

Über die Bedeutung intrazellulärer Subdomänen des Glycinrezeptors für die Kanalfunktion



Investigations into the relevance of glycine receptor intracellular subdomains to receptor channel function

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Neurowissenschaften

Vorgelegt von

Georg Langlhofer

aus

Berlin

Würzburg 2016



Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: **Prof. Dr. Thomas Dandekar**

1. Betreuer: **Prof. Dr. Carmen Villmann**

2. Betreuer: **PD Dr. Robert Blum**

3. Betreuer: **Prof. Dr. Erhard Wischmeyer**

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

„Alle Wissenschaftler versuchen, an der Pyramide menschlichen Wissens weiter zu bauen. Ich hoffe, dass ich einen kleinen Stein dazutun konnte.“

Stephen Hawking

I. Zusammenfassung

Der zur Familie der pentameren ligandengesteuerten Ionenkanäle zugehörige Glycinrezeptor (GlyR) ist ein wichtiger Vermittler synaptischer Inhibition im Zentralnervensystem von Säugetieren. GlyR-Mutationen führen zur neurologischen Bewegungsstörung Hyperekplexie. Aufgrund fehlender struktureller Daten ist die intrazelluläre Loop-Struktur zwischen den Transmembransegmenten 3 und 4 (TM3-4 Loop) eine weitgehend unerforschte Domäne des GlyR. Innerhalb dieser Domäne wurden Rezeptortrunkierungen sowie Punktmutationen identifiziert. Rezeptortrunkierung geht mit Funktionslosigkeit einher, welche jedoch durch Koexpression des fehlenden Sequenzabschnitts zum Teil wiederhergestellt werden kann. Innerhalb dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen trunkierten, funktionslosen GlyR und sukzessiv verkürzten Komplementationskonstrukten untersucht. Dabei wurden als Minimaldomänen für die Interaktion das C-terminale basische Motive des TM3-4 Loops, die TM4 sowie der extrazelluläre C-Terminus identifiziert. Die Rückkreuzung transgener Mäuse, die das Komplementationskonstrukt iD-TM4 unter Kontrolle des GlyR-Promotors exprimierten, mit der *oscillator*-Maus spd^{ot} , die einen trunkierten GlyR exprimiert und 3 Wochen nach der Geburt verstirbt, hatte aufgrund fehlender Proteinexpression keinen Effekt auf die Letalität der Mutation. Des Weiteren wurde die Bedeutsamkeit der Integrität beider basischer Motive $^{316}RFRRKRR^{322}$ und $^{385}KKIDKISR^{392}$ im TM3-4 Loop in Kombination mit der Loop-Länge für die Funktionalität und das Desensitivierungsverhalten des humanen GlyR $\alpha 1$ anhand von chimären Rezeptoren identifiziert. Eine bisher unbekannte Patientenmutation P366L innerhalb des TM3-4 Loops wurde mit molekularbiologischen, biochemischen und elektrophysiologischen Methoden charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass die mutierten Rezeptorkomplexe *in vitro* deutlich reduzierte Glycin-induzierte Maximalströme sowie eine beschleunigte Schließkinetik aufweisen. P366L hat im Gegensatz zu bereits charakterisierten Hyperekplexiemutationen innerhalb des TM3-4 Loops keinen Einfluss auf die Biogenese des Rezeptors. P366 ist Teil einer möglichen Poly-Prolin-Helix, die eine Erkennungssequenz für SH3-Domänen darstellt. Ein potenzieller Interaktionspartner des TM3-4 Loops des GlyR $\alpha 1$ ist Collybistin, welches eine wichtige Rolle bei der synaptischen Rezeptorintegration spielt und die Verbindung zum Zytoskelett vermittelt. An der inhibitorischen Synapse verursacht P366L durch die Reduzierung postsynaptischer Chloridströme, das beschleunigte Desensitivierungsverhalten des GlyR $\alpha 1$ sowie ein verändertes Interaktionsmotiv Störungen der glycinergen Transmission, die zur Ausprägung phänotypischer Symptome der Hyperekplexie führen.

II. Summary

The glycine receptor (GlyR) belongs to the superfamily of pentameric ligand-gated ion channels and mediates synaptic inhibition in the central nervous system of mammals. GlyR mutations lead to the neuromotor disorder hyperekplexia. Due to the lack of structural data, the intracellular loop between transmembrane segments 3 and 4 (TM3-4 Loop) is considered as the most unexplored domain of the GlyR. Within this domain receptor truncations as well as point mutations have been identified. Receptor truncation correlates with non-functionality that can be partially restored by coexpression of the missing sequence. In this work, the interaction between a truncated non-functional GlyR and successively truncated complementation constructs was investigated. The C-terminal basic motif of the TM3-4 loop, the TM4 and the C-Terminus were identified as the minimal domain required for interaction. Backcrossing of a transgenic mouse line expressing the complementation construct iD-TM4 under the control of the GlyR promoter, with the *oscillator* mouse spd^{ot} expressing a truncated GlyR leading to death 3 weeks after birth, was unsuccessful and did not influence the lethality of the mutation, most probably due to the lack of transgene protein expression. In addition the importance of the integrity of both basic motifs $^{316}RFRRKRR^{322}$ and $^{385}KKIDKISR^{392}$ within the TM3-4 loop in combination with loop length were shown to be essential for functionality and desensitization behavior of the human GlyR $\alpha 1$ using chimeric receptors. An unknown TM3-4 loop mutation P366L was characterized using biomolecular, biochemical and electrophysiological approaches. It was demonstrated that mutated receptor complexes display remarkably reduced glycine-induced maximal currents in addition to accelerated channel closing kinetics *in vitro*. In contrast to previously analyzed hyperekplexia mutations within the TM3-4 loop, P366L exhibits no influence on receptor biogenesis. P366 is located in a sequence probably forming a poly-proline helix, which serves as a recognition sequence for SH3 domains. One prospective interaction partner is collybistin, which plays a major role in the process of synaptic receptor integration and connects the receptor complex to the cytoskeleton. At the site of the inhibitory synapse, P366L causes reduced chloride currents, accelerated desensitization behavior of the GlyR $\alpha 1$ and an altered interaction motif leading to disturbed glycinergic neurotransmission that result in formation of phenotypic symptoms of hyperekplexia.

III. Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung

II. Summary

III: Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Das zentrale Nervensystem	1
1.2.	Die Nervenzelle	1
1.3.	Neurotransmission an der chemischen Synapse	2
1.4.	Ligandengesteuerte Ionenkanäle	4
1.5.	Synaptische Inhibition im zentralen Nervensystem	5
1.6.	Der Glycinrezeptor	6
1.6.1.	Allgemeine Merkmale	6
1.6.2.	Allgemeine Struktur	7
1.6.3.	Diversität der GlyR-Untereinheiten und entwicklungsabhängige Regulation	10
1.6.4.	Biogenese und Reifung	13
1.6.5.	Hyperekplexie: Störung der glycinergen Neurotransmission	13
1.6.6.	Mausmodelle für Hyperekplexie: Die <i>oscillator</i> -Maus (<i>spd^{ot}</i>)	16
1.6.7.	Der TM3-4 Loop	19
2.	Material & Methoden	25
2.1.	Zelllinien	25
2.1.1.	Cos7-Zellen	25
2.1.2.	HEK293-Zellen	25
2.2.	Mauslinien	25
2.2.1	C57BL/6	25
2.2.2.	<i>oscillator</i> (<i>spd^{ot}</i>)	25
2.2.3.	tg <i>Gla1</i> -Ex9	26
2.3.	Bakterien	27
2.4.	Modellierung von Glycinrezeptorstrukturen	27
2.5.	Kits: kommerzielle Reagenzienansätze	27
2.6.	Vektoren und Plasmide	27
2.7.	Enzyme	28
2.8.	Chemikalien	29
2.9.	Antikörper	29
2.10.	DNA- und Proteinstandardlösungen	30

2.11.	Zellkulturmedien- und Lösungen	30
2.12.	Transfektionslösungen	31
2.13.	Bakterienkulturmedien	31
2.14.	Puffer und Lösungen für Western-Blot und SDS-PAGE	32
2.15.	Puffer für elektrophysiologische Experimente	32
2.16.	Puffer für immunzytochemische Experimente	33
2.17.	Zellbiologische Methoden	33
2.17.1.	Acetonbehandlung von Deckgläschen	33
2.17.2.	Beschichtung von Deckgläschen mit Poly-L-Lysin	33
2.17.3.	Kultivierung von Zelllinien (HEK293/Cos7)	34
2.17.4.	Transfektion von HEK293-Zellen	34
2.17.5.	Transfektion von Cos7-Zellen	35
2.17.6.	Präparation und Kultivierung von Hippocampusneuronen	35
2.17.7.	Transfektion von Hippocampusneuronen	36
2.18.	Proteinbiochemische Methoden	38
2.18.1.	Gewinnung von Zelllysaten aus HEK293-Zellen	38
2.18.2.	Proteinbestimmung nach Bradford	38
2.18.3.	SDS-PAGE	39
2.18.4.	Western-Blot	40
2.18.5.	Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen	41
2.18.6.	Membranproteinpräparation	42
2.18.7.	Koimmunopräzipitation (Ko-IP)	43
2.18.8.	Immunzytochemie	44
2.19.	Molekularbiologische Methoden	46
2.19.1.	PCR- <i>Polymerase Chain Reaction</i>	46
2.19.2.	PCR-Mutagenese	47
2.19.3.	Agarose-Gelelektrophorese	48
2.19.4.	Gel-Extraktion	48
2.19.5.	Klonierung	48
2.19.6.	Klonierung von GlyR-Varianten in <i>low-copy</i> -Vektoren	52
2.19.7.	DNA-Sequenzierung	53
2.19.8.	DNA-Isolation aus Gewebe	53
2.19.9.	Genotypisierung der <i>oscillator</i> -Mäuse	53
2.19.10.	Genotypisierung der tg <i>Gral</i> -Ex9-Mäuse	54
2.20.	Elektrophysiologische Methoden	55
2.20.1.	Prinzip der Durchführung von Patch-Clamp-Experimenten	55
2.20.2.	Physikalische Grundlagen der Datengewinnung	57
2.20.3.	Datenanalyse elektrophysiologischer Experimente	58
2.20.4.	Spannungsklemmen-Fluorometrie	59

3.	Ergebnisse	61
3.1.	Funktionelle <i>in vitro</i> Komplementation des murinen GlyRα1	61
3.1.1.	Vorarbeiten und Generierung der Konstrukte	61
3.1.2.	Oberflächenexpression ausgewählter Komplementationskonstrukte	63
3.1.3.	Ergänzende zelluläre Detektion der Komplementationskonstrukte	65
3.1.4.	Elektrophysiologische Charakterisierung der Komplementationskonstrukte	68
3.2.	Transgene Mäuse: Funktionelle <i>in vivo</i> Komplementation	71
3.2.1.	Untersuchung der Komplementationseffizienz verschiedener Konstrukte	71
3.2.2.	Detektion des transgenen Proteins	75
3.2.3.	<i>in vivo</i> Komplementation des <i>oscillator</i> -Phänotyps	76
3.3.	Einfluss der Länge des TM3-4 Loops auf die Rezeptorfunktion	77
3.3.1.	Generierung verschiedener chimärer Glycinrezeptoren	78
3.3.2.	Expression chimärer GlyR-Varianten	79
3.3.3.	Elektrophysiologische Charakterisierung chimärer GlyR- Varianten	82
3.4.	Charakterisierung der Patientenmutation P366L	86
3.4.1.	Generierung der Konstrukte	87
3.4.2.	Expression der P366-Varianten	88
3.4.3.	Einfluss auf Glycin-induzierte Maximalströme und Desensitisierungsverhalten	90
3.4.4.	Charakterisierung von P366L im Oozyten-Expressionssystem	93
3.4.5.	Interaktion der Poly-Prolin-Sequenz mit intrazellulären Proteinen	95
4.	Diskussion	103
4.1.	Funktionelle <i>in vitro</i> Komplementation des murinen GlyRα1	103
4.1.1.	Geladene Aminosäuren als Vermittler der Interaktion	103
4.1.2.	Spezielle Subdomänen als Vermittler der Interaktion	105
4.2.	<i>In vivo</i> Komplementation des <i>oscillator</i>-Phänotyps	107
4.2.1.	Detektion der Proteinexpression	109
4.3.	Einfluss der Länge des TM3-4 Loops auf die Rezeptorfunktion	110
4.4.	Charakterisierung der Patientenmutation P366L	113
4.4.1.	Einfluss auf die Biogenese des GlyR	114
4.4.2.	Einfluss auf funktionelle Kanaleigenschaften	114

4.4.3.	Einfluss auf die Desensitisierung_____	116
4.4.4.	P366 als Bindemotiv für intrazelluläre Proteine_____	117
5.	Quellenverzeichnis_____	120
Anhang I	Abbildungsverzeichnis_____	132
Anhang II	Tabellenverzeichnis_____	133
Anhang III	Abkürzungsverzeichnis_____	134
Anhang IV	Primerliste_____	136
	Curriculum Vitae_____	141
	Publikationen_____	142
	Eidesstattliche Erklärung_____	144
	Affidavit_____	144
	Danksagung_____	145

1. Einleitung

1.1. Das zentrale Nervensystem

Als das zentrale Nervensystem (ZNS) bezeichnet man bei Wirbeltieren jene Nervenstrukturen, die vom Gehirn und Rückenmark gebildet werden und für die zentrale Reizverarbeitung verantwortlich sind. Dazu gehören (i) die Integration aller internen und externen sensorischen Reize, (ii) die Koordination aller motorischen Einheiten des Organismus sowie (iii) die Regulation aller dafür notwendigen internen Abstimmungsvorgänge zwischen Organsystemen. Das ZNS erfüllt auf diese Weise die Aufgabe alle Informationen über die Umwelt und den Organismus selbst zu verarbeiten und auf Veränderungen mit präzisen und hochspezifischen Reaktionen optimal zu antworten. Demzufolge ist es ein wesentlicher Bestandteil der fundamentalen Eigenschaft des Lebens, welchen man Erreg- oder Reizbarkeit nennt.

Bei Wirbeltieren unterscheidet man das ZNS vom peripheren Nervensystem (PNS). Letzteres bezeichnet Nervenstrukturen außerhalb des Schädels und des Wirbelkanals, welche hauptsächlich aus den Hirn- und Spinalnerven sowie dem enterischen Nervensystem bestehen. Diese Abgrenzung ist jedoch rein topografisch, da die Nervenfortsätze des PNS fast ausnahmslos in das ZNS ziehen, in welchem die eigentliche Informationsverarbeitung stattfindet. Im Gegensatz zum ZNS ist das PNS nicht durch Knochen oder die Blut-Hirn-Schranke geschützt.

1.2. Die Nervenzelle

Die Nervenzelle (Neuron) bildet die strukturelle und funktionelle Grundeinheit des Nervensystems. Neuronen sind auf die Erregungsleitung spezialisierte Zelltypen, die in ihrer Gesamtheit zusammen mit den Gliazellen das Nervensystem ausbilden. Ein typisches Neuron besteht aus 4 morphologisch definierten Regionen (Abb.1 A): dem Zellkörper, den Dendriten, dem Axon und den präsynaptischen Terminalen. Das Soma stellt das metabolische Zentrum der Nervenzelle dar und beinhaltet den Zellkern sowie das endoplasmatische Retikulum als auch weitere membranumschlossene Zellkompartimente. Ausgehend vom Soma erstrecken sich 2 Arten von Zellfortsätzen. Die zahlreich verzweigten afferenten Dendriten dienen der Aufnahme von Informationen anderer Neuronen. Ein vergleichsweise großes efferentes Axon ist für die Übertragung von Signalen (Aktionspotentialen) zu anderen Neuronen spezialisiert. Aktionspotentiale sind sehr schnelle transiente Nervenimpulse, die am Axonhügel des

Neurons initiiert werden und über die Axonmembran mit einer Geschwindigkeit von 1-100 m/s zu den präsynaptischen Terminalen weitergeleitet werden. Die Entstehung eines Aktionspotentials funktioniert nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip und wird von spannungsabhängigen Ionenkanälen gebildet. Wird am Axonhügel ein bestimmtes Schwellenpotential (ca. -60 mV) überschritten, kommt es zur Depolarisation der Axonmembran und zur Entstehung des Aktionspotentials, welches sich bis in die feinen axonalen Verästelungen fortpflanzt. Dort wird das elektrische Signal auf die Dendriten eines anderen Neurons übertragen. Diese Kommunikationsstellen sind die Synapsen.

1.3. Neurotransmission an der chemischen Synapse

Im ZNS existieren 2 Arten von neuronalen Kommunikationsstellen: die elektrischen, transmitterfreien und die chemischen Synapsen. Elektrische Synapsen (*gap junctions*) sind Kanalproteine, die das Zytoplasma zweier benachbarter Zellen direkt verbinden. Aufgrund der direkten Verbindung führt die Depolarisation der präsynaptischen Zelle zur Bewegung von Ladungsträgern (Ionen) in die postsynaptische Zelle. Die Erregungsleitung erfolgt ohne Verzögerung läuft und in der Regel bidirektional. Die Aufgabe elektrischer Synapsen ist hauptsächlich die Synchronisation bestimmter Neuronengruppen, die als Oszillatoren fungieren. Beim Menschen werden sie vorrangig von bestimmten Herzmuskel-, Epithel- und Gliazellen ausgebildet.

Die Erregungsleitung an der chemischen Synapse hingegen läuft indirekt ab. Das bedeutet, dass das ankommende elektrische Signal der Präsynapse zunächst in ein chemisches Signal in Form von Neurotransmittern übersetzt und anschließend in der Postsynapse wieder in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Spannungsabhängige Calciumkanäle in den Synapsenendknöpfchen der Axonterminalen öffnen als Antwort auf die Ankunft eines Aktionspotentials und Calciumionen strömen in die Präsynapse. Innerhalb von Sekundenbruchteilen bewirkt dieses Ereignis die Fusionierung Neurotransmitter-gefüllter Vesikel mit der präsynaptischen Membran sowie die anschließende Freisetzung ihres Inhalts in den synaptischen Spalt. An der postsynaptischen Membran befinden sich ligandengesteuerte Ionenkanäle (Rezeptoren), die den Neurotransmitter binden und daraufhin eine Konformationsänderung durchlaufen, welche den Einstrom von verschiedenen Ionen in die Postsynapse zur Folge hat (Abb.1 B). Abhängig von der Art der auf der postsynaptischen Membran exprimierten Rezeptoren unterscheiden sich die qualitativen Eigenschaften der postsynaptischen Reaktion. Man unterteilt Rezeptoren in metabotrope und ionotrope

Neurotransmitterrezeptoren. Metabotrope Rezeptoren sind Transmembranproteine, die Signale mithilfe von Guanosintriphosphat-bindenden Proteinen (G-Proteinen) weiterleiten. Als Reaktion auf die Bindung des Neurotransmitters im Extrazellulärbereich des Rezeptors werden im Intrazellulärbereich G-Proteine aktiviert, welche in $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ Untereinheiten dissoziieren. Diese Untereinheiten können daraufhin andere Rezeptoren entweder direkt oder über *second messenger*-Kaskaden modulieren und dadurch die Depolarisierung oder Hyperpolarisierung der postsynaptischen Membran bewirken. Iontrope Rezeptoren sind transmembrane Proteine, die die Membran durchspannen und eine Ionenpore ausbilden. Dieser Ionenkanal öffnet als Reaktion auf die Bindung des jeweiligen Neurotransmitters, was den Einstrom von Ionen in die Postsynapse auslöst. Entlang des Axons sowie an der Synapse sind außerdem spannungsabhängige Ionenkanäle an der direkten Weiterleitung elektrischer Signale beteiligt. Iontrope Rezeptoren bilden die Superfamilie der ligandengesteuerten Ionenkanäle (LGICs). Exzitatorische (erregende) LGICs vermitteln den Einstrom von Kalium-, Natrium- oder Calciumionen (positive Ladungsträger, depolarisierend), inhibitorische LGICs leiten hingegen den Einstrom von negativ geladenen Chloridionen und wirken (meist) hyperpolarisierend. Im menschlichen Gehirn nutzen exzitatorische LGICs in den meisten Fällen Glutamat oder Acetylcholin als Neurotransmitter, während inhibitorische LGICs die Neurotransmission mittels Glycin oder γ -Aminobuttersäure (GABA) gewährleisten.

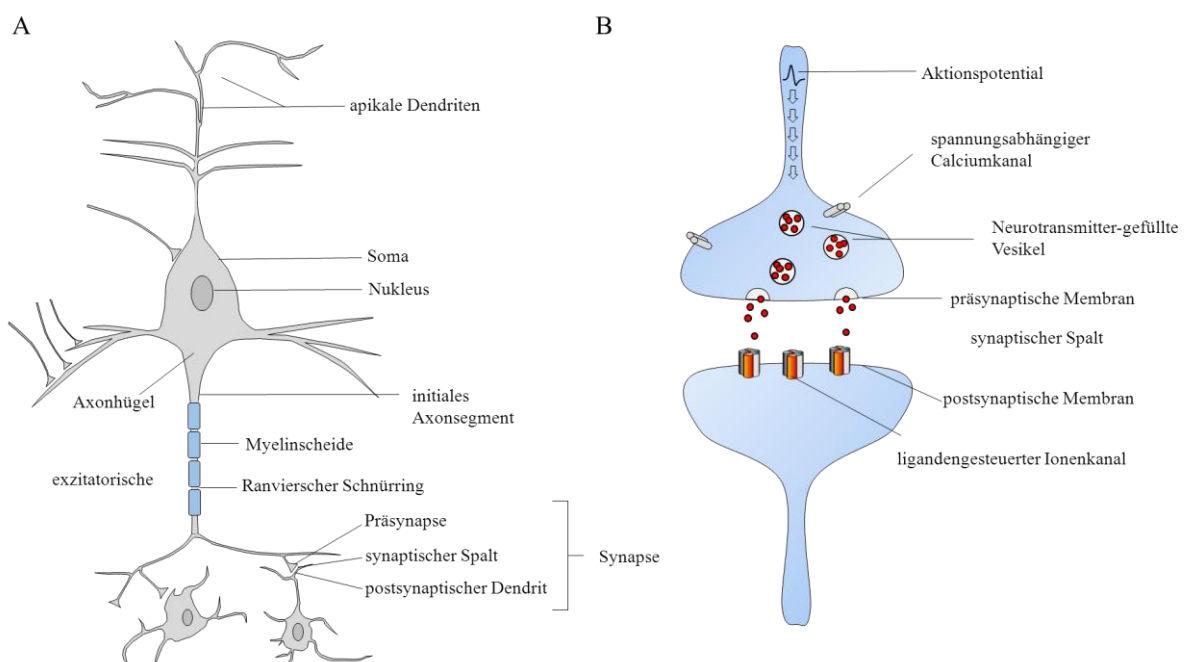


Abbildung 1. Schematische Darstellung eines Neurons und einer chemischen Synapse

A: Struktur eines typischen Neurons im ZNS. Die meisten Neuronen im Nervensystem der Wirbeltiere teilen bestimmte Hauptmerkmale. Dazu gehören der Zellkörper welcher den Nukleus beinhaltet und 2 Arten neuronaler Fortsätze ausbildet: Dendriten und Axon(e). Das Aktionspotential wird am Axonhügel generiert und bis zur Präsynapse fortgeleitet. Zur Beschleunigung der saltatorischen Erregungsleitung sind einige Axone von einer Myelinschicht isoliert. B: In der Präsynapse bewirkt die Depolarisation der Membran die Fusionierung Transmitter-gefüllter Vesikel und anschließende Freigabe des Inhalts in den synaptischen Spalt. An der postsynaptischen Membran binden diese Transmitter ligandengesteuerte Ionenkanäle. Dadurch wird die Leitfähigkeit der postsynaptischen Membran für bestimmte Ionen kurzzeitig erhöht. Abhängig vom exprimierten Rezeptor bewirkt die Kanalöffnung eine Depolarisation oder Hyperpolarisation der Postsynapse.

1.4. Ligandengesteuerte Ionenkanäle

Ligandengesteuerte Ionenkanäle (LGICs, *ligand-gated ion channels*) sind transmembrane Proteine, die als Antwort auf die Bindung ihres jeweiligen Neurotransmitters an die extrazelluläre Domäne (ECD) eine zentrale Ionenpore öffnen und somit die Passage von mono- oder divalenten Ionen wie Na^+ , K^+ , Ca^{2+} oder Cl^- durch die Zellmembran ermöglichen. Zu dieser Superfamilie zählt man die Cys-Loop-Rezeptoren (CLRs), ionotrope Glutamaterezeptoren sowie die Purinrezeptoren (Abb. 2). Zu den CLRs gehören der nikotinische Acetylcholinrezeptor (nAChR), der Serotoninrezeptor Typ3 (5-HT₃R), die γ -Aminobuttersäurerezeptoren Typ A/C (GABA_{A/C}R) sowie der Glycinrezeptor (GlyR) (Lynch, 2004). Namensgebend für diese Familie ist eine Disulfidbrücke zwischen 2 hochgradig konservierten Cysteinresten in der ECD (Vogel et al., 2009). CLRs setzen sich aus 5 Proteinuntereinheiten zusammen, eine Untereinheit besteht dabei aus 4 α -helikalen Transmembransegmenten (TM1-TM4), die über Loop-Strukturen miteinander verbunden sind, sowie einer ECD und einem kurzen C-Terminus. Im pentameren Protein bilden die TM2 jeder Untereinheit zusammen den zentralen Ionenkanal aus.

Neben den CLRs zählt zur Superfamilie der LGICs die Familie der ionotropen Glutamaterezeptoren, welche Tetramere ausbilden und weiterhin in N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDAR), α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazolpropionsäure-Rezeptoren (AMPA) und Kainatrezeptoren unterteilt werden (Traynelis et al., 2010). Die dritte Gruppe der CLRs bilden die trimeren Purinrezeptoren (P2X-Rezeptoren), deren Untereinheiten aus 2 Transmembransegmenten bestehen und ATP in ihrer ECD binden (Jarvis and Khakh, 2009).

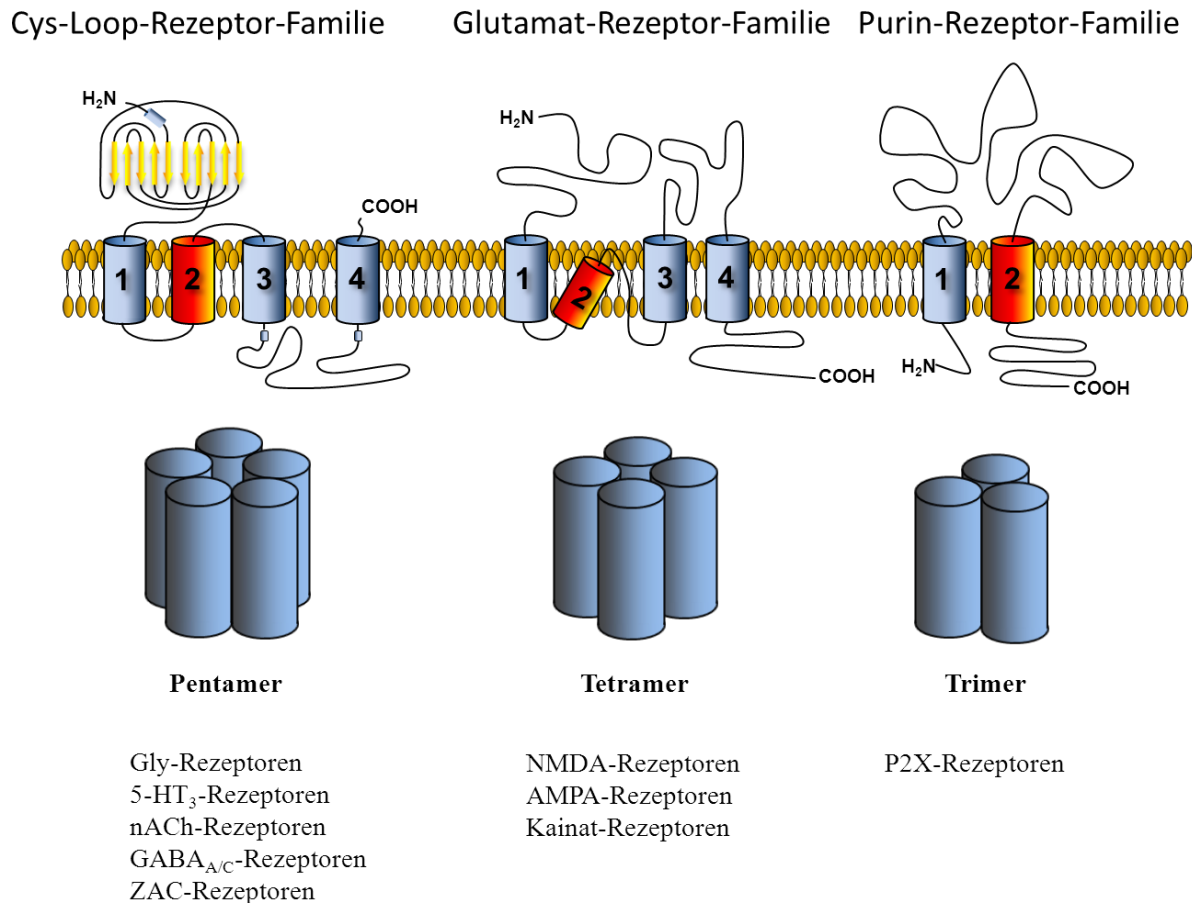


Abbildung 2. Die Superfamilie der ligandengesteuerten Ionenkanäle

Die Superfamilie der LGICs besteht aus den Cys-Loop-Rezeptoren (Pentamere), den ionotropen Glutamatrezeptoren (Tetramere) und den Purinrezeptoren (Trimere). Die Mitglieder einer Familie teilen jeweils den grundsätzlichen Aufbau aus Extrazellulärdomäne, Transmembrandomänen (Zylinder) sowie intrazellulären und extrazellulären Loop-Strukturen. Die TM-Domänen jeder Untereinheit, die im oligomeren Rezeptor die Ionenpore ausbilden, sind rot dargestellt.

1.5. Synaptische Inhibition im zentralen Nervensystem

Bei dem Prozess der synaptischen Inhibition handelt es sich um einen elektrochemischen Impuls, der die Nervenzelle hemmt ein Aktionspotential zu generieren und damit das von dieser Zelle weitergegebene Signal abschwächt. In diesem Zusammenhang spricht man von einem inhibitorischen postsynaptischen Potential (IPSP). Im ZNS wird die synaptische Inhibition durch die Neurotransmitter GABA oder Glycin gewährleistet. Diese binden und aktivieren GABA_{A/C}-Rezeptoren bzw. Glycinrezeptoren. Man zählt diese sogenannten inhibitorischen Ionenkanäle aufgrund ihrer Leitfähigkeit für negativ geladene Chloridionen (Cl⁻) zu den hemmenden pentameren ligandengesteuerten Ionenkanälen. Die Aktivierung von GABA_{A/C}S oder GlyRs führt in den meisten Fällen (embryonal exzitatorisch) zur Hyperpolarisation der Postsynapse und damit zur Hemmung des Aktionspotentials.

GABAerge Neurone werden im gesamten ZNS exprimiert. Eine besondere Rolle spielt der GABAR im Kleinhirn sowie in den Basalganglien, wo er an der Koordination von Bewegungen sowie an der Einleitung und Aufrechterhaltung des Schlafs beteiligt ist. Der GlyR wird hingegen hauptsächlich im Hirnstamm und Rückenmark sowie in der Retina exprimiert (Legendre, 2001).

1.6. Der Glycinrezeptor

1.6.1. Allgemeine Merkmale

Der Anionen-selektive Glycinrezeptor ist ein pentamerer ligandengesteuerter Ionenkanal, der die schnelle synaptische Inhibition im Rückenmark und Hirnstamm von Säugetieren vermittelt. Ursprünglich wurde der GlyR das erste Mal 1982 aus dem Rückenmark der Ratte mittels Affinitäts-Chromatografie unter Zuhilfenahme von Strychnin-Agarose im Labor von Heinrich Betz isoliert (Pfeiffer et al., 1982). Spätere Studien konnten zeigen, dass es sich bei diesem Rezeptor um ein Pentamer aus α -Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 48 kDa und β -Untereinheiten von 58 kDa handelt (Grenningloh et al., 1987, Grenningloh et al., 1990). Die genaue Konfiguration der Untereinheiten wird gegenwärtig kontrovers diskutiert, da unklar ist, ob es sich beim adulten GlyR um ein Pentamer aus 2α - und 3β -Untereinheiten handelt (Grudzinska et al., 2005, Yang et al., 2012) oder um eine Kombination aus 3α - und 2β -Untereinheiten (Durisic et al., 2012).

Der primäre Agonist des GlyR ist der namensgebende Neurotransmitter Glycin. Strukturell ähnliche Aminosäuren wie β -Alanin oder Taurin sind jedoch ebenfalls in der Lage den Rezeptor zu aktivieren und werden als partielle Agonisten eingestuft (Lewis et al., 2003). Hauptantagonist des GlyRs ist das pflanzliche Alkaloid Strychnin, welches Glycin durch seine hohe Affinität aus der Bindestelle verdrängt und den Rezeptor blockiert (Rasmussen et al., 2002). Weitere wichtige Modulatoren des GlyRs stellen Zn^{2+} (Laube et al., 2000), d-Tubocurarin (Brams et al., 2011), 3-[2'-Phosphonomethyl[1,1'-Biphenyl]-3-yl]Alanin (PMBA) (Saitoh et al., 1994), Picrotoxin (Pribilla et al., 1992), Cyanotriphenylborate (Rundstrom et al., 1994), Ivermectin (Shan et al., 2001), Alkohole und Anästhetika (Mascia et al., 1996, Mihic et al., 1997) sowie diverse Endocannabinoide dar (Yevenes and Zeilhofer, 2011a).

1.6.2. Allgemeine Struktur

Der adulte GlyR-Komplex besteht aus fünf Proteinuntereinheiten, die sich als Heteropentamer rosettenähnlich um die zentrale Symmetrieachse anlagern, welche den Ionenpermeationsweg darstellt (Breitinger and Becker, 2002). Die TM2-Domänen aller fünf Untereinheiten tragen zur Ausbildung der Ionenpore bei (Hilf and Dutzler, 2008) (Abb. 4C). Die ECD ist eine hochgradig strukturierte Region des Rezeptors, die starke Homologie zum Acetylcholin-Bindeprotein (AChBP) der Schlammschnecke *Lymnea stagnalis* aufweist (Brejc et al., 2001). Die Struktur des N-Terminus ist durch 10 β -Faltblätter gekennzeichnet, die ein sogenanntes β -Sandwich ausbilden und eine Immunglobulin-artige Faltung aufweisen (Bork et al., 1994) (Abb. 3). Des Weiteren beinhaltet die ECD 2 kurze α -helikale Elemente, deren Funktion bislang unerforscht ist (Du et al., 2015). Die ECD bildet die Ligandenbindestelle an der Grenzfläche zwischen zwei benachbarten Untereinheiten aus. Sie besteht aus den Loops A, B und C der Hauptuntereinheit und Loops D, E und F der benachbarten Untereinheit. Die Nomenklatur besagt, dass im heteromeren Rezeptor die α -Untereinheit als die Hauptuntereinheit (*principal site*, „+“-*site*) und die β -Untereinheit als komplementäre Untereinheit (*complementary site*, „-“-*site*) bezeichnet werden. An diesen Grenzflächen bilden sich hydrophobe Bindetaschen aus, in denen aromatische Aminosäurereste Kation- π -Interaktionen mit dem Stickstoffmolekül der Aminogruppe des Agonisten eingehen und auf diese Weise binden (Zhong et al., 1998, Corringer et al., 2000). Für die Ligandenbindung sind dabei die Aminosäurereste F159, G160, Y161 (Loop B) sowie K200, Y202 und T204 (Loop C) essentiell (Breitinger and Becker, 2002). Diese Aminosäuren sind ebenfalls an der Bindung von Strychnin beteiligt (Vandenberg et al., 1992, Brams et al., 2011). Aus diesem Grund spricht man von überlappenden Bindestellen. Die Aminosäure D97 (Loop A) bildet eine elektrostatische Verbindung mit der benachbarten Untereinheit aus, die durch Bindung des Liganden zerstört wird und essentiell für die Kanalfunktion ist (Todorovic et al., 2010). Mutagenesestudien konnten zeigen, dass der Austausch durch Alanin oder Arginin an dieser Position zu GlyRs führt, die spontan öffnen (Beckstead et al., 2002, Chung et al., 2010). Nicht nur die Anwesenheit bestimmter, an der Ligandenbindung beteiligter Aminosäurereste ist für die Umstrukturierung der ECD und anschließende Öffnung des Kanals entscheidend. So deuten diverse Studien am nAChR darauf hin, dass sich der komplette Loop C in Richtung des gebundenen Agonisten bewegt und somit die Diffusion dieser Moleküle verhindert (Hansen et al., 2005). An der komplementären Grenzfläche („-“-*site*) der Bindetasche liegen weitere wichtige Determinanten der Kanalfunktion. Aminosäurereste in Loop D und E tragen zur Effizienz der Ligandenbindung bei und sind am Prozess der Liganden-induzierten

Desensibilisierung und Öffnung des Kanals beteiligt (Nys et al., 2013). Ebenso sind die Aminosäurereste in Loop F vermutlich eher an der strukturellen Neuordnung extrazellulärer Kanalbereiche als Antwort auf die Ligandenbindung beteiligt, als an der eigentlichen Bindung.

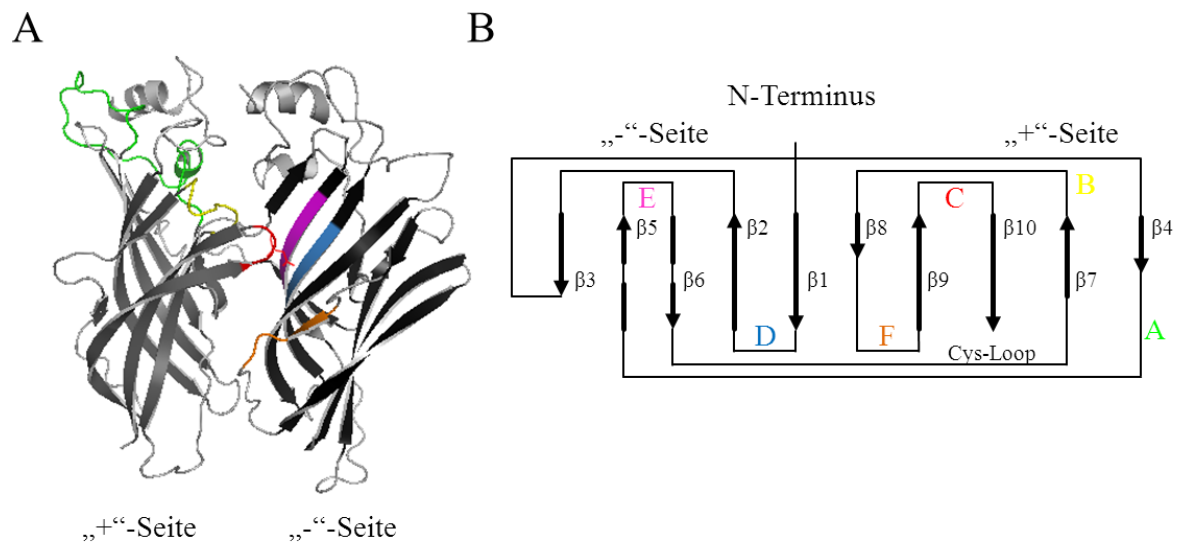


Abbildung 3. Aufbau der N-terminalen Extrazellulärdomäne des GlyR

A: Kristallstruktur der ECD des GlyR (*Danio rerio*, PDB-ID: 3JAD; modifiziert nach Du et al., 2015). Die an der Grenzfläche zweier Untereinheiten an der Ligandenbindung beteiligten Loop-Strukturen sind farblich gekennzeichnet (grün, Loop A; gelb, Loop B; rot, Loop C; blau, Loop D; magenta, Loop E, braun, Loop F). B: Schematische Darstellung der Extrazellulärdomäne aus 10 β -Faltblättern (schwarze Pfeile), die durch die Loops A-F miteinander verbunden sind.

Der Prozess, bei dem die Bindung des Liganden in der ECD des Rezeptors zur Öffnung der Ionenpore in der Transmembrandomäne (TMD) führt, bezeichnet man als *Gating*. Dabei kommt es zu einer Kaskade von Konformationsänderungen in Teilbereichen des Rezeptors, die auf die TM2-Segmente übertragen werden. Man fasst diejenigen Strukturen des Kanals unter dem Begriff *transition zone* (Umschaltzone, Abb. 4) zusammen. Diese *transition zone* umfasst Teile der ECD (siehe oben), den Cys-Loop, die prä-TM1-Domäne sowie den TM2-3 Loop (Brejc et al., 2001, Unwin, 2005, Hibbs and Gouaux, 2011). Die Konformationsänderung in der *transition zone* führt zur Umstrukturierung des TM2-3 Loops und zur rotationsartigen Kippbewegung der TM2-Segmente, was zur Öffnung des Kanals und zum Einstrom von Cl^- führt (Pless et al., 2007, Lee et al., 2009).

Die Ionenselektivität des GlyR wird von geladenen Aminosäureresten auf der Innenseite der Ionenpore nahe des zytoplasmatischen Endes der TM2-Segmente determiniert (Hucho and Weise, 2001). Betrachtet man die porenaukleidenden Aminosäurereste aus einer hypothetischen Aufsicht, bilden diese einen hydrophilen Streifen in einer sonst hydrophoben α -Helix aus. Zum Vergleich der TM2-Segmente verschiedener LGICs existiert ein Nummerierungssystem, welches V253 als Position 1' am zytoplasmatischen Ende des Kanals und R271 als Position 19' am extrazellulären Ende festlegt (Lynch, 2004). Obwohl es weitere molekulare Determinanten in Rezeptorbereichen außerhalb der TM2 gibt, gelten als minimale Grundvoraussetzung für Anion-selektive CLR die Existenz der Reste -2P' (P250) und -1A' (A251) (Keramidas et al., 2004, Thompson et al., 2010). Die Mutationen P250 Δ , A251E und T265V in TM2 resultieren in Kation-selektiven GlyRs (Keramidas et al., 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Ladung und Polarität an Position 250 (TM1-2 Loop) eine kritische Determinante für die Kanalfunktion darstellt (Breitinger et al., 2001). Neben der Kanal-bildenden Funktion dient TM2 als Hauptbindestelle für allosterische Modulatoren (Mihic et al., 1997, Nury et al., 2010). Die Transmembransegmente TM1, TM3 und TM4 sind im pentameren Rezeptor von der Kanalpore abgewandt. Es wird angenommen, dass welches für die korrekte tetrahelikale Assemblierung der einzelnen Transmembransegmente sowie für die Ausbildung der pentameren Geometrie innerhalb der Rezeptorfamilie notwendig ist (Haeger et al., 2010). Über die Architektur des großen intrazellulären Loops zwischen TM3 und TM4 (TM3-4 Loop) gibt es aufgrund fehlender Kristallstrukturdaten keine Informationen über das exakte Verhalten während des Öffnens und Schließens des Kanals. *In vitro* Studien postulieren allerdings eine wichtige Funktion dieses Kanalbereichs während der Biogenese und posttranslationaler Modifikation (Sadtler et al., 2003, Villmann et al., 2009b). Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass Trunkierungen dieses Bereichs einen Einfluss auf das Desensitisierungsverhalten des GlyR haben (Papke and Grosman, 2014, Langlhofer et al., 2015). Eine ausführliche Erörterung zum aktuellen Stand der Forschung bezüglich der Ergebnisse zu den Funktionen und Eigenschaften des TM3-4 Loops ist auf S.19 zu finden.

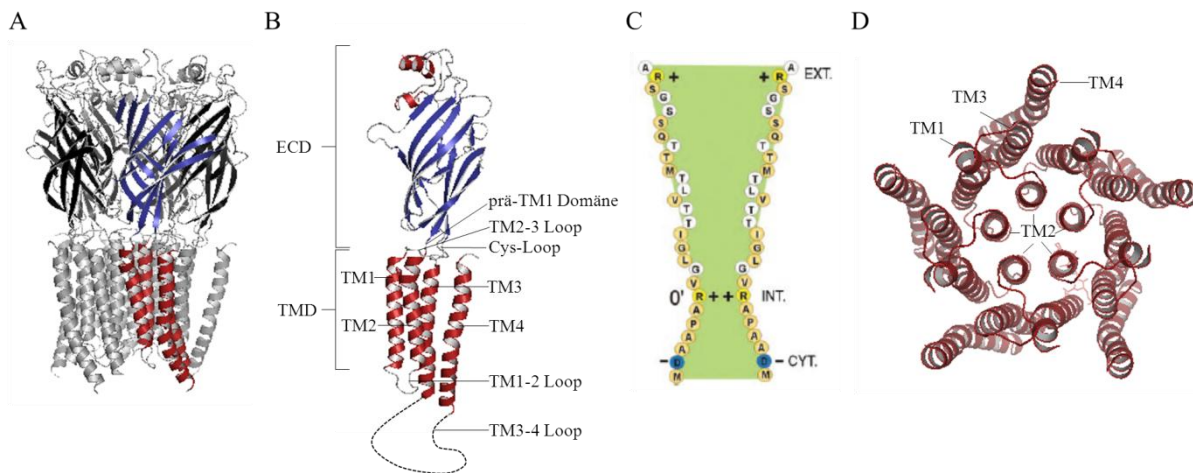


Abbildung 4. Struktur des Glycinrezeptors

A: Kristallstruktur des Glycinrezeptors (PDB-ID:3JAD, modifiziert nach Du et al., 2015). Dargestellt ist der pentamere GlyR. Eine einzelne Untereinheit ist farblich hervorgehoben (rot: TMD, blau extrazelluläre β -Faltblätter). Diese Abbildung enthält keine strukturellen Informationen über den TM3-4 Loop. B: Kristallstruktur einer einzelnen GlyR α 1-Untereinheit aus *Danio rerio*. (rot: α -helikale Bereiche, blau: β -Faltblätter, grau: Loop-Strukturen). Zu erkennen ist der tetrahelikale Aufbau aus 4 α -helikalen Transmembransegmenten. Die Extrazellulärdomäne baut sich aus 2 kurzen α -helikalen Elementen und 10 β -Faltblätter auf, die über kurze Loop-Strukturen miteinander verbunden sind und eine Immunglobulin-artige Gestalt annehmen. Die für den Gating-Prozess wichtige *transition zone* besteht aus der prä-TM1-Domäne, dem Cys-Loop sowie dem TM2-3 Loop. Der TM3-4 Loop ist durch die gestrichelte Linie angedeutet. C: Schematische Darstellung eines hypothetischen Querschnitts der GlyR-Ionenpore nach Lynch, 2004. Zu beachten ist, dass P250 und A251 nach 2015 nicht mehr als Teil der Ionenpore angesehen werden. Porenauskleidende Aminosäurereste sind als weiße Kreise dargestellt. D: Aufsicht auf die Transmembrandomäne des GlyR. Die zentrale Ionenpore wird von den TM2-Segmenten der 5 Untereinheiten gebildet.

1.6.3. Diversität der GlyR-Untereinheiten und entwicklungsabhängige Regulation

Derzeit wurden 4 α -Untereinheiten des GlyRs in Säugetieren identifiziert, die von den Genen *GLRA1* (Mensch: Chromosom 5; Maus: *Glr1*, Chromosom 11), *GLRA2* (bzw. Maus: *Glr2*, X-Chromosom), *GLRA3* (Mensch: Chromosom 4; Maus: *Glr3*, Chromosom 8) und *GLRA4* (bzw. Maus: *Glr4*, X-Chromosom) gesteuert werden. Jede Untereinheit ist in der Lage funktionelle homopentamere Kanäle auszubilden (Kuhse et al., 1991, Nikolic et al., 1998, Harvey et al., 2000). *GLRA4* bildet allerdings eine Ausnahme, da es beim Menschen als Pseudogen fungiert (Simon et al., 2004). Zusätzlich existiert eine β -Untereinheit (Mensch: Chromosom 4; Maus: *GlrB* Chromosom 3), die vom Gen *GLRB* kontrolliert wird. Die β -Untereinheit ist nicht in der Lage funktionelle Homopentamere auszubilden (Bormann et al., 1993, Griffon et al., 1999). Stattdessen vermittelt sie im adulten heteromeren Rezeptorkomplex die postsynaptische Verankerung über das Gephyrin-Bindemotiv im TM3-4 Loop und trägt zur Bindung von Glycin in der ECD bei (Meyer et al., 1995, Meier et al., 2001, Grudzinska et al., 2005). Elektrophysiologische Experimente konnten zeigen, dass die

verschiedenen homo- und pentameren GlyRs sich durch ihre typischen Einzelkanal-Leitfähigkeiten sowie durch differentielle Kanalkinetik unterscheiden (Takahashi and Momiyama, 1991, Bormann et al., 1993). Pharmakologisch lassen sich homomere α GlyRs von heteromeren $\alpha\beta$ GlyRs durch ihre unterschiedliche Sensitivität gegenüber Picrotoxin unterscheiden (Pribilla et al., 1992). Während homomere α GlyRs durch den nicht-kompetitiven Antagonist inhibiert werden, bewirkt die Anwesenheit der β -Untereinheit in heteropentameren GlyRs eine stark reduzierte Empfindlichkeit.

Es existieren zwei Spleißvarianten der $\alpha 1$ -Untereinheit, die sich durch ein Insert von acht Aminosäuren (lange Spleißvariante: $\alpha 1$ ins) im TM3-4 Loop voneinander unterscheiden (Malosio et al., 1991a). Die Expression der GlyR $\alpha 1$ -mRNA beginnt bei der Ratte am Tag 5 nach der Geburt und steigert sich bis zur Vollendung der Adoleszenz. Bei der Maus wurde ab dem Embryonalstadium E14 GlyR $\alpha 1$ -mRNA detektiert (Malosio et al., 1991a), während die Expression der Untereinheit beim Menschen direkt nach der Geburt beginnt. Der GlyR $\alpha 1$ wird hauptsächlich im Rückenmark, in einzelnen Kernen des Hirnstamms sowie in der Retina exprimiert, wurde jedoch ebenso in höheren Hirnregionen wie dem Thalamus und dem Hippocampus detektiert (Sato et al., 1991, Meng et al., 2014).

Von der $\alpha 2$ -Untereinheit sind ebenfalls zwei Spleißvarianten des Exons 3 bekannt (Kuhse et al., 1991). Aufgrund des ausgeprägten Expressionsmusters im embryonalen Nervensystem (der Ratte) wird angenommen, dass der homomere $\alpha 2$ GlyR die pränatale Form des GlyRs darstellt (Becker et al., 1988, Malosio et al., 1991b). Außerdem impliziert die relativ hohe Sensitivität Glycin-induzierter Chloridströme in unreifen Neuronen die abundante Existenz homomerer $\alpha 2$ GlyRs (Mangin et al., 2003). Nach der Geburt sinkt die Expression bis zur postnatalen Woche 3 stark ab, während die Expression der $\alpha 1$ - und der β -Untereinheit in diesem Zeitraum kontinuierlich zunimmt. Aus diesem Grund spricht man von einem entwicklungsabhängigen Wechsel zwischen den verschiedenen Untereinheiten des GlyR (Lynch, 2009). Da innerhalb embryonaler Neuronen die Chloridkonzentration im Vergleich zu ausgereiften Neuronen relativ hoch ist (Rivera et al., 1999), wird davon ausgegangen, dass $\alpha 2$ GlyRs im Embryonalstadium den depolarisierenden Glycin-induzierten Chloridstrom vermitteln, der den Einstrom von Ca^{2+} stimuliert (Flint et al., 1998). Dieser Calciumeinstrom ist für die Ausbildung zahlreicher neuronaler Spezialisierungen, wie z.B. die Entwicklung glycinerner Synapsen, notwendig (Kneussel and Betz, 2000b). In einigen Geweben, wie dem auditorischen Hirnstamm, der Retina und dem Cerebellum, wird die $\alpha 2$ -Untereinheit in homo- oder heteropentamerer Form bis ins Erwachsenenalter exprimiert (Piechotta et al., 2001, Nobles et al., 2012). Auf der anderen Seite zeigen GlyR $\alpha 2$ -knockout Studien, dass die

Anwesenheit des GlyR α 2 für die Entwicklung des auditorischen Hirnstamms nicht notwendig ist (Young-Pearse et al., 2006).

Die α 3-Untereinheit zeigt im gesamten ZNS ein weit verbreitetes Expressionsmuster, wird jedoch in besonderem Maße in Lamina II des dorsalen Horn des Rückenmarks gebildet (Harvey et al., 2004b). In dieser Region projizieren die meisten nozizeptiven Afferenzen und hemmen die GlyR α 3-vermittelten glycinergen Chloridströme durch die Ausschüttung von Prostaglandin E₂ (PGE₂). Die Aktivierung von EP2-Rezeptoren aktiviert in diesen sensorischen Neuronen die Proteinkinase A, welche den GlyR α 3 an der Position S342 phosphoryliert und die Ströme über diesen Rezeptor inhibiert (Racz et al., 2005, Zeilhofer, 2005). In Übereinkunft mit diesen Erkenntnissen zeigen GlyR α 3-knockout-Mäuse eine stark reduzierte Schmerzwahrnehmung. Interessanterweise hat die Phosphorylierung im TM3-4 Loop Auswirkungen auf die Effizienz der Ligandenbindung im extrazellulären Bereich hat (Han et al., 2013b). Die reduzierte Sensitivität der α 3-Untereinheit gegenüber GlyR-Agonisten beruht allerdings auf der unterschiedlichen Orientierung der TM4-Segmente (Chen et al., 2009, Han et al., 2013a). Alternatives Spleißen generiert 2 verschiedene Isoformen des GlyR α 3, welche im Gegensatz zur α 1-Untereinheit verschiedene Kanalkinetiken aufweisen (Nikolic et al., 1998). Die Anwesenheit von 15 Aminosäuren in der langen Spleißvariante bestimmen die speziellen Kanaleigenschaften (Breitinger et al., 2009, Meiselbach et al., 2014).

Die α 4-Untereinheit wurde im Rückenmark und sympathischen Ganglienzellen des PNS von Hühnern identifiziert (Harvey et al., 2000). Außerdem wurde eine Kolokalisation der Untereinheit mit den postsynaptischen Markerproteinen Bassoon und Gephyrin in der Retina der Maus festgestellt (Heinze et al., 2007). Die Funktion dieser Kanäle ist allerdings unerforscht.

Die β -Untereinheit wird im gesamten ZNS sowie in nicht-neuronalem Gewebe exprimiert. Bei der Maus ist sie ab Embryonalstadium E14 detektierbar (Malosio et al., 1991b). Wie bereits erwähnt ist sie für die postsynaptische Verankerung über Gephyrin verantwortlich. Da Gephyrin für die synaptische Aggregation des GlyR essentiell ist (Fritschy et al., 2008) und es nur von β -Untereinheiten des GlyR gebunden wird (Meyer et al., 1995, Kim et al., 2006) sind synaptische GlyRs $\alpha\beta$ -Heteromere.

