanchez *et al.*, 2008). Beruhend auf

der Dimer-Struktur (Bartholomäus et al., 2008) wird sich bei der 1:1 Co-Expression von GlyT2-Wildtyp-Protein und GlyT2^{P429L}-Protein der Wahrscheinlichkeit nach zu 50 % der Fälle eine Wildtyp-Proteinuntereinheit und eine mutierte Proteinuntereinheit (P429L) zum Dimer verknüpft. Zu jeweils 25 % schließen sich zwei identische Proteinuntereinheiten (zwei Wildtyp-Monomere oder zwei P429L-Monomere) zum Dimer zusammen. Unter diesen Voraussetzungen liegt die Vermutung nahe, dass durch den kombinierten Transporter aus Wildtyp- und P429L-Protein, der Substrattransport durch das Wildtyp-Monomer aufrechterhalten werden kann. Gleichzeitig wird diese Annahme durch den unauffälligen Phänotyp der Familienmitglieder mit heterozygotem Genotyp für P429L unterstützt. Die Transportfähigkeit bei einer 1:1 Co-Expression von GlyT2-Wildtyp und GlyT2^{P429L} war leicht reduziert aber nicht signifikant verändert. Wurde ein 1:10 Verhältnis zugunsten der GlyT2^{P429L}-Variante gewählt, setzen sich die Dimere größtenteils aus zwei P429L-Protein-Monomeren zusammen, die insgesamt einen funktionslosen Transporter bilden. Die höhere Transportaktivität der 1:10 Co-Expression im Vergleich zur GlyT2^{P429L}-Variante erklärt sich aus der geringen Wahrscheinlichkeit, mit der zwei GlyT2-Wildtyp-Monomere oder eine Kombination aus GlyT2-Wildtyp und GlyT2^{P429L} zum Dimer zusammenfinden.

Die Analyse der Transportaktivität bei Co-Expression von GlyT2-Wildtyp und GlyT2^{P429L} unter bestimmten Verhältnissen erfolgte anhand der Michaelis-Menten-Kinetik. Die Michaelis-Menten-Konstante K_m entspricht der Substratkonzentration, bei der eine enzymatische Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit ($\frac{1}{2} v_{max}$) abläuft. Anders ausgedrückt ist K_m die Substratkonzentration (Glycinkonzentration), bei der genau die Hälfte des Enzyms (GlyT2) als Enzym-Substrat-Komplex vorliegt. Somit ist K_m in erster Linie ein Maß für die Affinität des Glycins zum Transporter. Je kleiner der K_m -Wert bzw. je niedriger die Substratkonzentration ist, bei der der GlyT2 mit $\frac{1}{2} v_{max}$ arbeitet, desto höher ist seine Affinität zum Substrat und desto stabiler ist der Glycin-Transporter-Komplex. Im Fall der GlyT2^{P429L}-Mutante oder der 1:10 Co-Transfektion von GlyT2-Wildtyp und GlyT2^{P429L} erhielt man verglichen zum GlyT2-Wildtyp oder einer 1:1 Co-Transfektion signifikant höhere k_m -Werte. Das bedeutet, aufgrund der signifikant reduzierten Bindungsstärke der GlyT2^{P429L}-Mutante zum Glycin bedarf es viel mehr an Substratkonzentration (Glycin), um die $\frac{1}{2} v_{max}$ zu erreichen. Die signifikante Reduktion der Glycinaffinität zum mutierten Transporter im Vergleich zum GlyT2-Wildtyp könnte in der bereits vermuteten Proteinfehlfaltung liegen, die vermutlich die Substratbindestelle behindert oder sogar unzugänglich macht.

Während die k_m -Werte für GlyT2-Wildtyp und die 1:1 Co-Transfektion von GlyT2-Wildtyp und GlyT2^{P429L} ähnlich waren und damit die Affinität zum Glycin weitestgehend konstant blieb, wiesen dagegen die v_{max} -Werte einen signifikanten Unterschied auf. Allgemein hängt die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei konstanten Umgebungsbedingungen (Temperatur, pH-Wert) von der Transporterkonzentration sowie der Substratkonzentration ab. Beide Faktoren konnten im [³H]-Bindungstest dieser Arbeit zum einen durch die zusätzliche Proteinkonzentrationsbestimmung *pro well* und zum anderen durch die Substratsättigung des Transporters mit Glycin eliminiert werden. Da selbst durch die Erhöhung der Substratkonzentration alle GlyT2-Varianten (1:1 Co-Expression, 1:10 Co-Expression, GlyT2^{P429L}) die maximale Reaktionsgeschwindigkeit des GlyT2-Wildtyps nicht mehr erreichen konnten, ist eine kompetitive Hemmung ausgeschlossen. Daraus lässt sich eine irreversible Hemmung des Transporters durch die Mutation P429L ablesen.

Bei einer 1:1 Co-Transfektion von GlyT2-Wildtyp und GlyT2^{P429L} würde man aufgrund der irreversiblen Hemmung des Transporters durch die Mutation P429L von einer Reduktion der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit um 50 % verglichen zur v_{max} des GlyT2-Wildtyps ausgehen. Interessanterweise wurde die v_{max} der 1:1 Co-Transfektion jedoch um lediglich ca. 20 % reduziert. Eine Erklärung liefert die Dimerisierung zweier Proteinuntereinheiten, die der Wahrscheinlichkeit nach in 75 % funktionsfähige Transporter generieren. Somit kann in ca. 75 % durch die Verknüpfung einer Wildtyp-Proteinuntereinheit und einer mutierten Proteinuntereinheit zum Dimer die Transportfunktion weitestgehend aufrechterhalten werden. Tatsächlich entsprach die Transportkapazität für die 1:1 Co-Expression 78,55 [%WT] ± 4,66 des GlyT2-Wildtyps. Heterozygote Familienmitglieder der zu untersuchenden Familie wiesen keine Hyperekplexie-Symptomatik auf. Die 1:1 Co-Expression von GlyT2-Wildtyp und GlyT2^{P429L} entsprach der Transporterfunktion der Heterozygoten. Demnach würde eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von ca. 80 % des GlyT2-Wildtyps ausreichen, um keine Hyperekplexie-Symptomatik zu entwickeln. Allerdings bleibt zu berücksichtigen, dass sich die Kurve asymptotisch der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit nähert, dass wiederum die Schwierigkeit, die v_{max} -Werte genau zu berechnen, erklärt. Der k_m -Wert entspricht dagegen exakt der Substratkonzentration, bei der die $\frac{1}{2} v_{max}$ erreicht wird. Aus diesem Grund wurde der k_m -Wert gegenüber dem v_{max} -Wert bei der Auswertung bevorzugt.

