

Aus dem Institut für Klinische Neurobiologie der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. Michael Sendtner

**Untersuchung der synaptischen Lokalisation des heteromeren Glycin-Rezeptors
in einem neuen Mausmodell der *Startle* Erkrankung
-mit Fokus auf die GlyR- β -Untereinheit-
Inauguraldissertation**



**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Isabell Fuhl
aus Maßbach**

Würzburg, Juli 2023

Referentin: Prof. Dr. Carmen Villmann

Korreferent: Prof. Dr. Robert Blum

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 09.01.2024

Die Promovendin ist Zahnärztin

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
1.1	Das Nervensystem	1
1.2	Der Glycin-Rezeptor	1
1.2.1	Allgemeine Merkmale	1
1.2.2	Struktureller Aufbau	3
1.2.3	Diversität der GlyR-Untereinheiten α und β	5
1.2.8	Verankerung des Glycin-Rezeptors an der inhibitorischen Synapse	9
1.2.7	Biogenese	11
1.2.8	Die glycinerge Synapse im Nerv-Muskel-Kreislauf	12
1.3	Hyperekplexie	14
1.4	Mausmodelle	16
1.4.1	<i>shaky</i> Maus - <i>Glr1^{sh}</i>	17
1.4.2	<i>eos</i> Maus - <i>Glr^{eos}</i>	19
2.	Ziele der Arbeit	20
3.	Material und Methoden	22
3.1	Organismen	22
3.1.1	Zelllinie	22
3.1.2	Mauslinien	22
3.1.3	Ethik- und Tierversuchsvotum	23
3.2	Chemikalien	24
3.2.1	Chemikalien allgemein	24
3.2.2	Größenstandards	24
3.2.3	Plasmide	25
3.2.4	Primer	26
3.2.5	Enzyme	26
3.2.6	Antikörper	27
3.2.7	Zellkulturlösungen und Medien	28
3.2.8	Standardlösungen	29
3.3	Verbrauchsmaterialien	30
3.4	Geräte und Software	30
3.5	Methoden der Molekularbiologie	31
3.5.1	Isolierung genomischer DNA aus Mausbiopsien	31
3.5.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
3.5.3	Verdau des PCR-Produkts bei <i>Glr1^{sh}</i> - Genotyp	32
3.5.4	Agarose-Gelelektrophorese	33
3.6	Wiegeversuche	34
3.7	Zellkultur	36

3.7.1	HEK293-Zellen	36
3.7.2	Rückenmarksneurone	38
3.7.3	Rückenmarksschnitte	40
3.8	Immunzytochemische Färbungen	41
3.8.1	HEK293-Zellen	41
3.8.2	Rückenmarksneurone	43
3.8.3	Rückenmarksschnitte	45
3.9	Mikroskopie	46
3.9.1	Konfokale Mikroskopie.....	46
3.9.2	Axio Imager 2.....	46
3.10	Statistische Auswertung	47
3.10.1	Wiegedaten.....	47
3.10.2	Mikroskopiedaten.....	47
4.	Ergebnisse	49
4.1	Glycin-Rezeptor Nachweis in HEK293-Zellen.....	50
4.2	Expression des GlyR in Rückenmarksneuronen	52
4.2.1	Prä- und postsynaptische Ziel-Epitope.....	53
4.2.2	Detektion der GlyR- β - Untereinheit	57
4.3	<i>Glrb^{eos}</i> Tiere unterschieden sich nicht im Gewicht von Wildtyp Kontrolltieren	60
4.4	Kreuzung und Genotypisierung	63
4.5	Verstärkung des β^{eos} -Signals.....	65
4.6	Quantitative Expression von Markerproteinen der glycinergen Synapse im <i>shaky</i> Mausmodell.....	70
4.6.1	Linie 131 <i>Glr1^{sh}</i>	72
4.6.2	Linie 204 <i>Glrb^{eos} x Glr1^{sh}</i>	76
4.7	Expressionsverteilung von GlyR- α 1, β^{eos} und Gephyrin in Rückenmarksschnitten (<i>Glrb^{eos} x Glr1^{sh}</i>).....	87
5.	Diskussion	93
5.1	Glycin-Rezeptor in transfizierten HEK293-Zellen zeigt für GlyR- α 1 ^{Q177K} eine erniedrigte Oberflächenexpression	94
5.2	Die eingefügte mEos4b-Sequenz besitzt keinen Einfluss auf den Phänotyp und das Gewicht von Tieren der Hybridlinie <i>Glrb^{eos} x Glr1^{sh}</i>	96
5.3	Der <i>Startle</i> Phänotyp homozygoter <i>shaky</i> Tiere ist durch veränderte Expressionsmuster von Markern der glycinergen Synapse bedingt.....	100
5.4	Expressionsmuster in Rückenmarksschnitten sind äquivalent zu <i>in vitro</i> Rückenmarksneuronen-Kulturen	106
6.	Zusammenfassung.....	107
7.	Literaturverzeichnis.....	111
8.	Appendix	1

8.1	Abkürzungsverzeichnis	1
8.2	Abbildungsverzeichnis	4
8.3	Tabellenverzeichnis.....	6
8.4	Kontrollbilder	9
8.5	Statistik der Wiegedaten.....	11
8.6	Bearbeitung der Abbildungsbilder	13
8.7	Embryo- und Messbilderzuordnung.....	17
8.8	Tabellen statistischer Auswertung	19
8.9	Dendriten Einteilung am Beispiel GlyR- α 1	26
8.10	Abbildungen statistischer Auswertung.....	27
8.11	Beispielbild für stark gefärbte Dendriten.....	32
8.12	Lizenzen	33
8.13	Danksagung.....	36

1. Einleitung

1.1 Das Nervensystem

Bei Wirbeltieren unterscheidet man zwischen dem zentralen und peripheren Nervensystem. Dabei übernimmt das periphere Nervensystem hauptsächlich die informationsleitende Funktion und umfasst alle Strukturen außerhalb des zentralen Nervensystems, welches durch das Gehirn und Rückenmark gebildet wird und zusätzlich die Fähigkeit der Informationsverarbeitung besitzt.

Die Kommunikation der Nervenzellen erfolgt vor allem durch die Reizweiterleitung chemischer Synapsen. Die Kontaktstelle der Nervenzellen wird in Prä- und Postsynapse unterteilt. Das ankommende elektrische Aktionspotential bewirkt präsynaptisch eine chemische Transmitterfreisetzung, welche postsynaptisch über eine Rezeptorbindung entweder in ein erregendes (exzitatorisches) oder hemmendes (inhibitorisches) Potential umgesetzt wird. Das Membranpotential des nachgeschalteten Neurons ist dabei vom freigesetzten Transmitter und vom postsynaptischen Rezeptor abhängig, welche sich weiter in metabotrope und ionotrope Rezeptoren unterteilen lassen. Letztere bilden durch ihre transmembranen Anteile eine Ionenpore, welche aufgrund der Transmitterbindung spezifische Ionen leitet. Die liganden-gesteuerten Ionenkanäle (*ligand-gated ion channels*, LGICs) gliedern sich in exzitatorische und inhibitorische LGICs (Lynch 2004, Mense 2014).

1.2 Der Glycin-Rezeptor

1.2.1 Allgemeine Merkmale

Der Glycin-Rezeptor (GlyR) zählt zu den Cys-Loop-Rezeptoren (CLRs). GlyRs sind eine Untergruppe der inhibitorischen LGICs und aus fünf Untereinheiten aufgebaut (Lynch 2004). Aus den vier α -Untereinheiten ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) des Glycin-Rezeptors können homomere funktionelle Ionenkanäle gebildet werden (Turecek and Trussell 2001), während die β -Untereinheit nur zusammen mit α -Untereinheiten funktionelle Rezeptorkomplexe bilden kann (Griffon, Büttner et al. 1999).

Homomere Glycin-Rezeptoren wurden bisher nur an extrasynaptischen und präsynaptischen Stellen beschrieben und bilden beispielsweise als homomere GlyR $\alpha 2$ den vorherrschenden exzitatorischen Ionenkanal im embryonalen Rückenmark (Turecek and Trussell 2001, Lynch 2009). Auch GlyR mit gemischten α -Untereinheiten sind möglich (Harvey, Depner et al. 2004).

Die Mehrzahl der Glycin-Rezeptoren bilden heteromere Konfigurationen, welche über das Strukturprotein Gephyrin an der postsynaptischen Membran verankert sind und eine schnelle synaptische Hemmung im Hirnstamm und Rückenmark von erwachsenen Nagetieren und Menschen vermitteln (Lynch 2004). Die genaue Stöchiometrie des heteromeren GlyR wird gegenwärtig kontrovers diskutiert. So postulierten frühere Studien eine $3\alpha : 2\beta$ (Kuhse, Laube et al. 1993, Durisic, Godin et al. 2012) oder $2\alpha : 3\beta$ (Grudzinska, Schemm et al. 2005, Yang, Taran et al. 2012) Konfiguration. Neue Kryo-EM-Strukturen weisen auf eine $4\alpha : 1\beta$ Stöchiometrie hin. Ebenso führte eine Beteiligung von mehreren β -Untereinheiten zu nicht leitfähigen Kanälen (Yu, Bai et al. 2021, Zhu and Gouaux 2021).

Auf funktioneller Ebene unterscheiden sich homomere von heteromeren GlyR durch eine unterschiedliche Picrotoxin-Empfindlichkeit und größeren Einzelkanalleitfähigkeiten in transfizierten HEK-Zellen (Pribilla, Takagi et al. 1992, Beato, Groot-Kormelink et al. 2004, Burzomato, Beato et al. 2004).

Die Rangfolge der Agonisten des Glycin-Rezeptors beginnt mit dem Neurotransmitter Glycin, gefolgt von β -Alanin und schließlich Taurin. Als Antagonist ist das Alkaloid Strychnin zu nennen (Lynch 2009).

Neben der starken Expression im adulten Rückenmark sind GlyR im Hirnstamm auf diskrete Kerne lokalisiert, wie beispielsweise auf die Trigemuskern, den Nucleus hypoglossus motoris und Nucleus cochlearis. Darüber hinaus sind Glycin-Rezeptoren auch in der Netzhaut, dem Hippocampus, der Hirnrinde und Kleinhirn zu finden (Lynch 2004, Avila, Nguyen et al. 2013).

1.2.2 Struktureller Aufbau

Die erste Isolierung des Glycin-Rezeptors erfolgte 1982 aus dem Rückenmark der Ratte (Pfeiffer 1982). Danach erweiterten viele *in vitro* Studien den strukturellen Aufbau des Rezeptors bis 2015 zwei Studien mittels Kryo-EM-(Elektronenmikroskopie) und Röntgenkristallographie, die Strukturen von homomeren GlyR vorstellten und damit einen genauen Aufbau darlegten sowie die Regionen, die in den *Gating*-Mechanismus des Glycin-Rezeptors involviert sind, genau beschrieben (Du, Lü et al. 2015, Huang, Chen et al. 2015).

Der GlyR gehört zur Superfamilie der CLR's und ist in der *Abbildung 1* vereinfacht dargestellt. Diese sind aus fünf Untereinheiten aufgebaut, welche sich symmetrisch um eine zentrale Ionenpore anordnen. Jede Untereinheit besteht aus einem stark strukturierten N-Terminus sowie vier α -helikalen Transmembrandomänen (TM1-TM4) und einem extrazellulären kurzen C-Terminus (Abb. 1, A) (Du, Lü et al. 2015). Die vier α -helikalen Transmembrandomänen (TM1-TM4) sind von der Synapse aus betrachtet im Uhrzeigersinn angeordnet und durch intra- und extrazelluläre Schleifenstrukturen verbunden. Dabei formen die TM2 Domänen aller fünf Untereinheiten die Innenwand der Ionenpore des Rezeptors (Abb. 1, B) (Lynch 2004).

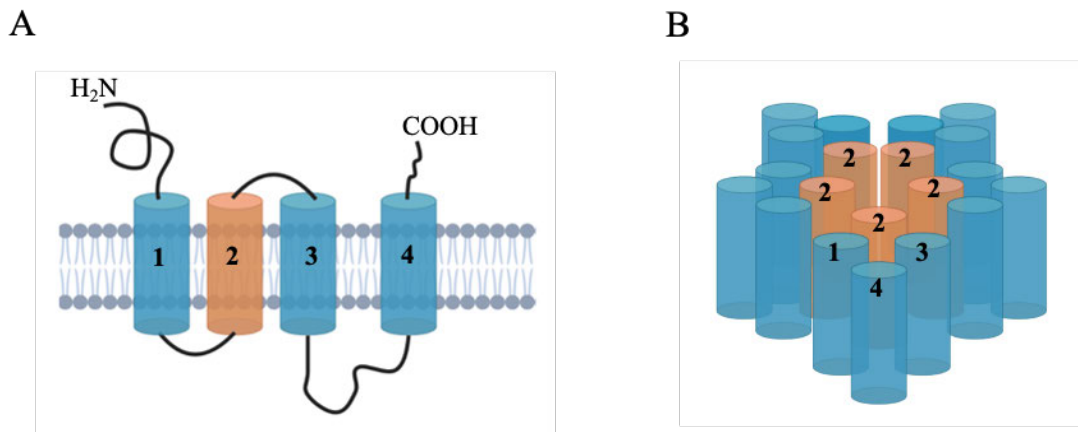


Abbildung 1 Glycin-Rezeptor Aufbau

A: Vereinfachte Darstellung einer Untereinheit des GlyR. Diese besteht aus vier Transmembrandomänen (1-4), welche über Schleifenstrukturen verbunden sind. Extrazellulär sind ein langer extrazellulärer N-Terminus (H_2N) und ein kurzer C-Terminus ($COOH$) zu finden. Der N-Terminus ist hier deutlich verkürzt dargestellt und korreliert nicht mit der Anzahl der Aminosäuren.

B: Fünf dieser Untereinheiten (A) bilden zusammen den pentameren GlyR. Von extrazellulär betrachtet sind die Transmembrandomänen 1-4 im Uhrzeigersinn angeordnet. Die Ionenpore wird von jeder Untereinheit mittels der Transmembrandomäne 2 gebildet.

Die *Abbildung 1* wurde mit BioRender.com von der Doktorandin hergestellt. Lizenz siehe *Anhang 8.12*

Die Transmembransegmente TM3-TM4 sind durch eine große intrazelluläre Schleife (ICD) verbunden, welche einer starken Diversität unterliegt und damit die untereinheitsspezifischen Eigenschaften bestimmt (Lynch 2004). Das strukturelle Wissen über die ICD ist jedoch begrenzt. Um die Methodik zu erleichtern wurde in der 2015 vorgestellten Röntgen-Struktur die TM3-TM4-Schleife mit ihren 76 Resten durch ein eingefügtes Tripeptid verkürzt (Huang, Chen et al. 2015). Auch die Kryo-EM-Strukturen von Du, Lü et al. (2015) sowie von Zhu, Gouaux et al. (2021) lösten diese ICD nicht näher auf.

Die große NH₂-terminale extrazelluläre Domäne (ECD) beherbergt die Agonistenbindestelle und eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten, welche für die Cys-Loop-Rezeptoren namensgebend ist (Abb. 2) (Vogel, Kluck et al. 2009). Die ECD besteht aus zwei kurzen α -Helices und 10 β -Faltblättern, welche eine verdrehte β -Faltblattanordnung annehmen und mit β -Faltblättern einer benachbarten Untereinheit die Ligandenbindetasche formen. Dabei bilden die Schleifen A, B und C der Hauptuntereinheit („+ Seite“) und die Schleifen D, E und F der komplementären Untereinheit („- Seite“) die Ligandenbindetasche (Brams, Pandya et al. 2011). Die F-Schleife wird im Folgenden als β 8- β 9 Schleife bezeichnet.

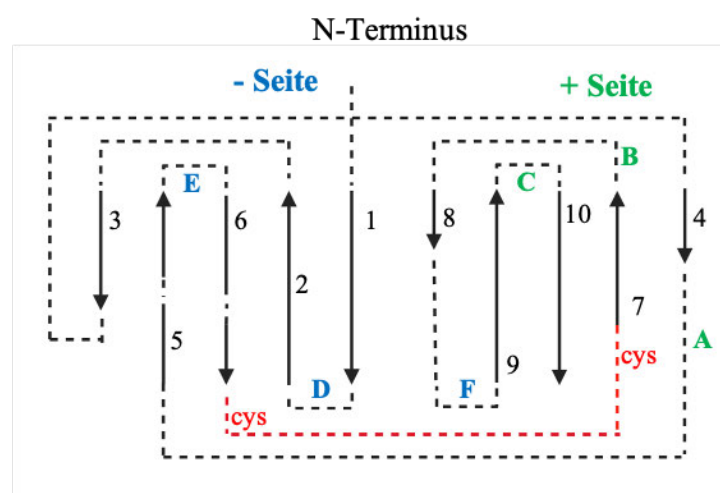


Abbildung 2 N-Terminus des Glycin-Rezeptors

Dargestellt ist der extrazelluläre N-Terminus. Es sind die β -Faltblätter 1-10 abgebildet, sowie die Disulfidbrücke (rot) der zwei Cysteinreste (cys). Als Modell werden die „+/- Seiten“ in einer ECD abgebildet. Die Ligandenbindetasche wird allerdings von zwei benachbarten Untereinheiten geformt.

Diese wird von den Schleifen A, B, C (grün dargestellt) der Hauptuntereinheit/ „+ Seite“ sowie den Schleifen D, E, F der komplementären Untereinheit/ „- Seite“ zusammengesetzt (blau gefärbt).

Die Abbildung 2 wurde mit BioRender.com von der Doktorandin hergestellt. Lizenz siehe Anhang 8.12

Durch die Aufklärung der Struktur des GlyR konnte der Mechanismus des *Gating*-Prozesses des Rezeptors verstanden werden. Bei der Bindung des Liganden Glycins an die ECD durchläuft der Glycin-Rezeptor mehrere Konformationsänderungen, welche auf den Rezeptor und insbesondere auf die TM2 übertragen werden und zur Kanalöffnung und zum Chlorid-Einstrom führen. Nachfolgend wird der komplexe Ablauf, welcher von Du, Lü et al. (2015) durch die homomere Zebrafisch-GlyR- $\alpha 1$ Struktur genauer definiert wurde, vereinfacht zusammengefasst und die für diese Arbeit relevanten Strukturen hervorgehoben. Von der Strychnin- zur Glycin-gebundenen Isoform des Rezeptors erfolgt eine Kippung und leichte Auswärtsdrehung der TM2-Helices, wodurch die zwei physikalischen Engstellen in der Mitte der Ionenpore vergrößert werden und damit den Chlorid-Einstrom ermöglichen. Während dieses Prozesses, durchläuft die C-Schleife eine Konformationsänderung von „offen“ zu „geschlossen“. Die C-Schleife bedeckt die Bindungstasche und ist mit der angrenzenden $\beta 8$ - $\beta 9$ Schleife verbunden, welche unterhalb der Bindungstasche liegt und somit indirekt an der Ligandenbindung beteiligt ist. Bei einer Bewegung der C-Schleife verschiebt sich folglich auch die $\beta 8$ - $\beta 9$ Schleife. Diese Kaskade von Konformationsänderungen innerhalb der ECD, einschließlich der $\beta 8$ - $\beta 9$ Schleife, wird auf die TM-Helices übertragen und bewirkt eine Öffnung der Ionenpore (Du, Lü et al. 2015).

1.2.3 Diversität der GlyR-Untereinheiten α und β

Für den GlyR wurden bisher vier α -Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von ca. 48 Kilodalton (kDa) und eine β -Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 58 kDa identifiziert (Pfeiffer, Graham et al. 1982). Darüber hinaus wird diese Diversität durch alternatives Spleißen der Untereinheiten erweitert (Malosio, Grenningloh et al. 1991, Nikolic, Laube et al. 1998). Die Klonierung einer α -Untereinheit gelang 1987, darauf folgte die β -Untereinheit im Jahre 1990. Die Homologie der Aminosäuresequenz ist bei den α -Untereinheiten mit 76-99% sehr stark ausgeprägt, während die β -Untereinheit eine Sequenzähnlichkeit von 47% mit der $\alpha 1$ -Untereinheit aufweist (Grenningloh, Rienitz et al. 1987, Grenningloh, Pribilla et al. 1990, Grenningloh, Schmieden et al. 1990).

α -Untereinheiten

$\alpha 1$

Für die GlyR- $\alpha 1$ -Untereinheit der Ratte existieren zwei Spleißvarianten, die sich in der TM3-TM4-Schleife unterscheiden (Malosio, Grenningloh et al. 1991). Die $\alpha 1$ -mRNA wird bei Ratten im Rückenmark ab dem 14. Embryonaltag (E14) exprimiert und steigt bis zum 15. postnatalen Tag (P15) stetig an. Im Hirnstamm und den Colliculi superiores und inferiores hingegen erfolgte der mRNA-Nachweis erst ab dem 5. postnatalen Tag. Der Großteil der $\alpha 1$ -mRNA wird im Rückenmark und in einzelnen Kernen des Hirnstamms exprimiert, aber auch im Hypothalamus und Thalamus konnte diese Untereinheit detektiert werden (Malosio, Marquèze-Pouey et al. 1991, Sato, Zhang et al. 1991). Im adulten Rückenmark ist die $\alpha 1$ -Untereinheit die am meisten exprimierte GlyR- α -Untereinheit (Jonsson, Morud et al. 2012)

Homomere Glycin-Rezeptoren $\alpha 1$ wurden an präsynaptischen Nervenendigungen in der Held-Kalyx, einem Teilbereich des Hörkreislaufes im Hirnstamm, und in lumbosakralen Rückenmarksneuronen der Ratte nachgewiesen. Die Funktion beruht auf der indirekten Beteiligung bei der Glycin Freisetzung in den synaptischen Spalt (siehe Kapitel 1.2.8) (Jeong, Jang et al. 2003, Xiong, Chen et al. 2014). Daneben wurden auch homomere GlyR $\alpha 1 / \alpha 3$ im dorsalen Horn des Rückenmarks detektiert (Harvey, Depner et al. 2004).

Heteromere GlyR $\alpha 1 / \beta$ stellen die wichtigsten synaptischen Inhibitoren an der Postsynapse von Motoneuronen im adulten Rückenmark dar (Lynch 2004) und sind im *Kapitel 1.2.8* näher erläutert.

$\alpha 2$

Im Rattenhirn ist die GlyR- $\alpha 2$ -mRNA bereits ab dem 14. Embryonaltag weit exprimiert und sinkt postnatal ab. In adulten Hirnregionen wie dem Thalamus und Hippocampus konnten weiterhin Expressionen detektiert werden. Dagegen nahm die Expression im Rückenmark der Ratte deutlich ab, bis schließlich keine $\alpha 2$ -Transkripte im ventralen Horn im Erwachsenenstadium mehr nachweisbar waren. Aufgrund der gegenläufigen Expression im Rückenmark wurde postuliert, dass ein entwicklungsbedingter Wechsel von homomeren exzitatorischen GlyR $\alpha 2$ zu heteromeren inhibitorischen GlyR $\alpha 1/\beta$ in den ersten zwei Wochen nach Geburt im Nager erfolgt (Malosio, Marquèze-Pouey et al. 1991, Liu and Wong-Riley 2013). Die depolarisierenden homomeren GlyR $\alpha 2$ sind besonders für die Neurogenese entscheidend. Dies bestätigt eine Studie zur Inaktivierung des *Gla2*-Gens, welches für die GlyR- $\alpha 2$ -Untereinheit kodiert. So zeigten *Gla2*-Knockout Embryonen eine Verarmung an kortikalen Neuronen, welche zu einer moderaten Mikrozephalie bei neugeborenen *Gla2*-Knockout Mäusen führte (Avila, Vidal et al. 2014).

$\alpha 3$

Die GlyR- $\alpha 3$ -mRNA wird im Rückenmark der Ratte erst ab der postnatalen Entwicklung exprimiert (Malosio, Marquèze-Pouey et al. 1991). Im adulten Rückenmark von Mäusen sind GlyR- $\alpha 3$ -Untereinheiten vor allem in der Lamina II des dorsalen Horns detektierbar, wo sie weitestgehend mit Gephyrin kolokalisiert vorliegen, was wiederum auf einen heteromeren GlyR $\alpha 3/\beta$ schließen lässt. Die Funktion dieses Rezeptors besteht in der Hemmung der Schmerzweiterleitung, was mit *Gla3*-Knockout-Mäusen bestätigt werden konnte (Harvey, Depner et al. 2004).

$\alpha 4$

In Mäusen wurde die GlyR- $\alpha 4$ -Untereinheit in der Netzhaut mit Gephyrin kolokalisiert (Heinze, Harvey et al. 2007). Während Erkenntnisse dieser Untereinheit bei der Maus nur begrenzt verfügbar sind, wurde es beim Menschen als Pseudogen postuliert (Lynch 2009).

β -Untereinheit

Das GlyR- β -Polypeptid der Ratte weist eine 99% Übereinstimmung mit der β -Untereinheit des Menschen auf (Handford, Lynch et al. 1996). Die GlyR- β -Untereinheit verankert heteromere Glycin-Rezeptoren über ein Aminosäure-Motiv (Reste 378-426) in der TM3-TM4-Schleife der β -Untereinheit mit dem Strukturprotein Gephyrin (Meyer, Kirsch et al. 1995, Kasaragod and Schindelin 2018). Durch diese hydrophobe Interaktion mit Gephyrin verankert die β -Untereinheit den heteromeren GlyR an die Postsynapse (Kim, Schrader et al. 2006).

Die Expression der GlyR- β -mRNA ist in embryonalen und frühen postnatalen Strukturen des Rattengehirns weit verbreitet. Im Rückenmark der Ratte konnte sie ab dem Embryonalstadium E14 nachgewiesen werden und stieg danach stark an, bis ein hohes Expressionsniveau postnatal erreicht wurde (Malosio, Marquèze-Pouey et al. 1991). Wie bereits erwähnt kann die β -Untereinheit keine funktionellen homomeren GlyR bilden und führt bei einer Einbeziehung von mehr als einer β -Untereinheit zu nicht leitfähigen Kanälen (Griffon, Büttner et al. 1999, Zhu and Gouaux 2021). Interessanterweise war aber die Verteilung der β -Transkripte viel breiter als die der α -Untereinheiten und wurde in vielen Hirnregionen detektiert, bei welchen keine α -Transkripte beobachtet werden konnten (Malosio, Marquèze-Pouey et al. 1991, Jonsson, Morud et al. 2012). Transkript- und Proteinexpressionsmuster der β -Untereinheit stimmen nicht genau überein. So zeigten Detektionen der β -Untereinheit mit einem entwickelten mAb-GlyR- β -Antikörper hohe Dichten von GlyR- β -Immunreaktivitäten im Rückenmark, Hirnstamm, Mittelhirn sowie den Riechkolben der Maus, während im Neokortex, Kleinhirn und Hippocampus kein β -Signal detektiert werden konnte (Weltzien, Puller et al. 2012).

Zur Erforschung der β -Untereinheit wurden bisher mRNA-Nachweise verwendet. Für den immunzytochemischen Proteinnachweis war bisher nur ein Antikörper vorhanden, welcher aufgrund fehlender Stabilität die Erforschung der β -Untereinheit begrenzte (Weltzien, Puller et al. 2012). Zukünftig wird dieser Kenntnisstand durch eine erst kürzlich entwickelte Mauslinie, welche eine endogen fluoreszierende β -Untereinheit enthält, maßgeblich erweitert werden (Maynard, Rostaing et al. 2021).

1.2.8 Verankerung des Glycin-Rezeptors an der inhibitorischen Synapse

Die Effizienz der neuronalen Signaltransduktion hängt stark von der Anzahl und Aktivität verfügbarer Rezeptoren in der postsynaptischen Membran ab (Specht, Izeddin et al. 2013). Für diese Verankerung des heteromeren GlyR ist das Strukturprotein Gephyrin bedeutend, daneben sind auch weitere Akteure wie Collybistin und Syndapin I zu nennen.

Gephyrin

Gephyrin ist ein 93 kDa großes zytoplasmatisches Protein und bindet den GlyR über die β -Untereinheit an die Postsynapse (Pfeiffer, Graham et al. 1982, Meyer, Kirsch et al. 1995). Das Strukturprotein Gephyrin wird in drei funktionelle Domänen unterteilt. Die N-terminale G-Domäne ist über eine strukturell flexible C-Domäne mit der C-terminalen E-Domäne verbunden. Die G-Domäne kann mit anderen G-Domänen trimerisieren, während die E-Domäne nur Dimere bilden kann. So wurde postuliert, dass Gephyrinproteine in einer hexagonalen Gitterstruktur angeordnet sind (Groeneweg, Trattnig et al. 2018). Die C-Domäne besitzt mehrere Stellen für posttranslationale Modifikationen und kann beispielsweise über die leichte Dynein-Kette mit Mikrotubuli interagieren (Kasaragod and Schindelin 2018). Die E-Domäne bildet die hydrophobe Bindungstasche, um die Glycin- und GABA_A-Rezeptoren konkurrieren (Kim, Schrader et al. 2006). GABA_A-Rezeptoren zählen ebenfalls wie der Glycin-Rezeptor zu den wichtigsten Inhibitoren im zentralen Nervensystem. Sie unterscheiden sich jedoch in der Bindungsaffinität zu Gephyrin, bei welcher der Glycin-Rezeptor deutlich stärker gebunden ist als der GABA_A-Rezeptor (Kasaragod and Schindelin 2018). Die Bindung zwischen Gephyrin und der GlyR- β -Untereinheit wird weiter in eine hochaffine und niedrigaffine Bindung unterteilt (Schrader, Kim et al. 2004). Dies steht mit dem Verständnis der dynamischen Organisation verschiedener Subpopulationen an inhibitorischen Synapsen im Einklang. Beim Modell der Rezeptor-Gerüst-Dynamik, wird zwischen einer engen Rezeptor-Gerüst-Domäne und einer lockeren Rezeptor-Gerüst-Population unterschieden. Letztere befindet sich im Austausch mit extrasynaptischen Pools. Dabei zeigten Fluoreszenz-Zeitrafferaufnahmen der markierten Rückenmarksneurone, dass die GlyR- und Gephyrin-Populationen sich mit ähnlichen Zeitskalen austauschten. Dies deutet daraufhin, dass GlyR und Gephyrin als Komplex zusammen in die Synapse ein- und austreten (Chapdelaine, Hakim et al. 2021).

Da bei der GlyR- β -Gephyrin Bindung auch eine Subdomäne der benachbarten E-Domäne beteiligt ist, wird vermutet, dass diese GlyR Bindung die Gephyrin-E-Dimerisierung und damit das Gephyrin-Clustering beeinflusst (Kim, Schrader et al. 2006). Diese strukturellen Daten implizieren, dass α -Untereinheiten des GlyR nicht zum Clusterverhalten von Gephyrin beitragen. Jedoch konnte eine Studie von Patrizio, Renner et al. (2017) bei heteromeren $\alpha 3$ -haltigen GlyR eine niedrigere Mobilität und eine höhere Dichte der Akkumulation zeigen im Vergleich zu Heteromeren, die $\alpha 1$ im Komplex beinhalten (Patrizio, Renner et al. 2017).