1.6.4. Biogenese und Reifung

Die Reifung von Proteinen ist ein komplexer Prozess, welcher in 2 verschiedenen Zellkompartimenten stattfindet. Zunächst wird der GlyR am rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) translatiert und in die Membran des ERs eingebaut. Die pentamere Assemblierung geschieht hierbei kotranslationell (Griffon et al., 1999). Neu synthetisierte GlyR-Untereinheiten interagieren hierbei mit Chaperonen, welche die korrekte Faltung der Proteine regulieren bevor sie zum Golgi Apparat weitergeleitet werden. Chaperone sind außerdem in der Lage falsch gefaltete Proteine zu erkennen und den Weitertransport zu verhindern (Helenius and Aebi, 2004). Einen weiteren wichtigen Schritt im Zuge der Proteinreifung stellt die Glykosylierung dar. Verschiedene enzymatische Reaktionen bewerkstelligen dabei die Anheftung von Oligosacchariden an Asparaginreste in der Erkennungssequenz Asn-X-Ser/Thr (X stellt eine beliebige Aminosäure dar). Diese Form der posttranslationalen Modifizierung ist die Grundvoraussetzung das Chaperon-Qualitätskontrollsystem zu überwinden, das ER zu verlassen und zum Golgi-Apparat weitertransportiert zu werden (Helenius and Aebi, 2004). Wird ein Protein nicht korrekt gefaltet und glykosyliert, wird es vom Proteasom degradiert (Gross and Schoneberg, 2004). Im Golgi-Apparat bewirkt eine weitere Kaskade von Glykosylierungsschritten die Anheftung von weiteren Glykanen an das reifende Protein. Ausschließlich korrekt gefaltete Proteine verlassen den Golgi-Apparat und werden über das Transportprotein Kinesin entlang der Aktinfilamente zur Zellmembran transportiert (Maas et al., 2009). Die Proteine, die in diesem Prozess falsch gefaltete GlyRs erkennen, sind bislang weitgehend unerforscht. Es ist jedoch bekannt, dass das Protein Kif5 an die β -Untereinheit des GlyRs sowie an das Gerüstprotein Gephyrin bindet und dieser Komplex an die Zellmembran transportiert wird (Dumoulin et al., 2010). Der retrograde Transport wird nach der Rezeptorinternalisierung durch den Dynein-Motorkomplex reguliert (Maas et al., 2006). Bestimmte Mutationen des GlyRs bewirken eine Akkumulation des Rezeptors im ER oder Golgi-Apparat, was dazu führt, dass die glycinerge Neurotransmission an den Synapsen gestört wird und es zur Ausprägung des Krankheitsbildes der Hyperekplexie kommt (Schaefer et al., 2015).

1.6.5. Hyperekplexie: Störung der glycinergen Neurotransmission

Hyperekplexie (*startle disease, stiff baby syndrom*, OMIM#149400) ist eine sehr seltene neuromotorische Krankheit, für deren Ursache hauptsächlich Mutationen in *GLRA1* verantwortlich sind (Bode and Lynch, 2014). Des Weiteren sind Mutationen in *GLRB* und

anderen Genen bekannt, die für wichtige Proteine der inhibitorischen Synapse kodieren (Abb. 5). Zu diesen gehören der präsynaptische Glycintransporter 2, Gephyrin und Collybistin. Folgende Merkmale sind für das Krankheitsbild symptomatisch: (i) Generalisierte und episodische Muskelsteifheit die innerhalb des ersten Lebensjahres allmählich nachlässt, (ii) Ateminsuffizienz, verzögerter Spracherwerb, geistige Behinderung, (iii) verstärkte Schreckreaktionen auf unerwartete taktile oder auditorische Reize sowie (iv) generalisierte, transiente Muskelsteifheit nach diesen Schreckattacken, welche bis ins hohe Erwachsenenalter überdauern kann (Kirstein and Silfverskiold, 1958, Bakker et al., 2006, Bode and Lynch, 2014). Zur Behandlung von Hyperekplexie wird Chlonazepam verwendet, ein Benzodiazepin, welches GABAerge Ströme positiv moduliert (Bakker et al., 2006).

Um die physiologischen Konsequenzen der Hyperekplexie zu verstehen, ist es zunächst wichtig den glycinergen Signalweg an der Synapse im Rückenmark von Säugetieren zu betrachten (Abb. 5A):

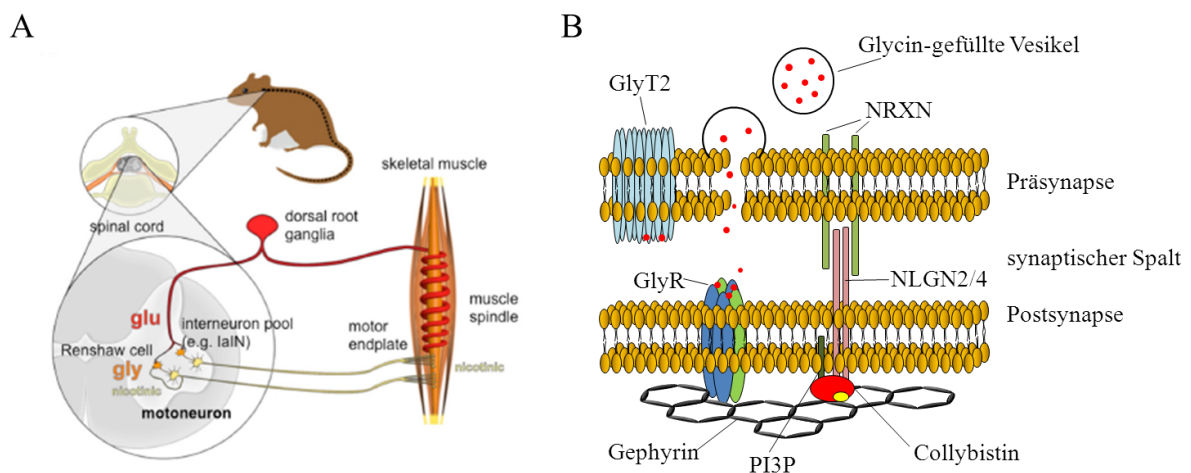


Abbildung 5. Regelkreis glycinerner Neurotransmission im Rückenmark

A: Schaltkreis des motorischen Kreislaufs im Rückenmark von Säugetieren. Das dorsale Wurzelganglion aktiviert glutamaterge Motoneurone, welche die motorische Endplatte mittels ACh stimulieren. Der Skelettmuskel kontrahiert. Gleichzeitig aktiviert das Wurzelganglion glutamaterge Interneurone, welche Glycin ausschütten und die Aktivität des Motoneurons hemmen (*Renshaw cell*, modifiziert (Schaefer et al., 2012)). B: An der Synapse der *Renshaw*-Zelle sind zahlreiche Proteine an der glycinergen Neurotransmission beteiligt. Mutationen in einem oder mehreren dieser Proteine können zum Krankheitsbild der Hyperekplexie führen. Erklärung siehe Text. GlyT2, präsynaptischer Glycintransporter 2; NRXN, Neurexine; NLGN2/4, Neuroligine 2 und 4; PI3P, Phosphoinositolsphosphat.

Der Glycinrezeptor spielt eine wichtige Rolle in der Rückkopplungsschleife des neuromotorischen Regelkreises. Sensorische Neurone in den dorsalen Wurzelganglien

projizieren in das Vorderhorn des Rückenmarks. Als Reaktion auf ein taktiler oder akustisches Signal aktivieren sie dort Motoneurone durch die Ausschüttung von Glutamat. Die Motoneurone generieren Aktionspotentiale und setzen an der motorischen Endplatte (am Skelettmuskel) Acetylcholin als Neurotransmitter frei. Das Signal wird über nikotinische AChRs auf der postsynaptischen Membran der Muskelzelle in einen Ca^{2+} -Einstrom übersetzt, welcher zur Kontraktion des Muskels führt. Die Effizienz dieses Systems wird durch GlyRs reguliert: Kollaterale Axone der Motoneurone (setzen ACh frei), sowie primäre Afferenzen (setzen Glutamat frei) aktivieren inhibitorische Interneuronen im Rückenmark (*Renshaw cell*, IaIN). Diese bilden Synapsen mit der postsynaptischen Membran der Motoneurone aus (Abb. 5B) und schütten Glycin aus, was zur Hyperpolarisation und zur Hemmung des Aktionspotentials führt. Durch diese inhibitorische Rückkopplungsschleife regulieren GlyRs die Menge an ACh, die an der motorischen Endplatte notwendig ist, um das Schwellenpotential der Muskelfaser zu überschreiten. Gleichzeitig wird eine Überkontraktion verhindert.

Fehlfunktionen dieses komplexen inhibitorischen Systems können Auswirkungen auf die Kontrolle von Bewegungen haben. Inhibitorische glycinerge Synapsen werden hauptsächlich im Rückenmark und Hirnstamm gebildet (Legendre, 2001, Chalphin and Saha, 2010). Funktionsstörungen dieser Synapsen führen zur erhöhten Erregbarkeit der Motoneuronen und resultieren unter anderem in neonataler Hypertonie. Offenbar existieren beim Menschen Kompensationsmechanismen, die die Aufgabe bewältigen diese chronisch erhöhte Erregbarkeit zu mildern. Diese Mechanismen sind jedoch nicht in der Lage, den starken exzitatorischen Input als Reaktion auf unerwartete Reize zu bewältigen (Bakker et al., 2006). Bis heute gibt es kein Heilmittel für Hyperekplexie, lediglich die Symptome sind behandelbar.

Die Reihenfolge der Gene, die durch Mutation am häufigsten betroffen sind und zum Krankheitsbild der Hyperekplexie führen, ist (absteigend): *GLRA1* (GlyR α 1), *SLC6A5* (GlyT2), *GLRB* (Gly β), *GPHN* (Gephyrin), *ARHGEF90* (Collybistin) (Rees et al., 2003, Harvey et al., 2004a, Carta et al., 2012, Bode et al., 2013b, Chung et al., 2013). In vielen Fällen gibt es allerdings keine genetische Erklärung für Hyperekplexie (Thomas et al., 2013).

Bis heute wurden beim Menschen ca. 55 verschiedene Mutation in *GLRA1* identifiziert (Bode and Lynch, 2014), die sich nach ihrem Vererbungsmuster einteilen lassen: dominante, rezessive und gemischt heterozygote (*compound heterozygous*) Mutationen. Während dominant vererbte Mutationen hauptsächlich in der Kanal-bildenden TM2 und assoziierten Loop-Bereichen akkumulieren (die Mutationen treten zwar in der DNA auf, zur

Vereinfachung wird hier jedoch von den Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz gesprochen), sind rezessive Mutationen im gesamten Rezeptor anzutreffen (Harvey et al., 2008). Dominante Mutationen sind *Missense*-Mutationen, die Auswirkungen auf funktionelle Kanaleigenschaften wie die spontane Kanalaktivität, Sensitivität gegenüber diversen Agonisten, Einzelkanalleitfähigkeit oder Öffnungswahrscheinlichkeit haben (Chung et al., 2010, Schaefer et al., 2013). Im Kontrast dazu beeinflussen rezessiv auftretende (*Nonsense*-, *Deletion/Frameshift*-) Mutationen den Transport des Rezeptors zur und die Assemblierung an der Zellmembran. Zudem bewirken diese Mutationen eine verminderte Stabilität des GlyR an der Zellmembran (Villmann et al., 2009b). Eine Übersicht über die Lokalisation der bekannten Hyperekplexiemutation im humanen GlyR ist der nachfolgenden Abbildung 6 zu entnehmen.

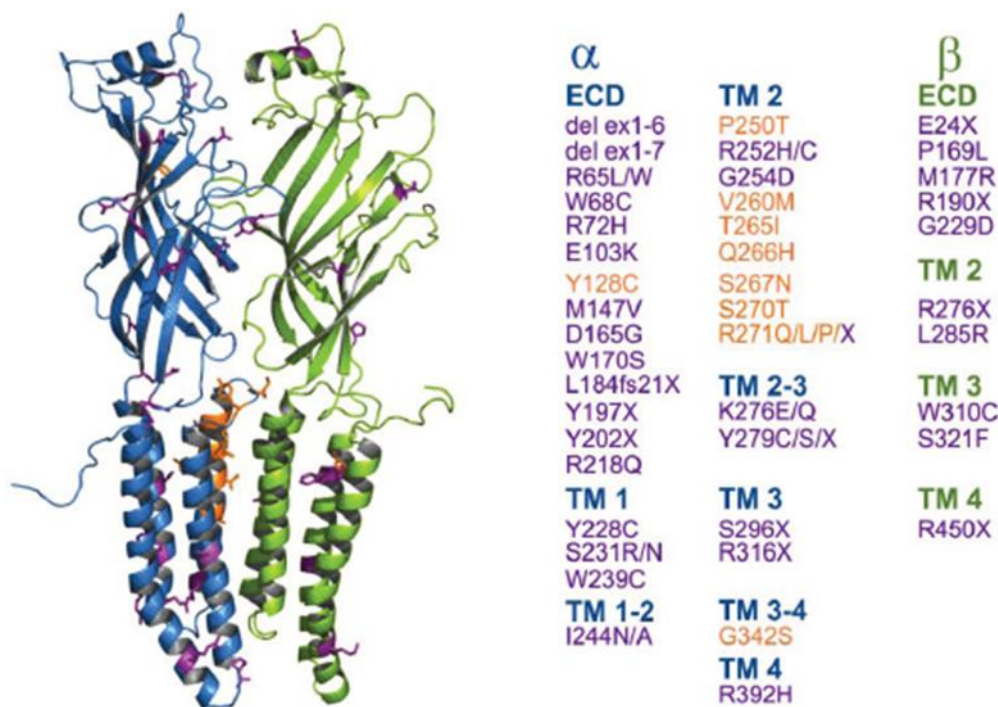


Abbildung 6. Humane Hyperekplexiemutationen in *GLRA1* und *GLRB* (Schaefer et al., 2013)

Modell humaner GlyR-Untereinheiten (blau, α 1-Untereinheit; grün, β -Untereinheit) basierend auf der Kristallstruktur des Glutamat-gesteuerten Chloridkanals (Glu-Cl) aus *C. elegans* (Hibbs and Gouaux, 2011). Nebenstehende Mutationen sind unterteilt in rezessive (magenta) und dominant auftretende Mutationen (orange).

1.6.6. Mausmodelle für Hyperekplexie: Die *oscillator*-Maus (*spd*^{ot})

Gleichen bestimmte Merkmale einer Maus, die durch genetische Mutationen ausgelöst wurden, einer menschlichen Krankheit oder Funktionsstörung, können diese Mäuse als

Modellorganismus in der medizinischen Forschung von großem Wert zur Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen sein. Diese Mutationen können spontan auftreten oder durch gezielte Veränderung des Genoms in diese Mäuse eingeschleust werden. Mäuse eignen sich als Modellsystem menschlicher Krankheiten besonders gut, da ihr Genom zu 95% mit dem menschlichen übereinstimmt und sie eine kurze Generationszeit aufweisen.

Nach der erfolgreichen Klonierung der GlyR-Untereinheiten in den 1990er Jahren wurden verschiedene Mausmodelle zur Untersuchung der genetischen Ursachen Hyperekplexie-ähnlicher Phänotypen herangezogen. Spontane Mausmutanten mit Mutationen in *Glr1* oder *Glr2* sind *spasmodic* (*spd*), *oscillator* (*spd^{ot}*) und *spastic* (*spa*) (Keramidas et al., 2004). In der vorliegenden Studie wurde ausschließlich mit *oscillator*-Mäusen (*spd^{ot}*) gearbeitet (Abb. 7A). Homozygote Tiere dieser Linie entwickeln 2 Wochen nach der Geburt einen massiven Tremor und starke Muskelspasmen, die schließlich nach 3 Wochen zum Tode führen (Buckwalter et al., 1994, Busselberg et al., 2001). Auf molekularer Ebene weist das *oscillator*-Allel *Glr1^{spd-ot}* eine Mikrodeletion von 9 bp sowie eine Mikroinsertion von 2 bp auf (7 bp Nettodeletion), die eine Leserasterverschiebung (*frameshift*) zufolge hat und zur Generierung eines Stopcodons im TM3-4 Loop führt. Abhängig von der Nutzung einer alternativen *splice acceptor site* in Exon 9 von *Glr1* (Malosio et al., 1991a), entstehen 2 unterschiedlich lange GlyR-Varianten, von denen keine die TM4 exprimiert (Abb. 7B). Unter Nichtnutzung der *splice acceptor site* entsteht die trunkierte *oscillator*-Variante *spd^{ot}-trc* mit dem verfrühten Stopcodon P355X 19 Aminosäuren hinter der Mikrodeletion. Unter Verwendung der *splice acceptor site* wird hingegen ein langes *Nonsense*-Polypeptid gebildet, welches länger als der wildtypische (*wt*) GlyR ist und nach 127 Aminosäuren ein Stopcodon generiert (*spd^{ot}-elg*). Im ZNS von homozygoten Mutationsträgern kommt es in beiden Fällen zum vollständigen Funktionsverlust des GlyRa1 (Kling et al., 1997), was die *oscillator*-Mutation als klassische funktionelle Null-Mutation kennzeichnet.

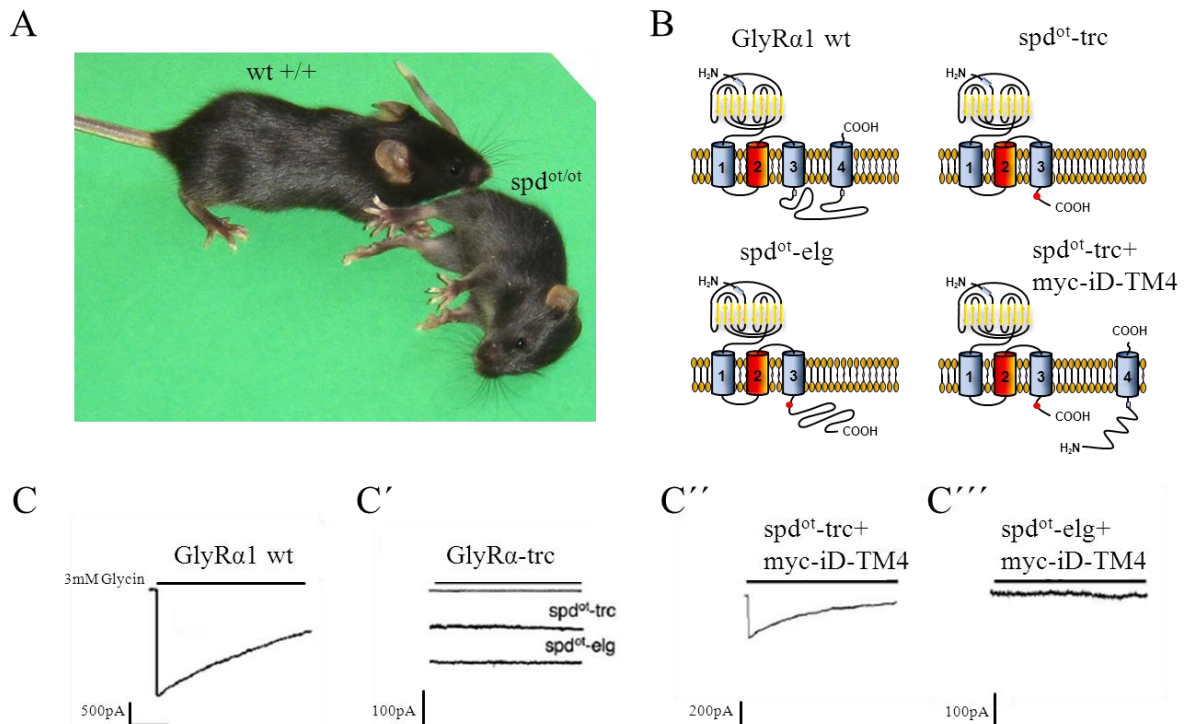


Abbildung 7. Der *oscillator*-Phänotyp und *in vitro* rescue

A: Darstellung einer homozygoten *oscillator*-Maus (spd^{ot}) neben einem wildtypischen Wurfgeschwister (wt). Beide Tiere sind gleich alt (\sim P20), aber spd^{ot} ist kleiner und zeigt das für Hyperekplexie-ähnliche Phänotypen Verkrampfen der Vorder- und Hinterextremitäten. B: Schematische Darstellung der $\alpha 1$ -Untereinheiten beider *oscillator*-Spleißvarianten sowie des *rescue*-Ansatzes ($\text{spd}^{\text{ot}} + \text{myc-iD-TM4}$). C: Funktioneller *in vitro* *rescue*-Ansatz (Villmann et al., 2009a). GlyR $\alpha 1$ reagiert auf die Applikation von 3 mM Glycin mit ausgeprägtem Chlorideinwärtsstrom. C': Experimentelle Darstellung der Funktionslosigkeit beider Spleißvarianten nach Einzeltransfektion in HEK293-Zellen. C'': In HEK293-Zellen durchgeführte Kotransfektion des spd^{ot} -GlyR ($\text{spd}^{\text{ot-trc}}$) in Kombination mit einer GlyR-Variante, die nur aus dem fehlenden Stück des GlyR besteht (R327-K429, *tail*). Man erkennt einen vergleichsweise schwachen Glycin-induzierten Chlorideinwärtsstrom. C''': Dasselbe Experiment wie (C'') unter Verwendung der langen Spleißvariante $\text{spd}^{\text{ot-elg}}$. Die Chloridströme lassen sich durch Kotransfektion des Rettungskonstrukts nicht wiederherstellen.

Eine wichtige Grundlage für die in dieser Studie durchgeführten Experimente zu Rettung (*rescue*) des *oscillator*-Phänotyps bildet die *in vitro* Komplementationsstudie trunkierter GlyR $\alpha 1$ -Varianten (Villmann et al., 2009a). In dieser Veröffentlichung wurde demonstriert, dass sich die Funktion des trunkierten spd^{ot} -GlyR $\alpha 1$ teilweise durch die Koexpression eines C-terminalen Rettungskonstruktes (*rescue tail*, myc-iD-TM4) wiederherstellen lässt. Dieses *tail* umfasst den Anteil der C-terminalen Aminosäuresequenz des GlyR, welcher durch die Einführung des Stopcodons P355X in spd^{ot} verloren geht. Durch die Koexpression des $\text{spd}^{\text{ot-trc}}$ in Kombination mit diesem *tail*-Konstrukt konnten $\sim 30\%$ der maximalen Chlorideinwärtsströme (I_{max}) wiederhergestellt werden (Abb. 7C''). Die Kanalfunktion der anderen Spleißvariante $\text{spd}^{\text{ot-elg}}$ konnte hingegen nicht wiederhergestellt werden (Abb. 7C'''). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass sich der GlyR aus voneinander

unabhängigen Domänen zusammensetzt, welche ohne direkte kovalente Interaktion einen funktionellen Rezeptor an der Zellmembran ausbilden können. Die *oscillator*-Mutation verkürzt den GlyR nicht nur wesentlich, sondern bewirkt durch die *Frameshift*-Mutation außerdem den Verlust des basischen Motivs am Beginn des TM3-4 Loops ³⁴⁶RRKRRH³⁵¹ (Abb. 8). Wie im nächsten Abschnitt erläutert, fungiert dieser Bereich des TM3-4 Loops als multifunktionelles Motiv und ist z.B. für die korrekte Integration des GlyR in die Zellmembran notwendig (Sadtler et al., 2003). Villmann et al. konnten in diesem Zusammenhang die Bedeutsamkeit dieses basischen Motivs für die Effizienz der Komplementation demonstrieren: Beinhaltete des *tail*-Konstrukt das basische Motiv, konnte die Kanalfunktion des *spd*^{ot}-trc-GlyR komplett wiederhergestellt werden (Villmann et al., 2009a). Eine Folgestudie beschäftigte sich daraufhin systematisch mit dem Thema, welche Aminosäuren des *tails* für die Interaktion beider Domänen an der Zellmembran verantwortlich sind (Unterer et al., 2012). Hier wurde im Wesentlichen gezeigt, dass die *rescue*-Effizienz des *tails* mit dessen Länge korreliert: Die Deletion von mehr als 49 Aminosäuren am N-Terminus des *tails* führt zum Verlust des Komplementationspotentials.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, (i) welche Art der Interaktion zwischen trunkierten GlyR und dem *tail*-Konstrukt die Ausbildung eines funktionellen Rezeptors an der Zelloberfläche determiniert. Hierzu wurden den trunkierten *tail*-Konstrukten Aminosäuren verschiedener Polarität und Volumens am N-Terminus angeheftet sowie der Einfluss bestimmter Motive innerhalb des Vollängenkonstruktes auf die *rescue*-Effizienz untersucht. Weiterhin wurde (ii) überprüft, inwieweit sich die Erkenntnisse der *in vitro* Studie zur Komplementation des *oscillator*-GlyRs *in vivo* anwenden lassen. Diesbezüglich wurde in elektrophysiologischen Experimenten die Effizienz unterschiedlicher *tail*-Konstrukte im Vektor pECFP-C1 überprüft. Das effizienteste Konstrukt wurde anschließend von der Arbeitsgruppe von C. Gross (EMBL, Monterotondo, Italien) zur Generierung der transgenen Maus tg *Gla1*-Ex9 verwendet. Diese Mäuse wurden im Anschluss mit heterozygoten *oscillator*-Mäusen verpaart und überprüft, ob die Anwesenheit des Transgens in den homozygoten Nachkommen Einfluss auf den Phänotyp hat.

1.6.7. Der TM3-4 Loop

Die Methode der Röntgenkristallografie hat seit dem Beginn des laufenden Jahrhunderts die Forschung auf dem Gebiet der Ionenkanalphysiologie revolutioniert. Dieses hochauflösende Bildgebungsverfahren ermöglicht die Untersuchung der Beziehungen zwischen

dreidimensionaler Quartärstruktur eines Proteins und seiner Funktion. Auf diese Weise konnte die Kristallstruktur sämtlicher Cys-Loop-Rezeptoren entschlüsselt werden (Unwin, 2005, Hassaine et al., 2014, Miller and Aricescu, 2014, Du et al., 2015). Bei näherer Betrachtung dieser Kristallstrukturen fällt auf, dass diese aus 2 Domänen bestehen: der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, sowie der Transmembrandomäne aus 4 α -helikalen Transmembransegmenten. Die Kristallstruktur des großen intrazellulären Loops (TM3-4 Loop) konnte aufgrund seiner Flexibilität jedoch nicht aufgelöst werden. Im Vergleich zu den strukturellen Ähnlichkeiten, die zwischen den Mitgliedern der CLR-Familie in den ECDs und TMDs herrscht, liegt im Bereich des TM3-4 Loops die größte Diversität in Bezug auf Länge und Aminosäurekomposition vor (Goyal et al., 2011). Man geht aus diesem Grund davon aus, dass dieser Bereich die funktionellen, rezeptorspezifischen Kanaleigenschaften determiniert.

Die prokaryotischen CLR-Homologe ELIC (*Erwinia chrysanthemi ligand-gated ion channel*) und GLIC (*Gloeobacter violaceus ligand-gated ion channel*) besitzen im Vergleich zur CLR-Superfamilie sehr kurze TM3-4 Loops (Tasneem et al., 2005, Hilf and Dutzler, 2008, Nury et al., 2011). Chimäre CLR, die anstatt des TM3-4 Loops das kurze Heptapeptide SQPARAA (TM3-4 Loop von GLIC) tragen, bilden funktionelle Ionenkanäle aus, die sich in der Einzelkanalleitfähigkeit und dem Desensitisierungsverhalten vom wildtypischen Rezeptor unterscheiden, nicht aber in allgemeinen Merkmalen, wie der Ionenselektivität, der Effizienz der Ligandenbindung (als Maß gilt hier der EC_{50} -Wert) oder Stromamplitude (Jansen et al., 2008, Papke and Grosman, 2014, Moraga-Cid et al., 2015). Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass nicht die Länge des TM3-4 Loops für die Rezeptorfunktion entscheidend ist, sondern die Aminosäuresequenz. Des Weiteren handelt es sich bei den angesprochenen Studien um Überexpressionsexperimente in Zellkulturen, weshalb die Frage nach funktionellen chimären Rezeptoren *in vitro* unbeantwortet bleibt.

Der aktuelle Wissensstand über strukturierte Bereiche des TM3-4 Loops des GlyR ist stark limitiert und beschränkt sich auf die Segmente nahe TM3 und TM4. So ist von Kationselektiven CLR bekannt, dass sie am Ende des TM3-4 Loops α -helikale Bereiche ausbilden, die man *MA-stretch* (Membran-assoziierte Ausdehnung) nennt (Unwin, 2005, Hassaine et al., 2014). Innerhalb dieses *MA-stretches* sind positiv geladene Aminosäuren an der Ausbildung lateraler Tunnel, oder Portale beteiligt, die den Permeationsweg einströmender Ionen und damit die Kanalleitfähigkeit beeinträchtigen (Kelley et al., 2003). Die Existenz dieser Portale wird aufgrund der Sequenzhomologie der beteiligten Aminosäuren auch für den GlyR vorhergesagt (Carland et al., 2009). Anhand der Struktur des Serotoninrezeptors lässt sich die Existenz eines zweiten α -helikalen Bereichs am Beginn des TM3-4 Loops des GlyRs

vermuten. Dieser Abschnitt wird MX-helix genannt und ist beim Serotoninrezeptor ebenfalls an der Ausbildung intrazellulärer Portale beteiligt (Hassaine et al., 2014). Die Verwendung von Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) hat gezeigt, dass der TM3-4 Loop des GlyR α 1 ebenfalls α -helikale Bereiche nahe TM3 und TM4 ausbildet (Burgos et al., 2015) was einen weiteren Anhaltspunkt für die Existenz intrazellulärer Portale im GlyR darstellt. CD-Spektroskopie bestätigt außerdem das Vorhandensein sogenannter Poly-L-Prolin-Helices Typ II (PPII) im TM3-4 Loop des GlyR (Cascio et al., 2001). PPII sind helikale Sekundärstrukturen mit einer perfekten 3-fachen Rotationssymmetrie (Rath et al., 2005) die zur Ausprägung von SH3-Konsensussequenzen (*SRC Homology 3 Domain consensus sequences*) führen. Die Erkennungssequenz XXPXXP ist zwischen allen GlyR-Untereinheiten stark konserviert und an der Bindung von intrazellulären Proteinen an den TM3-4 Loop des GlyR β beteiligt (Del Pino et al., 2011, Del Pino et al., 2014).

Innerhalb der vermuteten MX-Helix am C-Terminus des TM3-4 Loops wird einer Gruppe von basischen Aminosäuren ³¹⁶RFRRKRR³²² eine besondere Bedeutung beigemessen: So konnte demonstriert werden, dass die Integrität dieses positiv geladenen Motivs für die korrekte Membranintegration des apolaren TM3-Segments essentiell ist (Sadler et al., 2003). Gleichzeitig sind Teile dieses basischen Motives (³¹⁸RRKRR³²² in GlyR α 1; ³²⁴RRKRR³²⁸ GlyR α 3) an der Ausbildung nukleärer Lokalisationssignale beteiligt, welche durch die Interaktion mit den Karyopherinen α 3/ α 4 den Transport in den Zellkern steuern (Melzer et al., 2010). Obwohl die Funktion von GlyRs innerhalb des Zellkerns unerforscht ist, wird ihnen eine entscheidende Rolle in nicht-neuronalen Geweben (den Eynden et al., 2009) wie beispielsweise in Hirntumoren zugeschrieben (Forstera et al., 2014). Innerhalb des basischen Motivs sind die Aminosäuren ³¹⁶RFRRK³²⁰ zudem an der Bindung zytosolischer G-Proteinuntereinheiten (G $\beta\gamma$) beteiligt (Yevenes et al., 2006), welche die Glycin-induzierten Chloridströme *in vitro* potenzieren (Yevenes et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass die Interaktion des TM3-4 Loops mit G-Proteinen an den Motiven ³¹⁶RFRRK³²⁰ und ³⁸⁵KK (am N-Terminus des TM3-4 Loops) stark mit der allosterischen Modulation durch Ethanol korreliert (Yevenes et al., 2010). So werden nur diejenigen GlyR-Untereinheiten (als homomere Kanäle) durch Ethanol moduliert, die auch durch G $\beta\gamma$ moduliert werden (San Martin et al., 2012). Weitere Determinanten für die Ethanolsensitivität liegen in TM2, der Spleißkassette im TM3-4 Loop sowie dem extrazellulären C-Terminus (Sanchez et al., 2015). In Übereinstimmung mit diesen Erkenntnissen zeigen die Knockin-Mäuse KK385/386AA eine stark reduzierte Sensitivität gegenüber Ethanol (Aguayo et al., 2014). Interessanterweise

spielt K385 weiterhin eine entscheidende Rolle in der allosterischen Modulation von GlyRs durch Endocannabinoide (Yevenes and Zeilhofer, 2011b).

Eine weitere wichtige Art der Modulation von GlyRs stellt die posttranslationale Modifikation des TM3-4 Loops dar. Die Ubiquitinierung postsynaptischer Proteine stellt dabei ein wichtiges Signal für die proteolytische Degradation von LGICs in intrazellulären Kompartimenten dar (Christianson and Green, 2004). Zahlreiche rezessiv vererbte Hyperekplexie-Mutationen beeinflussen die Ubiquitin-vermittelte Rezeptordegredation und verursachen die Akkumulation des GlyR im ER oder Golgi-Apparat (Villmann et al., 2009b, Schaefer et al., 2015). Es wird angenommen, dass die Ubiquitinierung des GlyR α 1 an 3 von insgesamt 10 Lysinresten im TM3-4 Loop stattfindet und dass dieses Ereignis das endogene Signal für die Internalisierung und anschließende proteolytische Spaltung in 13 kDa- und 35 kDa-Fragmente darstellt (Buttner et al., 2001). Die Internalisierung des GlyR wird außerdem durch Phosphorylierung der Proteinkinase C (PKC) in Abhängigkeit des Di-Leucinmotivs L314/L315 stimuliert (Huang et al., 2007). Eine konkrete PKC-Phosphorylierungsstelle innerhalb des TM3-4 Loops ist S391 (Ruiz-Gomez et al., 1991). Ebenso spielt die cAMP-abhängige Phosphorylierung (durch PKA) eine wichtige Rolle bei posttranslationalen Modifikation des GlyR. Beide Kinasen haben Einfluss auf die maximalen Chlorideinwärtsströme (Vaello et al., 1994) sowie auf das Desensitisierungsverhalten des Rezeptors (Gentet and Clements, 2002).

Die am besten erforschte Interaktion des TM3-4 Loops mit intrazellulären Bindungspartnern ist die vom GlyR β (Aminosäuren 398-410) mit dem Verankerungsprotein Gephyrin (Kim et al., 2006). Gephyrin nimmt eine hexagonale Struktur an (Saiyed et al., 2007) und verankert GlyRs und GABA $_A$ Rs an der postsynaptischen Membran (Kneussel and Betz, 2000a). Die Gephyrin-Bindestellen von GlyR β und bestimmten GABA $_A$ -Untereinheiten sind dabei dieselben (Maric et al., 2014). Doch Gephyrin ist nicht nur ein Verankerungsprotein. Die direkte Interaktion mit polymerisiertem Tubulin (Kirsch et al., 1991) sowie den Mikrotubuli-assoziierten Motorproteinen Kif5 und dlc1/2 legt eine direkte Beteiligung am anterograden und retrograden Transport des GlyR an inhibitorischen Synapsen nahe (Fuhrmann et al., 2002, Maas et al., 2009). Neben zahlreichen intrazellulären Proteinen, die von Gephyrin gebunden werden ist die Interaktion mit dem GDP/GTP-Austauschfaktor Collybistin (CB) besonders interessant (Kins et al., 2000, Fritschy et al., 2008). Der *knockout* von CB führt zum vollständigen Verlust von Gephyrin und Gephyrin-bindenden GABA $_A$ -Subtypen in bestimmten Bereichen des Vorderhirns von Mäusen (Papadopoulos et al., 2007) sowie zum

Verlust GABAerger Synapsen im Hippocampus (Papadopoulos et al., 2008). Der GABA_AR α 2 bindet Gephyrin und Collybistin an überlappenden Bindestellen im TM3-4 Loop (Saiepour et al., 2010). Eine direkte Interaktion zwischen GlyR und Collybistin konnte bisher allerdings nicht gezeigt werden.

Neben Gephyrin bindet der TM3-4 Loop des GlyR β die Transportproteine Vps35 und Neurobeachin (Nbea) (Del Pino et al., 2011) sowie das F-Bar-Protein Syndapin I (Del Pino et al., 2014). Syndapine sind an der Vesikelformation an der Zellmembran, dem Trans-Golgi-Netzwerk sowie dem Proteasom beteiligt und gelten als Vermittler des vesikulären Transports (Qualmann and Kelly, 2000, Kessels and Qualmann, 2004). Zusammenfassend ist der TM3-4 Loop des GlyR β durch die Bindung intrazellulärer Adapterproteine nicht nur an der Verankerung, sondern vermutlich ebenso am Transport des Rezeptorkomplexes zur Zellmembran verantwortlich.

Die Rolle des TM3-4 Loops an der Aufrechterhaltung der glycinergen Neurotransmission wird darüber hinaus durch die Hyperekplexiemutationen R316X, G342S, D388A, E375X und R392H innerhalb dieses Bereichs unterstrichen (Vergouwe et al., 1999, Rees et al., 2001, Tsai et al., 2004, Bode et al., 2013a). Diese sind (bis auf E375X) gemischt heterozygote Mutationen, die in Kombination mit Mutationen in anderen Rezeptorbereichen auftreten. Die zugrundeliegenden Mechanismen die zur Störung der Rezeptorfunktion führen sind allerdings unbekannt. Eine dahingegen gut charakterisierte Mutation in der intrazellulären Domäne des GlyR α 1 ist die Mutation P250T im TM1-2 Loop (Saul et al., 1999). Die Einführung von Threonin an Position 250 am zytoplasmatischen Ende der Ionenkanalpore führt zu GlyRs, die sehr schnell desensibilisieren und einen erhöhten EC₅₀-Wert vorweisen (Breitinger et al., 2001). P250 ist außerdem ein geeignetes Beispiel für den Zusammenhang zwischen (Kristall-) Struktur und Funktion eines Proteins: Bevor die Kristallstruktur weiterer CLR's aufgelöst werden konnte, ist man anhand der Homologie der TM2 des GlyRs zum AChR davon ausgegangen, dass die engste Stelle der Kanalpore von R252 (in räumlicher Nähe zu P250) gebildet wird (Akabas et al., 1994, Miyazawa et al., 2003). Nach Auflösung der Kristallstruktur der Kanalpore des GlyR ist bekannt, dass die engste Stelle des Kanals im geschlossenen Zustand weiter entfernt von P250 (-2 Å) an Position L261 liegt. Heutzutage wird angenommen dass P250 Teil des TM1-2 Loops ist, welcher im pentameren Rezeptorkomplex im offenen Zustand des Kanals die engste Stelle des erweiterten Ionenpermeationswegs darstellt, an welcher einströmende Cl⁻-Ionen ihre Hydrathülle abstreifen (Du et al., 2015). Im Strychnin-gebundenen, geschlossenen Kanalzustand bildet der

hydrophobe Ring aus Leucinen an Position 261 hingegen eine Barriere mit einem Porenradius von $\sim 1,4 \text{ \AA}$ aus, welche die Passage von Chloridionen mit einem Radius von $1,8 \text{ \AA}$ (im hydratisierten Zustand) verhindert.

Mutagenesestudien am TM3-4 Loop verschiedener GlyR α s belegen außerdem den Einfluss einzelner oder gruppierter Aminosäuren auf das Desensitisierungsverhalten des Rezeptors (Nikolic et al., 1998, Breitinger et al., 2009, Meiselbach et al., 2014).

In der vorliegenden Arbeit war die vollständige Charakterisierung der bislang unbekanntenen Hyperekplexie-assoziierten Mutation P366L im TM3-4 Loop des GlyR $\alpha 1$ zielsetzend. Des Weiteren wurde der Einfluss des Austauschs des kompletten TM3-4 Loops des GlyR $\alpha 1$ gegen das Heptapeptid SQPARAA aus *Gloeobacter violaceus* in Abhängigkeit von der Anwesenheit der basischen Motive am C- und N-Terminus des Loops untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Zelllinien

2.1.1. Cos7-Zellen stammen von Nierenzellen der afrikanischen Primatenart grüne Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) ab. Es handelt sich um eine Fibroblastenzelllinie, die in den 1980er Jahren stabil mit einer Mutante des SV40-Virus transformiert wurde und das sogenannte T-Antigen produziert (Gluzman, 1981). Durch Vorhandensein des T-Antigens, welches bei der DNA-Replikation als Helikase wirkt, sind Cos7-Zellen besonders gut für Transfektionsexperimente geeignet.

2.1.2. HEK293-Zellen sind embryonale humane Nierenzellen (*human embryonic kidney cells*), welche in den 1970er Jahren mit DNA-Fragmenten des humanen Adenovirus 5 transformiert wurden (Graham et al., 1977). Es handelt sich um hypotriploide, sich schnell teilende und adhärent wachsende Epithelzellen.

2.2. Mauslinien

2.2.1. C57BL/6: Hierbei handelt es sich um eine wildtypische Mauslinie, die für alle Kontrollexperimente dieser Studie verwendet wurde. Die C57BL/6-Maus war das 2. Säugetier, dessen Genom vollständig sequenziert wurde (Waterston et al., 2002).

2.2.2. Oscillator (spd^{ot}): Die spontane Mausmutante *oscillator* (spd^{ot}) trat im Maushintergrund C57BL/6 erstmalig auf. Homozygote Träger des rezessiv vererbten *oscillator*-Allels spd^{ot} zeigen Symptome der komplexen Bewegungsstörung Hyperekplexie (*startle disease*), die 3 Wochen nach der Geburt zum Tod führen. Die Symptome gleichen denen einer Vergiftung mit Strychnin, welches ein kompetitiver Antagonist des inhibitorischen Glycinrezeptors ist. Die Symptomatik ist auf eine Mikrodeletion von 7 bp innerhalb des *Glr1*-Gens auf Chromosom 11 zurückzuführen, welches die α 1-Untereinheit des Glycinrezeptors kodiert (Buckwalter et al., 1994, Kling et al., 1997). Dadurch wird eine Leserasterverschiebung ausgelöst, welche in Abhängigkeit einer alternativen Spleißakzeptorstelle (*splice acceptor site*) in Exon 9 zur Expression zweier Polypeptide führt (Malosio et al., 1991a), bei denen die 4. Transmembrandomäne des Rezeptors nicht vorhanden ist.

2.2.3. tg *Gla1-Ex9*: Diese Mauslinie wurde von der Arbeitsgruppe von C. Gross am EMBL in Monterotondo (Italien) generiert. Zusätzlich zum murinen GlyR α 1 exprimieren diese Mäuse das sogenannte *mm α 1-tail* unter der Kontrolle des Glycinrezeptorpromotors. Dieses tail-Konstrukt besteht aus jener Sequenz des GlyRs, die in der kurzen *oscillator*-Variante (*spd*^{ot}-trc) durch das verfrühte Stopcodon der *spd*^{ot}-Mutation nicht exprimiert wird. Im Vergleich mit dem wildtypischen GlyR beginnt die Aminosäuresequenz mit L357 und endet mit dem Stopcodon 458 (Abb. 8B). Das Konstrukt wurde zunächst in pECFP-C1 (Clontech) kloniert und später in einen BAC (*bacterial artificial chromosom*) integriert. Die generierten transgenen Mäuse wurden in den *oscillator*-Stamm zurückgekreuzt, um den Effekt des Transgens auf den *oscillator*-Phänotyp zu untersuchen

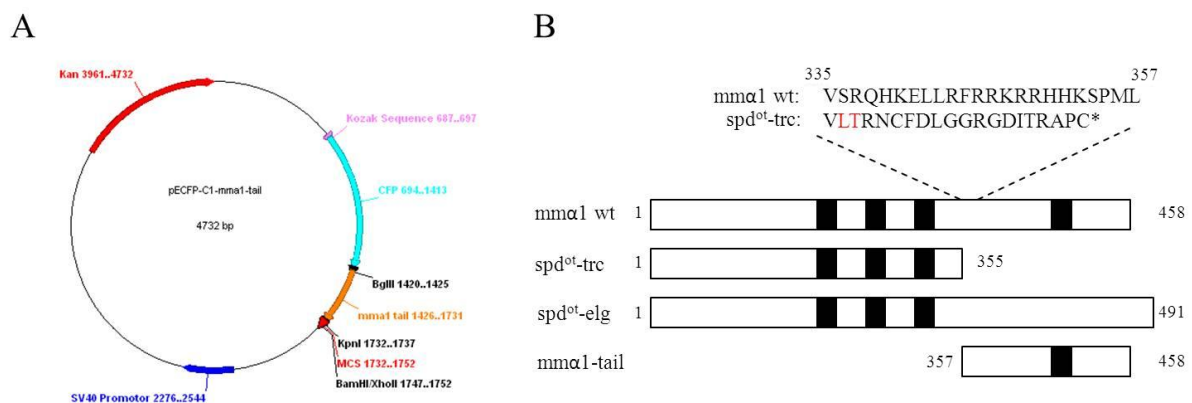


Abbildung 8. Übersicht des transgenen Komplementierungsansatzes

A: Dargestellt ist das für die Generierung der transgenen *Gla1-Ex9*-Mäuse verwendete Ausgangskonstrukt. Das *mm α 1-tail* wurde über die BglII-Restriktionsschnittstelle hinter die Sequenz des *enhanced cyan fluorescence protein* (eCFP) eingefügt. Die Präsenz dieses Markerproteins im transgenen Tier dient der proteinbiochemischen sowie immunzytochemischen Detektion. Am Beginn der eCFP-Sequenz befindet sich außerdem eine Kozak-Konsensussequenz (GCC.ACC.AUG.G), welche eine wichtige Rolle im Prozess der Initiation der Translation einnimmt (Kozak, 1987). B: Die schematische Darstellung des wildtypischen GlyR α 1 zeigt im Vergleich mit der *spd*^{ot}-Mutation die Sequenzunterschiede der Rezeptoren auf. Bei *spd*^{ot}-trc tritt im rot gekennzeichneten Bereich (*spd*^{ot}-trc: L336-T337, analog zu wt: S336 bzw. R337) eine Mikrodeletion von 9 bp in Kombination mit einer Mikroinsertion von 2 bp auf, die zu einer Leserasterverschiebung und verfrühtem Stopcodon (*355) führt. Unter Nutzung der alternativen *splice acceptor site* in Exon 9 wird ein verlängertes (elongiertes) *Nonsense*-Peptid exprimiert, welches ein Stopcodon nach 491 Aminosäuren generiert. Beiden *oscillator*-Proteinen fehlt das für die Kanalfunktion essentielle Transmembransegment 4 (TM4) sowie der sich daran anschließende C-Terminus. Transmembrandomänen sind als schwarze Rechtecke, nicht-Transmembrandomänen als weiße Rechtecke dargestellt. Die Nummerierung der Aminosäuresequenz bezieht sich auf das unreife Protein vor der Abspaltung des Signalpeptids. Die Darstellung ist schematisch und die Abstände der TMs sind nicht proportional zur bp-Länge.

2.3. Bakterien

Für die Transformation von DNA in *E. coli*-Zellen wurden bei Klonierungen die chemokompetenten Bakterienstämme DH5 α (Thermo Scientific, Malham, USA) oder NEB5 α (New England Biolabs, Ipswich, USA) verwendet. Für die Klonierung mit dem *low copy*-Vektor FUVaI_IRES2_GFP wurden TOP10 *E. coli*-Zellen (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet.

2.4. Modellierung von Glycinrezeptorstrukturen

Alle Modelle des in dieser Studie dargestellten Glycinrezeptors sind mit dem Programm Pymol Molecular Graphic System, Version 1.6.9.0 (Schrödinger, LLC) erstellt wurden.

2.5. Kits: kommerzielle Reagenzienansätze

Kit	Hersteller	Verwendung
SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate	ThermoFisher Scientific	ECL-Detektion
SuperSignal™ West Femto Chemiluminescent Substrate	ThermoFisher Scientific	ECL-Detektion
Gel Extraktion Kit	Qiagen	Geextraktion
Gel and PCR Cleanup	Macherey-Nagel-	DNA-Aufreinigung
NucleoBond® Xtra Maxi EF	Macherey-Nagel	DNA-Isolation

Tabelle 1. Kommerzielle Reagenzienansätze

2.6. Vektoren und Plasmide

Vektor/Plasmid	Insert/Verwendung	Hersteller/Herkunft
pRK5	high-copy vector, CMV und Sp6-Promotor, Ampicillinresistenz zur Expression in HEK293-oder Cos7-Zellen, für humane GlyR-Varianten	P. Seeburg, MPI für Medizinische Forschung, Heidelberg
pRK7	high-copy vector, CMV und Sp6-Promotor, Ampicillinresistenz zur	P. Seeburg, MPI für Medizinische Forschung,

	Expression in HEK293-oder Cos7-Zellen, für murine GlyR-Varianten	Heidelberg
hsa1-pRK5	<i>Homo sapiens</i> GlyR α 1 Wildtyp, parentaler Klon für alle humanen GlyR α 1- Varianten	AG Villmann
mma1-pRK7	Mus musculus GlyR α 1 Wildtyp, parentaler Klon für alle murinen GlyR α 1- Varianten	AG Villmann
pECFP-C1	enhanced cyan fluorescent protein, Kanamycinresistenz, CMV-Promotor, für Expression in Säugetierzellen	Clontech
pGEMHE	Oocytenexpressionsvektor	bereitgestellt von J. Lynch, QBI Brisbane, Australien
FUVal_IRES2_GFP	<i>low copy-vector</i> zur Produktion von Glycinrezeptorvarianten in Lentiviren	bereitgestellt von R. Blum

Tabelle 2. Plasmide und Vektoren

2.7. Enzyme

Kit	Hersteller	Verwendung
GoTaq DNA-Polymerase inkl. Puffer	Promega	PCR und Genotypisierung
High Fidelity Taq-Polymerase inkl. Puffer	Roche	Klonierungen PCR
Antarctic Phosphatase inkl. Puffer	NEB	Ligation
T4 DNA-Ligase inkl. Puffer	NEB	Ligation
Restriktionsendonukleasen inkl. Puffer	NEB/Promega	DNA-Verdau
Proteinase K	Sigma Aldrich	DNA-Präparation
DNase	Roche	Protein-Präparation
RNase	Carl Roth	DNA-Präparation

Tabelle 3. In dieser Studie verwendete Enzyme

2.8. Chemikalien

Soweit nicht anders gekennzeichnet wurden alle in dieser Studie verwendeten Chemikalien von Sigma-Aldrich (München), AppliChem (Chicago, USA) oder Carl Roth (Karlsruhe) erworben.

2.9. Antikörper

Antikörper (inkl. Ursprungsspezies)	Hersteller	Verwendung
mab2b (Ms)	Synaptic Systems (126111)	IC
mab4A (Ms)	Synaptic Systems (146011)	IC/WB
Glycine receptor alpha 1 (Kn)	Chemicon (AB15012)	IC/WB
Collybistin (Kn)	Synaptic Systems (261003)	IC/WB/IP
Gephyrin (Ms)	BD Transduction Labs. (610584)	IC/WB
Pan-Cadherin (Kn)	Cell Signalling (4068)	WB
Syndapin I (Kn)	bereitgestellt von D. Kessels, Institut für Biochemie I, Universitätsklinikum Jena	IC
c-Myc 9E10 (Ms)	Santa Cruz Biotechnologi y Inc. (Sc-40)	IP
GFP (Kn)	Abcam (ab6556)	IP/WB
Zg anti-Ms-HRP	Jackson ImmunoResearch (115-035-146)	WB
Zg anti-Kn -HRP	Jackson ImmunoResearch (111-036-003)	WB
Zg anti-Ms -Cy3	Jackson ImmunoResearch (115-165-003)	IC
Zg anti-Kn Cy3	Jackson ImmunoResearch (111-165-003)	IC
Zg anti-Kn -Cy5	Jackson ImmunoResearch (11111-175-0061-165-003)	IC

Zg anti-Ms-Cy5	Jackson ImmunoResearch (715-175-150)	IC
----------------	---	----

Tabelle 4. In dieser Studie verwendete Primär-und Sekundärantikörper. WB-Western-Blot, IC-Immunzytochemie, IP-Immunpräzipitation, Ms-Maus, Kn-Kaninchen, Zg-Ziege.

Primer

Die Liste der in dieser Studie zur Mutagenese, Genotypisierung und Sequenzierung verwendeten Primer befindet sich im Anhang.

2.10. DNA-und Proteinstandardlösungen

Pufferlösung	Zusammensetzung
1xTE-Puffer (TRIS-EDTA-Puffer)	10 mM TRIS Base, 1 mM EDTA; pH 7,4
1xTBE-Puffer	89 mM TRIS Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA; pH 8,3
1xPBS (Phosphat-gepufferte Saline)	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 3H ₂ O; pH 7,4

Tabelle 5. DNA-und Proteinstandardlösungen

2.11. Zellkulturmedien und-Lösungen

Lösung oder Medium	Hersteller/Zusammensetzung
MEM (Minimum Essential Medium)	Life Technologies (10270-106)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Life Technologies (11960-044)
Neurobasalmedium (NB)	Life Technologies (21103-049)
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	Life Technologies (14170-088)
Dulbecco's PBS (1x Phosphate Buffered Saline)	PAA (H15-002)
L-Glutamin	Life Technologies (25030-024)
FCS (Fetal Calf Serum)	Life Technologies (10270-106)
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Life Technologies (15140-122)
B-27 Ergänzungsstoff	Life Technologies (17504-044)
Trypsin 0,05%	PAN Biotech (P10-023500)

Silan-Lösung 10%	Sigma Aldrich (P1274)
Poly-L-Lysin-Lösung	Sigma Aldrich (A3648)
Cos7-Medium	DMEM, 10% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Pen/Strep
HEK293-Medium	MEM, 10% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Pen/Strep
Neuronenkulturmedium	NB, 2 mM L-Glutamin, 2% B-27

Tabelle 6. Zellkulturmedien- und Lösungen

2.12. Transfektionslösungen

Reagenz	Hersteller/Zusammensetzung
2xHBS (HEPES buffered saline)	50 mM Hepes, 12 mM Dextrose, 10 mM KCl, 28 mM NaCl, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 6,95
TE-Puffer (siehe oben)	Applichem (A0973,0500)
DEAE Dextran (Diethylaminoethyl-dextran)	Sigma-Aldrich, 10 mg/ml in PBS
Chloroquin	Sigma-Aldrich, 10 mM in PBS
2xBBS (BES buffered saline)	50 mM BES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 7,05
HBSS	Life Technologies (14170-088), 320-330 mOsm mit Manitol
CaCl ₂	2,5 M; pH 7
NB-Medium	Life Technologies (21103-049), 320-330 mOsm mit Manitol

Tabelle 7. Transfektionslösungen- und Reagenzien

2.13. Bakterienkulturmedien

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium (Lauria Bertani)	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl
2xYT-Medium (Yeast/Tryptone)	15 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl (für Agar-Platten: 5 g/l Agar)

SOD-Medium (Super optimal Broth)	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,6 g/l NaCl, 0,5 g/l KCl (vor Benutzung: 5 µl/ml 1 M MgCl ₂ , 10 µl/ml 0,5 M MgSO ₄)
----------------------------------	---

Tabelle 8. Medien für Bakterienkulturen

2.14. Puffer und Lösungen für Western-Blot und SDS-PAGE

Pufferlösung	Zusammensetzung
TBS (TRIS buffered saline)	50 mM TRIS, 150 mM NaCl
TBS/T-Puffer	0,05% Tween 20 in TBS
Transferpuffer (Anode)	10% (v/v) Methanol, 50 mM Natriumboratpuffer, 0,04% SDS
Transferpuffer (Kathode)	5% (v/v) Methanol, 50 mM Natriumboratpuffer, 0,04% SDS
SDS-Puffer	25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS; pH 8,3
2xSDS-Probenpuffer	90 mM TRIS-HCl pH 6,8, 20% (v/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 0,02% (w/v) Bromphenolblau
Blocklösung	5% (w/v) BSA in TBS/T
Sammelgelpuffer	0,5 M TRIS-HCl, 0,4% (w/v) SDS; pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M TRIS-HCl, 0,4% (w/v) SDS; pH 8,8
Sammelgel	650 µl Polyacrylamid, 1,25 ml Sammelgelpuffer, 3,05 ml H ₂ O, 25 µl 10% APS, 5 µl TEMED
Trenngel (11%)	5,5 ml PAA, 3,75 ml Trenngelpuffer, 5,75 ml H ₂ O, 50 µl 10% APS, 10 µl TEMED

Tabelle 9. Puffer und Lösungen für Western-Blot und SDS-PAGE

2.15. Puffer für elektrophysiologische Experimente

Medium	Zusammensetzung
Extrazellulärpuffer	137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 5 mM HEPES; pH 7,2 mit NaOH
Intrazellulärpuffer	120 mM CsCl, 20 mM N(Et) ₄ Cl, 1 mM CaCl ₂ , 2 mM

MgCl₂, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES; pH 7,2 mit
CsOH

Tabelle 10. Elektrophysiologiepuffer

2.16. Puffer und Lösungen für immunzytochemische Experimente

Medium	Hersteller/Zusammensetzung
4% Paraformaldehyd (PFA)-Sucrose	2g Sucrose und 2 g PFA in 50 ml dH ₂ O lösen, 2 Tropfen 1 N NaOH hinzugeben, auf 55 °C erhitzen bis sich PFA löst. 10 ml 10xPBS hinzugeben und mit dH ₂ O auf 100 ml auffüllen
Blocklösung	5% (v/v) Ziegen Serum (NGS), 0,1-0,2% Triton X-100 in PBS pH 7,4
PFA-Blocker	50 mM NH ₄ Cl
Quenching-Puffer	0,1 mM Glycin in PBS
Mowiol	Carl Roth

Tabelle 11. Puffer und Lösungen für immunzytochemische Färbexperimente

2.17. Zellbiologische Methoden

2.17.1. Aceton-Behandlung von Deckgläsern

Um das Wachstum der adhärenen HEK293- und Cos7-Zellen auf der Oberfläche der Deckgläser zu ermöglichen, wurden diese 10 min in Aceton (99,5%) inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser bei RT getrocknet, hitzesterilisiert und bis zur Benutzung steril bei RT gelagert. Die Acetonbehandlung greift die Oberfläche der Deckgläser an und ermöglicht den Zellen ein erleichtertes Anheften und Wachsen.