Zusammengefasst kann man sagen, dass im Dimer die fehlende Transportfunktion der P429L-Variante durch die GlyT2-Wildtyp-Untereinheit kompensiert wird. Es liegt nahe, dass Aminosäuresubstitutionen neue Wechselwirkungen zwischen den Transmembrandomänen

generieren. Kommen diese in hoch konservierten Domänen vor, ist mit großer Wahrscheinlichkeit ein Strukturelement mit essentieller Funktion für die Transportfähigkeit betroffen. Dazu gehören insbesondere Strukturen, die im Kern des Transporters lokalisiert sind, wo die Bindungsstelle für das Natriumion und das Substrat lokalisiert sind. Diese relevanten Domänen werden hauptsächlich von den unterbrochenen Strukturelemente TM1 und TM6, die beim Substrattransport direkt beteiligt sind, gebildet. Sobald relevante Strukturen direkt oder indirekt gestört sind, sind Interaktionen von Ionen und Substrat nicht mehr möglich, sodass die Transportfähigkeit komplett verloren geht.

Rees *et al.* untersuchte 2006 die Mutationen W482R und N509S. Obwohl beide Transporter-Varianten bis in die Plasmamembran transloziert wurden, war kein Glycintransport nachweisbar (Rees *et al.*, 2006). Rees *et al.* vermuteten damals Störungen in der Koordination der Glycinbindestelle bzw. der Natriumbindestelle (Rees *et al.*, 2006). Da dieselbe Kombination aus uneingeschränktem Proteintransport bis zur Membran und dem kompletten Funktionsverlust mit der bisherigen Charakterisierung der GlyT2^{P429L}-Variante übereinstimmt, kann vom selben pathologischen Mechanismus ausgegangen werden. Diese Vermutung sollte basierend auf einem DAT-Homologiemodell auf struktureller Ebene mit Hilfe von Herrn Dr. Vikram Kasaragod (Rudolf-Virchow-Zentrum Würzburg, Strukturbiologie, Gruppe Hermann Schindelin) näher untersucht werden.

4.4 α -helikale Struktur geht durch die Mutation P429L verloren

Die Strukturanalyse gibt eine mögliche Erklärung für die signifikant reduzierte Bindungsstärke des GlyT2^{P429L} zum Glycin verglichen zum GlyT2-Wildtyp. Die *in silico* Mutationsanalyse legt nahe, dass das Prolin der P429L-Mutation nicht nur einen Knick in der α -Helix erzeugt, sondern auch die Beweglichkeit der benachbarten α -Helix 8 beeinflusst. Interessanterweise ist die α -Helix 8 im GlyT2-Modell entsprechend der Helix 8 beim DAT (Penmatsa *et al.*, 2013) bei der Bindung eines Natriumions beteiligt. Die Vermittlung der Natriumbindestelle spielt eine entscheidende Rolle beim Zugangsmechanismus des Transporters (Yamashita *et al.*, 2005). Die Strukturanalyse bestätigt, dass durch die P429L-Mutation eine Natriumbindestelle gestört wird und darin die suboptimale Funktionalität des Transporters begründet ist. Das bedeutet, die Bindung des Natriumions erleichtert die Bindung des Substrats Glycin an den Transporter. Dieser Mechanismus ist mit einer positiven Kooperativität vergleichbar.

Im Gegensatz dazu steht die zweite Mutation D463N in der Schleife (extrazellulärer Loop, EL6), die die α -Helices 5 und 6a verbindet. Der Aminosäurerest D463 bildet mit K460 in der benachbarten Helix eine Salzbrücke. Die Mutation D463N geht mit einem Aminosäureaustausch von Aspartat zu Asparagin einher. Asparagin würde die Ausbildung einer Salzbrücke verhindern, aber die einer Wasserstoffbrücke wäre dennoch möglich.

Nichtsdestoweniger steht es nahe, dass die Proteinstabilität in Abwesenheit dieses Ionenpaars insgesamt wahrscheinlich abnimmt. Da die Mutation D463N vermutlich keinen Einfluss auf die Natriumbindestelle hat und die ursprüngliche Proteinfaltung durch die Wasserstoffbrücke weitestgehend erhalten bleibt, kann davon ausgegangen werden, dass die Mutation D463N weniger schwerwiegendere Folgen als die Mutation P429L bis gar keine Folgen hat, wie in Untersuchungen von Evans *et al.* 1999 gezeigt (Evans et al., 1999).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch die Mutation P429L die Sekundärstruktur des Proteins gestört wird, sodass die für den Glycintransport essentielle Natriumbindestelle verloren geht. Dadurch wurde bestätigt, dass gleiche Pathomechanismen der Fehlfunktion zugrunde liegen. Diese Arbeit führte zur weiteren Aufklärung des Pathomechanismus präsynaptisch ursächlicher Hyperekplexie, die in Defekten der Natriumbindestelle begründet sind.

5 Zusammenfassung

Der präsynaptische Na^+/Cl^- -abhängige Glycintransporter 2 (GlyT2) ist für die synaptische Inhibition im zentralen Nervensystem (ZNS) von Säugetieren von essentieller Bedeutung. Gemeinsam mit dem Glycinrezeptor (GlyR), einem pentameren ligandengesteuerten Ionenkanal in der inhibitorisch glycinergen Postsynapse, vermitteln sie die hemmende Wirkung der Reizweiterleitung vom ZNS zu den Muskelfasern. Mutationen in GlyR-Untereinheiten und im GlyT2 verursachen die neurologische Erkrankung Hyperekplexie (*startle disease*), die aufgrund der defekten inhibitorischen glycinergen Neurotransmission durch Bewegungsstörungen charakterisiert ist.