Collybistin

Ein weiterer Hinweis für die Bedeutung der α -Untereinheit des GlyR für das Gephyrin-Clustering zeigt eine potenziell synaptische Verankerungsstelle der GlyR- $\alpha 1$ -Untereinheit. Die Koexpression von GlyR- $\alpha 1$ - und Collybistin-Varianten in HEK293-Zellen sowie in Hippocampusneuronen identifizierte eine Polyprolin-II-Helix in der intrazellulären TM3-TM4 Schleife der menschlichen GlyR- $\alpha 1$ -Untereinheit als potentielle Bindestelle für Collybistin (Breitinger, Weinländer et al. 2021). Collybistin wurde weiterhin als Bindungspartner für Gephyrin identifiziert und lokalisiert durch die Assoziation zur Plasmamembran Gephyrin an die Postsynapse (Kins, Betz et al. 2000, Kneussel and Betz 2000).

Syndapin I

Darüber hinaus scheint Syndapin I für die Organisation glyzinerger Synapsen wichtig zu sein. Sowohl GlyR- β als auch GlyR- $\alpha 1$ besitzen die Fähigkeit, Syndapin I (Sdp I) in ihrer TM3-TM4-Schleife zu binden (Del Pino, Koch et al. 2014, Langlhofer, Schaefer et al. 2020). Die Syndapin-Proteine sind bei der Vesikelbildung an der Plasmamembran, dem trans-Golgi-Netzwerk, dem Recycling-Endosom sowie der Aktinpolymerisation beteiligt. In kultivierten Rückenmarksneuronen bewirkte ein Mangel von Sdp I eine Reduzierung von GlyR in Größe und Anzahl, während die Gephyrin Cluster unverändert blieben (Del Pino, Koch et al. 2014). Es wird postuliert, dass Sdp I am *Trafficking* und der synaptischen Verankerung von GlyR beteiligt ist und damit die Feinabstimmung glyzinerger Synapsen reguliert (Del Pino, Koch et al. 2014, Tröger, Seemann et al. 2021).

1.2.7 Biogenese

Als erster Schritt der Glycin-Rezeptor Proteinreifung wird die Aminosäurekette vom Ribosom kotranslational an das Endoplasmatische Retikulum (ER) weitergegeben. Im ER findet die post-translationale Faltung und Glykosylierung statt. Die Assemblierung der Glycin-Rezeptor-Untereinheiten zu homomeren und heteromeren Pentameren erfolgt im ER und setzt bestimmte Glykosylierungsschritte voraus (Schaefer, Roemer et al. 2018). Chaperone sind für die ER-Qualitätskontrolle verantwortlich und verhindern, dass unreife Proteine das ER verlassen (Helenius and Aebi 2004). Falsch gefaltete Proteine werden vom Proteasom abgebaut. Die GlyR-Komplexe werden an Vesikeln gebunden und zum cis-Golgi-Kompartiment transferiert (Schaefer, Roemer et al. 2018). Die heteromeren GlyR werden vor dem Verlassen des Endoplasmatischen Retikulums an Gephyrin gekoppelt (Hanus, Vannier et al. 2004).

Auch in den cis-, medial- und trans- Kompartimenten des Golgi-Apparats erfolgen Glykosylierungsschritte. Nachdem die GlyR-Komplexe aus dem Golgi-Apparat entlassen werden, werden sie entlang der Tubulinfilamente an die Zelloberfläche weitergeleitet (Schaefer, Roemer et al. 2018). Für den anterograden Transport vom Zellkörper zu den distalen Neuriten ist das Motorprotein Kinesin zuständig, während der retrograde Transport durch Dynein-Motorkomplexe reguliert wird. Bei heteromeren GlyR fungiert Gephyrin als Bindeglied zwischen der β -Untereinheit des GlyR und den Motorproteinen (Maas, Tagnaouti et al. 2006, Dumoulin, Triller et al. 2009).

Die Integration in die inhibitorische Synapse wird beispielsweise durch Collybistin gesteuert (Kneussel and Betz 2000). Die Lokalisierung von Glycin-Rezeptoren an der Zellmembran unterliegt einer Dynamik, bei der die Rezeptorkompartimente im Austausch mit subsynaptischen Domänen stehen (Chapdelaine, Hakim et al. 2021). Die GlyR werden durch Endozytose internalisiert und können anschließend entweder recycelt oder lysosomal degradiert werden (Schaefer, Roemer et al. 2018).

1.2.8 Die glycinerge Synapse im Nerv-Muskel-Kreislauf

In der Nerv-Muskel-Synapse sind Glycin-Rezeptoren bei der rekurrenten Hemmung von Motoneuronen entscheidend. Dieser neuromotorische Regelkreis beginnt mit sensorischen Neuronen in den dorsalen Wurzelganglien (Abb. 3, A). Diese setzen aufgrund taktiler oder sensorischer Reize im Rückenmark Glutamat frei. Nach der Bindung des Glutamats an Rezeptoren von Motoneuronen, generieren diese Aktionspotenziale, welche zur Freisetzung von Acetylcholin an der neuromotorischen Endplatte des Skelettmuskels führt. Es erfolgt ein Calcium-Einstrom in die Muskelzellen und der Muskel kontrahiert. Der Schutz vor Überkontraktion wird durch Glycin-Rezeptoren geregelt. Hierfür sind inhibitorische Interneurone (z.B. Renshaw-Zellen) wichtig. Diese werden entweder durch Acetylcholin von Kollateralaxonen der Motoneuronen oder durch Glutamat von primären Afferenzen aktiviert. Daraufhin setzen die Interneurone Glycin frei, welches an der postsynaptischen Membran von Motoneuronen bindet, zum Chlorid-Einstrom und zur Hyperpolarisation führt (Abb. 3, B). Mit dieser Rückkopplung wird nur so viel Acetylcholin freigesetzt, was zur Überschreitung des Schwellenpotenzials der Muskelzellen benötigt wird. Die Glycin-Rezeptoren sind somit für ein Gleichgewicht zwischen Erregung und Hemmung verantwortlich (Schaefer, Vogel et al. 2012).

Die inhibitorische glycinerge Synapse im Rückenmark wird aus der Präsynapse des Interneurons und der Postsynapse des Motoneurons gebildet und ist vereinfacht in der *Abbildung 3, B* dargestellt (Schaefer, Vogel et al. 2012). Die Glycin-Rezeptoren sind als homomere GlyR $\alpha 1$ präsynaptisch oder extrasynaptisch lokalisiert, während heteromere GlyR $\alpha 1/\beta$ in der Stöchiometrie $4\alpha 1:1\beta$ postsynaptisch oder extrasynaptisch vorhanden sind (Jeong, Jang et al. 2003, Yu, Bai et al. 2021). Das Gerüstprotein Gephyrin bildet mit den heteromeren Glycin-Rezeptoren einen engen Rezeptor-Gerüst-Komplex an der postsynaptischen Membran und steht dabei mit den extrasynaptischen lockeren Rezeptor-Gerüst-Komplexen im Austausch (Chapdelaine, Hakim et al. 2021).

Nach der Aktivierung der Interneurone fusionieren Glycin gefüllte Vesikel mit der präsynaptischen Membran und setzen Glycin in den synaptischen Spalt frei. Daneben sind auch homomere GlyR $\alpha 1$ beteiligt. Durch den präsynaptischen intrazellulären Chlorid-Ausstrom werden spannungsabhängige Calcium-Kanäle aktiviert, welche wiederum die Transmitterfreisetzung von Glycin fördern. Der Neurotransmitter Glycin bindet an dem postsynaptischen heteromeren GlyR $\alpha 1/\beta$ und bewirkt einen Chlorid-Einstrom mit anschließender Hyperpolarisation (Jeong, Jang et al. 2003, Schaefer, Vogel et al. 2012). Das Glycin-Recycling aus dem synaptischen Spalt erfolgt durch den präsynaptischen Glycin-Transporter 2 (GlyT2). Danach werden die Vesikel mit Glycin mit Hilfe des vesikulären inhibitorischen Aminosäuretransporters (VGAT/VIAAT) gefüllt und fusionieren bei erneuter Aktivierung (Zafra, Aragón et al. 1995, Schaefer, Harvey et al. 2022).

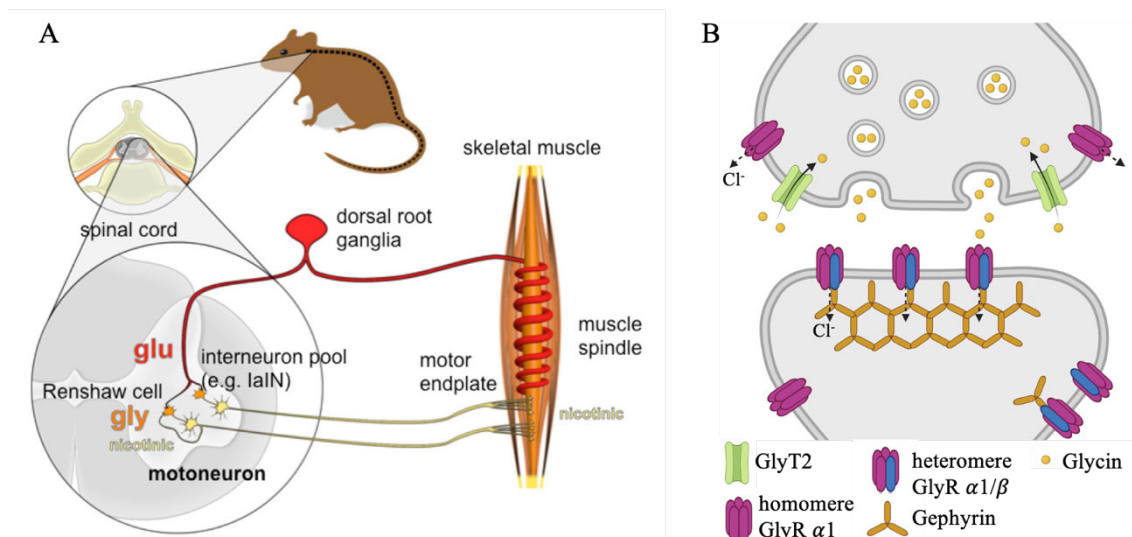


Abbildung 3 GlyR regulieren Nerv-Muskel-Kreislauf

A: Dargestellt ist ein Rückenmarksausschnitt einer Maus und die Verbindung zum Skelettmuskel. Nach der Aktivierung von sensorischen Neuronen (rot) führt das freigesetzte Glutamat zur Aktivierung von Motoneuronen (gelb). Die generierten Aktionspotentiale bewirken eine Kontraktion des Skelettmuskels. Interneurone werden durch Kollateralaxone von Motoneuronen aktiviert und schütten Glycin aus, welches an GlyR bindet. Daraufhin erfolgt ein Chlorid-Einstrom mit einer anschließenden Hyperpolarisation. (modifiziert nach Schaefer, Vogel et al. 2012) Lizenz siehe *Anhang 8.12*

B: GlyR sind in einer Stöchiometrie von $4\alpha 1:\beta$ angeordnet. Gephyrin verankert den GlyR an der Membran. Glycin wird durch GlyT2 in die Präsynapse aufgenommen und durch Vesikel oder indirekt durch homomere GlyR $\alpha 1$ freigesetzt. Der Chlorid-Ausstrom (Cl^-) erfolgt durch die Ionenpore des GlyR und bewirkt eine Depolarisation der Präsynapse. Die *Abbildung 3* wurde angepasst von „2 Panel with Synapses (layout)“ von BioRender.com (2022) und von der Doktorandin erstellt. abgerufen von <https://app.biorender.com/biorender-templates> ; Lizenz siehe *Anhang 8.12*

Abbildung 3, B stellt ein vereinfachtes Modell der Nerv-Muskel-Synapse dar. Darüber hinaus sind auch inhibitorische GABA_A-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran an Gephyrin gekoppelt und liegen auch teilweise mit den Glycin-Rezeptoren als gemischte Rezeptorkomplexe vor. Die Anzahl der GABA_A-Rezeptoren nimmt postnatal im ventralen Horn des Rückenmarks ab, so dass die Hemmung in der adulten Nerv-Muskel-Synapse hauptsächlich durch GlyR vermittelt wird (Gao, Stricker et al. 2001, Shimizu-Okabe, Kobayashi et al. 2022). Neben dem GlyT2 ist ebenso der Asc-1 (Alanin-Serin-Cystein) Plasmatransporter an der Regulation des synaptischen Glycinspiegels beteiligt (Schaefer, Harvey et al. 2022).

1.3 Hyperekplexie

Störungen der glycinergen Synapse im Nerv-Muskel-Kreislauf können die Ursache für das Erkrankungsbild der Hyperekplexie darstellen (Schaefer, Vogel et al. 2012).

Die seltene neuromotorische Erkrankung Hyperekplexie (*Startle Disease, Stiff-Baby-Syndrom*, OMIM 149400) ist seit den 1960er Jahren bekannt (Suhren, Bruyn et al. 1966). Durch eine gestörte glycinerge Neurotransmission im Rückenmark und Hirnstamm entsteht ein Ungleichgewicht zwischen Erregung und Hemmung zugunsten der Erregung. Dafür sind drei Hauptmerkmale entscheidend: schwere Muskelsteifheit bei Neugeborenen, verstärkte Schreckreflexe aufgrund akustischer und taktiler Reize sowie generalisierte Steifheit nach unerwarteter Schreckreaktion ohne willkürliche Bewegung (Tijssen, Vergouwe et al. 2002). Das Bewusstsein bleibt dabei vollständig erhalten. Darüber hinaus sind auch Apnoe-Episoden möglich, wenn eine glycinerge Dysfunktion in Hirnstammkernen vorliegt (Bode and Lynch 2014). Das klassische stereotype Bewegungsmuster wurde wie folgt beschrieben: Grimassieren des Gesichts, Anhebung der Schultern und Beugung von Kopf, Ellenbogen, Rumpf und Knie (Andermann, Keene et al. 1980). Allerdings ist die phänotypische Ausprägung individuell unterschiedlich und auch von der jeweiligen Genmutation abhängig (Thomas, Chung et al. 2013).

Hauptverantwortlich dafür sind vor allem Genmutationen im GlyR $\alpha 1/\beta$ oder GlyT2. Dabei kodieren die Gene *GLRA1* und *GLRB* für die GlyR-Untereinheiten $\alpha 1$ und β und *SLC6A5* für den Glycin-Transporter 2 im Menschen (Chung, Bode et al. 2013). Mit mehr als 50 Mutationen in *GLRA1*, bilden diese Gendefekte die Hauptursache für Hyperekplexie, gefolgt von *SLC6A5* und *GLRB*. Aber auch Mutationen in den Proteinen Gephyrin, Collybistin, Syndapin I und Asc-1-Transporter sowie Defekte in präsynaptischen GlyR geraten zunehmend stärker in den Fokus und unterstreichen die Komplexität der Erkrankung (Davies, Chung et al. 2010, Schaefer, Harvey et al. 2022).

Die Mutationen werden in dominant, rezessiv und *gain-of-function* unterteilt (Schaefer, Harvey et al. 2022). Während dominante Mutationen hauptsächlich in und um die kanalbildende TM2 Domäne des GlyR assoziiert sind und damit das GlyR *Gating* stören, sind rezessive Mutationen über den gesamten Rezeptor verteilt und beeinflussen vor allem die Zelloberflächenexpression (Chung, Vanbellinghen et al. 2010, Bode and Lynch 2014). Bei *gain-of-function* Mutationen wurden verlängerte Öffnungs- oder Schließzeiten identifiziert. Es wurde postuliert, dass die zeitlich erhöhte intrazelluläre Chlorid Konzentration zu einer Reduzierung synaptisch exprimierter Glycin-Rezeptoren führt und somit Hyperekplexie Symptome auslöst (Schaefer, Harvey et al. 2022).

Auch andere Erkrankungen können ähnliche Schrecksymptome auslösen. Neben neuropsychiatrischen Erkrankungen oder der schreckinduzierten Epilepsie ist das *Stiff-Person-Syndrom* (SPS) zu nennen (Bakker, van Dijk et al. 2006, Schaefer, Roemer et al. 2018). Beim SPS sind Autoantikörper gegen den Glycin-Rezeptor bei 10% der betroffenen Patienten ursächlich, die zu einer erhöhten Rezeptor Internalisierung führen (Rauschenberger, von Wardenburg et al. 2020). Die Diagnose erfolgt durch klinische Untersuchungen, Analyse der Schrecksymptome und genetisches Screening (Bakker, van Dijk et al. 2006). Bislang konnten die Erkrankten nur symptomatisch behandelt werden. Die Therapie der Wahl stellt daher Clonazepam, ein Benzodiazepin dar, welches die hemmenden synaptischen GABA_A-Rezeptoren positiv verstärkt (Thomas, Chung et al. 2013, Bode and Lynch 2014).

1.4 Mausmodelle

Um die Erkrankung der Hyperekplexie zu erforschen, wurden Mausmodelle herangezogen. Durch die hohe genomische Übereinstimmung mit dem Menschen, stellt die Maus ein geeignetes Modell dar (van der Weyden and Bradley 2006, Bult, Eppig et al. 2013). Für die Hyperekplexie sind derzeit folgende Mausmodelle bekannt: *spasmodic* (*spd*), *oscillator* (*spd^{o1}*), *spastic* (*spa*), *cincinnati*, *nmf11* und *shaky* (*sh*) (Schaefer, Roemer et al. 2018). Diese Mausmutanten werden rezessiv vererbt und sind bis auf *nmf11* spontan (Schaefer, Langlhofer et al. 2013).

Die Mutationen sind entweder im *Gral1*- oder *Glr1b*-Gen vertreten und bewirken verschiedene GlyR Störungen, welche nachfolgend aufgelistet sind. Bei der *spasmodic* Maus führt eine Punktmutation im *Gral1*-Gen zu einer verminderten Glycin-Affinität (Saul, Schmieden et al. 1994). Eine Mikrodeletion und *Frameshift* im *Gral1* Gen bewirkt bei der *oscillator* Mutante einen Verlust des funktionellen GlyR- $\alpha 1$ Proteins (Buckwalter, Cook et al. 1994, Kling, Koch et al. 1997). Die *spastic* Maus besitzt eine reduzierte GlyR- β Expression in voller Länge, welche durch eine Insertion im *Glr1b*-Gen begründet ist (Mülhardt, Fischer et al. 1994). Eine Duplikation im *Gral1*-Transkript der *cincinnati* Maus bewirkt ein vorzeitiges Stopcodon mit einem Verlust der GlyR- $\alpha 1$ Funktion, welche mit der *oscillator* vergleichbar ist (Holland, Fleming et al. 2006). Die *nmf11* Mutante ist durch ein chemisches Mutagen induziert und betrifft eine *Missense*-Mutation im *Gral1*-Gen, allerdings ist der genaue Mechanismus der GlyR Funktionsstörung noch nicht ausreichend erklärt (Traka, Seburn et al. 2006). Das neuartige *shaky* Mausmodell trägt eine *Missense*-Mutation im *Gral1*-Gen, welche zu einer verminderten Rezeptorfunktion führt (Schaefer, Berger et al. 2017).

Dabei unterscheiden sich die neuromotorischen Phänotypen in ihrer Ausprägung. Während die homozygoten *spasmodic* Mäusen nur milde Phänotypen mit einer normalen Lebenserwartung aufzeigen, weisen homozygote Mäuse der Linien *oscillator*, *spastic*, *shaky*, *cincinnati* und *nmf11* schwerere Phänotypen mit teils letalem Ausgang wenige Wochen nach der Geburt auf. Allerdings sind die genauen Mechanismen noch nicht vollständig verstanden und erklären beispielsweise nicht die bessere Kompensation beim

erkrankten Menschen im Vergleich zu den Mausmodellen (Schaefer, Vogel et al. 2012, Schaefer, Berger et al. 2017).

In dieser Doktorarbeit wurde für die weitere Erforschung der Hyperekplexie das *shaky* Mausmodell genutzt. Um die Auswirkungen der *Missense*-Mutation auf den postsynaptischen GlyR $\alpha 1/\beta$ besser zu verstehen, wurde eine Kreuzung mit einer neuartigen *eos* Mauslinie vollzogen. Nachfolgend werden die beiden Mausmodelle näher erläutert.

1.4.1 *shaky* Maus - *Glr1^{sh}*

Die homozygote *shaky* Maus (*Glr1^{sh/sh}*) zeigt ab der zweiten Woche nach Geburt einen neuromotorischen Phänotyp mit Tremor, Muskelkrämpfen, Steifheit und einem typischen Umklammern der Hinterfüße beim Anheben am Schwanz. Die kleineren und leichteren homozygot mutierten Mäuse sterben im Alter von 3 bis 6 Wochen (Schaefer, Berger et al. 2017). Dabei zeigte sich, dass die Beeinträchtigung der glycinergen Synapse dem Symptombeginn eine Woche vorausgeht (Schaefer, Zheng et al. 2018).

Die *Glr1^{sh}* Maus trägt eine *Missense*-Mutation in Exon 6 von Glutamin (Q) zu Lysin (K) an der Position 177 in der extrazellulären $\beta 8\text{-}\beta 9$ Schleife der GlyR- $\alpha 1$ -Untereinheit und wird daher als Q177K Mutation bezeichnet. Die $\beta 8\text{-}\beta 9$ Schleife ist mit benachbarten Schleifenstrukturen an der Bildung der Ligandenbindetasche beteiligt und entscheidend für Konformationsübergänge beim Öffnen und Schließen des Ionenkanals (Kapitel 1.2.2). Die Mutation stört die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Q177 und dem Rest R65 (Schaefer, Berger et al. 2017). Die Bedeutung dieses Wasserstoffbrückennetzwerks, konnte durch eine weitere *in vitro* Studie gezeigt werden. Hierfür wurden verschiedene Aminosäuren an der Position 177 substituiert. Bei Aminosäuren mit funktionell reduzierten Glycin-Potenzien konnten strukturelle Modellierungen eine Unterbrechung des Wasserstoffbrückennetzwerks bestätigen, wohingegen geringere funktionelle Störungen bei einem strukturellen Erhalt dieses Netzwerkes gemessen wurden (Janzen, Schaefer et al. 2017).

Grundsätzlich können in mutierten *shaky* Mäusen Glycin-Rezeptor Ionenkanäle gebildet werden, allerdings sind sie funktionell eingeschränkt mit verringerten Stromamplituden und schnellerem Schließverhalten (Schaefer, Berger et al. 2017). Elektrophysiologische Messungen von Hirnstammschnitten vor und nach dem Auftreten der Hyperekplexie Symptome zeigten signifikant verringerte Glycin Amplituden, Frequenzen und veränderte Zeitkonstanten für das Schließverhalten des Ionenkanals. Diese genannten Studien bestätigen die Annahme, dass die Schwere des Phänotyps auf den mutierten postsynaptischen GlyR $\alpha 1/\beta$ zurückzuführen ist, auch wenn der genaue Mechanismus noch nicht vollständig erklärbar ist.

Die Analyse synaptischer GlyR wurde bereits in früheren Studien im *shaky* Mausmodell untersucht (Schaefer, Berger et al. 2017). Es erfolgte eine Immunzytochemie an Rückenmarksschnitten und kultivierten Rückenmarksneuronen. Bei *Glr1^{sh/sh}* wurde im Vergleich zu *Glr1^{+/+}* vermehrt GlyR- $\alpha 1$ und vermindert Gephyrin an der Oberfläche exprimiert. Die Kolokalisationen von GlyR- $\alpha 1$ und Gephyrin sowie GlyR- $\alpha 1$ und VGAT/Synapsin wurden nur anhand von Mikroskopie-Aufnahmen bei *Glr1^{sh/sh}* als reduziert interpretiert, jedoch nicht quantitativ ausgewertet. Eine erhöhte Expression *in vivo* von GlyR- $\alpha 1^{Q177K}$ konnte nicht die verringerte synaptische Integration der mutierten GlyR- $\alpha 1$ -Untereinheiten kompensieren. Dies lässt vermuten, dass die Mutation Konformationsänderungen in die GlyR- β -Gephyrin Bindung überträgt und damit die synaptische Verankerung beeinträchtigt. Eine weitere Erklärung für die verringerte synaptische Integration wäre ein erhöhter Austausch des synaptischen Pools durch Endozytose. Auch eine Beteiligung präsynaptisch mutierter homomerer GlyR $\alpha 1$ wurde diskutiert (Schaefer, Berger et al. 2017).

1.4.2 *eos* Maus - *Glr^b^{eos}*

Die *eos* Maus ist ein Knock-In-Mausmodell (KI). Die fluoreszierende mEos4b kodierende Sequenz wurde in Exon 2 des *Glr^b-Gens* durch homologe Rekombination eingefügt. Um die kodierende Sequenz des Rezeptors nicht zu unterbrechen, wurde die mEos4b-Sequenz nach dem Signalpeptid und vor dem N-Terminus der reifen GlyR- β -Untereinheit eingefügt. Das *eos* Mausmodell generiert endogene, durch Fluoreszenz markierte GlyR- β -Untereinheiten. Dies ermöglicht erstmals eine spezifische immunzytochemische Untersuchung der β -Untereinheit des Glycin-Rezeptors (Kapitel 1.2.3) (Maynard, Rostaing et al. 2021).

Eine mögliche Beeinträchtigung der eingefügten Sequenz auf die GlyR Expression oder Funktion wurde ausgeschlossen. Die KI-Tiere zeigten eine normale Lebenserwartung, keinen offensichtlichen Phänotyp und folgten der Mendel'schen Vererbung. Auch beim Vergleich maximaler Chlorid-Ströme unterschieden sich homozygote *Glr^b^{eos}* Tiere nicht vom Wildtyp (Maynard, Rostaing et al. 2021).

2. Ziele der Arbeit

Die neuromotorische Erkrankung der Hyperekplexie ist derzeit in ihrer Pathologie noch nicht vollständig verstanden und kann nur symptomatisch behandelt werden. Dafür sind vor allem Genmutationen im heteromeren Glycin-Rezeptor $\alpha 1/\beta$ und Glycin-Transporter 2 ursächlich.

Der GlyR $\alpha 1/\beta$ stellt den wichtigsten Inhibitor in der adulten Nerv-Muskel-Synapse des Rückenmarks an der postsynaptischen Membran von Motoneuronen dar. Bei einer Mutation dieses GlyR Subtyps kann das Gleichgewicht zwischen Erregung und Hemmung gestört werden, so dass dies zu Muskelkontraktionen, übersteigerten Schreckreaktionen und Muskelsteifheit beim Menschen führen kann. Der heteromere GlyR ist in einer Stöchiometrie von $4\alpha 1:1\beta$ angeordnet und über das β -Gephyrin Bindungsmotiv an der Postsynapse verankert. Das Rezeptor-Gerüst-Modell ist dynamisch und tauscht sich mit extrasynaptischen Pools aus.

Die *shaky* Maus bietet ein gutes Modell für die Erforschung der Hyperekplexie. Die Q177K Mutation in der extrazellulären $\beta 8$ - $\beta 9$ Schleife der GlyR- $\alpha 1$ -Untereinheit bewirkt funktionelle Beeinträchtigungen mit einem letalen neuromotorischen Phänotyp. Dabei wurde die immunzytochemische Oberflächenexpression und synaptische Lokalisation in Rückenmarksneuronen der *Glr1^{sh}* Maus nur begrenzt quantifiziert und konnte aufgrund fehlender stabiler β -Antikörper noch nicht vollständig geklärt werden.

Mit der *Glr^{eos}* Maus kann die β -Untereinheit immunzytochemisch erfasst werden. Durch die Kreuzung *Glr^{eos}* x *Glr1^{sh}* kann auf die Frage eingegangen werden, welche Auswirkungen die mutierte $\alpha 1$ -Untereinheit auf die Interaktion mit der β -Untereinheit und Gephyrin hat.

Ziel der Arbeit ist es, in kultivierten Rückenmarksneuronen der Hybridlinie *Glr^b^{eos}* x *Glr¹^{sh}* sowohl die Einzelexpressionen von GlyR- α 1, GlyR- β und Gephyrin als auch die jeweiligen Koexpressionen immunzytochemisch und immunhistologisch zu untersuchen und damit die Lücken der vorangegangenen Studien zu schließen. Auch eine Einflussnahme auf die Anzahl der Synapsen mittels Synapsin wird immunzytochemisch beleuchtet. Bislang wurde der motorische Phänotyp bei homozygoten *Glr¹^{sh}* Mäusen durch eine veränderte synaptische Expression mutierter GlyR- α 1-Untereinheiten erklärt. Die synaptische Expression kann nun durch die Kreuzung mit *Glr^b^{eos}* näher beleuchtet werden, da GlyR- β als direkter synaptischer Marker zusammen mit Gephyrin dient.

3. Material und Methoden

3.1 Organismen

3.1.1 Zelllinie

Die Zellen der Linie HEK293 sind humane embryonale Nierenzellen, welche mit fragmentierter Adenovirus-Typ-5-DNA transformiert wurden. Diese HEK (*human embryonal kidney*) Zellen wurden 1973 im Labor von Alex J. van der Eb und Frank L. Graham generiert (Graham, Smiley et al. 1977). Für die Experimente wurden diese HEK293-Zellen von ATCC (ATCC-Global Bioresource Center, Manassas, VA, USA) akquiriert.

3.1.2 Mauslinien

CD-1:

CD-1 Wildtyp Mäuse wurden zur Gewinnung von Rückenmarksneuronen genutzt. Ursprünglich wurden CD-1 Mäuse von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und im Tierstall des Instituts der Klinischen Neurobiologie Würzburg weiter gezüchtet (FBVVL 568/200-324/13).

GlyT2-eGFP:

Bei dieser Mauslinie wurde der präsynaptische Glycin-Transporter 2 mit einem grün fluoreszierenden Protein (*eGFP*) versehen (Zeilhofer, Studler et al. 2005). Diese Mauslinie diente zur Etablierung verschiedener immunzytochemischer Färbungen. Die Mauslinie entstammt aus dem Labor von Professor U. Zeilhofer und wurde dem Institut der Klinischen Neurobiologie Würzburg für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt (MTA mit Universität Zürich, Prof. Dr. Ulrich Zeilhofer, Schweiz).

131 *Glr1^{sh}*:

Die *shaky* Maus trägt eine *Missense*-Mutation Q177K, welche sich in der extrazellulären $\beta 8$ - $\beta 9$ Schleife in der Glycin-Rezeptor- $\alpha 1$ -Untereinheit (GlyR) befindet. Diese äußert sich bei homozygoten Mäusen in einem motorischen Phänotyp mit Muskelspasmen und Steifheit und dient daher als Mausmodell der Hyperekplexie-Erkrankung (Schaefer, Berger et al. 2017). Diese Mauslinie entstand im Labor von Christopher Paige im Ontario Cancer Institut (MTA mit Universität Health Network, Prof. Dr. Christopher Paige, Toronto Kanada) und wurde ins Labor von Professorin Carmen Villmann überführt.

202 *Glr^{eos}*:

Die *eos* Maus verfügt über eine mEos4b kodierende Sequenz, welche in Exon 2 des *Glr β* -Gens durch homologe Rekombination eingefügt wurde (Maynard, Rostaing et al. 2021). Diese mEos4b-Sequenz ermöglicht aufgrund ihrer endogen fluoreszierenden Eigenschaft die Analyse der GlyR- β -Untereinheit. Die Mauslinie entstammt dem Institut de Biologie de l'ENS (IBENS), École Normale Supérieure, CNRS, Inserm, PSL-Universität (MTA mit INSERM, Dr. Christian Specht, Paris, Frankreich) und wurde dem Labor von Professorin Carmen Villmann für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt.

204 *Glr^{eos} x Glr1^{sh}*:

Diese Linie ging aus der Kreuzung der *Glr^{eos}* und *Glr1^{sh}* Mäusen hervor und wurde im Institut für Klinischen Neurobiologie in Würzburg über mehrere Generationen gezüchtet. Dies ermöglicht eine Untersuchung des Mausmodells der Hyperekplexie mit Fokus auf die β -Untereinheit des Glycin-Rezeptors.