2.17.2. Beschichtung von Deckgläsern mit Poly-L-Lysin

Um das Wachstum von primären Neuronenkulturen auf Deckgläsern zu ermöglichen, wurden diese 1 h in 1 M HCl, anschließend 1 h in 96% Ethanol inkubiert und über Nacht bei

50 °C getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen einzeln 3x in Silanlösung getaucht, je 4 Stück in einer 3 cm-Schale platziert und 6-8 h bei 37 °C getrocknet. Die eigentliche Beschichtung mit Poly-L-Lysin erfolgte über Nacht in der Sterilbank unter Bestrahlung mit UV-Licht. Am Folgetag wurden die Deckgläschen 3x mit dH₂O gewaschen und in Alufolie gewickelt bei 4 °C gelagert.

2.17.3. Kultivierung von Zelllinien (HEK293/Cos7)

Die Zellen wurden in Vollmedium bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle Schritte zur Kultivierung wurden in einer sterilen Werkbank durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen und Medien wurden vor der Benutzung bei 37 °C inkubiert. Bei einer Konfluenz von ca. 70-90% wurden die Zellen gesplittet. Dabei wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, um nicht-adhärente bzw. abgestorbene Zellen zu entfernen. Anschließend wurde diese Lösung abgesaugt, durch 1-3 ml 0,05% Trypsin ersetzt und 3 min bei 37 °C inkubiert, um die Zellen vom Untergrund zu lösen. Der Verdau wurde mit Vollmedium beendet und die Zellsuspension 6 min bei 1400 rpm abzentrifugiert. Im letzten Arbeitsschritt wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in Vollmedium suspendiert, die Zellzahl bestimmt und die gewünschte Zellzahl in 10 cm-Schalen oder Kulturflaschen ausplattiert. Für elektrophysiologische und immunzytochemische Experimente wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen auf Aceton-behandelten 13 mm Deckgläschen in einer 3 cm-Schale ausplattiert und das Gesamtvolumen auf 2,5 ml mit Vollmedium aufgefüllt. Für die Gewinnung von Zelllysaten sowie zur Präparation von Membran-gebundenen Proteinen wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen in 10 cm-Schalen ausgesät und mit Vollmedium auf ein Gesamtvolumen von 7,5 ml aufgefüllt.

2.17.4. Transfektion von HEK293-Zellen

Die Transfektion erfolgte 24 h nach der Aussaat der Zellen nach einem modifizierten Protokoll von Chen und Okayama (Chen and Okayama, 1987). Diese Standardmethode gewährleistet den effizienten Transfer von plasmidisch kodierter DNA in kultivierte (HEK293-) Zellen. Im Wesentlichen entsteht bei dieser Transfektionsmethode ein Präzipitat aus positiv geladenen Calciumionen und negativ geladenen Phosphatgruppen, welches die zu transfizierende DNA bindet und über einen bisher nicht komplett verstandenen Mechanismus von der Zielzelle internalisiert wird. Hierzu wird zu einer Lösung aus DNA, CaCl₂ und

0,1xTE-Puffer tröpfchenweise 2xHBS-Puffer hinzugegeben und das Gemisch 20 min bei RT inkubiert (Tab. 12). Anschließend wird diese Transfektionslösung auf die Zellen getropft, die Kultur unter Standardbedingungen kultiviert, nach 14 h mit 3 ml Vollmedium gewaschen und nach weiteren 24 h für die experimentelle Analyse verwendet. Als Transfektionskontrolle wurde GFP kotransfiziert.

Reagenz	3 cm-Schale	10 cm-Schale
DNA	0,5-3 µg	5-30 µg
CaCl ₂ (2,5 mM)	10 µl	50 µl
0,1xTE-Puffer	ad 100 µl	ad 500 µl
2xHBS-Puffer	100 µl	500 µl

Tabelle 12. Transfektion von HEK293-Zellen

2.17.5. Transfektion von Cos7-Zellen

Cos7-Zellen wurden mit Hilfe des kationischen Polymers DEAE-Dextran transfiziert. Dabei bindet das Polyelektrolyt die negativ geladene DNA. Der entstandene Komplex wird von der Zielzelle internalisiert. Die Transfektionslösung (Tab. 13) wird tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation wurde das komplette Medium abgenommen und durch frisches Vollmedium ersetzt. Zur Steigerung der Transfektionseffizienz wurden entweder 12 µl (3 cm-Schale) oder 75 µl (10 cm-Schale) Chloroquin hinzugegeben (Erbacher et al., 1996). Nach 3 h wurde das Medium erneut gewechselt.

Reagenz	3 cm-Schale	10 cm-Schale
DNA	1-3 µg	10-30 µg
PBS	30 µl	187 µl
DEAE-Dextran	ad 100 µl	ad 500 µl

Tabelle 13 Transfektion von Cos7-Zellen

2.17.6. Präparation und Kultivierung von Hippocampusneuronen

Die schwangeren weiblichen Mäuse der Linie C57BL/6 wurden an Tag 17-21 nach positivem Ovulationstest mit CO₂ euthanisiert und die Gebärmutterschläuche einschließlich der vitalen

Embryonen in eine mit MEM-Medium gefüllte 10 cm-Schale überführt. Die Embryonen wurden dekapiert, die Köpfe zur Reinigung mit Terralin besprüht und in eine neue 3 cm-Schale mit frischem MEM-Medium (1% Penicillin/Streptomycin) transportiert. Nach Öffnen der Schädeldecke wurde das Gehirn freigelegt und anschließend unter dem Binokular der Hippocampus entnommen. Dabei wurde darauf geachtet, möglichst alle Meningen und Blutgefäße zu entfernen. Beide Hippocampi eines Tieres wurden danach in einer eisgekühlten 3 cm Schale mit MEM (1% Penicillin/Streptomycin) gesammelt. Von diesem Zeitpunkt an wurden alle weiteren Schritte unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Nach der Gewebepräparation wurden alle Hippocampi mit einer Schere mechanisch zerkleinert, in einem 15 ml Falcon mit 5 ml 0,05% Trypsin und 0,1 mg/ml DNase gesammelt und im Wasserbad 30 min bei 37 °C verdaut.

Die Trypsinisierung wurde durch Zugabe von 500 µl FCS beendet. Im Anschluss wurde das Gewebe in mehreren Schritten trituriert: Die scharfen Ränder der Öffnungen der Pasteurpipetten wurden durch gleichmäßiges Erhitzen abgerundet, um ein schonendes Vereinzeln der Hippocampusneuronen zu gewährleisten. Auf diese Art und Weise wurden 3 Pipetten unterschiedlichen Durchmessers erstellt. Zuerst wurden die verdauten Hippocampi mit der Pipette mit dem größten Durchmesser und anschließend mit den Pipetten geringeren Durchmessers 10x vorsichtig trituriert. Nach 3-minütiger Sedimentationszeit wurde der Überstand in ein neues Falcon überführt und das verbleibende Pellet in 2 ml NB-Medium (+L-Glut) gelöst und erneut mit der kleinsten Pipette trituriert. Nach 2 min Wartezeit wurden beide Überstände vereint und 15 min bei 500 rpm zentrifugiert um die enthaltenen Neuronen von eventuellen Geweberesten zu trennen. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt (2 min, 800 rpm) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 1 ml NB-Medium (+L-Glut) resuspendiert und anschließend erneut 10 min bei 500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in NB (+L-Glut/B27) resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden in eine sterile Neubauer-Zählkammer pipettiert um die Neuronenkonzentration festzustellen. Insgesamt wurden pro 3 cm-Schale 150.000 Neurone in 2,5 ml NB (+L-Glut/B27) auf poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgesät.

2.17.7. Transfektion von Hippocampusneuronen

Lipofectaminmethode

Kultivierte Hippocampusneurone wurden 3-5 Tage nach der Aussaat nach einem modifizierten Protokoll von Ohki und Tilkins (Ohki et al., 2001) transfiziert. Lipofectamin ist eine Lösung aus kationischen und neutralen Lipiden, die in der Lage ist einen lipophilen Komplex mit negativ geladenen DNA-Molekülen auszubilden (sogenannte Liposomen) und über Lipid-Lipid-Interaktion mit der Zellmembran zu verschmelzen. Der genaue molekulare Mechanismus, wie die auf diese Weise eingeschleuste DNA anschließend in den Zellkern gelangt ist, ist weitgehend unbekannt.

Die zu transfizierenden Hippocampusneuronen wurden zunächst mitsamt Vollmedium in eine 24-Well-Platte überführt. Das Transfektionsmedium (NB⁻-Medium=NB ohne Zusätze) wurde 20 min bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Für die eigentliche Transfektion wurden zwei Lösungen erstellt: Lösung A enthielt 1 µg DNA gelöst in 50 µl NB-Medium/Well und Lösung B 50 µl NB-Medium + 2 µl Lipofectamin/Well. Beide Lösungen wurden 5 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden beide Lösungen kombiniert und weitere 20 min inkubiert. Nach diesem Schritt wurde das originale NB-Vollmedium abgenommen, sterilfiltriert und für die gesamte Transfektionszeit im Inkubator aufbewahrt. Sofort nach Abnahme des Originalmediums wurden 300 µl NB-Medium und 100 µl der Transfektionslösung/Well hinzugegeben. Generell wurde beim Umsetzen der Zellen sowie beim Pipettieren der verschiedenen Medien streng darauf geachtet, die Zellen nicht austrocknen zu lassen. Nach 50-minütiger Inkubation wurde die Transfektionslösung abgenommen und durch das Originalmedium ersetzt.

Calciumphosphatmethode

Der Wirkmechanismus dieser Methode ist derselbe wie bei der Transfektion von HEK293-Zellen. Die Transfektion hippocampaler Neuronen wurde 3-5 Tage nach der Aussaat in 3 cm-Schalen durchgeführt. Das originale Kulturmedium wurde abgenommen und bei 37 °C und 5% CO₂ gelagert und durch vorgewärmtes NB-Medium ersetzt. Die Transfektionslösung wurde wie folgt hergestellt: 7,5 µg DNA wurden in 60 µl dH₂O gelöst und mit 7,5 µl CaCl₂ gemischt. Anschließend wurden 75 µl 2xBBS hinzugegeben und für 30 min bei RT in Dunkelheit inkubiert. Nach Zugabe von 1,25 ml NB-Medium wurden die Neurone 30-45 min in dieser Transfektionslösung inkubiert. Danach wurden die Zellen 3x mit vorgewärmtem HBSS gewaschen und im letzten Schritt das Originalmedium hinzugefügt.

2.18. Proteinbiochemische Methoden

2.18.1. Gewinnung von Zelllysaten aus HEK293-Zellen

Ganzzelllysate wurden zur Untersuchung der Expression bestimmter Proteine von Interesse aus HEK293-Zellen gewonnen. Hierzu wurden die in 10 cm-Schalen kultivierten Zellen 48 h nach der Transfektion 1x mit PBS pH 7,4 gewaschen und anschließend mit 1 ml 95 °C heißem 2xSDS-Probenpuffer unter Zuhilfenahme eines Zellschabers vom Untergrund gelöst und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Zur Entfernung von unlöslichen Zellbestandteilen wurden die Proben bei 4 °C 5 min und 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues steriles Eppendorfgefäß überführt und für weitere Analytik verwendet. Die Lagerung von Zelllysaten erfolgte bei -80 °C. Bei Immunpräzipitationsexperimenten wurde anstatt 2x SDS-Puffer *Cytobuster Protein Extraction Reagent* zum Lysieren der Zellen verwendet.

2.18.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das *Bradford Protein Assay Kit* (Biorad) verwendet. Das Verfahren basiert auf der Komplexbildung des Farbstoffes Coomassie-Blau mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen in saurem Milieu. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von $\lambda=470$ nm auf 595 nm. Dabei ist die Zunahme der Absorption bei 595 nm proportional zu der Menge des gebundenen Farbstoffes und somit zur Menge der in der Probe enthaltenen Proteine (Bradford, 1976). Die Analyse erfolgte am BioPhotometer plus (Eppendorf).

Für die Konzentrationsbestimmung wurden 1 μ l der Probe in 999 μ l Bradford-Gebrauchslösung verdünnt (Verdünnung: 1:1000). Die Absorption wurde bei 595 nm gemessen und zur Bestimmung der Konzentration mit den Absorptionswerten des Standardproteins BSA verschiedener Konzentrationen (in μ g/ml: 1; 2,5; 5; 10; 15; 25) verglichen. Lagen die gemessenen Werte in der Nähe der Grenzen der ermittelten Eichkurve ($<0,1$ oder $>0,8$) wurde die Probe schwächer (1:500) oder stärker (1:2000) verdünnt und die Messung wiederholt. Mit Hilfe des Bradford-Tests konnte beim Vergleich der Proteinexpression verschiedener Proben (z.B. Membranexpression verschiedener GlyR-Mutanten) sichergestellt werden, dass beim Auftragen auf ein PAA-Gel von jeder Probe dieselbe Proteinmenge verwendet wurde.

2.18.3. SDS-Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine weitverbreitete Variante der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese und dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld (Laemmli, 1970). Im Wesentlichen basiert diese Methode auf der hitzebedingten Denaturierung von Proteinen in der Anwesenheit von *Sodiumdodecylsulfate* (SDS) und β -Mercaptoethanol. Unter diesen Bedingungen trennen sich die verschiedenen Proteinuntereinheiten und verlieren dabei ihre biologische Aktivität. β -Mercaptoethanol wird zur Reduzierung von Sulfidbrücken eingesetzt während SDS als anionisches Tensid die Eigenladung von Proteinen überdeckt. Durch Behandlung der Proben mit SDS-Probenpuffer liegen die enthaltenen Proteine in denaturierter, linearisierter Form vor und weisen eine konstant negative Ladungsverteilung auf. Aus diesem Grund wandern die Proteinkomplexe in Abhängigkeit ihrer Masse und nicht ihrer Ladung unterschiedlich schnell durch das PAA-Gel. Die Dichte des (PAA-) Trenngels richtet sich nach der Masse der Proteine, die aufgetrennt werden sollen. So ist ein niedrig konzentriertes PAA-Gel für die Auftrennung größerer (schwererer) Proteine praktikabel, während die Auftrennung kleinerer (leichterer) Proteine höher konzentrierte Gele erfordert.

Für die vorliegende Arbeit wurden PAA-Gele mit einer Konzentration von 9-15% PAA verwendet. Zur Herstellung wurde das *Mini-PROTEAN Tetra Cell Casting Kit* (Biorad) benutzt. Die beiden Glasplatten wurden in das abdichtende Gestell eingespannt. Zwischen die beiden Glasscheiben (Abstand: 1,5 mm) wurde die frisch hergestellte Trenngel-Lösung (Tab. 9) bis 2 cm unter den oberen Rand gegossen. Dann wurde das Gel mit 0,5 ml Isopropanol überschichtet und die Polymerisierung abgewartet. Anschließend wurde das Isopropanol abgegossen und die frisch hergestellte Sammelgel-Lösung auf das polymerisierte Trenngel pipettiert. Ein Kamm wurde in das Sammelgel gesteckt und 25 min bei RT inkubiert. Das fertige diskontinuierliche PAA-Gel wurde nach vollständiger Polymerisierung für die Gelelektrophorese verwendet.

Mit Ausnahme der intrazellulären Proteinfraction (Biotinylierung S.41) wurden vor der Beladung des Gels alle Proben 1:1 (v/v) mit 2x SDS-Probenpuffer gemischt und 5-7 min bei 95 °C auf dem Thermoschüttler (Eppendorf) gekocht. Danach wurden pro Tasche 20-40 μ g Protein aufgetragen. Die Elektrophorese wurde 45-55 min bei 180 V, 400 mA durchgeführt. Als Standardproteinmarker wurden 5 μ l PPM eingesetzt.

2.18.4. Western-Blot Analyse

Der Begriff Western-Blot beschreibt das Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen (Towbin et al., 1979). Dabei werden die in einem PAA-Gel enthaltenen Proteine mittels Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und anschließend durch Immunfärbung und ECL-Detektion visualisiert.

Proteintransfer

Für den Elektrotransfer der Proteine auf die Trägermembran wurde die (*semidry*) Westernblotkammer von Biometra verwendet. Bei dieser Methode wird ein senkrecht zum PAA-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, wodurch die Proteine Richtung Anode wandern und über ionische und polare Wechselwirkungen an der Nitrozellulosemembran haften bleiben. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt dabei erhalten und die gebundenen Proteine für die weitere immunochemische Analyse zugänglich. Gleichzeitig wird die Bindung zwischen Proteinen und SDS zerstört, sodass diese renaturieren und ihre Sekundär- bzw. Tertiärstruktur einnehmen können. Aus diesem Grund ist anschließend eine indirekte Detektion mit spezifischen Antikörpern überhaupt möglich.

Folgender Aufbau wurde für den Elektrotransfer verwendet: 3 *Whatman*-Papiere wurden in Anodenpuffer (Tab. 9) eingeweicht und anschließend übereinander auf der Anode platziert. Auf diese Schicht wurde die in dH₂O inkubierte Membran gelegt und darauf das PAA-Gel passgenau ausgerichtet. Das Gel wurde mit 3 *Whatman*-Papieren bedeckt, die zuvor in Kathodenpuffer eingeweicht wurden, die Luftblasen mit einer Walze entfernt und die Transferkammer verschlossen. Der Proteintransfer wurde 1,5 h bei 4 °C und 35 V, 150 mA, 10 W durchgeführt und die Membran anschließend zur indirekten Immundetektion (siehe unten) verwendet.

Antikörperfärbung und verstärkte Chemilumineszenzdetektion (ECL)

Zur Identifikation von Proteinbanden auf der Trägermembran macht man sich das Prinzip der indirekten Immundetektion zunutze. Dabei binden hochspezifische Antikörper das Antigen des untersuchten Proteins. Diese Primärantikörper werden wiederum mit einem HRP-gekoppelten (*horseradish peroxidase*) Sekundärantikörper markiert und über Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm nachgewiesen.

Um das unspezifische Binden des Primärantikörpers an freien Bindestellen der Nitrozellulosemembran zu minimieren, wurde diese 1 h mit 5% BSA in TBS/T (Tab. 11) bei RT blockiert. BSA blockiert diese Bindestellen, sodass der Primärantikörper anschließend nur noch die freien Antigene des gesuchten Proteins erkennt. Nach dem Blockieren wurde der jeweilige Primärantikörper in dieser Blocklösung verdünnt und die Membran über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zur Entfernung dennoch unspezifisch gebundener Antikörper wurde die Membran am nächsten Tag 3x10 min mit TBS/T gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran 1 h mit dem in der Blocklösung verdünnten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen der Membran (3x 10 min TBS/T) wurden die gebundenen HRP-Antikörper direkt mit *SuperSignal West Pico* (bzw. *Femto*) *chemiluminescent substrate kit* detektiert. HRP ist ein Enzym, das die Oxidation von Luminol-basierten Substraten katalysiert, wobei diese Licht emittieren. Durch Auflegen eines lichtempfindlichen Röntgenfilms wird dieses Licht an der Stelle auf der Membran detektiert, an der der Sekundärantikörper bindet und somit indirekt das Vorhandensein des gesuchten Proteins nachgewiesen. Die mit Antikörpern behandelte Membran wurde im letzten Schritt 5 min in der ECL-Lösung inkubiert (siehe Herstellerinformationen), danach in eine Röntgenkammer überführt und für 1-120 s in der Dunkelkammer mit dem Röntgenfilm (Amersham Bioscience) bedeckt. Die Entwicklung erfolgte automatisch im X-Omat 1000 (Kodak).

2.18.5. Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

Zur Detektion von extrazellulären an der Oberfläche lokalisierten Proteindomänen wurde ein *Biotinylierungsassay* angewendet. Dabei macht man sich die chemischen Eigenschaften von EZ-link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific) zunutze. Durch die Konjugation mit der Sulfonatgruppe ist diese Biotinvariante sehr gut wasserlöslich und geht in basischer Lösung spontan stabile Esterbindungen mit der α -Aminogruppe der ersten Aminosäure, bzw. der ϵ -Aminogruppe von extrazellulären Oberflächenproteinen ein. Der N-Hydroxy-Succinimidyl-Ring des Biotinylierungsreagenz gewährleistet eine lipophobe Polarität und verhindert das Penetrieren durch die Zellmembran. Auf diese Weise werden sämtliche Oberflächenproteine mit Biotin markiert ohne ihre chemischen und biologischen Eigenschaften zu beeinflussen. Durch die hohe Affinität zu Streptavidin können biotinylierte Proteine nach der Zellyse gebunden, isoliert und für die weitere Analyse verwendet werden.

Der *Biotinylierungsassay* wurde in dieser Arbeit für jedes zu untersuchende Protein mit 2 Schalen transfizierter HEK293-Zellen (1,5 Mio. Zellen/Schale) 72 h nach Aussaat der Zellen

durchgeführt. Zunächst wurde das Medium abgegossen und jede Schale 3x mit 4 °C kaltem PBS (pH 8.0) gewaschen. Um die verbleibenden adhärenen Zellen mit Biotin zu markieren, wurde nun jede Schale mit 1,5 ml Biotinlösung (1 mg/ml EZ-link Sulfo-NHS-LC-Biotin in PBS) 30 min bei 4 °C vorsichtig geschwenkt. Im Anschluss daran wurden die Schalen erneut 2x mit 4 °C kaltem PBS gewaschen. Zur Beseitigung überschüssigen Biotins sowie zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen mit intrazellulären Proteinen wurden die Schalen hiernach 2x mit Quenching-Puffer (Tab. 11) gespült. Die biotinylierten Zellen beider Schalen wurden anschließend mit einem Zellschaber und 1 ml PBS vom Untergrund abgelöst und in einem 2 ml Reaktionsgefäß vereint. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (5 min, 1000 g, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 1 ml Lysis-Puffer (1% TritonX-100, 0,1 mM PMSF, 2 mM EDTA pH 8, 10 mg/ml Proteaseinhibitor) homogenisiert. Diese Suspension wurde nun 1 min (13.000 g, 4 °C) zentrifugiert um die in der Proben enthaltenen Proteine (im Überstand) von Zelltrümmern und weiteren Bestandteilen zu trennen. 100 µl dieses Überstandes wurden in ein separates Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert. Diese Proteinfraction stellt den Gesamtproteingehalt von membranständigen, biotinylierten, sowie intrazellulären unbiotinylierten Proteinen dar (G-Fraktion). Die übrigen 900 µl des Überstandes wurden nun 2 h mit 50 µl 50% Streptavidin-Sepharose-Beads (Thermo Scientific) bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Zuvor wurde das Säulenmaterial (engl. *Beads*) 3x mit TBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Proben kurz zentrifugiert, was die Trennung von intrazellulären Proteinen (IC-Fraktion, Überstand) und biotinylierten Membranproteinen (M-Fraktion) sicherstellte. Die Beads wurden 3x mit Lysis-Puffer gewaschen und danach die Proteine durch 5 minütiges Kochen in 2xSDS-Puffer eluiert. Für die Analyse im Westernblot wurden die G- und IC-Fraktion der Proteinproben ebenfalls 1:1 mit 2xSDS-Puffer gemischt, aber nur die G-Fraktion parallel für 5 min 95 °C erhitzt. Pro Tasche wurden 40 µl der verdünnten Proben auf das PAA-Gel aufgetragen, wobei darauf geachtet wurde von der M-Fraktion nur das Eluat aufzutragen.

2.18.6. Membranproteinpräparation

Diese Methode erlaubt die Gewinnung von Proteinen aus der Plasma-sowie ER-Membran. Hierzu wurden 48 h nach der Transfektion 10x10 cm-Schalen HEK293-Zellen pro Kondition mit je 5 ml PBS pH 7,4 gewaschen und anschließend mit dem selben Volumen kaltem PBS unter Zuhilfenahme eines Zellschabers gelöst und in einem 50 ml-Falkon gesammelt. Die Proben wurden 20 min bei 4 °C und ca. 13.000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und

das Pellet in 3 ml Puffer H (10 mM KH_2PO_4 , 10 mM K_2HPO_4 , 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1% PMSF, 1x Proteaseinhibitor) resuspendiert. Zur mechanischen Zerkleinerung wurde die Suspension nun in einen Glashomogenisator überführt und 10x gepötlert. Die Proben wurden danach in Jouan-Röhrchen gegeben und 20 min bei 4 °C und 35.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet erneut in 3 ml Puffer H resuspendiert, erneut gepötlert und unter denselben Konditionen zentrifugiert. Im letzten Schritt dieser Methode wurde das Pellet in 400 μl Puffer-B (250 mM KCl, 25 mM KH_2PO_4 , 25 mM K_2HPO_4 , 1x Proteaseinhibitor) aufgenommen. Die Proteinkonzentration wurde nach dem Bradford-Verfahren ermittelt. 20 μg Protein wurde in 20 μl 2xSDS-Puffer gelöst und 5 min bei 95 °C gekocht bevor die Proben mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert wurden. Bei der Gewinnung von Membranproteinen aus Mausgewebe wurde nach selbigem Protokoll vorgegangen mit dem Unterschied, dass vor der ersten Zentrifugation das Gewebe mit einem Ultra-Turrax (IKA) homogenisiert wurde. Das überschüssige Probenmaterial wurde bei -80 °C gelagert.

2.18.7. Koimmunpräzipitation (Ko-IP)

Die Immunpräzipitation ist eine biochemische Methode, bei der mittels Antikörper Antigene aus einer gemischten Lösung konzentriert werden (Kaboord and Perr, 2008). Diese Antigene sind meist Proteine (können aber auch Kohlenhydrate, Lipide oder andere Stoffe sein), die sich auf der Oberfläche von Zellen befinden und dort eine charakteristische dreidimensionale Struktur einnehmen, die von spezifischen Antikörpern erkannt und gebunden werden. Bei dieser *in vitro* Methode macht man sich die Eigenschaften von bakteriellem Protein-A und Protein-G (sogenannte *beads*) zunutze, mit hoher Affinität die Fc-Region der meisten Säugetierantikörper zu binden. Bei der Isolierung der *beads* durch Zentrifugation werden die gebundenen Antikörper mitsamt der spezifisch gebundenen Antigene (auf der Oberfläche des gesuchten Proteins) sowie deren Interaktionspartner gefällt (=präzipitiert). Das isolierte Protein und seine Interaktionspartner (Koimmunpräzipitate) können anschließend durch Westernblot und Immundetektion nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Interaktionspartner des humanen Glycinreceptors $\alpha 1$ untersucht. Hierfür wurden HEK293-Zellen mit den Plasmiden des GlyRs sowie des zu untersuchenden Proteins transfiziert und 48 h nach der Transfektion Zelllysate nach dem *Cytobuster TM Protein Extraction protocol* (Novagen) hergestellt. Dabei wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit dem Lysis-Puffer aus der 10 cm-Kulturschale gelöst und schließlich

5 min bei 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand (auch als Input bezeichnet) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und einer Proteinkonzentrationsbestimmung unterzogen. Für die Präzipitation wurden (für einen Ansatz mit 20 Proben) 50 mg Protein-A-Sepharose (Sigma) und 50 µl Protein-G-Agarose (Roche) in 1400 µl Lysispuffer 15 min inkubiert. Der jeweilige Antikörper wurde in dieser Lösung verdünnt und (50 µl) zusammen mit 300 µg des jeweiligen Zelllysats über Nacht bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben 3x mit Lysis-Puffer gewaschen und mit der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet (*beads* + Antikörper + gebundene Proteine) wurde mit 30 µl 2xSDS-Puffer gemischt und 5 min bei 95 °C gekocht. Die Proben wurden danach kurz zentrifugiert und der Überstand (Protein-Eluat) zusammen mit den Lysaten auf PAA-Gele aufgetragen und mittels Westernblotanalyse untersucht.

2.18.8. Immunzytochemie

Mithilfe immunzytochemischer Färbungen können die von einer Zelle gebildeten Proteine visualisiert und ihre Abundanz sowie Lokalisation quantifiziert werden.

In dieser Arbeit wurden sowohl transfizierte HEK293-Zellen oder Cos7-Zellen als auch primäre Hippocampusneuronen einer immunzytochemischen Behandlung unterzogen. Die auf Deckgläschen kultivierten Zellen wurden dazu 3x mit PBS gewaschen und in eine mit Parafilm beschichtete (semifeuchte) Färbekammer überführt. Um eine Konservierung der Antigenstruktur der untersuchten Proteine zu ermöglichen, wurden die Zellen anschließend 10 min mit 4% PFA-Sucrose (Tab. 11) oder 90 s mit -20 °C kaltem Methanol (100%) fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die unspezifischen Antikörperbindestellen für 30 min mit 5% Ziegen Serum (in PBS) blockiert. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde dieser Blocklösung 0,1% Triton-X100 (Roth) beigemischt. Danach wurden die gegen die zu untersuchenden Proteine gerichteten spezifischen Primäantikörper in der Blocklösung verdünnt und 70 µl für 1-2 h bei 4 °C auf die Zellen gegeben. Im Anschluss wurden die Deckgläschen erneut 3x mit PBS gewaschen und mit den ebenfalls in der Blocklösung (1:500) verdünnten Fluoreszenz-gekoppelten Sekundäantikörpern 1 h bei RT inkubiert. Zur Färbung der Zellkerne wurde nach 3x Waschen mit PBS 5 min mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, 1:5000 in PBS) inkubiert. Im letzten Schritt wurden die Deckgläschen nacheinander in PBS, dann in dH₂O getaucht und schließlich auf einem Objektträger mit einem Tropfen Mowiol oder Aqua-Polymount (Polysciences) eingebettet. Die auf diese Weise gefärbten Zellen wurden mit einem invertierten Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Fluoview1000ix81)

untersucht. Die entstandenen Bilder wurden anschließend mit ImageJ (Wayne Rasband) und Photoshop CS6 (Adobe) analysiert. Die verwendeten Antikörper mit allen relevanten dazugehörigen Informationen sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Für sogenannte *LIVE*-Färbungen der Glycinrezeptoren auf der Zelloberfläche wurde der Antikörper mab2b 1:250 im jeweiligen Kulturmedium verdünnt und ohne vorherige Block- oder Waschschrte auf die Zellen gegeben. Bei Neuronenfärbungen wurden nach der Fixierung die freien PFA-Gruppen 10 min mit NH_4Cl blockiert und 15 min mit Quenching-Puffer inkubiert bevor die Deckgläschen mit Primäantikörpern inkubiert wurden.

2.19. Molekularbiologische Methoden

2.19.1. PCR-Polymerase Chain Reaction

Die Polymerase-Kettenreaktion beschreibt ein *in vitro* Verfahren zur exponentiellen Amplifikation von DNA unter Verwendung thermostabiler DNA-Polymerasen (Mullis et al., 1986). Der Begriff exponentiell bezieht sich auf die Tatsache, dass die Produkte vorheriger Zyklen als Ausgangsstoffe für weitere Zyklen dienen.

Man unterteilt die PCR in 3 Elemente, die sich durch die jeweilige Reaktionstemperatur unterscheiden: Die Strangdenaturierung, das Anlagern (*Annealing*) der Oligonukleotide (*Primer*) und die Elongation der gewünschten DNA-Sequenz definierter Länge. Die Denaturierung der doppelsträngigen Matrizen-DNA (template-DNA) erfolgt bei 94 °C. Die Synthese des neuen DNA-Strangs wird von DNA-Polymerasen katalysiert, welche für die Initiation ihrer Aktivität ein freies 3'-OH Ende zur Anlagerung von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) benötigen. Dies wird durch Zugabe synthetischer Primer gewährleistet, welche über komplementäre Basenpaarung an den Enden des zu amplifizierenden Strangs binden. Die Temperatur bei der sich die Primer an einzelsträngige DNA anlagern, hängt von der Länge der Primer als auch von ihrem GC-Gehalt ab und liegt gewöhnlicherweise zwischen 50-70 °C. Die Schmelztemperatur wurde unter www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html berechnet. Bei der Elongation synthetisiert die DNA-Polymerase schließlich den neuen DNA-Strang bei einer Reaktionstemperatur von meist 72 °C am effektivsten. In der hier vorliegenden Arbeit wurden Taq- (*Thermus aquaticus*, Genotypisierung) oder Pfu- (*Pyrococcus furiosus*, Klonierung) Polymerasen für die PCR verwendet. Ein Standard-PCR-Ansatz enthielt folgende Elemente:

Reagenz	Volumen
template-DNA (100 ng/μl)	1 μl
dNTPs (10 mM)	2 μl
Taq-Polymerase (5 U/μl)	0,5 μl
forward-Primer (100 pmol/μl)	1 μl
reverse-Primer (100 pmol/μl)	1 μl
10xTaq-Puffer (MgCl ₂ -frei)	10 μl
MgCl ₂ (25 mM)	2 μl
dH ₂ O	ad 100 μl

Tabelle 14. Standard-PCR-Mix

Die Annealing-Temperatur wurde in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer berechnet und an das Standard-PCR-Programm (Tab. 15) angepasst. Die Annealing-Temperaturen der jeweiligen Primer sind in (Anhang IV) zu finden.

Verfahrensschritt	Temperatur/Zeit
1. initiale DNA-Denaturierung	95 °C-5 min
2. Denaturierung	95 °C-30 s
3. Annealing	50-70 °C-30 s
4. Elongtion	72 °C-30 s
5. finale Elongation	72 °C-10 min
	25-30 Zyklen der Schritte 2-4

Tabelle 15. Temperatur und Zeiten der Standard-PCR.

Für Klonierungen wurde die Pfu-Polymerase in Kombination mit dem dazugehörigen 10x-Puffer verwendet (Dauer Schritte 2-4: 1, 2, 4 min, 28 Zyklen). Für die Genotypisierungen genomischer DNA wurde die Go-Taq-Flexi-Polymerase (Promega) mit dazugehörigem Puffer verwendet (30, 30, 30 s; 28-30 Zyklen).

2.19.2. PCR-Mutagenese

Zur Generierung von Mutationen im GlyRa1 wurde die Strategie der *overlap extension* PCR (Verlängerung durch Überlappung) angewendet. Im ersten Schritt dieses Verfahrens wurden zwei PCR-Fragmente generiert, welche die gleiche Mutation enthalten und sich in einem Bereich von 10-30 bp überlappen (5 min, 95 °C Denaturierung, 5 min 50-70 °C Annealing, 72 °C Elongation, 28 Zyklen). Die verwendeten Primer mit dazugehöriger Annealing-Temperatur finden sich im Anhang IV. In der 2. PCR dienten diese überlappenden Fragmente nun als Matrize und wurden zur Länge des jeweiligen anderen Fragments durch die Polymerase am 3'-OH-Ende aufgefüllt. (5 min, 95 °C Denaturierung, 5 min 55 °C Annealing, 72 °C Elongation, 2 Zyklen). Anschließend wurden 2 parentale Primer zu dem Ansatz hinzugegeben, welche die cDNA an flankierenden Bereichen binden und somit die exponentielle Amplifikation des mutierten Fragments ermöglichen. Als PCR-Bedingungen zur Amplifikation wurde dasselbe Programm wie in der 1. PCR verwendet.

2.19.3. Agarose-Gelelektrophorese

Diese molekularbiologische Standard-Methode wird verwendet, um Nukleinsäure-Fragmente (DNA oder RNA) in einer Agarosematrix ihrer Masse nach aufzutrennen. In einem elektrischen Feld wandert die negativ geladene DNA zur Anode. Die Agarose dient dabei als molekulares Sieb, das größere Fragmente stärker zurückhält als kleinere. Die absolute Größe eines Fragments wird durch Vergleich mit einem DNA-Standard ermittelt.

In dieser Arbeit wurden vorrangig 1%ige Gele aus LE-Agarose (Biozym) hergestellt, indem 1 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer (Tab. 5) durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst wurde. Anschließend wurden 5 µl Midori-Green (Nippon Genetics) beigemischt und die Lösung polymerisiert. Midori-Green ist ein nicht-kanzerogener DNA-Farbstoff, der unter UV-Licht bei einem Absorptionsmaximum von 470-520 nm detektiert werden kann. Die Proben wurden 1:1 mit Blaumarker gemischt und parallel zum DNA-Standard in die Taschen des Gels aufgetragen. Eine Spannung von 140-180 V und 100-140 mA Stromstärke wurden für 30-60 min angelegt und die DNA-Fragmente anschließend unter UV-Licht zur Dokumentation fotografiert.

2.19.4 Gel-Extraktion

Mit Hilfe der Gelextraktion ist es möglich DNA-Fragmente aus einer PCR oder einem Restriktionsverdau zu isolieren und von Rückständen wie Primern, Matrizen-DNA, Vektor-DNA oder Enzymen zu befreien.

Die Proben wurden in 2-4 Taschen eines Agarose-Gels aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel entlang der vertikalen Taschen mit einem Skalpell säuberlich zerschnitten und nur die gesuchte Bande der 1. Tasche unter Anregung von UV-Licht ausgeschnitten. Anschließend wurden die anderen Streifen wieder an den 1. Streifen angelegt und auf derselben Höhe (ohne UV-Licht) horizontal geschnitten. Die Gelstücke wurden in einem Eppendorfgefäß gesammelt die enthaltene DNA nach dem Protokoll des *NucleoSpin Gel and PCR clean up Kits* (Macherey-Nagel) aufgereinigt. Die so gewonnenen DNA-Fragmente wurden für die Klonierung oder *overlap*-PCR verwendet.

2.19.5. Klonierung

Ziel einer Klonierung ist es, ein lineares DNA-Fragment (Insert) in einen Expressionsvektor (Plasmid) einzubauen. Das Insert wurde mithilfe der PCR von einer Matrize amplifiziert. Die

DNA wurde durch Gelelektrophorese überprüft und anschließend über Gelextraktion isoliert und aufgereinigt. Danach wurden Insert und Plasmid mit denselben Restriktionsenzymen verdaut, auf ein Agarosegel aufgetragen und die gewünschten Banden erneut isoliert und aufgereinigt. Vor dem eigentlichen Einbau des Inserts in den geschnittenen Vektor wurde die Vektor-DNA einer Phosphatasebehandlung unterzogen, um eine Religation zu verhindern. Nach der Ligation beider Fragmente wurde das fertige Plasmid in Bakterienzellen transformiert, auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden sechs Kolonien isoliert und das Vorhandensein des Inserts mittels PCR überprüft. Wurde das Insert in einer Kolonie erfolgreich nachgewiesen wurde zur Vermehrung der DNA eine 2 ml-Übernachtskultur mit der entsprechenden Kolonie angeimpft. Aus dieser Kultur konnte am nächsten Tag die DNA über Mini-DNA-Präparation isoliert und mittels Kontrollverdau auf die Existenz des Inserts überprüft werden. Von 1-2 positiven Klonen wurde die DNA zur Sequenzierung an die Firma Eurofins (Ebersbach) gesendet. Nach positiver Sequenzierung wurde zur Vervielfältigung der DNA eine Maxi-DNA-Präparation mit dem entsprechenden Klon durchgeführt.

Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die doppelsträngige DNA an definierten, meist palindromischen Sequenzen von 4-8 Basenpaaren erkennen und durch Hydrolyse aufspalten. *In vivo* treten Restriktionsendonukleasen unter anderem in Bakterien und Archaeen auf und dienen der Abwehr von fremd-DNA. Die Enden der geschnittenen DNA können entweder versetzt (*sticky*, klebrig) oder glatt (*blunt*) sein, wobei sticky ends leichter ligierbar sind, da sie miteinander hybridisieren können.

Bei der Klonierung werden die Insert-DNA und Vektor-DNA mit denselben Restriktionsenzymen verdaut und anschließend über Ligation miteinander verbunden. Auf diese Weise ist es möglich in einen Expressionsvektor die gewünschte DNA an definierter Stelle (meist MCS, *multiple cloning site*) einzuschleusen und z.B. über Transfektion von Zellkulturen die Expression des kodierten Proteins zu erreichen. Nach einer Klonierung kann mit Hilfe des Kontrollverdaus festgestellt werden, ob der jeweilige Vektor das Insert tatsächlich aufgenommen hat.

Für den Verdau von DNA wurde das jeweilige Enzym in Kombination mit dem dazugehörigen Puffer und BSA nach Angaben des Herstellers verwendet. Bei einem

Doppelverdau mit 2 Enzymen wurde diejenige Kondition gewählt, die die Effizienz beider Enzyme maximierte. Die Restriktionsansätze (Tab. 16) wurden 1 h bei 37 °C inkubiert.

Restriktionsverdau Insert	Restriktionsverdau Vektor	Kontrollverdau nach Transformation
11 µl PCR-Produkt	1 µg Vektor-DNA	2 µl DNA aus Mini-Präp.
1,5 µl 10xBSA	1 µl 10xBSA	1 µl 10xBSA
1,5 µl 10xPuffer	1 µl 10xPuffer	1 µl 10xPuffer
0,5 µl Enzym 1	0,5 µl Enzym 1	0,5 µl Enzym 1
0,5 µl Enzym 2	0,5 µl Enzym 2	0,5 µl Enzym 2
	6 µl dH ₂ O	5 µl dH ₂ O

Tabelle 16. Pipettierschema verschiedener Restriktionsansätze

Phosphatasebehandlung

Um nach einem Restriktionsverdau mit nur einem Enzym die sogenannte Monoligation (Ligation beider Enden eines Fragments) des verdauten DNA-Fragments zu verhindern, wurde obligatorisch eine Phosphatasebehandlung durchgeführt. Bei diesem Reaktionsschritt wurde das 5'-Phosphat-Ende des linearisierten Vektors mit Phosphatase dephosphoryliert, um die Hybridisierung komplementärer Enden zu unterbinden. Auf diese Weise wurde gewährleistet, dass der Vektor anstatt mit sich selbst mit dem Insert ligiert werden konnte. Die Phosphatasebehandlung von 8 µl Vektor-DNA erfolgte 15 min bei 37 °C mit 1 µl Antarctic Phosphatase und 1 µl dazugehörigem Puffer (NEB).

Ligation

Für die Ligation von Vektor und Insert wurde die T4-Ligase mit dazugehörigem Puffer (NEB) verwendet. Der Ligationsansatz bestand aus 1 µl Ligase, 7,5 µl Ligase-Puffer, 1 µl Vektor-DNA (verdaut, dephosphoryliert) und 5,5 µl Insert-DNA (verdaut). Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 14 °C inkubiert.

Transformation

Unter Transformation versteht man die nicht-virale Übertragung von rekombinanter DNA in kompetente Bakterien zum Zweck der Vervielfältigung. In dieser Arbeit wurde der DNA-Transfer in chemokompetente *E.coli*-Bakterien (Stamm: DH5 α) über Hitzeschock gewährleistet. Dafür wurden 50 μ l der aufgetauten Zellen mit 5 μ l des Ligationsansatzes (s. oben) für 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin folgte der Hitzeschock 45 s im 42 °C heißen Wasserbad, gefolgt von einer 2-minütigen Inkubation auf Eis. Anschließend wurden 200 μ l 2xYT-Medium (Tab. 8) hinzugegeben und für 45 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nun wurden die Zellen auf vorgewärmten Agar-Platten (mit dem entsprechenden Antibiotikum) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Unter diesen Umständen kann man erwarten, dass nur diejenigen Bakterien erfolgreich Kolonien ausbilden können, welche das ligierte Plasmid inklusiver der jeweiligen Antibiotikaresistenzkassette durch die Transformation erfolgreich aufgenommen haben.

Bakterienkulturen und DNA-Isolation

Die Gewinnung von rekombinanter DNA aus Bakterienkulturen erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979), gefolgt von einer Fällung der DNA mittels Isopropanol (Sigma). In Abhängigkeit der gewünschten DNA-Ausbeute wurde eine Mini-Präparation (bis 25 μ g) oder Maxi-Präparation (bis 1 mg) durchgeführt. Hierfür wurden zunächst einzelne Kolonien transformierter Bakterien (s. oben) mit einer 200 μ l-Spitze gepickt und in 2 ml (Mini-Präp.) oder 250 ml (Maxi-Präp.) 2xYT-Medium (inklusive geeignetem Antibiotikum) bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) über Nacht inkubiert. Die folgenden Schritte der Isolation beziehen sich auf die 2 ml-Kulturen (Mini-Präp.) und unterscheiden sich von der Isolation aus 250 ml-Kulturen nur in der Verwendung entsprechend geringerer Volumina der beteiligten Reagenzien sowie der DNA-Ausbeute: Am Tag nach dem Animpfen der Kultur wurden die 2 ml Proben 1 min bei 16.000 g zentrifugiert und das Pellet in 200 μ l Puffer-1 (50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8) resuspendiert. Nach 5 min Inkubation wurden 400 μ l Puffer-2 (200 mM NaOH, 1% SDS) hinzugegeben und die Reaktionsgefäße 5x invertiert. Nach 5 min Inkubation wurden nun 300 μ l Puffer-3 (11,5% Eisessig, 2 M Kaliumacetat) hinzugegeben und erneut 5 min inkubiert. Anschließend wurde 5 min bei 16.000 g zentrifugiert und 750 μ l des Überstandes mit 750 μ l Isopropanol gemischt (und die enthaltene DNA gefällt). Wieder wurde 5 min bei 16.000 g

zentrifugiert und danach das Pellet 2x mit 70% EtOH (Sigma) gewaschen. Im finalen Schritt wurde das Pellet nun 10 min getrocknet und in 40 µl 1xTE-Puffer (Tab. 5) gelöst.

Zur Lagerung und späterem Zurückgreifen auf transformierte Bakterienkulturen wurden 700 µl der Übernachtskultur mit 300 µl Glycerin (86 %) gemischt und bei -80 °C in Cryo-Röhrchen (Thermo Fischer Scientific) aufbewahrt.

spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration isolierter DNA wurde spektrophotometrisch mit dem Nanodrop ND-100 (Thermo Fisher Scientific) ermittelt. Für doppelsträngige DNA gilt, dass eine Lösung von 50 µg/ml eine Absorption von 1 bei $\lambda=260$ nm aufweist. DNA hat ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, während das von Proteinen bei 280 nm liegt. 1 µl Probe wurden zur Konzentrationsbestimmung aufgetragen und die Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt. Der Quotient dieser Werte sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Niedrigere Werte deuten auf eine Kontamination der Probe mit Proteinen oder Phenolen hin.

Die Konzentration wurde auf diese Weise bestimmt und die Probe anschließend auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt.

2.19.6. Klonierung von GlyR-Varianten in *Low-Copy*-Vektoren

Zur Untersuchung der Effekte der Punktmutation P366L-GlyR α 1 in primären Hippocampuskulturen wurde das Konstrukt in den sogenannten *low copy vector* FUVAl_IRES2_GFP kloniert. Der Vektor wurde von R. Blum bereitgestellt und kontrolliert die Expression des inserierten Gens unter Einfluss des Ubiquitinpromotors. Als Matrizen-DNA diente das bereits existierende GlyR α 1-Konstrukt im *high copy vector* pRK5. Unter Verwendung geeigneter Primer wurden zunächst die BamHI bzw. NotI-Schnittstellen mittels PCR angefügt (FUVAl_BamHI_forward: CGGGATCC ATG TAC AGC TTC AAT ACT CTT CGA CTC; FUVAl_NotI_reverse: ATAGTTTAGCGGCCGC TCA CTG GTT GTG GAC GTC CTC TCT ACG). Das PCR-Produkt wurde auf ein 1%-Agarosegel aufgetragen, nach der Gelelektrophorese die gesuchte Bande ausgeschnitten und aufgereinigt. Anschließend wurden Vektor und Insert verdaut und ligiert. Für die Transformation wurden ebenfalls von R. Blum bereitgestellte chemokompetente Bakterien verwendet. Zur Kultivierung wurde SOD-Medium ohne NaCl verwendet (Tab. 8) und fortlaufend gearbeitet

(ohne Lagerung bei 4 °C), um zu verhindern, dass der kälteempfindliche FUVa1-Vektor das Insert wieder ausschleust. Vor der Sequenzierung der gewonnenen DNA wurde ein Kontrollverdau mit BamHI und NotI unter Standardbedingungen praktiziert. Die DNA von positiv getesteten Klonen wurde für die 250 ml-Übernachtskultur und anschließende Maxi-Präparation verwendet.

2.19.7. DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung von DNA-Proben wurde die Firma Eurofins Genomics (Ebersbach) beauftragt. Es wurde nach dem Herstellerprotokoll gearbeitet und 15 µl DNA (10 ng/µl) sowie 15 µl (150 pmol) des jeweiligen Primers separat versendet.

2.19.8. DNA-Isolation aus Gewebe

Die Isolation genomischer DNA aus dem Ohrgewebe oder anderem Mausegewebe erfolgte mithilfe TRIS-EDTA-NaOH-SDS-Puffers (TENS; 10 mM TRIS pH 8,5; 5 mM EDTA; 0,2% SDS; 200 mM NaCl). Hierzu wurde das Gewebe in 800 µl TENS-Puffer und 5 µl Proteinase K über Nacht bei 55 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben 5 min bei RT und 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit 750 µl Isopropanol gemischt. Anschließend wurde 15 min bei 4 °C und 15.000 rpm zentrifugiert und das Pellet 2x mit 70% EtOH gewaschen. Nach Trocknen des Alkohols wurde die DNA in 40 µl TE-Puffer eluiert.

2.19.9. Genotypisierung der *oscillator*-Mäuse

Zur Genotypisierung der Mauslinie *spd*^{ot} (*oscillator*) wurde das Exon 9 des murinen *Glal*-Gens unter folgenden PCR-Bedingungen amplifiziert: 5 min 95 °C initiale Denaturierung, 30 s 95 °C Denaturierung, 30 s 55 °C Annealing, 30 s 72 °C Elongation und 10 min finale Elongation. Ausschließlich der initialen Denaturierung und der finalen Elongation wurde dieses Programm 30x wiederholt. Der PCR-Ansatz enthielt 1,5 µl Proben-DNA, 1,25 mM dNTPs, 25 mM MgCl₂, 2,5 µl 5x GoGreen-Puffer, 0,35 µl GoTaq Polymerase, 5 pmol beider Primer (Anhang IV) und 13,15 µl dH₂O. Zur Analyse wurden 10 µl der PCR-Produkte auf ein 9% PAA-Gel aufgetragen. Während bei wildtypischer DNA ein DNA-Fragment von 194 bp amplifiziert wurde, lag die Größe des entsprechenden Fragmentes bei *spd*^{ot}-Tieren bei 187 bp.

Heterozygote Tiere wurden hingegen durch die Anwesenheit beider Fragmente charakterisiert.

2.19.10. Genotypisierung der tg *Gral1*-Ex9-Mäuse

Die Anwesenheit des Transgens in genomischer DNA wurde unter denselben PCR-Bedingungen wie bei der Genotypisierungs-PCR der *oscillator*-Mäuse (s. oben) überprüft. Diese PCR unterschied sich lediglich durch die Anzahl der Amplifikationszyklen (35 statt 30 Zyklen) und der erhöhten Annealing-Temperatur von 64 °C aufgrund der Komposition der hier verwendeten Primer (Anhang IV).

2.20. Elektrophysiologische Methoden

Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, wie der Glycinrezeptor, sind transmembrane Proteine, welche als Reaktion auf die hochaffine Bindung ihres Liganden in der extrazellulären Domäne eine Konformationsänderung durchlaufen, die schließlich zur Öffnung der zentralen Ionenpore und zum Einstrom von (Chlorid-) Ionen führt. Dieser Ionenfluss kann mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik elektrophysiologisch gemessen und durch funktionelle Datenanalyse charakterisiert werden. Die Methode stellt eine weiterentwickelte Form der *Voltage-Clamp*-Technik (Spannungsklemmen-Technik) dar und dient der Untersuchung elektrischer Aktivität einzelner Neurone und selbst einzelner Ionenkanäle. 1979 wurde diese heute weit verbreitete Methode das erste Mal von Erwin Neher und Bert Sakmann beschrieben, wofür sie 1991 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet wurden (Sakmann and Neher, 1984).

2.20.1. Prinzip und Durchführung von Patch-Clamp-Experimenten

Das zugrundeliegende Prinzip dieser Methode ist die langsame Annäherung und das Aufsetzen einer elektrolytgefüllten Mikropipette sehr geringen Öffnungsdurchmessers (wenige μm) auf die Plasmamembran der zu untersuchenden Zelle (Abb. 9A,B). Durch Anlegen von Unterdruck entsteht an dieser Stelle zwischen Pipette und Zellmembran nun eine Verbindung mit einem hohen Abdichtwiderstand im Gigaohmbereich. Dieses sogenannte *Gigaseal* gewährleistet die elektrische Isolation des Membranstücks (Patch) unter der Pipettenspitze gegenüber dem Außenmedium. Zur eigentlichen Messung von Ionenströmen ist das Innere der Patch-Pipette über einen Silberdraht mit dem Verstärker verbunden. Dieser Draht dient gleichzeitig als Messelektrode und Spannungsklemme (s. unten). Ausgehend von dieser *cell-attached*-Konfiguration (oder *on-cell*-Konfiguration) sind nach Ausbildung des *Gigaseals* noch weitere Messkonfigurationen möglich (Abb. 9C). So lässt sich durch Anlegen eines Unterdrucks das Membranstückchen unter der Pipette durchbrechen ohne das *Gigaseal* zu zerstören. Auf diese Art und Weise erhält man eine niederohmige Verbindung zur gesamten Zelle mit der die Gesamtströme aller auf der Membran exprimierten Ionenkanäle gemessen werden können (*whole-cell*-Konfiguration). Bewegt man nun die Pipette vorsichtig von der Zelle weg, schließt sich die geöffnete Membran in der Pipette und ist mit ihrer Außenseite dem Außenmedium ausgesetzt. Mit dieser *outside-out*-Konfiguration ist es möglich Einzelkanalmessungen durchzuführen. Entfernt man hingegen die Pipette ausgehend von der *cell-attached*-Konfiguration von der Zelle, erhält man Zugang zur zytoplasmatischen

Seite des Membranstücks. Diese *inside-out*-Konfiguration eignet sich zur Untersuchung der elektrischen Aktivität einzelner Ionenkanäle in Abhängigkeit von der biochemischen Zusammensetzung des Zytosols. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Ganzzell-Ableitungen von transfizierten HEK293-Zellen oder primären Hippocampusneuronen durchgeführt.