In der vorliegenden Arbeit soll die neue *missense* Mutation c.1286C > T im Exon 8 des GlyT2-Gens (*SLC6A5*), die in der Aminosäuresubstitution P429L resultiert, hinsichtlich ihres pathologischen Mechanismus im direkten Vergleich zum GlyT2-Wildtyp untersucht werden. Die Charakterisierung erfolgt mittels molekularbiologischer und proteinbiochemischer Methoden, immunocytochemischen Färbungen sowie mittels Funktionstests für die Untersuchung der Transportaktivität. Abschließend erfolgt die Strukturanalyse der Mutation mit Hilfe von Herrn Dr. Vikram Kasaragod (Rudolf-Virchow-Zentrum Würzburg, Strukturbiologie, Arbeitsgruppe Hermann Schindelin).

Die Allelsequenzierung gibt Aufschluss über die Allelhäufigkeit und lässt Rückschlüsse auf das Vererbungsmuster der Mutation P429L ziehen. Zelllysate werden nach der Transfektion von Zelllinien hergestellt und werden für Proteinexpressionsuntersuchungen mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot benutzt. Diese proteinbiochemischen Analysen werden durch immunocytochemische Färbungen von transfizierten Zellen, um mögliche Unterschiede zwischen Mutation und Wildtyp in der Lokalisation in den Zellkompartimenten herauszuarbeiten, sinnvoll ergänzt. Mittels radioaktiv markiertem [^3H]-Glycin soll die Glycin-Aufnahme bzw. die Transportfunktion zwischen dem GlyT2-Wildtyp und dem mutierten Transporter GlyT2^{P429L} verglichen werden.

Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse ergab, dass beide Elternteile Allelträger der Mutation P429L sind. Obwohl beide Elternteile für eine zweite Mutation in Position c.1387G > A im selben Exon 8 des *SLC6A5*-Gens, die zur Aminosäuresubstitution D463N führt, heterozygot waren, wurde diese zweite Mutation an die Nachkommen mit Hyperekplexie-Symptomatik nicht vererbt. Betroffene Kinder waren dagegen für die Mutation P429L homozygot. Dies legt nahe, dass die Mutation P429L einem rezessiven

Vererbungsmuster folgt. Die Allelsequenzierung ergab, dass die Allelvarianten P429L und D463N bei Heterozygoten im selben Genlocus, aber auf das homologe Chromosomenpaar (*in-trans*) verteilt waren. Weiterhin wurde gezeigt, dass durch die Mutation die Gesamtproteinexpression signifikant reduziert ist. Immunocytochemische Färbungen deuten auf eine vermehrte Proteinaggregation der GlyT2^{P429L}-Variante innerhalb der Zelle hin, sodass weniger Protein bis in die Plasmamembran transloziert wird. Jedoch konnte durch die Zellkompartimentanalyse ein defekter Proteintransport während der Proteinbiogenese vom ER über den Golgi bis zur Plasmamembran ausgeschlossen werden. Der Membranproteinnachweis der GlyT2^{P429L}-Mutante gab Anlass auf die Untersuchung der Transportaktivität. Dabei verursachte die Mutation P429L einen kompletten Funktionsverlust des Transporters. Die Co-Expression von GlyT2-Wildtyp und GlyT2^{P429L}-Mutante in bestimmten Verhältnissen deuten darauf hin, dass der Funktionsverlust der GlyT2^{P429L}-Mutante durch GlyT2-Wildtyp-Untereinheiten ausgeglichen werden kann. Anschließend ergab die Strukturanalyse anhand eines DAT-Homologiemodells, dass die Aminosäuresubstitution von Prolin zu Leucin in Aminosäureposition 429 in Transmembrandomäne 5 die Sekundärstruktur der α -Helix zerstört. Durch die Elimination des Prolins geht der Knick in der α -Helix verloren, sodass die für den Glycintransport essentielle Natriumbindestelle strukturell verändert wird und dadurch der Transportmechanismus gestört wird.

Die Ergebnisse dieser neuen Mutation P429L bestätigen, dass GlyT2-Mutationen zur neurologischen Bewegungsstörung Hyperekplexie führen und, dass das hGlyT2-Gen (*SLC6A5*) neben dem *GLRA1*-Gen als ein bedeutendes Kandidatengen einzuordnen ist.

6 Verzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis

- Al-Owain M, Colak D, Al-Bakheet A, Al-Hashmi N, Shuaib T, Al-Hemidan A, Aldhalaan H, Rahbeeni Z, Al-Sayed M, Al-Younes B, Ozand PT, Kaya N (2012) Novel mutation in GLRB in a large family with hereditary hyperekplexia. *Clinical Genetics* 81:479-484.
- Altman DG, Bland JM (2005) Standard deviations and standard errors. *British Medical Journal* 331:903.
- Andermann F, Andermann E (1986) Excessive startle syndromes: startle disease, jumping, and startle epilepsy. *Advances in Neurology* 43:321-338.
- Andermann F, Keene DL, Andermann E, Quesney LF (1980) Startle disease or hyperekplexia: further delineation of the syndrome. *Brain : A Journal of Neurology* 103:985-997.
- Aragon C, Lopez-Corcuera B (2005) Glycine transporters: crucial roles of pharmacological interest revealed by gene deletion. *Trends in Pharmacological Sciences* 26:283-286.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22:195-201.
- Arribas-Gonzalez E, Alonso-Torres P, Aragon C, Lopez-Corcuera B (2013) Calnexin-assisted biogenesis of the neuronal glycine transporter 2 (GlyT2). *Public Library of Science ONE* 8:e63230.
- Arribas-Gonzalez E, de Juan-Sanz J, Aragon C, Lopez-Corcuera B (2015) Molecular basis of the dominant negative effect of a glycine transporter 2 mutation associated with hyperekplexia. *The Journal of Biological Chemistry* 290:2150-2165.
- Aubrey KR (2016) Presynaptic control of inhibitory neurotransmitter content in VIAAT containing synaptic vesicles. *Neurochemistry International* 98:94-102.
- Aubrey KR, Rossi FM, Ruivo R, Alboni S, Bellenchi GC, Le Goff A, Gasnier B, Supplisson S (2007) The transporters GlyT2 and VIAAT cooperate to determine the vesicular glycinergic phenotype. *The Journal of neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27:6273-6281.
- Bajaj K, Madhusudhan MS, Adkar BV, Chakrabarti P, Ramakrishnan C, Sali A, Varadarajan R (2007) Stereochemical criteria for prediction of the effects of proline mutations on protein stability. *Public Library of Science Computational Biology* 3:e241.
- Bakker MJ, Peeters EA, Tijssen MA (2009) Clonazepam is an effective treatment for hyperekplexia due to a SLC6A5 (GlyT2) mutation. *Movement disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society* 24:1852-1854.
- Bartholomaeus I, Milan-Lobo L, Nicke A, Dutertre S, Hastrup H, Jha A, Gether U, Sitte HH, Betz H, Eulenburg V (2008) Glycine transporter dimers: evidence for occurrence in the plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry* 283:10978-10991.
- Beuming T, Shi L, Javitch JA, Weinstein H (2006) A comprehensive structure-based alignment of prokaryotic and eukaryotic neurotransmitter/Na⁺ symporters (NSS) aids in the use of the LeuT structure to probe NSS structure and function. *Molecular Pharmacology* 70:1630-1642.
- Blackstone C (2009) Infantile parkinsonism-dystonia: a dopamine "transportopathy". *The Journal of Clinical Investigation* 119:1455-1458.
- Bogdanik LP, Chapman HD, Miers KE, Serreze DV, Burgess RW (2012) A MusD retrotransposon insertion in the mouse Slc6a5 gene causes alterations in neuromuscular junction maturation and behavioral phenotypes. *Public Library of Science ONE* 7:e30217.