3.1.3 Ethik- und Tierversuchsvotum

Alle durchgeführten Experimente erfolgten nach den Richtlinien der Europäischen Union. Genehmigungen von der Ethikkommission für Tierversuche der Regierung von Unterfranken und des Veterinäramts der Stadt Würzburg liegen vor (FBVVL 568/200-324/13, 55.2.2-2532.2-949-31)

3.2 Chemikalien

Soweit nicht anders beschrieben wurden alle in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien von den Firmen AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA), Nippon Genetics Europe (Düren, Deutschland), Promega (Madison, Wisconsin, USA), Sigma Aldrich Chemie (Schnellendorf, Deutschland) und Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) erworben.

3.2.1 Chemikalien allgemein

In *Tabelle 1* sind die allgemein verwendeten Chemikalien aufgelistet.

Tabelle 1 Chemikalien allgemein

PCR = Polymerase-Kettenreaktion

Chemikalien (Konzentration)	Hersteller (Art. Nr.) / Zusammensetzung	Verwendung
PCR dH ₂ O		PCR
MgCl ₂ (25 mM)	Promega (A351H)	PCR
dNTPs (1,25 mM)	Thermo Fisher Scientific (R0192)	PCR
GoTaq Puffer Green 5x	Promega (M891A)	PCR
Cut smart Puffer	New England Biolabs (B7204S)	<i>shaky</i> -Verdau
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific (840004)	Agarosegel
Midori Green Advance DNA Stain	Nippon Genetics Europe	Agarosegel

3.2.2 Größenstandards

DNA- und Proteingrößenstandards wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific bezogen. Weiterhin wurde ein DNA-Größenstandard verwendet, der durch Plasmidverdau in der AG Villmann selbst hergestellt wurde (Tabelle 2).

Tabelle 2 Größenstandards

AG = Arbeitsgruppe, PCR = Polymerase-Kettenreaktion

Größenstandard	Hersteller (Art. Nr.)	Verwendung
Fast Ruler Ultra Low Range DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (SM1233)	Marker bei <i>shaky</i> -PCR 10 - 200 bp
pRK7 Plasmid, Hinf I verdaut	AG Villmann	Marker bei <i>eos</i> -PCR 100 - 1500 bp

3.2.3 Plasmide

Die folgenden Plasmid-DNAs (pDNA) lagen der Arbeitsgruppe Villmann vor und wurden bei der Transfektion von HEK293-Zellen verwendet (Tabelle 3).

Tabelle 3 Plasmide

GlyR = Glycin-Rezeptor

Vektor	Insert	Spezies	Bemerkung	interne Laufnummer
peGFP-N1			Enhanced Green Fluorescent Protein, CMV Promotor	#76
pRK7	GlyR- $\alpha 1^{wt}$	<i>mouse</i>	hohe Proliferationsrate, CMV und Sp6 Promotor, für murine GlyR- $\alpha 1$ -Variante	#6
pRK7	GlyR- $\alpha 1^{Q177K}$	<i>mouse</i>	hohe Proliferationsrate, CMV und Sp6 Promotor, für murine GlyR- $\alpha 1$ -Variante mit der <i>shaky</i> Mutation Q177K	#200
pRK7	Myc-GlyR- β^{wt}	<i>human</i>	hohe Proliferationsrate, CMV und Sp6 Promotor, für GlyR-Variante, am N-Terminus Myc-tag inseriert	#481
peGFP-C2	Gephyrin	<i>rat</i>	CMV Promotor	#477

3.2.4 Primer

Die aufgelisteten Primer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) erzeugt (Tabelle 4).

Tabelle 4 Primer

bp= Basenpaare, GT = Genotypisierung

Primer	Sequenz in 5'-3'-Richtung	bp	Verwendung
<i>genotyping shaky</i> F #6	CTG AGT TCT CGC TGA CCG AGC	21	GT <i>shaky</i> -Tiere
<i>genotyping shaky</i> R #7	CAC CTG TGT TGT AGT GCT TGG TG	23	GT <i>shaky</i> -Tiere
mGlyRb-Seq6s #498	TACCTTCTTGTTTTCTCTCC	20	GT <i>eos</i> -Tiere
mGlyRb-Seq5a #499	TCGCTTTTTGTAAATGATATGG	21	GT <i>eos</i> -Tiere
mGlyRb -Seq8a #500	GTCTGTTTTCCCTCATAAGG	20	GT <i>eos</i> -Tiere

3.2.5 Enzyme

Die Enzyme und ihre Verwendung sind in *Tabelle 5* beschrieben.

Tabelle 5 Enzyme

PCR = Polymerase-Kettenreaktion

Enzyme (Konzentration)	Hersteller (Art. Nr.)	Verwendung
StemPro™ Accutase™ Zelldissoziationsreagenz	Thermo Fisher Scientific (A11105-01)	HEK293-Zellen splitten
DNase I recombinant	Roche (04536282001)	Maus Präparation
Trypsin EDTA	PAN-Biotech (P10-023500)	Maus Präparation
Proteinase K	Sigma Aldrich	Genotypisierung
GoTaq G2 Flexi Polymerase (5 U/μl)	Promega (M780B)	PCR
HpyCH4V	New England Biolabs (R0620L)	<i>shaky</i> -Verdau

3.2.6 Antikörper

Die primären Antikörper wurden in unterschiedlichen Verdünnungen (VD) in der Immunzytochemie der HEK293-Zellen (HEK), der Rückenmarksneurone (RMN) und Rückenmarksschnitte (RMS) verwendet (Tabelle 6). Die sekundären Antikörper wurden für alle Färbungen in dem gleichen Verhältnis verdünnt (Tabelle 7).

Tabelle 6 Primäre Antikörper

HEK = HEK293-Zellen, RMN = Rückenmarksneurone, RMS = Rückenmarksschnitte, VD = Verdünnung

Primäre Antikörper	Hersteller (Art. Nr.)	VD	Verwendung
GlyR- α 1 mAb2b <i>mouse</i>	Synaptic Systems (146-111)	1:250 1:500	HEK RMN
GlyR- α 1 mAb2b <i>rabbit</i>	Synaptic Systems (146-118)	1:500	RMN, RMS
GlyR- α mAb4a <i>mouse</i>	Synaptic Systems (146-011)	1:500 1:250	HEK RMN
Myc-tag <i>rabbit</i>	Abcam (ab 9106)	1:500	HEK
VGAT <i>rabbit</i>	Synaptic Systems (131-003)	1:500	RMN
VGAT <i>guinea pig</i>	Synaptic Systems (131-004)	1:500	RMN
Synaptophysin <i>rabbit</i>	Chemicon (AB9272)	1:500	RMN
Synapsin 1/2 <i>chicken</i>	Synaptic Systems (106-006)	1:500	RMN, RMS
Gephyrin <i>mouse</i>	Synaptic Systems (147-111)	1:500	RMN
Gephyrin <i>rabbit</i>	Synaptic Systems (147-008)	1:500	RMN
MAP-2 <i>mouse</i>	Millipore (MAB3418)	1:500	RMN
GFP <i>mouse</i>	Roche	1:500	RMN

Tabelle 7 Sekundäre Antikörper

DAPI = 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid, VD = Verdünnung

Sekundäre Antikörper	Hersteller (Art. Nr.)	VD
Cy3 <i>goat-anti-mouse</i>	Dianova (115-165-003)	1:500
Cy3 <i>goat-anti-rabbit</i>	Dianova (111-165-003)	1:500
Cy5 <i>goat-anti-mouse</i>	Dianova (115-175-146)	1:500
Cy5 <i>goat-anti-rabbit</i>	Dianova (111-175-006)	1:500
Cy5 <i>donkey-anti-guinea-pig</i>	Jackson (706-175-148)	1:500
Alexa Fluor 647 <i>donkey-anti-chicken</i>	Dianova (703-605-155)	1:500
Alexa Fluor 488 <i>goat-anti-mouse</i>	Dianova (115-546-003)	1:500
anti-mEos-ATTO488 <i>goat</i>	Nanotag N3102-At488	1:500 1:200 (bei statistisch bewertenden Aufnahmen)
DAPI	Thermo Fisher Scientific (D1306)	1:5000

3.2.7 Zellkulturlösungen und Medien

Die verwendeten Lösungen für die Zellkultur, die Transfektion und die jeweiligen Medien der HEK293-Zellen und Rückenmarksneurone sind in *Tabelle 8, 9 und 10* dargestellt.

Tabelle 8 Zellkulturlösungen

Zellkulturlösungen	Hersteller (Art. Nr.) / Zusammensetzung
MEM (Minimum Essential Medium)	Thermo Fisher Scientific (21090-055)
FBS (Fetal Bovine Serum) / FCS (Fetal Calf Serum)	Thermo Fisher Scientific (10270-106)
GlutaMAX (200 mM)	Thermo Fisher Scientific (35050-038)
Sodium Pyruvat (100 mM)	Thermo Fisher Scientific (11360-039)
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific (15140-122)
Trypan Blue Solution	Sigma Aldrich (93595)
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific (25030-081)
B-27 Supplement	Thermo Fisher Scientific (17504-044)
Neurobasalmedium	Thermo Fisher Scientific (21103-049)
DPBS (ohne Calcium, ohne Magnesium) (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Thermo Fisher Scientific (14190-144)
Silan Lösung	Carl Roth (2328-2) Stocklösung: 10% 3-Aminopropyltriethoxysilan in H ₂ O Gebrauchslösung: 1:10 in H ₂ O
Poly-L-Lysin Lösung (0,1 mg/ml)	Sigma Aldrich (P1274) Stocklösung: Poly-L-Lysin 5 mg/ml in H ₂ O Gebrauchslösung: 1:100 in H ₂ O

Tabelle 9 Transfektion HEK293-Zellen

Bezeichnung	Hersteller (Art. Nr.) / Zusammensetzung
0,1x TE-Puffer pH 8,0 (Tris-EDTA)	AppliChem (A0973-0500)
2x HBS-Puffer pH 6,95 (HEPES gepufferte Kochsalzlösung)	50 mM HEPES, 12 mM D-Glucose, 10 mM KCl, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, pH 6,95
CaCl ₂ (2,5 M)	Roth (6781-3)

Tabelle 10 Zusammensetzung Vollmedium

Zellkulturmedien	Zusammensetzung
HEK293 Medium	87% MEM, 10% FBS, 1% Pen/Strep, 1% GlutaMAX, 1% Sodiumpyruvat
Neuronenkulturmedium	Neurobasalmedium + 1,4 mM L-Glutamin + B-27

3.2.8 Standardlösungen

Die Zusammensetzung der Standardlösungen sind in den *Tabellen 11 bis 14* beschrieben.

Tabelle 11 DNA-Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Tens-Puffer	10 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,2% SDS, pH 8,5
TE-Puffer	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8
TBE-Puffer	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3

Tabelle 12 Zusammensetzung Agarosegel

Agarosegel	Zusammensetzung
<i>shaky</i> -Gel: 3%; <i>eos</i> -Gel: 2,7%	100 ml 1x TBE-Puffer, 3 (bzw. 2,7) g Agarose, 5 µl Midori Green Advance

Tabelle 13 Lösungen/Reagenzien Immunzytochemie für Rückenmarksneurone

PBS = Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

Lösungen/Reagenzien	Hersteller (Art. Nr.) / Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl, 3 mM KCl, 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ x 3 H ₂ O, pH 7,4
4% Paraformaldehyd (PFA) 4% Sucrose in PBS	4 g PFA + 4 g Sucrose in 75 ml H ₂ O lösen, 2-3 Tropfen NaOH dazugeben, auf 60 °C erhitzen bis gelöst, dann auf 4 °C abkühlen, 10 ml 10x PBS dazu, mit H ₂ O auf 100 ml auffüllen
Blockinglösung	5% Ziegen Serum (NGS) in 1x PBS pH 7,4
TritonX-100	AppliChem (A4975)
Permeabilitätslösung	5% (NGS) in 1x PBS pH 7,4 + 0,2% TritonX-100
Mowiol 4-88	Sigma Aldrich (81381)

Tabelle 14 Lösungen/Reagenzien Immunzytochemie für Rückenmarksschnitte

PBS = Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, PFA = Paraformaldehyd

Lösungen/Reagenzien	Hersteller (Art. Nr.) / Zusammensetzung
PBS	pH 8
2% PFA	2 g PFA
Quenching mit NH ₄ Cl	Glycin (0,75 g in 100 ml in H ₂ O) + NH ₄ Cl 50 mM (133 mg in 50 ml 1x PBS)
Blockinglösung	10% NGS in 1x PBS pH 8
Fluor Save	Merck (345789)

3.3 Verbrauchsmaterialien

Die Hersteller der Verbrauchsmaterialien sind in *Tabelle 15* genannt.

Tabelle 15 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller (Art. Nr.)
TC-Schalen Standard (35 x 10 mm)	Sarstedt (83.3900.300)
Biosphere Filter Tips (0,1–20 µl / 1000 µl)	Sarstedt (70.1114.210 / 70.3050.275)
Deckgläser (Ø 13 mm)	VWR (631-0149)
Objektträger	R. Langenbrinck (ISO8037/1)
Super Frost Plus Objektträger	R. Langenbrinck (03-0060)
Abdeckgläser (24 x 50 mm)	Hartenstein (DK 50)
Tissue Tek O.C.T. Compound	Sakura (94-4583)
Parafilm	Sigma Aldrich (BR701611)
Reagiergefäße 1,5 ml / 2 ml	Sarstedt (72.706 / 72.695.500)
Falcon 15 ml / 50 ml	Greiner Bio-One (188271/227261)

3.4 Geräte und Software

In *Tabelle 16* sind die für die Experimente benötigten Geräte und Softwares aufgelistet.

Tabelle 16 Geräte- und Softwareliste

Verbrauchsmaterialien	Hersteller (Art. Nr.)
Heizblock	Eppendorf, Thermomixer comfort
Inkubator	Binder (11-13758), Temp. 37 °C, CO ₂ 5%, News Brunswick Scientific, Innova 42 Incubator Shakers (M1335-0002)
Mikrowelle	Bosch, AM925ELS
NanoDrop 10000 Spectrometer	Thermo Fisher Scientific
Professional PCR Thermocycler	Biometra (070-000)
UV-Belichtungseinheit	Biometra, BioDoc Analyze
Spiegelreflexkamera	Canon, EOS 1100 D
Thermopapierdrucker Mitsubishi P95	Biometra
Neubauer-Zählkammer	Hartenstein
Schwenktisch	Biometra
Konfokales Mikroskop	Olympus IX-81 Olympus, Fluoview FV1000
Axio Imager 2	Zeiss, ZEN-Software (Version 2.6/blue edition)
Kryostat	Leica Biosystems (Leica CM 1950)
<i>ImageJ</i> -Software	Version 2.3.0/1.53f (Mac-Version)
<i>GraphPad Prism</i> - Software	Version 9.3.1

3.5 Methoden der Molekularbiologie

3.5.1 Isolierung genomischer DNA aus Mausbiopsien

Um die genomische DNA (gDNA) der einzelnen Mausbiopsien zu isolieren, wurden die Proben mit je 300 μ l Tens-Puffer und 3 μ l Proteinase K versetzt. Anschließend wurden diese im Eppendorf-Shaker mit 550 rpm (*revolutions per minute*/ Umdrehungen pro Minute) bei 55 °C für 3 Stunden inkubiert. Wenn das Gewebe vollständig gelöst war, wurden die Proben für 10 Minuten mit 13.000 rpm bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der DNA-Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß mit 750 μ l kalten 100% Ethanol (-20 °C) gefüllt, viermalig invertiert und für 30 Minuten bei -20 °C gefällt. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 15.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die verbleibende gDNA mit 250 μ l kalten 70% Ethanol (-20 °C) gewaschen. Nach dreimaligem Invertieren wurden diese für 5 Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Ethanol wurde zuerst abpipettiert und konnte anschließend auf dem Heizblock (37 °C) für 5 Minuten verdunsten. Das verbleibende gDNA-Pellet wurde mit 15 μ l Tris-HCl (pH 8,4) versetzt und mit Hilfe des Eppendorf-Shakers mit 300 rpm bei 55 °C gelöst. Anschließend wurden die gDNA-Konzentrationen mit Hilfe eines NanoDrop-Spectrophotometers bestimmt und durch Zugabe des Tris-HCl Puffers (pH 8,4) auf 250 ng/ μ l eingestellt.

3.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur exponentiellen Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen wurde das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. Dieses besteht aus drei Hauptphasen, der Denaturierung, dem Anlagern der Primer (*Annealing*) und der Elongation, die einen Zyklus darstellen. Dieser Zyklus wird 30 bis 35-mal wiederholt (Tabelle 17).

Der PCR-Ansatz für einen gDNA-Nachweis umfasst 22 μ l mit folgenden Chemikalien: 13,8 μ l denaturiertes H₂O, 2 μ l MgCl₂ (25 mM), 5 μ l GoTaq Puffer Green 5x, 1 μ l dNTPs (1,25 mM), 0,2 μ l GoTaq Flexi Polymerase. Die Zugabe der einzelnen Primer unterscheidet sich bei der Typisierung der einzelnen Genotypen. Diese ist in *Tabelle 18* aufgelistet.

Tabelle 17 Programmeinstellung für PCR

min = Minuten, sec = Sekunden

Genotyp	<i>Glr1^{sh}</i>			<i>Glr^{eos}</i>		
	Temperatur (°C)	Zeit (min, sec)	Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (min, sec)	Zyklen
initiale Denaturierung	95	3 min		94	5 min	
Denaturierung	95	20 sec	x 30	94	30 sec	x 35
Annealing	60	20 sec		52	30 sec	
Elongation	72	20 sec		72	30 sec	
finale Elongation	72	6 min		10	Pause	

Tabelle 18 PCR Pipettierplan

GlyR = Glycin-Rezeptor, μ l = Mikroliter, PCR = Polymerase-Kettenreaktion,

Genotyp	<i>Glr1^{sh}</i>	<i>Glr^{eos}</i>
1x PCR-Ansatz	22 μ l: 13,8 μ l dH ₂ O 2 μ l MgCl ₂ (25 mM) 5 μ l GoTaq Puffer Green 5x 1 μ l dNTPs (1,25 mM) 0,2 μ l GoTaq Flexi Polymerase	
+ Primer	1 μ l genotyping <i>shaky</i> F #6	1 μ l mGlyRb-Seq6s #498
	1 μ l genotyping <i>shaky</i> R #7	0,6 μ l mGlyRb-Seq5a #499
		0,4 μ l mGlyRb-Seq8a #500
gesamt	24 μ l	

3.5.3 Verdau des PCR-Produkts bei *Glr1^{sh}* - Genotyp

Bei der Typisierung des *Glr1^{sh}*- Genotyps ist ein zusätzlicher Restriktionsverdau nötig, um die Genotypen im Agarosegel eindeutig zu zuordnen. Dafür werden je 10 μ l des PCR-Produkts zu 7,8 μ l H₂O und 2 μ l Cut smart Puffer gegeben und durch das Enzym HpyCH4V (0,2 μ l) bei 37 °C für 12 Stunden verdaut (Tabelle 19).

Tabelle 19 Verdau des PCR-Produkts bei *Glr1^{sh}*

μ l = Mikroliter, PCR = Polymerase-Kettenreaktion,

Verdau	
1 x Verdau-Ansatz	7,8 μ l dH ₂ O 2 μ l Cut smart Puffer 0,2 μ l HpyCH4V
+	10 μ l PCR-Produkt
gesamt	20 μ l

3.5.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese bezweckt die Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe. Hierbei durchlaufen kleinere Nukleinsäure-Stränge das Agarosegel schneller als größere. Durch die Zugabe eines geeigneten Markers und Kontrollproben können die aufgetrennten Basenpaare identifiziert und zugeordnet werden.

Zur Herstellung eines 3% Agarosegels wurden 3 g Agarose in 100 ml 1x TBE-Puffer in einer Mikrowelle gelöst. Dies erfolgte in zwei Schritten (600 Watt, 360 Watt) für jeweils eine Minute. Anschließend wurde 5 μ l des DNA-Farbstoffs Midori Green Advance hinzugefügt. Der Agaroseanteil unterscheidet sich je nach Anwendung auf die entsprechenden zu erwartenden Größen der DNA-Banden (Tabelle 12).

Das flüssige Gel wurde in einen Schlitten gegossen, wobei der zuvor gesteckte Kamm die späteren Geltaschen bildet. Nach dem Erstarren des Gels konnte dieser entfernt, das Gel in die mit TBE befüllte Elektrophoresekammer gebracht und die einzelnen DNA-Probeflösungen in die Ladetaschen pipettiert werden. Die aufgetragenen Marker (Tabelle 2) und zugehörigen DNA-Kontrollen (wildtyp-, heterozygot-, homozygot-Proben) der unterschiedlichen Genotypen dienen der Identifikation und Zuordnung. Eine Kontamination wird mit Hilfe einer zusätzlichen Wasser-Kontrollprobe ausgeschlossen. Das beladene Gel wurde für 40 Minuten bei einer Spannung von 120 Volt angeschlossen. Die Auswertung erfolgte mit der *BioDoc*-Analyse, wodurch die einzelnen DNA-Banden mit UV-Licht angeregt und fotografisch dargestellt werden konnten. Die spezifischen DNA-Basenpaare (bp) von *Glr1^{sh}* und *Glr1^{eos}* sind in der *Tabelle 20* aufgelistet.

Tabelle 20 spezifische DNA-Basenpaare (bp)

bp = Basenpaare, CTRL = Kontrolle

Kontrollen (CTRL)	<i>Glr1^{sh}</i>	<i>Glr1^{eos}</i>
Wildtyp-CTRL	88/95 bp	404 bp
Heterozygot-CTRL	88/95/183 bp	243/404 bp
Homozygot-CTRL	183 bp	243 bp
H ₂ O	negativ-CTRL	negativ-CTRL

3.6 Wiegeversuche

Um einen möglichen Einfluss der endogen exprimierten mEos4b-GlyR- β -Untereinheit auszuschließen, wurden die Tiere verschiedener Genotypen im Entwicklungsverlauf nach Gewicht dokumentiert. Die Verpaarungen der Mauslinie 204 *Glrb^{eos} x Glra1^{sh}* wurden durch Mitarbeiter der AG Villmann angesetzt und durch den Tierstall des Institutes für Klinische Neurobiologie am Universitätsklinikum Würzburg ausgeführt.

Die Tiere verfügten stets über Futter und Wasser *ad libitum*. Nach jedem Wiegevorgang waren alle dafür benötigten Utensilien mit Ethanol zu reinigen. Die Mäuse wurden täglich beginnend ab Tag 0 bis Tag 21 gewogen, wobei der Tag 0 dem Wurfstag entspricht. Die Markierung erfolgte zu Beginn mit einem wasserfesten Stift auf dem Bauch der Mäuse. Nach 7 bis 9 Tagen wurden Mausbiopsien aus dem Ohrengewebe mit Hilfe eines Stanzers entnommen und anschließend genotypisiert. Ab Tag 14 sollte bei den Mäusen mit dem Genotyp *Glra1^{sh/sh}* auf die typischen Symptome wie das Umklammern der Hinterfüße beim Packen des Schwanzes, Tremor, Steifheit und Muskelspasmen (Schaefer, Berger et al. 2017) geachtet werden. Am Tag 21 wurden die Mäuse mit CO₂ getötet. Dafür wurde das Gas langsam in einen geschlossenen und durchsichtigen Behälter eingeleitet und die Tiere für mindestens 10 Minuten in der Kammer belassen. Von jeweils zwei Mäusen mit den Genotypen *Glrb^{eos} x Glra1^{+/+}* und *Glrb^{eos} x Glra1^{sh/sh}* wurde anschließend noch das Rückenmark entnommen, welches wiederum für die späteren Rückenmarkgewebefärbungen verwendet wurde.

In *Tabelle 21* sind die Mäuse den jeweiligen Genotypen zugeordnet. Es wurden insgesamt sechs Würfe in der Quarantäne gewogen und genotypisiert. Da bei 3 von den insgesamt 9 möglichen Genotypen die N-Zahl von 3 Tieren nicht erreicht wurde, mussten zur statistischen Auswertung die Wiegedaten vom Tierstall des Institutes für Klinische Neurobiologie am Universitätsklinikum Würzburg mit einbezogen werden. Dies ist in der *Tabelle 21* mit der Abkürzung TS gekennzeichnet.

Tabelle 21 Anzahl der Mäuse pro Genotyp

TS = Tierstall

	<i>Glr1</i> ^{+/+}		<i>Glr1</i> ^{+/sh}		<i>Glr1</i> ^{sh/sh}		<i>Glr1</i> ^{eos} (mit <i>Glr1</i> ^{+/+} , <i>Glr1</i> ^{+/sh} , <i>Glr1</i> ^{sh/sh})
<i>Glr1</i> ^{+/+}	1 TS: 4	5	3	3	1 TS: 5	6	14
<i>Glr1</i> ^{+/eos}	6	6	12	12	8	8	26
<i>Glr1</i> ^{eos/eos}	10	10	8	8	0 TS: 4	4	22
<i>Glr1</i> ^{sh} (mit <i>Glr1</i> ^{+/+} , <i>Glr1</i> ^{+/eos} , <i>Glr1</i> ^{eos/eos})	21		23		18		

Die Daten wurden abschließend in Microsoft Excel übertragen und mit *GraphPad Prism* (Version 9.3.1) ausgewertet, siehe *Kapitel 3.10.1*.

3.7 Zellkultur

Um eine sterile Arbeitsweise zu gewährleisten, erfolgten die Arbeitsschritte unter einer Sterilbank mit sterilen Medien und Lösungen. Die dafür verwendeten Chemikalien wurden für 30 Minuten in einem Wasserbad (37 °C) erwärmt.

3.7.1 HEK293-Zellen

Die Aceton-Behandlung der Deckgläschen, die Kultivierung der Zellen und die Methode der Transfektion sind im Folgendem beschrieben.

Aceton-Behandlung der Deckgläschen

Um das Wachstum der HEK293-Zellen auf der Oberseite der Deckgläschen zu verbessern, wurden diese für 5 Minuten mit Aceton inkubiert. Anschließend erfolgte die Trocknung bei Raumtemperatur und Hitzesterilisation. Es wurden je 4 behandelte Deckgläschen in eine 3 cm Schale gegeben und bis zur weiteren Verwendung steril bei Raumtemperatur gelagert.

Kultivierung von HEK293-Zellen

Die Zellen wurden im HEK293-Vollmedium (Tabelle 10) bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Um die Grenze einer Konfluenz von 70-90% nicht zu überschreiten, wurden die Zellen nach 3 bis 4 Tagen gesplittet. Dabei wurde das Nährmedium abgesaugt und die nicht-adhären Zellen mit einer einmaligen Spülung mit DPBS (phosphatgepufferten Salzlösung) entfernt. Die anschließende Zugabe von Accutase für 5 Minuten bei 37 °C löste die verbleibenden Zellen vom Untergrund. Das zugeführte Medium stoppte diesen Verdau und nach kurzer Vereinzlung durch Auf- und Abpipettieren, wurde diese Zellsuspension bei 1300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, bereits vorgewärmtes Medium hinzugegeben und die Zellen resuspendiert. Um die Zellzahl pro Milliliter zu bestimmen, wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:10 mit Trypanblau verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgewertet. Abschließend konnte die errechnete Zellzahl in geeignete Kulturschalen ausplattiert werden. In der *Tabelle 22* sind die verwendeten Mengen aufgelistet.

Tabelle 22 Kultivierung von HEK293-Zellen

cm = Zentimeter, DPBS = phosphatgepufferte Kochsalzlösung, ml = Milliliter

Größe	3 cm Schale	10 cm Schale
DPBS	1 ml	1-2 ml
Accutase	0,5 ml	1 ml
Vollmedium zum Abspülen der Zellen	2 ml	5 ml
Vollmedium zum Resuspendieren	1 ml	2 ml
Vollmedium für neue Schalen	2 ml	10 ml
ausgesäte Zellzahl	200x 10 ³	1,8x 10 ⁶

Transfektion von HEK293-Zellen

Nachdem die Zellen für 24 Stunden ausplattiert waren, konnten diese transfiziert werden. Bei der Transfektion wird fremde DNA in eukaryotische Zellen eingebracht. Bei der hier verwendeten Calciumchlorid-Methode enthält das entstandene Präzipitat Calciumionen, welche die Durchlässigkeit der Membran verändern und somit die Aufnahmefähigkeit der Zelle für Fremd-DNA steigern. Die Lösung mit einem Gesamtvolumen von 100 μ l wurde in einem 1,5 ml Reagiergefäß gemischt. Zu pDNA und 0,1x TE-Puffer, wurde CaCl₂ hinzugegeben. Die daraus erfolgte Schlierenbildung, wurde durch Auf- und Abpipettieren gelöst. Anschließend wurde der HBS-Puffer tröpfchenweise dazu gegeben und die Lösung für 20 Minuten bei RT inkubiert. Die Präzipitatbildung wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und die erforderliche Menge auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 6 Stunden bei 37 °C wurden die Zellen mit Vollmedium gewaschen und erst nach weiteren 48 Stunden der Kultivierung für immunzytochemische Färbungen verwendet. Als Kontrolle wurde GFP kotransfiziert (GFP-CTRL) oder untransfizierte Zellen (negativ-CTRL) mitgefärbt. Die unterschiedlichen Mengen von pDNA wurden durch die Zugabe von 0,1x TE-Puffer ausgeglichen (Tabelle 23).

Tabelle 23 Transfektion von HEK293-Zellen in 3 cm SchalenCTRL = Kontrolle, GlyR = Glycin-Rezeptor, pDNA = Plasmid-DNA, μ l = Mikroliter, wt = Wildtyp

pDNA	pDNA-Menge	0,1x TE-Puffer	CaCl ₂ (2,5 M)	2x HBS-Puffer
untransfiziert (negativ-CTRL)	x	90 μ l	10 μ l	100 μ l
peGFP-N1 (#76) (GFP-CTRL)	1 μ l	89 μ l	10 μ l	100 μ l
pRK7-GlyR- α 1 ^{wt} (#6)	1 μ l	89 μ l	10 μ l	100 μ l
pRK7-GlyR- α 1 ^{Q177K} (#200)	1 μ l	89 μ l	10 μ l	100 μ l
pRK7-GlyR- α 1 ^{Q177K} (#200)	0,4 μ l	85,6 μ l	10 μ l	100 μ l
pRK7-Myc-GlyR- β ^{wt} (#481)	2 μ l			
peGFP-Gephyrin (#477)	2 μ l			

3.7.2 Rückenmarksneurone

Nachfolgend ist die vorbereitende Beschichtung der Deckgläschen mit Poly-L-Lysin, die Präparation von Rückenmarksneuronen, sowie die Kultivierung beschrieben.

Poly-L-Lysin Beschichtung von Deckgläschen

Um die Adhäsion der Neurone auf der Glasoberfläche der Deckgläschen zu ermöglichen, wurden diese in eine Glasschale gegeben und auf dem Schwenktisch mit 1 M HCl für 1 Stunde vollständig bedeckt. Danach folgte ein Waschschrift mit Ampuwa-H₂O und eine weitere Stunde des Schwenkens mit 96% Ethanol. Anschließend wurden die Deckgläschen erneut mit Ampuwa-H₂O gewaschen, für 12 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und sterilisiert. Die nachfolgenden Schritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt.

Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen dreimalig in einer Silan-Gebrauchslösung und zweimalig in sterilem H₂O eingetaucht, anschließend zu je 4 Teilen in 3 cm Schalen gelegt und im Inkubator bei 37 °C für 4 Stunden getrocknet. Danach erfolgte die Zugabe von Poly-L-Lysin-Gebrauchslösung unter UV-Licht für 12 Stunden. Am Folgetag wurde die Lösung entfernt und die Deckgläschen dreimalig mit sterilem H₂O gewaschen. Diese wurden bis zur weiteren Verwendung mit Aluminiumfolie umhüllt und bei 4 °C gelagert.

Präparation von Rückenmarksneuronen

Die schwangeren weiblichen Mäuse wurden an Tag 12-13 nach erfolgtem Coitus mit CO₂ getötet. Dafür wurde das Gas langsam in einen geschlossenen und durchsichtigen Behälter eingeleitet und die Tiere für mindestens 10 Minuten in der Kammer belassen. Danach wurden die Embryonen vom Uterus des Muttertiers getrennt und in eine mit PBS gefüllte 10 cm Schale überführt. Anschließend wurde unter einem Mikroskop das Rückenmark der Embryos freigelegt und von der umgebenden Rückenmarkshaut befreit. Das verbleibende Rückenmark wurde in ein 15 ml Falcon gegeben, welches mit PBS gefüllt war. Wenn die Embryonen unterschiedliche Genotypen aufwiesen, wurde bei der sogenannten Single-Präparation jedes Rückenmark einzeln behandelt und zusätzlich ein Stück Gewebe bis zur weiteren Analyse bei -20 °C nummeriert gelagert.

Die weiteren Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Nachdem sich die Rückenmärker am Boden des Falkons abgesetzt hatten, wurde der Überstand abgenommen, 5 ml Trypsin sowie 50 μ l DNase hinzugegeben und in einem Wasserbad für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch die Zugabe von 500 μ l FCS wurde der Vorgang der Trypsinisierung gestoppt und das Gewebe 18-mal trituriert. Dies erfolgte 10-malig mit einer größeren Filterspitze (geeignet für 1000 μ l) und 8-malig mit einer Glaspasteurpipette, welche zuvor durch Erhitzen abgerundet wurde. Der Überstand wurde in ein neues Falcon Gefäß überführt und die verbleibenden Zellen mit 1000 μ l Neurobasalmedium (NB) (ohne Zusätze) resuspendiert. Die Schritte des Triturierens wurden wiederholt und der restliche Überstand in ein neues Falcon Gefäß zugeführt. Nach erfolgter Zentrifugation für 10 Minuten bei 500 rpm wurde der Überstand entfernt und das verbleibende Pellet mit 1000 μ l zusatzfreiem NB erneut trituriert. Die Zellsuspension wurde für 10 Minuten bei 500 rpm zentrifugiert und nach Abzug des Überstandes in 1000 μ l NB (+L-Glutamin/B27) resuspendiert. Davon wurden 5 μ l zu 45 μ l Trypanblau hinzugegeben, um 10 μ l dieser Verdünnung in einer Neubauer-Zählkammer auszuwerten. Abschließend wurden 250.000 Neurone pro 3 cm Schale in 2 ml Neurobasalmedium (+L-Glutamin/B27) auf 4 mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgesät. Die Unterschiede zwischen der Präparation von Embryonen eines einzelnen und verschiedenen Genotyps sind in *Tabelle 24* beschrieben.

Kultivierung der Neurone

Die Rückenmarksneurone wurden bei 37 °C und 5% CO₂ für 16 Tage kultiviert, beginnend ab dem Folgetag der Präparation. Im Rhythmus von 3 bis 5 Tagen wurden jeweils 500 μ l des Neurobasalmediums (+L-Glutamin/B27) unter sterilen Bedingungen hinzugegeben. Die Kontrolle des Neuronenwachstums erfolgte unter dem Mikroskop.

Tabelle 24 Unterschiede der Präparation abhängig vom Genotyp

cm = Zentimeter, FCS = Fetal Calf Serum, FSP = Filterspitzen, μl = Mikroliter, ml = Milliliter, NB = Neurobasalmedium,

Genotyp	gleich	ungleich (Single-Präparation)
Trypsin	5 ml	1 ml
DNAse	50 μl	10 μl
FCS	500 μl	100 μl
NB (ohne Zusätze)	1000 μl	500 μl
NB (+L-Glutamin/B27) Pellet resuspendieren	1000 μl	500 μl
NB (+L-Glutamin/B27) in 3 cm Schalen	2 ml	2 ml
FSP, Glaspasteurpipetten	1x pro Präparation	1x pro Embryo

3.7.3 Rückenmarksschnitte

Entnahme

Die folgende Methode der Rückenmarksentnahme wurde von Anna-Lena Eckes (Ph.D.-Studentin der AG Villmann), die der Schnitte von Christine Schmitt (Technische Assistentin der AG Villmann) durchgeführt.

Die Mäuse mit den Genotypen *Glr^b^{eos} x Glra¹^{+/+}* und *Glr^b^{eos} x Glra¹^{sh/sh}* wurden mit CO₂ getötet. Dafür wurde das Gas langsam in einen geschlossenen und durchsichtigen Behälter eingeleitet und die Tiere für mindestens 10 Minuten in der Kammer belassen. Danach wurde entlang des Rückenmarks die Haut abgelöst und die Wirbelsäule vom umliegenden Gewebe getrennt. Am unteren Rückenmarksgang wurde ein mit PBS gefüllte Spritze angesetzt. Durch Abgabe des Inhalts wurde so das Rückenmark herausgeschwemmt und konnte in eine zuvor vorbereitete Kammer aus Aluminiumfolie überführt sowie möglichst waagrecht auf Trockeneis positioniert werden. Das erste Drittel wurde mit Tissue Tek gefüllt. Nachdem dies angefroren war, konnte das Rückenmark darauf abgelegt, die restliche Kammer mit Tissue Tek befüllt und die erfolgreiche Entnahme bei -80 °C aufbewahrt werden.

Schnitte

Die Rückenmarkskammern wurden auf -20 °C erwärmt und von der umgebenden Aluminiumfolie befreit. Anschließend wurde das Rückenmark senkrecht im Kryostat mit Hilfe von Tissue Tek befestigt. Die 9 μm Schnitte wurden bei -20 °C durchgeführt und auf die Super Frost Objektträger gegeben. Nach kurzer Trocknung bei Raumtemperatur wurden die Schnitte bis zur Färbung bei -20 °C gelagert.

3.8 Immunzytochemische Färbungen

Die immunzytochemischen Färbungen dienen dem Vernetzen der gewünschten Ziel-Epitope mit Fluoreszenzproteinen, welche mittels Fluoreszenz basierter Mikroskopie detektiert werden können. Häufig muss dabei auf den Zwischenschritt der primären Antikörper als Ankerprotein für die sekundär fluoreszierenden Antikörper zurückgegriffen werden.

Ausnahmen bildet bei den HEK293-Zellen das Gephyrin, welches bereits mit dem Fluoreszenzprotein eGFP gekoppelt transfiziert wurde. Bei den Neuronen und Rückenmarksschnitten der Mauslinien *Glrb^{eos}* und *Glrb^{eos} x Glra1^{sh}* wird die bereits endogen fluoreszierende mEos4b-Sequenz durch den anti-mEos-ATTO488 Antikörper verstärkt, welcher zeitgleich mit den sekundären Antikörpern aufgetragen wurde.

Die Inkubation der Deckgläschen erfolgte bei allen Färbungen in einer Dunkelkammer, welche mit einem befeuchteten Papiertuch und einem beschrifteten Parafilm ausgekleidet war. Bei der Immunzytochemie der HEK293-Zellen und der Rückenmarksneuronen wurden jeweils 50 μ l pro Deckgläschen innerhalb eines Inkubationsschrittes verwendet. Das erläuterte PBS hatte einen pH von 7,4.

3.8.1 HEK293-Zellen

GlyR- α 1 mAb2b mouse Antikörper -live:

Bei der Lebendzellfärbung mit dem primären GlyR- α 1 mAb2b mouse Antikörper (1:250 in HEK293-Medium) wurden die Deckgläschen zuerst auf Eis für eine Stunde inkubiert. Danach wurde dreimalig mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 20 Minuten mit 4% PFA 4% Sucrose-Lösung fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Alle weiteren Schritte wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Es folgte der Blockierungsschritt für 30 Minuten mit 5% Ziegenserum in PBS (5% NGS). Nach einmaligem Waschschrift wurde für eine Stunde der sekundäre Cy3 goat-anti-mouse Antikörper (1:500 in 5% NGS) aufgetragen. Die Deckgläschen wurden mit PBS dreimal gewaschen und die Zellkerne für 5 Minuten mit DAPI (1:5000 in 5% NGS) gefärbt. Danach folgte ein dreifacher Waschschrift mit PBS und einmalig mit destilliertem H₂O. Abschließend wurden die Deckgläschen mit Mowiol auf den Objektträgern fixiert, über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und bei 4 °C gelagert.

GlyR- α mAb4a mouse/ Myc-Tag rabbit:

Bei dieser Färbung wurden die HEK293-Zellen nicht lebend gefärbt, wodurch alle Schritte bei Raumtemperatur stattfanden.

Zu Beginn wurden die Deckgläschen einmalig mit PBS gewaschen und mit 4% PFA 4% Sucrose-Lösung für 20 Minuten fixiert. Nach dreimaligen PBS-Waschen folgte der Blockierungsschritt für 30 Minuten mit 5% NGS 0,2% Triton X-100. Die Permeabilisierungsmethode mit Triton ermöglicht eine intrazelluläre Detektion des Ziel-Epitops. Anschließend wurde das überschüssige Triton durch dreimaliges PBS-Waschen entfernt. Die primären Antikörper (GlyR- α mAb4a mouse/ Myc-Tag rabbit), welche 1:500 in 5% NGS verdünnt waren, inkubierten für eine Stunde. Nachfolgend wurden die nicht gebundenen Antikörper (AK) durch dreimaliges PBS-Waschen entfernt. Die Deckgläschen wurden mit den sekundären AK (Cy3 goat-anti-rabbit, Cy5 goat-anti-mouse) in einer Verdünnung von 1:500 in 5% NGS für eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligen PBS-Waschen folgte die Zellkernfärbung für 5 Minuten mit DAPI (1:5000 in PBS) und die letzten vier Waschschrte (3x PBS, 1x destilliertes H₂O). Mittels Mowiol wurden die Deckgläschen auf die beschrifteten Objektträger fixiert, über Nacht getrocknet und bei 4 °C gelagert.

In allen HEK293-Färbungen wurde zur Kontrolle der Antikörper auf untransfizierten Zellen statt des primären Antikörpers PBS aufgetragen und lediglich der sekundäre Antikörper verwendet. Bei GFP transfizierten Zellen wurde die Inkubation mit den primären Antikörpern durchgeführt und statt des sekundären PBS pipettiert.

3.8.2 Rückenmarksneurone

Um eine Vergleichbarkeit der statistisch relevanten Färbungen zueinander zu ermöglichen, wurden diese Rückenmarksneurone immer am 16. Tag der Kultivierung gefärbt, wobei der Tag 0 dem Präparationstag entspricht.

GlyR- α 1 mAb2b mouse Antikörper:

Bei den Rückenmarksneuronen wurde der GlyR- α 1 mAb2b mouse Antikörper nicht mit lebenden, sondern mit bereits fixierten Zellen gefärbt. Daher orientierte sich die Färbung an der Reihenfolge wie sie bei „GlyR- α mAb4a mouse/ Myc-Tag rabbit“ beschrieben ist. Der Unterschied besteht darin, dass eine erfolgreiche Bindung des GlyR- α 1 mAb2b mouse Antikörpers nur vor dem Auftragen der Triton-Blockinglösung möglich ist. Daher wurden zwei zusätzliche Schritte zwischen der Fixierung der Zellen und dem Blocken mit Triton im Protokoll eingefügt, welche wie folgt lauten: Die Deckgläschen wurden mit 5% NGS für 30 Minuten geblockt und anschließend für eine Stunde mit GlyR- α 1 mAb2b mouse Antikörper (1:500 in 5% NGS) inkubiert. Nach dreimaligen PBS-Waschen wurde mit dem Schritt des Blockens mit 5% NGS 0,2% Triton im Protokoll fortgeföhren.

Weitere Antikörperkombinationen:

Die Färbungen mit allen anderen Antikörperkombinationen folgten dem Protokoll wie es bei „GlyR- α mAb4a mouse/ Myc-Tag rabbit“ aufgelistet wurde.

Um eine unspezifische Bindung der sekundären Antikörper auszuschließen, wurde bei den Kontrollen aller Färbungen von Rückenmarksneuronen die Inkubation des primären Antikörpers durch PBS ersetzt und nur der sekundäre Antikörper aufgetragen.

Die genaue Verdünnung und Verwendung der jeweiligen Antikörperkombinationen für die HEK293-Zellen und für die Neurone der entsprechenden Mauslinien sind im *Kapitel 3.2.6* erläutert und in der nachfolgenden *Tabelle 25* aufgelistet.

Tabelle 25 verwendete Antikörperkombinationen von HEK293-Zellen und Rückenmarksneuronen
 AK = Antikörper, GlyR = Glycin-Rezeptor

Färbung	Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
HEK293	GlyR- α 1 mAb2b <i>mouse</i>	Cy3 <i>goat-anti-mouse</i>
	GlyR- α mAb4a <i>mouse</i> + Myc-Tag <i>rabbit</i>	Cy5 <i>goat-anti-mouse</i> + Cy3 <i>goat-anti-rabbit</i>
CD-1 & <i>GlyT2-eGFP</i>	GlyR- α 1 mAb2b <i>mouse</i> + VGAT <i>rabbit</i>	Cy3 <i>goat-anti-mouse</i> + Cy5 <i>goat-anti-rabbit</i>
	GlyR- α 1 mAb2b <i>mouse</i> + Synaptophysin <i>rabbit</i>	
	GlyR- α mAb4a <i>mouse</i> + VGAT <i>rabbit</i>	
	GlyR- α mAb4a <i>mouse</i> + Gephyrin <i>rabbit</i>	
	MAP2 <i>mouse</i> + VGAT <i>rabbit</i>	
204: <i>Glr^b eos x Glra¹ sh</i> (ohne anti-mEos-AK)	GlyR- α 1 mAb2b <i>mouse</i> + VGAT <i>rabbit</i>	Cy3 <i>goat-anti-mouse</i> + Cy5 <i>goat-anti-rabbit</i>
	GFP <i>mouse</i> + VGAT <i>rabbit</i>	Alexa Fluor 488 <i>goat-anti-mouse</i> + Cy5 <i>goat-anti-rabbit</i>
202: <i>Glr^b eos</i>	GlyR- α 1 mAb2b <i>rabbit</i> + VGAT <i>guinea pig</i>	Cy3 <i>goat-anti-rabbit</i> + Cy5 <i>donkey-anti-guinea-</i> <i>pig</i> + anti-mEos-ATTO488
	GlyR- α 1 mAb2b <i>rabbit</i> + Gephyrin <i>mouse</i>	Cy3 <i>goat-anti-rabbit</i> + Cy5 <i>goat-anti-mouse</i> + anti-mEos-ATTO488
	GlyR- α mAb4a <i>mouse</i> + VGAT <i>rabbit</i>	Cy3 <i>goat-anti-mouse</i> + Cy5 <i>goat-anti-rabbit</i> + anti-mEos-ATTO488
	MAP2 <i>mouse</i> + VGAT <i>rabbit</i>	
	GlyR- α 1 mAb2b <i>mouse</i> + Synaptophysin <i>rabbit</i>	
131: <i>Glra¹ sh</i> & 204: <i>Glr^b eos x Glra¹ sh</i>	GlyR- α 1 mAb2b <i>rabbit</i> + Synapsin 1/2 <i>chicken</i>	Cy3 <i>goat-anti-rabbit</i> + Alexa Fluor 647 <i>donkey-</i> <i>anti-chicken</i> (bei 204: + anti-mEos-ATTO488)
	GlyR- α 1 mAb2b <i>rabbit</i> + Gephyrin <i>mouse</i>	Cy3 <i>goat-anti-rabbit</i> + Cy5 <i>goat-anti-mouse</i> (bei 204: + anti-mEos-ATTO488)

3.8.3 Rückenmarksschnitte

Die immunzytochemische Färbung der Rückenmarksschnitte von *Glrb^{eos} x Glra1^{+/+}* und *Glrb^{eos} x Glra1^{sh/sh}* Mäusen wurde zweimal durchgeführt. Das dafür verwendete PBS hatte einen pH von 8 und das PFA wurde zu 2% in H₂O gelöst. Die bei -20 °C gelagerten 9 µm Schnitte wurden bei RT in einer befeuchteten Dunkelkammer gefärbt und nur während der Inkubation der primären Antikörper über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Pipettierangaben beziehen sich auf die Menge von µl, die pro Slide aufgetragen wurde. Die kombinierten Antikörper sind in *Tabelle 26* aufgeführt.

Am ersten Tag wurden die Schnitte für 30 Sekunden mit 2% PFA fixiert. Anschließend wurden die Objektträger in Quenching mit NH₄Cl Lösung kurz eingetaucht und mit 500 µl Glycin (0,1 mM) für 30 Minuten bedeckt. Danach wurden die Schnitte mit je 500 µl 10% Horse Serum in PBS (10% NGS) für eine Stunde geblockt. Die Objektträger wurden mit je 100 µl primärer Antikörper (1:500 in 10% NGS) pipettiert und mit einem Deckglas vor dem Austrocknen geschützt. Die befeuchtete Dunkelkammer wurde über Nacht bei 4 °C gelagert.

Am zweiten Tag wurden die Deckgläser entfernt und die Schnitte dreimalig in PBS für jeweils 10 Minuten gewaschen. Danach folgte die Inkubation der sekundären Antikörper (1:500 in 10% NGS) mit je 100 µl und einem Deckglas für eine Stunde. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde der dreimalige PBS-Waschschritt für jeweils 10 Minuten wiederholt. Die Zellkerne wurden mit je 500 µl DAPI (1:2000 in PBS) für 5 Minuten gefärbt. Der Waschschritt mit PBS wurde erneut dreimal für 10 Minuten wiederholt und durch kurzes Eintauchen in destilliertem H₂O ergänzt. Abschließend wurden die Schnitte mit Hilfe eines neuen Deckglases und Fluor Save fixiert, bei RT über Nacht getrocknet und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 26 Antikörperkombinationen Rückenmarksschnitten

GlyR = Glycin-Rezeptor

Färbung	Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
204: <i>Glrb^{eos} x Glra1^{sh}</i>	GlyR-α1 mAb2b <i>rabbit</i> + Synapsin 1/2 <i>chicken</i>	Cy3 <i>goat-anti-rabbit</i> + Cy5 <i>donkey-anti-chicken</i> + anti-mEos-ATTO488
	GlyR-α1 mAb2b <i>rabbit</i> + Gephyrin <i>mouse</i>	Cy3 <i>goat-anti-rabbit</i> + Cy5 <i>goat-anti-mouse</i> + anti-mEos-ATTO488

3.9 Mikroskopie

Die Aufnahmen von den HEK293-Zellen und den Rückenmarksneuronen wurden mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie getätigt, während die Rückenmarksschnitte mittels Axio Imager 2 detektiert wurden. Beide Systeme beruhen auf dem Prinzip der Fluoreszenz und wurden mit der Software *ImageJ* (Version 2.3.0/1.53f) ausgewertet und dargestellt.

3.9.1 Konfokale Mikroskopie

Das invertierte IX-81 Mikroskop ist mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Fluoview FW 1000 von Olympus) und mit einem FVD10 SPD Spektraldetektor verbunden. Zur Aufnahme der Bilder wurde das 60x Objektiv mit Öl und folgende Diodenlaser eingesetzt: 405 nm (DAPI), 473 nm (Alexa 488), 559 nm (Cy3) und 635 nm (A647, Cy5). Die Belichtungszeit entsprach 8.0 μ s/Pixel mit einer Auflösung von 1024 Pixel. Für die statistische Auswertung wurden die konfokalen Aufnahmen unterschiedlicher Genotypen derselben Mauslinie mit den gleichen Einstellungen belichtet. Im Vergleich von *Glr1^{sh}* (131) und *Glr1^{sh} x Glrb^{eos}* (204) unterschieden sich die Einstellung nur bei der Aufnahme von Gephyrin. Der Grund hierfür war, dass sonst das zu detektierende Gephyrin bei *Glr1^{sh} x Glrb^{eos}* (204) zu schwach für die anschließende Auswertung gewesen wäre (Anhang, Kapitel 8.6, Tabelle 37). Innerhalb einer Linie wurden die Einstellungen von Gephyrin und allen weiteren Ziel-Epitopen nicht verändert, um eine Vergleichbarkeit der Genotypen (Homozygot, Wildtyp) zu gewährleisten. Bildzuschnitte als auch die Verstärkung der Farben erfolgten in gleicher Weise (Anhang, Kapitel 8.6, Abb. 30, Tabelle 36, 37). Die genauen Laser- und Bildbearbeitungseinstellungen sind im *Anhang Kapitel 8.6* zu finden.

3.9.2 Axio Imager 2

Das Axio Imager 2 Fluoreszenzmikroskop von der Firma Zeiss kann wahlweise mit dem Apotom Filter (ApoTome.2) verbunden werden. Mit Hilfe der *ZEN-Software* (Version 2.6/ blue edition) wurde das System kalibriert, um anschließend die Schnitte in den gewünschten Kanälen (DAPI, Alexa 488, Cy3, Cy5) aufzunehmen. Für die hier gezeigten Aufnahmen wurde das 20x Objektiv ohne Öl verwendet. Die zugehörigen Einstellungen sind in im *Anhang Kapitel 8.6* gelistet.

3.10 Statistische Auswertung

Die gesamte Analyse und Auswertung der Daten wurde von der Doktorandin Isabell Fuhl durchgeführt. Datensätze wurden in Microsoft Excel gesammelt und mit *GraphPad Prism* (Version 9.3.1) ausgewertet. Zu Beginn wurden die Daten jeweils anhand der *ROUT*-Methode ($Q = 1\%$) auf mögliche Ausreißer überprüft und gegebenenfalls vom Datensatz ausgeschlossen. Als signifikant wurden alle p-Werte kleiner 0,05 eingestuft, wobei die einzelnen Stufen der Signifikanz wie folgt eingeteilt wurden: $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ *** und $p < 0,0001$ ****. p-Werte größer gleich 0,05 wurden als nicht signifikant bewertet ($p \geq 0,05$).

3.10.1 Wiegedaten

Die erhobenen Körpergewichtswerte der verwendeten Tiere pro Gramm wurden hinsichtlich der Genotypen eingeteilt und miteinander verglichen. Zuerst wurde die *Row-Statistic*-Methode angewendet, wodurch die Werte der einzelnen Genotyp-Gruppen pro Tag gemittelt wurden. Anschließend wurde der *One-Way-Anova*-Test durchgeführt, der die Mittelwerte der einzelnen Gruppen (mehr als zwei) miteinander vergleicht. Zuletzt konnte mittels des ungepaarten *t-Tests* die Wiegedaten zweier Genotypen zueinander untersucht werden.

3.10.2 Mikroskopiedaten

Mikroskopie Aufnahmen der Motoneuronen wurden mit *ImageJ* (Version 2.3.0/1.53f) analysiert. Im *Plugin NeuronJ* wurde eine bestimmten Dendritenlänge markiert. Diese Schablone wurde im *Plugin SynapcountJ* über die verschiedenen Einzelkanäle und Kollokalisierungen gelegt, so dass die gezählte Proteindichte auf die gleiche Dendritenlänge bezogen werden konnte. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Dendriten nach ihrer Stärke in schwach, mittel und stark eingeteilt. Diese Einteilung sollte vermeiden, dass zu stark fluoreszierende und doppelte Dendriten mit schwachen und dünneren Dendriten verglichen werden. Diese Einteilung ist im Anhang an einem Beispiel der Daten für GlyR- $\alpha 1$ näher erläutert (Anhang, Kapitel 8.9). Die Zählung wurde zusätzlich immer nochmals per Auge überprüft. Die wenigen „falsch“ gezählten Dendriten waren teils durch Unschärfe begründet und wurden daher von der Aufteilung ausgeschlossen, jedoch bei der Auswertung „aller Dendriten“ mit einbezogen.

Im Ergebnisteil sind jeweils die mittelstarken Dendriten zweier Genotypen miteinander verglichen. Im *Anhang* in dem *Kapitel 8.7* sind sowohl die jeweilige Messbilderanzahl pro Genotyp und Färbung als auch die gezählten Dendriten pro Embryo zugeordnet. Ebenso ist im Anhang eine weitere statistische Auswertung mit allen (schwach + mittel + stark + aussortiert) gezählten Dendriten pro Genotyp zu finden (*Anhang, Kapitel 8.8 und 8.10*).

Bei der statistischen Auswertung der Daten wurde wie folgt vorgegangen. Die Gaußsche Normalverteilung mit einem Signifikanzniveau von 0,05 wurde anhand folgender Tests ermittelt: *Anderson-Darling Test, D'Agostino-Pearson omnibus normality Test, Kolmogorov-Smirnov normality Test, Shapiro-Wilk normality Test*. War in einem der Tests der p-Wert unter 0,05 wurde dieser Datensatz als nicht normalverteilt gewertet und anschließend der *Mann-Whitney-Test* durchgeführt. Traf jedoch eine Normalverteilung zu, konnte der ungepaarte *t-Test* herangezogen werden. Zuletzt wurden die Mittelwerte, die Differenz der Mittelwerte und der Standardfehler (Standardabweichung/ $\sqrt{\text{Stichprobengröße}}$) errechnet.

4. Ergebnisse

Die seltene Erkrankung der Hyperekplexie wird durch eine fehlerhafte inhibitorische Neurotransmission mittels Glycins ausgelöst. Dafür sind vor allem Genmutationen in der GlyR- $\alpha 1$ - und β - Untereinheit des Glyzin-Rezeptors oder GlyT2-Mutationen verantwortlich. GlyR- $\alpha 1$ und β werden im Menschen von den Genen *GLRA1* und *GLRB* kodiert, während GlyT2, der Glycin-Transporter 2, von *SLC6A5* kodiert wird. Diese Mutationen führen zu einem Ungleichgewicht zwischen Erregung und Hemmung, und können beim Menschen übersteigerte Schreckreaktionen, Muskelsteifheit und Apnoe auslösen (Schaefer, Langlhofer et al. 2013, Bode and Lynch 2014).

Die zugrundeliegende Pathologie ist bislang noch nicht vollständig verstanden. Dabei ist die Beteiligung der GlyR- β - Untereinheit an diesen Krankheitsmechanismen meist noch unklar. Das Fehlen eines stabilen Antikörpers gegen diese Untereinheit ist dafür eine der wesentlichen Ursachen. Das neue Mausmodell mit einer markierten GlyR- β - Untereinheit durch ein *mEos4b-Tag* (Maynard, Rostaing et al. 2021) erlaubt es nun in bereits bekannten Mausmodellen der Hyperekplexie die Beteiligung der β - Untereinheit näher zu charakterisieren.

Ein gutes Modell, diese Erkrankung zu untersuchen, stellt die *shaky* Mausmutante dar, die eine *Missense*-Mutation Q177K in der extrazellulären $\beta 8$ - $\beta 9$ Schleife der Glycin-Rezeptor- $\alpha 1$ -Untereinheit trägt. Bislang wurde neben funktionellen Störungen auch eine veränderte synaptische Integration für diese Mausmutante postuliert. Als mögliche Erklärung wurde eine strukturvermittelte Konformationsänderung im GlyR $\alpha 1/ \beta$ Rezeptorkomplex angenommen, welche eine gestörte Gephyrinbindung und damit eine fehlende synaptische Verankerung bewirken könnte (Schaefer, Berger et al. 2017). Um diese These weiter zu untersuchen, ist die β -Untereinheit als Bindeglied zwischen $\alpha 1$ und Gephyrin von großem Interesse.

Die Mauslinie *Glr^{b^{eos}}* eröffnet mit einer endogen fluoreszierenden β -Untereinheit neue experimentelle Untersuchungsmöglichkeiten. Durch die Kreuzung *Glr^{b^{eos}}* \times *Glr^{a1^{sh}}* wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Frage eingegangen, welche Auswirkungen die Mutation der $\alpha 1$ -Untereinheit auf die Interaktion von der β -Untereinheit und Gephyrin hat. Dabei wurde sowohl die Einzelexpression GlyR- $\alpha 1$, Gephyrin und GlyR- β als auch die jeweiligen Kollokalisierungen untersucht. Außerdem wurde eine weitere mögliche Einflussnahme auf die Anzahl der Synapsen mittels Synapsin immunzytochemisch beleuchtet.

4.1 Glycin-Rezeptor Nachweis in HEK293-Zellen

Zu Beginn wurden mit transfizierten HEK293-Zellen immunzytochemische Färbungen durchgeführt, um die vorhandenen Antikörper zu validieren. Die eingeschleusten Plasmid-DNAs exprimierten die gewünschten Glycin-Rezeptorproteine, wie GlyR- $\alpha 1^{wt}$, GlyR- $\alpha 1^{Q177K}$, Myc-GlyR- β^{wt} und Gephyrin. Die Färbung erfolgte 48 Stunden nach erfolgreicher Transfektion.

Die GlyR- $\alpha 1$ -Untereinheit wurde spezifisch von dem GlyR- $\alpha 1$ mAb2b Antikörper detektiert, der am extrazellulären N-Terminus der adulten $\alpha 1$ -Untereinheit an den Aminosäureresten 1-10 bindet. Der GlyR- α mAb4a Antikörper hingegen ist spezifisch gegen neonatale und adulte α -Isoformen des Glycin-Rezeptors und reagiert mit den Resten 96-105 (Schröder, Hoch et al. 1991, Rauschenberger, von Wardenburg et al. 2020). Allerdings wurden bezüglich der α -Isoformen nur GlyR- $\alpha 1$ in HEK293-Zellen transfiziert. Der Myc-Tag Antikörper erkennt spezifisch das eingeschleuste extrazelluläre Myc-Epitop an der β -Untereinheit. Das exprimierte Gephyrin Protein war bereits mit dem Fluorophor GFP gekoppelt. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Als Kontrolle wurden untransfizierte HEK293-Zellen und mit GFP transfizierte Zellen mitgefärbt (Anhang, Kapitel 8.4).

Abbildung 4 A zeigt die Kolokalisation der Signale (merge) für GlyR- α 1 und Gephyrin. Im Vergleich zu der Kolokalisation von GlyR- α 1 und Gephyrin akkumulieren Gephyrin und GlyR- β deutlich kongruenter (Abb. 4 B).