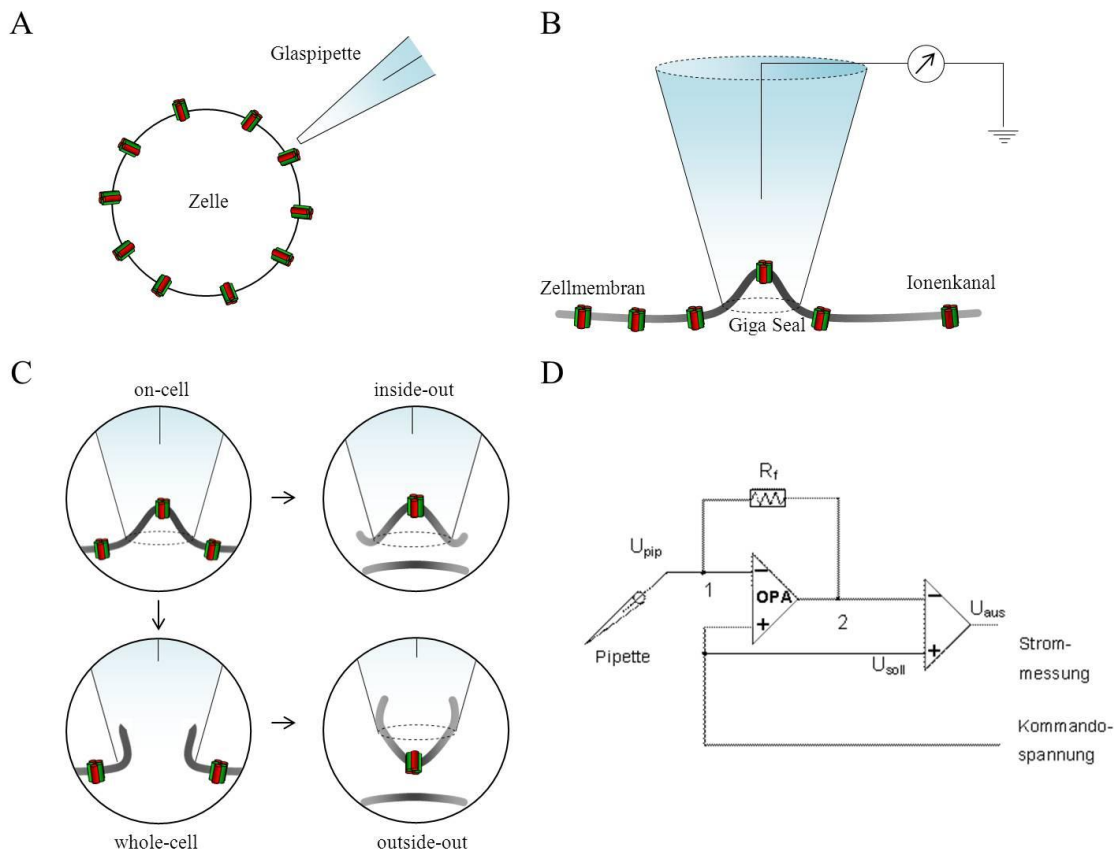


Abbildung 9. Prinzip und Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik

A: Eine elektrolyt-gefüllte Mikropipette mit integriertem Silberdraht dient als Messelektrode. Diese wird mit einem Mikromanipulator zur Zelle von Interesse navigiert bis die *on-cell*-Konfiguration erreicht ist (B). Durch geringen Unterdruck bildet sich nun das *Gigaseal* aus. C: Ausgehend von dieser Konfiguration sind verschiedene Zellmanipulationen möglich (Erklärung siehe Text). D: Schematisches Schaltbild des Patch-Clamp-Verstärkers (Numberger and Draguhn, 1996).

Zur Messung von Chloridströmen über den humanen oder murinen GlyR α 1 wurde das Deckglaschen mit transfizierten HEK293 Zellen am Messplatz 15 min in Extrazellulärpuffer inkubiert. Die Patchpipetten wurden mit Hilfe des Horizontalpullers P-97 (Sutter Instrument, Novato, USA) aus Borsilikatkapillaren (World Precision Instruments, Berlin) nach Herstellerprotokoll gezogen und zur Hälfte mit Intrazellulärpuffer gefüllt. Der

Pipettenwiderstand variierte zwischen 3-10 M Ω . Die Zusammensetzung der beteiligten Puffer sind Tabelle 10 zu entnehmen. Zur Minimierung von Hintergrundrauschen wurden die elektrophysiologischen Experimente auf einem schwingungsgedämpften Tisch innerhalb eines Faraday'schen Käfigs durchgeführt. Um die *on-cell*-Konfiguration zu erreichen wurde die gefüllte Pipette auf die Messelektrode montiert und über einen Mikromanipulator zur Zelloberfläche navigiert. Dabei wurde die Bewegung der Pipette über ein konfokales Fluoreszenz-Mikroskop mit 40-facher Vergrößerung verfolgt. Transfizierte Zellen konnten auf diese Weise durch Emission von grünem Licht von untransfizierten Zellen unterschieden werden. Die Messkammer wurde kontinuierlich mit vorgewärmtem Extrazellulärpuffer gespült und über einen weiteren regulierbaren Perfusionskreislauf (sogenanntes U-Tube-Perfusionssystem) mit dem Agonisten (1-3000 μ M Glycin) versorgt. Zur gezielten Applikation wurde das U-Tube-Perfusionssystem über das Programm Pulse+Pulse-Fit (HEKA, Göttingen) gesteuert. Die Messelektrode wurde über einen EPC-9-Verstärker (HEKA, Göttingen) mit demselben Programm verbunden. Nach Erreichen der *whole-cell*-Konfiguration wurde die Zelle auf -60 mV geklemmt und die kapazitiven Ströme elektrisch kompensiert (s. unten). Zur Datenanalyse wurden nur Zellen verwendet, die nach Erreichen der *whole-cell*-Konfiguration einen Widerstand über 100 M Ω sowie einen Leckstrom von unter 0,5 nA zeigten. Es wurde ebenfalls darauf geachtet nur Zellen mit einer Membrankapazität C_m zwischen 2,5-10 pF und Pipettenkapazität C_{pip} zwischen 10-15 pF in die spätere Analyse einzubeziehen.

2.20.2. Physikalische Grundlagen und Datengewinnung

Bei der Detektion von Ionenströmen im Nanoamperebereich ist die Verwendung eines Differenzverstärkers notwendig, der über einen Vorverstärker mit der Messelektrode verbunden ist. Dabei wird das Potential (=elektrische Spannung) der untersuchten Zelle konstant gehalten und der resultierende Kompensationsstrom gemessen. Die Strommessung und parallele Potentialkontrolle wird durch den Strom-Spannungswandler (Abb. 9D) reguliert, dessen wichtigste Komponenten der Operationsverstärker (OPA) und der Rückkopplungs- bzw. Referenzwiderstand (R_f) sind. Der OPA besitzt 2 Eingänge mit unendlich hohem Eingangswiderstand ($>10^{12}$ M Ω), sodass über den OPA kein Strom fließen kann. Stattdessen misst er kontinuierlich das Membranpotential der untersuchten Zelle, welches der Pipettenspannung U_{pip} entspricht und vergleicht diesen Wert mit der Kommandospannung U_{soll} , welche durch die Software eingegeben wird. Stimmen beide Werte überein, fließt kein

Strom durch das System. Weichen die beiden Werte voneinander ab, liefert der OPA an seinem Ausgang die Ausgleichsspannung U_f , die notwendig ist um die Spannungsdifferenz der beiden Eingänge auszugleichen. Da der Ausgang des OPA über den Rückkopplungswiderstand mit dem Eingang der Messelektrode verbunden ist, liefert dieser nun ein hoch verstärktes Spannungssignal U_f , welches proportional zur Spannungsdifferenz beider Eingänge ist. Der nachgeschaltete Differenzverstärker vergleicht nun diese Spannung mit der Kommandospannung und gibt die Differenz über ein Oszilloskop oder einen Monitor aus (Numberger and Draguhn, 1996).

Eine weitere wichtige Kenngröße, die bei der Untersuchung von Ionenkanalströmen eine essentielle Rolle einnimmt, ist die Kapazität C . Diese beschreibt das Verhältnis zwischen der Ladungsmenge Q zweier elektrisch isolierter Körper und der zwischen ihnen herrschenden elektrischen Spannung. Es gilt: $C = \frac{Q}{U}$. Mit dieser Formel ist es möglich die Speicherkapazität eines Kondensators zu berechnen. Dieser besteht aus 2 leitenden Schichten, die über ein Dielektrikum (=nicht leitendes Medium) voneinander getrennt sind. Neben der Kapazität des Vorverstärkers spielen die kapazitiven Eigenschaften der Zellmembran sowie der Patchpipette eine wichtige Rolle. Als Dielektrikum werden die Lipiddoppelschicht der Zellmembran und die Glaswand der Patchpipette betrachtet. Bei einer Änderung der Kommandospannung werden zunächst die Kapazitäten der Zellmembran und der Pipette umgeladen bevor es zu einer entsprechenden Änderung des Membranpotentials kommt. Als Antwort auf den angelegten Testpuls (5 mV) zeigen sich exponentiell verlaufende transiente Ströme, die sehr hohe Werte annehmen können und die eigentlichen Messwerte beeinträchtigen können. Aus diesem Grund wurden diese kapazitiven Ströme (C_{fast} : Kapazität der Pipette mit schneller Zeitkonstante; C_{slow} : Membrankapazität mit langsamer Zeitkonstante) durch einen in den EPC9-Verstärker eingebauten automatischen Korrekturmechanismus korrigiert. Der Kapazitätsausgleich kann ebenso manuell über die Software vorgenommen werden.

2.20.3. Datenanalyse elektrophysiologischer Messungen

Für jedes elektrophysiologisch untersuchte Konstrukt wurden mindestens 10 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten zur Datenanalyse herangezogen. Die Maximalströme als Folge auf die Applikation von Glycin (1-3000 μ M) wurden analysiert und mithilfe von Microsoft Excel und Origin 5 (OriginLab) grafisch dargestellt. Folgende Kenngrößen wurden ermittelt:

Mittelwert:

$$x = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}; n = \text{Anzahl gemessener Zellen.}$$

Varianz:
$$V(x) = \frac{1}{n(n-1)} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2;$$

Standardabweichung (SD)
$$\sigma = \sqrt{V(x)};$$

SEM (Standardfehler der Mittelwerte; SEM):
$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

EC₅₀-Dosis-Wirkungskurven wurden aus den Maximalströmen (Amplituden) von sieben verschiedenen Konzentrationen des applizierten Agonisten (1-3000µM) angefertigt. Unter Verwendung der Hill-Gleichung $\frac{I_{Glycin}}{I_{sat}} = \frac{Glycine^{n_{Hill}}}{EC_{50}^{n_{Hill}} + Glycine^{n_{Hill}}}$, bei welcher n_{Hill} den Hill-Koeffizienten, I_{Glycin} den Maximalstrom bei gegebener Konzentration, I_{sat} den Maximalstrom bei sättigender Glycinkonzentration darstellt, wurde der EC₅₀-Wert ermittelt, welcher jene Konzentration darstellt, welche eine halbmaximale Stromantwort produziert.

2.20.4. Spannungsklemmen-Fluorometrie (VCF)

Die Methode der Spannungsklemmen-Fluorometrie (*voltage-clamp fluorometry*=VCF) wurde im Labor von Joe Lynch am *Queensland Brain Institute* angewendet, um die Bewegungen extrazellulärer Schleifenstrukturen während des Öffnens und Schließens des Glycinrezeptors in Abhängigkeit von der Patientenmutation P366L zu untersuchen. Die VCF beinhaltet die molekulare Befestigung eines Fluoreszenzfarbstoffes (Fluorophor) an der Region des Rezeptors, die auf Molekülbeweglichkeit hin untersucht werden soll. Dieses Fluorophor ist üblicherweise mit einer reaktiven Sulfhydrylgruppe konjugiert. Unter Abspaltung von Sulfinsäure wird dann eine stabile Thioesterbindung mit Cysteinresten des Polypeptids eingegangen und das Fluorophor auf die Weise an definierter Position konjugiert. In dieser Studie wurden die beiden extrazellulär lokalisierten Aminosäurereste N203 (Loop C) sowie R271 (TM2-3 Loop) in Cysteine umgewandelt, und mit MTS-TAMRA (N203C) oder MTSR (R271C) (beide Methanthiosulfate von J. Lynch bereitgestellt) konjugiert. Im Vorfeld wurden die Konstrukte P366L/N203C und P366L/R271C kloniert und schließlich im Vergleich mit dem „wildtypischen“ N203C-oder R271C-GlyRα1 in Oocyten der Spezies *Xenopus laevis* exprimiert und die Fluoreszenzänderung in Abhängigkeit von der Applikation aufsteigender Glycinkonzentrationen (3-30.000 µM) gemessen. Die Methode bedient sich der Tatsache, dass die Fluoreszenzquantenausbeute vieler organischer Fluorophore hochempfindlich gegenüber Veränderungen ihrer chemischen Mikroumgebung ist. Wenn eine Glycin-induzierte Konformationsänderung des GlyRs stattfindet verändert sich durch die Bewegung

bestimmter Molekülbereiche die chemische Mikroumgebung des Fluorophors. Diese Änderung der Fluoreszenz kann dann durch Anregung mit (nahezu) monochromatischem Licht an einem Epifluoreszenzmikroskop detektiert werden. Die VCF macht es des Weiteren möglich diese Molekülbewegungen mit simultan gemessenen Ionenströmen in Echtzeit zu korrelieren. Es wurde nach Standardprotokoll vorgegangen (Pless et al., 2007, Lynagh and Lynch, 2012).

3. Ergebnisse

3.1. Funktionelle *in vitro* Komplementation des murinen GlyR α 1

3.1.1. Vorarbeiten und Generierung der Konstrukte

Von NMDA-Rezeptoren ist bekannt, dass sie sich aus voneinander unabhängigen, selbstfaltenden Domänen zusammensetzen, die sich nach separater Expression in der Zellmembran zu funktionellen Ionenkanälen formieren (Schorge and Colquhoun, 2003). Das gleiche Prinzip gilt für den Glycinrezeptor (Abb. 7). So konnte demonstriert werden, dass die Funktion trunkierter Rezeptorvarianten durch Koexpression von Rettungskonstrukten (*rescue tails*), welche den fehlenden C-terminalen Bereich des Rezeptors umfassen, wiederhergestellt werden kann (Villmann et al., 2009a). Auf diese Weise konnte der funktionslose *oscillator*-GlyR $\text{spd}^{\text{ot}}\text{-trc}$ *in vitro* komplementiert und ca. 30 % der Glycin-induzierten Maximalströme zurückgewonnen werden. Außerdem wurde die Bedeutsamkeit der Integrität des basischen Motivs $^{344}\text{RRKRRH}^{349}$ am C-Terminus des TM3-4 Loops für die funktionelle Komplementation des GlyR hervorgehoben: Die *oscillator*-Mutation führt, wie bereits erwähnt, nicht nur zu dem verfrühten Stopcodon P355X, sondern auch zum Verlust des basischen Motivs (Abb. 10A). Eine Rückmutation dieses Rezeptorbereichs bewirkte vollständige Komplementation nach Koexpression des *rescue-tails*. Um die Effekte der Rezeptortrunkierung von denen des Verlusts des basischen Motivs unterscheiden zu können, wurden in den Komplementationsstudien mit dem verkürzten Konstrukt α 1-trc gearbeitet (Abb. 10A), welches das Stopcodon an äquivalenter Stelle wie $\text{spd}^{\text{ot}}\text{-trc}$ trägt, aber das basische Motiv beinhaltet (Villmann et al., 2009a).

Der Mechanismus, welcher der Interaktion zwischen dem trunkierten GlyR und dem *tail* zugrunde liegt, ist nicht vollständig entschlüsselt. Als für die Interaktion notwendige Minimaldomäne wurden in einer Folgestudie die Aminosäuren 357-418 des TM3-4 Loops definiert (Unterer et al., 2012). In dieser Studie wurde des Weiteren demonstriert, dass eine schrittweise Trunkierung am N-Terminus des *tails* (Abb. 10B) nach 49 Aminosäuren zum Verlust der Komplementationspotenz führt (Abb. 10C).

Ausgehend von den in Unterer et al., 2012 verwendeten *tail*-Varianten myc-i Δ 22-TM4, myc-i Δ 55-TM4 und myc-i Δ 62-TM4 wurden diverse Modifikationen am N-Terminus dieser Konstrukte generiert, um den Einfluss auf die Komplementation zu untersuchen. So wurde dem funktionellen Konstrukt myc-i Δ 22-TM4 das basische Motiv RRKRR angeheftet

(myc-iD-RRKRR Δ 22-TM4), um die These zu überprüfen, dass es sich um eine ladungsabhängige Interaktion zwischen α 1-trc und dem *tail* handelt.



Abbildung 10. Vorarbeiten zur *in vitro* Komplementation des GlyR

A: Sequenzvergleich des trunkierten wt GlyR α 1 (α 1-trc) und dem *oscillator*-GlyR (spd^{ot}-trc). Der rote Kasten markiert den Ort der 7 bp Mikrodeletion, welche zur Leserasterverschiebung und Generierung des Stopcodons P355X führt. Die gestrichelte Linie markiert das Ende der TM3, der graue Kasten markiert das multifunktionelle basische Motiv im TM3-4 Loop. Erklärung siehe Text. Modifiziert nach (Villmann et al., 2009a) B: Prinzip der Komplementation des funktionslosen α 1-trc durch schrittweise trunkierte *rescue-tails*. Schematische Darstellung trunkierter GlyR-Varianten. Transmembrandomänen sind durch schwarze Kästen markiert. Die Sequenz des Volllängen-*tails* myc-iD-TM4 beginnt mit L357. Die gestrichelten Linien markieren die Orte der N-terminalen Trunkierung des *tails* nach 22, 27, 43, 49, 55, 62 und 67 Aminosäuren. C: Darstellung der Glycin-induzierten Chlorideinstrome nach Koexpression von α 1-trc in Kombination mit verschiedenen langen *tail*-Varianten. Nach Deletion von mehr als 49 Aminosäuren am N-Terminus des *tails* kommt es zum nahezu vollständigen Verlust der Komplementationspotenz. Modifiziert nach (Unterer et al., 2012).

Da der C-Terminus von α 1-trc hauptsächlich positiv geladene Aminosäuren beinhaltet, würde man bei einer Komplementation eine Repulsion des *tails* erwarten, und nach der Koexpression keine Ströme messen. Weiterhin wurden den funktionslosen Konstrukten myc-iD Δ 55-TM4 und myc-iD Δ 62-TM4 negativ geladene Aminosäuren angeheftet (myc-iD-MEE Δ 55-TM4 und myc-iD-EAEE Δ 62-TM4) um zu überprüfen, ob durch die negative Ladung des N-Terminus des *tails* nach Koexpression mit dem positiv geladenen C-terminalen Ende des α 1-trc die Kanalfunktion teilweise wiederhergestellt werden kann. Zusätzlich wurden den soeben genannten Ausgangskonstrukten Alanine am N-Terminus angeheftet (myc-iD-MAA Δ 55-TM4 und myc-iD-AAAA Δ 62-TM4). Alanin besitzt außer einer Methylgruppe keine Seitenkette. Mit diesen Konstrukten sollte überprüft werden, ob nicht die Ladung, sondern möglicherweise die Art der Seitenkette für die Interaktion entscheidend ist. Da zur immunzytochemischen Detektion alle Ausgangskonstrukte ein myc-Epitop (N-EQKLISEEDL-C) am N-Terminus tragen und dessen Anwesenheit die Komplementation beeinflusst (Villmann et al., 2009a), wurden vom Δ 62-Konstrukt ebenfalls solche Varianten generiert, die das myc-Epitop nicht trugen (iD-EAEE Δ 62-TM4, iD- Δ 62-TM4). Eine

schematische Übersicht über die verwendeten Konstrukte sind der folgenden Abbildung zu entnehmen.

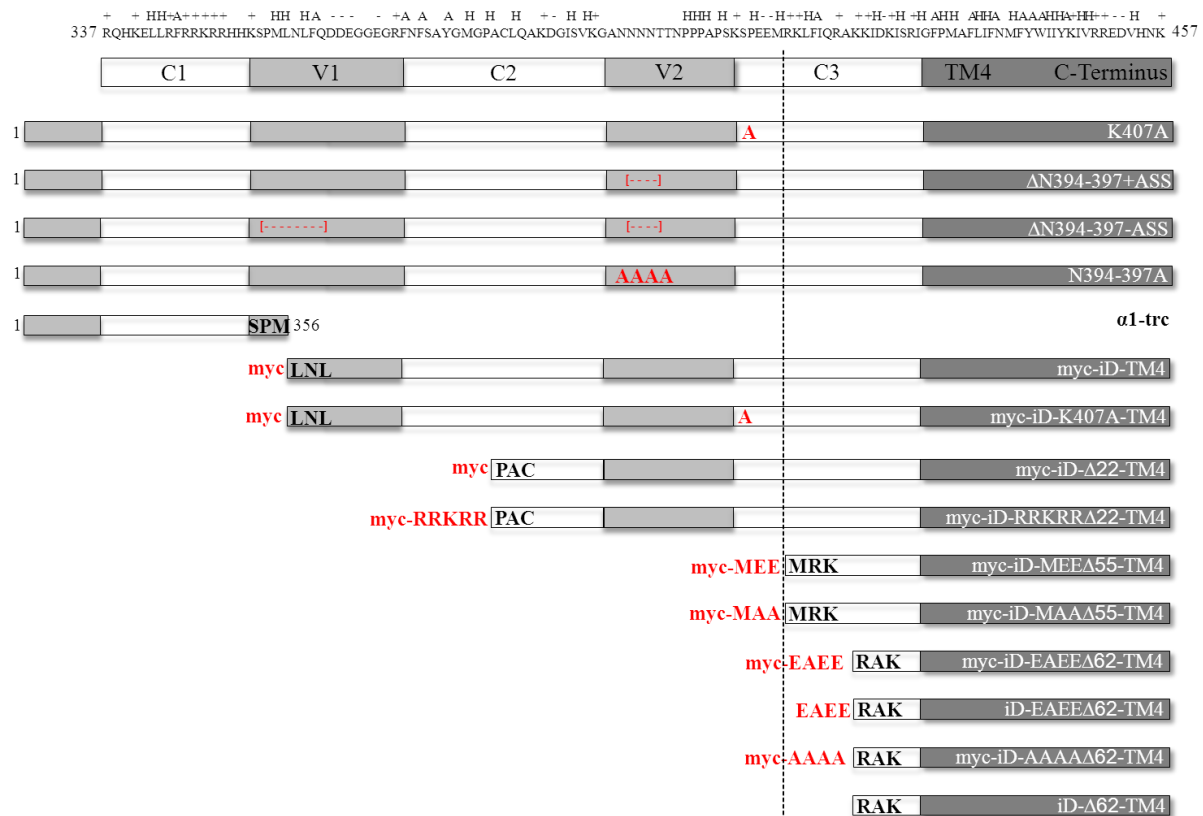


Abbildung 11. Darstellung der Konstrukte für die *in vitro* Komplementation

Der TM3-4 Loop gliedert sich in konservierte (C1-C3) und variable Bereiche (V1, V2). Die Sequenz des TM3-4 Loops des GlyR α 1 befindet sich über der Darstellung der konservierten und variablen Bereiche und ist in positiv geladene (+), negative geladene (-), hydrophobe (H) und aromatische (A) Seitenketten unterteilt. Darunter befindet sich die schematische Darstellung der in dieser Studie untersuchten Konstrukte. Die Vollängenkonstrukte K407A, Δ N394-397+ASS, Δ N394-397-ASS und N394-397A sind durch eine „1“ am linken Bildrand markiert. Darunter sind der trunke GlyR α 1-trc und die für die Rezeptorkomplementation verwendeten *tail*-Konstrukte dargestellt. Rote Beschriftungen kennzeichnen die (meist) N-terminalen Modifikationen, deren Einfluss untersucht werden sollte. Die gestrichelte vertikale Linie markiert den Bereich der TM3-4 Loop-Sequenz, nach dem in Unterer et al., 2012 die Komplementationspotenz der *tails* verloren geht. Die Abbildung ist modifiziert nach (Unterer et al., 2012). Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf das unreife Protein.

3.1.2. Oberflächenexpression ausgewählter Komplementationskonstrukte

Die Expression der neu generierten Komplementationskonstrukte myc-iD-RRKRR Δ 22-TM4, myc-iD-MEE Δ 55-TM4 und myc-iD-EAEE Δ 62-TM4 wurde zunächst auf Proteinebene auf der Oberfläche von HEK293-Zellen mittels *Biotinylierungsassay* untersucht. Hierzu wurden die genannten Konstrukte einzeln sowie in Kombination mit der verkürzten α 1-Untereinheit α 1-trc in HEK293-Zellen (ko-)transfiziert. Als Negativkontrolle wurde GFP transfiziert. Die

Proben aus der Membranproteinfraktion sowie der Gesamtproteinfraktion wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot aufgetrennt und mit dem Pan-GlyR α -Antikörper mab4A detektiert (Abb. 12). Dieser Antikörper bindet sein Epitop im N-Terminale Bereich des GlyR α . Die Komplementationskonstrukte konnten zudem mit dem c-Myc-Antikörper detektiert werden. Als Ladekontrolle wurde gegen Pan-Cadherine gefärbt, ubiquitär exprimierte Transmembranproteine, welche am Calcium-abhängigen Zell-Zell-Kontakt beteiligt sind.

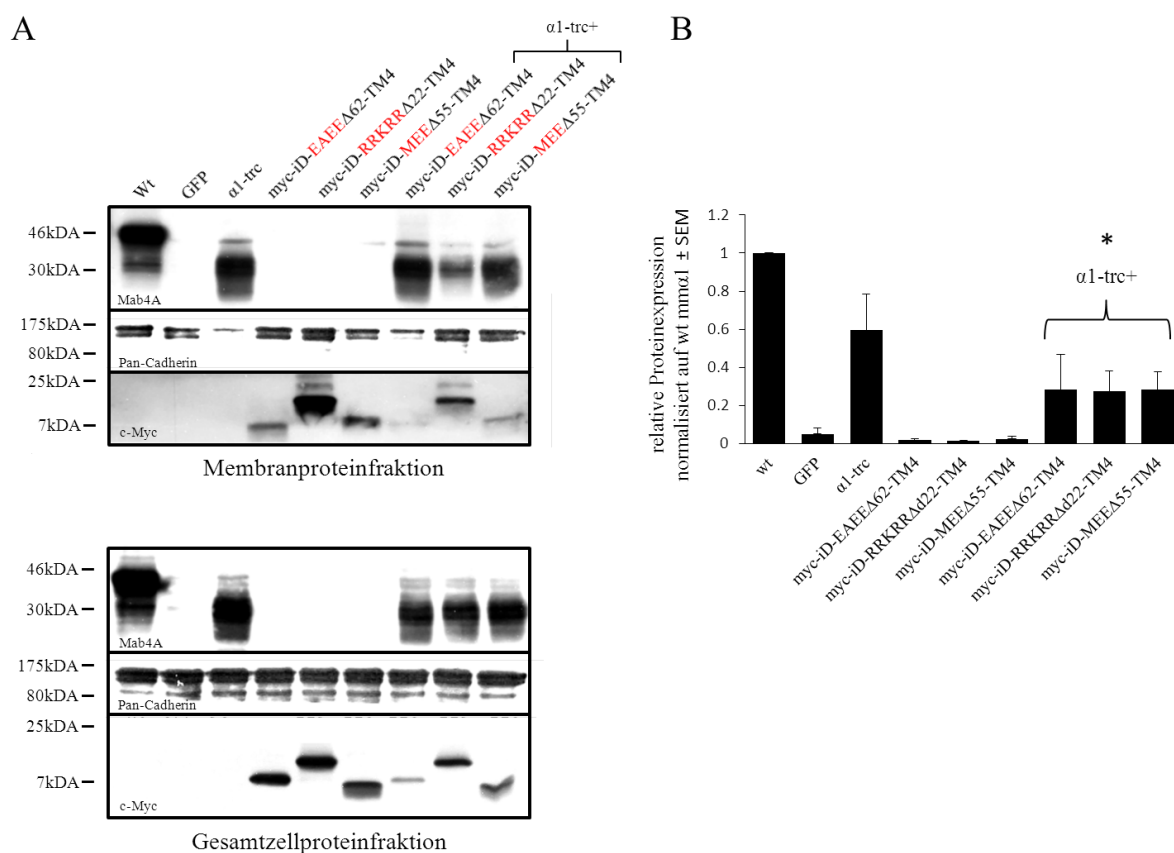


Abbildung 12. Biotinylierungsassay zur Bestimmung der Oberflächenexpression

A: Markierung der Oberflächenproteine mit Biotin nach Expression von $\alpha 1$ -trc und den verschiedenen *tail*-Konstrukten in HEK293-Zellen. Innerhalb der Membranproteinfraktion sowie der Gesamtzellproteinfraktion wurden wt, $\alpha 1$ -trc und die kotransfizierte Konstrukte mit Mab4A detektiert. Das myc-Epitop der *tails* wurde mit c-Myc visualisiert. Als Ladekontrolle wurde Pan-Cadherin verwendet. B: Quantifizierung der Banden, die von Mab4A in der Membranfraktion gebunden wurden im Vergleich zur wt-Bande (48 kDa). * $p < 0,05$, ANOVA. *mmu1*, *Mus musculus* GlyR α . Es wurden die Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten verwendet. Erklärung siehe Text.

Wie in Abbildung 12A zu erkennen ist, wurden der wildtypische GlyR $\alpha 1$ (48 kDa), $\alpha 1$ -trc (38 kDa) in der Membranproteinfraktion sowie in der Gesamtzellproteinfraktion detektiert. Die Färbung mit c-Myc weist in beiden Proteinfraktionen ein stärkeres Signal in der

Einzeltransfektion als in der Kotransfektion mit $\alpha 1$ -trc auf. Die verschiedenen Molekülmassen der trunkierten *tails* korrespondieren zu den Längen der jeweiligen Konstrukte (myc-iD-RRKRR Δ 22-TM4, 20 kDa; myc-iD-MEE Δ 55-TM4, 7 kDa und myc-iD-EAEE Δ 62-TM4, 6 kDa). GFP wurde nicht durch mab4A und c-Myc detektiert. Die Färbung gegen Pan-Cadherin (Ladekontrolle) zeigt bei jeder Probe eine Doppelbande (170 kDa und 130 kDa). Anhand dieser Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass sowohl $\alpha 1$ -trc als auch die *tail*-Konstrukte an der Zellmembran lokalisiert sind, was die Grundvoraussetzung für eine funktionelle Rezeptorkomplementation darstellt. Die Ergebnisse von 3 voneinander unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 12B quantifiziert. Man sieht, dass die Expression der kotransfizierten *tail*-Varianten an der Zellmembran von HEK293-Zellen ca. 30% des wt GlyR ausmacht.

3.1.3. Ergänzende zelluläre Detektion der Komplementationskonstrukte

Zur weiteren Charakterisierung der Expression der *tail*-Konstrukte wurden HEK293-Zellen transfiziert und einer immunzytochemischen Färbung unterzogen. Mithilfe dieser Methode ist es möglich, Rückschlüsse auf die genaue Lokalisation der Konstrukte innerhalb der Zelle zu ziehen. Zunächst wurde eine *LIVE*-Färbung (ohne Permeabilisierung der Zellen) durchgeführt, um die Proteine an der Membranoberfläche zu visualisieren (Abb. 13). Die Zellkerne wurden mit DAPI, der extrazelluläre N-Terminus der Glycinrezeptorvarianten mit einem GlyR $\alpha 1$ -spezifischen Antikörper und die myc-Epitope der *tails* sowie des hier verwendeten myc-GlyR β mit c-Myc gefärbt. Man erkennt in keiner der Konditionen eine Färbung des myc-Epitops. Das bedeutet, dass das N-terminale lokalisierte intrazelluläre myc-Epitop der *tail*-Konstrukte an der Membranoberfläche nicht zugänglich für den Antikörper war. Gleichzeitig sieht man bei der Färbung des GlyR $\alpha 1$ ein spezifisches Signal in jenen Zellen, die mit wt GlyR $\alpha 1$, $\alpha 1$ -trc alleine oder in Kombination mit den *tail*-Konstrukten transfiziert wurden. Anhand dieser Färbung lässt sich allerdings nicht unterscheiden, ob in den kotransfizierten Zellen ein komplementierter GlyR oder $\alpha 1$ -trc alleine detektiert wurde. Der Verlust des myc-Signals der *tail*-Konstrukte bedeutet, dass diese sich korrekt in die Plasmamembran integriert haben müssen. Diese Aussage wurde an permeabilisierten Zellen überprüft, die das intrazellulär gelegene myc-Epitop zugänglich machen (Abb. 14). In dieser Abbildung sieht man anhand der positiven myc-Färbung, dass alle Komplementationskonstrukte exprimiert wurden.

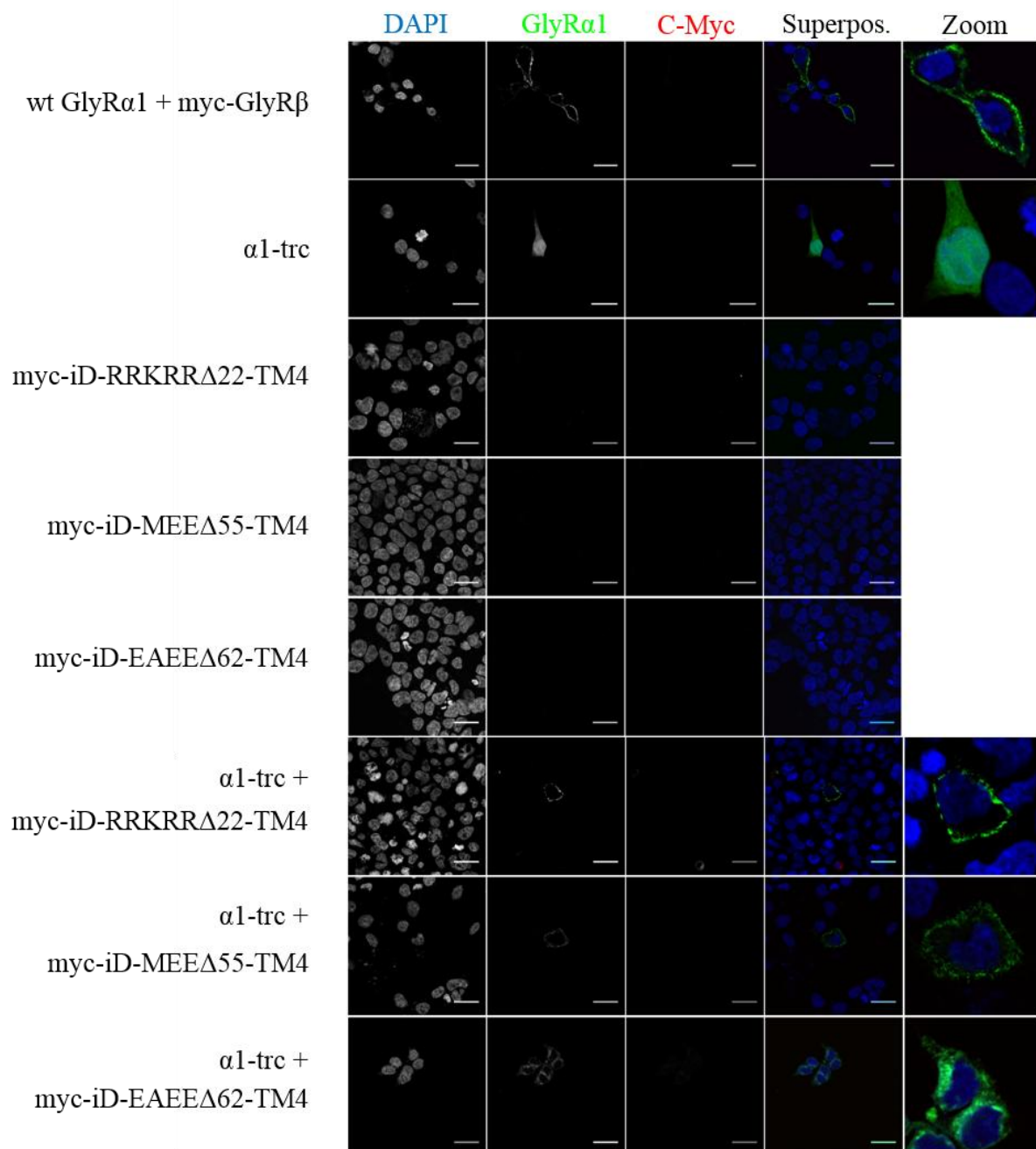


Abbildung 13. Immunzytochemische LIVE-Färbung (ko-) transfizierter *tail*-Konstrukte

LIVE-Färbung transfizierter HEK293-Zellen. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit DAPI (Zellkerne), GlyR α 1 und c-Myc gefärbt. Alle Zellen wurden erfolgreich mit DAPI gefärbt. Der GlyR α 1-Antikörper färbte nur Zellen, die mit wt GlyR α 1 oder α 1-trc (allein oder mit *tails*) transfiziert wurden. Der c-Myc-Antikörper erkannte in keiner Kondition das Zielepitop. Erklärung siehe Text. Superpos., Überlagerung der einzelnen Kanäle (Superposition); Zoom, Vergrößerung der GlyR α 1-gefärbten Zellen. Weiße Balken entsprechen 50 μ m.

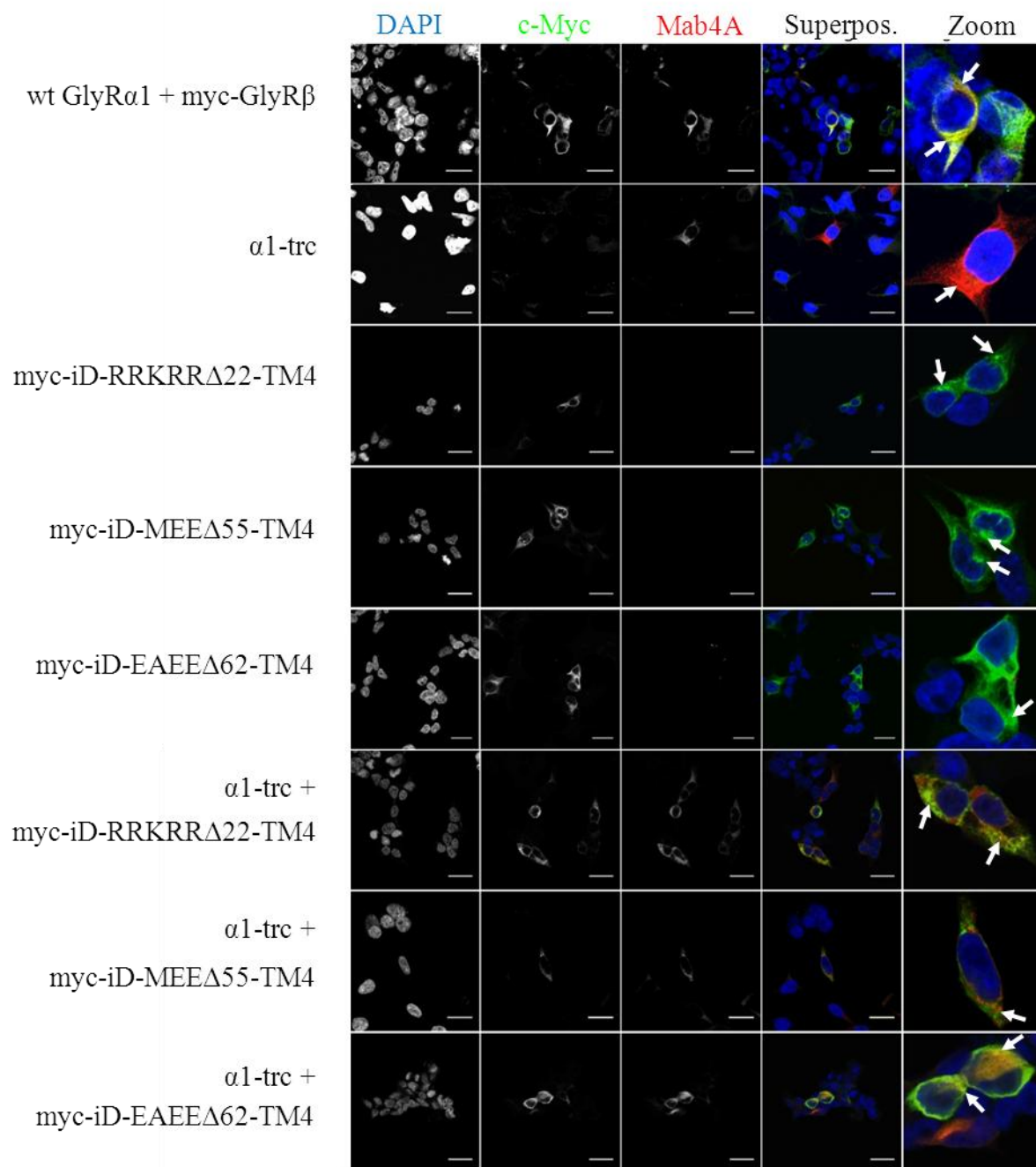


Abbildung 14. Immunzytochemische Färbung (ko-)transfizierter *tail*-Konstrukte nach Permeabilisierung

Färbung transfizierter HEK293-Zellen. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 0.1% Triton-X100 permeabilisiert und mit DAPI (Zellkerne), c-Myc und mab4A gefärbt. Der Pan-GlyR α -Antikörper mab4A färbte Zellen, die mit wt GlyR α 1 oder α 1-trc (allein oder mit *tails*) transfiziert wurden. Der c-Myc-Antikörper erkannte in allen Konditionen das Zielepitop. Weiße Pfeile deuten auf die Lokalisation der myc-Signale hin. Erklärung siehe Text. Superpos., Überlagerung der einzelnen Kanäle (Superposition); Zoom, Vergrößerung der mab4A-gefärbten Zellen. Weiße Balken entsprechen 50 μ m.

Die erfolgreiche intrazelluläre myc-Färbung des GlyR β zeigt in Kombination mit der fehlenden Färbung von α 1-trc (unspezifisches Signal), dass der c-Myc-Antikörper spezifisch

sein Epitop erkennt. Weiterhin ist eine Kolokalisation zwischen GlyR α 1- und GlyR β -Signal im Randbereich der transfizierten Zellen zu erkennen (weiße Pfeile). Das mab4A-Signal in α 1-trc-transfizierten Zellen zeigt eine gleichmäßige zytosolische Verteilung. Im Gegensatz dazu wurde das myc-Signal in den Zellen, die mit den Komplementationskonstrukten alleine transfiziert wurden, akkumuliert im ER detektiert (weiße Pfeile markieren die Akkumulationen). Nach der Kotransfektion mit α 1-trc wurde hingegen eine Kolokalisation zwischen myc- und mab4A-Signal detektiert (weiße Pfeile deuten auf membran-nahe Kolokalisationssignale), die mit der Färbung von GlyR α 1- und GlyR β zu vergleichen ist. Die Kolokalisation zwischen c-Myc und mab4A deutet auf eine Translokation von α 1-trc und dem jeweiligen *tail*-Konstrukt in Richtung der Zellmembran hin.

3.1.4. Elektrophysiologische Charakterisierung der Komplementationskonstrukte

Nachdem durch proteinbiochemische Methoden die Anwesenheit verkürzter *tail*-Konstrukte an der Zellmembran von HEK293-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde die Funktionalität der Komplementationskonstrukte elektrophysiologisch untersucht (Abb. 15). Dafür wurden HEK293-Zellen mit α 1-trc und den verschiedenen *tail*-Konstrukten im Verhältnis 1:2 (α 1-trc : *tail*) transfiziert und 48 h später Ganzzell-Ableitungen durchgeführt. Das Konstrukt myc-iD-K407A-TM4 wurde generiert, um die Rolle der erwähnten zytoplasmatischen Portale zu untersuchen, an deren Ausbildung K407 beteiligt sein soll (Carland et al., 2009). Unabhängig von der Bedeutung bestimmter Bereiche des TM3-4 Loops für die *in vitro*-Komplementation trunkierter GlyRs wurde die Relevanz der poly-N-Sequenz N394-397 in Abhängigkeit von der Anwesenheit der alternativen Spleißkassette (ASS) ³⁵⁴SPMLNLFQ³⁶¹ mit den Volllängenkonstrukten Δ N394-397+ASS, Δ N394-397-ASS, N394-397A untersucht. Die Glycin-induzierten (1 mM) Chloridströme sind der nachfolgenden Abbildung zu entnehmen.

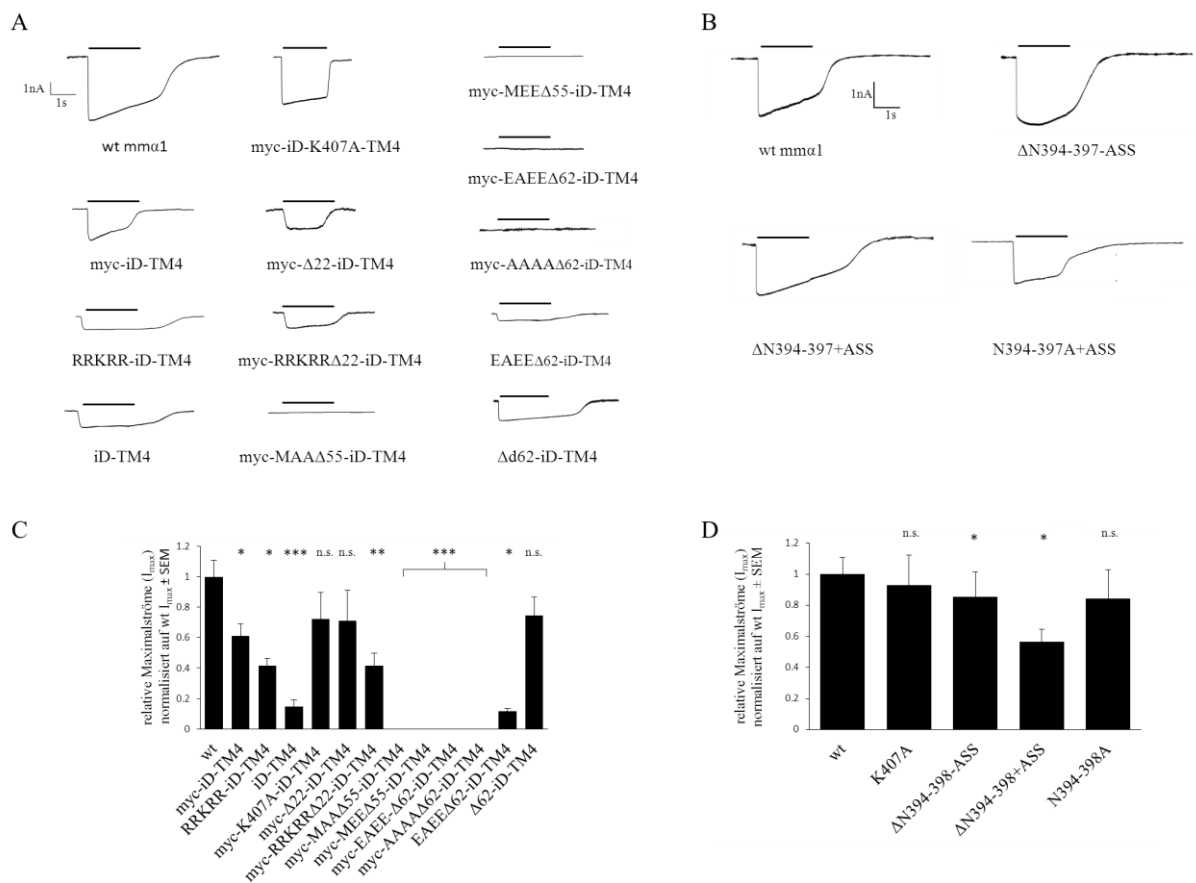


Abbildung 15. Elektrophysiologische Charakterisierung der Komplementationskonstrukte

A: Repräsentative Stromantworten kotransfizierter Komplementationskonstrukte auf die Applikation von 1 mM Glycin. Schwarze Balken deuten die Applikationszeit von 2 s an. Die Mittelwerte aus 3 verschiedenen Messungen sind in (C) auf die Reaktion des wt GlyR normiert und quantifiziert. B: Repräsentative Stromantworten verschiedener Vollängen -GlyR-Varianten. Die Mittelwerte hiervon sind in (D) quantifiziert. n.s., nicht signifikant; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ANOVA.

Nach der separaten Transfektion von $\alpha 1$ -trc oder der verschiedenen Komplementationskonstrukte konnten nach der Applikation von 1 mM Glycin keine Ströme gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Nach der Koexpression von $\alpha 1$ -trc mit dem Vollängen-Komplementationskonstrukt myc-iD-TM4 wurde die Funktionalität des verkürzten Rezeptors zu 61% wiederhergestellt (Tab. 17). Bei der Koexpression mit dem um 22 Aminosäuren verkürzten *tail*-Konstrukt myc- $\Delta 22$ -iD-TM4 wurden ähnliche Maximalströme gemessen (71% von wt). Diese Werte sind statistisch nicht signifikant verschieden ($p = 0,6$; ANOVA). Nach Anheftung des basischen Motivs an dieses verkürzte Konstrukt (myc-RRKRR $\Delta 22$ -iD-TM4) wurden 41% der Maximalströme wiederhergestellt. Dieser Wert unterscheidet sich signifikant von der Komplementationspotenz des Vollängen-*tails* ($p = 0,01$; ANOVA), was auf einen repulsiven Effekt beider positiven Ladungsmotive

hindeutet. Ebenso sinkt die maximale Stromantwort nach der Entfernung des myc-Epitops und Anheftung des positiven Ladungsmotives an das Volllängen-*tail* (RRKRR-iD-TM4) von 61% auf 41%, was ein weiterer Hinweis auf einen abstoßenden Effekt beider Domänen ist. Nach Anheftung negativ geladener Aminosäuren an die in Unterer et al., 2012 funktionslosen *rescue-tails* myc- Δ 55-iD-TM4 und myc- Δ 62-iD-TM4 (myc-MEE Δ 55-iD-TM4 und myc-EAEE Δ 62-iD-TM4) konnte die Funktion des trunkierten Rezeptors ebenfalls nicht wiederhergestellt werden. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass unterschiedliche Ladungen keinen signifikanten Einfluss auf die Komplementationspotenz dieser Konstrukte haben. Alanine am N-Terminus dieser Konstrukte zeigten ebenfalls keinen steigenden Effekt auf die gemessenen Maximalströme dieser kotransfizierten *tails* (myc-MAA Δ 55-iD-TM4 und myc-AAAA Δ 62-iD-TM4). Nach Entfernung des myc-Epitops vom Δ 62-Konstrukt (EAEE- Δ 62-iD-TM4) wurden 11% der Maximalströme zurückgewonnen. Im Gegensatz dazu zeigte jedoch das Volllängen-*tail* mit N-terminalem myc-Epitop (myc-iD-TM4) eine deutlich höhere Effizienz zur funktionellen Komplementation als dasselbe Konstrukt ohne myc ($p < 0,0001$; ANOVA). Nach Entfernung des negativ geladenen Motivs (Δ 62-iD-TM4) wurden interessanterweise 75% der Ströme wiederhergestellt, obwohl bei der Komplementation durch dieses *tail* sowohl der C-Terminus von α 1-trc als auch der N-Terminus von Δ 62-iD-TM4 überwiegend aus positiv geladenen Aminosäureresten bestehen. Unter allen untersuchten *rescue-tails* hat Δ 62-iD-TM4 die Funktion von α 1-trc am effizientesten komplementiert (Tab. 17). Der Aminosäureaustausch K407A im Volllängen-*tail* (myc-K407A-iD-TM4) hatte hingegen keinen Einfluss auf die Fähigkeit von myc-iD-TM4 die Rezeptorfunktion wiederherzustellen.

exprimierte Konstrukte	Anzahl gemessener Zellen (n)	I_{\max} [nA] \pm SEM	normalisierter I_{\max} [% von wt mmα1 im selben Experiment]
wt mm α 1	84	2,69 \pm 0,19	100%
<u><i>rescue</i>-Konstrukte:</u>			
myc-iD-TM4	34	1,91 \pm 0,24	61%
RRKRR-iD-TM4	20	1,23 \pm 0,15	41%
iD-TM4	17	0,44 \pm 0,13	15%
myc-K407A-iD-TM4	12	1,96 \pm 0,48	72%

myc-Δ22-iD-TM4	6	1,76 ± 0,49	71%
myc-RRKRRΔ22-iD-TM4	13	0,99 ± 0,19	42%
myc-MAAΔ55-iD-TM4	7	0 ± 0	0%
myc-MEEΔ55-iD-TM4	16	0 ± 0	0%
myc-EAEEΔ62-iD-TM4	10	0 ± 0	0%
myc-AAAAΔ62-iD-TM4	10	0 ± 0	0%
EAEEΔ62-iD-TM4	9	0,30 ± 0,05	11%
Δ62-iD-TM4	17	1,42 ± 0,23	75%
<u>GlyR-Konstrukte:</u>			
K407A	23	2,31 ± 0,48	93%
ΔN394-397+ASS	14	1,82 ± 0,26	56%
ΔN394-397-ASS	16	2,76 ± 0,51	86%
N394-397A	12	1,80 ± 0,40	84%

Tabelle 17. Maximale Stromantworten (I_{\max}) trunkierter Komplementationskonstrukte

Unter den Mutationen im Volllängen- GlyR α 1 hatte die Deletion von N394-397 den einzigen signifikanten Effekt auf die Glycin-induzierten Maximalströme ($p_{\Delta N394-397+ASS}=0,02$; $p_{\Delta N394-397-ASS}=0,04$; $\alpha=0,05$). Dabei unterschieden sich die Ströme beider Konstrukte nicht signifikant voneinander ($p=0,14$; ANOVA;), was den Einfluss der alternativen Spleißkassette ³⁵⁴SPMLNLFQ³⁶¹ auf die Maximalströme ausschließt.

3.2. Transgene Mäuse: Funktionelle *in vivo* Komplementation

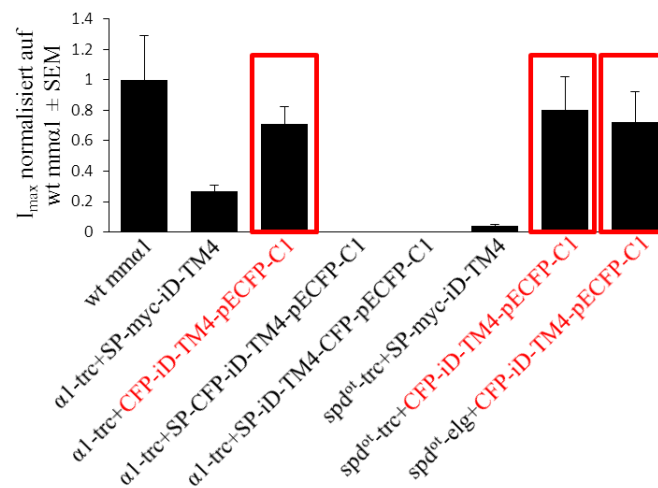
3.2.1. Untersuchung der Komplementationseffizienz verschiedener Konstrukte

Wie im vergangenen Kapitel erläutert, ist es möglich in Zellkulturen die Funktion verkürzter GlyR-Varianten wiederherzustellen. Voraussetzung für die funktionelle Komplementation scheint dabei die Expression eines sich selbst faltenden *tail*-Konstrukts zu sein, dass über eine bisher unbekannte Art der Proteininteraktion den Kontakt zum verkürzten GlyR im Bereich des TM3-4 Loops herstellt und auf diese Weise einen funktionsfähigen GlyR ausbildet. Ist jedoch eine Komplementation funktionsloser trunkierter Proteine auch *in vivo* möglich?

Ausgangspunkt für die Übertragung der Erkenntnisse der *in vitro* Komplementation ist das *oscillator*-Mausmodell. Die *frameshift*-Mutation in *Gla1* führt in dieser Mausmutante zum völligen Funktionsverlust des GlyR α 1 und zum Tod homozygoter Mutationsträger 3 Wochen nach der Geburt. Auf Proteinebene zeigt sich ein vollständiger Verlust des GlyR α 1-Proteins im Rückenmark (Kling et al., 1997). Der Zeitpunkt des Todes dieser Tiere korreliert dabei mit der verstärkten Expression der adulten GlyR α β -Isoform im Rückenmark (Becker et al., 1988, Malosio et al., 1991b). Für eine erfolgreiche *in vivo* Komplementation ist also der Zeitpunkt der Expression des Rettungskonstrukts von entscheidender Bedeutung.

Als Basis für die Generierung eines geeigneten Rettungskonstrukts diente das bereits charakterisierte *rescue tail* (myc)-iD-TM4. Es wurde demonstriert, dass dieses Konstrukt die Fähigkeit besitzt in transfizierten HEK293-Zellen ca. 10% der Glycin-induzierten Maximaleinwärtsströme über den *oscillator*-GlyR $\text{spd}^{\text{ot/ot}}$ -trc wiederherzustellen (Villmann et al., 2009a). In derselben Studie wurde überdies gezeigt, dass durch die Infektion von Rückenmarksneuronenkulturen mit rekombinanten Adeno-assoziierten Viren (rAAVs), die Expression des GlyR α 1 wiederhergestellt wird. Auf der Suche nach einem möglichst effektiven Rettungskonstrukt wurden deshalb zunächst verschiedene Varianten des *tail*-Konstrukts iD-TM4 in HEK293-Zellen zusammen mit den trunkierten GlyR α 1-Varianten α 1-trc, spd^{ot} -trc und spd^{ot} -elg exprimiert und auf ihre Komplementationspotenz elektrophysiologisch untersucht (Abb. 16).