- Broer S, Gether U (2012) The solute carrier 6 family of transporters. *British Journal of Pharmacology* 167:256-278.
- Brune W, Weber RG, Saul B, von Knebel Doeberitz M, Grond-Ginsbach C, Kellerman K, Meinck HM, Becker CM (1996) A GLRA1 null mutation in recessive hyperekplexia challenges the functional role of glycine receptors. *American Journal of Human Genetics* 58:989-997.
- Carta E et al. (2012) Mutations in the GlyT2 gene (SLC6A5) are a second major cause of startle disease. *The Journal of Biological Chemistry* 287:28975-28985.
- Charlier C et al. (2008) Highly effective SNP-based association mapping and management of recessive defects in livestock. *Nature Genetics* 40:449-454.
- Chen C, Okayama H (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molecular and Cellular Biology* 7:2745-2752.
- Chen N, Reith ME (2003) Na⁺ and the substrate permeation pathway in dopamine transporters. *European Journal of Pharmacology* 479:213-221.
- Chen NH, Reith ME, Quick MW (2004) Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology* 447:519-531.
- Chung SK et al. (2010) Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive GLRA1 mutations in hyperekplexia. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30:9612-9620.
- Ebihara S, Yamamoto T, Obata K, Yanagawa Y (2004) Gene structure and alternative splicing of the mouse glycine transporter type-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317:857-864.
- Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta crystallographica Section D, Biological Crystallography* 60:2126-2132.
- Eulenburg V, Armsen W, Betz H, Gomeza J (2005) Glycine transporters: essential regulators of neurotransmission. *Trends in Biochemical Sciences* 30:325-333.
- Eulenburg V, Retiounskaia M, Papadopoulos T, Gomeza J, Betz H (2010) Glial glycine transporter 1 function is essential for early postnatal survival but dispensable in adult mice. *Glia* 58:1066-1073.
- Eulenburg V, Becker K, Gomeza J, Schmitt B, Becker CM, Betz H (2006) Mutations within the human GLYT2 (SLC6A5) gene associated with hyperekplexia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 348:400-405.
- Evans J, Herdon H, Cairns W, O'Brien E, Chapman C, Terrett J, Gloger I (1999) Cloning, functional characterisation and population analysis of a variant form of the human glycine type 2 transporter. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 463:301-306.
- Felgner PL, Ringold GM (1989) Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 337:387-388.
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:7413-7417.
- Fernandez-Sanchez E, Diez-Guerra FJ, Cubelos B, Gimenez C, Zafra F (2008) Mechanisms of endoplasmic-reticulum export of glycine transporter-1 (GLYT1). *The Biochemical Journal* 409:669-681.
- Fornes A, Nunez E, Aragon C, Lopez-Corcuera B (2004) The second intracellular loop of the glycine transporter 2 contains crucial residues for glycine transport and phorbol ester-induced regulation. *The Journal of Biological Chemistry* 279:22934-22943.

- Gill JL, Capper D, Vanbellinghen JF, Chung SK, Higgins RJ, Rees MI, Shelton GD, Harvey RJ (2011) Startle disease in Irish wolfhounds associated with a microdeletion in the glycine transporter GlyT2 gene. *Neurobiology of Disease* 43:184-189.
- Gimenez C et al. (2012) A novel dominant hyperekplexia mutation Y705C alters trafficking and biochemical properties of the presynaptic glycine transporter GlyT2. *The Journal of Biological Chemistry* 287:28986-29002.
- Gluzman Y (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23:175-182.
- Gomez J, Hulsmann S, Ohno K, Eulenburg V, Szoke K, Richter D, Betz H (2003a) Inactivation of the glycine transporter 1 gene discloses vital role of glial glycine uptake in glycinergic inhibition. *Neuron* 40:785-796.
- Gomez J, Ohno K, Hulsmann S, Armsen W, Eulenburg V, Richter DW, Laube B, Betz H (2003b) Deletion of the mouse glycine transporter 2 results in a hyperekplexia phenotype and postnatal lethality. *Neuron* 40:797-806.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of General Virology* 36:59-74.
- Harvey K, Duguid IC, Alldred MJ, Beatty SE, Ward H, Keep NH, Lingenfelter SE, Pearce BR, Lundgren J, Owen MJ, Smart TG, Luscher B, Rees MI, Harvey RJ (2004) The GDP-GTP exchange factor collybistin: an essential determinant of neuronal gephyrin clustering. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24:5816-5826.
- Harvey RJ, Yee BK (2013) Glycine transporters as novel therapeutic targets in schizophrenia, alcohol dependence and pain. *Nature Reviews Drug Discovery* 12:866-885.
- Harvey RJ, Topf M, Harvey K, Rees MI (2008) The genetics of hyperekplexia: more than startle! *Trends in Genetics : TIG* 24:439-447.
- He L, Vasiliou K, Nebert DW (2009) Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Human Genomics* 3:195-206.
- Holter W, Fordis CM, Howard BH (1989) Efficient gene transfer by sequential treatment of mammalian cells with DEAE-dextran and deoxyribonucleic acid. *Experimental Cell Research* 184:546-551.
- Horiuchi M, Nicke A, Gomez J, Aschrafi A, Schmalzing G, Betz H (2001) Surface-localized glycine transporters 1 and 2 function as monomeric proteins in *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:1448-1453.
- Just H, Sitte HH, Schmid JA, Freissmuth M, Kudlacek O (2004) Identification of an additional interaction domain in transmembrane domains 11 and 12 that supports oligomer formation in the human serotonin transporter. *The Journal of Biological Chemistry* 279:6650-6657.
- Kirstein L, Silfverskiold BP (1958) A family with emotionally precipitated drop seizures. *Acta Psychiatrica et Neurologica Scandinavica* 33:471-476.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Legendre P (2001) The glycinergic inhibitory synapse. *Cellular and molecular life sciences : Cellular and Molecular Life Sciences* 58:760-793.
- Lieber MR, Hesse JE, Mizuuchi K, Gellert M (1987) Developmental stage specificity of the lymphoid V(D)J recombination activity. *Genes & Development* 1:751-761.
- Lin L, Yee SW, Kim RB, Giacomini KM (2015) SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* 14:543-560.