HEK293: GlyR- α 1^{Q177K}, Myc-GlyR- β ^{wt}, eGFP-Gephyrin

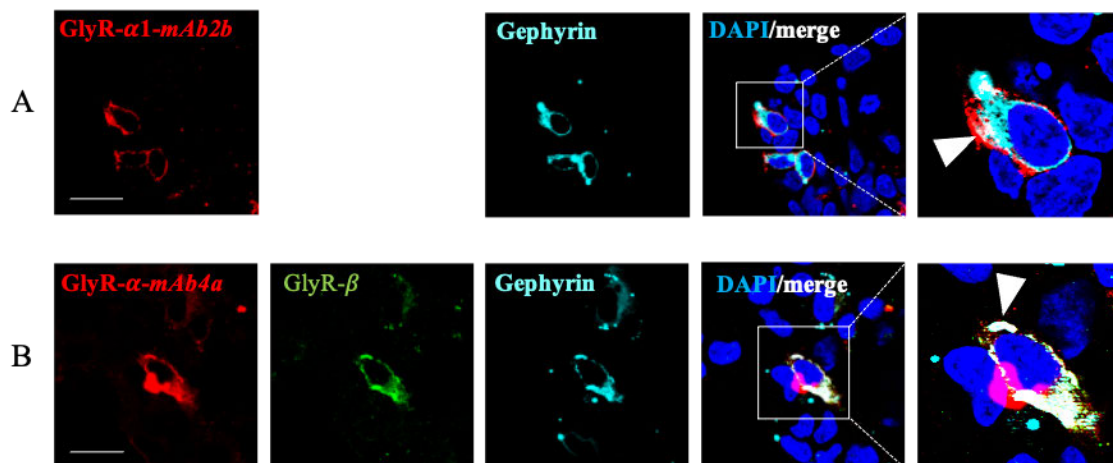


Abbildung 4 Nachweis des GlyR in HEK293-Zellen

Die Transfektion von HEK293-Zellen erfolgte mit den pDNAs: pRK7-GlyR- α 1^{Q177K}, pRK7-Myc-GlyR- β ^{wt} und eGFP-Gephyrin. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Überlagerung (merge) der Kanäle ist mit weißen Pfeilspitzen gekennzeichnet.

A: primäre Antikörper: GlyR- α 1 mAb2b mouse

B: primäre Antikörper: GlyR- α mAb4a mouse + Myc-Tag rabbit

Einheit des Maßstabbalkens: 25 μ m

Zur Charakterisierung der *shaky* Mutation der GlyR- α 1-Untereinheit in HEK293-Zellen, wurde die Plasmid-DNA mit dem Insert GlyR- α 1^{Q177K} und als Wildtyp Vergleich GlyR- α 1^{wt} transfiziert und mittels GlyR- α 1 mAb2b Antikörper detektiert. In der Vergrößerung (Abb.5 A, rechts) ist eine leicht reduzierte Oberflächenexpression von α 1^{Q177K} im Vergleich zu α 1^{wt} (Abb. 5 B, rechts) zu erkennen.

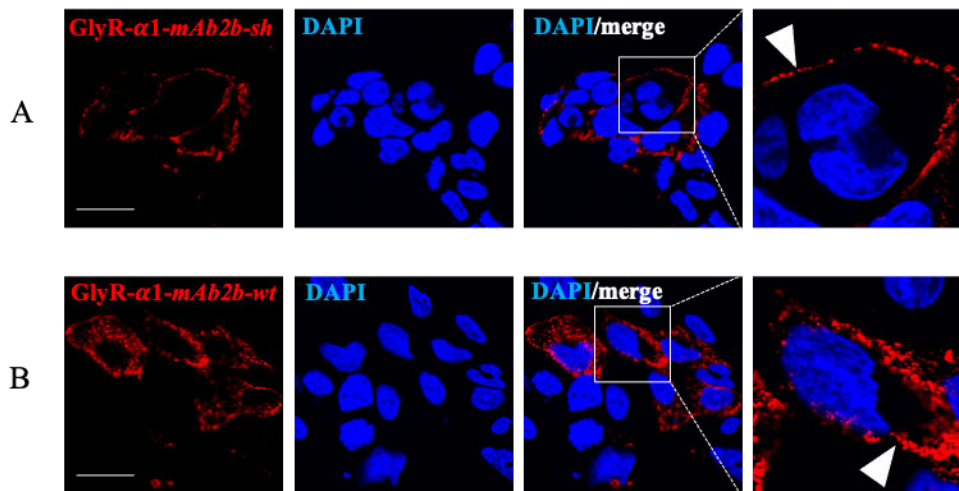


Abbildung 5 Die *shaky* Mutation hat in HEK293-Zellen eine verringerte GlyR- $\alpha 1$ Oberflächenexpression zur Folge

In **A** wurden HEK293-Zellen mit pRK7-GlyR- $\alpha 1^{Q177K}$ und in **B** mit pRK7-GlyR- $\alpha 1^{wt}$ transfiziert. Die Färbung wurde mit dem primären Antikörper GlyR- $\alpha 1$ mAb2b *mouse* durchgeführt. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Die Ausprägung der Oberflächenexpression ist mit einem Pfeil (weiß) in der Vergrößerungsansicht markiert. *sh* = shaky, *wt* = Wildtyp, *vs.* = versus

A & B: primärer Antikörper: GlyR- $\alpha 1$ mAb2b *mouse*

Einheit des Maßstabalkens: 25 μm

4.2 Expression des GlyR in Rückenmarksneuronen

Der Glycin-Rezeptor vermittelt primär die hemmende Neurotransmission im Rückenmark und im Hirnstamm (Lynch 2004). Um den GlyR immunzytochemisch *in vitro* zu untersuchen, wurden Rückenmarksneurone von Mäuseembryonen 12 bis 13 Tage nach erfolgtem Coitus gewonnen und für mindestens 14 Tage kultiviert. Die Oberflächenexpression des Glycin-Rezeptors in 2D-Kulturen von Rückenmarksneuronen steigt zwischen den Tagen 14 bis 17 stark an und erreicht das Maximum am 17. Tag (Fischhaber, Faber et al. 2021). Für die vergleichbare Auswertung wurden die Rückenmarksneurone immer am 16. Tag gefärbt, bevor ein zu starkes neuronales Netzwerk die konfokalen Aufnahmen erschweren würden.

4.2.1 Prä- und postsynaptische Ziel-Epitope

Zur Testung immunzytochemischer Färbungen wurde mit Rückenmarksneuronen der Mauslinien CD-1 und *GlyT2-eGFP* gearbeitet. Während CD-1 eine käufliche Wildtyp Mausstammlinie ist, handelt es sich bei *GlyT2-eGFP*, um eine Mauslinie, in welcher der Glycin-Transporter 2 mit GFP markiert ist, so dass glycinerge Interneurone grün leuchten (Zeilhofer, Studler et al. 2005). Zur Markierung der GlyR- $\alpha 1$ - Untereinheit wurde der mAb2b Antikörper und für alle α -Isoformen der mAb4a Antikörper eingesetzt.

Weiterhin wurden die präsynaptischen Marker VGAT (Vesikulärer-GABA-Transporter) und Synaptophysin (in der Membran synaptischer Vesikelproteine) und der postsynaptische Marker Gephyrin verwendet. Der Antikörper MAP2 detektierte als spezifischer Neuronenmarker das Mikrotubuli-Assoziierte-Protein-2. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Beispiele für die Überlagerung der jeweiligen Marker sind mit weißen Pfeilen versehen und in einem vergrößerten Ausschnitt am rechten Bildrand zu finden. Die nachfolgenden Aufnahmen (Abb. 6-8) zeigen eine erfolgreiche spezifische Färbung der Ziel-Epitope.

Kolokalisationen der markierten GlyR- $\alpha 1$ - Untereinheiten (mAb2b AK) mit präsynaptischen Markern (VGAT, Synaptophysin) zeigen eine erfolgreiche Synapsen Ausbildung zwischen einem präsynaptischen Dendriten und dem postsynaptischen GlyR eines Motoneurons (Abb. 6, 8).

Die Detektion aller α -Isoformen mittels mAb4a AK (Abb. 7) ist im Vergleich zum mAb2b AK (Abb. 6) deutlich stärker und stützt damit die Erwartung, dass sich neben der GlyR- $\alpha 1$ -Untereinheit weitere GlyR- α -Untereinheiten an der Postsynapse von Motoneuronen befinden. Kolokalisationen von mAb4a und Gephyrin (Abb. 7, 8) lassen auf einen GlyR $\alpha 1/\beta$ schließen, könnten aber hinsichtlich der Mischkultur auch dorsale GlyR $\alpha 3/\beta$ abbilden. MAP2 markiert das Zytoskelett von Neuronen und veranschaulicht in dieser AK-Kombination, wie sich ein präsynaptischer Dendrit (VGAT) an ein postsynaptisches Motoneuron anlagert (Abb. 7, 8).

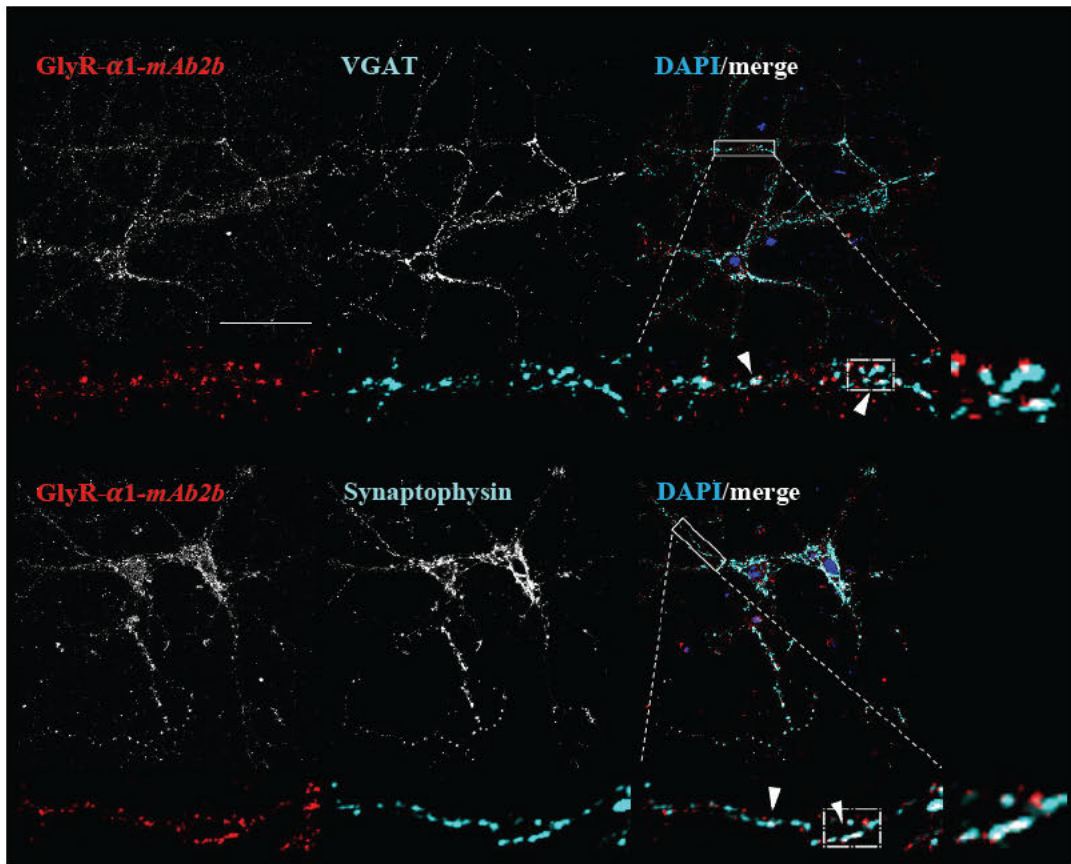


Abbildung 6 Immunzytochemische Färbung von Rückenmarksneuronen CD-1 (Teil 1)

Die Rückenmarksneurone der Mauslinie CD-1 wurden am 15. Tag nach Präparation gefärbt. Dargestellt ist die Detektion der GlyR- α 1-Untereinheit mittels mAb2b Antikörper sowie die Verwendung präsynaptischer Marker (VGAT und Synaptophysin). Zellkerne sind durch die DAPI-Färbung (blau) erkennbar.

1. Reihe: primäre Antikörper GlyR- α 1 mAb2b *mouse* + VGAT *rabbit*
 2. Reihe: primäre Antikörper GlyR- α 1 mAb2b *mouse* + Synaptophysin *rabbit*
- Einheit des Maßstabbalkens: 50 μ m

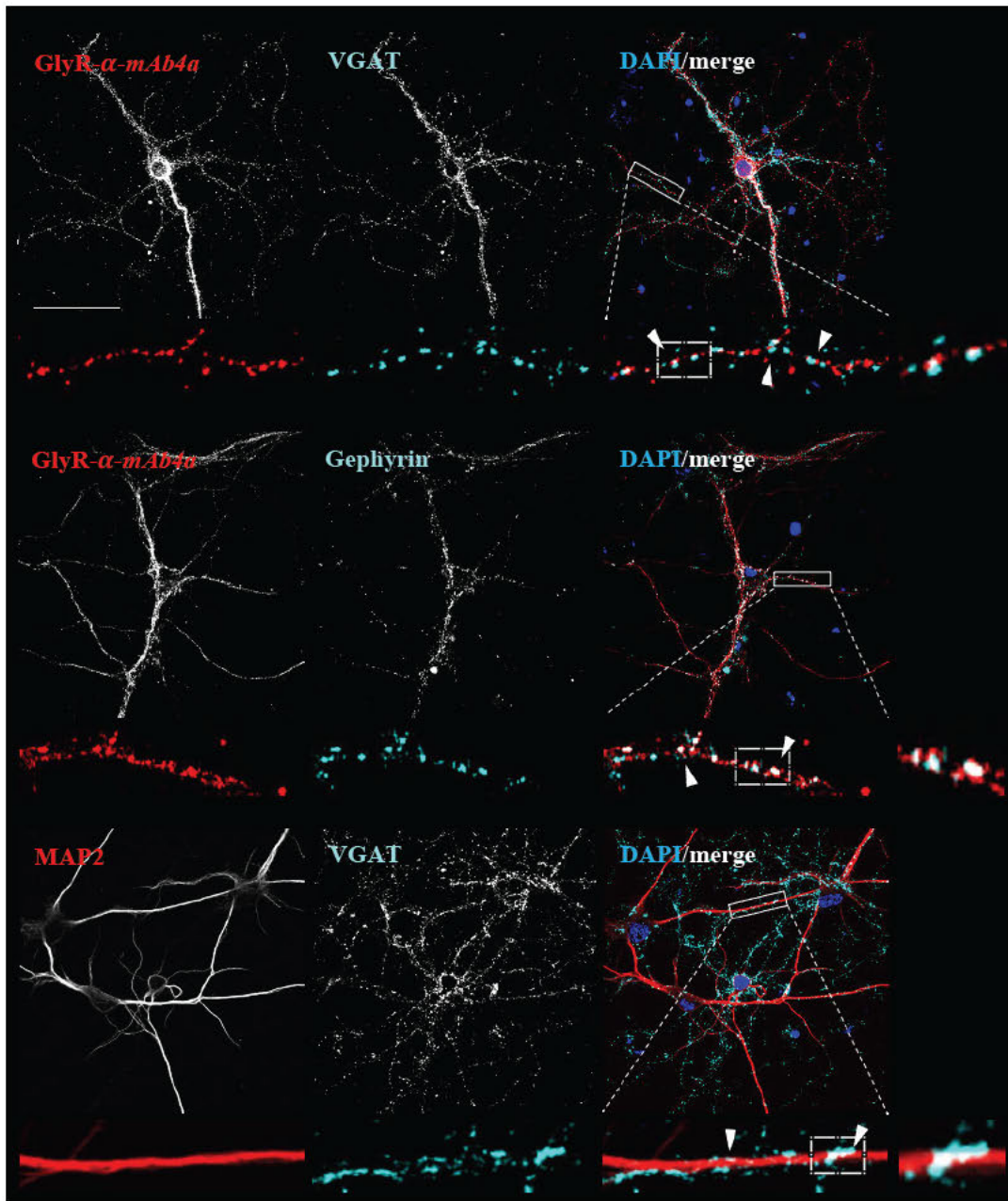


Abbildung 7 Immunzytochemische Färbung von Rückenmarksneuronen CD-1 (Teil 2)

Die Rückenmarksneurone der Mauslinie CD-1 wurden am 15. Tag nach Präparation gefärbt. Dargestellt ist die Detektion der GlyR- α -Untereinheiten mittels mAb4a Antikörper sowie die Verwendung des präsynaptischen Markers (VGAT) und des postsynaptischen Markers (Gephyrin). Das Zytoskelett der Neurone ist durch MAP2 detektiert. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI.

obere Reihe: primäre Antikörper GlyR- α mAb4a mouse + VGAT rabbit

mittlere Reihe: primäre Antikörper GlyR- α mAb4a mouse + Gephyrin rabbit

untere Reihe: primäre Antikörper MAP2 mouse + VGAT rabbit

Einheit des Maßstabalkens: 50 μ m

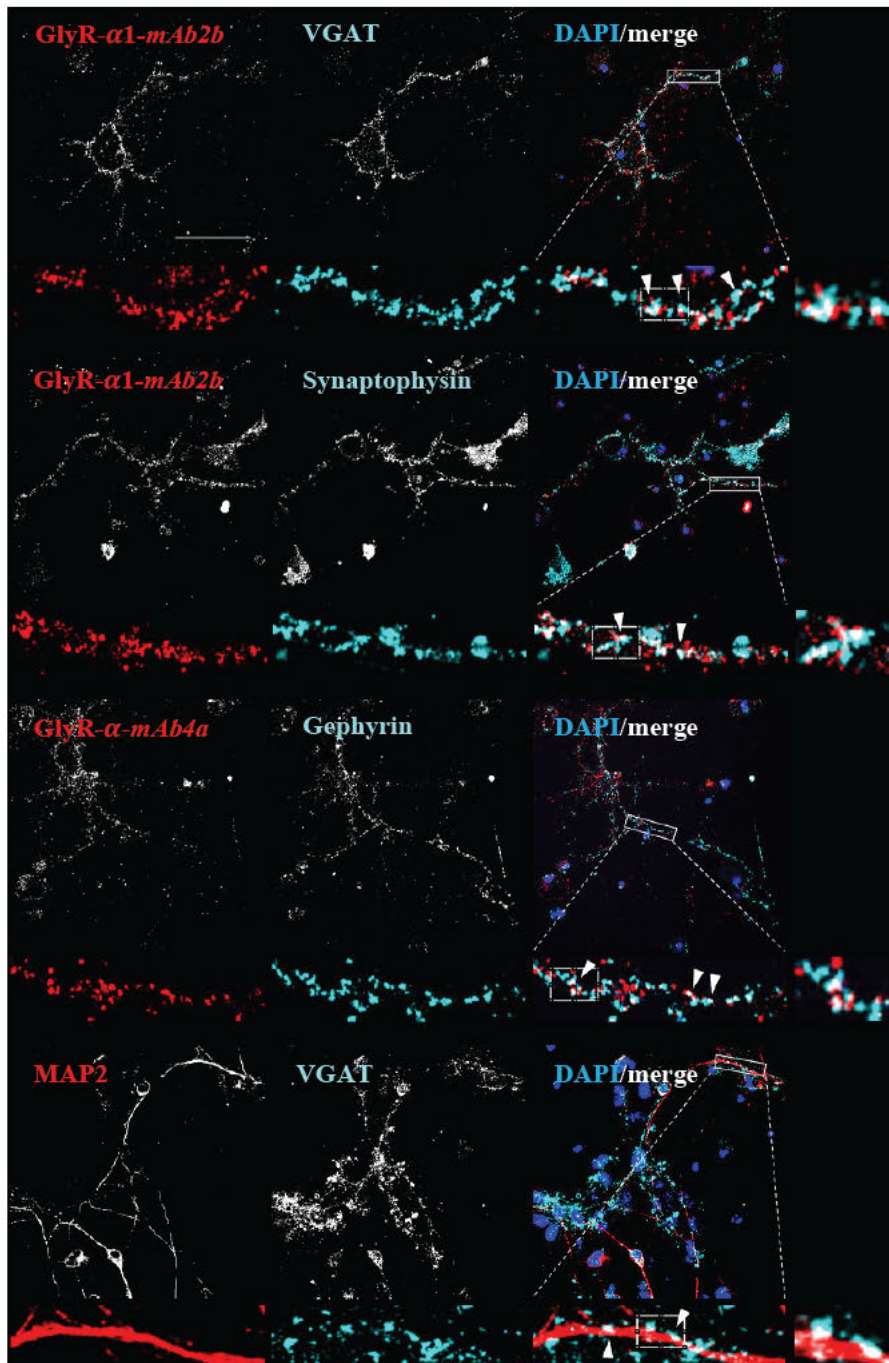


Abbildung 8 Immunzytochemische Färbung von Rückenmarksneuronen *GlyT2-eGFP*

Die Rückenmarksneurone der Mauslinie *GlyT2-eGFP* wurden am 21. Tag nach Präparation gefärbt. Die GlyR- α 1-Untereinheit ist mittels mAb2b AK und der α -Isoformen durch mAb4a AK dargestellt. Als präsynaptische Marker wurden VGAT und Synaptophysin, als postsynaptischer Marker Gephyrin verwendet. Das Zytoskelett ist durch MAP2 gekennzeichnet. Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt.

1. Reihe: primäre Antikörper GlyR- α 1 mAb2b mouse + VGAT rabbit
2. Reihe: primäre Antikörper GlyR- α 1 mAb2b mouse + Synaptophysin rabbit
3. Reihe: primäre Antikörper GlyR- α mAb4a mouse + Gephyrin rabbit
4. Reihe: primäre Antikörper MAP2 mouse + VGAT rabbit

Einheit des Maßstabalkens: 50 μ m

4.2.2 Detektion der GlyR- β - Untereinheit

Die mEos4b-Sequenz ermöglicht aufgrund ihrer endogen fluoreszierenden Eigenschaft die Analyse der GlyR- β -Untereinheit. Für eine erste Testung wurden Rückenmarksneurone aus der Kreuzung *Glr^b^{eos} x Glra1^{sh}* 15 Tage lang kultiviert.

Die erfolgreiche Detektion der β^{eos} -Untereinheit ist in den konfokalen Aufnahmen der Motoneurone mit den Genotypen *Glr^b^{eos/eos} x Glra1^{+/+}* und *Glr^b^{+/eos} x Glra1^{+/sh}* dargestellt (Abb. 9, 10). Bei beiden Aufnahmen lassen sich in den vergrößerten Ausschnitten 2 und 3 Kolokalisationen zwischen β^{eos} / $\alpha 1$ (orange) und VGAT/ $\alpha 1$ (weiß) erkennen und deuten damit auf einen synaptisch integrierten GlyR $\alpha 1/\beta$ hin. Im Vergleich zu *Glr^b^{eos/eos} x Glra1^{+/+}* ist die Intensität des β^{eos} -Signals (grün) bei *Glr^b^{+/eos} x Glra1^{+/sh}* schwächer.

Insgesamt betrachtet ist ein deutlicher Unterschied zwischen dem β^{eos} -Signal zu den anderen Markern GlyR- $\alpha 1$ mAb2b und VGAT zu erkennen, welche weniger diffus und eher punktförmig erscheinen. Diese eher diffuse Detektion ist deshalb von Bedeutung, da eine Auswertung der Einzelexpressionen und Kolokalisationen mit der Software *ImageJ* erschwert worden wäre. Daneben erschien das β^{eos} - Signal am konfokalen Mikroskop eher schwach und konnte nur durch erhöhte Lasereinstellung und verstärkter Bildbearbeitung abgebildet werden.

Der Versuch, das β^{eos} -Signal durch den primären Antikörper gegen GFP zu erhöhen, blieb erfolglos. Daraus resultierend ergab sich die Fragestellung, wie diese endogen fluoreszierende Eigenschaft verbessert werden könnte, um eine verstärkte und punktförmige Darstellung mittels konfokaler Mikroskopie zu ermöglichen.

Glrβ^{eos/eos} x Glra1^{+/+}

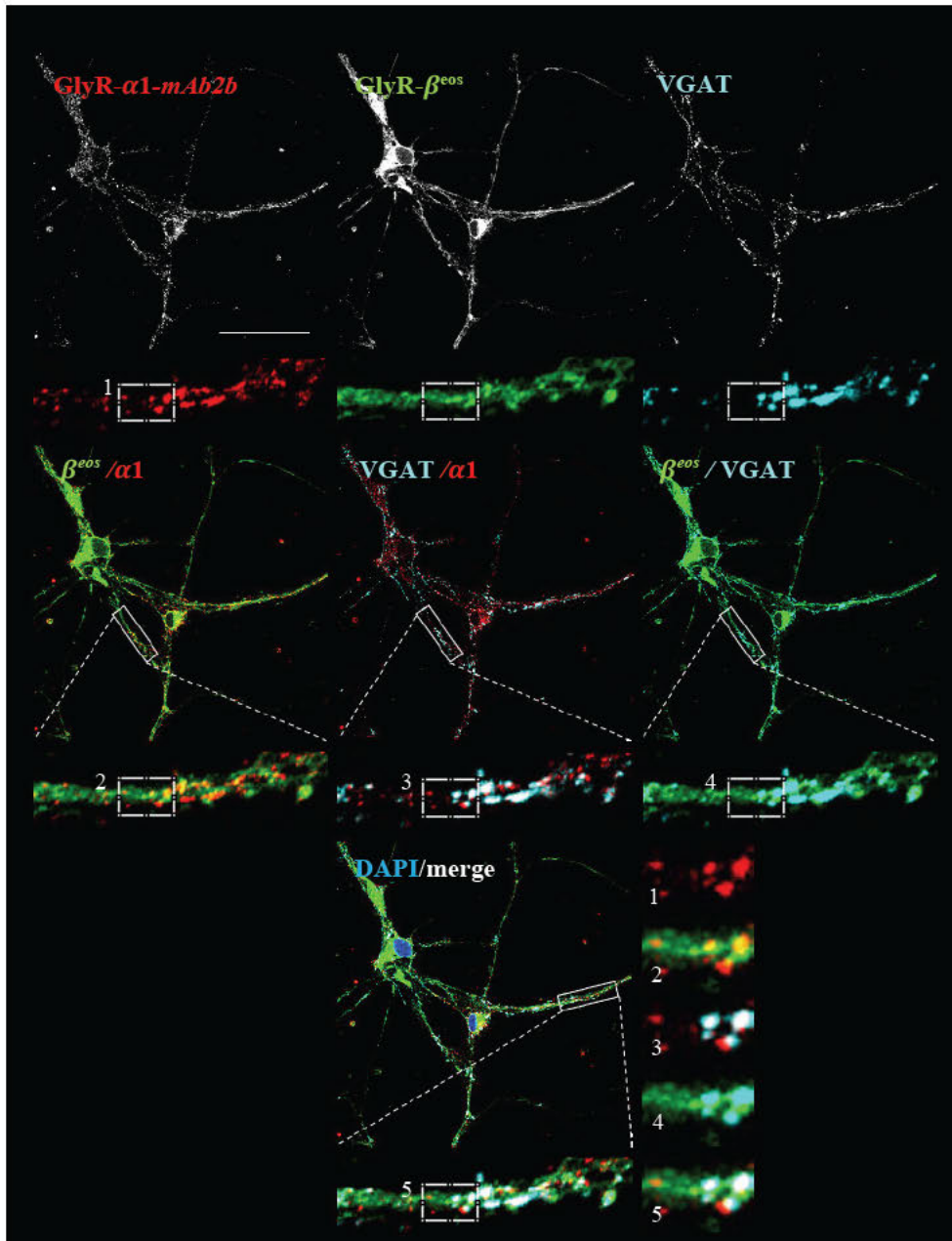


Abbildung 9 Immunzytochemische Färbung von Rückenmarksneuronen *Glrβ^{eos/eos} x Glra1^{+/+}*
Die Rückenmarksneurone des Genotyps *Glrβ^{eos/eos} x Glra1^{+/+}* (204) wurden 15 Tage lang kultiviert. Es ist die Detektion der GlyR-α1-Untereinheit mittels mAb2b *mouse* Antikörper gezeigt. Als präsynaptischer Marker wurde VGAT *rabbit* verwendet. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI sichtbar gemacht. Einheit des Maßstabbalkens: 50 μ m

Glrb^{+/*eos*} x *Gla1*^{+/*sh*}

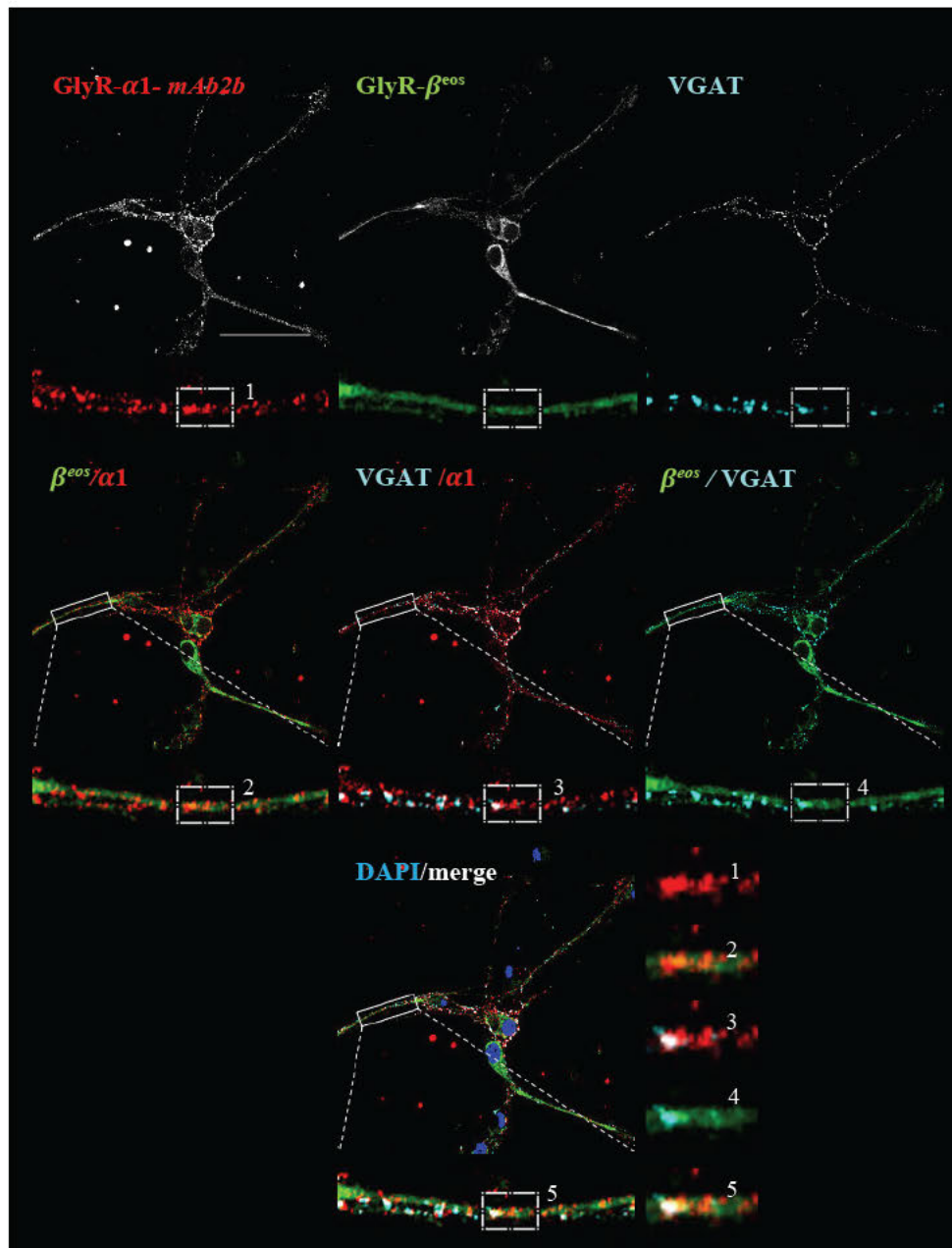


Abbildung 10 Immunzytochemische Färbung von Rückenmarksneuronen *Glrb*^{+/*eos*} x *Gla1*^{+/*sh*}

Die Rückenmarksneurone des Genotyps *Glrb*^{+/*eos*} x *Gla1*^{+/*sh*} (204) wurden 15 Tage lang kultiviert. Die GlyR- α 1-Untereinheit wurde mittels mAb2b mouse Antikörper detektiert. Als präsynaptischer Marker wurde VGAT rabbit verwendet. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI.