A



B

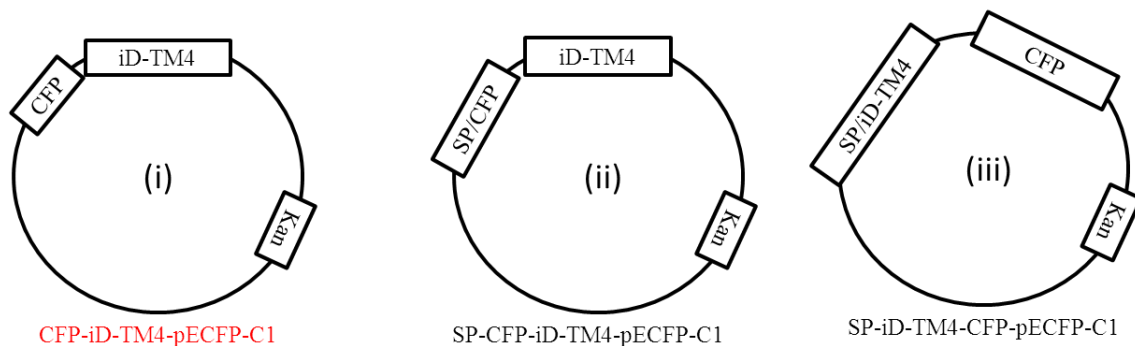


Abbildung 16. Untersuchung verschiedener spd^{ot} -Komplementationskonstrukte

A: Quantifizierung der Komplementation von $\alpha 1$ -trc, spd^{ot} -trc und spd^{ot} -elg durch die in (B) aufgeführten Rettungskonstrukte CFP-iD-TM4-pECFP-C1, SP-CFP-iD-TM4-pECFP-C1 und SP-iD-TM4-CFP-pECFP-C1. Das effektivste Konstrukt ist in (A, B) rot markiert. Erklärung siehe Text.

Es wurden drei unterschiedliche Varianten des iD-TM4-Konstrukts im Expressionsvektor pECFP-C1 auf die Komplementationspotenz untersucht: (i) CFP-iD-TM4-pECFP-C1, (ii) SP-CFP-iD-TM4-pECFP-C1 und (iii) SP-iD-TM4-CFP-pECFP-C1. Diese unterschieden sich untereinander in der Lage der CFP-Sequenz (*cyan fluorescent protein*, cyanblaues Fluoreszenzprotein) und der Signalpeptidsequenz (SP) in Relation zu iD-TM4 innerhalb des Vektors (Abb. 16B). Diese Konstrukte wurden in Kombination mit den oben genannten GlyR-Varianten in HEK293-Zellen transfiziert und 48 h später Ganzzellaufgaben durchgeführt.

Während nach der alleinigen Transfektion von $\alpha 1$ -trc und spd^{ot} -trc keine Glycin-induzierten Chloridströme gemessen wurden (Daten nicht gezeigt), konnte nach der Kotransfektion mit CFP-iD-TM4-pECFP-C1 die Rezeptorfunktion nahezu vollständig wiederhergestellt werden. Mit $71\% \pm 12\%$ der zurückgewonnenen Maximalströme war das Konstrukt (i) dabei ca.

dreimal effektiver als das herkömmliche Konstrukt myc-iD-TM4 ($26\% \pm 4\%$). Darüber hinaus lag die Effizienz bei der Komplementierung des $\text{spd}^{\text{ot}}\text{-trc}$ bei $80\% \pm 22\%$ im Vergleich zu $4\% \pm 1\%$ durch die Kotransfektion von myc-iD-TM4. Selbst die Funktion von $\text{spd}^{\text{ot}}\text{-elg}$ konnte durch Kotransfektion von Konstrukt (i) zu $73\% \pm 20\%$ komplementiert werden. Die Funktion der langen Spleißvariante $\text{spd}^{\text{ot}}\text{-elg}$ konnte durch myc-iD-TM4 nicht wiederhergestellt werden (Villmann et al., 2009a). Die anderen getesteten Konstrukte (ii) und (iii) hatten keinen Einfluss auf die Rezeptorkomplementation (Abb. 16). Interessanterweise ist der einzige Unterschied zwischen (i) und (ii) die Anwesenheit der Signalpeptidsequenz (28 Aminosäuren lang) in (ii).

Als *in vivo* Komplementationskonstrukt wurde aufgrund der erhöhten Effizienz gegenüber dem Ausgangskonstrukt myc-iD-TM4 das Konstrukt CFP-iD-TM4-pECFP-C1 ausgewählt (Abb. 8). In der Arbeitsgruppe von C. Gross wurde dieses Konstrukt anschließend in ein BAC (*bacterial artificial chromosome*) integriert. Zur Erzeugung der transgenen Mauslinie *Glal-Ex9* wurde das BAC-Konstrukt über Pronukleusinjektion in Vorkerne befruchteter Eizellen der Linie C57/Bl6 eingebracht. Als Promotor wurde der Glycinrezeptorpromotor gewählt, welcher eine starke konstitutive Expression des Transgens in Neuronen des Rückenmarks und des Hirnstamms ab dem Entwicklungstag P6 steuert. Auf diese Weise wurden 5 männliche transgene Mäuse (sogenannte *Founder*, Linienbegründer) generiert, welche für den Linienaufbau (Zucht) und anschließend zur Verpaarung mit heterozygoten *oscillator*-Mäusen verwendet wurden. Zur Untersuchung der Komplementationsfähigkeit des Transgens wurden nach Feststellung des Genotyps heterozygoter *oscillator*-Mäuse, die Träger des Transgens waren ($\text{spd}^{\text{ot}/+}\text{tg+}$), untereinander verpaart, um transgene homozygote $\text{spd}^{\text{ot}/\text{ot}}$ zu erhalten ($\text{spd}^{\text{ot}/\text{ot}}\text{tg+}$).

Zum Zweck der Erhaltungszucht sowie zur gezielten Etablierung der transgenen *oscillator*-Linie wurde von jeder neugeborenen Maus der Genotyp festgestellt. Hierfür wurde die genomische DNA aus Schwanzgewebe isoliert und mittels PCR die Anwesenheit des Transgens bestimmt. Bei Vorhandensein der transgenen DNA wurde nach der anschließenden Gelelektrophorese eine spezifische Bande von 513 bp (Abb. 17) sichtbar. Zusätzlich wurden die PCR-Produkte einmalig aus dem Gel isoliert und mittels Sequenzierung die Anwesenheit der transgenen DNA sichergestellt. Der Nachweis der *oscillator*-DNA wurde ebenfalls mittels PCR festgestellt. Um den durch die Mikrodeletion entstandenen Verlust von 7 bp detektieren zu können, wurde das PCR-Produkt auf ein 9% PAA-Gel aufgetragen. Hier ergab sich für den

Wildtyp eine Bande von 194 bp und für $spd^{ot/ot}$ eine Bande von 187 bp (Abb. 17). Bei heterozygoten Tieren wurden beide Banden nachgewiesen.

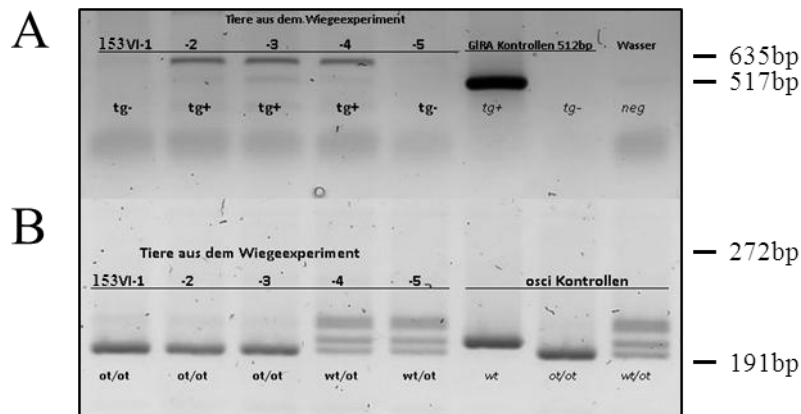


Abbildung 17. Genotypisierungen

Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. Dabei ergab sich für Träger des Transgens (tg+) eine spezifische Bande bei 513 bp (A). Beim Nachweis des *oscillator*-Allels ergab sich für den Wildtyp eine Bande von 194 bp während diese bei $spd^{ot/ot}$ auf einer Höhe von 187 bp verlief (B). Als PCR-Matrize diente bei den hier durchgeführten Experimenten die genomische DNA der Tiere 1-5 der Linie $spd^{ot/+}$ (153-VI). Als Positivkontrolle wurde die genomische DNA des in der Gruppe von C. Gross entwickelten transgenen *Founders* I genutzt. Als Negativkontrolle wurden bei der PCR die DNA eines Wildtyps bzw. dH_2O eingesetzt. Aus beiden PCRs lassen sich folgende Genotypen ableiten: 153VI-1: $spd^{ot/ot}tg^-$; 153VI-2: $spd^{ot/ot}tg^+$; 153VI-3: $spd^{ot/ot}tg^+$; 153VI-4: $spd^{ot/+}tg^+$ und 153VI-5: $spd^{ot/+}tg^-$.

3.2.2. Detektion des transgenen Proteins

Nach der erfolgreichen Detektion der transgenen DNA im Genom der *Founder* I-V sollte im nächsten Schritt das Translationsprodukt (Protein) in Proben des Rückenmarks untersucht werden. Hierfür wurde eine Membranproteinpräparation aus frischem Gewebe durchgeführt und die Proben mittel SDS-PAGE und Western-Blot untersucht. Die Detektion des transgenen Proteins erfolgte dabei über Färbung mit einem GFP-Antikörper. Die Sequenz von GFP unterscheidet sich von dem im Komplementationskonstrukt enthaltenen eCFPs nur durch den Austausch einzelner Aminosäuren. Aus diesem Grund bindet der GFP-Antikörper neben GFP auch CFP. Wie in der nachfolgenden Abbildung zu erkennen ist, wurde in keinem der untersuchten Gewebe das CFP-Protein (30 kDa) detektiert. Bei der Positivkontrolle aus GFP-transfizierten HEK293-Zelllysaten konnte hingegen eine deutliche Bande mit der entsprechenden Molekülmasse visualisiert werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die transgene DNA zwar vorhanden ist, aber nicht zur Bildung des transgenen Komplementationsproteins führt. Es ist jedoch möglich, dass das gebildete transgene Protein

in solch geringer Menge produziert wurde, dass es mit den hier angewendeten Methoden nicht detektierbar war.

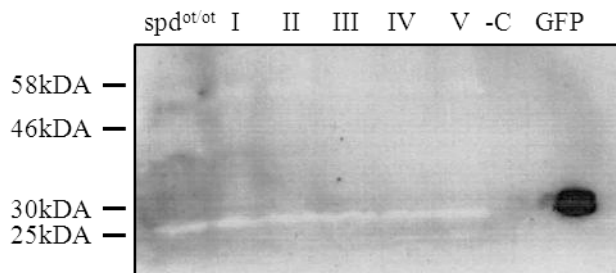


Abbildung 18. Detektion des transgenen Proteins im Western-Blot

Membranproteinproben aus dem Rückenmark der *Founder* I-V wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot ihrer Molekülmasse nach aufgetrennt und mit einem polyklonalen GFP-Antikörper detektiert. Als Positivkontrolle diente das Lysat aus GFP-transfizierten HEK293-Zellen (GFP), als Negativkontrolle die Membranproteine aus dem Rückenmark von $spd^{ot/ot}$ sowie eine negative Ladekontrolle (-C). Während bei GFP eine Bande von 30 kDa detektiert wurde, konnte in allen anderen Konditionen kein Protein der entsprechenden Masse detektiert werden.

3.2.3. *In vivo* Komplementation des *oscillator*-Phänotyps

Zur Untersuchung der Komplementationsfähigkeit des funktionslosen *oscillator*-GlyR wurde die transgene Mauslinie mit $spd^{ot/+}$ gekreuzt. Nach drei Generationen wurden dann die Nachkommen dieser Linie untereinander verpaart um Tiere des Genotyps $spd^{ot/ot}tg+$ zu erhalten. Diesen Tieren wurde kurz nach der Geburt (Ohr-) Biopsien entnommen und der Genotyp bestimmt. Ab Tag 10 nach der Geburt wurden alle Tiere eines Wurfs alle zwei Tage gewogen und auf Hyperekplexie-Symptome untersucht (Abb. 19). Da $spd^{ot/ot}$ Tiere 19-21 Tage nach der Geburt sterben, wurde bei einer erfolgreichen *in vivo* Komplementation davon ausgegangen, dass $spd^{ot/ot}tg+$ Tiere eine längere Lebensspanne aufweisen, als Wurfgeschwister, die ebenfalls homozygot das *oscillator*-Allel aufweisen aber kein Transgen exprimieren.

Wie in der folgenden Abbildung 19 zu sehen ist, hatte das Transgen keinen Einfluss auf die Überlebensspanne von $spd^{ot/ot}$. Tier 1 starb bereits an Tag 13 nach der Geburt vermutlich an den Folgen einer mangelnden Versorgung durch das Muttertier. Dieses Tier zeigte ein deutlich reduziertes Körpergewicht von 2,6 g im Vergleich zu 7,8 g-8,4 g bei den Wurfgeschwistern. Die Tiere 2 und 3, ebenfalls homozygote *oscillator*-Mäuse, starben an Tag 17 und 19 nach der Geburt. Bei ihnen wurde ab Tag 14 ein erhöhter Muskeltonus und das für einen neuromotorischen Phänotyp typische Verkrampfen der Hinterextremitäten beobachtet.

Außerdem konnte bei diesen Tieren ab Tag 14 ein Gewichtsverlust festgestellt werden. Die Anwesenheit der transgenen DNA führte bei diesen Tieren nicht zu einer verlängerten Lebensspanne. Die Tiere 4 und 5, heterozygote *oscillator*-Mäuse, überlebten hingegen den gesamten Zeitraum des Experiments. Hier ließ sich eine konstante Zunahme des Körpergewichts messen. Der Vergleich von Tier 4 und 5 verdeutlicht, dass die Anwesenheit der transgenen DNA in Tier 4 keinen negativen Einfluss auf das Überleben der Maus hatte. Zusammen mit der fehlenden Detektierbarkeit des Proteins in der transgenen Mauslinie lässt sich schlussfolgern, dass durch die fehlende Bildung des Komplementationsproteins (iD-TM4) keine Interaktion mit dem verkürzten *oscillator*-GlyR stattfinden kann und die Ergebnisse aus der *in vitro* Komplementation nicht *in vivo* übertragbar sind.

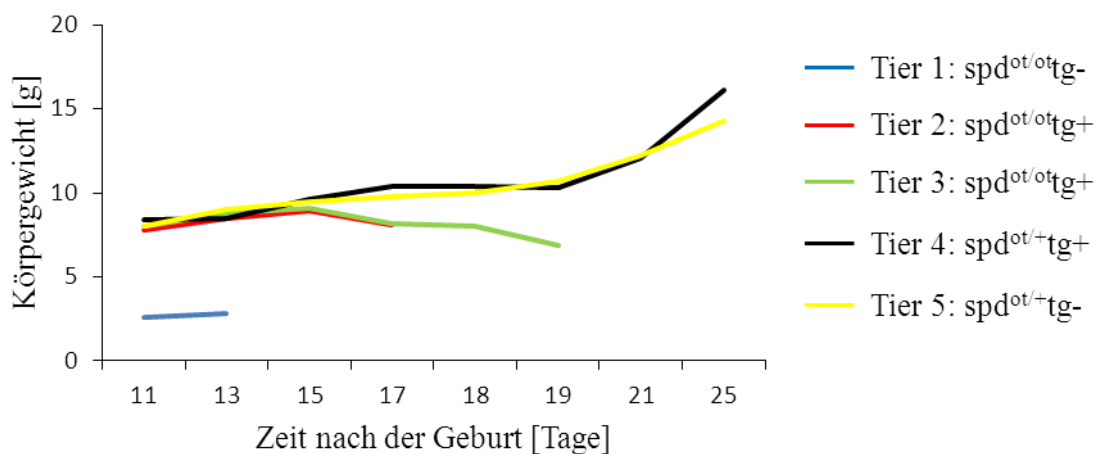


Abbildung 19. Gewichtskontrolle transgener *oscillator*-Mäuse

Dargestellt ist das Körpergewicht von 5 Wurfgeschwistern der Linie $spd^{ot}tg^+$. Tier 1-3 wurden als homozygote, Tier 4 und 5 als heterozygote Mutationsträger identifiziert. Das Transgen wurde bei den Tieren 2, 3 und 4 nachgewiesen (siehe Abb. 17). Nach Ende des Experiments (Tag 25 nach der Geburt) hatten nur heterozygote *oscillator*-Mäuse überlebt. Die Anwesenheit der transgenen DNA hatte keinen lebensverlängernden Effekt auf das Überleben von $spd^{ot/ot}$.

3.3. Einfluss der Länge des TM3-4 Loops auf die Rezeptorfunktion

Anhand der Kristallstrukturen der CLR's lässt sich unter den einzelnen Mitgliedern der Superfamilie ein hohes Maß an Sequenz- und Strukturhomologie im Bereich der ECD und TMD ableiten (Brejc et al., 2001, Moraga-Cid et al., 2015). Im Gegensatz dazu ist über die Struktur des TM3-4 Loops der CLR wenig bekannt. Es wurde jedoch demonstriert, dass die Bereiche in unmittelbarer Nähe der TM3 und TM4 beim nAChR und 5-HT_{3A}R an der

Ausbildung helikaler Strukturen beteiligt sind (Unwin, 2005, Hassaine et al., 2014). Diese helikalen Bereiche werden auch für den humanen GlyR α 1 vorausgesagt und umfassen die multifunktionellen basischen Motive ³¹⁶RFRRKRR³²² und ³⁸⁵KKIDK³⁹⁰ (Burgos et al., 2015).

Bis zur Entdeckung homologer Proteine in Prokaryoten ist man davon ausgegangen, dass CLRs nur in vielzelligen Lebewesen (*Metazoa*) existieren (Tasneem et al., 2005). Diese prokaryotischen Rezeptoren (ELIC und GLIC) weisen ebenfalls eine starke Ähnlichkeit zu den ECDs und TMDs der CLRs auf (Hilf and Dutzler, 2008, Bocquet et al., 2009, Hilf and Dutzler, 2009a). Ein anderer wichtiger Unterschied sind die mit weniger als 17 Aminosäuren sehr kurzen ICDs beider Rezeptoren verglichen mit über 70 Aminosäuren bei den CLRs (Baptista-Hon et al., 2013). Aufgrund dieses wesentlichen Unterschieds eignen sich chimäre CLRs, die anstatt der großen ICD einen kurzen, prokaryotischen TM3-4 Loop beinhalten, als Modellsysteme zur Untersuchung des Einflusses des TM3-4 Loops auf die Rezeptorfunktion. Studien am GABA ρ 1-Rezeptor und 5-HT_{3A}-Rezeptor belegen, dass der Austausch des TM3-4 Loops durch den korrespondierenden Bereich in GLIC (SQPARAA) die Funktion dieser Ionenkanäle nicht beeinträchtigt (Jansen et al., 2008). Um Erkenntnisse über die Funktion des TM3-4 Loops des humanen GlyR α 1 zu gewinnen wurde in den nun folgenden Experimenten das Heptapeptid SQPARAA an verschiedenen Positionen des TM3-4 Loops eingesetzt und der Einfluss der Länge des Loops in Abhängigkeit von der Anwesenheit der beiden basischen Motive auf die Biogenese, Expression und Funktion des chimären GlyR α 1 analysiert.

3.3.1. Generierung verschiedener chimärer Glycinrezeptoren

Der TM3-4 Loop des humanen GlyR α 1 besteht aus 92 Aminosäuren, der des Protonengesteuerten Ionenkanals aus *Gloeobacter violaceus* (GLIC) umfasst hingegen nur die 7 Aminosäuren SQPARAA. Die Kristallstruktur des GlyR α 1 des Zebrafischs (*Danio rerio*) lässt erkennen, dass die letzten 15 Aminosäuren K377-R391 (K378-R392 in *homo sapiens* GlyR α 1) als helikale, zytoplasmatische Erweiterung des vierten Transmembransegments anzusehen sind (Du et al., 2015). Um den Einfluss der Länge des TM3-4 Loops auf die Rezeptorfunktion zu untersuchen, wurde das Konstrukt GlyR α 1-GLIC entworfen (Abb. 20C,D). GlyR α 1-GLIC stellt einen chimären GlyR dar, bei welchem die 92 Aminosäuren R309-R400 entfernt und durch die ICD von GLIC ersetzt wurden. Aufgrund der bereits beschriebenen Bedeutsamkeit der basischen Motive am N- und C-Terminus des TM3-4 Loops, wurde ein zweites Konstrukt generiert, bei welchem der GLIC-Loop zwischen die basischen Motive ³¹⁸RRKRR und ³⁸⁵KKIDK eingesetzt wurde (GlyR α 1-GLIC(+)_{bm}). Beim

dritten Konstrukt GlyR α 1- Δ TM3-4(+)*bm* wurden die beiden basischen Motive ohne Insertion des GLIC-Loops direkt miteinander verbunden. Auf diese Weise entstanden drei GlyR-Varianten mit stark verkürzter ICD, anhand deren Funktion Rückschlüsse auf (i) die Bedeutung der Länge des TM3-4 Loops und (ii) die Relevanz der Anwesenheit der basischen Motive auf die Expression und Funktionalität des GlyR α 1 gezogen werden konnten.

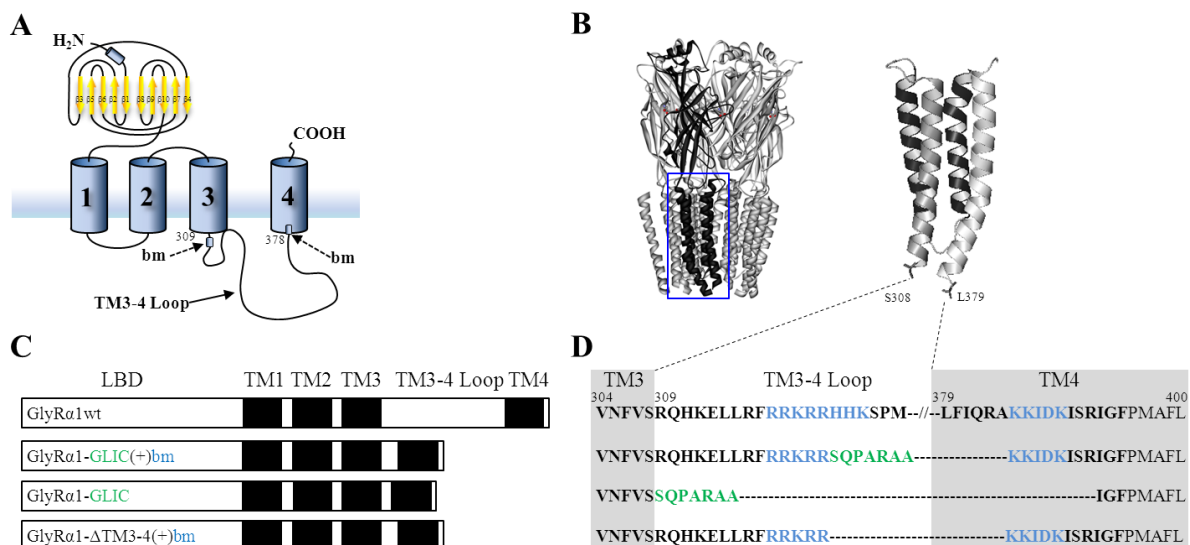


Abbildung 20. Schematische Darstellung der Generierung chimärer GlyR-Varianten

A: Darstellung einer GlyR α 1-Untereinheit. Die Transmembransegmente 3 und 4 (blaue Zylinder) sind durch den TM3-4 Loop miteinander verbunden. An beiden Enden befinden sich basische Motive (bm), die als multifunktionale Domäne betrachtet werden. B: Kristallstruktur des pentameren GlyR α 1 aus *Danio rerio* neben der Darstellung der TMs einer einzelnen Untereinheit. Die Struktur wurde nach Du et al., 2015 modifiziert (PDB-ID:3JAD). C: Schematische Darstellung der in diesem Teilprojekt der Arbeit untersuchten GlyR α 1-Konstrukte. Die Transmembransegmente (TM1-TM4) sind durch schwarze Rechtecke dargestellt. Die Sequenz der abgebildeten Konstrukte ist in (D) zu erkennen. Blau markierte Aminosäuren markieren die basischen Motive, grüne Aminosäuren die ICD von GLIC. Zur Vereinfachung sind die Aminosäuren L329-K378 der Wildtyp-Sequenz ausgespart (//). Die Bereiche, von denen angenommen wird, dass sie zu den Transmembrandomänen gehören, sind grau hinterlegt. Die Nummerierung der Aminosäuren richtet sich nach dem reifen Protein.

3.3.2. Expression chimärer GlyR-Varianten

Die chimären GlyRs (Abb. 20C,D) wurden in HEK293-Zellen exprimiert und mit dem GlyR α 1-spezifischen Antikörper mab2b N-terminal detektiert (Aminosäuren 1-10 des reifen Proteins) sowie mit dem Pan-GlyR-Antikörper mab4A, welcher an fixierte Epitope bindet, permeabilisierte Zellen angefärbt (Abb. 21B,C). Zunächst wurde durch die Kotransfektion mit GFP überprüft, ob die Transfektion der verschiedenen GlyR-Chimären die Transfektionseffizienz beeinflusst. In Abbildung 21A erkennt man, dass alle Konstrukte ähnliche Expressionsmuster aufweisen: Die Anzahl GFP-positiver Zellen sowie die

Kolokalisation zwischen GFP und dem jeweiligen Konstrukt (hier roter Kanal) ist in allen Konditionen ähnlich. Das bedeutet, dass es keine Unterschiede in der Transfektionseffizienz zwischen den unterschiedlichen Konstrukten gibt. Anhand der Färbung permeabilisierter Zellen (Abb. 21B) lässt sich erkennen, dass zwischen den Konstrukten kein Unterschied in der zytosolischen Expression existiert: Die Signalintensität- und Häufigkeit des mab4A-Antikörpers ist in jeder Kondition gleich. Bei der Betrachtung der Expression der GlyR-Chimären an der Zelloberfläche (Abb. 21C) fällt jedoch ein wesentlicher Unterschied auf: Während der wt GlyR α 1 spezifisch an der Oberfläche der meisten Zellen detektiert werden konnte, war die Anzahl mab2b-positiver Zellen bei GlyR α 1-GLIC(+)_{bm} und GlyR α 1- Δ TM3-4(+)_{bm} deutlich reduziert. Das Konstrukt GlyR α 1-GLIC konnte hingegen nicht an der äußeren Membran detektiert werden.

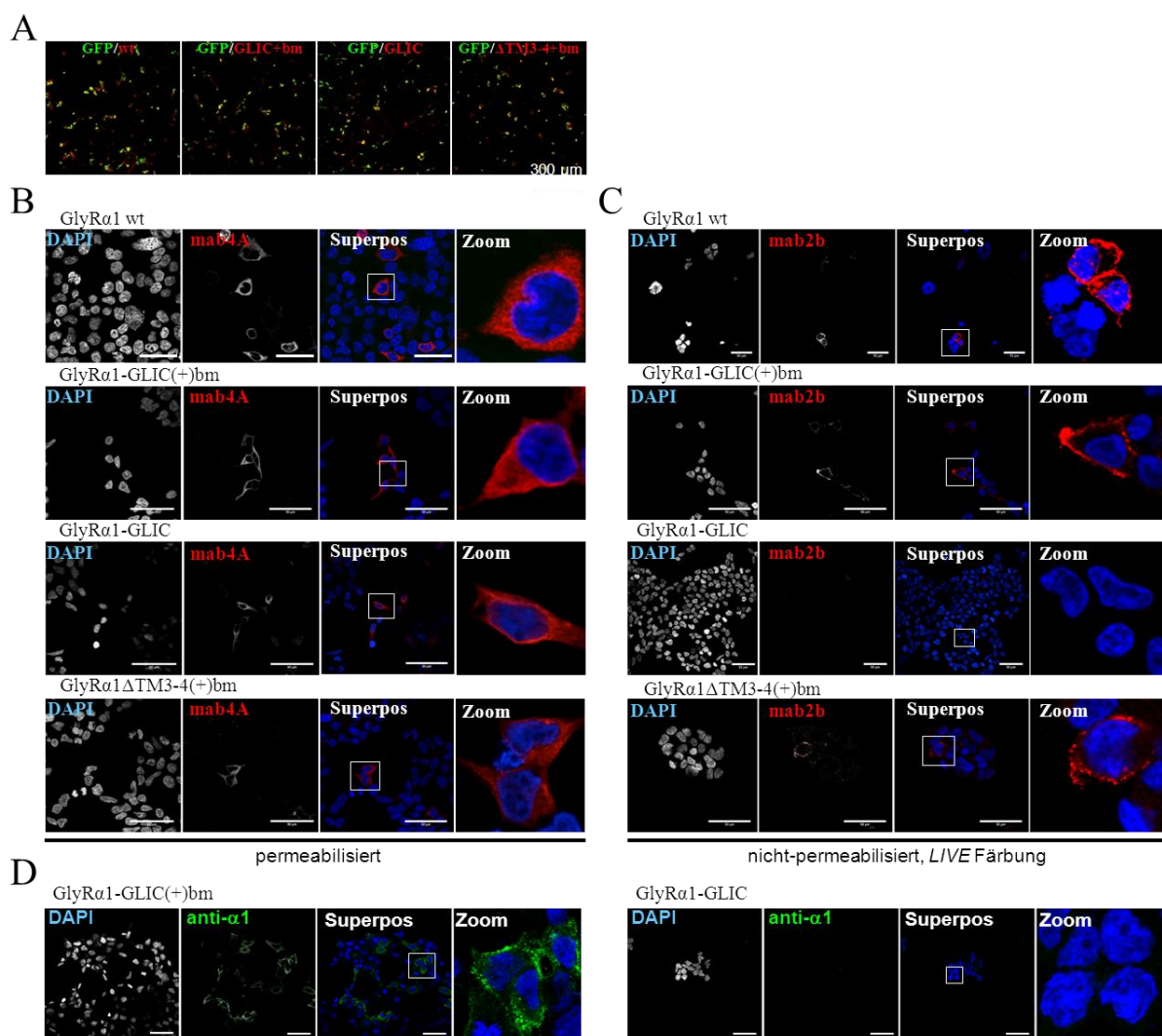


Abbildung 21. Immunzytochemische Detektion chimärer GlyR-Varianten in HEK293-Zellen

A: Transfektionskontrolle der GFP-kotransfizierten Konstrukte. B: Intrazelluläre Färbung der GlyR-Chimären in permeabilisierten (+0,1% Triton-X100), transfizierten HEK293-Zellen unter Verwendung des Pan-GlyR α -Antikörpers mab4A. C: *LIVE*-Färbung nicht-permeabilisierter, transfizierter HEK293-Zellen mithilfe des GlyR α 1-spezifischen Antikörpers mab2b. Bis auf GlyR α 1-GLIC konnten alle Konstrukte an der äußeren Zellmembran visualisiert werden. D: *LIVE*-Färbung wie in (C) unter Verwendung von anti- α 1 (AB15012) zur Kontrolle der fehlenden Oberflächenexpression von GlyR α 1-GLIC. Weiße Balken entsprechen 50 μ m, weiße Quadrate in der Superpos.-Spalte markieren den Bildausschnitt, welcher in der Zoom-Spalte vergrößert dargestellt ist.

Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurde ein weiterer kommerzieller Antikörper (anti- α 1, AB15012) verwendet (Abb. 21D). Diese Färbung bestätigt, dass GlyR α 1-GLIC nicht an der Membranoberfläche transfizierter Zellen detektiert werden kann. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass durch die Abwesenheit des TM3-4 Loops (inklusive der basischen Motive) die Expression des GlyRs an der Zelloberfläche gestört wird.

Zusammenfassend lässt sich anhand der Resultate der immunzytochemischen Färbung chimärer GlyR-Varianten die Schlussfolgerung ziehen, dass die Deletion großer Bereiche des TM3-4 Loops einen Einfluss auf die Effizienz der Inkorporation des GlyR α 1 in die Zellmembran hat, nicht aber auf die generelle Expression des Rezeptors im Zytosol.

Da die Ergebnisse der immunzytochemischen Färbung einen deutlichen Hinweis auf eine veränderte Expression der chimären Rezeptoren der Zellmembran lieferten, wurde im nächsten Schritt die Proteinexpression der Konstrukte mithilfe des *Biotinylierungsassays* untersucht. Im Vergleich zur immunzytochemischen Färbung ist diese Methode sensitiver und erlaubt außerdem die quantitative Unterscheidung zwischen der Gesamtproteinexpression und der Expression an der äußeren Zellmembran. Die Ergebnisse der Oberflächenbiotinylierung transfizierter HEK293-Zellen sind in der nachfolgenden Abbildung zu sehen. Als Negativkontrolle wurde GFP transfiziert, als Positivkontrolle wt GlyR α 1. Wie zu erkennen ist, wurden alle Konstrukte in der Gesamtproteinfraction (Ges) sowie in der Membranproteinfraction (Mem) durch mab4A detektiert (Abb. 22A). Aufgrund der Deletion von 64-92 Aminosäuren des TM3-4 Loops ergaben sich bei den Chimären reduzierte Molekülmassen von 38 kDa (GlyR α 1-GLIC), 40 kDa (GlyR α 1- Δ TM3-4(+)*bm*) und 41 kDa (GlyR α 1-GLIC(+)*bm*). In der Membranproteinfraction ist im Vergleich zur 48 kDa-Bande des wt GlyR α 1 das Signal der Banden aller chimären Konstrukte wesentlich schwächer. Dasselbe gilt für die Proteinbanden in der Gesamtproteinfraction Die Quantifizierung der Proteinexpression im Vergleich zum wt und zur Ladekontrolle (Pan-Cadherin) ergab eine deutlich reduzierte Expression der chimären Konstrukte insgesamt (15-25%), sowie an der Membranoberfläche (Abb. 22B/C). Im Vergleich zum wt wurden nur 3% der GlyR α 1- Δ TM3-

4(+)*bm* an der Zellmembran detektiert. Die Membranexpression der anderen Konstrukte GlyR α 1-GLIC und GlyR α 1-GLIC(+)*bm* lag bei 9-12%.

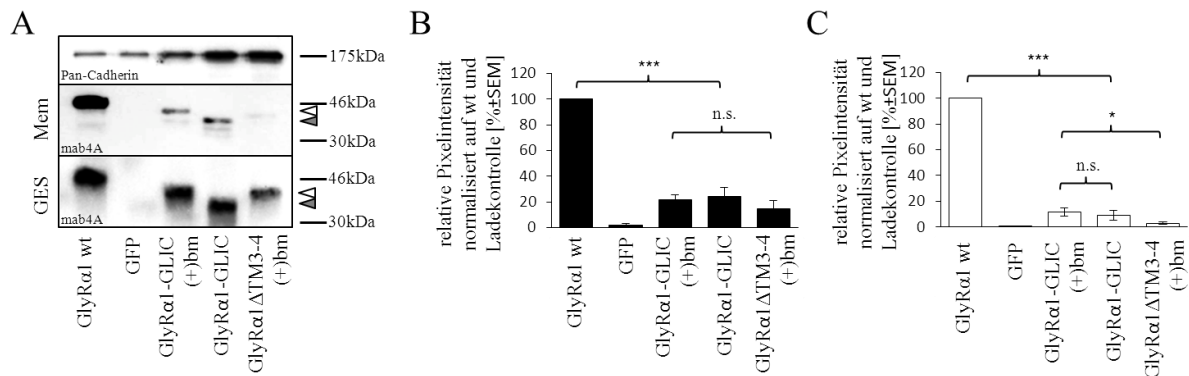


Abbildung 22. Oberflächenbiotinylierung chimärer GlyR-Konstrukte

A: Die Membranexpression der chimären Konstrukte wurde mittels *Biotinylierungsassay* in transfizierten HEK293-Zellen untersucht. Zu sehen ist der Vergleich der Expression der GlyR-GLIC-Konstrukte an der Zellmembran (Mem) und in der Gesamteinfraktion (Ges). In beiden Fraktionen wurde mab4A zur Detektion der GlyR-Varianten verwendet. Als Ladekontrolle wurde gegen Pan-Cadherine gefärbt. Weiße Pfeile deuten auf die 40-41kDa-Bande der Konstrukte GlyR α 1- Δ TM3-4(+)*bm* und GlyR α 1-GLIC(+)*bm*, schwarze Pfeile auf die 38 kDa-Bande von GlyR α 1-GLIC. B: Quantifizierung der Pixelintensität der niedermolekularen Banden der Gesamteinfraktion in Relation zur 48 kDa-Bande des wt und Pan-Cadherin Kontrolle (mab4A/Pan-Cad). C: Quantifizierung wie in (B) bezogen auf die Membranproteinfraktion.

Beide Methoden deuten auf eine deutlich reduzierte Expression der Konstrukte an der Zelloberfläche hin. Die verminderte Gesamtproteinexpression war nur im *Biotinylierungsassay* messbar und ist möglicherweise ein Anzeichen für zytotoxische Effekte der Überexpression der Konstrukte. Die Chimären GlyR α 1-GLIC ohne basische Motive im TM3-4 Loop konnte im *Biotinylierungsassay* an der Zellmembran detektiert werden (9% von wt), aber nicht in der Immunfärbung.

3.3.3. Elektrophysiologische Charakterisierung der chimären GlyR-Varianten

Nachdem die generelle Proteinexpression der chimären Konstrukte an der äußeren Zellmembran transfizierter HEK293-Zellen bestätigt werden konnte, sollte als Nächstes die Frage nach der Funktionalität dieser Rezeptoren beantwortet werden. Da eine reduzierte Oberflächenexpression nicht unbedingt in der Funktionslosigkeit eines Rezeptors resultiert, wurde die Kanalfunktion in transfizierten HEK293-Zellen elektrophysiologisch untersucht. In Abbildung 23A,C sind die dabei gemessenen Maximalströme dargestellt.

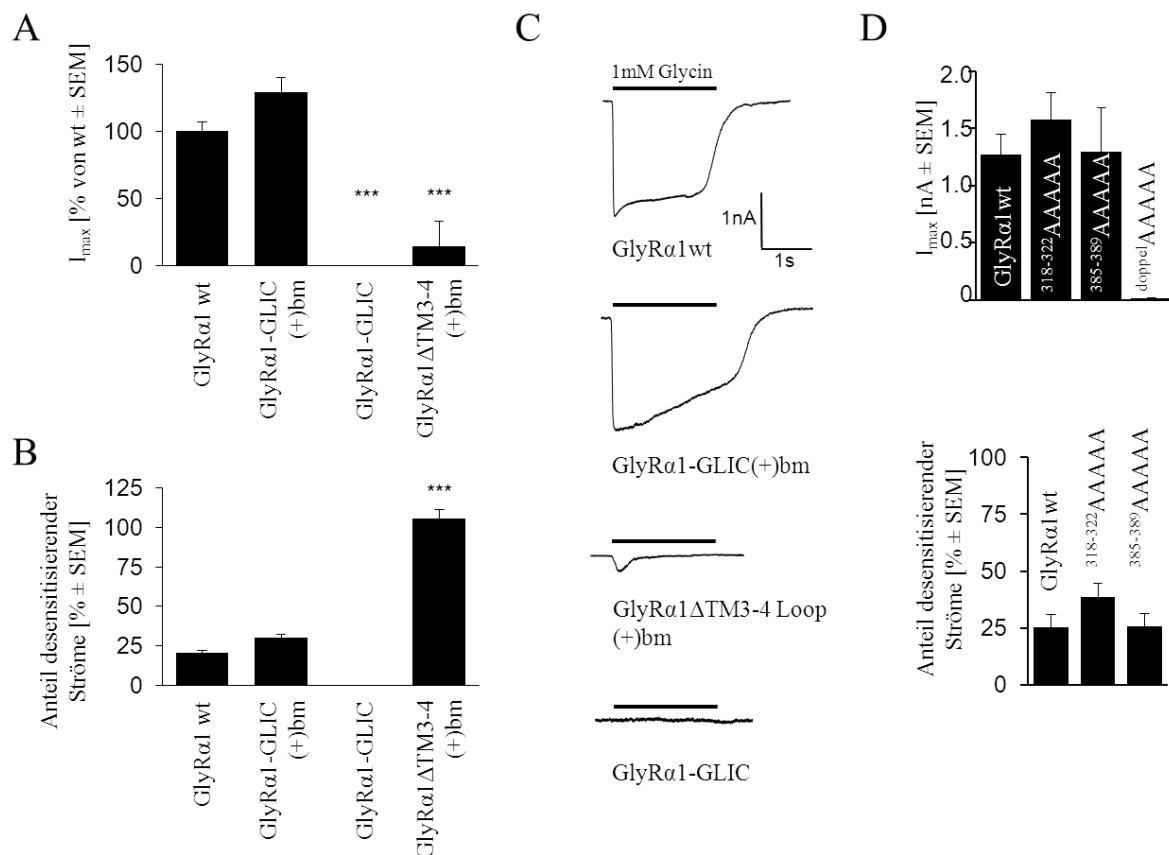


Abbildung 23. Elektrophysiologische Charakterisierung chimärer GlyR-Varianten

A: Quantifizierung der gemessenen Maximalströme (I_{max}) der in HEK293-Zellen transfizierten chimären Konstrukte. Es wurde 1 mM Glycin für 2 s appliziert und Ganzzelleitungen durchgeführt. Die dazugehörigen repräsentativen Stromantworten sind in (C) dargestellt. B: Desensitisierungsanalyse der in (C) dargestellten Kurvenverläufe. Der Anteil desensitisierender Ströme beschreibt den abfallenden Kurvenverlauf, der während der Applikation des Agonisten zu beobachten ist. D: I_{max} und Desensitisierungsanalyse von Kontrollkonstrukten, in denen die basischen Motive separat in Alanine umgewandelt wurden ohne Loop-Trunkierungen vorzunehmen.

Wie in Abbildung 23A,C zu sehen ist, resultierte der Austausch des kompletten TM3-4 Loops gegen den GLIC-Loop in nicht-funktionellen chimären GlyRs. Es konnten keine Glycin-induzierten Chloridströme für das Konstrukt GlyR α 1-GLIC gemessen werden, obwohl die Grundvoraussetzung der Expression an der Zellmembran demonstriert wurde. Die Chimären GlyR α 1-GLIC(+)
bm und GlyR α 1- Δ TM3-4(+)
bm, welche die basischen Motive beinhalten, bildeten im Gegensatz dazu funktionelle Anionenkanäle aus. Die gemessenen Ströme von GlyR α 1-GLIC(+)
bm waren mit $129,5\% \pm 10\%$ im Vergleich zum wt leicht, aber nicht signifikant, erhöht ($p=0,14$; ANOVA). Die Deletion des TM3-4 Loops zwischen den basischen Motiven im Konstrukt GlyR α 1- Δ TM3-4(+)
bm führte mit $14,6\% \pm 2\%$ zu stark reduzierten

Maximalströmen ($p=5,2 \times 10^{-9}$; ANOVA). Obwohl alle Konstrukte eine signifikant verringerte Membranexpression zeigten, unterschieden sie sich stark in ihrer Funktionalität.

Die in Abbildung 23C abgebildeten Chlorideinwärtsströme der untersuchten Konstrukte variierten in ihrem Desensitisierungsverhalten. Bei der Desensitisierung eines Rezeptors handelt es sich um eine Konformationsänderung, die während der Stimulation durch den Liganden stattfindet und dazu führt, dass der Ionenkanal wieder undurchlässig für einströmende Ionen wird. Ein hoher Anteil desensitisierender Ströme bedeutet für die Kinetik eines Rezeptors, dass die Wahrscheinlichkeit für das Schließen erhöht ist und weniger Ionen in die Zelle einströmen. Für den GlyR $\alpha 1$ wt wurde ein Anteil an desensitisierenden Strömen von $25,5\% \pm 1,5\%$ ermittelt. Dieser Wert unterschied sich nicht signifikant von der Desensitisierung von GlyR $\alpha 1$ -GLIC(+)*bm* mit $29,9\% \pm 2,2\%$ ($p=0,54$; ANOVA) (Abb. 23B). Im Gegensatz dazu wurde bei GlyR $\alpha 1$ - Δ TM3-4(+)*bm* eine vollständige Desensitisierung mit $105,7\% \pm 5,6\%$ ($p=7,4 \times 10^{-18}$; ANOVA) gemessen. Dieses Ergebnis zeigt, dass in den abgeleiteten HEK293-Zellen, die mit diesem Konstrukt transfiziert wurden, alle GlyRs vor Ende der Glycin-Applikation in einen geschlossenen, desensitierten Kanalzustand übergegangen waren.

Zur Überprüfung der Annahme, dass die basischen Motive Einfluss auf die Funktionalität der chimären GlyRs hat, wurden die drei Kontrollkonstrukte ³¹⁸⁻³²²AAAAA, ³⁸⁵⁻³⁸⁹AAAA und ^{doppel}AAAAA elektrophysiologisch untersucht. Dabei handelt es sich um GlyRs, bei welchen die basischen Motive ³¹⁸RRKRR und ³⁸⁵KKIDK des TM3-4 Loops einzeln, oder in Kombination (^{doppel}AAAAA) in Alanine umgewandelt wurden. Im Gegensatz zu den chimären Konstrukten wurden hier keine Deletionen der ICD vorgenommen. Wie in Abbildung 23D zu erkennen ist, hatte die separate Umwandlung der basischen Motive in Alanine keinen signifikanten Einfluss auf die Maximalströme sowie das Desensitisierungsverhalten. Wie bei GlyR $\alpha 1$ -GLIC führten die Mutationen in ^{doppel}AAAAA zum vollständigen Verlust Glycin-induzierter Chloridströme.

Zusammengefasst lässt sich aus den Ergebnissen der elektrophysiologischen Charakterisierung der chimären GlyR-Varianten schlussfolgern, dass die Anwesenheit der basischen Motive am N- und C-Terminus des TM3-4 Loops des GlyR $\alpha 1$ eine Grundvoraussetzung für die Ausbildung funktioneller Ionenkanäle darstellt. Die Länge der Aminosäuresequenz zwischen diesen Domänen determiniert die für die Kanalfunktion wichtige Separation dieser Motive und moduliert das Desensitisierungsverhalten des GlyRs.

Eine Gesamtübersicht mit allen relevanten Messwerten der GlyR-Chimären sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Konstrukt	Expression	n	I_{\max} [pA] \pm SEM	Anteil desensitisierender Ströme [%] \pm SEM	τ_{Des} [s] \pm SEM
GlyR α 1 wt	+++	28	2003 \pm 172	20.6 \pm 1.9	1.59 \pm 0.21
GlyR α 1-GLIC (+) bm	++	30	2593 \pm 268	29.9 \pm 2.2	1.40 \pm 0.07
GlyR α 1-GLIC	++	16	0 \pm 0	-	-
GlyR α 1- Δ TM3-4 loop (+) bm	+	22	292 \pm 54 ^{***}	105.7 \pm 5.6 ^{***}	0.54 \pm 0.04 ^{***}

Tabelle 18. Gesamtübersicht der Charakterisierung der GlyR-Chimären

Für jedes untersuchte Konstrukt sind folgende Messwerte tabellarisch aufgelistet: Oberflächenexpression aus Biotinylierungsassay und immunzytochemischer Färbung (+, schwache Expression; ++, mittlere Expression; +++, starke Expression des wt GlyR), Anzahl gemessener Zellen [n], Maximaleinwärtsströme [I_{\max}] nach Applikation von 1 mM Glycin, Desensitierungsverhalten und die Zeitkonstante der Desensitisierung τ_{Des} .

3.4. Charakterisierung der Patientenmutation P366L

Hyperekplexie ist eine seltene (exakte Prävalenz unbekannt) neuromotorische Störung, die durch Fehlfunktion der glycinergen Neurotransmission verursacht wird. Als Hauptursache werden Mutationen im Gen *GLRA1* angesehen, welches die $\alpha 1$ -Untereinheit des Glycinrezeptors auf dem Chromosomenabschnitt 5q33.1 kodiert (Rees et al., 2001). Unter den bekannten Mutationen in *GLRA1* führen die meisten (auf Proteinebene) zu einem Aminosäureaustausch in der Kanalpore-auskleidenden TM2 sowie in benachbarten Loop-Strukturen. Diese Mutationen werden meist dominant vererbt. Rezessiv vererbte Mutationen treten dahingegen häufiger in der Ligandenbindedomäne auf. Im TM3-4 Loop des GlyR $\alpha 1$ sind bislang die 5 Mutationen R316X, G342S, D388A, E375X und R392H gefunden worden, welche (bis auf E375X) gemischt heterozygot (in Kombination mit einer weiteren Mutation) vererbt werden. Im folgenden Abschnitt soll die bisher unbekannte Mutation P366L im TM3-4 Loop des GlyR $\alpha 1$ charakterisiert werden. Dabei sollen die molekularen Mechanismen erörtert werden, die durch die Mutation zu einer veränderten glycinergen Neurotransmission und zur Ausprägung des Hyperekplexie-Phänotyps führen.

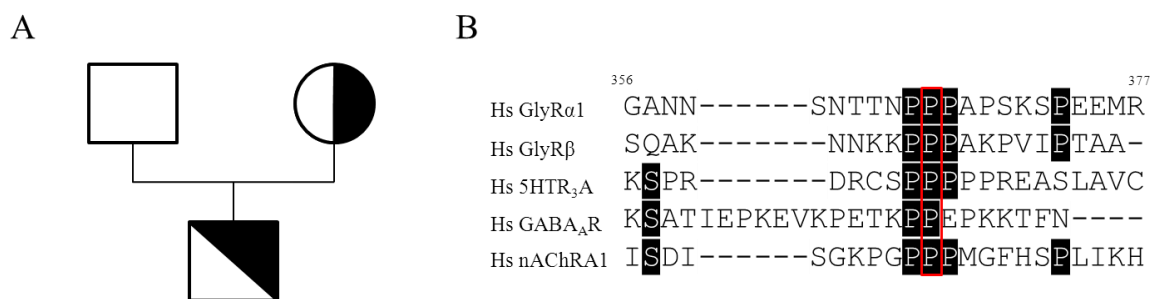


Abbildung 24. Vererbung und Lokalisation der Patientenmutation P366L

A: Stammbaum des betroffenen männlichen Patienten (schwarz-weißes Quadrat). Unter den Eltern war die Mutter Träger der Mutation. B: Vergleich der Lokalisation von P366L im TM3-4 Loop von GlyR $\alpha 1$ unter verschiedenen Untereinheiten der CLR-Familie. P366 ist durch das rote Rechteck hervorgehoben.

Der Stammbaum des betroffenen Patienten zeigt, dass es sich bei der Art der Vererbung um einen dominanten Erbgang handelt (Abb. 24A). Während vom Vater keine Mutation in Hyperekplexie-assoziierten Genen bekannt ist, wurde dieselbe Punktmutation im Genom der Mutter identifiziert. P366 befindet sich in einer Prolin-reichen Sequenz des TM3-4 Loops, von der vermutet wird, dass sie an der Ausbildung einer Poly-Prolin-Helix Typ II (PPII)

beteiligt ist (Cascio et al., 2001). Der Sequenzvergleich mit anderen Mitgliedern der CLR-Familie verdeutlicht die Konservierung von Prolin an dieser Position (Abb. 24B).

3.4.1. Generierung der Konstrukte

Um die Rolle der Polarität, des Volumens und der Ladung des Aminosäurerestes an Position 366 des GlyR α 1 für die Kanalfunktion untersuchen zu können, wurden neben P366L weitere Aminosäurereste über Mutagenese in den rekombinanten Rezeptor eingefügt (Abb. 25). Zur Untersuchung der Bedeutsamkeit der vorhergesagten PPII-Struktur innerhalb des Sequenzabschnitts ³⁶⁴NPPPAPSKSP³⁷³, wurden die Proline in Alanine bzw. Leucine umgewandelt. Alanin und Leucin sind an der Ausprägung der rechtsdrehenden α -Helix mit 3,6 Aminosäuren pro Windung beteiligt, während die PPII-Struktur eine linksdrehende Helix mit 3 Aminosäureresten pro Windung darstellt. In einem weiteren Konstrukt wurden vier Proline innerhalb der Sequenz deletiert. Diese Konstrukte wurden in HEK293-Zellen transfiziert und die Veränderungen im Vergleich zum wt proteinbiochemisch, immunzytochemisch und elektrophysiologisch untersucht.

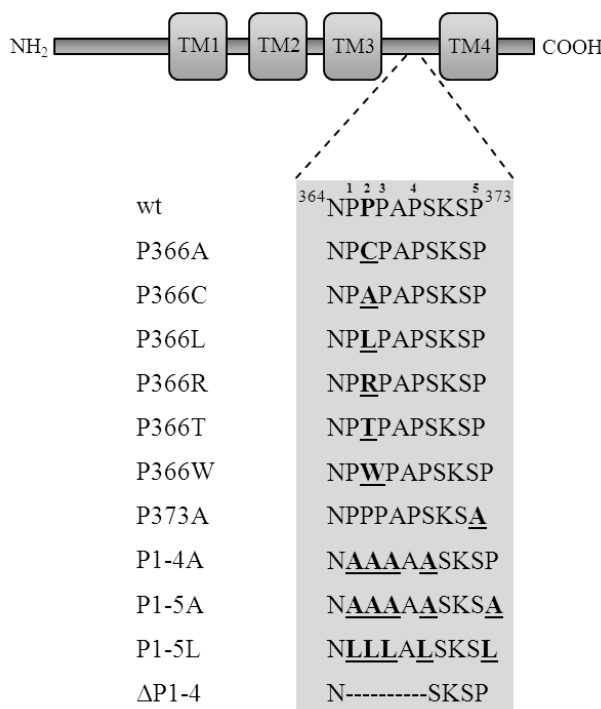


Abbildung 25. Übersicht der Konstrukte zur Untersuchung der Patientenmutation P366L

P366 befindet sich innerhalb der Sequenz ³⁶⁴NPPPAPSKSP³⁷³ im TM3-4 Loops des GlyR α 1 (schematische Darstellung im oberen Bildabschnitt). Insgesamt existieren in dieser Sequenz 5 Proline (1-5 über der wt-Sequenz). Es wurden die Punktmutationen P366A/C/L/R/T/W zur Untersuchung der Rolle von Prolin an Position 366 generiert. Weiterhin wurden die kombinierten Mutationen P1-4A, P1-5A, P1-5L und ΔP1-4 generiert um die Auswirkungen auf die vorhergesagte PPII-Struktur zu untersuchen. Bei jedem Konstrukt sind die Aminosäuren fett markiert und unterstrichen, die im Vergleich zur wt-Sequenz verändert wurden.

3.4.2. Expression der P366-Varianten

Zur Untersuchung der Expression der Einzelmutanten P366L, P366C, P366T, P366R, P366R und P366A wurden diese Konstrukte in permeabilisierten bzw. nicht-permeabilisierten HEK293-Zellen immunzytochemisch visualisiert (Abb. 26). Anhand der intrazellulären Färbung (Abb. 26A) lässt sich erkennen, dass es zwischen wt und den Mutanten keinen Unterschied in der Lokalisation der mab4A-Signale gibt. Sowohl die Anzahl als auch Intensität des mab4A-Signal ist unabhängig von der Aminosäure, die an Position 366 des GlyR α 1 ausgetauscht wurde. Dasselbe gilt für die Färbung der Konstrukte an der Oberfläche der Zellmembran (Abb. 26B). Alle untersuchten Konstrukte konnten durch mab2b detektiert werden. Diese Resultate zeigen, dass die Patientenmutation P366L keinen Einfluss auf die Gesamtzellexpression sowie Membran-assoziierte Lokalisation des GlyR α 1 besitzt.