- Lolkema JS, Slotboom DJ (2008) The major amino acid transporter superfamily has a similar core structure as Na⁺-galactose and Na⁺-leucine transporters. *Molecular Membrane Biology* 25:567-570.
- Lolkema JS, Dobrowolski A, Slotboom DJ (2008) Evolution of antiparallel two-domain membrane proteins: tracing multiple gene duplication events in the DUF606 family. *Journal of Molecular Biology* 378:596-606.
- Lopez-Corcuera B, Martinez-Maza R, Nunez E, Roux M, Supplisson S, Aragon C (1998) Differential properties of two stably expressed brain-specific glycine transporters. *Journal of Neurochemistry* 71:2211-2219.
- Luthman H, Magnusson G (1983) High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucleic Acids Research* 11:1295-1308.
- Lynch JW (2004) Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiological Reviews* 84:1051-1095.
- Martinez-Maza R, Poyatos I, Lopez-Corcuera B, E Nu, Gimenez C, Zafra F, Aragon C (2001) The role of N-glycosylation in transport to the plasma membrane and sorting of the neuronal glycine transporter GLYT2. *The Journal of Biological Chemistry* 276:2168-2173.
- Morrow JA, Collie IT, Dunbar DR, Walker GB, Shahid M, Hill DR (1998) Molecular cloning and functional expression of the human glycine transporter GlyT2 and chromosomal localisation of the gene in the human genome. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 439:334-340.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51 Pt 1:263-273.
- Nelson N (1998) The family of Na⁺/Cl⁻ neurotransmitter transporters. *Journal of Neurochemistry* 71:1785-1803.
- Nigro MA, Lim HC (1992) Hyperekplexia and sudden neonatal death. *Pediatric Neurology* 8:221-225.
- Penado KM, Rudnick G, Stephan MM (1998) Critical amino acid residues in transmembrane span 7 of the serotonin transporter identified by random mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 273:28098-28106.
- Penmatsa A, Wang KH, Gouaux E (2013) X-ray structure of dopamine transporter elucidates antidepressant mechanism. *Nature* 503:85-90.
- Ponce J, Poyatos I, Aragon C, Gimenez C, Zafra F (1998) Characterization of the 5' region of the rat brain glycine transporter GLYT2 gene: identification of a novel isoform. *Neuroscience Letters* 242:25-28.
- Rees MI, Lewis TM, Kwok JB, Mortier GR, Govaert P, Snell RG, Schofield PR, Owen MJ (2002) Hyperekplexia associated with compound heterozygote mutations in the beta-subunit of the human inhibitory glycine receptor (GLRB). *Human Molecular Genetics* 11:853-860.
- Rees MI, Harvey K, Ward H, White JH, Evans L, Duguid IC, Hsu CC, Coleman SL, Miller J, Baer K, Waldvogel HJ, Gibbon F, Smart TG, Owen MJ, Harvey RJ, Snell RG (2003) Isoform heterogeneity of the human gephyrin gene (GPHN), binding domains to the glycine receptor, and mutation analysis in hyperekplexia. *The Journal of Biological Chemistry* 278:24688-24696.
- Rees MI, Harvey K, Pearce BR, Chung SK, Duguid IC, Thomas P, Beatty S, Graham GE, Armstrong L, Shiang R, Abbott KJ, Zuberi SM, Stephenson JB, Owen MJ, Tijssen MA, van den Maagdenberg AM, Smart TG, Supplisson S, Harvey RJ (2006) Mutations in the gene encoding GlyT2 (SLC6A5) define a presynaptic component of human startle disease. *Nature Genetics* 38:801-806.