Einheit des Maßstabalkens: 50 μ m

4.3 *Glr^b^{eos}* Tiere unterschieden sich nicht im Gewicht von Wildtyp Kontrolltieren

Ehe weitere Experimente mit der *Glr^b^{eos}* Maus erfolgten, sollte ein Einfluss der mEos4b-Sequenz auf die Entwicklung der Tiere ausgeschlossen werden. Eine einfache Methodik stellt zunächst das Dokumentieren des Körpergewichts der Tiere verschiedener Genotypen im Entwicklungsverlauf dar.

Hierfür wurden die Mäuse der Kreuzung *Glr^b^{eos}* x *Glr^a^{sh}* täglich beginnend ab Tag 0 bis Tag 21 gewogen und auf phänotypische Veränderungen hin beobachtet. Die typischen phänotypischen Symptome der *shaky* Mausmutante wie das Umklammern der Hinterfüße beim Packen des Schwanzes, Tremor und Muskelspasmen (Schaefer, Berger et al. 2017) wurden ab Tag 14 beobachtet und nach den Versuchen mit den Genotypisierungsdaten abgeglichen. Dabei wurden ausschließlich Tiere mit diesen spezifischen Symptomen dem Genotyp *Glr^a^{sh/sh}* zugeordnet. Es konnte keine Veränderung des Phänotyps durch die mEos4b-Sequenz festgestellt werden. Anschließend wurden die Daten hinsichtlich der Genotypen eingeteilt (Tabelle 27) und mit *GraphPad Prism* statistisch ausgewertet.

Zu jeder graphischen Darstellung wurde ein Vergleich zweier Gruppen mittels ungepaartem *t-Test* und dreier Gruppen mittels *One-Way-Anova-Test* durchgeführt, dabei wurden alle Gruppen zueinander verglichen. In den Graphen (Abb. 11, 12) werden die statistisch erfassten Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) abgebildet. Weiterführende Erläuterungen zur Datenauswertung sind im *Kapitel 3.10.1* sowie im *Anhang Kapitel 8.5* zu finden.

Tabelle 27 Zuordnung der Mäuse pro Genotyp

	<i>Glr^a^{+/+}</i>	<i>Glr^a^{+/sh}</i>	<i>Glr^a^{sh/sh}</i>	<i>Glr^b^{eos}</i> (mit <i>Glr^a^{+/+}</i> , <i>Glr^a^{+/sh}</i> , <i>Glr^a^{sh/sh}</i>)
<i>Glr^b^{+/+}</i>	5	3	6	14
<i>Glr^b^{+/eos}</i>	6	12	8	26
<i>Glr^b^{eos/eos}</i>	10	8	4	22
<i>Glr^a^{sh}</i> (mit <i>Glr^b^{+/+}</i> , <i>Glr^b^{+/eos}</i> , <i>Glr^b^{eos/eos}</i>)	21	23	18	

In *Abbildung 11* wurden zuerst die *Glrbeos*- Genotypen (*Glrb*^{+/+}, *Glrb*^{+/*eos*}, *Glrbeos/eos*) innerhalb einer *Glr1^{sh}*-Gruppe (*Abb. 11, A-C*) gegenübergestellt und anschließend alle drei *Glrbeos*- Genotypen inklusive der drei *Glr1^{sh}*-Varianten zueinander verglichen (*Abb. 11, D*). Die graphische Darstellung zeigt einen relativ homogenen Verlauf und keine statistische Signifikanz (*Anhang, Kapitel 8.5*).

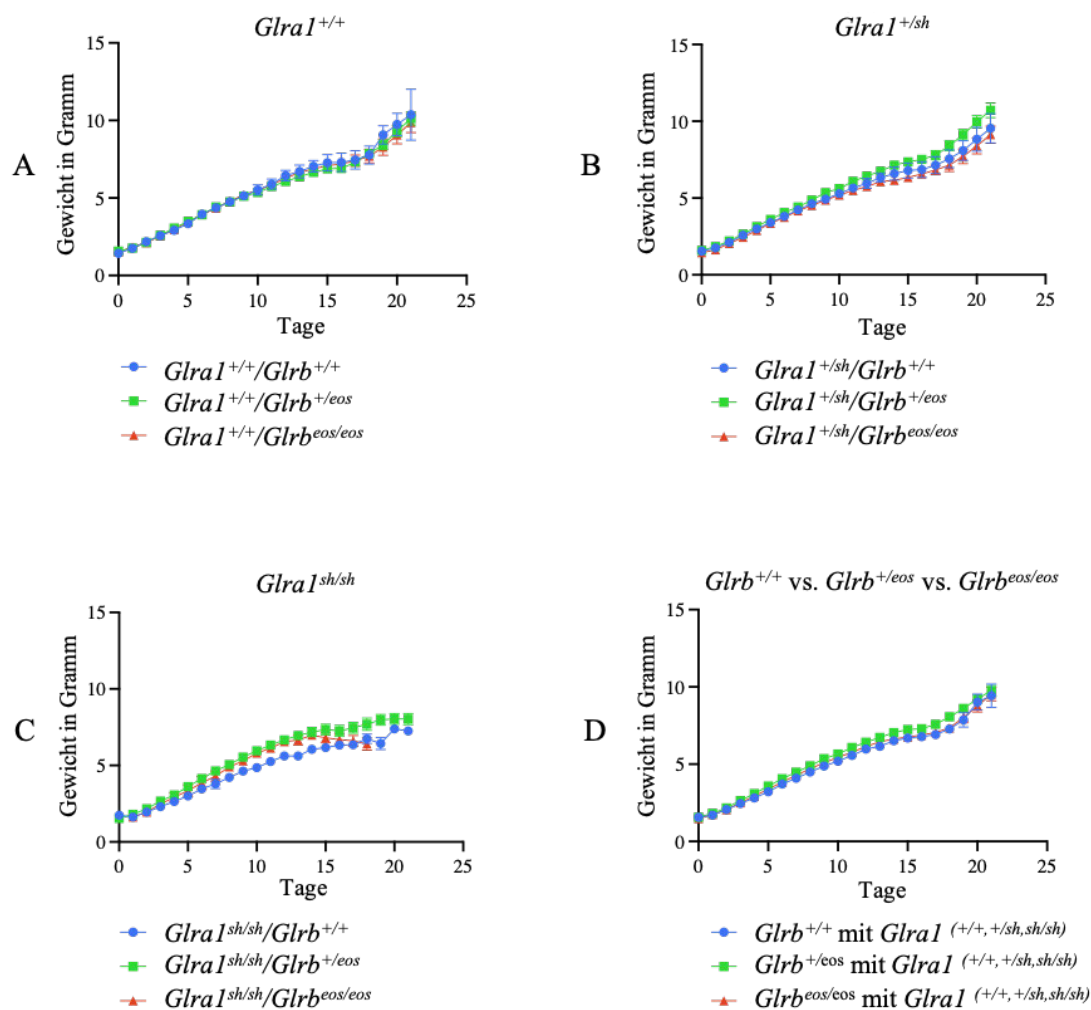


Abbildung 11 Die *Glrbeos*-Genotypen der Linie *Glrbeos* x *Glra1^{sh}* unterscheiden sich nicht im Gewicht. Dargestellt sind die sich in Abhängigkeit der Zeit verändernden Körpergewichte der Tiere verschiedener Genotypen zueinander (Mittelwerte mit SEM). In **A-C** wurden die *Glrbeos*-Genotypen (*Glrb*^{+/+}, *Glrb*^{+/*eos*}, *Glrbeos/eos*) innerhalb einer *Glra1^{sh}*-Gruppe verglichen, während in **D** die *Glrbeos*-Genotypen inklusive aller drei *Glra1^{sh}*-Varianten gegenübergestellt wurden. Die y-Achse gibt das Gewicht in Gramm an, wohingegen die x-Achse den zeitlichen Verlauf in Tagen abbildet (Tag 0-21). vs. = versus

A: *Glra1*^{+/+}-Gruppe mit Vergleich der *Glrbeos*-Genotypen (*Glrb*^{+/+}, *Glrb*^{+/*eos*}, *Glrbeos/eos*) zueinander

B: *Glra1*^{+/*sh*}-Gruppe mit Vergleich der *Glrbeos*-Genotypen (*Glrb*^{+/+}, *Glrb*^{+/*eos*}, *Glrbeos/eos*) zueinander

C: *Glra1*^{*sh/sh*}-Gruppe mit Vergleich der *Glrbeos*-Genotypen (*Glrb*^{+/+}, *Glrb*^{+/*eos*}, *Glrbeos/eos*) zueinander

D: *Glrb*^{+/+} vs. *Glrb*^{+/*eos*} vs. *Glrbeos/eos* (inklusive der jeweiligen drei *Glra1^{sh}*-Varianten)

Nachdem eine Beeinflussung der *Glrb^{eos}*-Genotypen ausgeschlossen werden konnte, wurden anschließend die *Glra1^{sh}*-Genotypen (I: *Glra1^{+/+}*, II: *Glra1^{+ / sh}*, III: *Glra1^{sh / sh}*) inklusive der drei *Glrb^{eos}*-Varianten gegenübergestellt. Im *Graphen A* (Abb. 12) ist dieser Vergleich von Tag 0 bis 21 aufgeführt. Bis Tag 14 ist ein homogener Verlauf zu erkennen, während ab Tag 15 die Körpergewichte der *Glra1^{sh / sh}* Tiere langsamer steigen. Es ist kein Unterschied zwischen den Wiegekurven des Wildtyps *Glra1^{+/+}* und der heterozygoten *Glra1^{+ / sh}* Tiere zu erkennen.

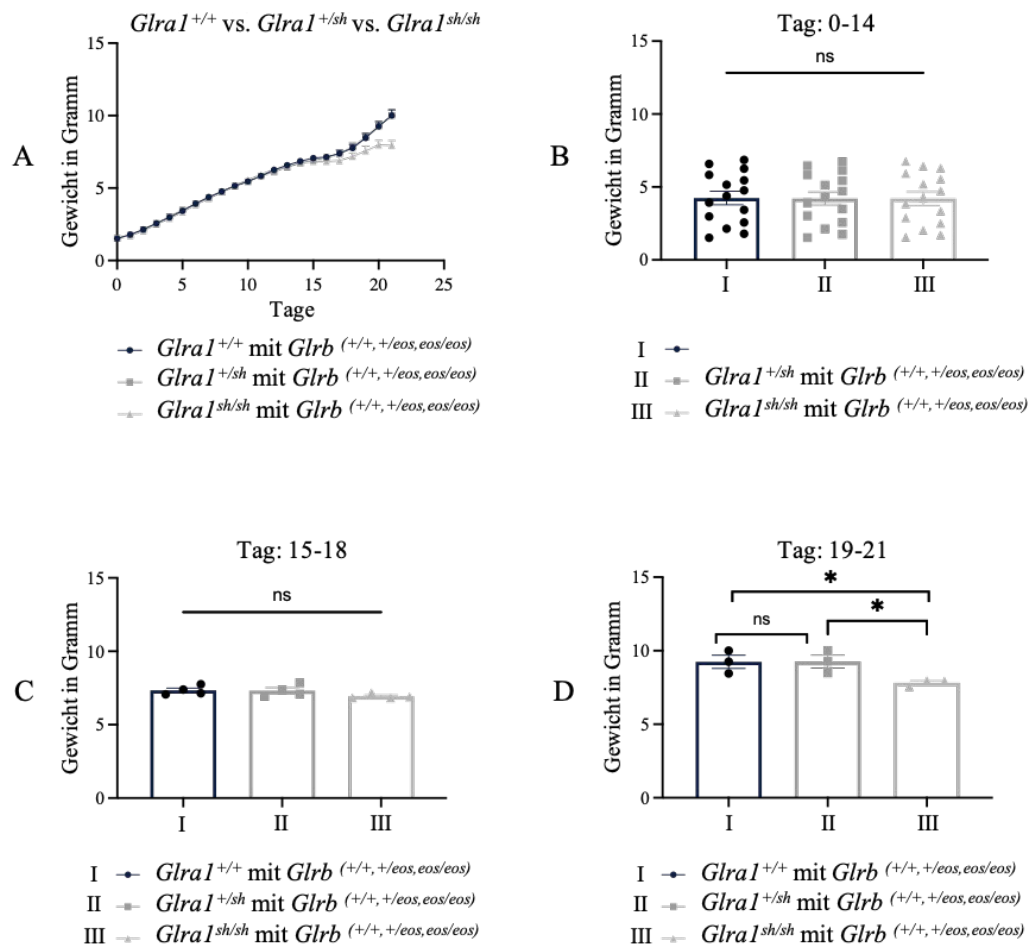


Abbildung 12 Die *Glra1^{sh}*-Genotypen der Linie *Glrb^{eos} x Glra1^{sh}* weichen im Gewicht voneinander ab
 In A sind die sich in Abhängigkeit der Zeit verändernden Körpergewichte der Tiere verschiedener *Glra1^{sh}*-Genotypen zueinander dargestellt (Mittelwerte mit SEM). Die y-Achse gibt das Gewicht in Gramm an, wohingegen die x-Achse den zeitlichen Verlauf in Tagen abbildet (Tag 0-21). vs. = versus
 Für einen eingeschränkten zeitlichen Verlauf zeigen die Balkendiagramme B-D den statistischen Vergleich (ungepaarter *t-Test*) der einzelnen Gruppen I, II und III zueinander. I: *Glra1^{+/+} mit Glrb^{eos} (+ / +, + / eos, eos / eos)*; II: *Glra1^{+ / sh} mit Glrb^{eos} (+ / +, + / eos, eos / eos)*; III: *Glra1^{sh / sh} mit Glrb^{eos} (+ / +, + / eos, eos / eos)*. Abgebildet sind die jeweiligen Mittelwerte der Gewichte für den angegebenen Zeitraum mit Standardfehler.

ns = nicht signifikant, ns = $p \geq 0,05$; * $p < 0,05$

A: Tag 0-21; *Glra1^{+/+} vs. Glra1^{+ / sh} vs. Glra1^{sh / sh}* (inklusive der *Glrb^{eos}*-Varianten); Graphen

B: Tag 0-14; *Glra1^{+/+} vs. Glra1^{+ / sh} vs. Glra1^{sh / sh}* (inklusive der *Glrb^{eos}*-Varianten); Balken; Statistik

C: Tag 15-18; *Glra1^{+/+} vs. Glra1^{+ / sh} vs. Glra1^{sh / sh}* (inklusive der *Glrb^{eos}*-Varianten); Balken; Statistik

D: Tag 19-21; *Glra1^{+/+} vs. Glra1^{+ / sh} vs. Glra1^{sh / sh}* (inklusive der *Glrb^{eos}*-Varianten); Balken; Statistik

In den *Diagrammen B-D* (Abb. 12) wurden drei Zeitpunkte des *Glr1^{sh}*-Genotypen Vergleichs im Hinblick auf das Gewicht der Tiere in Form von Balken mit Mittelwerten und Standardfehlern dargestellt. Bei den ersten beiden Zeitpunkten (Abb. 12, B und C) zeigte sich keine statistische Signifikanz zwischen den *Glr1^{sh}*- Gruppen I, II und III. Ab Tag 19-21 ergab die statistische Auswertung mittels ungepaartem *t-Test* eine Signifikanz von $*p < 0,05$ zwischen *Glr1^{sh/sh}* und *Glr1^{+/+}* ($*p = 0,0394$) und ebenso zwischen *Glr1^{sh/sh}* und *Glr1^{+/sh}* ($*p = 0,0349$), während im Vergleich des Wildtyps zum Heterozygoten der errechnete p-Wert nicht signifikant war ($ns = p \geq 0,05$; $p = 0,9728$). Die statistische Auswertung ist im *Anhang Kapitel 8.5* aufgelistet.

Zusammenfassend kann ein Einfluss der mEos4b-Sequenz auf das Körpergewicht ausgeschlossen werden. Die Beobachtungen zum Auftreten des Phänotyps der *shaky* Maus und deren Gewichtsreduktion im zeitlichen Verlauf sind mit bereits zuvor erhobenen Daten vergleichbar (Schaefer, Berger et al. 2017) und schließen damit eine Veränderung des Phänotyps durch die mEos4b-Sequenz aus.

4.4 Kreuzung und Genotypisierung

Für die Zuordnung der Tiere im Wiegeversuch, die Verpaarung und Etablierung einer Stammbaumlinie sowie für weiterführende Experimente ist die Typisierung des Genotyps von Bedeutung. Dafür wurde die genomische DNA aus Mausbiopsien isoliert, in dem Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt und mittels der Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Bei den Genotypen der *Glr1^{sh}* Maus musste ein zusätzlicher Restriktionsverdau erfolgen (Kapitel 3.5.3).

Der Wildtyp der *Glr1^{eos}* Maus zeigte eine charakteristische Bande bei 404 bp (bp = Basenpaare), heterozygote Tiere zeigten zwei Banden bei 243 bp und 404 bp und homozygote Tiere eine Bande bei 243 bp (Abb. 13). Im Unterschied dazu war bei den *Glr1^{sh}* Genotypen beim Wildtyp zwei Banden (88 bp, 95 bp), beim Heterozygoten drei (88 bp, 95 bp, 183 bp) und beim Homozygoten eine (183 bp) zu sehen. Dargestellt sind diese Banden in Beispielwürfen der Linien *Glr1^{eos}*, *Glr1^{sh}* sowie der Kreuzung *Glr1^{eos}* x *Glr1^{sh}* (Abb. 13). Ebenso ist das Kreuzungsschema der einzelnen Linien schematisch abgebildet. Bei den Linien *Glr1^{eos}* (202) und *Glr1^{sh}* (131) sind drei unterschiedliche Genotypen möglich, wohingegen bei der Kreuzung (204) diese Zahl auf neun steigt.

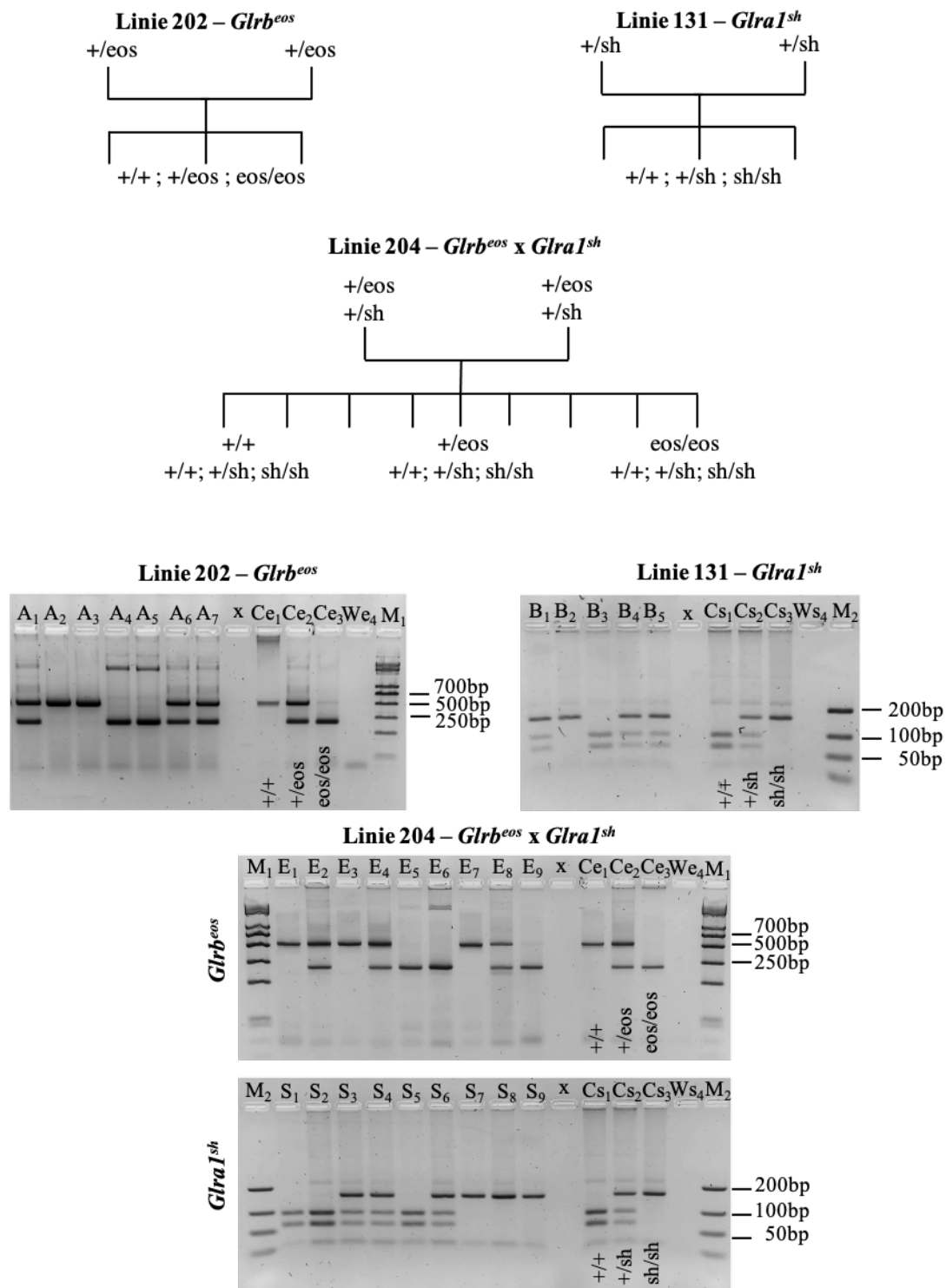


Abbildung 13 Kreuzungsschema und Genotyp Nachweis mittels PCR

M₁: Marker 1, M₂: Marker 2, We₄: „eos“-Wasserkontrolle, Ws₄: „shaky“-Wasserkontrolle, x: freigelassene Geltasche

Ce₁: +/+ -Kontrolle (404 bp), Ce₂: +/eos -Kontrolle (243/404 bp), Ce₃: eos/eos -Kontrolle (243 bp)

Cs₁: +/+ -Kontrolle (88/95 bp), Cs₂: +/sh -Kontrolle (88/95/183 bp), Cs₃: sh/sh -Kontrolle (183 bp)

A₁-A₇: Beispiele für 202-Wurf, B₁-B₅: Beispiele für 131-Wurf; E₁+S₁-E₉+S₉: Beispiele für 204-Wurf. Die Anzahl der Striche im Kreuzungsschema entspricht der Zahl der möglichen Genotypen, nicht der Wurfgröße. Linie 202 & 131: jeweils 3 mögliche Genotypen; Linie 204: 9 mögliche Genotypen

Zur gezielten Generierung der Genotypen $Glr^{eos/eos} \times Glra1^{+/+}$ und $Glr^{eos/eos} \times Glra1^{sh/sh}$ war zu beachten, dass Tiere mit $Glra1^{sh/sh}$ aufgrund ihrer kurzen Lebensdauer (3 bis maximal 6 Wochen) nicht zur Verpaarung zur Verfügung standen. Mit doppelt *eos*-transgenen Mäusen hingegen konnte dies erreicht werden.

Um die Möglichkeit der fluoreszenzbasierten Darstellung der β -Untereinheit in der Erforschung des heteromeren Glycin-Rezeptors im *shaky* Mausmodell zu nutzen, wurde eine Kreuzung der beiden Mauslinien Glr^{eos} und $Glra1^{sh}$ durchgeführt.

4.5 Verstärkung des β^{eos} -Signals

Die im Kapitel 4.2.2 angesprochene Problematik der Diffusität und Stärke des β^{eos} -Signals konnte mittels des Antikörpers anti-mEos-ATTO488 gelöst werden. Dieser Antikörper bindet an das fluoreszierende *Tag*, welches von der Glr^{eos} Maus endogen an dem N-Terminus der β -Untereinheit des Glycin-Rezeptors exprimiert wurde. Durch diesen Antikörper erschien das β^{eos} -Signal heller und punktförmiger.

In den folgenden *Abbildungen 14-17* ist die Testung dieses anti-mEos-ATTO488 Antikörpers mit anderen Antikörperkombinationen bei Rückenmarksneuronen mit dem Genotyp $Glr^{eos/eos}$ der Linie 202 Glr^{eos} zu sehen. Wurden die Antikörper Synaptophysin *rabbit* und Synapsin1/2 *chicken* mit diesem Antikörper kombiniert, konnte kein verbessertes β^{eos} -Signal festgestellt werden. In Verbindung mit MAP2 *mouse* trat eine Wechselwirkung mit dem anti-mEos-ATTO488 Antikörper auf. Bei den geprüften Verdünnungen dieses Antikörpers erschien 1:200 besser geeignet als 1:500.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt ist der heteromere Glycin-Rezeptor $\alpha1/\beta$ in der postsynaptischen Membran der Motoneurone im Rückenmark zu finden. Zur Identifikation dieses Rezeptors wurden in der *Abbildung 14* die GlyR- $\alpha1$ -Untereinheit mit dem spezifischen mAb2b Antikörper (rot) markiert, wohingegen die β^{eos} -Untereinheit durch den anti-mEos-ATTO488 Antikörper verstärkt und grün abgebildet wurde.

Eine Kolokalisation wird durch die Überlagerung in der Farbe Orange sichtbar und ist in dem vergrößerten Ausschnitt (Abb.14, 2) zu erkennen. Es sind nicht alle markierten β^{eos} -Untereinheiten mit $\alpha 1$ kolokalisiert. VGAT als Präsynapsenmarker kolokalisiert mit $\alpha 1$ (Abb.14, 3) und β^{eos} (Abb.14, 4). Dies zeigt eine Synapsenbildung zwischen einer präsynaptischen Membran eines inhibitorischen Interneurons (VGAT) und einer postsynaptischen Membran eines Motoneurons (heteromere GlyR $\alpha 1/\beta$).

In der *Abbildung 15* wurden die gleichen Marker zur Darstellung der GlyR- $\alpha 1$ - und β^{eos} -Untereinheit gewählt. Zusätzlich wurde Gephyrin gefärbt, welches ein Strukturprotein der Postsynapse darstellt und über die β -Untereinheit mit dem GlyR $\alpha 1/\beta$ vernetzt ist. So zeigt der ausgewählte Dendrit eines Motoneurons einen fast identischen Verlauf zwischen β^{eos} und Gephyrin, während $\alpha 1$ zwar zu weiten Teilen stark übereinstimmt, jedoch auch ohne die beiden Marker alleine erscheint.

Der GlyR- α mAb4a verwendete Antikörper zeigt in der *Abbildung 16* ein stärkeres Signal im Vergleich zu GlyR- $\alpha 1$ (Abb. 14, 15), was insbesondere in der schwarz-weißen Darstellung sichtbar wird. Der mAb4a Antikörper markiert sowohl neonatale als auch adulte α -Isoformen und könnte somit zusätzlich homomere GlyR $\alpha 2$ markieren. Diese GlyR-Isoform stellt den embryonal vorherrschenden extrasynaptischen Rezeptorkomplex dar und wechselt fast vollständig zur adulten Form des heteromeren GlyR $\alpha 1/\beta$ bis zum 20. postnatalen Tag (Lynch 2004). Eine Erfassung von noch vorhandenen GlyR $\alpha 2$ kann daher nicht ausgeschlossen werden. Da es sich um eine Mischkultur aus Rückenmarksneuronen handelt, wäre auch eine Detektion des GlyR $\alpha 3/\beta$ denkbar, welcher im dorsalen Horn des Rückenmarks bei der Schmerzsensorik integriert ist.

Daneben zeigte die Kombination des *eos* Antikörpers mit dem mAb4a Antikörper (Abb. 16) deutlich mehr Kolokalisationen als mit dem GlyR- $\alpha 1$ spezifischen Antikörper (Abb. 14,15). Da bekannt ist, dass der kommerzielle mAb4a Antikörper auch zum Teil GlyR- β erkennt (Weltzien, Puller et al. 2012), zumindest mit niedriger Affinität, erscheint diese Kolokalisation plausibel.

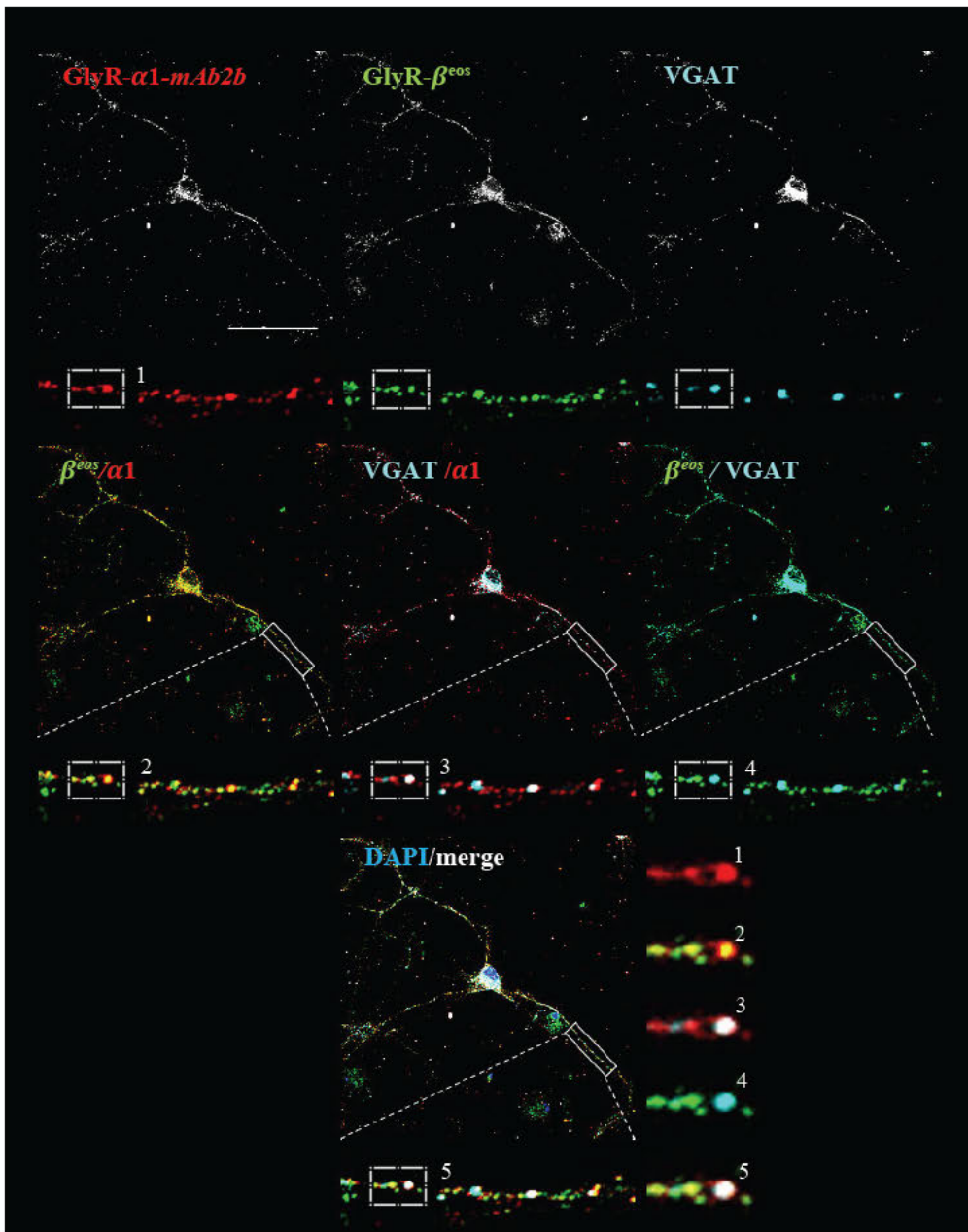


Abbildung 14 Expression von *Glr^b^{eos/eos}* in Rückenmarksneuronen – (Teil 1)

Die Rückenmarksneurone des Genotyps *Glr^b^{eos/eos}* (Linie 202) wurden am 17. Tag nach Präparation gefärbt. Die GlyR- α 1-Untereinheit wurde mittels mAb2b rabbit und die β^{eos} - Untereinheit mit anti-mEos-ATTO488 detektiert. Die Präsynapse wurde mit VGAT *guinea pig* markiert. Die Zellkernmarkierung (blau) erfolgte mit DAPI.