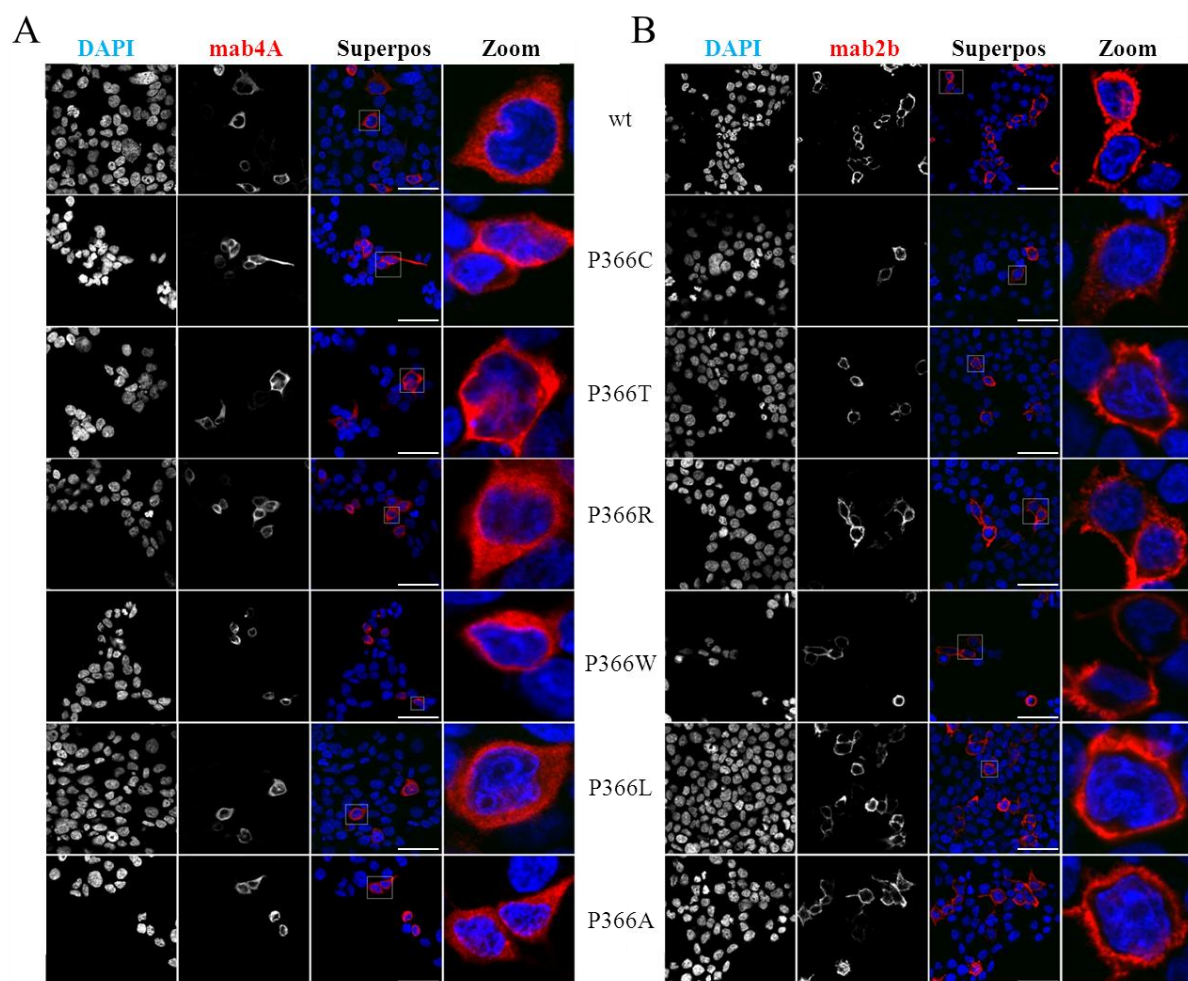


Abbildung 26. Immunzytochemische Detektion der P366-Varianten in HEK293-Zellen

A: Färbung permeabilisierter, transfizierter HEK293-Zellen. Der intrazelluläre GlyR α 1 wurde mit mab4A detektiert. Es konnte kein Unterschied in der Expression zwischen den Konstrukten und wt festgestellt werden

B: *LIVE*-Färbung der GlyR-Varianten an der Zelloberfläche mittels mab2b. Alle Konstrukte wurden an der Oberfläche transfizierter HEK293-Zellen detektiert. Weiße Balken entsprechen 50 μ M. Weiße Quadrate stellen den in der Zoom-Spalte vergrößerten Bildausschnitt dar.

Nachdem die immunzytochemische Färbung keinen Hinweis auf veränderte Expression der P366-Einzelmutanten gab, wurden dieselben Konstrukte im quantitativen *Biotinylierungsassay* analysiert. Die Ergebnisse der Oberflächenbiotinylierung sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

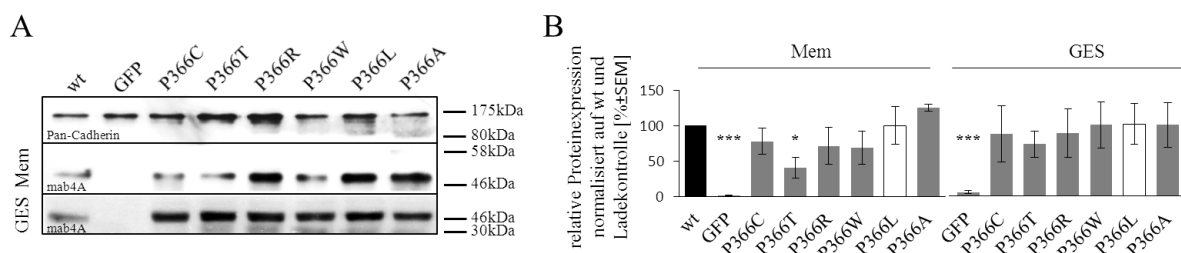


Abbildung 27. Oberflächenbiotinylierung der P366-Einzelmutanten

A: Die Expression der P366-Einzelmutanten an der Zellmembran (Mem) sowie in der Gesamtproteinfraktion (GES) wurden mittels *Biotinylierungsassay* in transfizierten HEK293-Zellen untersucht. Alle Mutanten konnten in der Membran durch mab4A detektiert werden. B: Quantifizierung der Pixelintensitäten der Proteinbanden aus (A) in Relation zur wt-Bande und Ladekontrolle. In der Mem-Fraktion war die Expression von P366T reduziert. In der GES-Fraktion konnte kein Unterschied in der Expression festgestellt werden. (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$, ANOVA). wt, schwarze Balken; P366L, weiße Balken; übrige Konstrukte graue Balken.

Im Vergleich zum wt GlyR α 1 gab es keinen Unterschied in der Gesamtexpression der untersuchten Einzelmutanten. Des Weiteren wird deutlich, dass alle Konstrukte an der Zellmembranoberfläche exprimiert wurden. P366T ist das einzige Konstrukt, welches mit $40,6\% \pm 14,8\%$ eine signifikant reduzierte Oberflächenexpression zeigte ($p = 0,03$, ANOVA). Zwischen wt GlyR α 1 und der Patientenmutation P366L wurde weder in der Gesamtproteinfraktion noch in der Membranfraktion ein signifikanter Unterschied in der Expression festgestellt.

Fasst man die bisherigen Resultate zur Charakterisierung der Effekte der Mutation P366L zusammen, lässt sich schlussfolgern, dass dieser Aminosäureaustausch im TM3-4 Loop des GlyR α 1 keinen Einfluss auf die Biogenese des Rezeptors (in transfizierten HEK293-Zellen) hat.

3.4.3. Einfluss auf Glycin-induzierte Maximalströme und Desensitisierungsverhalten

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Mutation auf die Glycin-induzierten Ströme in HEK293-Zellen untersucht. Dafür wurden die Einzelmutationskonstrukte sowie die Konstrukte mit kombinierten Mutationen transfiziert und elektrophysiologisch abgeleitet.

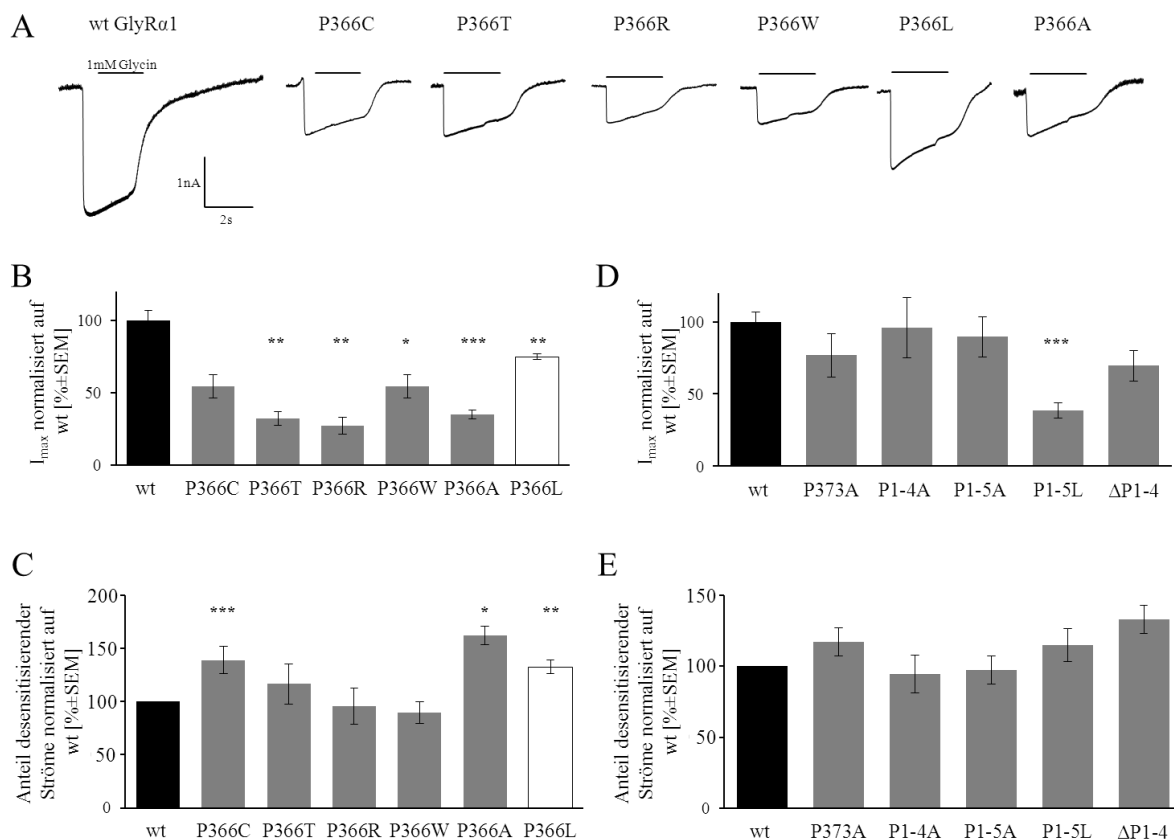


Abbildung 28. Elektrophysiologische Charakterisierung des Einflusses von Mutationen innerhalb der Sequenz ³⁶⁴NPPPAPSKSP³⁷³ auf die Rezeptorfunktion

A: Repräsentative Darstellung der Glycin-induzierten Chlorideinwärtsströme für die Konstrukte P366C/T/R/WL/A. Schwarze Balken über den Kurven markieren die Applikationszeit von 1 mM Glycin. Alle Konstrukte bildeten funktionelle Ionenkanäle mit veränderten Kanaleigenschaften aus. B: Quantifizierung der I_{max}-Werte der Einzelmutationen an Position 366. C: Quantifizierung des Desensitisierungsverhaltens der in (A) dargestellten Kurvenverläufe. D: Quantifizierung der I_{max}-Werte der kombinierten Mutationen. E: Quantifizierung des Desensitisierungsverhaltens der Kurvenverläufe der Konstrukte mit kombinierten Mutationen. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; ANOVA.

Wie in Abbildung 28A zu erkennen ist, bildeten die Konstrukte P366C, P366T, P366R, P366W, P366A und P366L funktionelle Ionenkanäle aus. Als Antwort auf die Applikation von Glycin (1 mM, 2 s) wurden dabei, mit Ausnahme von P366C, für alle diese Konstrukte signifikant reduzierte Maximalströme gemessen (Abb. 28B). Für die Patientenmutation P366L wurden 74,9% ± 2,9% der Maximalströme über den wt GlyRα1 ermittelt (p=0,005,

ANOVA). Unter den kombinierten Mutationen hatte nur P1-5L mit $38,8\% \pm 5,2\%$ einen signifikanten Einfluss auf die Maximalströme ($p=1,7 \times 10^{-5}$; ANOVA). Wie im Abschnitt 3.3.3. beschrieben, gilt das Schließen Liganden-gesteuerter Ionenkanäle in Anwesenheit des Agonisten als Maß für die Desensibilisierung des Rezeptors. Die Quantifizierung des Desensibilisierungsverhaltens der untersuchten Konstrukte verdeutlicht, dass einige Einzelmutationen die Rezeptordesensibilisierung beeinflussten (Abb. 28C), nicht aber die Mutationen die zur Störung der vermuteten PPII-Helix eingefügt wurden (Abb. 28D). Die Mutationen P366A und P366L führten zu GlyRs mit reduzierten Maximalströmen sowie zu Kanälen mit beschleunigtem Schließverhalten. Der Anteil desensibilisierender Ströme lag bei $161,9\% \pm 8,6\%$ (P366A, $p=0,02$; ANOVA) und $132,7\% \pm 6,2\%$ (P366L, $p=0,001$; ANOVA) bezogen auf den Anteil von wt GlyR α 1. P366C hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Maximalströme aber mit $139\% \pm 13,1\%$ Anteil an desensibilisierenden Strömen einen Effekt auf die Kanalkinetik ($p=9,1 \times 10^{-9}$; ANOVA). Eine Übersicht aller gemessenen Maximalströme sowie desensibilisierende Stromanteile sind der nachfolgenden Tabelle 19 zu entnehmen.

Diese Ergebnisse belegen, dass die Mutation P366L zur Ausbildung funktioneller GlyRs führt, deren Maximalströme deutlich reduziert sind und deren Schließkinetik signifikant beschleunigt ist. Das bedeutet, dass nach Öffnen des Kanals insgesamt weniger Cl⁻-Ionen in die Zelle einströmen als im wt GlyR α 1.

Konstrukt	n	I_{\max} [nA \pm SEM]	I_{\max} [% von wt \pm SEM]	Anteil desensibilisierender Ströme [% \pm SEM]	Anteil desensibilisierender Ströme [% von wt \pm SEM]
GlyR α 1 wt	95	$2,99 \pm 0,18$	$100 \pm 6,02$	$30,65 \pm 1,31$	$100 \pm 4,3$
P366L	81	$2,21 \pm 0,16$	$74,99 \pm 7,37^{**}$	$45,36 \pm 2,83$	$132,67 \pm 6,25^{**}$
P366C	13	$1,99 \pm 0,43$	$54,41 \pm 1,38$	$42,93 \pm 5,62$	$138,91 \pm 13,08^{***}$
P366T	12	$1,89 \pm 0,26$	$32,49 \pm 8,37^{**}$	$35,99 \pm 6,75$	$116,52 \pm 18,74$
P366R	12	$1,01 \pm 0,32$	$27,54 \pm 2,09^{**}$	$29,58 \pm 4,96$	$95,77 \pm 16,78$
P366W	12	$1,43 \pm 0,44$	$54,4 \pm 9,79^*$	$32,01 \pm 3,29$	$89,39 \pm 10,28$
P366A	17	$0,88 \pm 0,11$	$34,84 \pm 4,62^{***}$	$44,12 \pm 3,91$	$161,95 \pm 8,85^*$
P373A	9	$1,83 \pm 0,36$	$76,85 \pm 15,1$	$26,66 \pm 2,67$	$117,2 \pm 10,02$
P1-4A	12	$1,84 \pm 0,4$	$95,77 \pm 20,87$	$24,11 \pm 3,19$	$94,58 \pm 13,25$

P1-5A	13	1.85 ± 0.29	89.66 ± 13.96	29.88 ± 2.94	97.24 ± 9.84
P1-5L	26	1.18 ± 0.16	$38.77 \pm 5.22^*$	28.31 ± 3.24	114.8 ± 11.43
Δ P1-4	22	2.09 ± 0.32	69.64 ± 10.64	32.81 ± 3.28	133.02 ± 10.01

Tabelle 19. Gesamtübersicht der elektrophysiologischen Messwerte der P366-Varianten

Für jedes untersuchte Konstrukt wurden die I_{\max} -Werte sowie der Anteil desensitisierender Ströme aufgelistet. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die Messwerte des wt GlyR α 1 am selben Tag. Die Anzahl untersuchter Zellen (n) bezieht sich auf die Berechnung der I_{\max} -Werte. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, ANOVA.

Die reduzierten I_{\max} -Werte und die beschleunigte Kanalkinetik von P366L führten zu der These, dass die Mutation möglicherweise die Effizienz der Ligandenbindung verändert. Mutationen in der ICD können die Effizienz der Übersetzung der Ligandenbindung in eine Konformationsänderung der Kanalpore stören und im Nervensystem der Mutationsträger zu einer gestörten inhibitorischen Neurotransmission führen (Breitinger et al., 2001, Chung et al., 2010).

Zur Überprüfung dieser These, wurde die Dosis-Wirkungs-Beziehung des wt GlyR α 1 mit P366L verglichen. Hierfür wurde Glycin in aufsteigender Konzentration (3 μ M-3 mM) auf transfizierte HEK293-Zellen appliziert. Die logarithmische Darstellung der auf diese Weise gemessenen Maximalströme ist in Abbildung 29A dargestellt. Anhand der Überlappung beider Kurven erkennt man, dass es keinen Unterschied in der Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen wt und P366L gibt. Die Glycinkonzentration, die den halbmaximalen Strom auslöste (EC_{50} -Wert) betrug für den wt $19,01 \mu\text{M} \pm 2,13 \mu\text{M}$ und für P366L $28,25 \mu\text{M} \pm 1,73 \mu\text{M}$. Diese Werte waren statistisch nicht signifikant verschieden ($p=0,63$, T-Test).

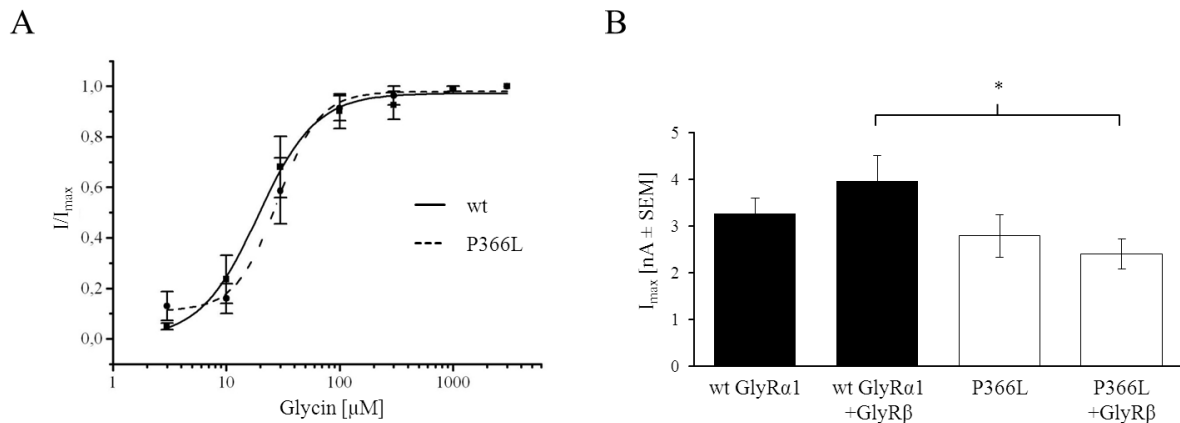


Abbildung 29. Elektrophysiologische Charakterisierung von P366L

A: Dosis-Wirkungs-Beziehung zur Bestimmung der halbmaximalen effektiven Konzentration (EC_{50}) von wt GlyR α 1 und P366L. Der in der Y-Achse dargestellte relative Maximalstrom errechnet sich aus dem Quotienten des I_{max} -Wertes bei der gegebenen Glycinkonzentration (3 μ M-3 mM) und dem I_{max} -Wert der sättigenden Konzentration (3 mM). Die Glycinkonzentration ist logarithmisch dargestellt. B: Maximalströme von wt GlyR α 1 und P366L nach Kotransfektion von GlyR β . Es wurden 1 mM Glycin für 2 s appliziert. Die I_{max} -Werte der heteropentameren Rezeptoren unterschieden sich signifikant voneinander (*, $p=0,03$; ANOVA).

Synaptische GlyR α 1-Untereinheiten sind *in vivo* mit β -Untereinheiten assoziiert. Für die Expression GlyR α 1-vermittelter, Glycin-induzierter Ströme in einem heterologen Expressionssystem ist die Anwesenheit von GlyR β nicht erforderlich. Dennoch gewährt die Untersuchung heteromerer GlyRs einen Einblick auf die besonderen physiologischen Eigenschaften von GlyRs *in vivo*. Aus diesem Grund wurden die Maximalströme heteromerer wt bzw. P366L-GlyRs in HEK293-Zellen elektrophysiologisch untersucht.

Wie in Abbildung 29B zu erkennen ist, hatte die Kotransfektion der β -Untereinheit keinen signifikanten Effekt auf die Maximalströme des wt oder P366L-GlyRs. Nach der Kotransfektion von GlyR β wurde für den wt eine ca. 20%ige Steigerung und für den heteromeren P366L-GlyR eine ca. 15%ige Reduzierung der Maximalströme gemessen. Im Vergleich der Maximalströme beider heteromer GlyRs ließ sich allerdings ein deutlicher Unterschied feststellen. Die I_{max} -Werte des heteromeren wt GlyR α 1 betragen $3,96 \text{ nA} \pm 0,55 \text{ nA}$, die sich signifikant von $2,4 \text{ nA} \pm 0,55 \text{ nA}$ des heteromeren P366L-GlyR unterschieden ($p=0,03$; ANOVA).

3.4.4. Charakterisierung von P366L im Oozyten-Expressionssystem

Außer der Beeinflussung der maximalen Chlorideinwärtsströme in homo- und heteropentameren GlyRs sowie die veränderte Kanalkinetik ist der Pathomechanismus der

Patientenmutation P366L unklar. Da die reduzierte Chloridleitfähigkeit des Rezeptors nicht auf eine reduzierte Membranexpression zurückzuführen ist, legt das eine veränderte Konformation des Rezeptorproteins nahe. Veränderungen in der Konformation sowie in der Molekülbeweglichkeit können durch die Methode der Spannungsklemmen-Fluorometrie beschrieben werden. Im Wesentlichen werden dabei Cysteine in der ECD des zu untersuchenden Rezeptors mit hochaffinen Fluorophoren konjugiert. Das Rezeptorprotein wird in vitalen Oozyten der Spezies *Xenopus laevis* exprimiert und die Fluoreszenzänderung in Abhängigkeit von der applizierten Agonistenkonzentration ermittelt. Studien an der ECD des GlyR α 1 konnten demonstrieren, dass die Färbung der Aminosäurereste N203C (Loop C) und R271C (TM2-3 Loop) hinreichend zur Untersuchung der Molekülbeweglichkeit im extrazellulären Bereich des GlyR ist (Pless and Lynch, 2009, Lynagh et al., 2011).

Zur Detektion von Fluoreszenzsignalen als Reaktion auf das Öffnen des GlyR wurden die Konstrukte wt/N203C, P366L/N203C, wt/R271C und P366L/R271C (Abb. 30A) in Oozyten von *Xenopus laevis* exprimiert und diese für 15 min mit 10 μ M MTS-TAMRA (N203C) bzw. MTSR inkubiert. Anschließend wurden aufsteigende Glycinkonzentrationen (3 μ M-30 mM) appliziert und bei einer Haltespannung von -40 mV mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme die Chlorideinwärtsströme gemessen. Parallel wurde die Änderung der Fluoreszenz mit einem invertierten konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Nikon Instruments, Kawasaki, Japan) gemessen.

Die Applikation sättigender Glycinkonzentrationen löste in allen untersuchten Rezeptoren Chlorideinwärtsströme sowie damit korrelierende Fluoreszenzänderungen aus (Abb. 30B,C). Die I_{\max} -Werte betragen für N203C-GlyRs 2,61 μ A \pm 0,7 μ A (wt) und 2,09 μ A \pm 0,6 μ A (P366L) und für R271C-GlyRs 1,34 μ A \pm 0,5 μ A (wt) und 1,79 μ A \pm 0,5 μ A (P366L). Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant voneinander (N203C: $p=0,09$; R271C: $p=0,15$; ANOVA). Die dazugehörigen maximalen Fluoreszenzänderungen betragen dabei für N203C-GlyRs 52,6% \pm 4,5% (wt) und 42,6% \pm 8,1% (P366L) und für R271C-GlyRs 13,2% \pm 1,7% (wt) und 13,9% \pm 1,2% (P366L). Die ΔF_{\max} -Werte waren ebenfalls nicht statistisch signifikant verschieden (N203C: $p=0,7$; R271C: $p=0,8$; ANOVA).

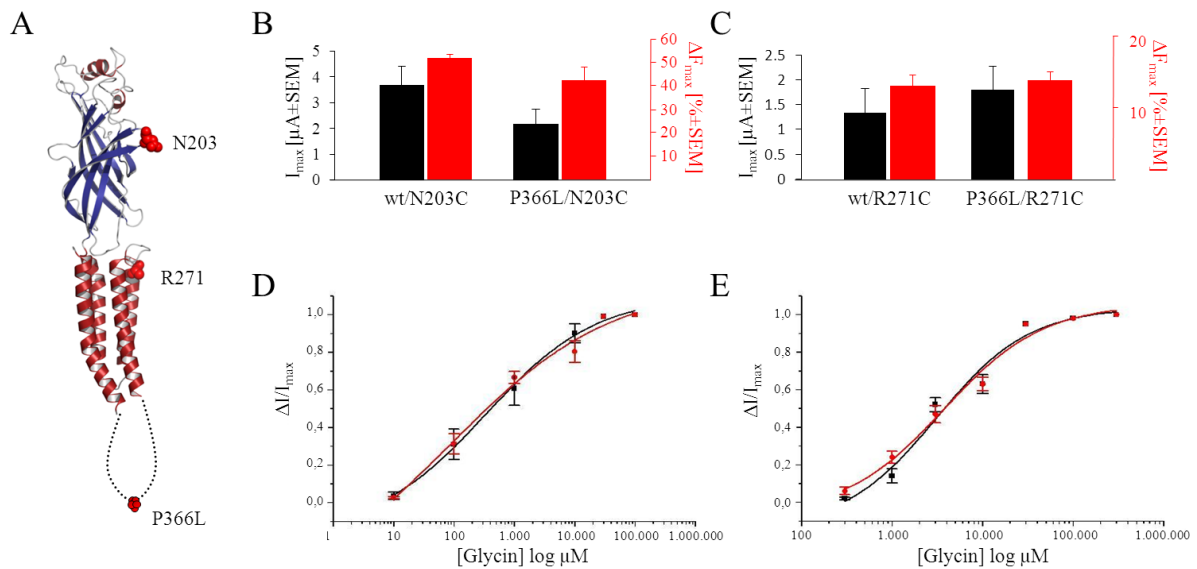


Abbildung 30. Spannungsklemmen-Fluorometrie-Versuche im Oozytenexpressionssystem

A: Dargestellt ist die $\alpha 1$ -Untereinheit des GlyR (Kristallstruktur nach Du et al., 2015) inklusive der in dieser Versuchsreihe gefärbten Aminosäurereste N203C und R271C. Der TM3-4 Loop samt P366L ist als gestrichelte Linie dargestellt. B: Darstellung der maximalen Stromamplitude (schwarze Balken) und Fluoreszenzänderung (rote Balken) in wt/N203C und P366L/N203C. C: Darstellung der maximalen Stromamplitude und Fluoreszenzänderung in wt/R271C und P366L/R271C. Die dazugehörigen Dosis-Wirkungs-Kurven sind in D (N203C) und E (R271C) dargestellt. wt, schwarz; P366L, rot.

Zur Bestimmung des EC_{50} -Wertes wurden aufsteigende Glycinkonzentrationen appliziert (Abb. 30D,E). Analog zu den Ergebnissen für die gemessenen Amplituden bei sättigender Glycinkonzentration ergaben diese Experimente unabhängig vom gefärbten Aminosäurerest keinen signifikanten Unterschied in den gemessenen Einwärtsströmen bei niedrigen Konzentrationen. Die EC_{50} -Werte lagen bei $337,7 \mu\text{M} \pm 160 \mu\text{M}$ (wt) und $309 \mu\text{M} \pm 94,2 \mu\text{M}$ (P366L) für N203C-GlyRs (Abb. 30D) und bei $3119,7 \mu\text{M} \pm 185 \mu\text{M}$ (wt) und $3776,7 \mu\text{M} \pm 186 \mu\text{M}$ (P366L) für R271C-GlyRs (Abb. 30E). In beiden Dosis-Wirkungs-Kurven überlagern sich die sigmoidalen Trendlinien von wt und P366L, was ein Anzeichen für eine starke Ähnlichkeit der Ausgangswerte darstellt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Mutation P366L keinen Einfluss auf die Molekülbeweglichkeit der hier untersuchten extrazellulären Rezeptorbereiche (Loop C, TM2-3 Loop) hat.

3.4.5. Interaktion der Poly-Prolin-Sequenz mit intrazellulären Proteinen

Der TM3-4 Loop des GlyRs wird aufgrund der in Abschnitt 1.6.7. beschriebenen Eigenschaften als Ort posttranslationaler Modifikation angesehen. Des Weiteren ist vom GlyR β bekannt, dass der TM3-4 Loop die E-Domäne von Gephyrin bindet und den

Rezeptorkomplex auf diese Weise mit dem Zytoskelett an der Postsynapse verankert. Wie in Abbildung 24B zu sehen ist sind sich die Aminosäuresequenzen von GlyR α 1 und GlyR β im Bereich um P366L sehr ähnlich. Beide Untereinheiten bilden innerhalb der Sequenz $^{363}\text{TNPPPAPSK}^{371}$ (α 1) bzw $^{435}\text{KPPPAKPVI}^{443}$ (β) eine SH3-Konsensussequenz aus (Casacio et al., 2001). Für GlyR β wurde gezeigt, dass dieses Motiv an der Interaktion mit der SH3-Domäne von Syndapin I beteiligt ist (Del Pino et al., 2014). Interaktionspartner der α 1-Untereinheit des GlyR wurden bisher nicht identifiziert. In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse zur Untersuchung der Interaktion des TM3-4 Loops des GlyR α 1 mit dem zytosolisch exprimierten Protein Collybistin erläutert. Collybistin wurde ausgewählt, weil es ebenfalls eine SH3-Domäne ausbildet und mit dem TM3-4 Loop der α 2-Untereinheit des GABA $_A$ R interagiert (Saiepour et al., 2010). Des Weiteren wurde demonstriert, dass die 2. Collybistin-Spleißvariante ohne SH3-Domäne, die submembrane Aggregation von Gephyrin auslöst (Harvey et al., 2004a), welche heteromere GlyRs akkumulieren (Kins et al., 2000). Es wurde die Interaktion mit GlyR α 1 untersucht und überprüft, ob diese durch die Patientenmutation P366L beeinflusst wird, da diese innerhalb der SH3-Konsensussequenz liegt.

Als Initialexperiment wurde eine Koimmunpräzipitation aus Lysaten transfizierter HEK293-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit wt GlyR α 1 oder P366L in Kombination mit Collybistin 3 (CB3(SH3+)) transfiziert. Da die Interaktion im Rezeptorkomplex an der Synapse nicht aufgeklärt ist, wurden in einem weiteren Ansatz zusätzlich Gephyrin und GlyR β im selben Verhältnis kotransfiziert. Als Negativkontrolle wurde GFP transfiziert. Die Präzipitation wurde mit mab2b durchgeführt und für die Immundetektion im Western-Blot wurde ein spezifischer Collybistin-Antikörper (SySy, 261003) verwendet. Zur Kontrolle wurden die Lysate (Input) auf ein Gel aufgetragen und gegen GAPDH, GlyR α (mab4A) und Gephyrin gefärbt. Wie in Abbildung 31A zu sehen ist, konnte in den Proben, die mit mab2b präzipitiert wurden, eine spezifische Collybistin-Bande (60 kDa) detektiert werden. In der Negativkontrolle wurde hingegen keine Bande detektiert. Die Kontrollfärbungen der Lysate zeigt, dass der Glycinrezeptor nur in den (wt, P366L-) transfizierten Zellen vorhanden war (48 kDa). Die Gephyrin-Bande (93 kDa) wurde nur in den Gephyrin-transfizierten Proben detektiert. Als Ladekontrolle wurde gegen GAPDH (32 kDa) gefärbt. Zur Quantifizierung wurde der Quotient der Pixelintensitäten der Collybistin-Banden (IP) und der GAPDH-Banden (Input) gebildet und auf den wt normalisiert (Abb. 31B). Die Quantifizierung zeigt, dass die Interaktion zwischen GlyR α 1 und CB(SH3+) unabhängig von der Mutation P366L war. Ebenso wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der Transfektion mit Gephyrin

und GlyR β und der Kotransfektion von wt bzw. P366L mit CB(SH3+) festgestellt. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass es eine Interaktion zwischen GlyR α 1 und CB(SH3+) gibt, diese aber nicht durch P366L gestört wird.

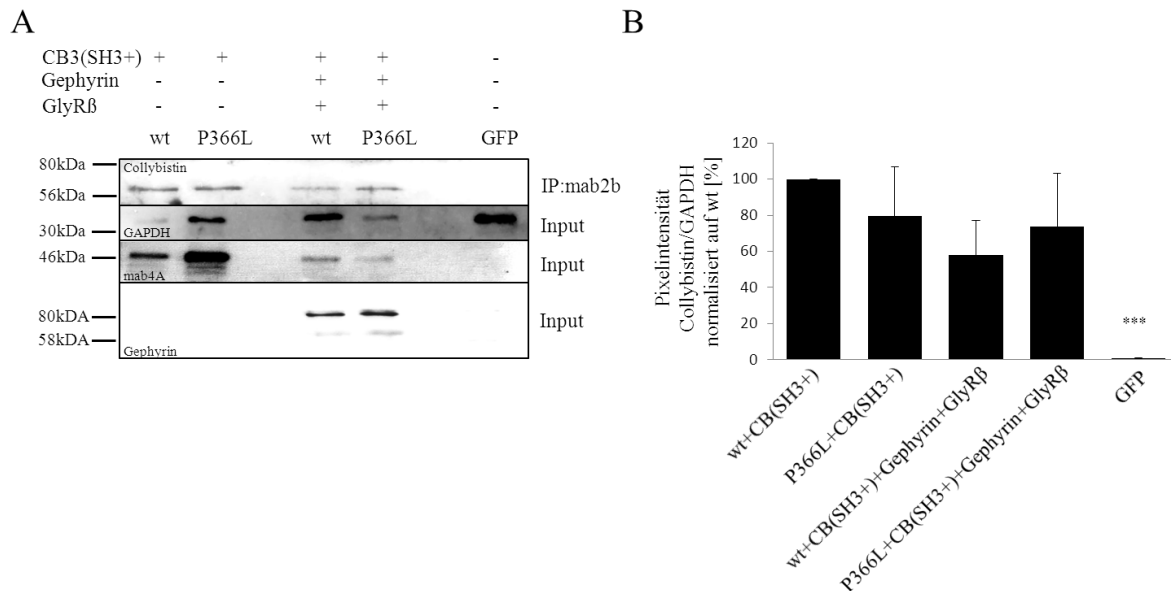


Abbildung 31. Koimmunpräzipitation von GlyR α 1 und Collybistin

A: HEK293-Zellen wurden mit wt GlyR α 1 oder P366L in Kombination mit CB(SH3+) transfiziert. In einem zweiten Ansatz wurden zusätzlich Gephyrin und GlyR β kotransfiziert. Die Zellysate wurden für die Präzipitation mit mab2b verwendet. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Die präzipitierten Proben (IP:mab2b) wurden gegen Collybistin und die Lysate (Input) gegen GAPDH, mab4A und Gephyrin gefärbt. Die Färbung zeigt eine Collybistin-Bande in den mab2-präzipitierten Proben. B: Quantifizierung der Pixelintensitäten der Collybistin-Banden normalisiert auf GAPDH und wt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den ersten 4 Konditionen festgestellt.

Die nachgewiesene Interaktion von GlyR α 1 und Collybistin sollte im nächsten Schritt über eine immunzytochemische Färbung analysiert werden. Dazu wurden Cos7-Zellen mit wt GlyR α 1 oder P366L, GFP-Gephyrin und Collybistin transfiziert. Um die Interaktion mit der SH3-Domäne von Collybistin untersuchen zu können, wurde in einem parallelen Ansatz die zweite Isoform (CB(SH3-)) kotransfiziert. Die Zellen wurden permeabilisiert und mit mab4A und dem Collybistin-Antikörper behandelt. Der Hintergrund warum für die immunzytochemische Färbung Cos7-Zellen verwendet wurden ist, dass diese Zellen (z.B. im Vergleich zu HEK293-Zellen) ein verhältnismäßig großes Zytoplasma ausbilden, was für die Untersuchung intrazellulär exprimierter Proteine von Vorteil ist. Zudem wurden die bisherigen Erkenntnisse über die Funktion und Lokalisation von Collybistin vorrangig unter Verwendung dieser Zelllinie gewonnen.

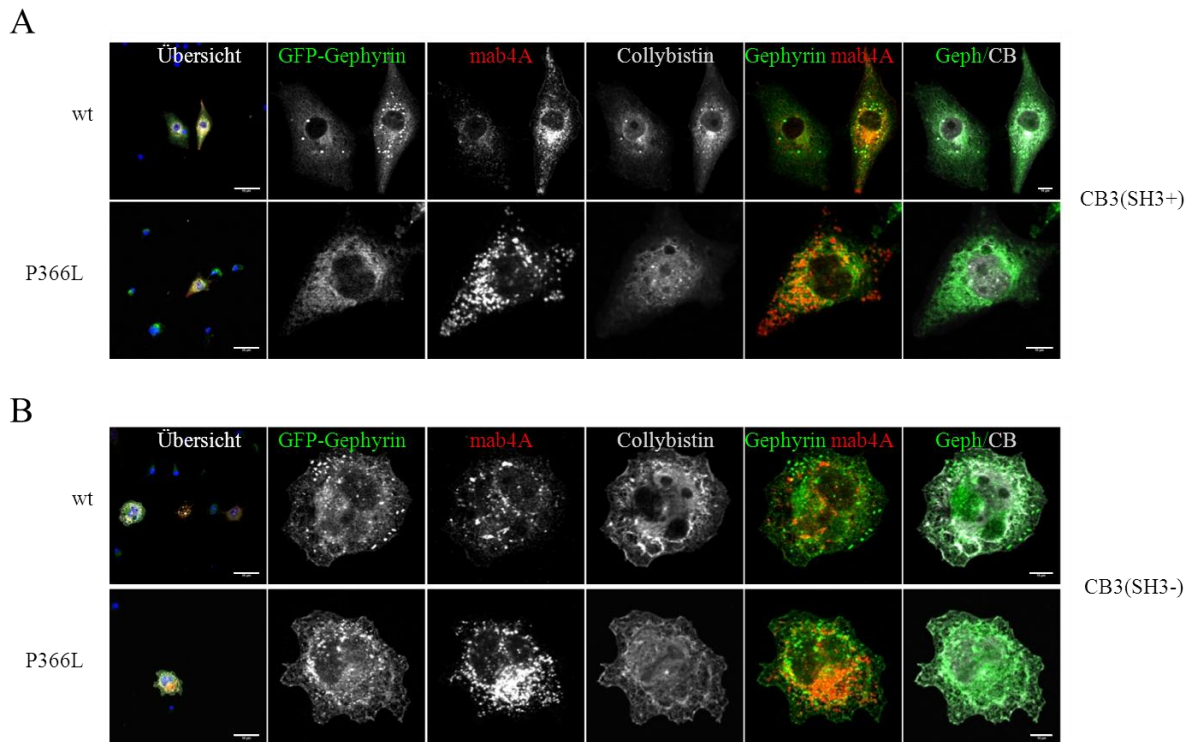


Abbildung 32. Immunzytochemische Detektion von Collybistin in transfizierten Cos7-Zellen

A: Färbung permeabilisierter, transfizierter Cos7-Zellen. Der GlyR wurde mit mab4A detektiert, Collybistin wurde mit dem spezifischen Collybistin-Antikörper (SySy, 261003) detektiert. Gephyrin wurde über die Fluoreszenz des GFP-tags visualisiert. Die Zellen wurden mit CB(SH3+) transfiziert. B: Färbung wie in (A) unter Verwendung der Isoform CB(SH3-). Weiße Balken in der Übersichts-Spalte entsprechen 50 µm, in der Geph/CB-Spalte 10 µm.

In Abbildung 32A ist die intrazelluläre Färbung von CB(SH3+) in Kombination mit Gephyrin und dem GlyR (mab4A) zu erkennen. Die Gephyrin- und mab4A-Signale wurden punktuell detektiert. Die Lokalisation beider Signale (Gephyrin mab4A-Spalte) ist zwischen wt und P366L sehr ähnlich, man sieht eine Signalüberlagerung in beiden Konditionen (gelbe Punkte). Das Collybistin-Signal wirkt in den P366L-transfizierten Zellen hingegen etwas schwächer, zeigt aber in beiden Konditionen eine räumliche Nähe zu Gephyrin (Gephyrin Collybistin-Spalte). Im Vergleich dazu ist das Collybistin-Signal in den CB(SH3-)-transfizierten Zellen (Abb. 32B) diffuser verteilt. Das Gephyrin-Signal tritt in dieser Kondition in Form von Mikroaggregaten auf. Es wurde kein Unterschied in der Lokalisation von Gephyrin und mab4A und Gephyrin und Collybistin zwischen wt und P366L festgestellt. Die immunzytochemische Färbung transfizierter Cos7-Zellen lieferte keinen Hinweis auf eine Interaktion zwischen GlyR α 1 und Collybistin, die durch P366L gestört wird.

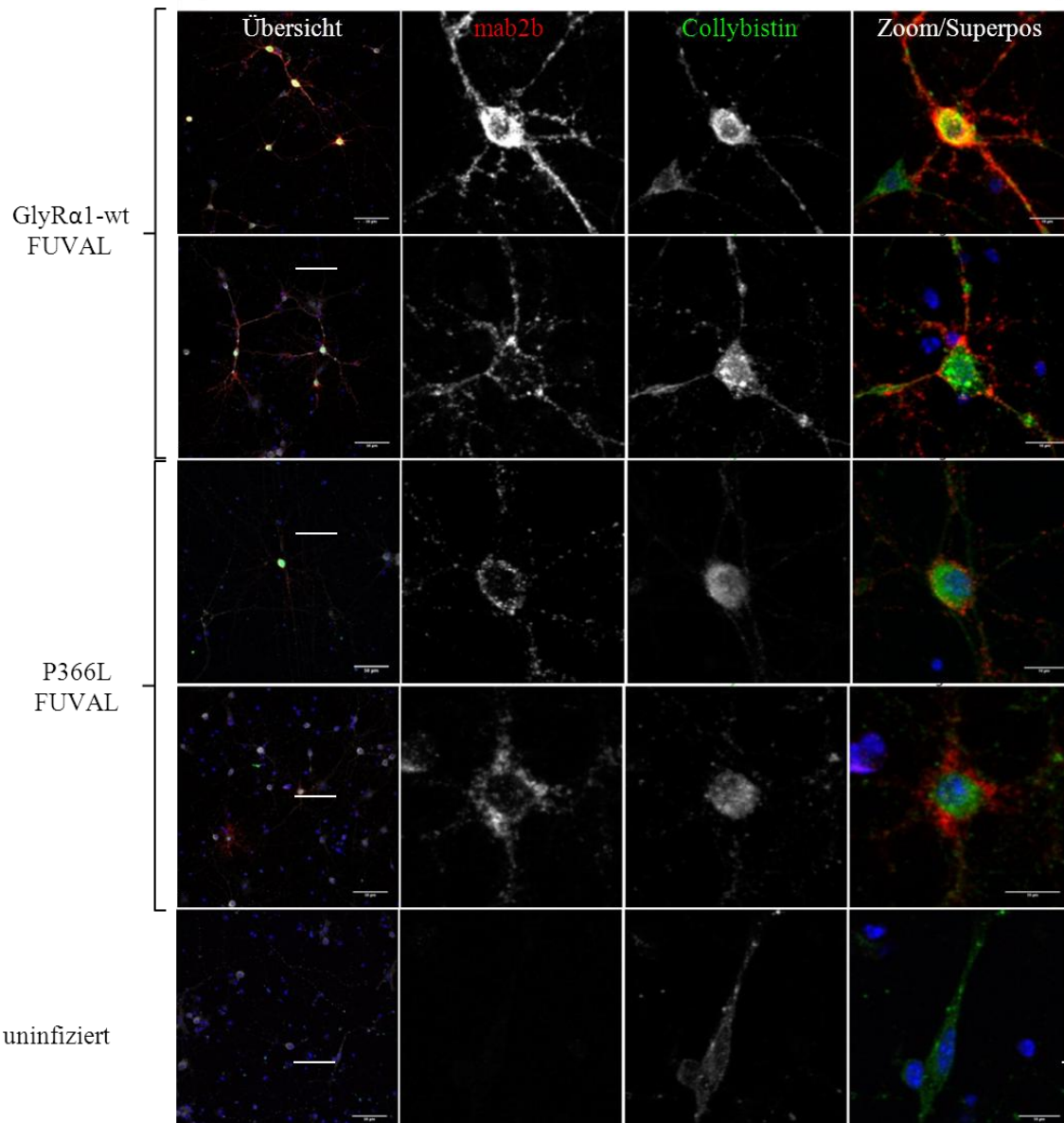


Abbildung 33. Immunzytochemische Detektion von Collybistin in infizierten Hippocampusneuronen

Färbung infizierter primärer Hippocampusneuronen der Maus (E18). Der über den FUVAl-Virus transportierte GlyR wurde mittels mab2b detektiert. Infizierte Zellen wurden anhand der GFP-Fluoreszenz detektiert. Bei der dargestellten Collybistin-Färbung handelt es sich um endogen angefarbtes Collybistin. Weiße Balken in der Übersichts-Spalte entsprechen 50 μm , in der Zoom/Superpos-Spalte 10 μm .

Um Artefakte der Überexpression ausschließen zu können, wurden im nächsten Experiment primäre Hippocampusneuronen mit dem *low-copy*-Vektor FUVAl_IRES2_GFP (transportiert wt GlyR α 1 oder P366L) infiziert und das endogene Collybistin untersucht. Ein Vorteil von der Verwendung dieser Neuronen ist, dass sie keinen synaptisch lokalisierten GlyR α 1 exprimieren. Die primären Hippocampusneuronenkulturen wurden am Tag der Präparation mit wt- oder P366L-FUVAl_IRES2_GFP infiziert und 14 Tage später analysiert. Dabei wurde

zunächst eine *LIVE*-Färbung des GlyR α 1 mit mab2b durchgeführt, anschließend die Zellen permeabilisiert und mit dem Collybistin-Antikörper inkubiert.

Anhand der in Abbildung 33 dargestellten Färbung erkennt man, dass der Transfer der rekombinanten GlyR-DNA über den FUVa1-Virus in Hippocampusneuronen stattgefunden hat. Während in uninfizierten Zellen kein mab2b-Signal detektiert werden konnte, sieht man in den (wt oder P366L-) infizierten Zellen ein spezifisches GlyR-Signal an der Oberfläche der Neuriten und des Somas. Dabei wurde in den P366L-FUVa1-infizierten Zellen ein deutlich schwächeres Signal detektiert als in wt GlyR α 1-infizierten Zellen. Dieser Effekt könnte jedoch durch einen schwächeren Virustiter des P366L-FUVa1-Virus bedingt sein. Die Intensität des GFP-Signals des viralen Konstruktes war in den mab2b-positiven Zellen (die mit P366L-FUVa1 infiziert wurden) ebenfalls schwächer (nicht dargestellt). Bei der Betrachtung des endogenen Collybistin-Signals fällt auf, dass die Intensität beim wt wesentlich höher ist als bei P366L. Beim wt wurden Collybistin-Signale in den Neuriten und dem Soma festgestellt, während diese Signale bei P366L vorrangig somatisch detektiert wurden. Zur Überprüfung dieser Beobachtung wurde die Collybistin-Signalintensität in FUVa1-positiven Zellen quantifiziert (Abb. 34).

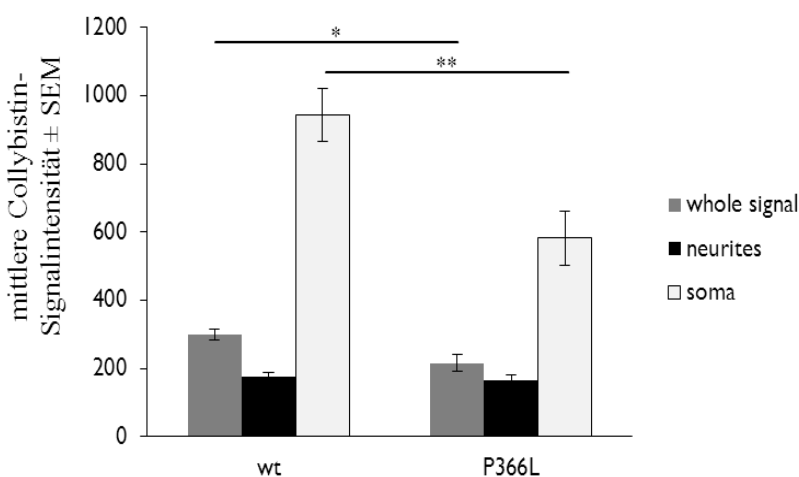


Abbildung 34. Quantifizierung der Intensität des Collybistin-Signals in infizierten Hippocampusneuronen

Die Signalintensität wurde in infizierten (GFP-positiven) Zellen insgesamt, im Soma und in den Neuriten mit der software Openview (Noam Ziv.) gemessen. Dabei wurde der mab2b-Kanal als Maske verwendet und innerhalb dieser *Cluster* die Intensität des Collybistin-Signals ermittelt. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ANOVA.

Die Quantifizierung der Signalintensitäten zeigt, dass das Collybistin-Signal in P366L-FUVa1-infizierten Zellen insgesamt und in den Somata signifikant reduziert war (insgesamt: $p = 0,01$; Soma: $p = 0,004$; ANOVA). Das bedeutet, dass in diesen Zellen weniger Protein gebildet und durch den Antikörper gebunden werden konnte.

Nachdem die dargestellten proteinbiochemischen Methoden gezeigt haben, dass Collybistin zusammen mit GlyR α 1 präzipitiert wird, wurde die Funktionalität des GlyRs in Abhängigkeit von der Anwesenheit von CB(SH3+) in HEK293-Zellen elektrophysiologisch untersucht. Da, wie bereits erläutert, die Interaktion zwischen GlyR und Collybistin im Rezeptorkomplex an der Synapse unbekannt ist, wurden wt oder P366L in Kombination mit CB3(SH3+) oder mit GlyR β bzw. mit Gephyrin in HEK293-Zellen kotransfiziert und die Maximalströme als Reaktion auf die Applikation von 1 mM Glycin gemessen.

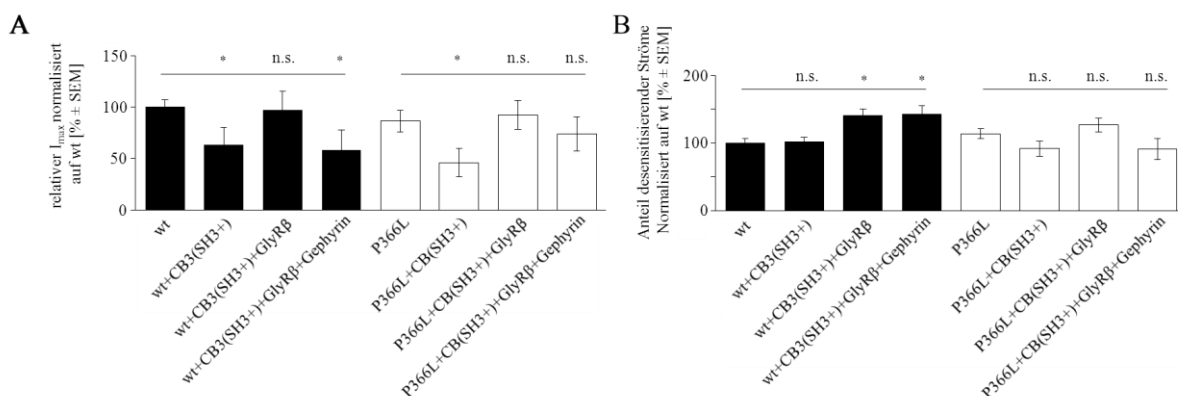


Abbildung 35. Elektrophysiologische Charakterisierung des Effektes von Collybistin auf die GlyR-Funktion in HEK293-Zellen

A: I_{max} -Werte der verschiedenen Kombinationen kotransfizierter GlyR-Komplex-Elemente als Reaktion auf die Applikation von 1 mM Glycin für 2 s. B: Funktionelle Charakterisierung der in (A) gemessenen Maximalströme. Dargestellt ist der Anteil desensitisierender Ströme der verschiedenen Konstrukt-Kombinationen. *, $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant ($p > 0,05$); ANOVA.

Die Kotransfektion von CB3(SH3+) hatte eine Reduzierung der Maximalströme auf $63,4\% \pm 9,9\%$ über den GlyR α 1 wt und $45,9\% \pm 7\%$ über P366L zufolge (Abb. 35A). In beiden Fällen war dieser Effekt statistisch signifikant (wt: $p=0,04$; P366L: $p=0,003$; ANOVA). Durch die zusätzliche Kotransfektion der β -Untereinheit wurden in beiden Fällen die Maximalströme der jeweiligen Einzeltransfektion zurückgewonnen. Durch die weitere Kotransfektion von Gephyrin wurde nur im Vergleich zum wt eine erneute Reduzierung der I_{max} -Werte auf $58\% \pm 10,6\%$ erreicht ($p=0,01$; ANOVA). Im Vergleich zur Einzeltransfektion von P366L war ein ähnlicher, aber nicht signifikanter Effekt zu beobachten ($p=0,07$; ANOVA). Bei der Analyse der desensitisierenden Stromanteile (Abb. 35B) wurde für den Rezeptorkomplex aus wt, CB3(SH3+) und GlyR β und dem Komplex aus wt, CB3(SH3+), GlyR β und Gephyrin eine beschleunigte Kanalkinetik mit $140,7\% \pm 9,4\%$ (wt + CB3(SH3+) + GlyR β ; $p=0,02$; ANOVA) bzw. $142,6\% \pm 11,9\%$ (wt + CB3(SH3+) + GlyR β + Gephyrin;

$p=0,04$; ANOVA) desensitisierender Ströme gemessen. Das Desensitisierungsverhalten von P366L wurde durch keine der kotransfizierten Elemente verändert.

Die elektrophysiologischen Messdaten belegen, dass P366L im Rezeptorkomplex mit Collybistin, GlyR β und Gephyrin einen messbaren Einfluss auf die Kanalkinetik hat, nicht aber auf die maximalen Chlorideinwärtsströme. Im Vergleich zur Einzeltransfektion von wt und P366L (Abb. 28) war der Anteil desensitisierender Ströme reduziert.

Fasst man die Ergebnisse zur Interaktion zwischen Collybistin und GlyR α 1 zusammen, lässt sich das Fazit ziehen, dass Collybistin mit der α 1-Untereinheit präzipitiert, diese Interaktion jedoch nicht wesentlich durch P366L beeinflusst wird. Die Färbung infizierter Hippocampusneuronen weist auf eine durch P366L induzierte Veränderung der Collybistinexpression und -lokalisation hin. Weitere Untersuchungen sind hier notwendig um unspezifische Effekte der Virusinfektion auszuschließen. Der Einfluss der PPII-Helix auf die Interaktion mit weiteren intrazellulären Proteinen bleibt bislang unbeantwortet.

4. Diskussion

4.1. Funktionelle *in vitro* Komplementation des murinen GlyR α 1

Die seltene erbliche Krankheit Hyperekplexie wird durch diverse Mutationen des GlyRs verursacht, welcher zu den wichtigsten Mediatoren schneller synaptischer Inhibition im zentralen Nervensystem von Säugetieren zählt (Bode and Lynch, 2014). Unter den humanen Mutationen sind 3 Null-Mutationen bekannt, die zum völligen Funktionsverlust des GlyR führen (Rees et al., 2001, Tsai et al., 2004, Bode et al., 2013a). Die *oscillator*-Maus $sp^{\text{ot/ot}}$ exprimiert ebenfalls eine nicht-funktionelle, trunkierte GlyR-Variante und zeigt einen Hyperekplexie-ähnlichen Phänotyp. Auf Proteinebene bewirkt die Leserrasterverschiebung den Verlust des multifunktionellen basischen Motivs $^{346}\text{RRKRR}^{351}$ am Beginn des TM3-4 Loops, des Großteils des TM3-4 Loops selbst sowie der TM4 inklusive C-Terminus. Um die Effekte des Verlustes des basischen Motivs von denen der Rezeptortrunkierung unterscheiden zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit und den 2009 und 2012 veröffentlichten Komplementationsstudien (Villmann et al., 2009a, Unterer et al., 2012) mit dem verkürzten GlyR α 1-trc gearbeitet, welcher das basische Motiv trägt.