- Reisner AH, Nemes P, Bucholtz C (1975) The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 64:509-516.
- Rigsby RE, Parker AB (2016) Using the PyMOL application to reinforce visual understanding of protein structure. *Biochemistry and molecular biology education : A Bimonthly Publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 44:433-437.
- Roux MJ, Supplisson S (2000) Neuronal and glial glycine transporters have different stoichiometries. *Neuron* 25:373-383.
- Ryan SG, Sherman SL, Terry JC, Sparkes RS, Torres MC, Mackey RW (1992) Startle disease, or hyperekplexia: response to clonazepam and assignment of the gene (STHE) to chromosome 5q by linkage analysis. *Annals of Neurology* 31:663-668.
- Ryser HJ (1967) A membrane effect of basic polymers dependent on molecular size. *Nature* 215:934-936.
- Saenz-Lope E, Herranz-Tanarro FJ, Masdeu JC, Chacon Pena JR (1984) Hyperekplexia: a syndrome of pathological startle responses. *Annals of Neurology* 15:36-41.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:5463-5467.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9:676-682.
- Schmidt T, Situ AJ, Ulmer TS (2016) Structural and thermodynamic basis of proline-induced transmembrane complex stabilization. *Scientific Reports* 6:29809.
- Shannon JR, Flattem NL, Jordan J, Jacob G, Black BK, Biaggioni I, Blakely RD, Robertson D (2000) Orthostatic intolerance and tachycardia associated with norepinephrine-transporter deficiency. *The New England Journal of Medicine* 342:541-549.
- Shiang R, Ryan SG, Zhu YZ, Hahn AF, O'Connell P, Wasmuth JJ (1993) Mutations in the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor cause the dominant neurologic disorder, hyperekplexia. *Nature Genetics* 5:351-358.
- Shiang R, Ryan SG, Zhu YZ, Fielder TJ, Allen RJ, Fryer A, Yamashita S, O'Connell P, Wasmuth JJ (1995) Mutational analysis of familial and sporadic hyperekplexia. *Annals of Neurology* 38:85-91.
- Smith KE, Borden LA, Hartig PR, Branchek T, Weinshank RL (1992) Cloning and expression of a glycine transporter reveal colocalization with NMDA receptors. *Neuron* 8:927-935.
- Supplisson S, Roux MJ (2002) Why glycine transporters have different stoichiometries. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 529:93-101.
- Vergouwe MN, Tijssen MA, Shiang R, van Dijk JG, al Shahwan S, Ophoff RA, Frants RR (1997) Hyperekplexia-like syndromes without mutations in the GLRA1 gene. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 99:172-178.
- Vigevano F, Di Capua M, Dalla Bernardina B (1989) Startle disease: an avoidable cause of sudden infant death. *Lancet* 1:216.
- Wang JB, Moriwaki A, Uhl GR (1995) Dopamine transporter cysteine mutants: second extracellular loop cysteines are required for transporter expression. *Journal of Neurochemistry* 64:1416-1419.
- Wang KH, Penmatsa A, Gouaux E (2015) Neurotransmitter and psychostimulant recognition by the dopamine transporter. *Nature* 521:322-327.
- Yamashita A, Singh SK, Kawate T, Jin Y, Gouaux E (2005) Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature* 437:215-223.

- Yang YW, Yang JC (1997) Studies of DEAE-dextran-mediated gene transfer. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 25:47-51.
- Zafra F, Aragon C, Olivares L, Danbolt NC, Gimenez C, Storm-Mathisen J (1995) Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *The Journal of neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 15:3952-3969.
- Zewert TE, Harrington MG (1993) Protein electrophoresis. *Current Opinion in Biotechnology* 4:3-8.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Mutationen im hGlyT2-Gen (<i>SLC6A5</i>) bei Patienten mit Hyperekplexie	2
Abbildung 2	<i>SLC6</i> -Transporterfamilie.....	5
Abbildung 3	Aminosäuresequenz und Sekundärstruktur des LeuT _{Aa}	7
Abbildung 4	Inhibitorische glycinerge Synapse.....	9
Abbildung 5	Sequenzanalyse und Familienstammbaum.....	10
Abbildung 6	Schematische Darstellung der Mutagenese nach der <i>Overlap Extension</i> - Methode („Verlängerung aufgrund von Überlappungssequenzen“).....	34
Abbildung 7	Schema zum Ablauf der Allelsequenzierung.....	36
Abbildung 8	Restriktionsenzyme, die <i>sticky ends</i> erzeugen am Beispiel von PstI-HF und ClaI.....	39
Abbildung 9	Schematische Darstellung der Verknüpfung von Vektor-/Plasmid- und Insertfragment	40
Abbildung 10	Prinzip der Immundetektion und Chemilumineszenz-Reaktion	49
Abbildung 11	Biotinylierung auf chemischer Reaktionsebene.....	51
Abbildung 12	DNA-Sequenzanalyse der Familie mit Mutationen P429L und D463N im Exon 8 des hGlyT2-Gens (<i>SLC6A5</i>).....	58
Abbildung 13	Isolierung eines DNA-Abschnitts, Ergebnisse nach Agarosegelelektrophorese	60
Abbildung 14	Quantifizierung der Allelvarianten der 5 Familienmitglieder (1–5).....	62
Abbildung 15	Mutagenese.....	64
Abbildung 16	Kontrollverdau und Sequenzierungsergebnisse	65
Abbildung 17	Transformation: Bakterienkolonien auf Ampicillin-Agarplatten.....	66
Abbildung 18	Konfokale Mikroskopie immuncytochemischer Färbungen	68
Abbildung 19	Quantifizierungsergebnisse der CytoBuster-Lysate.....	71
Abbildung 20	Biotinylierungsergebnisse	72
Abbildung 21	Kompletter Funktionsverlust des GlyT2 ^{P429L}	75
Abbildung 22	Strukturanalyse.....	77
Abbildung 23	Genetische Risikoabschätzung bei rezessivem Vererbungsmuster.....	81

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Zelllinien	11
Tabelle 2	Bakterien	12
Tabelle 3	Allgemein verwendete Chemikalien	12
Tabelle 4	Verwendete Vektoren.....	13
Tabelle 5	<i>Sense</i> und <i>antisense</i> Mutageneseprimer für hGlyT2-Klon mit intregrierter Mutation P429L.....	13
Tabelle 6	<i>Sense</i> und <i>antisense</i> hGlyT2-Exon 8-Primer mit angehängten Restriktionssequenzen für Allelsequenzierung	14
Tabelle 7	<i>Sense</i> und <i>antisense</i> pRK5/pRK7-Vektorprimer.....	14
Tabelle 8	Verwendete Enzyme.....	14
Tabelle 9	Restriktionsenzyme und ihre Puffer	15
Tabelle 10	Verwendete Kits	15
Tabelle 11	Verwendete Primärantikörper	16
Tabelle 12	Verwendete Sekundärantikörper	16
Tabelle 13	Größenstandards für die Protein- und DNA-Auftrennung.....	17
Tabelle 14	Zellkulturlösungen und Medien	17
Tabelle 15	Zelltransfektionsreagenzien für HEK293 und COS7 Zellen.....	18
Tabelle 16	Bakterienkulturmedien	18
Tabelle 17	Antibiotikum	18
Tabelle 18	Zusammensetzung der Ampicillin-Agarplatten	18
Tabelle 19	DNA-Lösungen	19
Tabelle 20	Puffer für Minipräparation der Plasmid-DNA aus Bakterien	19
Tabelle 21	Zusammensetzung eines 1% Agarosegels.....	19
Tabelle 22	Lösungen und Reagenzien für SDS Page, Western Blot und Biotin <i>Assay</i>	19
Tabelle 23	Zusammensetzung eines 9 % Polyacrylamidgels (PAA-Gel).....	20
Tabelle 24	Lösungen und Reagenzien für Immuncytochemie.....	20
Tabelle 25	Lösungen und Reagenzien für [³ H]-Glycin <i>Uptake Assay</i>	21
Tabelle 26	Glycinkonzentrationsreihe des Transportmediums	21
Tabelle 27	Verwendete Verbrauchsmaterialien	22
Tabelle 28	Verwendete Geräte	23
Tabelle 29	Ausgesetzte Zellzahl.....	24
Tabelle 30	Transfektionsansätze von HEK293 Zellen mit Lipofectamine2000	26
Tabelle 31	Pipettierschema für Transfektion mittels Calciumphosphatpräzipitation	26