Einheit des Maßstabbalkens: 50 μ m

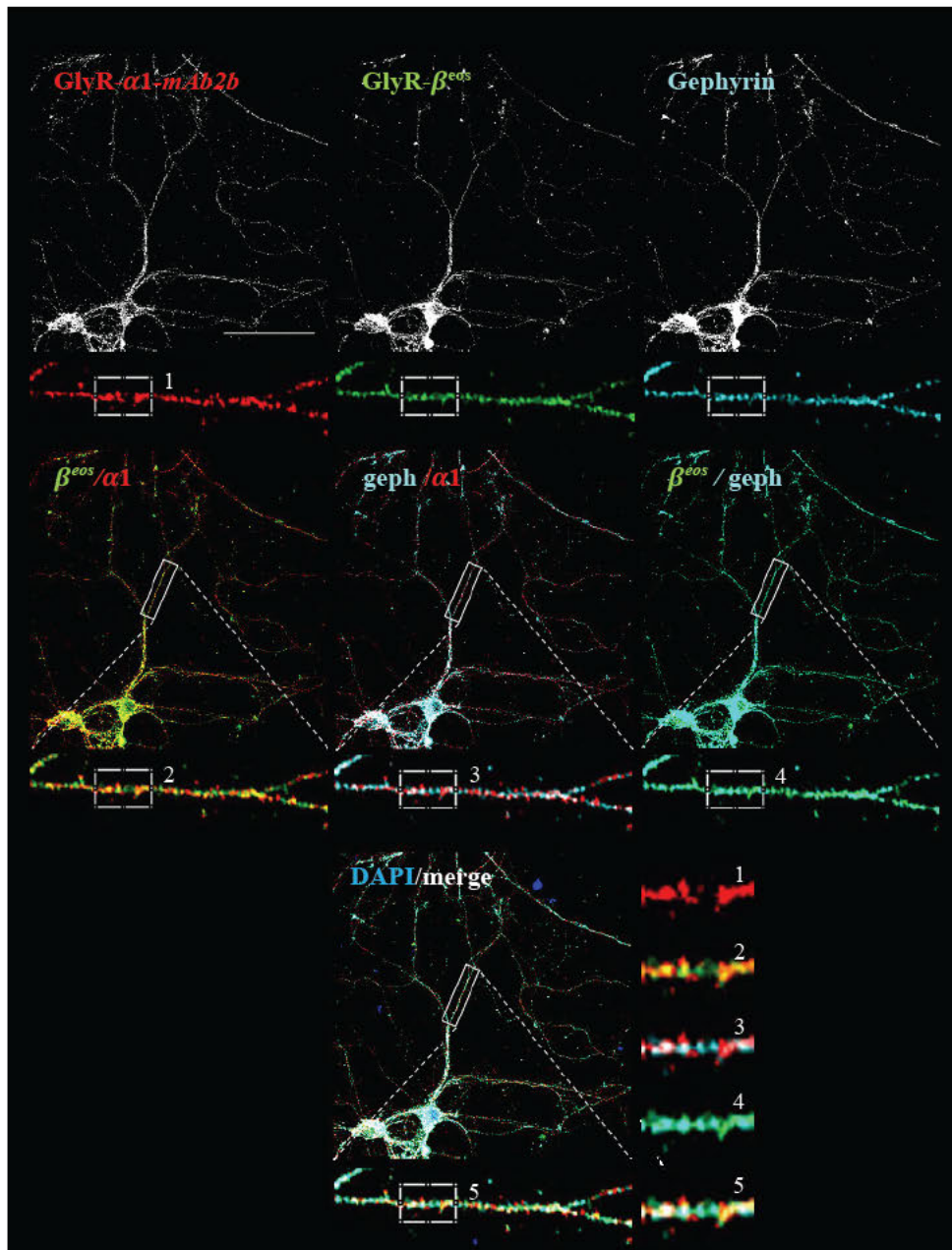


Abbildung 15 Expression von *Glr^{β^{eos}/eos}* in Rückenmarksneuronen – (Teil 2)

Die Rückenmarksneurone des Genotyps *Glr^{β^{eos}/eos}* (Linie 202) wurden am 17. Tag nach Präparation gefärbt. Die GlyR- α 1-Untereinheit wurde mittels mAb2b *rabbit* und die β^{eos} - Untereinheit mit anti-mEos-ATTO488 detektiert. Die Postsynapse wurde mit Gephyrin *mouse* markiert. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI markiert.
Einheit des Maßstabbalkens: 50 μ m

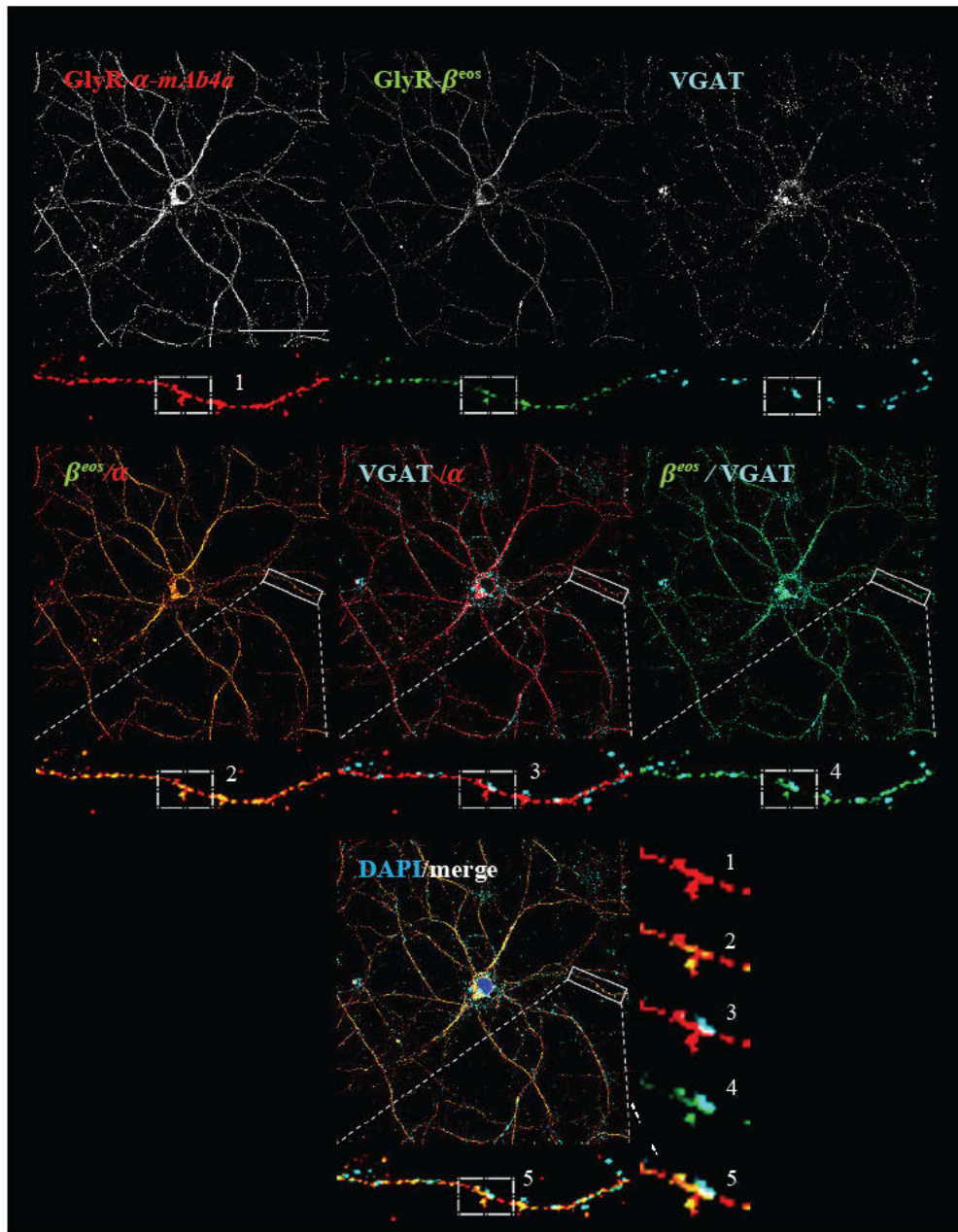


Abbildung 16 Expression von *Glr^β eos/eos* in Rückenmarksneuronen – (Teil 3)

Die Rückenmarksneurone des Genotyps *Glr^β eos/eos* (Linie 202) wurden am 17. Tag nach Präparation gefärbt. Die GlyR- α -Untereinheiten wurden mittels mA4a *mouse* detektiert, während die β^{eos} - Untereinheit mit anti-mEos-ATTO488 erfasst wurde. Die Präsynapse wurde mit VGAT *rabbit* markiert. Die Zellkernmarkierung (blau) erfolgte mit DAPI.

Einheit des Maßstabbalkens: 50 μm

In der Kombination mit dem anti-MAP2 Antikörper *mouse* wurde eine Wechselwirkung mit dem anti-mEos-ATTO488 Antikörper beobachtet und deshalb nicht in die *Abbildung 17* miteinbezogen.

Das Mikrotubuli-Assoziierte-Protein-2 markiert das Zytoskelett der Neurone. In der *Abbildung 17* ist die Lokalisation von präsynaptischen Membranen (VGAT) an das postsynaptische Motoneuron veranschaulicht.

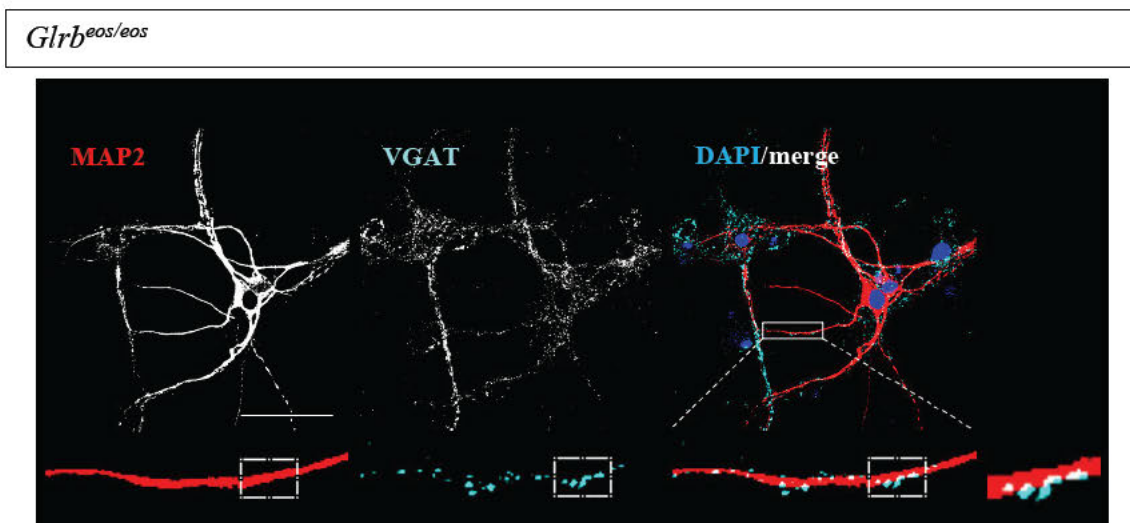


Abbildung 17 Expression von Markerproteinen in Rückenmarksneuronen *Glr^b^{eos/eos}* – (Teil 4)
Die Rückenmarksneurone des Genotyps *Glr^b^{eos/eos}* (Linie 202) wurden am 17. Tag nach Präparation gefärbt. Das Zytoskelett der Neurone wurde mit MAP2 *mouse* markiert. Als präsynaptischer Marker wurde VGAT *rabbit* gewählt. Die Zellkernfärbung (blau) erfolgte mit DAPI. Es trat eine Wechselwirkung zwischen den Antikörpern anti-mEos-ATTO488 und MAP2 *mouse* auf. Das β^{eos} -Signal ist daher in dieser Abbildung nicht gezeigt. Einheit des Maßstabalkens: 50 μm

4.6 Quantitative Expression von Markerproteinen der glycinergen Synapse im *shaky* Mausmodell

Zu Beginn der Experimente bezüglich des heteromeren Glycin-Rezeptors $\alpha 1/\beta$ in Motoneuronen der Linie 204 *Glr^b^{eos} x Glra1^{sh}* sollte das bereits etablierte *shaky* Mausmodell weiter validiert werden. In der Arbeitsgruppe zuvor erhobene Daten zeigten, dass die Oberflächenexpression bei *Glra1^{sh/sh}* im Vergleich zu *Glra1^{+/+}* für GlyR- $\alpha 1$ vermehrt und für Gephyrin vermindert ist. Allerdings wurden die Kolo-kalisationen von GlyR- $\alpha 1$ und Gephyrin sowie GlyR- $\alpha 1$ und VGAT/Synapsin nur anhand von Mikroskopie-Aufnahmen bei *Glra1^{sh/sh}* als reduziert interpretiert, jedoch nicht quantitativ

ausgewertet (Schaefer, Berger et al. 2017). Somit sollte die Oberflächenexpression von GlyR- α 1, Synapsin, Gephyrin im *shaky* Mausmodell statistisch untersucht werden.

Dafür wurden Rückenmarksneurone der Genotypen *Glr1^{+/+}* und *Glr1^{sh/sh}* der *shaky* Linie 131 und anschließend der Hybridlinie 204 *Glr^{eos} x Glr1^{sh}* am 16. Tag nach Präparation gefärbt. Die konfokalen Aufnahmen der Motoneurone wurden anschließend mit dem Programm *ImageJ* erfasst und mit *GraphPad Prism* statistisch ausgewertet. In *ImageJ* wurde eine bestimmten Dendritenlänge markiert und als Schablone über die verschiedenen Einzelkanäle und Kolokalisationen gelegt. So konnte die Aussage getroffen werden, wie viele Proteine auf dieser Dendritenlänge (pro 100 micron) exprimiert wurden. Im Ergebnisteil wird die Auswertung der mittelstarken Dendriten näher erläutert. Die Einteilung der Dendriten mit einem Beispiel bezüglich der GlyR- α 1 Detektion sowie weitere Auswertungen sind im *Anhang Kapitel 8.8, 8.9* sowie *8.10* zu finden.

Mittels ungepaartem *t-Test* wurden die Mittelwerte der gemessenen Dichte pro 100 micron erfasst. Waren die Daten nicht normal verteilt, wurde der *Mann-Whitney-Test* (MW-Test) angewendet. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Dabei entsprechen die einzelnen Punkte im Diagramm den gemessenen Einzelwerten. Die errechneten Mittelwerte, Standardfehler und p-Werte sind im *Anhang Kapitel 8.8* aufgelistet. Weiterführende Informationen zur Statistik sind in *Kapitel 3.10* zu finden.

Die Immunzytochemie erfolgte für *Glr1^{sh}* einmal mit je zwei Tieren des entsprechenden Genotyps für den Wildtyp und homozygote *shaky* Tiere (131, n = 2), während für *Glr^{eos} x Glr1^{sh}* zwei Versuchsreihen durchlaufen wurden mit insgesamt drei Tieren der Wildtypgruppe und der homozygoten Tiere (204 mit Gephyrin, n = 3). Davon ausgenommen war die Färbereihe mit Synapsin, welche nur einmal mit Neuronen der Hybridlinie 204 mit je einem Tier pro Genotyp gefärbt wurde (204 mit Synapsin, n = 1) (*Anhang, Kapitel 8.7*).

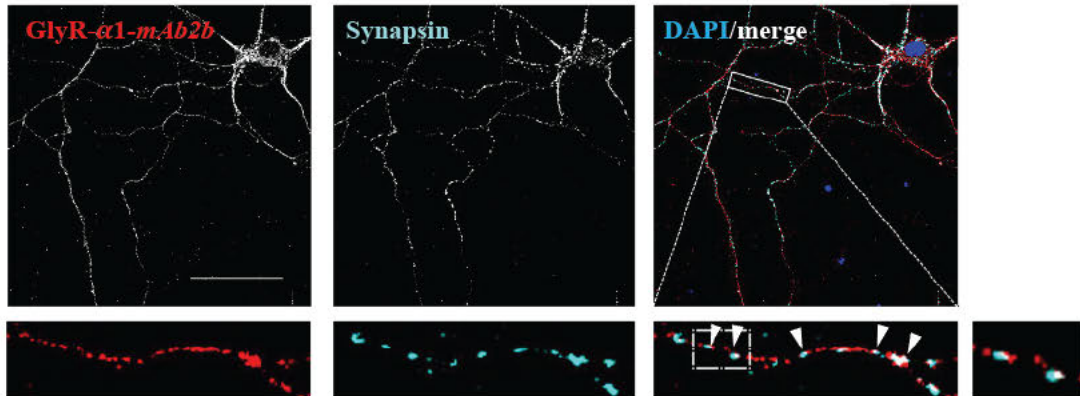
In den *Abbildungen 18-24* wurden folgende Antikörper verwendet. Die GlyR- α 1-Untereinheit wurde mit mAb2b *rabbit* und Cy3 *goat-anti-rabbit* detektiert und in der Farbe Rot abgebildet. Synapsin 1/2 *chicken* erkennt die Synapsine 1 a/b und 2 a/b, welche peripher synaptische Vesikelproteine darstellen und damit als Präsynapsenmarker geeignet ist und vom sekundären Antikörper Alexa Fluor 647 *donkey-anti-chicken* erkannt wurde. Der postsynaptische GlyR α 1/ β ist über die β -Untereinheit an Gephyrin gekoppelt. Dieses Strukturprotein wurde mit einem anti-Gephyrin Antikörper (*mouse*) markiert und mit Cy5 *goat-anti-mouse* Antikörper sichtbar gemacht. In der Hybridlinie *Glrb^{eos} x Glra1^{sh}* (204) war die Darstellung der β^{eos} -Untereinheit möglich, welche durch den anti-mEos-ATTO488 Antikörper verstärkt wurde (Kapitel 4.5)

4.6.1 Linie 131 *Glra1^{sh}*

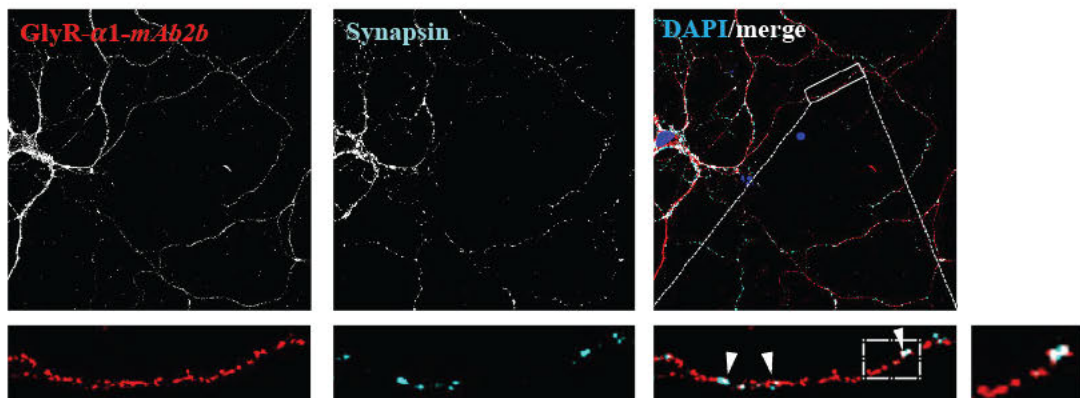
Bereits bekannte Daten zeigen, dass die funktionelle Rezeptorfunktion von synaptischen heteromeren GlyR α 1/ β im *shaky* Mausmodell eingeschränkt ist (Schaefer, Berger et al. 2017). Um die synaptische Architektur an der Oberfläche von Motoneuronen in diesem Mausmodell weiter zu erforschen, wurde die Expression der Marker mAb2b für GlyR- α 1, Synapsin und deren Kolokalisationen untersucht. Dabei entsprach die mittelstarke Dendritenzahl (DZ) 22 für den Wildtyp (WT) und 19 für den homozygot (HZ) kranken Genotyp.

Die Quantifizierung der Einzelexpressionen ergab im Vergleich zum Wildtyp bei *Glra1^{sh/sh}* einen signifikant gesteigerten Wert für GlyR- α 1 (α 1- α 1; *p = 0,0420) sowie eine signifikant verringerte Erfassung von Synapsin (synap – synap; **p = 0,0097) (Abb. 18, C). GlyR- α 1 und Synapsin sind ebenso bei *Glra1^{sh/sh}* signifikant weniger häufig kolokalisiert als beim Wildtyp (synap - α 1; **p = 0,0064). Die konfokalen Aufnahmen der *Abbildung 18 A und B* zeigen dies beispielhaft. So ist für die GlyR- α 1 (rot) Expression nur eine leichte Mehrzahl bei *Glra1^{sh/sh}* zu erkennen, wobei Synapsin (cyan) deutlich schwächer im Vergleich zum Wildtyp erscheint. Die verminderte Kolokalisation der beiden Marker bei *Glra1^{sh/sh}* ist in den vergrößerten Dendriten mit weißen Pfeilen markiert.

A: *Gla1*^{+/+}



B: *Gla1*^{sh/sh}



C: Quantifizierung *Gla1*^{+/+} vs. *Gla1*^{sh/sh}

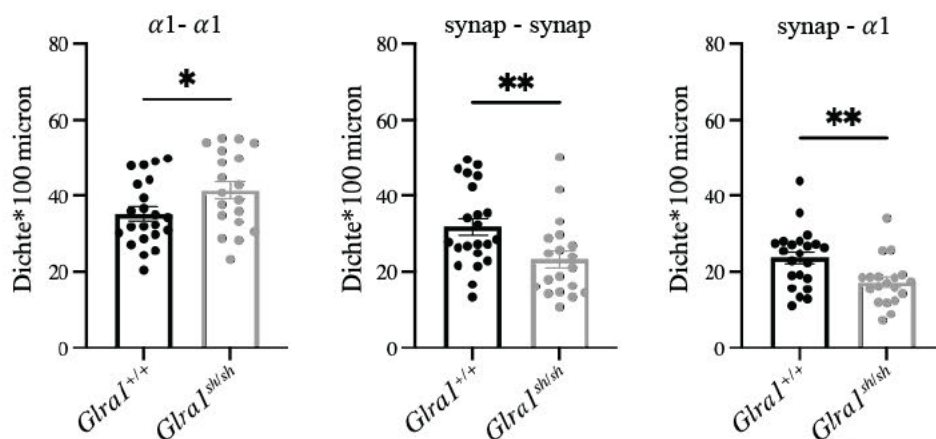


Abbildung 18 Synapsin ist in homozygoten *shaky* Neuronen der Linie *Gla1*^{sh} vermindert

A, B: Die Rückenmarksneurone der Linie 131 mit den Genotypen *Gla1*^{+/+} (A) und *Gla1*^{sh/sh} (B) wurden am 16. Tag nach Präparation ausgewertet (n = 2). Die GlyR- α 1-Untereinheit wurde mit mAb2b rabbit, die Präsynapse mit Synapsin 1/2 chicken und der Zellkern (blau) mit DAPI markiert. Einheit des Maßstabbalkens: 50 μ m; C: Abgebildet sind die jeweiligen Mittelwerte der gemessenen Dichten pro 100 micron (*t*-Test/*MW*-Test) mit dem Standardfehler (x-Achse: Genotypen; y-Achse: Dichte * 100 micron). Die p-Werte sind wie folgt zu verstehen: *p < 0,05; **p < 0,01. DZ^{WT}: 22; DZ^{HZ}: 19; DZ = Dendritenzahl; vs. = versus

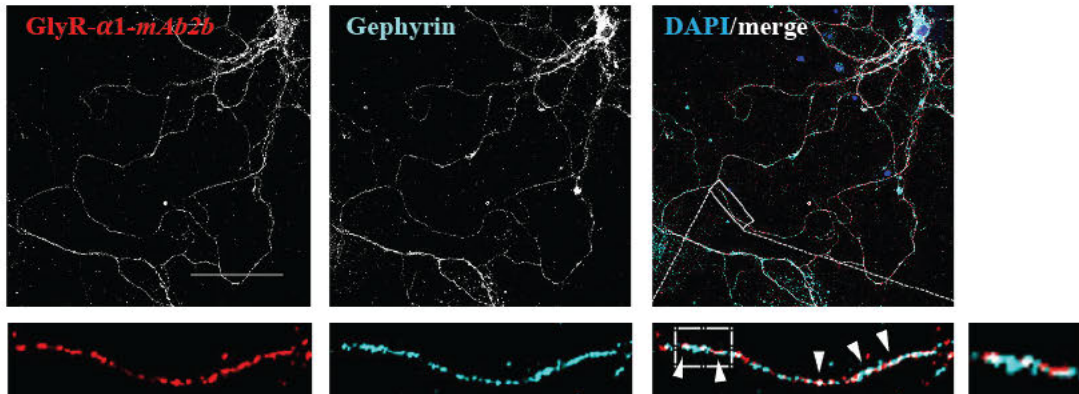
Eine reduzierte synaptische Kollokalisierung von GlyR- α 1 und Synapsin ließ vermuten, dass ebenso eine verringerte Oberflächenexpression des heteromeren postsynaptischen GlyR α 1/ β bei *Glr1^{sh/sh}* eine Folge der *shaky* Mutation sein könnte. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden die Einzelexpressionen der Marker mAb2b für GlyR- α 1, Gephyrin und deren Kollokalisierungen in verschiedenen Genotypen der *shaky* Linie verglichen (Abb. 19). Zur Quantifizierung wurde bei *Glr1^{+/+}* 22 und bei *Glr1^{sh/sh}* 19 mittelstarke Dendriten insgesamt ausgewertet.

Die Datenanalyse für *Glr1^{sh/sh}* zeigte eine leicht erhöhte GlyR- α 1 Einzelexpression, allerdings ohne statistische Signifikanz (α 1- α 1; $p = 0,0717$). Daneben ist eine deutlich verringerte Gephyrin Expression zu beobachten (geph – geph; *** $p = 0,0001$) und ebenso eine signifikant reduzierte Kollokalisierung zwischen GlyR- α 1 und Gephyrin (geph - α 1; ** $p = 0,0015$) im homozygot kranken *shaky* Tier im Vergleich zum Wildtypen.

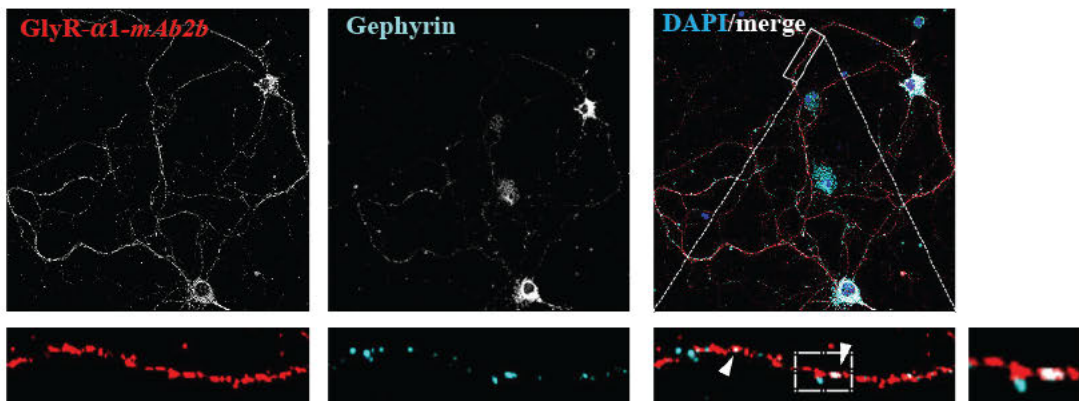
So zeigen auch die Aufnahmen in *Abbildung 19 A* und *B*, dass der Vergleich für GlyR- α 1 eher weniger deutlich zu erkennen ist, wohingegen Gephyrin insbesondere in der schwarz-weißen Darstellung beim Homozygoten erheblich schwächer erscheint. Zudem zeigt die Überlagerung der Kanäle (merge) bedeutend weniger Kollokalisierungen bei *Glr1^{sh/sh}* und somit entsteht auch das Bild eines vermehrt rot scheinenden Dendriten gegenüber *Glr1^{+/+}*. Neben den mittelstarken wurden auch die Daten aller Dendriten (DZ^{WT}: 63; DZ^{HZ}: 64) für diese Färbung statistisch ausgewertet, welche ein sehr ähnliches Muster zeigen und beispielsweise für Gephyrin stark vermindert in der *shaky* Mausmutante (**** $p < 0,0001$) errechnet wurden (Anhang, Kapitel 8.8, 8.10).

Zusammenfassend zeigt sich im Vergleich zwischen dem homozygot kranken *shaky* Tier und dem Wildtyp Kontrolltier für GlyR- α 1 eine erhöhte Oberflächenexpression bei *Glr1^{sh/sh}*. Zudem wurde in der *Glr1^{sh/sh}* Maus eine signifikant stark verminderte Expression von Synapsin und Gephyrin detektiert. Daraus resultierend wurden auch signifikant verringerte Kollokalisierungen für Synapsin/ α 1 und Gephyrin/ α 1 im homozygoten *shaky* Tier erfasst. Dies stützt die Vermutung, dass in der *Glr1^{sh/sh}* Maus weniger synaptische GlyR α 1/ β als im Wildtyp Kontrolltier an der postsynaptischen Membran lokalisiert sind.