In diesen Studien wurde gezeigt, dass die Funktionalität der verkürzten GlyR-Varianten α 1-trc und $sp^{\text{ot}}\text{-trc}$ *in vitro* durch Koexpression des Komplementationskonstruktes (myc-) iD-TM4 (*tail*) wiederhergestellt werden kann. Um den zugrunde liegenden Mechanismus der Interaktion zwischen α 1-trc und dem *tail* zu erforschen, wurde das Komplementationskonstrukt anschließend sukzessiv am N-Terminus verkürzt und herausgefunden, dass eine Deletion von mehr als 49 Aminosäuren zum Verlust der Komplementationsfähigkeit führt (Unterer et al., 2012). Es wurde geschlussfolgert, dass für die Interaktion zwei Grundvoraussetzungen erfüllt sein müssen: Das Komplementationskonstrukt muss (i) eine nicht definierte Mindestlänge vorweisen und (ii) N-terminal keine positiv geladenen Aminosäurereste tragen. Es wurde eine ionische Interaktion zwischen dem positiv geladenen C-Terminus des α 1-trc und dem N-Terminus des *tails* postuliert.

4.1.1. Geladene Aminosäurereste als Vermittler der Interaktion

In der vorliegenden Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf die Untersuchung einer ionischen Interaktion zwischen α 1-trc und *tail* untersucht. Dafür wurden dem funktionellen Konstrukt myc- Δ 22-iD-TM4 positiv geladenen Aminosäuren (myc-RRKRR Δ 22-iD-TM4) und den

funktionslosen Konstrukten myc- Δ 55-iD-TM4 und myc- Δ 62-iD-TM4 negativ geladene Aminosäuren angeheftet (myc-MEE55-iD-TM4, myc-EAEE Δ 62-iD-TM). Bei einer ionischen Interaktion wurde erwartet, dass die Komplementationsfähigkeit von myc-RRKRR Δ 22-iD-TM4 verloren geht, da nun die Interaktionsstelle an beiden Enden sich repulsierende positive Aminosäurereste enthielt. Ausgangspunkt dieser Überlegung war, dass bei den Experimenten zum *in vitro rescue* von α 1-trc (trägt RRKRR am C-Terminus) das Einbringen von positiven Ladungsmotiven an den N-Terminus des *tails* (RRKRR-iD-TM4) einen (nahezu) vollständigen Verlust der Glycin-induzierten Maximalströme nach Koexpression des *tails* zur Folge hatte (Villmann et al., 2009a).

Innerhalb der in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten elektrophysiologischen Experimente wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der Komplementation von α 1-trc mit myc- Δ 22-iD-TM4 (71% von wt I_{\max}) und myc-RRKRR Δ 22-iD-TM4 (42%) gemessen. Dieses Ergebnis spricht für eine Repulsion zwischen Aminosäureresten gleicher Ladung. Dagegen spricht, dass im Vergleich der beiden Vollängen-Rettungskonstrukte iD-TM4 und RRKRR-iD-TM4 das letztere mit 41% der wiederhergestellten Maximalströme den trankierten Rezeptor effektiver komplementierte als das Konstrukt ohne positiv geladenen N-Terminus (iD-TM4) mit 15%. Gegen eine rein ionische Interaktion spricht außerdem die Funktionslosigkeit der Konstrukte myc-MEE55-iD-TM4, myc-EAEE Δ 62-iD-TM. Die Anwesenheit negativer Ladungsmotive hatte hier keinen Einfluss auf die Komplementationeffizienz. Wie in Unterer et al., 2012 konnten nach der Koexpression dieser Konstrukte keine Ströme gemessen werden. Möglicherweise reichte hier das Anheften von 2-4 negativ geladenen Aminosäuren nicht aus, um eine generelle Komplementation zu ermöglichen. Das Anbringen von hydrophoben Aminosäureresten in myc-MAA55-iD-TM4, myc-AAAA Δ 62-iD-TM4 hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Funktionalität dieser Konstrukte.

Wenn man von einer ionischen Interaktion zwischen zwei separat exprimierten Konstrukten ausgeht, muss ebenfalls der Einfluss des myc-Epitops am N-Terminus der untersuchten *tails* beachtet werden. Die myc-Sequenz EQKLISEEDL beinhaltet drei stark negativ geladene Glutaminsäurereste und einen positiv geladenes Lysin. Es wurde demonstriert, dass die Anwesenheit des myc-Epitops einen Einfluss auf die Struktur und Funktion des fusionierten Proteins *in vitro* (Jiang et al., 2012) und *in vivo* (Shevtsova et al., 2006) haben kann. Für die Komplementation des α 1-trc wurde ebenfalls ein negativer Einfluss der myc-Sequenz auf die Komplementationsfähigkeit des *tails* gezeigt (Villmann et al., 2009a).

Nach der Entfernung der myc-Sequenz vom funktionslosen Rettungskonstrukt myc-EAEEΔ62-iD-TM4 (EAEEΔ62-iD-TM4) konnten 11% der wt I_{\max} -Werte zurückgewonnen werden. Nach Entfernung der myc-Sequenz des in Unterer et al., 2012 funktionslosen Konstruktes myc-Δ62-iD-TM4 (Δ62-iD-TM4) wurden 71% der wt Maximalströme gemessen. Diese Ergebnisse argumentieren für einen stärkeren Einfluss des myc-Epitops auf die Komplementationspotenz als das Anheften von positiv oder negativ geladenen Aminosäuren. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass beide Modifikationen unabhängig voneinander die Struktur der Interaktionsstelle verändern. Die Ergebnisse aus der Oberflächenbiotinylierung und der immunzytochemischen Färbung zeigen, dass die veränderten Rettungskonstrukte an der Plasmamembran von HEK293-Zellen detektiert werden können. Folglich ist ein Einfluss der genannten Modifikationen auf den Transport und die Assemblierung des GlyR unwahrscheinlich.

4.1.2. Spezielle Subdomänen als Vermittler der Interaktion

Eine weitere denkbare Art der Interaktion ist die zwischen ladungsunabhängigen Motiven innerhalb des TM3-4 Loops (des *tails*) mit dem C-Terminus des $\alpha 1$ -trc. Diese Interaktion könnte ebenso indirekt über intrazellulär exprimierte Proteine stattfinden, welche bis dato nicht identifiziert wurden.

So fehlen den funktionslosen Rettungskonstrukten myc-Δ55-iD-TM4 und myc-Δ62-iD-TM4 in Unterer et al., 2012 die beiden in der V2-Region lokalisierten Motive ³⁹⁴NNNN³⁹⁷ und ³⁹⁹TNPPPAPSKS⁴⁰⁹. Die Bedeutung von ³⁹⁴NNNN³⁹⁷ für die Kanalfunktion des GlyR ist bislang unerforscht. In Hefezellen konnte jedoch gezeigt werden, dass Poly-Asparagin-Abschnitte an der Ausbildung von Proteinaggregaten beteiligt sind, die den Aggregationen des Huntingtinproteins sehr ähnlich sind (Perutz et al., 2002, Peters and Huang, 2007). Die Deletion von ³⁹⁴NNNN³⁹⁷ in den Vollängenkonstrukten ΔN394-397+ASS und ΔN394-397-ASS führte zu einer signifikanten Reduzierung der Maximaleinwärtsströme im Vergleich zum wt. Diese Daten zeigen, dass das Poly-N-Motiv einen deutlichen Einfluss auf die Kanalfunktion des GlyR hat. Dieser Einfluss ist dabei unabhängig von der Anwesenheit der alternativen Spleißkassette (ASS) ³⁵⁴SPMLNLFQ³⁶¹ im TM3-4 Loop. Elektrophysiologische Untersuchungen beider Spleißvarianten des GlyR $\alpha 1$ in Oozyten konnten ebenfalls keinen Unterschied in der Kanalfunktion und Pharmakologie feststellen (Malosio et al., 1991a). So ist auch vom GlyR $\alpha 3$ bekannt, dass die Spleißkassette im TM3-4 Loop keinen Einfluss auf die Glycin-induzierten Maximalströme hat, allerdings auf die Kanalkinetik (Nikolic et al.,

1998). Der Einfluss der Spleißkassette auf die Kinetik wurde in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht.

Für die Komplementation von $\alpha 1$ -trc scheinen weder die Aminosäuren ³⁹⁴NNNN³⁹⁷ noch ³⁹⁹TNPPPAPSKS⁴⁰⁸ von wesentlicher Bedeutung zu sein. Durch Koexpression des Rettungskonstrukts $\Delta 62$ -iD-TM4 wurde der trunkierte Rezeptor $\alpha 1$ -trc am effektivsten komplementiert. Dieses Konstrukt beinhaltet nur die letzten 10 Aminosäuren (⁴¹⁹RAKKIDKISR⁴²⁸) des TM3-4 Loops, die TM4 und den sich anschließenden kurzen C-Terminus. Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Aminosäuren L357-Q418 für die Komplementation nicht essentiell sind. Dass sich trotz der starken Trunkierung des *tails* ein funktioneller Ionenkanal aus unabhängigen Domänen an der Plasmamembran von HEK293-Zellen ausbilden kann, lässt sich auf unterschiedliche Art und Weise erklären. Zum einen wurde bereits gezeigt, dass der verkürzte (humane) GlyR $\alpha 1$ E326X durch Koexpression eines Rettungskonstruktes analog zu myc- $\Delta 55$ -iD-TM4 komplementiert werden kann (Haeger et al., 2010). In dieser Studie wurde das *tail*-Konstrukt C-terminal mit einer Hexahistidin-Sequenz markiert. Für die pentamere Assemblierung wurde ein Netzwerk aromatischer Aminosäuren innerhalb der Transmembransegmente 1, 3 und 4 postuliert, welches durch die Trunkierung nicht beeinträchtigt wurde. Aufgrund der Sequenzhomologie zwischen humanem und murinem GlyR $\alpha 1$ ist davon auszugehen, dass das in der vorliegenden Arbeit verwendete Konstrukt myc- $\Delta 55$ -iD-TM4 nach Deletion der myc-Sequenz den $\alpha 1$ -trc ähnlich effizient komplementiert wie $\Delta 62$ -iD-TM4, da die aromatischen Aminosäuren in den helikalen Rezeptorbereichen nicht verändert sind. Nach der in Haeger et al., 2010 formulierten These findet die Interaktion von trunkierten Rezeptor und *tail* nicht zwischen Domänen des TM3-4 Loops statt, sondern zwischen bestimmten Aminosäureresten benachbarter Transmembrandomänen einer Proteinuntereinheit.

Zum anderen lässt sich die effektive Komplementation mit $\Delta 62$ -iD-TM4 durch die Anwesenheit der basischen Motive am C-Terminus von $\alpha 1$ -trc und am N-Terminus des *tails* erklären. Diese Bereiche sind die einzigen Abschnitte des TM3-4 Loops, von denen eine geordnete helikale Struktur vorausgesagt wurde (Burgos et al., 2015). Der Großteil an Informationen über die Funktion distinkter Domänen innerhalb des TM3-4 Loops stammt von den Motiven ³¹⁴LLRFRRKRR³²² und ³⁸⁵KKIDK³⁸⁹. Es wurde demonstriert, dass diese Bereiche wichtig für die Membranintegration, die Interaktion mit G-Proteinuntereinheiten sowie den Karyopherinen $\alpha 3$ und $\alpha 4$, die Phosphorylierung und für die Ausprägung intrazellulärer Portale sind, die wichtige Determinanten der Einzelkanalleitfähigkeit sind (Sadler et al., 2003, Yevenes et al., 2006, Huang et al., 2007, Carland et al., 2009, Melzer et

al., 2010, Yevenes et al., 2010, Yevenes and Zeilhofer, 2011b). Wenn diese beiden Motive intakt vorliegen sind somit die Grundvoraussetzungen für eine funktionelle Komplementation gegeben. Die genaue Form der Interaktion konnte in dieser vorliegenden Arbeit nicht entschlüsselt werden.

4.2. *In vivo* Komplementation des *oscillator* Phänotyps

Die Ergebnisse der *in vitro* Komplementation des GlyR zeigen, dass es möglich ist, trunkierte GlyR α 1-Varianten durch Koexpression der C-terminalen Domäne iD-TM4 (L357-K457) zu funktionellen Rezeptoren zu vervollständigen (Villmann et al., 2009a, Unterer et al., 2012). In wieweit sich diese Erkenntnisse auf eine *in vivo* Situation übertragen lassen, ist bislang nicht bekannt. Für das Hyperekplexie-Mausmodell *spastic*, welches eine Mutation in *Glrb* trägt, die zu einer stark reduzierten Expression der GlyR β -Untereinheit führt (Keramidas et al., 2004, Becker et al., 2012), konnte bereits eine Abmilderung des Phänotyps durch Einbringen des (transgenen) funktionellen Vollängen-GlyR β demonstriert werden (Hartenstein et al., 1996).

Ziel dieser Arbeit war es, den letalen *oscillator*-Phänotyp durch Rückkreuzung mit einer transgenen Mauslinie tg *Glr1-Ex9* zu retten. In früheren Studien innerhalb der Arbeitsgruppe wurde dafür ein Transgen bestehend aus dem Rettungskonstrukt myc-iD-TM4 und dem Thy1-Promotor generiert und über Pronukleusinjektion in die wildtypische Mauslinie C57BL/6J eingebracht (Unterer, 2012). Diese Tiere wurden mit heterozygoten *oscillator*-Mäusen verpaart, um die Komplementationsfähigkeit des transgenen Proteins in homozygoten Tieren ($spd^{ot/ot}$) *in vivo* untersuchen zu können. Das transgene Protein konnte jedoch in keinem der untersuchten Gewebe detektiert werden. Ebenso wurde bei transgenen $spd^{ot/ot}$ -Mäusen keine Abmilderung des Hyperekplexie-Phänotyps oder eine verlängerte Lebensdauer beobachtet. Es wurde argumentiert, dass die Aktivität des Thy1-Promotors ab dem postnatalen Tag 10 (Caroni, 1997) zu spät für die Komplementation des mutierten GlyR α 1 sein könnte, da die Hyperekplexie-Symptome der *oscillator*-Linie bereits ab P13-P14 sichtbar sind.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit in Kooperation mit C. Gross (EMBL, Monterotondo, Italien) ein ähnliches Konstrukt generiert, in welchem die Expression von CFP-iD-TM4 durch den Glycinrezeptor-Promotor reguliert wird. Es wurde davon ausgegangen, dass somit die Expression von iD-TM4 parallel zur Expression des GlyR α 1 angeschaltet wird. Im Vorfeld wurden verschiedene Rettungskonstrukte in HEK293-Zellen auf eine erhöhte Komplementationseffizienz elektrophysiologisch untersucht. Es konnte

gezeigt werden, dass das Konstrukt CFP-iD-TM4-pECFP-C1 $\alpha 1$ -trc in HEK293-Zellen ca. dreimal effektiver komplementiert als das bisher verwendete Konstrukt myc-iD-TM4. Weiterhin wurde demonstriert, dass dieses Konstrukt nach der Kotransfektion beide Spleißvarianten des *oscillator*-GlyR spd^{ot} -trc und spd^{ot} -elg funktionell komplementieren kann. Im Vergleich zu den Resultaten zum *in vitro rescue* des *oscillator*-GlyR 2009 bedeutet das eine 8-fache Steigerung der Komplementationeffizienz (Villmann et al., 2009a). Wie sind diese Unterschied zu erklären?

Zum einen wurden zwei verschiedene Expressionsvektoren verwendet. Die für die Generierung des Transgens verwendeten Rettungskonstrukte lagen im Vektor pECFP-C1 (Clontech) vor, während zuvor der Expressionsvektor pRK7 verwendet wurde. Beide Vektoren exprimieren den CMV-Promotor, der eine stetige Überexpression des Plasmids in transfizierten Säugetierzellen gewährleistet. Trotzdem ist denkbar, dass weitere Elemente innerhalb der Plasmidsequenz für eine unterschiedlich starke Expression verantwortlich sein können. In Villmann et al., 2009 wurde das Konstrukt myc-iD-TM4 im Verhältnis 1:9 ($\alpha 1$ -trc/ spd^{ot} -trc: *rescue tail*) transfiziert. CFP-iD-TM4-pECFP-C1 wurde hingegen im Verhältnis 1:2 transfiziert. Aus diesem Grund ist es unwahrscheinlich, dass die gemessenen Maximalströme allein aus einer unterschiedlich starken Expression der *tails* resultierten. Stattdessen liegt nahe, dass die Unterschiede in der Sequenz außerhalb iD-TM4 für die unterschiedliche Komplementationeffizienz verantwortlich waren.

Einer dieser Unterschiede ist das Fehlen der myc-Sequenz am N-Terminus von iD-TM4 in CFP-iD-TM4-pECFP-C1. Wie bereits am Beispiel von $\Delta 62$ -iD-TM4 erläutert, hat die myc-Sequenz einen starken Einfluss auf die Funktionalität der Rettungskonstrukte. Möglicherweise hat die CFP-Sequenz in CFP-iD-TM4-pECFP-C1 einen geringeren Einfluss auf die Interaktion zwischen trunkiertem Rezeptor und *tail* als die myc-Sequenz. Dafür spricht ebenso, dass die lange *oscillator*-Spleißvariante spd^{ot} -elg durch das pECFP-C1, nicht aber durch myc-iD-TM4 komplementiert werden konnte. Der andere Unterschied ist die Abwesenheit der Signalpeptidsequenz (SP) in dem effektiveren pECFP-C1-Konstrukt. Diese kurze Sequenz (28 Aminosäuren) dient in eukaryotischen Zellen als Signal für die Translokation vom ER zur Zellmembran (Rapoport, 2007). Es ist jedoch unklar, ob das SP während des Transports oder nach Einbau des Proteins in die Plasmamembran enzymatisch abgebaut wird. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass die Integration von Transmembranproteinen durch Signale innerhalb der Aminosäuresequenz selbst gesteuert wird. So konnte für 1 Transmembranproteine gezeigt werden, dass die korrekte Integration in die Plasmamembran von positiv geladenen Aminosäuren in flankierenden, zytoplasmatischen

und extrazellulären Bereichen abhängig ist (Andersson et al., 1992, Gafvelin et al., 1997). Dabei wurde demonstriert, dass zytoplasmatische Bereiche mehr positiv geladene Aminosäuren beinhalten als extrazelluläre und dass durch Störungen dieses Verhältnisses die Orientierung der TM-Domäne in der Plasmamembran verändert werden kann. Möglicherweise ist deshalb die Anwesenheit der SP-Sequenz in CFP-iD-TM4-pECFP-C1 für die Integration eines funktionellen Rettungskonstrukts in HEK293-Zellen nicht notwendig.

4.2.1. Detektion der Proteinexpression

Die Präsenz der transgenen DNA wurde im Gewebe der 5 *Founder* mittels PCR erfolgreich nachgewiesen. Die Nachkommen dieser Tiere wurden in den *oscillator*-Stamm zurückgekreuzt. Zur Untersuchung des Effekts des transgenen Rettungskonstruktes wurden diese Tiere nach mehreren Generationen untereinander verpaart, um transgene homozygote *oscillator*-Mäuse zu erhalten. Auch in diesen Tieren konnte die transgene DNA nachgewiesen werden. Beim Vergleich transgener und nicht-transgener $spd^{ot/ot}$ -Mäuse wurde kein Unterschied in der Lebensspanne oder dem Phänotyp festgestellt. Wie in der Studie zuvor konnte in der Membranpräparation aus dem Rückenmark transgener Mäuse kein GlyR Protein detektiert werden (Unterer, 2012). Diese Experimente sprechen dafür, dass entweder keine oder nur sehr geringe Konzentrationen des transgenen Proteins vorliegen und dass deshalb keine Rezeptorkomplementation stattfinden konnte. Hierfür sind verschiedene Gründe denkbar.

Auf Transkriptionsebene kann die Menge der gebildeten RNA reduziert sein. Diese ist abhängig von Ort der Integration des Transgens sowie von dessen Kopienzahl. Die zufällige Integration multipler Kopien des transgenen Konstrukts an einer unbekannt Stelle des Genoms kann zur Inaktivierung der transgenen DNA führen (Ohtsuka et al., 2012). Ein zielführendes Experiment zur Untersuchung des Transgens auf Transkriptionsebene wäre eine quantitative (Echtzeit-) PCR, bei der die Menge des transgenen Transkripts in Relation zu einem Kontrolltranskript gemessen wird.

Auch über die Beeinträchtigung der Translationsebene kann nur spekuliert werden. Es ist möglich, dass die RNA produziert, aber nicht in eine Aminosäuresequenz umgeschrieben wurde. So ist Beispielsweise vorstellbar, dass durch die Injektion der cDNA (ohne Introns, 5',3'-UTRs) am Ort der Integration essentielle regulatorische Elemente fehlen und die Translation nicht stattfinden kann. Zur weiteren Charakterisierung des transgenen Proteins

wäre die immunzytochemische Färbung von Gewebeschnitten essentiell. Aufgrund der CFP-Sequenz im transgenen Konstrukt, wäre entweder eine direkte Anregung mit monochromatischem Licht (405 nm) oder eine indirekte Visualisierung über die Reaktion mit CFP-Antikörpern zur Detektion des Proteins möglich.

Die letzte Ebene auf der die Genexpression des Transgens betroffen sein kann ist der Proteinabbau. Zum Beispiel ist denkbar, dass die parallele Expression des funktionslosen Rettungskonstruktes in den wildtypischen *Foundern* eine verstärkte Degradation des transgenen Proteins verursacht. Des Weiteren kann es sein, dass die Expression entwicklungsabhängig stattfindet. Die Genotypisierungen wurden, mit Ausnahme der *Founder*, stets mit dem Gewebe sehr junger Tiere (P7-P20) durchgeführt. Eine altersabhängige Genotypisierung (E18-adult) in Kombination mit proteinbiochemischen Methoden könnte hier Aufschluss darüber geben, ob und wann das transgene Protein gebildet wird. Weiterhin ist denkbar, dass durch die fehlende SP-Sequenz des transgenen Komplementationskonstrukts dessen Translokation zur Plasmamembran von Neuronen gestört wird und das reife Protein proteolytisch degradiert wird.

Aufgrund der fehlenden Expression des transgenen Proteins war die *in vivo* Komplementation des *oscillator*-GlyRa1 nicht möglich. Zur weiteren Untersuchung empfiehlt sich die Generierung einer gezielt-transgenen Mauslinie, zum Beispiel unter Verwendung der Cre-Lox-Rekombination oder der Zinkfinger-Nuklease-Technologie.

4.3. Einfluss der Länge des TM3-4 Loops auf die Rezeptorfunktion

Während frühere Studien die Architektur der Untereinheiten der Cys-Loop-Rezeptorfamilie als Komposition aus 2 Elementen, der extrazellulären und der transmembranen Domäne, beschrieben haben (Eisele et al., 1993), geht man heutzutage davon aus, dass der TM3-4 Loop dieser Rezeptoren als eigenständige, dritte Domäne zu betrachten ist (Goyal et al., 2011, Unterer et al., 2012). Die Entdeckung homologer prokaryotischer Ionenkanäle, welche im Gegensatz zu ihren eukaryotischen Verwandten keine (große) intrazelluläre Domänen besitzen (Tasneem et al., 2005), wirft die Frage nach der Funktion dieses Rezeptorbereiches auf. Die Kristallstrukturen dieser bakteriellen Ionenkanäle, GLIC (*Gloeobacter violaceus* ligand-gated ion channel) und ELIC (*Erwinia chrysanthemi* LGIC), demonstrieren die verschiedenen Konformationen LGICs im offenen (GLIC) und geschlossenen Kanalzustand (Hilf and Dutzler, 2008, Bocquet et al., 2009, Hilf and Dutzler, 2009b). Ob es sich bei der GLIC-Struktur um einen offenen oder desensitisierten Kanalzustand handelt, ist derzeit

Gegenstand wissenschaftlicher Kontroversen (Bocquet et al., 2007, Gonzalez-Gutierrez and Grosman, 2010, Parikh et al., 2011). Der Austausch des TM3-4 Loops verschiedener CLRs gegen die ICD von GLIC (SQPARAA) hat *in vitro* keinen Einfluss auf die allgemeine Funktion dieser chimären Rezeptoren (Jansen et al., 2008, Papke and Grosman, 2014). In der vorliegenden Arbeit wurden chimäre GlyRs generiert, bei denen unterschiedliche Bereiche des TM3-4 Loops durch die Sequenz SQPARAA ersetzt wurden. Auf diese Weise konnte der Einfluss der Loop-Länge in Abhängigkeit von der Anwesenheit der multifunktionellen basischen Motive ³¹⁸RRKRR und ³⁹³KKIDK auf die Biogenese, Expression und Kanalfunktion des GlyR untersucht werden.

Es wurde bestätigt, dass die Anwesenheit dieser basischen Motive für Integration des GlyR α 1 in die Plasmamembran notwendig ist. Obwohl die zytosolische Expression des Konstrukts GlyR α 1-GLIC (welchem diese basischen Motive fehlen) und die Assoziation mit der äußeren Zellmembran demonstriert werden konnte, schlug die Detektion dieser Chimäre in der *LIVE*-Färbung transfizierter HEK293-Zellen fehl. Diese Art der Visualisierung Antikörpergebundener Epitope gibt jedoch keine Auskunft über die Orientierung des Proteins in der Plasmamembran. Deshalb ist es möglich, dass die Mutation eine globale Konformationsänderung des Rezeptors verursacht, die dazu führt, dass das Konstrukt zwar in die Zellmembran eingebaut, das Zielepitop jedoch nicht mehr dem extrazellulären Lumen ausgesetzt ist und vom spezifischen Antikörper gebunden werden konnte. Die Verwendung eines weiteren, GlyR α 1-spezifischen Antikörpers führte zum selben Ergebnis. Diese Daten sprechen dafür, dass durch die Abwesenheit der basischen Motive die Integration des GlyR in die Plasmamembran gestört wird. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass beide Antikörper dasselbe Epitop binden.

Eine veränderte globale Rezeptorkonformation von GlyR α 1-GLIC wurde durch die Nichtfunktionalität dieser GlyR α 1-GLIC-Kanäle in den elektrophysiologischen Ableitungen bestätigt. Auch für das Kontrollkonstrukt ^{doppel}AAAAA, bei welchem beide basischen Motive durch Alanine ersetzt wurden (jedoch keine Loop-Trunkierung vorgenommen wurde), konnten keine Glycin-induzierten Chloridströme gemessen werden. Eine mögliche Erklärung warum beide Konstrukte nicht in der Lage waren funktionelle Ionenkanäle auszubilden, bietet die sogenannte *positive inside rule* (Regel des positiven Inneren). Diese besagt, dass bei bakteriellen Transmembranproteinen zytoplasmatische Domänen mehr positiv geladene Aminosäurereste tragen als extrazelluläre und dass auf diese Weise die Orientierung der Transmembrandomänen gewährleistet wird (von Heijne, 1992, Monne et al., 1998). Diese Regel kann auch auf eukaryotische Proteine übertragen werden, mit dem Unterschied, dass

extrazelluläre Domänen mehr positive Ladungsträger beinhalten können als prokaryotische (Gafvelin et al., 1997). Da der Verlust der basischen Motive in GlyR α 1-GLIC und ^{doppel}AAAAA mit dem Verlust positiv geladener Aminosäurereste einhergeht, ist denkbar, dass die Transmembrandomänen dieser Konstrukte fehlerhaft in die Plasmamembran integrieren und dies die Nichtfunktionalität des Rezeptors bedingt. Der Verlust des N-terminalen basischen Motivs ³¹⁶RFRRKRR kann ebenso zu einer fehlerhaften Faltung des reifen Proteins führen, welche eine erhöhte proteolytische Degradation verursacht (Sadler et al., 2003). Da die Insertion des Heptapeptids SQPARAA zwischen TM3 und TM4 des GABA ρ 1R hingegen keinen Einfluss auf funktionelle Eigenschaften des Rezeptors hat (Jansen et al., 2008), ist anzunehmen, dass die basischen Motive im TM3-4 Loop des GlyRs rezeptorspezifische Eigenschaften determinieren.

Die Konstrukte GlyR α 1-GLIC(+)_{bm} und GlyR α 1- Δ TM3-4(+)_{bm} enthielten die basischen Motive und bildeten funktionelle Ionenkanäle aus. Obwohl für beide Konstrukte eine stark reduzierte Expression im Zytosol und an der Plasmamembran festgestellt werden konnte, waren die Maximaleinwärtsströme und die Kanalkinetik für GlyR α 1-GLIC(+)_{bm} im Vergleich zum wt GlyR α 1 nicht signifikant verändert. Für GlyR α 1- Δ TM3-4(+)_{bm} wurden hingegen signifikant reduzierte Maximalströme und eine vollständige Rezeptordesensibilisierung gemessen. Der einzige Unterschied zwischen beiden Konstrukten ist die Anwesenheit der sieben Aminosäuren SQPARAA zwischen den basischen Motiven. Diese Resultate sprechen dafür, dass die Länge des Bereichs zwischen diesen Domänen eine wichtige Determinante für funktionelle Kanaleigenschaften des GlyR darstellt. Werden beide Domänen direkt miteinander verbunden, werden auf beiden Seiten des TM3-4 Loops α -helikale, zytoplasmatische Erweiterungen verknüpft (Burgos et al., 2015, Du et al., 2015). Diese veränderte Konformation lässt keine Ausbildung funktioneller Ionenkanäle zu. Für die δ -Untereinheit des nAChR wurde gezeigt, dass die Existenz ungefalteter Domänen im TM3-4 Loop eine wichtige Voraussetzung für den Aufbau großer Multiproteinkomplexe darstellen (Kukhtina et al., 2006). Für die α 7-Untereinheit des nAChR wurde ebenfalls demonstriert, dass die Deletion des kompletten TM3-4 Loops zwischen den helikalen Elementen am N- und C-Terminus zum vollständigen Funktionsverlust des Rezeptors führt (Valor et al., 2002).

Die funktionellen Konstrukte GlyR α 1-GLIC(+)_{bm} und GlyR α 1- Δ TM3-4(+)_{bm} unterschieden sich wesentlich in ihrem Desensibilisierungsverhalten. Die Applikation einer sättigenden Glycinkonzentration bewirkte in GlyR α 1- Δ TM3-4(+)_{bm} den Übergang aller Rezeptoren in einen geschlossenen, desensibilisierten Kanalzustand. Die Insertion von SQPARAA zwischen die beiden basischen Motive (GlyR α 1-GLIC(+)_{bm}) führte hingegen zu GlyRs mit einem

niedrigen Anteil desensitisierender Ströme, welche sich nicht signifikant vom wt GlyR α 1 unterscheiden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Desensitisierung des GlyR α 1 von der Sequenz zwischen den basischen Motiven mitbestimmt wird. Ebenso wurde gezeigt, dass die 15 Aminosäuren umfassende Spleißkassette im TM3-4 Loop von α 3L für das unterschiedliche Desensitierungsverhalten im Vergleich zur kurzen Spleißvariante α 3K verantwortlich ist (Nikolic et al., 1998, Meiselbach et al., 2014). Weiterhin wurde demonstriert, dass die Insertion von SQPARAA an einer anderen Stelle innerhalb des TM3-4 Loops (zwischen Q310 und K385) ebenfalls einen Einfluss auf die Desensitisierung des GlyR hat (Papke and Grosman, 2014). Die Hyperekplexiemutation P250T, die zwar ebenfalls im zytoplasmatischen Bereich des GlyR, aber nicht im TM3-4 Loop lokalisiert ist, führt zur Ausbildung von funktionellen Anionenkanälen, die ebenfalls einen sehr hohen Anteil desensitisierender Ströme aufweisen (Saul et al., 1999, Breitinger et al., 2001).

Die Ergebnisse der Charakterisierung der GlyR α 1-GLIC-Chimären erlauben die Schlussfolgerung, dass die Länge des TM3-4 Loops des GlyR α 1 die Desensitisierung des Rezeptors beeinflusst und die Separierung beider basischer Motive eine kritische Determinante für die Kanalfunktion darstellt.

4.4. Charakterisierung der Patientenmutation P366L

Die häufigste genetische Ursache für die Ausprägung der neurologischen Bewegungsstörung Hyperekplexie sind Mutationen in *GLRA1* (Bode and Lynch, 2014). Hyperekplexiepatienten werden effektiv mit dem Benzodiazepin Clonazepam behandelt, welches den inhibitorischen GABA_AR positiv moduliert (Bakker et al., 2006) und vermutlich den fehlenden inhibitorischen Input des GlyR kompensiert. Die Charakterisierung des Einflusses von Mutationen auf die glycinerge Neurotransmission hilft dabei, den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion bestimmter Subdomänen besser zu verstehen. Innerhalb des TM3-4 Loops des GlyR α 1 wurden bis heute die 5 Mutationen R316X, G342S, D388A, E375X und R392H identifiziert. E375X wird rezessiv vererbt, während die anderen Mutationen gemischt heterozygot, in Kombination mit einer anderen Mutation in *GLRA1*, vererbt werden (Bode et al., 2013a). *In vitro* Studien konnten belegen, dass diese Mutationen eher einen Einfluss auf den Transport und die Stabilität des Rezeptors an der Plasmamembran zufolge haben als auf physiologischen Kanaleigenschaften (Villmann et al., 2009b, Chung et al., 2010, Schaefer et al., 2015). Die bisher unbekannte Patientenmutation P366L ist hingegen die erste Hyperekplexie-assoziierte Mutation im TM3-4 Loop des GlyR α 1, die einen dominanten

Erbgang aufweist. Ziel dieser Arbeit war es mit proteinbiochemischen, immunzytochemischen, molekularbiologischen und elektrophysiologischen Methoden die molekularen Auswirkungen dieser Punktmutation auf die Biogenese, Expression und Kanalfunktion des GlyR α 1 zu charakterisieren, um den zugrundeliegenden Pathomechanismus der Hyperekplexie erklären zu können.

4.4.1. Einfluss auf die Biogenese des GlyR

Ein Großteil der bisher bekannten Hyperekplexie-Mutationen des GlyR α 1 bewirkt eine Reduzierung der Glycin-induzierten Chloridströme über die Rezeptordichte an der Plasmamembran, nicht jedoch über die Veränderung der funktionellen Kanaleigenschaften (Villmann et al., 2009b). Um zu überprüfen, ob P366L ebenfalls die Expression an der Plasmamembran beeinträchtigt, wurde das Expressionsmuster in transfizierten HEK293-Zellen analysiert. Dabei wurden weder in der Gesamtzellexpression noch in der Membranexpression an der Zelloberfläche Unterschiede in der Lokalisation der Signale zwischen wt und P366L festgestellt. Weitere Aminosäuresubstitutionen an Position 366 hatten ebenfalls keinen Einfluss auf die Biogenese der GlyR α 1-Untereinheit. Allein die Expression von P366T war im Vergleich zum wt leicht reduziert. Die bisher untersuchten GlyR α 1-Varianten R316X, E375X, D388A und R392H des TM3-4 Loops zeigten in früheren Studien hingegen eine deutlich verminderte Expression an der Plasmamembran transfizierter HEK-Zellen (Chung et al., 2010, Bode et al., 2013a, Schaefer et al., 2015). Die Ergebnisse zu P366L demonstrieren, dass diese Position keinen Einfluss auf die Membranlokalisation des GlyR hat. Durch Infektion hippocampaler Neuronenkulturen mit dem *low-copy*-Vektor FUV α IRES2_GFP wurde ebenfalls kein Unterschied in der Lokalisation der GlyR α 1-Signale festgestellt. Eine Beeinträchtigung der Membranlokalisation durch P366L gilt deshalb als unwahrscheinlich.

4.4.2. Einfluss auf funktionelle Kanaleigenschaften

Die meisten der bekannten dominant vererbten Hyperekplexiemutationen treten in den Transmembransegmenten 1-3 auf und verändern die physiologischen Kanaleigenschaften des GlyR (Harvey et al., 2008). P366L folgt ebenfalls einem dominanten Erbgang. Die elektrophysiologischen Versuche an transfizierten HEK293-Zellen zeigen, dass die Glycin-induzierten Chloridströme durch die Mutation um ca. 25% signifikant reduziert wurden. Bis

auf P366C hatten die anderen untersuchten Punktmutationen einen noch stärkeren Effekt auf die gemessenen Ströme. Im Gegensatz dazu führten Punktmutationen R316X, E375X, D388A und R392H zum völligen Funktionsverlust des GlyR in der homomeren Rezeptorkonfiguration (Chung et al., 2010, Bode et al., 2013a, Schaefer et al., 2015). Erst nach Koexpression der β -Untereinheit konnten hier funktionelle GlyRs beobachtet werden. Verglichen mit diesen Ergebnissen sind die Effekte von P366L auf die Maximalströme zwar gering, aber dennoch signifikant. Im Oozytenexpressionssystem wurde ebenfalls ein Trend hin zu reduzierten Maximaleinwärtsströmen bei sättigenden Glycinkonzentrationen gemessen, die durch P366L verursacht wurden. Hier war die Anzahl der abgeleiteten Zellen möglicherweise zu gering, um denselben Effekt wie in HEK293-Zellen messen zu können.

Nach Kotransfektion der GlyR β -Untereinheit wurde für den wt GlyR $\alpha 1$ erhöhte Maximalströme gemessen, die sich jedoch nicht signifikant vom homopentameren wt Rezeptor unterschieden. Für P366L wurde nach der Kotransfektion eine ca. 15%ige Reduktion der Maximalströme ermittelt, welche sich ebenfalls nicht vom homomeren P366L-GlyR unterschieden. Der Vergleich beider heteromeren GlyRs untereinander ergab jedoch einen deutlichen Unterschied der I_{\max} -Werte zwischen $\alpha 1/\beta$ wt GlyR und $\alpha 1$ P366L/ β GlyR. Mit einer ca. 40%igen Reduzierung der Maximalströme war der Effekt von P366L in der heteromeren Rezeptorkonfiguration fast doppelt so hoch wie in GlyR $\alpha 1$ -Homomeren. Dieses Ergebnis bietet eine mögliche Erklärung für den Pathomechanismus der Patientenmutation P366L. Im adulten Nervensystem treten postsynaptische GlyRs vorrangig als heteromere Rezeptoren in einer Stöchiometrie von 2 $\alpha 1$:3 β auf (Becker et al., 1988, Grudzinska et al., 2005). Hyperekplexie wird durch Mutationen des GlyR verursacht, welche die Glycin-induzierten Chloridströme reduzieren. Dieser Effekt wird entweder über eine verminderte Expression an der Plasmamembran oder eine reduzierte Leitfähigkeit des Rezeptors für Chloridionen vermittelt (Lynch, 2004). Hyperekplexiemutationen beeinflussen dadurch die Effizienz der glycinergen Neurotransmission in den Reflexbögen des Hirnstamms und des Rückenmarks und erhöhen dadurch die generelle Erregbarkeit von Motoneuronen. Da eine Beeinflussung der Expression durch P366L experimentell ausgeschlossen werden konnte, wird die Störung der glycinergen Transmission vermutlich über die veränderte Ionenleitfähigkeit des GlyR vermittelt. Dieser Effekt ist in heteromeren GlyRs wesentlich stärker, als in homomeren GlyRs.

Die Untersuchung der Glycin-Effektivität wurde über die Dosis-Wirkungsbeziehung untersucht. Eine Veränderung der so gewonnenen EC_{50} -Werte gibt Aufschluss darüber, mit welcher Effizienz die Ligandenbindung in der ECD in die Öffnung der Kanalpore übersetzt

wird. Die Mutationen D388A, E375X und R392H innerhalb des TM3-4 Loops haben beispielsweise einen signifikanten Effekt auf die halbmaximale effektive Glycinkonzentration (Chung et al., 2010, Bode et al., 2013a). Für diese Mutationen wird angenommen, dass sie die Effizienz der Übersetzung der Ligandenbindung in eine Konformationsänderung der TM2 stören. Der genaue Mechanismus, wie eine intrazelluläre Mutation die Glycinaffinität der extrazellulären Ligandenbindedomäne beeinflussen kann, ist bisher nicht vollständig entschlüsselt. Studien an Ivermectin, welches zwischen den Transmembrandomänen des GlyR bindet (Hibbs and Gouaux, 2011), postulieren jedoch eine Konformationsänderung, die sich nach der Aktivierung des Rezeptors über die TM2 zurück zur ECD fortpflanzt (Wang and Lynch, 2012). Die in dieser vorliegenden Arbeit gemessenen EC_{50} -Werte des GlyR α 1 wurden weder in HEK293-Zellen, noch in Oozyten durch P366L beeinflusst. Dieses Ergebnis zeigt, dass sich P366L in seinen Konsequenzen auf die Rezeptoreigenschaften klar von den bereits publizierten Mutationen unterscheidet.

Eine Untersuchung der Einzelkanalleitfähigkeit von P366L kann hier weitere Erkenntnisse über den Einfluss auf die spontane Öffnungswahrscheinlichkeit des Rezeptors geben. Für einige Hyperekplexie-Mutationen konnte bereits demonstriert werden, dass die veränderte glycinerge Transmission durch reduzierte Einzelkanalleitfähigkeit des GlyR α 1 verursacht wird (Langosch et al., 1994, Saul et al., 1999).

4.4.3. Einfluss auf die Desensitisierung

Die Untersuchung des Desensitierungsverhaltens ergab für P366L einen signifikant erhöhten Anteil desensitisierender Ströme im Vergleich zum wt GlyR α 1. Ein ähnlicher Effekt wurde für P366C und P366A ermittelt. Für die kombinierten Mutationen, in denen die Proline innerhalb der Sequenz ³⁶⁴NPPPAPSKSP³⁷² schrittweise in Alanine oder Leucine umgewandelt oder deletiert wurden, konnte kein Einfluss auf die Kanalkinetik gemessen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei P366 vermutlich um eine spezielle Determinante der Desensitisierung handelt. Wenn P366 durch Leucin, Alanin oder Cystein ersetzt wird, verändert sich die Schließkinetik des Rezeptors, aber wenn alle Proline innerhalb der Sequenz ersetzt oder deletiert werden ist dieser Effekt nicht zu beobachten. Möglicherweise ist P366 an der Ausbildung einer Sekundärstruktur beteiligt (Cascio et al., 2001, Breitinger et al., 2004), die durch eine Veränderung an Position 366 gestört wird, bei der es sich jedoch nicht um eine PPII-Helix handelt, weshalb weitere Mutationen innerhalb des Motivs keinen Einfluss auf die Desensitisierung des Rezeptors haben. So determiniert

beispielsweise die Spleißkassette in GlyR α 3 gleichzeitig das Desensitisierungsverhalten des Rezeptor als auch die Modulation durch Ethanol (Nikolic et al., 1998, Sanchez et al., 2015). Bis auf P250T im TM1-2 Loop ist bisher keine intrazellulär lokalisiert Mutation des GlyR α 1 bekannt, die einen Einfluss auf das Desensitisierungsverhalten des Rezeptors hat (Breitinger et al., 2001).

Am Prozess der Desensitisierung sind möglicherweise Interaktionen mit bisher nicht identifizierten Proteinen beteiligt, die durch P366L gestört werden. Dafür sprechen die Ergebnisse der Kotransfektion von Gephyrin und GlyR β . Hier wurden für den wt nach der Kotransfektion von GlyR β allein oder in Kombination mit Gephyrin signifikant erhöhte Anteile desensitisierender Ströme gemessen, welche im Experiment mit P366L nicht beobachtet werden konnten.

Die erhöhte Desensitisierung in Kombination mit reduzierten Maximalströmen bei P366L bedeutet für das glycinerge System *in vitro*, dass die Glycinrezeptoren an der Synapse zwischen inhibitorischen Interneuron und Motoneuron schneller schließen, einhergehend mit einem reduzierten Einstrom von Chloridionen und einer schwächeren Hyperpolarisation des Membranpotentials als Folge. Dadurch wird die Erregbarkeit des Motoneurons erhöht und ein gesteigerter Muskeltonus bedingt. Der Prozess der Desensitisierung spielt nicht nur im Krankheitsbild der Hyperekplexie eine entscheidende Rolle. So wurde beispielsweise demonstriert, dass Nikotin im Gehirn von Rauchern den präsynaptischen nAChR an GABAergen Terminalen desensitisiert, was zu einem reduzierten inhibitorischen Input dopaminergener Neurone im ventralen Tegmentum und zu einer gesteigerten Aktivität des dopaminergen Belohnungssystems führt (Mansvelder et al., 2002). Eine erhöhte Desensitisierungsrate des nAChR wird außerdem als Auslöser für eine spezielle Form der Frontallappenepilepsie angesehen (Bertrand et al., 2002).

4.4.4. P366 als Bindemotiv für intrazelluläre Proteine

Für den GlyR β wurde eine direkte Interaktion der Sequenz ⁴³⁵KPPPAKP⁴⁴¹ mit der SH3-Domäne von Syndapin I demonstriert (Del Pino et al., 2014). Aus diesem Grund wurde die Interaktion von GlyR α 1 mit Proteinen untersucht, die ebenfalls eine SH3-Sequenz ausbilden. Aufgrund folgender Ergebnisse wurde als Interaktionskandidat der GTP-Austauschfaktor Collybistin ausgewählt: Collybistin (i) interagiert mit Gephyrin und führt (in HEK-Zellen) zur Ausbildung von Mikroaggregaten, die koexprimierte GlyRs akkumulieren (Kins et al., 2000),

(ii) bindet die $\alpha 2$ -Untereinheit des GABA_ARs (Saiepour et al., 2010), (iii) verändert die Lokalisation von Gephyrin in Abhängigkeit von der Anwesenheit der SH3-Domäne (Harvey et al., 2004a, Soykan et al., 2014) und (iv) führt über die Punktmutation G55A zur Ausbildung von Hyperekplexie (Harvey et al., 2004a).

Die Interaktion von Collybistin (CB3(SH3+)) mit GlyR $\alpha 1$ und P366L GlyR $\alpha 1$ wurde an transfizierten Zellen gezeigt. Die Detektion der CB-Bande war dabei unabhängig von der Koexpression von Gephyrin oder GlyR β . Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine Interaktion zwischen GlyR $\alpha 1$ und CB(SH3+) existiert, die durch P366L nicht beeinflusst wird. Es ist nicht auszuschließen, dass diese Interaktion eine Folge der Überexpression von Collybistin und GlyR $\alpha 1$ in HEK293-Zellen ist und die Interaktion in Neuronen wesentlich schwächer oder gar nicht ausgeprägt ist. Ob die Interaktion über die SH3-Domäne vermittelt wird lässt sich in einem weiteren Experiment mit der Collybistin-Variante ohne SH3-Domäne (CB3(SH3-)) klären. Möglicherweise verändert die Abwesenheit der SH3-Domäne die Konformation des Proteins in der Art und Weise, dass die Interaktion mit P366L gestört wird.

Die räumliche Nähe von GlyR $\alpha 1$ mit beiden Collybistin-Isoformen wurde in transfizierten Cos7-Zellen untersucht. In Anwesenheit von CB3(SH3+) wurde eine Kolokalisation zwischen Gephyrin und GlyR bzw. Gephyrin und Collybistin beobachtet, die unabhängig von der Patientenmutation P366L war. In Zellen, die mit CB(SH3-) transfiziert wurden ergab sich ein punkartiges Gephyrin-Signal, welches auf eine Aggregation des Proteins hindeutet. Diese Beobachtung wurde bereits in einer früheren Studie zur Interaktion der Collybistin-Isoformen mit Gephyrin gezeigt (Soykan et al., 2014). Die Kolokalisation von GlyR und Collybistin wurde durch P366L nicht verändert. Dieses Ergebnis zeigt in Kombination mit den Resultaten der Kopräzipitation, dass Collybistin in transfizierten Zellkulturen eine Interaktion mit dem GlyR $\alpha 1$ eingeht, die durch die Mutation P366L nicht gestört wird.

Weiterhin wurden primäre Hippocampuskulturen mit dem *low-copy*-Vektor FUV_{al}_IRES2_GFP infiziert, welcher für wt GlyR $\alpha 1$ oder P366L kodiert. In diesen Kulturen wurde anschließend die Lokalisation des endogenen Collybistins analysiert. Hierbei wurde eine deutliche Veränderung des CB-Signals in GlyR $\alpha 1$ -positiven Zellen beobachtet. Die Quantifizierung ergab eine signifikante Reduzierung der CB-Signalintensität insgesamt, sowie im Zellsoma in Neuronen, die mit P366L infiziert wurden. Dieses Resultat zeigt, dass P366L einen Einfluss auf die Lokalisation von CB in Neuronen hat. Der genaue Mechanismus ist allerdings unklar. Des Weiteren war in diesen Experimenten auffällig, dass die GlyR $\alpha 1$ -Signale in mit P366L infizierten Zellen im Vergleich zu wt- GlyR $\alpha 1$ deutlich reduziert waren. Diese

Beobachtung kann allerdings durch einen schwächeren Virustiter bedingt sein. Zur Falsifizierung dieser These ist die Bestimmung des Titers beider Viren unerlässlich.

Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse zur Untersuchung der Interaktion des Motivs $^{364}\text{NPPAPSKSP}^{373}$ mit Collybistin 3 geben erstmalig Hinweise auf eine Interaktion des TM3-4 Loops des GlyR α 1 mit Proteinen des Zytoskeletts unabhängig von der GlyR β -Untereinheit. Möglicherweise ist die Affinität zwischen beiden Interaktionspartnern ähnlich gering wie zwischen Collybistin und der α 2-Untereinheit des GABA $_A$ R (Saiepour et al., 2010). Da jedoch die Rekrutierung von Gephyrin zur postsynaptischen Membran in vielen Hirnregionen von Collybistin abhängig ist (Papadopoulos and Soykan, 2011) und gleichzeitig von der Interaktion zwischen Collybistin und PI3P, Neuroligin 2 und 4 sowie Cdc42 gesteuert wird (Kneussel and Betz, 2000a, Kalscheuer et al., 2009, Pouloupoulos et al., 2009, Hoon et al., 2011), könnte die Interaktion von GlyR α 1 mit Collybistin einen weiteren Mechanismus erklären, wie der adulte GlyR $\alpha\beta$ an die postsynaptische Membran inhibitorischer Synapsen transportiert und aufrechterhalten wird.

5. Quellenverzeichnis

- Aguayo LG, Castro P, Mariqueo T, Munoz B, Xiong W, Zhang L, Lovinger DM, Homanics GE (2014) Altered sedative effects of ethanol in mice with alpha1 glycine receptor subunits that are insensitive to Gbetagamma modulation. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 39:2538-2548.
- Akabas MH, Kaufmann C, Archdeacon P, Karlin A (1994) Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the entire M2 segment of the alpha subunit. *Neuron* 13:919-927.
- Andersson H, Bakker E, von Heijne G (1992) Different positively charged amino acids have similar effects on the topology of a polytopic transmembrane protein in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 267:1491-1495.
- Bakker MJ, van Dijk JG, van den Maagdenberg AM, Tijssen MA (2006) Startle syndromes. *The Lancet Neurology* 5:513-524.
- Baptista-Hon DT, Deeb TZ, Lambert JJ, Peters JA, Hales TG (2013) The minimum M3-M4 loop length of neurotransmitter-activated pentameric receptors is critical for the structural integrity of cytoplasmic portals. *The Journal of biological chemistry* 288:21558-21568.
- Becker CM, Hoch W, Betz H (1988) Glycine receptor heterogeneity in rat spinal cord during postnatal development. *The EMBO journal* 7:3717-3726.
- Becker K, Braune M, Benderska N, Buratti E, Baralle F, Villmann C, Stamm S, Eulenburg V, Becker CM (2012) A retroelement modifies pre-mRNA splicing: The murine *Glrbspa* allele is a splicing signal polymorphism amplified by long interspersed nuclear element insertion. *The Journal of biological chemistry*. 287(37):31185-94
- Beckstead MJ, Phelan R, Trudell JR, Bianchini MJ, Mihic SJ (2002) Anesthetic and ethanol effects on spontaneously opening glycine receptor channels. *J Neurochem* 82:1343-1351.
- Bertrand D, Picard F, Le Hellard S, Weiland S, Favre I, Phillips H, Bertrand S, Berkovic SF, Malafosse A, Mulley J (2002) How mutations in the nAChRs can cause ADNFLE epilepsy. *Epilepsia* 43 Suppl 5:112-122.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7:1513-1523.
- Bocquet N, Nury H, Baaden M, Le Poupon C, Changeux JP, Delarue M, Corringer PJ (2009) X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature* 457:111-114.
- Bocquet N, Prado de Carvalho L, Cartaud J, Neyton J, Le Poupon C, Taly A, Grutter T, Changeux JP, Corringer PJ (2007) A prokaryotic proton-gated ion channel from the nicotinic acetylcholine receptor family. *Nature* 445:116-119.
- Bode A, Lynch JW (2014) The impact of human hyperekplexia mutations on glycine receptor structure and function. *Mol Brain* 7:2.
- Bode A, Wood SE, Mullins JG, Keramidas A, Cushion TD, Thomas RH, Pickrell WO, Drew CJ, Masri A, Jones EA, Vassallo G, Born AP, Alehan F, Aharoni S, Bannasch G, Bartsch M, Kara B, Krause A, Karam EG, Matta S, Jain V, Mandel H, Freilinger M, Graham GE, Hobson E, Chatfield S, Vincent-Delorme C, Rahme JE, Afawi Z, Berkovic SF, Howell OW, Vanbellinthen JF, Rees MI, Chung SK, Lynch JW (2013a) New hyperekplexia mutations provide insight into glycine receptor assembly, trafficking, and activation mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 288:33745-33759.
- Bode A, Wood SE, Mullins JG, Keramidas A, Cushion TD, Thomas RH, Pickrell WO, Drew CJ, Masri A, Lynch JW (2013b) Analysis of hyperekplexia mutations identifies

- transmembrane domain rearrangements that mediate glycine receptor activation. *The Journal of biological chemistry* 288:33760-33771.
- Bork P, Holm L, Sander C (1994) The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *Journal of molecular biology* 242:309-320.
- Bormann J, Rundstrom N, Betz H, Langosch D (1993) Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers. *The EMBO journal* 12:3729-3737.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brams M, Pandya A, Kuzmin D, van Elk R, Krijnen L, Yakel JL, Tsetlin V, Smit AB, Ulens C (2011) A structural and mutagenic blueprint for molecular recognition of strychnine and d-tubocurarine by different cys-loop receptors. *PLoS Biol* 9:e1001034.
- Breitinger HG, Becker CM (2002) The inhibitory glycine receptor-simple views of a complicated channel. *Chembiochem* 3:1042-1052.
- Breitinger HG, Villmann C, Becker K, Becker CM (2001) Opposing effects of molecular volume and charge at the hyperekplexia site alpha 1(P250) govern glycine receptor activation and desensitization. *The Journal of biological chemistry* 276:29657-29663.
- Breitinger HG, Villmann C, Melzer N, Rennert J, Breitinger U, Schwarzinger S, Becker CM (2009) Novel regulatory site within the TM3-4 loop of human recombinant alpha3 glycine receptors determines channel gating and domain structure. *The Journal of biological chemistry* 284:28624-28633.
- Breitinger U, Breitinger HG, Bauer F, Fahmy K, Glockenhammer D, Becker CM (2004) Conserved high affinity ligand binding and membrane association in the native and refolded extracellular domain of the human glycine receptor alpha1-subunit. *The Journal of biological chemistry* 279:1627-1636.
- Brejck K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der Oost J, Smit AB, Sixma TK (2001) Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* 411:269-276.
- Buckwalter MS, Cook SA, Davisson MT, White WF, Camper SA (1994) A frameshift mutation in the mouse alpha 1 glycine receptor gene (Glr1) results in progressive neurological symptoms and juvenile death. *Hum Mol Genet* 3:2025-2030.
- Burgos CF, Castro PA, Mariqueo T, Bunster M, Guzman L, Aguayo LG (2015) Evidence for alpha-helices in the large intracellular domain mediating modulation of the alpha1-glycine receptor by ethanol and Gbetagamma. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 352:148-155.
- Busselberg D, Bischoff AM, Becker K, Becker CM, Richter DW (2001) The respiratory rhythm in mutant oscillator mice. *Neurosci Lett* 316:99-102.
- Buttner C, Sadtler S, Leyendecker A, Laube B, Griffon N, Betz H, Schmalzing G (2001) Ubiquitination precedes internalization and proteolytic cleavage of plasma membrane-bound glycine receptors. *The Journal of biological chemistry* 276:42978-42985.
- Carland JE, Cooper MA, Sugiharto S, Jeong HJ, Lewis TM, Barry PH, Peters JA, Lambert JJ, Moorhouse AJ (2009) Characterization of the effects of charged residues in the intracellular loop on ion permeation in alpha1 glycine receptor channels. *The Journal of biological chemistry* 284:2023-2030.
- Caroni P (1997) Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *Journal of neuroscience methods* 71:3-9.
- Carta E, Chung SK, James VM, Robinson A, Gill JL, Remy N, Vanbellinghen JF, Drew CJ, Cagdas S, Harvey RJ (2012) Mutations in the GlyT2 gene (SLC6A5) are a second major cause of startle disease. *The Journal of biological chemistry* 282:28975-28985.