Tabelle 32	Pipettierschema für Transfektion von COS7 Zellen mit DEAE-Dextran	27
Tabelle 33	PCR-Zyklus-Programm zum HotStar HiFidelity Polymerase Kit	31
Tabelle 34	Reaktionsansätze für die Synthese zweier Ausgangsfragmente für <i>Overlap Extension</i> PCR.....	32
Tabelle 35	Pipettierschema für HotStar HiFidelity-Mastermixansatz	35
Tabelle 36	Mastermix GoTaq G2 für Kolonie PCR.....	42
Tabelle 37	PCR-Programm für Kolonie PCR mit GoTaq G2 Green Master Mix	43
Tabelle 38	Häufigkeit der Allelvarianten P429L und D463N	62
Tabelle 39	Proteinexpression von GlyT2-Wildtyp und GlyT2 ^{P429L}	72
Tabelle 40	[³ H]-Glycin <i>Uptake Assay</i>	76

6.4 Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
A.d./Aqua dest.	destilliertes Wasser
A_{\max}	Absorptionsmaximum
Annealing-Temperatur	Schmelz-/Anlagerungstemperatur der Primer
<i>antisense</i>	= <i>reverse</i> , in 3'-5'-Richtung auf dem DNA-Strang
Apnoe	Atemstillstand
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>ARHGEF9</i>	Gen für Collybistin (Clustering-Protein)
<i>(Uptake) Assay</i>	(Aufnahme-/Bindungs)versuch
β	beta
bp	Basenpaare
BSA	engl.: <i>bovine serum albumin</i> ; Rinderserumalbumin
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celcius
c.XX Y > Z	Nomenklatur für Nukleotidaustausch (Y, Z) in Position XX der codierenden DNA-Sequenz
ca.	cirka
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
<i>Compound</i> (-Heterozygotie)	zusammengesetzt (zwei unterschiedlich mutierte Allele des gleichen Gens)
COS7 Zellen	Nierenzellen äthiopischer Grünmeerkatzen (<i>Cercopithecus aethiopicus</i>)
DEAE-Dextran	Diethylaminoethyl-Dextran
ddNTPs	Didesoxyribonucleotidtriphosphate; äquimolare Mischung aus ddATP, ddGTP, ddCTP und ddTTP
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxyribonucleotidtriphosphate; äquimolare Mischung aus dATP, dGTP, dCTP und dTTP

DPM	engl.: <i>disintegration/min</i> ; Zerfälle/min
DTT	Dithiothreitol
ECL	engl.: <i>Enhanced Chemilumineszenz</i> ; verbesserte Chemilumineszenz-Reaktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EL	extrazellulärer Loop, extrazelluläre Schleife
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	ER Golgi intermediäres Kompartiment
<i>forward</i>	= <i>sense</i> , in 5'-3'-Richtung auf dem DNA-Strang
<i>frameshift</i> Mutation	Mutation aufgrund einer Leserasterverschiebung von Genen
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure
GABA _A R	GABA _A -Rezeptor
GAT1	GABA-Transporter1
gDNA	genomische DNA
(E)GFP	(<i>enhanced</i>) grün fluoreszierendes Protein
<i>GLRA1</i>	Gen für Glycinrezeptor- α 1-Untereinheit
<i>GLRB</i>	Gen für Glycinrezeptor- β -Untereinheit
GlyT1	Glycintransporter 1
(h)GlyT2	(humaner) Glycintransporter 2
<i>GPHN</i>	Gen für Gephyrin (Clustering-Protein)
GlyR	Glycinrezeptor
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HBS	engl.: <i>HEPES buffered saline</i> ; HEPES-gepufferte Kochsalzlösung

HEK293 Zellen	engl.: <i>human embryonic kidney 293 cell line</i> ; humane embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Heterozygotie	zwei unterschiedliche Allelvarianten auf demselben Genlocus
Homozygotie	identische Allelvarianten auf demselben Genlocus
HRP	engl.: <i>horseradish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase
ICC	Immuncytochemie
<i>in silico</i>	Reaktionen/Abläufe mittels Computersimulationen unter Verwendung von speziellen Programmen bzw. Algorithmen
<i>in-trans</i>	Zwei Mutationen auf unterschiedlichen Chromosomensträngen (Gegenteil: <i>in-cis</i>)
<i>in vitro</i>	„im Reagenzglas“, Reaktionen außerhalb eines Organismus
<i>in vivo</i>	Reaktionen im lebenden Organismus unter physiologischen Bedingungen
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
$k = k_m$	Michaelis-Menten-Konstante k_m
l	Liter
LeuT _{Aa}	Leucin-Transporter aus <i>Aquifex aeolicus</i>
M	Molar
MEM	Minimum essential medium
<i>merge</i>	zusammengesetzt, überlagert
<i>missense</i> Mutation	Punktmutation, die zur Aminosäuresubstitution führt
min	Minute
mRNA	messenger RNA
n	nano oder Anzahl
Na1/Na2	Natriumbindestelle 1 / Natriumbindestelle 2
Neurotransmitter	Botenstoff

NGS	engl.: <i>Normal Goat Serum</i> ; normales Ziegen Serum
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
<i>nonsense</i> Mutation	Punktmutation, die zu einem Stopp-Codon führt
NSS	Neurotransmitter-Sodium-Symporter
NTT	Neurotransmittertransporter
<i>Overlap Extension</i> PCR	Verlängerung durch überlappende DNA-Sequenzen
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	engl.: <i>Phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH-Wert	negativ dekadische Logarithmus der Konzentration von Protonen (H^+) und Hydronium-Ionen (H_3O^+)
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (Proteaseinhibitor)
PNS	Peripheres Nervensystem
<i>proofreading</i>	Korrekturmechanismus bei DNA-Polymerasen, 3'5'-Exonuklease-Aktivität
<i>reverse</i>	= <i>antisense</i> , in 3'-5'-Richtung auf dem DNA-Strang
RNA	engl.: <i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
rpm	engl.: <i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>screening</i>	systematisches Testverfahren
SD	engl.: <i>standard deviation</i> ; Standardabweichung
SDS	engl.: <i>sodium dodecyl sulphate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SEM	engl.: <i>standard error of the mean</i> ; Standardfehler

<i>sense</i>	= <i>forward</i> , in 5'-3'-Richtung auf dem DNA-Strang
SERT	Serotonintransporter
SIDS	engl.: <i>sudden infant death syndrome</i> ; plötzlicher Kindstod
SLC	engl.: <i>solute carrier</i> ; Transportprotein für Ionen oder auch geladene und ungeladene Moleküle
<i>SLC6A5</i>	Gen für humanen Glycintransporter 2
SOC	spezielles Nährmedium mit 50 mM Glukose
STHE	engl.: <i>startle disease</i> ; Hyperekplexie
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	engl.: <i>Tris buffered saline</i> ; Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan
<i>Template-DNA</i>	Ausgangsmaterial zur DNA-Vervielfältigung mittels Polymerasekettenreaktion
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit (Einheit der Enzymaktivität)
UT	untransfiziert
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
$(\frac{1}{2}) v_{\max}$	(halb-) maximale Reaktionsgeschwindigkeit
VIAAT	vesikulärer-inhibitorischer-Aminosäuretransporter
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
YT	engl.: <i>yeast extract</i> ; Hefeextraakt für Kulturmedium
ZNS	Zentrales Nervensystems

Danksagung

Von ganzem Herzen gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. Carmen Villmann für die Vergabe dieses interessanten Themas und für die kompetente Betreuung während der experimentellen Durchführung, der Ergebnisauswertung als auch der anschließenden Niederschrift. Für die kontinuierlich hervorragende Unterstützung, auch mit vielen liebevollen und ermutigenden Worten, bin ich sehr dankbar.

Ebenso geht ein großer Dank an Frau Dr. Natascha Schäfer für viele zielführende Ideen, für clevere Tipps in der Versuchsdurchführung sowie die aufopferungsvolle Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse. Ohne die vielfältigen Ratschläge und thematischen Anregungen hätte die Arbeit diesen Umfang nicht erreicht.

Herrn Prof. Dr. Michael Sendtner, Direktor des Instituts für Klinische Neurobiologie am Universitätsklinikum Würzburg, danke ich für die Möglichkeit der Promotion.

Herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Erhard Wischmeyer für die Betreuung dieser Arbeit als Korreferent.

Ebenso ein herzliches Dankeschön an Frau Prof. Dr. Kathleen Wermke für die Bereitschaft als Drittgutachterin des Betreuungskomitees einzutreten.

Frau Nadine Vornberger danke ich für die freundliche Einweisung in das Labor und ihre große Hilfe im Laboralltag, insbesondere durch die Unterstützung in den molekularbiologischen Methoden, sowie das Bereitstellen zahlreicher Zellschalen.

Herzlichen Dank an Frau Vera Römer und Herrn Dieter Janzen für eure geduldige und unermüdete Hilfsbereitschaft, insbesondere in der Computerwelt. Der gesamten Arbeitsgruppe Villmann gilt ein großer Dank, die sich durch eine sehr hilfsbereite und herzliche Zusammenarbeit aller Mitarbeiter auszeichnet und eine freundliche Arbeitsatmosphäre schafft. Danke für die tolle Erfahrung und die vielen schönen unvergesslichen Momente im und außerhalb des Labors.

Vielen Dank an Herrn Dr. Vikram Kasaragod und Herrn Prof. Dr. Hermann Schindelin für die strukturelle Analyse der GlyT2-Mutationen und die großartige graphische Darstellung.

Bei Herrn Prof. Dr. Robert Harvey möchte ich mich für die Bereitstellung des Plasmids Myc-GlyT2-pRK5 bedanken.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Robert Blum möchte ich für die Einweisungen in die S1-, S2-Leitlinien sowie für die Strahlenschutzbelehrung danken.

Bei Herrn Dr. Thomas Andreska möchte ich mich für die kompetente Instruktion in die konfokale Mikroskopie bedanken.

Für die Übernahme der Flüssigszintillationsmessungen danke ich Frau Sylvia Hengst.

Danke an die Familie für deren Einwilligung zur Untersuchung der Blutproben sowie an Herrn Dr. Tilman Polster und Herrn Dr. Ralph Hantschmann für die Bereitstellung der Blutproben.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern dafür danken, dass sie mich so großzügig in jeglicher Form unterstützen. Ebenso meiner Schwester Eva, meinem Bruder Markus und meinen Freunden, die mich immer wieder die Dinge aus einem anderen Blickwinkel betrachten lassen.

Lebenslauf – Alexandra Kitzenmaier

Persönliche Daten

Geburtsdatum 17. November 1991

Staatsangehörigkeit deutsch

Studium

01/2019 Promotion im Institut für Klinische Neurobiologie am
Universitätsklinikum Würzburg

08/2017 Approbation zur Zahnärztin

06/2017 Zahnärztliches Staatsexamen

10/2011 – 03/2017 Studium der Zahnmedizin, Julius-Maximilians-Universität,
Würzburg

Schulbildung

05/2011 Allgemeine Hochschulreife

09/2002 – 05/2011 Scheffold-Gymnasium, Schwäbisch Gmünd

Würzburg, den 09. Januar 2019