- Cascio M, Shenkel S, Grodzicki RL, Sigworth FJ, Fox RO (2001) Functional reconstitution and characterization of recombinant human alpha 1-glycine receptors. *The Journal of biological chemistry* 276:20981-20988.
- Chalphin AV, Saha MS (2010) The specification of glycinergic neurons and the role of glycinergic transmission in development. *Frontiers in molecular neuroscience* 3:11.
- Chen C, Okayama H (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7:2745-2752.
- Chen X, Webb TI, Lynch JW (2009) The M4 transmembrane segment contributes to agonist efficacy differences between alpha1 and alpha3 glycine receptors. *Mol Membr Biol* 26:321-332.
- Christianson JC, Green WN (2004) Regulation of nicotinic receptor expression by the ubiquitin-proteasome system. *The EMBO journal* 23:4156-4165.
- Chung SK, Bode A, Cushion TD, Thomas RH, Hunt C, Wood SE, Pickrell WO, Drew CJ, Yamashita S, Shiang R, Leiz S, Longardt AC, Raile V, Weschke B, Puri RD, Verma IC, Harvey RJ, Ratnasinghe DD, Parker M, Rittley C, Masri A, Lingappa L, Howell OW, Vanbellinghen JF, Mullins JG, Lynch JW, Rees MI (2013) GLRB is the third major gene of effect in hyperekplexia. *Hum Mol Genet* 22:927-940.
- Chung SK, Vanbellinghen JF, Mullins JG, Robinson A, Hantke J, Hammond CL, Gilbert DF, Freilinger M, Ryan M, Kruer MC, Masri A, Gurses C, Ferrie C, Harvey K, Shiang R, Christodoulou J, Andermann F, Andermann E, Thomas RH, Harvey RJ, Lynch JW, Rees MI (2010) Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive GLRA1 mutations in hyperekplexia. *J Neurosci* 30:9612-9620.
- Corringer PJ, Le Novere N, Changeux JP (2000) Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:431-458.
- Del Pino I, Koch D, Schemm R, Qualmann B, Betz H, Paarmann I (2014) Proteomic analysis of glycine receptor beta subunit (GlyRbeta)-interacting proteins: evidence for syndapin I regulating synaptic glycine receptors. *The Journal of biological chemistry* 289:11396-11409.
- Del Pino I, Paarmann I, Karas M, Kilimann MW, Betz H (2011) The trafficking proteins Vacuolar Protein Sorting 35 and Neurobeachin interact with the glycine receptor β -subunit. *Biochemical and biophysical research communications* 412:435-440.
- den Eynden JV, Ali SS, Horwood N, Carmans S, Brone B, Hellings N, Steels P, Harvey RJ, Rigo JM (2009) Glycine and glycine receptor signalling in non-neuronal cells. *Frontiers in molecular neuroscience* 2:9.
- Du J, Lu W, Wu S, Cheng Y, Gouaux E (2015) Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy. *Nature* 526:224-229.
- Dumoulin A, Triller A, Kneussel M (2010) Cellular transport and membrane dynamics of the glycine receptor. *Frontiers of Molecular Neuroscience* 2:28.
- Durisic N, Godin AG, Wever CM, Heyes CD, Lakadamyali M, Dent JA (2012) Stoichiometry of the human glycine receptor revealed by direct subunit counting. *J Neurosci* 32:12915-12920.
- Eisele JL, Bertrand S, Galzi JL, Devillers-Thiery A, Changeux JP, Bertrand D (1993) Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. *Nature* 366:479-483.
- Erbacher P, Roche AC, Monsigny M, Midoux P (1996) Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/lactosylated polylysine complexes. *Exp Cell Res* 225:186-194.
- Flint AC, Liu X, Kriegstein AR (1998) Nonsynaptic glycine receptor activation during early neocortical development. *Neuron* 20:43-53.
- Forstera B, Dzaye OD, Winkelmann A, Semtner M, Benedetti B, Markovic DS, Synowitz M, Wend P, Fahling M, Junier MP, Glass R, Kettenmann H, Meier JC (2014)

- Intracellular glycine receptor function facilitates glioma formation in vivo. *Journal of cell science* 127:3687-3698.
- Fritschy JM, Harvey RJ, Schwarz G (2008) Gephyrin: where do we stand, where do we go? *Trends in neurosciences* 31:257-264.
- Fuhrmann JC, Kins S, Rostaing P, El Far O, Kirsch J, Sheng M, Triller A, Betz H, Kneussel M (2002) Gephyrin interacts with Dynein light chains 1 and 2, components of motor protein complexes. *J Neurosci* 22:5393-5402.
- Gafvelin G, Sakaguchi M, Andersson H, von Heijne G (1997) Topological rules for membrane protein assembly in eukaryotic cells. *The Journal of biological chemistry* 272:6119-6127.
- Gentet LJ, Clements JD (2002) Binding site stoichiometry and the effects of phosphorylation on human alpha1 homomeric glycine receptors. *The Journal of physiology* 544:97-106.
- Gluzman Y (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23:175-182.
- Gonzalez-Gutierrez G, Grosman C (2010) Bridging the gap between structural models of nicotinic receptor superfamily ion channels and their corresponding functional states. *Journal of molecular biology* 403:693-705.
- Goyal R, Salahudeen AA, Jansen M (2011) Engineering a prokaryotic Cys-loop receptor with a third functional domain. *The Journal of biological chemistry* 286:34635-34642.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59-74.
- Grenningloh G, Pribilla I, Prior P, Multhaup G, Beyreuther K, Taleb O, Betz H (1990) Cloning and expression of the 58 kd beta subunit of the inhibitory glycine receptor. *Neuron* 4:963-970.
- Grenningloh G, Rienitz A, Schmitt B, Methfessel C, Zensen M, Beyreuther K, Gundelfinger ED, Betz H (1987) The strychnine-binding subunit of the glycine receptor shows homology with nicotinic acetylcholine receptors. *Nature* 328:215-220.
- Griffon N, Buttner C, Nicke A, Kuhse J, Schmalzing G, Betz H (1999) Molecular determinants of glycine receptor subunit assembly. *The EMBO journal* 18:4711-4721.
- Gross P, Schoneberg T (2004) Rescue of protein mutants: why? *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 19:1029-1032.
- Grudzinska J, Schemm R, Haeger S, Nicke A, Schmalzing G, Betz H, Laube B (2005) The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron* 45:727-739.
- Haeger S, Kuzmin D, Detro-Dassen S, Lang N, Kilb M, Tsetlin V, Betz H, Laube B, Schmalzing G (2010) An intramembrane aromatic network determines pentameric assembly of Cys-loop receptors. *Nat Struct Mol Biol* 17:90-98.
- Han L, Talwar S, Lynch JW (2013a) The relative orientation of the TM3 and TM4 domains varies between alpha1 and alpha3 glycine receptors. *ACS Chem Neurosci* 4:248-254.
- Han L, Talwar S, Wang Q, Shan Q, Lynch JW (2013b) Phosphorylation of alpha3 Glycine Receptors Induces a Conformational Change in the Glycine-Binding Site. *ACS Chem Neurosci* 4:1361-1370.
- Hansen SB, Sulzenbacher G, Huxford T, Marchot P, Taylor P, Bourne Y (2005) Structures of Aplysia AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. *The EMBO journal* 24:3635-3646.
- Hartenstein B, Schenkel J, Kuhse J, Besenbeck B, Kling C, Becker CM, Betz H, Weiher H (1996) Low level expression of glycine receptor beta subunit transgene is sufficient for phenotype correction in spastic mice. *The EMBO journal* 15:1275-1282.

- 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 (2004a) The GDP-GTP exchange factor collybistin: an essential determinant of neuronal gephyrin clustering. *J Neurosci* 24:5816-5826.
- Harvey RJ, Depner UB, Wassle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schutz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU, Muller U (2004b) GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304:884-887.
- Harvey RJ, Schmieden V, Von Holst A, Laube B, Rohrer H, Betz H (2000) Glycine receptors containing the alpha4 subunit in the embryonic sympathetic nervous system, spinal cord and male genital ridge. *The European journal of neuroscience* 12:994-1001.
- Harvey RJ, Topf M, Harvey K, Rees MI (2008) The genetics of hyperekplexia: more than startle! *Trends Genet* 24:439-447.
- Hassaine G, Deluz C, Grasso L, Wyss R, Tol MB, Hovius R, Graff A, Stahlberg H, Tomizaki T, Desmyter A, Moreau C, Li XD, Poitevin F, Vogel H, Nury H (2014) X-ray structure of the mouse serotonin 5-HT₃ receptor. *Nature* 512:276-281.
- Heinze L, Harvey RJ, Haverkamp S, Wassle H (2007) Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha4 subunit. *J Comp Neurol* 500:693-707.
- Helenius A, Aebi M (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73:1019-1049.
- Hibbs RE, Gouaux E (2011) Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature* 474:54-60.
- Hilf RJ, Dutzler R (2008) X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 452:375-379.
- Hilf RJ, Dutzler R (2009a) A prokaryotic perspective on pentameric ligand-gated ion channel structure. *Curr Opin Struct Biol* 19:418-424.
- Hilf RJ, Dutzler R (2009b) Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 457:115-118.
- Hoon M, Soykan T, Falkenburger B, Hammer M, Patrizi A, Schmidt KF, Sassoe-Pognetto M, Lowel S, Moser T, Taschenberger H, Brose N, Varoqueaux F (2011) Neuroigin-4 is localized to glycinergic postsynapses and regulates inhibition in the retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:3053-3058.
- Huang R, He S, Chen Z, Dillon GH, Leidenheimer NJ (2007) Mechanisms of homomeric alpha1 glycine receptor endocytosis. *Biochemistry* 46:11484-11493.
- Hucho F, Weise C (2001) Ligand-gated ion channels. *Angew Chem Int Edit* 40:3101-3116.
- Jansen M, Bali M, Akabas MH (2008) Modular design of Cys-loop ligand-gated ion channels: functional 5-HT₃ and GABA rho1 receptors lacking the large cytoplasmic M3M4 loop. *J Gen Physiol* 131:137-146.
- Jarvis MF, Khakh BS (2009) ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology* 56:208-215.
- Jiang L, Teng GM, Chan EY, Au SW, Wise H, Lee SS, Cheung WT (2012) Impact of cell type and epitope tagging on heterologous expression of G protein-coupled receptor: a systematic study on angiotensin type II receptor. *PloS one* 7:e47016.
- Kaboord B, Perr M (2008) Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods Mol Biol* 424:349-364.
- Kalscheuer VM, Musante L, Fang C, Hoffmann K, Fuchs C, Carta E, Deas E, Venkateswarlu K, Menzel C, Ullmann R, Tommerup N, Dalpra L, Tzschach A, Selicorni A, Luscher B, Ropers HH, Harvey K, Harvey RJ (2009) A balanced chromosomal translocation disrupting ARHGEF9 is associated with epilepsy, anxiety, aggression, and mental retardation. *Human mutation* 30:61-68.

- Kelley SP, Dunlop JI, Kirkness EF, Lambert JJ, Peters JA (2003) A cytoplasmic region determines single-channel conductance in 5-HT₃ receptors. *Nature* 424:321-324.
- Keramidas A, Moorhouse AJ, Schofield PR, Barry PH (2004) Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Prog Biophys Mol Biol* 86:161-204.
- Kessels MM, Qualmann B (2004) The syndapin protein family: linking membrane trafficking with the cytoskeleton. *Journal of cell science* 117:3077-3086.
- Kim EY, Schrader N, Smolinsky B, Bedet C, Vannier C, Schwarz G, Schindelin H (2006) Deciphering the structural framework of glycine receptor anchoring by gephyrin. *The EMBO journal* 25:1385-1395.
- Kins S, Betz H, Kirsch J (2000) Collybistin, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin. *Nat Neurosci* 3:22-29.
- Kirsch J, Langosch D, Prior P, Littauer UZ, Schmitt B, Betz H (1991) The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin. *The Journal of biological chemistry* 266:22242-22245.
- Kirstein L, Silfverskiold BP (1958) A family with emotionally precipitated drop seizures. *Acta Psychiatr Neurol Scand* 33:471-476.
- Kling C, Koch M, Saul B, Becker CM (1997) The frameshift mutation oscillator (Glr1(sp-dot)) produces a complete loss of glycine receptor alpha1-polypeptide in mouse central nervous system. *Neuroscience* 78:411-417.
- Kneussel M, Betz H (2000a) Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. *Trends in neurosciences* 23:429-435.
- Kneussel M, Betz H (2000b) Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *The Journal of physiology* 525 Pt 1:1-9.
- Kozak M (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic acids research* 15:8125-8148.
- Kuhse J, Kuryatov A, Maulet Y, Malosio ML, Schmieden V, Betz H (1991) Alternative splicing generates two isoforms of the alpha 2 subunit of the inhibitory glycine receptor. *FEBS Lett* 283:73-77.
- Kukhtina V, Kottwitz D, Strauss H, Heise B, Chebotareva N, Tsetlin V, Hucho F (2006) Intracellular domain of nicotinic acetylcholine receptor: the importance of being unfolded. *J Neurochem* 97 Suppl 1:63-67.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Langlhofer G, Janzen D, Meiselbach H, Villmann C (2015) Length of the TM3-4 loop of the glycine receptor modulates receptor desensitization. *Neuroscience Letters* 176-181.
- Langosch D, Laube B, Rundstrom N, Schmieden V, Bormann J, Betz H (1994) Decreased agonist affinity and chloride conductance of mutant glycine receptors associated with human hereditary hyperekplexia. *The EMBO journal* 13:4223-4228.
- Laube B, Kuhse J, Betz H (2000) Kinetic and mutational analysis of Zn²⁺ modulation of recombinant human inhibitory glycine receptors. *The Journal of physiology* 522 Pt 2:215-230.
- Lee WY, Free CR, Sine SM (2009) Binding to gating transduction in nicotinic receptors: Cys-loop energetically couples to pre-M1 and M2-M3 regions. *J Neurosci* 29:3189-3199.
- Legendre P (2001) The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* 58:760-793.
- Lewis TM, Schofield PR, McClellan AM (2003) Kinetic determinants of agonist action at the recombinant human glycine receptor. *The Journal of physiology* 549:361-374.
- Lynagh T, Lynch JW (2012) Molecular mechanisms of Cys-loop ion channel receptor modulation by ivermectin. *Frontiers in molecular neuroscience* 5:60.

- Lynagh T, Webb TI, Dixon CL, Cromer BA, Lynch JW (2011) Molecular determinants of ivermectin sensitivity at the glycine receptor chloride channel. *The Journal of biological chemistry* 286:43913-43924.
- Lynch JW (2004) Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev* 84:1051-1095.
- Lynch JW (2009) Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology* 56:303-309.
- Maas C, Belgardt D, Lee HK, Heisler FF, Lappe-Siefke C, Magiera MM, van Dijk J, Hausrat TJ, Janke C, Kneussel M (2009) Synaptic activation modifies microtubules underlying transport of postsynaptic cargo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:8731-8736.
- Maas C, Tagnaouti N, Loeblich S, Behrend B, Lappe-Siefke C, Kneussel M (2006) Neuronal cotransport of glycine receptor and the scaffold protein gephyrin. *The Journal of cell biology* 172:441-451.
- Malosio ML, Grenningloh G, Kuhse J, Schmieden V, Schmitt B, Prior P, Betz H (1991a) Alternative splicing generates two variants of the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor. *The Journal of biological chemistry* 266:2048-2053.
- Malosio ML, Marqueze-Pouey B, Kuhse J, Betz H (1991b) Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *The EMBO journal* 10:2401-2409.
- Mangin JM, Baloul M, Prado De Carvalho L, Rogister B, Rigo JM, Legendre P (2003) Kinetic properties of the alpha2 homo-oligomeric glycine receptor impairs a proper synaptic functioning. *The Journal of physiology* 553:369-386.
- Mansvelder HD, Keath JR, McGehee DS (2002) Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron* 33:905-919.
- Maric HM, Kasaragod VB, Hausrat TJ, Kneussel M, Tretter V, Stromgaard K, Schindelin H (2014) Molecular basis of the alternative recruitment of GABA(A) versus glycine receptors through gephyrin. *Nature communications* 5:5767.
- Mascia MP, Machu TK, Harris RA (1996) Enhancement of homomeric glycine receptor function by long-chain alcohols and anaesthetics. *Br J Pharmacol* 119:1331-1336.
- Meier J, Vannier C, Serge A, Triller A, Choquet D (2001) Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin. *Nat Neurosci* 4:253-260.
- Meiselbach H, Vogel N, Langlhofer G, Stangl S, Schleyer B, Bahnassawy L, Sticht H, Breitingner HG, Becker CM, Villmann C (2014) Single expressed glycine receptor domains reconstitute functional ion channels without subunit-specific desensitization behavior. *The Journal of biological chemistry* 289:29135-29147.
- Melzer N, Villmann C, Becker K, Harvey K, Harvey RJ, Vogel N, Kluck CJ, Kneussel M, Becker CM (2010) Multifunctional basic motif in the glycine receptor intracellular domain induces subunit-specific sorting. *The Journal of biological chemistry* 285:3730-3739.
- Meng K, Xie W, Zhang L (2014) [Pharmacological characteristics of glycine receptors in rat hippocampal pyramidal cells]. *Zhong nan da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Central South University Medical sciences* 39:989-993.
- Meyer G, Kirsch J, Betz H, Langosch D (1995) Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit. *Neuron* 15:563-572.
- Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, Koltchine VV, Krasowski MD, Finn SE, Mascia MP, Valenzuela CF, Hanson KK, Greenblatt EP, Harris RA, Harrison NL (1997) Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. *Nature* 389:385-389.
- Miller PS, Aricescu AR (2014) Crystal structure of a human GABAA receptor. *Nature* 512:270-275.

- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 423:949-955.
- Monne M, Nilsson I, Johansson M, Elmhed N, von Heijne G (1998) Positively and negatively charged residues have different effects on the position in the membrane of a model transmembrane helix. *Journal of molecular biology* 284:1177-1183.
- Moraga-Cid G, Sauguet L, Huon C, Malherbe L, Girard-Blanc C, Petres S, Murail S, Taly A, Baaden M, Delarue M, Corringer PJ (2015) Allosteric and hyperekplexic mutant phenotypes investigated on an alpha1 glycine receptor transmembrane structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112:2865-2870.
- 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 Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-273.
- Nikolic Z, Laube B, Weber RG, Lichter P, Kioschis P, Poustka A, Mulhardt C, Becker CM (1998) The human glycine receptor subunit alpha3. Glra3 gene structure, chromosomal localization, and functional characterization of alternative transcripts. *The Journal of biological chemistry* 273:19708-19714.
- Nobles RD, Zhang C, Muller U, Betz H, McCall MA (2012) Selective glycine receptor alpha2 subunit control of crossover inhibition between the on and off retinal pathways. *J Neurosci* 32:3321-3332.
- Numberger M, Draguhn A (1996) *Patch-Clamp-Technik*. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Nury H, Bocquet N, Le Poupon C, Raynal B, Haouz A, Corringer PJ, Delarue M (2010) Crystal structure of the extracellular domain of a bacterial ligand-gated ion channel. *Journal of molecular biology* 395:1114-1127.
- Nury H, Van Renterghem C, Weng Y, Tran A, Baaden M, Dufresne V, Changeux JP, Sonner JM, Delarue M, Corringer PJ (2011) X-ray structures of general anaesthetics bound to a pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 469:428-431.
- Nys M, Kesters D, Ulens C (2013) Structural insights into Cys-loop receptor function and ligand recognition. *Biochemical pharmacology* 86:1042-1053.
- Ohki EC, Tilkins ML, Ciccarone VC, Price PJ (2001) Improving the transfection efficiency of post-mitotic neurons. *Journal of neuroscience methods* 112:95-99.
- Ohtsuka M, Miura H, Sato M, Kimura M, Inoko H, Gurumurthy CB (2012) PITT: pronuclear injection-based targeted transgenesis, a reliable transgene expression method in mice. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science* 61:489-502.
- Papadopoulos T, Eulenburg V, Reddy-Alla S, Mansuy IM, Li Y, Betz H (2008) Collybistin is required for both the formation and maintenance of GABAergic postsynapses in the hippocampus. *Molecular and cellular neurosciences* 39:161-169.
- Papadopoulos T, Korte M, Eulenburg V, Kubota H, Retiounskaia M, Harvey RJ, Harvey K, O'Sullivan GA, Laube B, Hulsman S, Geiger JR, Betz H (2007) Impaired GABAergic transmission and altered hippocampal synaptic plasticity in collybistin-deficient mice. *The EMBO journal* 26:3888-3899.
- Papadopoulos T, Soykan T (2011) The role of collybistin in gephyrin clustering at inhibitory synapses: facts and open questions. *Frontiers in cellular neuroscience* 5:11.
- Papke D, Grosman C (2014) The role of intracellular linkers in gating and desensitization of human pentameric ligand-gated ion channels. *J Neurosci* 34:7238-7252.
- Parikh RB, Bali M, Akabas MH (2011) Structure of the M2 transmembrane segment of GLIC, a prokaryotic Cys loop receptor homologue from *Gloeobacter violaceus*, probed by substituted cysteine accessibility. *The Journal of biological chemistry* 286:14098-14109.

- Perutz MF, Pope BJ, Owen D, Wanker EE, Scherzinger E (2002) Aggregation of proteins with expanded glutamine and alanine repeats of the glutamine-rich and asparagine-rich domains of Sup35 and of the amyloid beta-peptide of amyloid plaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:5596-5600.
- Peters TW, Huang M (2007) Protein aggregation and polyasparagine-mediated cellular toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prion* 1:144-153.
- Pfeiffer F, Graham D, Betz H (1982) Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *The Journal of biological chemistry* 257:9389-9393.
- Piechotta K, Weth F, Harvey RJ, Friauf E (2001) Localization of rat glycine receptor alpha1 and alpha2 subunit transcripts in the developing auditory brainstem. *J Comp Neurol* 438:336-352.
- Pless SA, Dibas MI, Lester HA, Lynch JW (2007) Conformational variability of the glycine receptor M2 domain in response to activation by different agonists. *The Journal of biological chemistry* 282:36057-36067.
- Pless SA, Lynch JW (2009) Ligand-specific conformational changes in the alpha1 glycine receptor ligand-binding domain. *The Journal of biological chemistry* 284:15847-15856.
- Poulopoulos A, Aramuni G, Meyer G, Soykan T, Hoon M, Papadopoulos T, Zhang M, Paarmann I, Fuchs C, Harvey K, Jedlicka P, Schwarzacher SW, Betz H, Harvey RJ, Brose N, Zhang W, Varoqueaux F (2009) Neurologin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin. *Neuron* 63:628-642.
- Pribilla I, Takagi T, Langosch D, Bormann J, Betz H (1992) The atypical M2 segment of the beta subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels. *The EMBO journal* 11:4305-4311.
- Qualmann B, Kelly RB (2000) Syndapin isoforms participate in receptor-mediated endocytosis and actin organization. *The Journal of cell biology* 148:1047-1062.
- Racz I, Schutz B, Abo-Salem OM, Zimmer A (2005) Visceral, inflammatory and neuropathic pain in glycine receptor alpha 3-deficient mice. *Neuroreport* 16:2025-2028.
- Rapoport TA (2007) Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* 450:663-669.
- Rasmussen H, Rasmussen T, Triller A, Vannier C (2002) Strychnine-blocked glycine receptor is removed from synapses by a shift in insertion/degradation equilibrium. *Molecular and cellular neurosciences* 19:201-215.
- Rath A, Davidson AR, Deber CM (2005) The structure of "unstructured" regions in peptides and proteins: role of the polyproline II helix in protein folding and recognition. *Biopolymers* 80:179-185.
- 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, Lewis TM, Vafa B, Ferrie C, Corry P, Muntoni F, Jungbluth H, Stephenson JB, Kerr M, Snell RG, Schofield PR, Owen MJ (2001) Compound heterozygosity and nonsense mutations in the alpha(1)-subunit of the inhibitory glycine receptor in hyperekplexia. *Hum Genet* 109:267-270.
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K (1999) The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397:251-255.

- Ruiz-Gomez A, Vaello ML, Valdivieso F, Mayor F, Jr. (1991) Phosphorylation of the 48-kDa subunit of the glycine receptor by protein kinase C. *The Journal of biological chemistry* 266:559-566.
- Rundstrom N, Schmieden V, Betz H, Bormann J, Langosch D (1994) Cyanotriphenylborate: subtype-specific blocker of glycine receptor chloride channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:8950-8954.
- Sadtler S, Laube B, Lashub A, Nicke A, Betz H, Schmalzing G (2003) A basic cluster determines topology of the cytoplasmic M3-M4 loop of the glycine receptor alpha1 subunit. *The Journal of biological chemistry* 278:16782-16790.
- Saiepour L, Fuchs C, Patrizi A, Sassoe-Pognetto M, Harvey RJ, Harvey K (2010) Complex role of collybistin and gephyrin in GABAA receptor clustering. *The Journal of biological chemistry* 285:29623-29631.
- Saitoh T, Ishida M, Maruyama M, Shinozaki H (1994) A novel antagonist, phenylbenzene omega-phosphono-alpha-amino acid, for strychnine-sensitive glycine receptors in the rat spinal cord. *Br J Pharmacol* 113:165-170.
- Saiyed T, Paarman I, Schmitt B, Haeger S, Sola M, Schmalzing G, Weissenhorn W, Betz H (2007) Molecular basis of gephyrin clustering at inhibitory synapses: role of G- and E-domain interactions. *The Journal of biological chemistry* 282:5625-5632.
- Sakmann B, Neher E (1984) Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu Rev Physiol* 46:455-472.
- San Martin L, Cerda F, Jimenez V, Fuentealba J, Munoz B, Aguayo LG, Guzman L (2012) Inhibition of the ethanol-induced potentiation of alpha1 glycine receptor by a small peptide that interferes with Gbetagamma binding. *The Journal of biological chemistry* 287:40713-40721.
- Sanchez A, Yevenes GE, San Martin L, Burgos CF, Moraga-Cid G, Harvey RJ, Aguayo LG (2015) Control of ethanol sensitivity of the glycine receptor alpha3 subunit by transmembrane 2, the intracellular splice cassette and C-terminal domains. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 353:80-90.
- Sato K, Zhang JH, Saika T, Sato M, Tada K, Tohyama M (1991) Localization of glycine receptor alpha 1 subunit mRNA-containing neurons in the rat brain: an analysis using in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 43:381-395.
- Saul B, Kuner T, Sobetzko D, Brune W, Hanefeld F, Meinck HM, Becker CM (1999) Novel GLRA1 missense mutation (P250T) in dominant hyperekplexia defines an intracellular determinant of glycine receptor channel gating. *J Neurosci* 19:869-877.
- Schaefer N, Kluck CJ, Price KL, Meiselbach H, Vornberger N, Schwarzinger S, Hartmann S, Langlhofer G, Schulz S, Schlegel N, Brockmann K, Lynch B, Becker CM, Lummis SC, Villmann C (2015) Disturbed Neuronal ER-Golgi Sorting of Unassembled Glycine Receptors Suggests Altered Subcellular Processing Is a Cause of Human Hyperekplexia. *J Neurosci* 35:422-437.
- Schaefer N, Langlhofer G, Kluck CJ, Villmann C (2013) Glycine receptor mouse mutants: model systems for human hyperekplexia. *Br J Pharmacol* 170:933-952.
- Schaefer N, Vogel N, Villmann C (2012) Glycine receptor mutants of the mouse: what are possible routes of inhibitory compensation? *Frontiers in molecular neuroscience* 5:98.
- Schorge S, Colquhoun D (2003) Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *J Neurosci* 23:1151-1158.
- Shan Q, Haddrill JL, Lynch JW (2001) Ivermectin, an unconventional agonist of the glycine receptor chloride channel. *The Journal of biological chemistry* 276:12556-12564.
- Shevtsova Z, Malik JM, Michel U, Scholl U, Bahr M, Kugler S (2006) Evaluation of epitope tags for protein detection after in vivo CNS gene transfer. *The European journal of neuroscience* 23:1961-1969.

- Simon J, Wakimoto H, Fujita N, Lalande M, Barnard EA (2004) Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome. *The Journal of biological chemistry* 279:41422-41435.
- Soykan T, Schneeberger D, Tria G, Buechner C, Bader N, Svergun D, Tessmer I, Pouloupoulos A, Papadopoulos T, Varoqueaux F, Schindelin H, Brose N (2014) A conformational switch in collybistin determines the differentiation of inhibitory postsynapses. *The EMBO journal* 33:2113-2133.
- Takahashi T, Momiyama A (1991) Single-channel currents underlying glycinergic inhibitory postsynaptic responses in spinal neurons. *Neuron* 7:965-969.
- Tasneem A, Iyer LM, Jakobsson E, Aravind L (2005) Identification of the prokaryotic ligand-gated ion channels and their implications for the mechanisms and origins of animal Cys-loop ion channels. *Genome biology* 6:R4.
- Thomas RH, Chung SK, Wood SE, Cushion TD, Drew CJ, Hammond CL, Vanbellinthen JF, Mullins JG, Rees MI (2013) Genotype-phenotype correlations in hyperekplexia: apnoeas, learning difficulties and speech delay. *Brain* 136:3085-3095.
- Thompson AJ, Lester HA, Lummis SC (2010) The structural basis of function in Cys-loop receptors. *Q Rev Biophys* 43:449-499.
- Todorovic J, Welsh BT, Bertaccini EJ, Trudell JR, Mihic SJ (2010) Disruption of an intersubunit electrostatic bond is a critical step in glycine receptor activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:7987-7992.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:4350-4354.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews* 62:405-496.
- Tsai CH, Chang FC, Su YC, Tsai FJ, Lu MK, Lee CC, Kuo CC, Yang YW, Lu CS (2004) Two novel mutations of the glycine receptor gene in a Taiwanese hyperekplexia family. *Neurology* 63:893-896.
- Unterer B (2012) Domänenarchitektur inhibitorischer Ionenkanäle der Cys-Loop-Rezeptorfamilie. Dissertation am Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät, FAU Erlangen-Nürnberg AG Becker.
- Unterer B, Becker CM, Villmann C (2012) The importance of TM3-4 loop subdomains for functional reconstitution of glycine receptors by independent domains. *The Journal of biological chemistry* 287:39205-39215.
- Unwin N (2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *Journal of molecular biology* 346:967-989.
- Vaello ML, Ruiz-Gomez A, Lerma J, Mayor F, Jr. (1994) Modulation of inhibitory glycine receptors by phosphorylation by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 269:2002-2008.
- Valor LM, Mulet J, Sala F, Sala S, Ballesta JJ, Criado M (2002) Role of the large cytoplasmic loop of the alpha 7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit in receptor expression and function. *Biochemistry* 41:7931-7938.
- Vandenberg RJ, French CR, Barry PH, Shine J, Schofield PR (1992) Antagonism of ligand-gated ion channel receptors: two domains of the glycine receptor alpha subunit form the strychnine-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:1765-1769.

- Vergouwe MN, Tijssen MA, Peters AC, Wielaard R, Frants RR (1999) Hyperekplexia phenotype due to compound heterozygosity for GLRA1 gene mutations. *Ann Neurol* 46:634-638.
- Villmann C, Oertel J, Ma-Hogemeier ZL, Hollmann M, Sprengel R, Becker K, Breitinger HG, Becker CM (2009a) Functional complementation of Glra1(sp4-ot), a glycine receptor subunit mutant, by independently expressed C-terminal domains. *J Neurosci* 29:2440-2452.
- Villmann C, Oertel J, Melzer N, Becker CM (2009b) Recessive hyperekplexia mutations of the glycine receptor alpha1 subunit affect cell surface integration and stability. *J Neurochem* 111:837-847.
- Vogel N, Kluck CJ, Melzer N, Schwarzinger S, Breitinger U, Seeber S, Becker CM (2009) Mapping of disulfide bonds within the amino-terminal extracellular domain of the inhibitory glycine receptor. *The Journal of biological chemistry* 284:36128-36136.
- von Heijne G (1992) Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *Journal of molecular biology* 225:487-494.
- Wang Q, Lynch JW (2012) A comparison of glycine- and ivermectin-mediated conformational changes in the glycine receptor ligand-binding domain. *Int J Biochem Cell Biol* 44:335-340.
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Lander ES (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520-562.
- Yang Z, Taran E, Webb TI, Lynch JW (2012) Stoichiometry and subunit arrangement of alpha1beta glycine receptors as determined by atomic force microscopy. *Biochemistry* 51:5229-5231.
- Yevenes GE, Moraga-Cid G, Avila A, Guzman L, Figueroa M, Peoples RW, Aguayo LG (2010) Molecular requirements for ethanol differential allosteric modulation of glycine receptors based on selective Gbetagamma modulation. *The Journal of biological chemistry* 285:30203-30213.
- Yevenes GE, Moraga-Cid G, Guzman L, Haeger S, Oliveira L, Olate J, Schmalzing G, Aguayo LG (2006) Molecular Determinants for G Protein beta{gamma} Modulation of Ionotropic Glycine Receptors. *The Journal of biological chemistry* 281:39300-39307.
- Yevenes GE, Peoples RW, Tapia JC, Parodi J, Soto X, Olate J, Aguayo LG (2003) Modulation of glycine-activated ion channel function by G-protein betagamma subunits. *Nat Neurosci* 6:819-824.
- Yevenes GE, Zeilhofer HU (2011a) Allosteric modulation of glycine receptors. *Br J Pharmacol* 164:224-236.
- Yevenes GE, Zeilhofer HU (2011b) Molecular sites for the positive allosteric modulation of glycine receptors by endocannabinoids. *PloS one* 6:e23886.
- Young-Pearse TL, Ivic L, Kriegstein AR, Cepko CL (2006) Characterization of mice with targeted deletion of glycine receptor alpha 2. *Mol Cell Biol* 26:5728-5734.
- Zeilhofer HU (2005) The glycinergic control of spinal pain processing. *Cell Mol Life Sci* 62:2027-2035.
- Zhong W, Gallivan JP, Zhang Y, Li L, Lester HA, Dougherty DA (1998) From ab initio quantum mechanics to molecular neurobiology: a cation-pi binding site in the nicotinic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:12088-12093.

Anhang I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematische Darstellung eines Neurons und einer chemischen Synapse

Abbildung 2. Die Superfamilie der ligandengesteuerten Ionenkanäle

Abbildung 3. Aufbau der N-terminalen Extrazellulärdomäne des GlyR

Abbildung 4. Struktur des Glycinrezeptors

Abbildung 5. Regelkreis glycinerner Neurotransmission im Rückenmark

Abbildung 6. Humane Hyperekplexiemutationen in *GLRA1* und *GLRB*

Abbildung 7. Der *oscillator*-Phänotyp und *in vitro rescue*

Abbildung 8. Übersicht des transgenen Komplementierungsansatzes

Abbildung 9. Prinzip und Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik

Abbildung 10. Vorarbeiten zur *in vitro* Komplementation des GlyR

Abbildung 11. Darstellung der Konstrukte für die *in vitro* Komplementation

Abbildung 12. *Biotinylierungsassay* zur Bestimmung der Oberflächenexpression

Abbildung 13. Immunzytochemische *LIVE*-Färbung (ko-) transfizierter *tail*-Konstrukte

Abbildung 14. Immunzytochemische Färbung (ko-)transfizierter *tail*-Konstrukte nach
Permeabilisierung

Abbildung 15. Elektrophysiologische Charakterisierung der Komplementationskonstrukte

Abbildung 16. Untersuchung verschiedener spd^{ot} -Komplementationskonstrukte

Abbildung 17. Genotypisierungen

Abbildung 18. Detektion des transgenen Proteins im Western-Blot

Abbildung 19. Gewichtskontrolle transgener *oscillator*-Mäuse

Abbildung 20. Schematische Darstellung der Generierung chimärer GlyR-Varianten

Abbildung 21. Immunzytochemische Detektion chimärer GlyR-Varianten in HEK293-Zellen

Abbildung 22. Oberflächenbiotinylierung chimärer GlyR-Konstrukte

Abbildung 23. Elektrophysiologische Charakterisierung chimärer GlyR-Varianten

Abbildung 24. Vererbung und Lokalisation der Patientenmutation P366L

Abbildung 25. Übersicht der Konstrukte zur Untersuchung der Patientenmutation P366L

Abbildung 26. Immunzytochemische Detektion der P366-Varianten in HEK293-Zellen

Abbildung 27. Oberflächenbiotinylierung der P366-Einzelmutanten

Abbildung 28. Elektrophysiologische Charakterisierung des Einflusses von Mutationen
innerhalb der Sequenz $^{364}\text{NPPAPSKSP}^{373}$ auf die Rezeptorfunktion

Abbildung 29. Elektrophysiologische Charakterisierung von P366L

Abbildung 30. Spannungsklemmen-Fluorometrie-Versuche im Oozytenexpressionssystem

Abbildung 31. Koimmunpräzipitation von GlyR α 1 und Collybistin

Abbildung 32. Immunzytochemische Detektion von Collybistin in transfizierten Cos7-Zellen

Abbildung 33. Immunzytochemische Detektion von Collybistin in infizierten
Hippocampusneuronen

Abbildung 34. Quantifizierung der Intensität des Collybistin-Signals in infizierten
Hippocampusneuronen

Abbildung 35. Elektrophysiologische Charakterisierung des Effektes von Collybistin auf die
GlyR-Funktion in HEK293-Zellen

Anhang II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Kommerzielle Reagenzienansätze

Tabelle 2. Plasmide und Vektoren

Tabelle 3. In dieser Studie verwendete Enzyme

Tabelle 4. In dieser Studie verwendete Primär-und Sekundärantikörper

Tabelle 5. DNA-und Proteinstandardlösungen

Tabelle 6. Zellkulturmedien-und Lösungen

Tabelle 7. Transfektionslösungen-und Reagenzien

Tabelle 8. Medien für Bakterienkulturen

Tabelle 9. Puffer und Lösungen für Western-Blot und SDS-PAGE

Tabelle 10. Elektrophysiologiepuffer

Tabelle 11. Puffer und Lösungen für immunzytochemische Färbeexperimente

Tabelle 12. Transfektion von HEK293-Zellen

Tabelle 13 Transfektion von Cos7-Zellen

Tabelle 14. Standard-PCR-Mix

Tabelle 15. Temperatur und Zeiten der Standard-PCR.

Tabelle 16. Pipettierschema verschiedener Restriktionsansätze

Tabelle 17. Maximale Stromantworten (I_{\max}) trunkierter Komplementationskonstrukte

Tabelle 18. Gesamtübersicht der Charakterisierung der GlyR-Chimären

Tabelle 19. Gesamtübersicht der elektrophysiologischen Messwerte der P366-Varianten

Tabelle 20. Auflistung der in dieser Studie verwendeten Primer mit dazugehöriger Schmelztemperatur T_{Schmelz} .

Anhang III	Abkürzungsverzeichnis
Abb	Abbildung
Ach	Acetylcholin
AChR	Acetylcholinrezeptor
AChBP	acetylcholin binding protein
ASS	alternative splice site
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumine
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CMV-Promotor	Promotor des <i>Cytomegalo</i> -Virus
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribbonukleinsäure
ECL	enhanced chemiluminescence
ECFP	enhanced cyan fluorescent protein
FCS	fetal calf serum
EtOH	Ethanol
g	Schwerebeschleunigung
GABAR	GABA-Rezeptor
GFP	green fluorescent protein
GlyR	Glycinrezeptor
GlyT2	Glycintransporter 2
h	Stunde(n)
kDa	Kilodalton
M	Molar
mab	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mV	Millivolt

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
ms	Millisekunde
$\text{M}\Omega$	Megaohm
nA	Nanoampere
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NB	Neurobasalmedium
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	phosphate buffered saline
pF	Picofarad
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
rpm	rounds per minute
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Seite
tg	transgen
UV	ultraviolett
V	Volt
wt	Wildtyp
5-HTR	Serotoninrezeptor

Anhang IV Primerliste

Primer			
Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Verwendung	T _{Schmelz} [°C]
mma1-Sin7	GCCTCCGTGCTTTCTCCCTG	Genotypisierung	60,2
	C	Oscillator	
mma1-Ain8	CCCAGCCACGCCCA AAG	Genotypisierung Oscillator	57,2
CFP-Genotyping 07 fw	GCTCTCTGGCTTCGTAAGT	Genotypisierung	53,8
	G	<i>Gla1</i> -EX9	
CFP-Genotyping 09 rv	AGCACTGCACGCCCAAGG	Genotypisierung	60,0
	C	<i>Gla</i> -EX9	
pEGMHE- BamHI-fw	CCCCGGGGATCCATGGCCA	flankierender Primer	65,8
	GCTTCAA	Oocytenexperimente	
pEGMHE- BamHI-rv	CCAGATCAAGCTTGCTCTA	flankierender Primer	65,1
	GAGAATTCTCACTGGTT	Oocytenexperimente	
FUVAL_BamHI_ forward	CGGGATCCATGTACAGCTT	flankierender Primer	65,6
	CAATACTCTTCGACTC	FUVal-Klonierung	
FUVAL_NotI_re verse	ATAGTTTAGCGCCGCTCA	flankierender Primer	72,1
	CTGGTTGTGGACGTCCTCT CTACG	FUVal-Klonierung	
mma1_hsa1- TM1-seq-fw	CCTTCTGGATCAACATGGA T	Sequenzierung TM3- 4loop Konstrukte	49,7
OSCI-TAIL-AS	TCACTTGTTGTGGACATCC TCTC	Sequenzierung TM3- 4loop Konstrukte	55,3

384 pRK-Cis3 reverse	AACCATTATAAGCTGCAAT AAAC	flankierender Primer pRK5/7-Konstrukte	48,1
385 forward pRK5/pRK7	TAGGTGACACTATAGAATA ACATC	flankierender Primer pRK5/7-Konstrukte	50,6
P366L for	CCACCAACCCCCTTCCTGC ACCAT	P366L-Klonierung	62,5
P366L rev	GGT GCA GGA AGG GGG TTG GT	P366L-Klonierung	57,9
P366A-F-KasI	CACCACCACCCGGCGCCTG CACCA	P366A-Klonierung	67,5
P366A-R-KasI	GATGGTGCAGGCGCCGGGT TGGTGGT	P366A-Klonierung	67,4
P366C-Bsp1286I- F	CCAACCCGTGCCCTGCA	P366C-Klonierung	54,3
P366C-Bsp1286I- R	TGCAGGGCACGGGTTGG	P366C-Klonierung	54,3
P366W-EaeI-F	CCAACCCCTGGCCGGCA	P366W-Klonierung	56,7
P366W-EaeI-R	TGCCGGCCAGGGGTTGG	P366W-Klonierung	56,7
P366T-BsaHI-F	CCAACCCGACGCCTGCA	P366T-Klonierung	54,3
P366T-BsaHI-R	TGCAGGCGTCGGGTTGG	P366T-Klonierung	54,3
P366R-SacII-F	CCAACCCGCGGCCTGCA	P366R-Klonierung	56,7

P366R-SacII-R	TGCAGGCCGCGGGTTGG	P366R-Klonierung	56,7
P366A-F	CACCACCAACCCCGCACCT GCACCA	P366A-Klonierung	65,9
P366A-R	GGTGCAGGTGCGGGGTTGG TGGT	P366A-Klonierung	64,2
K371A-F	GCGCCATCCGCATCCCCGG AGGA	K371A-Klonierung	66
K371-R	CCTCCGGGGATGCGGATGG CGCA	K371A-Klonierung	66
P365-P373L-fv	CAGTAACACCACCAACCTC CTACTAGCACTATCTAAGT CCCTAGAGG	P365-373L- Klonierung	70,7
P365-P373L-rv	CGCATCTCCTCTAGGGACT TAGATAGTGCTAGTAGGAG GTTGGT	P365-373L- Klonierung	70,1
dP365-P369-fv	GGCGCCAACAACAGTAAC ACCACCAACTCTAAGTCCC CAGA	Δ P365-369- Klonierung	70,5
dP365-P369-rv	GTTTTTCGCATCTCCTCTGGG GACTTAGAGTTGGTGGTGT TA	Δ P365-369- Klonierung	68,5
hsa1_GLIC_IL_b as_motifs-fw	AGTCAACCAGCAAGAGCA GCAAAGAAGATCGACAAA ATATCCCGCATTGGC	GlyR α 1-GLIC(+) bm	71

hsa1_GLIC-IL- bas_motifs-rv	TGCTGCTCTTGCTGGTTGA CTTCTCCGCTTCCTCCTGAA TCGGAGCAGCT	GlyR α 1-GLIC(+) bm	74,4
hsa1_GLIC_IL_ wo_bas mot-fw	AGTCAACCAGCAAGAGCA GCAATTGGCTTCCCCATGG CCTTCCTCATTTTCAA	GlyR α 1-GLIC	72,3
hsa1- GLIC_IL_wo_ba s_mo-rw	TGCTGCTCTTGCTGGTTGA CTAGACACAAAGTTAACGG CAGCATATTCTAA	GlyR α 1-GLIC	69,2
hsa1_wo_TM3-4- loop-b_mo-fw	AAGAAGATCGACAAAATA TCCCGCATT	GlyR α 1- Δ TM3- 4(+) bm	55,2
hsa1_wo_TM3-4- loop-b_mo-rv	TCTCCGCTTCCTCCTGAATC GGAGCAGCT	GlyR α 1- Δ TM3- 4(+) bm	65,7
mma1-delpolyN- S-1174	GTCAAGGGTGCCACCACTA ACCCGCCT	mm GlyR α 1 Δ N366- 369	65,8
mma1-delpolyN- AS-1214	GCAGGAGGCGGGTTAGTG GTGGCACCCCTTGACAGA	mm GlyR α 1 Δ N366- 369	71,5
pNNNN fw	GTCAAGGGTGCCGCAGCTG CAGCTAACACTAA	mm GlyR α 1N366- 369A	67
pNNNN rev	GTTAGTGGTAGCTGCAGCT GCGGCACCCTT	mm GlyR α 1N366- 369A	67,1
a27RRK-F-EcoRI	GCGAATTCAGGAGGAAGA GGCGACCAGCCTGTCTGCA	myc-ID-RRKRR- Δ 22-TM4	72

G

a55EE-F-EcoRI	GCGAATTCATGGAGGAGCT CTTCATCCA	myc-ID-MEE-Δ55- TM4	61,4
d55-AA-F-EcoRI	GCGAATTCATGGCAGCACT CTTCATCCA	myc-ID-MAA-Δ55- TM4	61,4
Δ62EAEE-F	CCACTCAGCGTGGCTGAAG CCGAGGAGATCGACAA	myc-ID-EAEE-Δ62- TM4	70,3
d62AAAA-F- EcoRI	GCGAATTCGCAGCAGCAGC AATCGACAAA	myc-ID-AAAA- Δ62-TM4	62,9

Tabelle 20. Auflistung der in dieser Studie verwendeten Primer mit dazugehöriger Schmelztemperatur T_{Schmelz}

CURRICULUM VITAE

Georg Langhofer

Geburtsdatum/Geburtsort: 24.11.1985, Berlin

Nationalität: Deutsch

Adresse: Fröhlichstrasse 7, 97082 Würzburg

06/2012-2016

Universitätsklinikum Würzburg, Institut für klinische Neurobiologie, Arbeitsgruppe Prof. C. Villmann

- Promotion: Über die Bedeutung intrazellulärer Subdomänen des Glycinrezeptors für die Kanalfunktion
- Studentisches Mitglied der „Graduate School of Life Science“

07/2011-04/2012

Universitätsklinikum Würzburg, Institut für klinische Neurobiologie, Arbeitsgruppe PD Dr. R. Blum

- Diplomarbeit: Effekte des Neurotrophins BDNF auf den Tyrosinkinaserzeptor TrkB im Bereich von Millisekunden bis Sekunden.

2008-04/2012

Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Deutschland

- Diplom in Biologie

2006-2008

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland

- Vordiplom in Biologie

1996-2005

Liborius-Gymnasium Dessau, Deutschland

1992-1996

5. Grundschule Dessau, Deutschland

Arbeitserfahrung:

10/2011

Praktikum am Institut für klinische Neurobiologie, Würzburg, Deutschland, Arbeitsgruppe PD Dr. R. Blum
Verhaltensanalyse transgener Mäuse, diagnostische PCR und Gewebe-Präparationstechniken

10/2010-04/2011

Wissenschaftlicher Assistent in der molekularen Psychiatrie, Würzburg, Deutschland im Labor für translationale Neurowissenschaften, Arbeitsgruppe Prof. Dr. K.P. Lesch
Statistische Analyse und stereologische Abschätzung von Zellpopulationen in der Amygdala

Forschungsstipendien:

2015, GSLS Reisestipendium für das 45. jährliche Treffen der Gesellschaft für Neurowissenschaften 2015 in Chicago

01/09/2014- 12/10/2014 Forschungsstipendium der Bayrischen Forschungstiftung, München zur Bearbeitung des Projekts

„Krankheitsassoziierte Ionenkanalmutationen und deren Einfluss auf die Molekülbeweglichkeit“ in Kooperation mit Prof J. Lynch, QBI, Brisbane, Australien

Publikationen

Teile dieser Dissertation sind bereits veröffentlicht

Length of the TM3-4 loop of the glycine receptor modulates receptor desensitization.

Langlhofer G, Janzen D, Meiselbach H, Villmann C. *Neurosci Lett*. 2015 Jul 23;600:176-81. doi: 10.1016/j.neulet.2015.06.017. Epub 2015 Jun 12. PMID: 26079326

weitere Publikationen:

Disturbances of Ligand Potency and Enhanced Degradation of the Human Glycine Receptor at Affected Positions G160 and T162 Originally Identified in Patients Suffering from Hyperekplexia.

Atak S, **Langlhofer G**, Schaefer N, Kessler D, Meiselbach H, Delto C, Schindelin H, Villmann C. *Front Mol Neurosci*. 2015 Dec 22;8:79. doi: 10.3389/fnmol.2015.00079. eCollection 2015. PMID: 26733802

Disturbed neuronal ER-Golgi sorting of unassembled glycine receptors suggests altered subcellular processing is a cause of human hyperekplexia.

Schaefer N, Kluck CJ, Price KL, Meiselbach H, Vornberger N, Schwarzinger S, Hartmann S, **Langlhofer G**, Schulz S, Schlegel N, Brockmann K, Lynch B, Becker CM, Lummis SC, Villmann C. *J Neurosci*. 2015 Jan 7;35(1):422-37. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1509-14.2015. PMID: 25568133

Single expressed glycine receptor domains reconstitute functional ion channels without subunit-specific desensitization behavior.

Meiselbach H, Vogel N, **Langlhofer G**, Stangl S, Schleyer B, Bahnassawy L, Sticht H, Breitinger HG, Becker CM, Villmann C. *J Biol Chem*. 2014 Oct 17;289(42):29135-47. doi: 10.1074/jbc.M114.559138. Epub 2014 Aug 20. PMID: 25143388

Glycine receptor mouse mutants: model systems for human hyperekplexia.

Schaefer N, **Langlhofer G**, Kluck CJ, Villmann C. *Br J Pharmacol*. 2013 Nov;170(5):933-52. doi: 10.1111/bph.12335. Review. PMID: 23941355

GABA concentration and GABAergic neuron populations in limbic areas are differentially altered by brain serotonin deficiency in Tph2 knockout mice.

Waider J, Proft F, **Langlhofer G**, Asan E, Lesch KP, Gutknecht L. Histochem Cell Biol. 2013 Feb;139(2):267-81. doi: 10.1007/s00418-012-1029-x. Epub 2012 Oct 11. PMID: 23052836

Poster

A proline rich stretch influences functional ion channel properties of the human glycine receptor

Georg Langlhofer, Peter Baumann, Dieter Janzen and Carmen Villmann; SFN 45th Annual Meeting, Chicago, USA, Oktober 2015

The large intracellular loop of the human glycine receptor $\alpha 1$: It's not all about the size

Georg Langlhofer, Dieter Janzen and Carmen Villmann; 40th FEBS Congress, Berlin, Juli 2015

A proline rich stretch influences functional ion channel properties of the human glycine receptor

Georg Langlhofer, Peter Baumann, Dieter Janzen and Carmen Villmann; SFN 44th Annual Meeting, Washington, USA, November 2014

Characterization of a novel human mutation in the glycine receptors large intracellular loop

Georg Langlhofer and Carmen Villmann; 8th international Symposium of the Graduate School of Life Sciences Wuerzburg, Oktober 2013

The importance of charged residues in the intracellular TM3-4 loop of the inhibitory glycine receptor

Georg Langlhofer, Bea Unterer and Carmen Villmann; 10th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, März 2013

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Über die Bedeutung intrazellulärer Subdomänen des Glycinrezeptors für die Kanalfunktion“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen als Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum:

Unterschrift:

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „Investigations into the relevance of glycine receptor intracellular subdomains to receptor channel function” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in a similar form.

Place, Date:

Signature:

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Carmen Villmann in erster Linie aufgrund der hervorragenden Betreuungsarbeit, der Bereitstellung eines interessanten Forschungsthemas und für die Möglichkeit in der AG Villmann promovieren zu dürfen. Besonders für die Offenheit für neue Ideen, den Einsatz und die Unterstützung in Bezug auf Forschungsaufenthalte außerhalb von Würzburg sowie das Vorleben eines unerschütterlichen Forschergeistes bin ich sehr dankbar.

PD Dr. Robert Blum danke ich für all seine Bemühungen im Rahmen meiner Diplomarbeit und meiner Promotion, für die stets offene Tür und die Hilfsbereitschaft die ich erleben durfte und für die Bereitschaft sich als Zweitgutachter meines Prüfungskomitees anzubieten.

Prof. Erhard Wischmeyer möchte ich für die Bereitschaft als Drittgutachter meines Prüfungskomitees einzutreten, sowie für die vielen Ratschläge und Diskussionen bei der Betreuung meiner Arbeit danken.

Prof. Michael Sendtner danke ich für die Ratschläge und Empfehlungen im Rahmen des Progress Report Seminars, die meine Projekte stets unterstützt und vorangetrieben haben.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der AG Villmann, Sinem Atak, Natascha Schäfer, Nadine Vornberger, Gudrun Schell, Niels von Wardenburg, Paul Drehmann und Barbara Schleyer für die Unterstützung im Labor und bei der vorliegenden Arbeit, aber auch für all die schönen Stunden außerhalb S1/2-Bereichs.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der AG Sendtner, welche mich immer unterstützt haben und ein freundliches und angenehmes Arbeitsklima geschaffen haben. Besonders bei Thomas Andreska und Michael Skoruppa bedanke ich mich ganz herzlich für die vielen lustigen Stunden, alle freundschaftlichen aber auch professionellen Ratschläge sowie die schöne Zeit, die wir gemeinsam in Würzburg verbracht haben.

Für die gute und verständnisvolle Zusammenarbeit möchte ich mich bei dem ganzen Team des Tierstalls der klinischen Neurobiologie bedanken.

Außerdem gilt mein Dank der GSLS sowie der Bayerischen Forschungsförderung, welche mir außergewöhnliche Forschungsaufenthalte in Brisbane und Chicago ermöglicht haben.

Meine besondere Dankbarkeit möchte ich gegenüber meinen Eltern und meiner Familie ausdrücken, die niemals an mir gezweifelt haben, auch wenn ich selbst nicht mehr weiter wusste und mich mit Geduld und viel Verständnis unterstützt haben. Ich danke euch für euer Vertrauen und die Gewissheit immer auf eure Hilfe setzen zu können.