A: *Gla1*^{+/+}



B: *Gla1*^{sh/sh}



C: Quantifizierung *Gla1*^{+/+} vs. *Gla1*^{sh/sh}

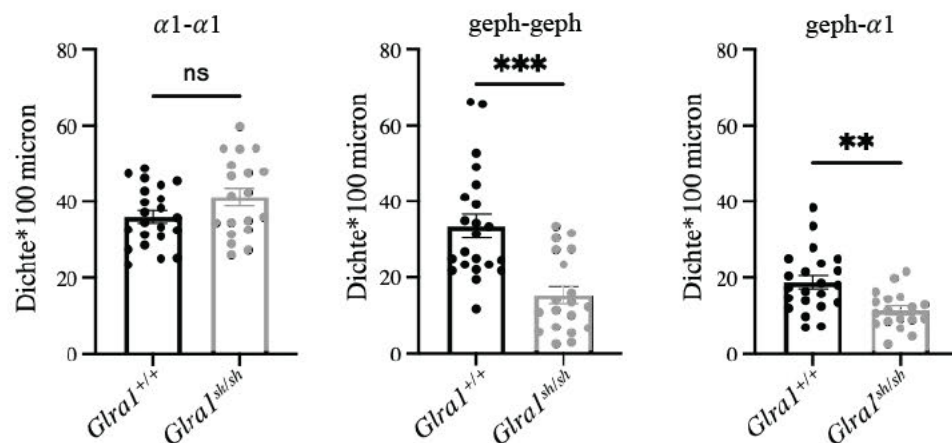


Abbildung 19 Gephyrin ist in homozygoten *shaky* Neuronen der Linie *Gla1*^{sh} stark verringert

A, B: Die Rückenmarksneurone der Linie 131 mit den Genotypen *Gla1*^{+/+} (A) und *Gla1*^{sh/sh} (B) wurden am 16. Tag nach Präparation gefärbt (n = 2). Die GlyR-α1-Untereinheit wurde mit mAb2b rabbit, die Postsynapse mit Gephyrin mouse und der Zellkern mit DAPI (blau) detektiert. Einheit des Maßstabalkens: 50 μm; C: Abgebildet sind die jeweiligen Mittelwerte der gemessenen Dichten pro 100 micron (*t*-Test/*MW*-Test) mit dem Standardfehler (x-Achse: Genotypen; y-Achse: Dichte * 100 micron). Die p-Werte sind wie folgt: ns = p ≥ 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001. DZ^{WT}: 22; DZ^{HZ}: 19; DZ = Dendritenzahl; vs. = versus; ns = nicht signifikant

4.6.2 Linie 204 *Glrbeos* x *Glrash*

Nachfolgend werden *Glrash* mit *Glrbeos* x *Glrash* verglichen und um Daten zur Beteiligung der β -Untereinheit des GlyR $\alpha 1/\beta$ ergänzt.

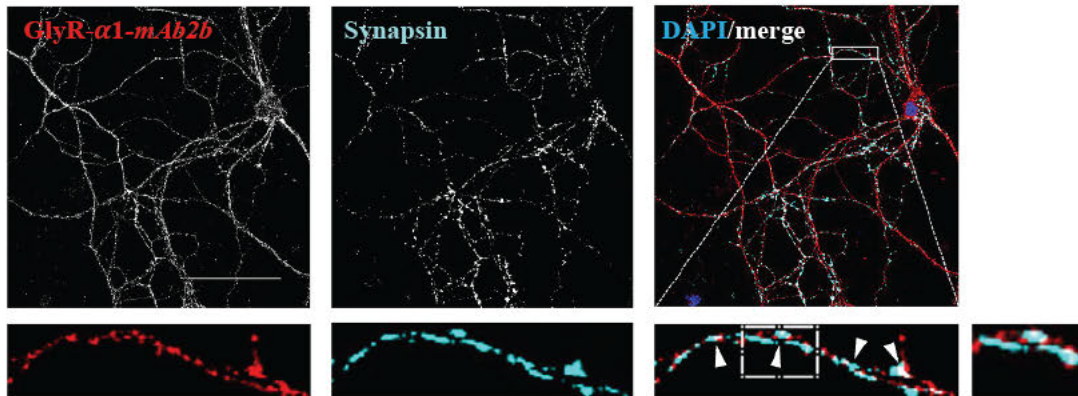
Hiernach wurde zuerst in dieser Hybridmauslinie die Expression von GlyR- $\alpha 1$, Synapsin und deren Kolokalisationen verglichen (Abb. 20). Eine Auswertung hinsichtlich der β -Untereinheit war auf Grund der Wechselwirkungen der Antikörper allerdings nicht möglich (Kapitel 4.5). Die zur Auswertung herangezogene mittelstarke Dendritenzahl entsprach 28 für den Wildtyp und 14 für die homozygot kranken Tiere.

Dabei wurde für die Einzelexpression bezüglich GlyR- $\alpha 1$ bei *Glrbeos/eos* x *Glrash/sh* ein größerer Mittelwert im Vergleich zum Wildtyp ermittelt, allerdings ohne statistische Signifikanz ($\alpha 1$ - $\alpha 1$; $p = 0,4140$). Die Datenanalyse betreffend Synapsin zeigte, dass beim Homozygoten signifikant weniger Synapsin exprimiert wurde (synap – synap; ** $p = 0,0012$). Als Folge der geringeren Synapsin Expression war auch die Kolokalisation von GlyR- $\alpha 1$ und Synapsin bei *Glrbeos/eos* x *Glrash/sh* verringert (synap - $\alpha 1$; * $p = 0,0492$).

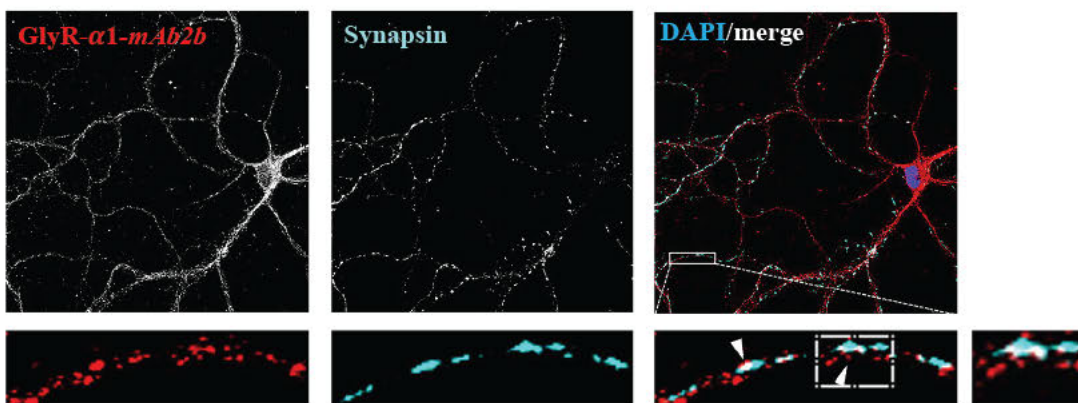
Beim Abgleich mit den Aufnahmen in *Abbildung 20 A* und *B* ist im vergrößerten Dendriten ein Unterschied bei GlyR- $\alpha 1$ (rot) weniger erkennbar, wohingegen mehr Synapsin (cyan) beim Wildtyp deutlich wird. Auch die Kolokalisation (weiß) der beiden Proteine ist beim Wildtyp häufiger detektiert als beim Homozygoten.

Folglich kann beim Vergleich der Daten der *shaky* Mauslinie 131 *Glrash* und der Hybridlinie 204 *Glrbeos* x *Glrash* mit markiertem β^{eos} -Protein die Oberflächenexpression im homozygot kranken Tier für GlyR- $\alpha 1$ vermehrt und für Synapsin signifikant verringert bestätigt werden. Ebenso wurde bei beiden Linien, *Glrash* und *Glrbeos* x *Glrash*, die Kolokalisation von GlyR- $\alpha 1$ und Synapsin signifikant weniger häufig im homozygot kranken Tier im Vergleich zum Wildtyp Kontrolltier detektiert.

A: $Glr^{eos/eos} \times Glra1^{+/+}$



B: $Glr^{eos/eos} \times Glra1^{sh/sh}$



C: Quantifizierung $Glr^{eos/eos} \times Glra1^{+/+}$ vs. $Glr^{eos/eos} \times Glra1^{sh/sh}$

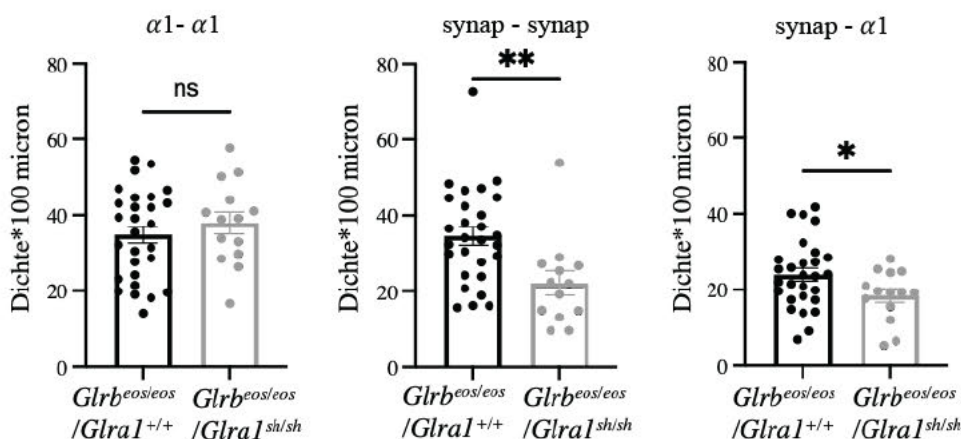


Abbildung 20 Verminderte Expression von Synapsin in *shaky* Tieren der Hybridlinie $Glr^{eos} \times Glra1^{sh}$
A, B: Die Rückenmarksneurone der Linie 204 mit den Genotypen $Glr^{eos/eos} \times Glra1^{+/+}$ (A) und $Glr^{eos/eos} \times Glra1^{sh/sh}$ (B) wurden am 16. Tag nach Präparation gefärbt (n = 1). Die GlyR- $\alpha 1$ -Untereinheit wurde mit mAb2b *rabbit*, die Präsynapse mit Synapsin 1/2 *chicken* und der Zellkern (blau) mit DAPI detektiert. Einheit des Maßstabbalkens: 50 μm ; **C:** Abgebildet sind die jeweiligen Mittelwerte der gemessenen Dichten pro 100 micron (*t-Test/MW-Test*) mit dem Standardfehler (x-Achse: Genotypen; y-Achse: Dichte * 100 micron). Die p-Werte (*t-Test/MW-Test*) sind wie folgt: ns = $p \geq 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. DZ^{WT} : 28; DZ^{HZ} : 14; DZ = Dendritenzahl; vs. = versus; ns = nicht signifikant

Anschließend erfolgte die Auswertung für das postsynaptische Strukturprotein Gephyrin sowie dessen Kolokalisation mit den GlyR-Untereinheiten $\alpha 1$ und β^{eos} und somit die Untersuchung des heteromeren GlyR $\alpha 1/\beta$ in Motoneuronen der Linie 204 *Glr^{b^{eos}}* \times *Glr^{a1^{sh}}*.

Zuerst werden die konfokalen Aufnahmen der Genotypen zueinander betrachtet (Abb. 21-22). Bei *Glr^{b^{eos/eos}}* \times *Glr^{a1^{+/+}}* (Abb. 21) zeigen die schwarz-weißen Darstellungen der Einzelkanäle eine recht homogene Fluoreszenzintensität, während bei *Glr^{b^{eos/eos}}* \times *Glr^{a1^{sh/sh}}* (Abb. 22) β^{eos} und Gephyrin erheblich schwächer gegenüber $\alpha 1$ erscheinen. In beiden Abbildungen zeigt sich im überlagerten Bild, dass $\beta^{eos}/\alpha 1$ und Gephyrin/ $\alpha 1$ stark kongruent sind, während beim Homozygoten erneut eine verstärkte Expression der GlyR- $\alpha 1$ -Untereinheit und als Folge davon ebenso auf geringere Kolokalisationen von $\beta^{eos}/\alpha 1$ und Gephyrin/ $\alpha 1$ bestätigt wird. Bei den Dendriten Ausschnitten 2 und 3 sind beim Homozygoten die Kolokalisationen von $\beta^{eos}/\alpha 1$ (Abb. 22, 2) zu Gephyrin/ $\alpha 1$ (Abb. 22, 3) abweichend, während sie beim Wildtyp stark übereinstimmen (Abb. 21, 2/3).

Glrb^{eos/eos} x Glra1^{+/+}

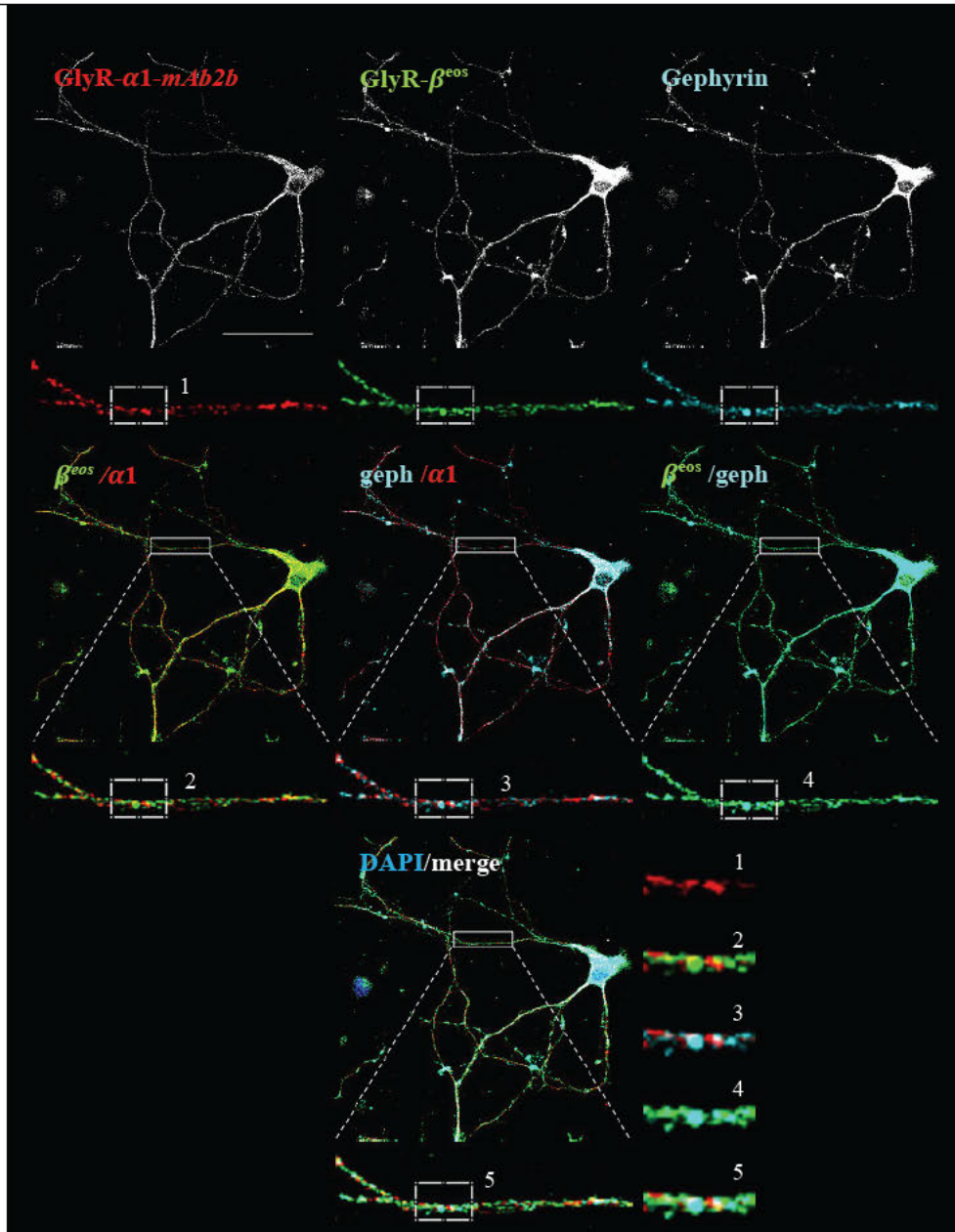


Abbildung 21 Expression der GlyR-Untereinheiten und Gephyrin in *Glrb^{eos} x Glra1^{+/+}* Tieren

Die Rückenmarksneurone des Genotyps *Glrb^{eos/eos} x Glra1^{+/+}* wurden am 16. Tag nach Präparation gefärbt. Die GlyR-α1-Untereinheit wurde mit mAb2b rabbit, β^{eos}-Untereinheit mit anti-mEos-ATTO488, die Postsynapse mit Gephyrin mouse und der Zellkern (blau) mit DAPI detektiert. Einheit des Maßstabalkens: 50 μm

Glr^{eos/eos} x Glra1^{sh/sh}

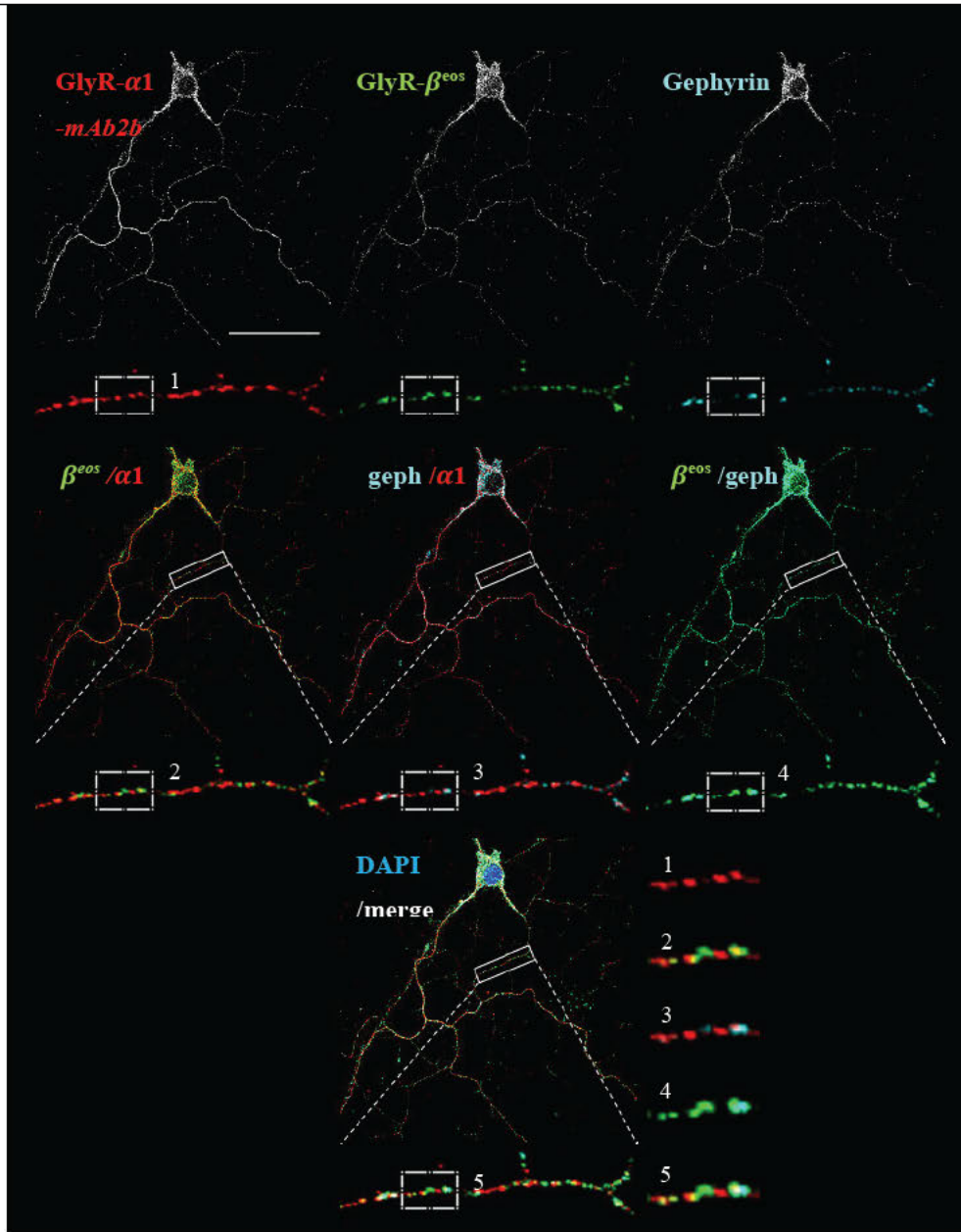


Abbildung 22 Expression der GlyR-Untereinheiten und Gephyrin in mutierten *shaky* Tieren der Hybridlinie *Glr^{eos/eos} x Glra1^{sh/sh}*

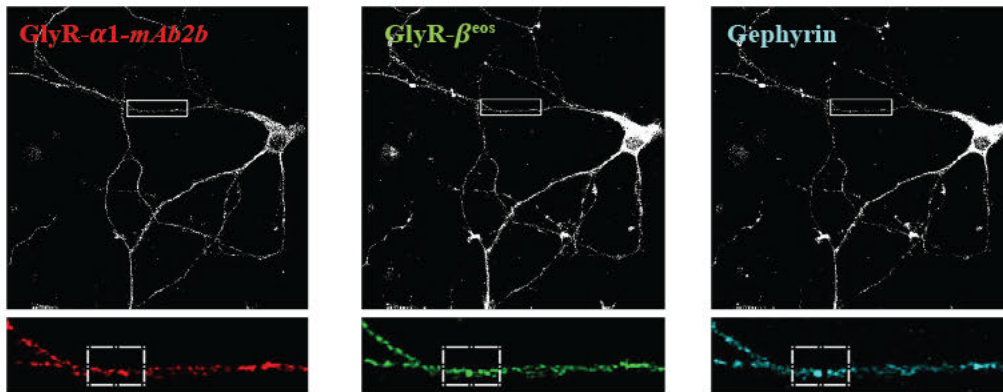
Die Rückenmarksneurone des Genotyps *Glr^{eos/eos} x Glra1^{sh/sh}* wurden am 16. Tag nach Präparation gefärbt. Die GlyR- α 1-Untereinheit wurde mit mAb2b *rabbit*, β^{eos} -Untereinheit mit anti-mEos-ATTO488, die Postsynapse mit Gephyrin *mouse* und der Zellkern (blau) mit DAPI detektiert. Einheit des Maßstabbalkens: 50 μ m

Für die statistische Auswertung wurden je 48 mittelstarke Dendriten pro Genotyp ausgewertet. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt mit insgesamt 3 Embryonen pro Genotyp. In den einzelnen Versuchen wurden die mittelstarken Dendriten getrennt statistisch ausgewertet und im *Anhang* (Kapitel 8.8, Tabelle 57-62) aufgelistet, in der nachfolgenden Erläuterung werden die zusammengeführten Daten der Einzelexperimente aufgeführt. Daneben wurde auch die Statistik aller gezählten Dendriten (DZ^{WT}: 97; DZ^{HZ}: 98) ausgewertet, welche ebenso im *Anhang* (Kapitel 8.8, Tabelle 63-66) zu finden ist.

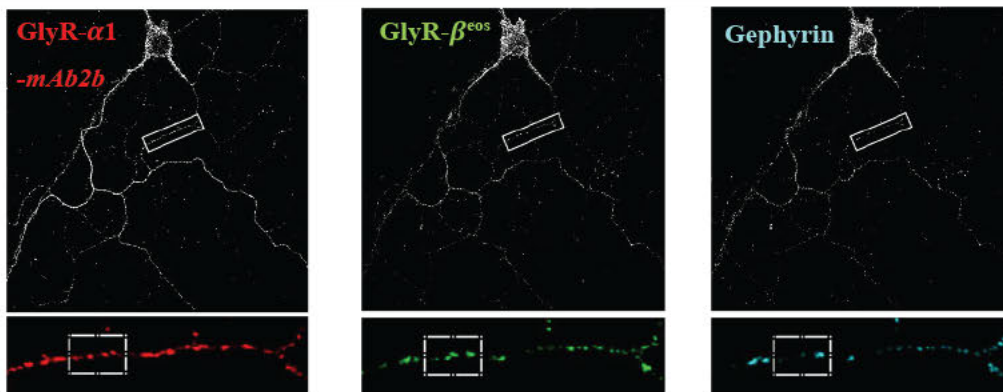
Die Quantifizierung der Expressionen für die GlyR- α 1-Untereinheit ergab bei *Glr^b^{eos/eos} x Glra1^{sh/sh}* im Vergleich zu *Glr^b^{eos/eos} x Glra1^{+/+}* eine signifikante Erhöhung für GlyR- α 1 (α 1- α 1; *p = 0,0341), während für die GlyR- β ^{eos}-Untereinheit (β ^{eos} - β ^{eos}; ****p < 0,0001) und das Verankerungsprotein Gephyrin (geph – geph; ****p < 0,0001) eine signifikant verringerte Expression im *shaky* Tier ermittelt wurde (Abb. 23). Diese Daten zeigen sich auch in den Abbildungen qualitativ und decken sich mit den vorherigen Studien (Kapitel 4.6.1, 4.6.2). Das gleiche Bild findet sich auch in der vergrößerten Darstellung eines Dendriten in der homozygoten *shaky* Maus mit verstärkter Expression von GlyR- α 1 (rot) und deutlich weniger β ^{eos} (grün) und Gephyrin (cyan) Expression (Abb. 22, A, B).

In der *Abbildung 24* sind die drei Kolokalisationen β ^{eos}/ α 1, Gephyrin/ α 1 und β ^{eos}/ Gephyrin aufgeführt. Interessanterweise sind für alle drei untersuchten Kolokalisationen zwischen β ^{eos}/ α 1, Gephyrin/ α 1 und β ^{eos}/ Gephyrin im homozygoten Tier die Werte deutlich erniedrigt im Vergleich zum Wildtyp Tier (β ^{eos}/ α 1, *p = 0,0386; geph/ α 1, ***p = 0,0002; β ^{eos}/ geph ****p < 0,0001). Jedoch ist der Unterschied bei β ^{eos}/ α 1 weniger stark als bei Gephyrin/ α 1 ausgeprägt. Dies ist ebenso sichtbar in den zuvor betrachteten Ausschnitten bei *Glr^b^{eos/eos} x Glra1^{sh/sh}* (Abb. 22, 2,3), wo eine höhere Kolokalisation zwischen β ^{eos}/ α 1 im Vergleich zu Gephyrin/ α 1 identifiziert wurde.

A: $Glrb^{eos/eos} \times Glra1^{+/+}$



B: $Glrb^{eos/eos} \times Glra1^{sh/sh}$



C: Quantifizierung $Glrb^{eos/eos} \times Glra1^{+/+}$ vs. $Glrb^{eos/eos} \times Glra1^{sh/sh}$

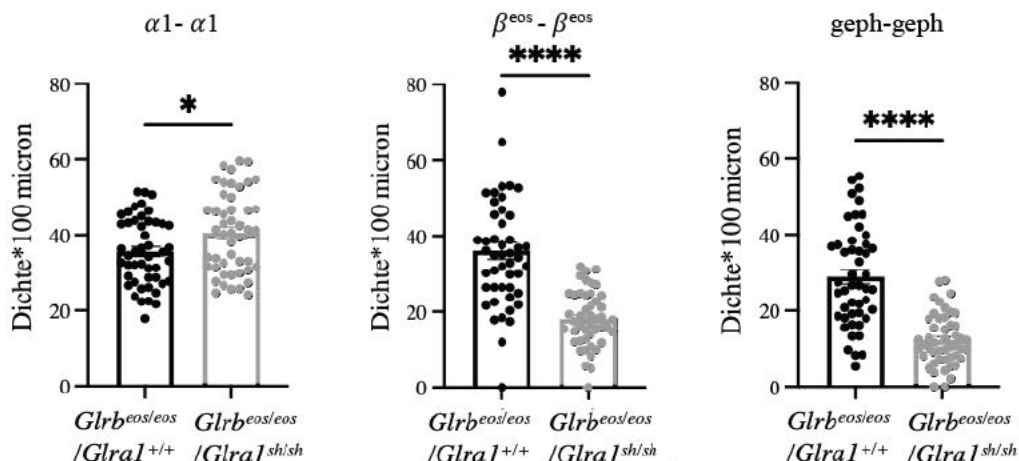
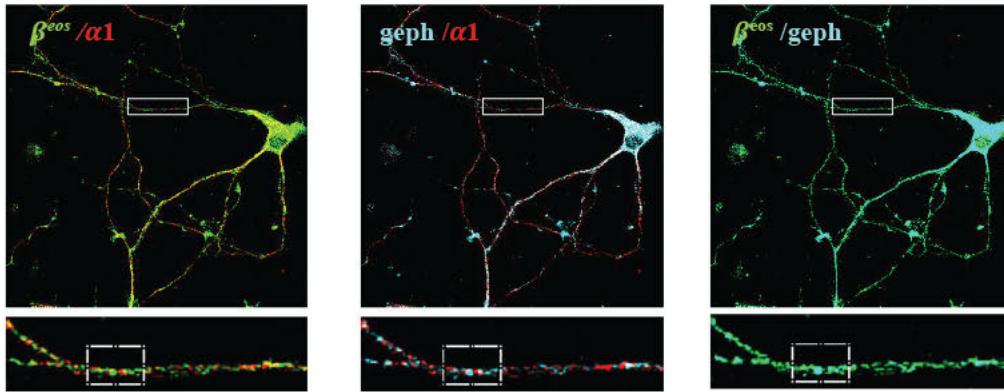


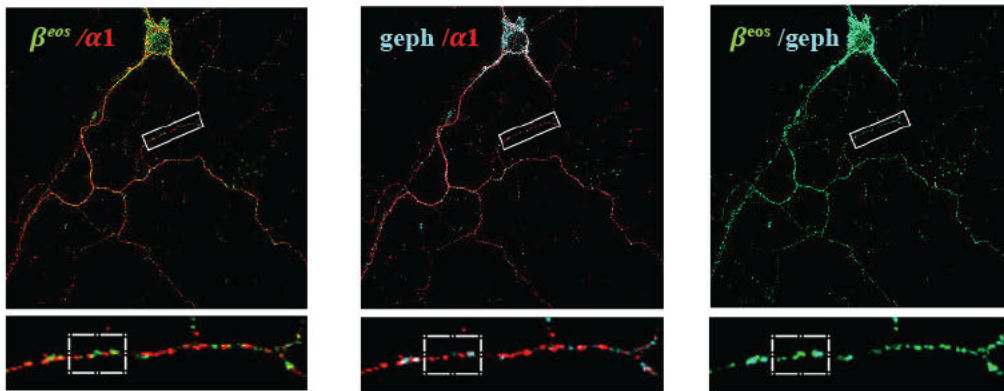
Abbildung 23 In *shaky* Tieren der Hybridlinie $Glrb^{eos} \times Glra1^{sh}$ ist GlyR- $\alpha1$ vermehrt und β^{eos} und Gephyrin vermindert exprimiert

A, B: Die Rückenmarksneurone der Genotypen $Glrb^{eos/eos} \times Glra1^{+/+}$ (A) und $Glrb^{eos/eos} \times Glra1^{sh/sh}$ (B) wurden am 16. Tag nach Präparation gefärbt (n = 3). Die GlyR- $\alpha1$ -UE wurde mit mAb2b rabbit, β^{eos} -UE mit anti-mEos-ATTO488, die Postsynapse mit Gephyrin mouse und der Zellkern mit DAPI detektiert. Einheit des Maßstabbalkens: 50 μ m; C: Abgebildet sind die jeweiligen Mittelwerte der gemessenen Dichten pro 100 micron (Einzelexpressionen) mit dem Standardfehler (x-Achse: Genotypen; y-Achse: Dichte * 100 micron). Bei β^{eos} - β^{eos} liegt ein Datenpunkt (80,24) des WT außerhalb der y-Achse und ist hier nicht abgebildet. Die p-Werte (*t*-Test/*MW*-Test) sind wie folgt: *p < 0,05; ***p < 0,001; ****p < 0,0001; DZ^{WT}: 48; DZ^{HZ}: 48; DZ = Dendritenzahl; vs. = versus

A: $Glrb^{eos/eos} \times Glra1^{+/+}$



B: $Glrb^{eos/eos} \times Glra1^{sh/sh}$



C: Quantifizierung $Glrb^{eos/eos} \times Glra1^{+/+}$ vs. $Glrb^{eos/eos} \times Glra1^{sh/sh}$

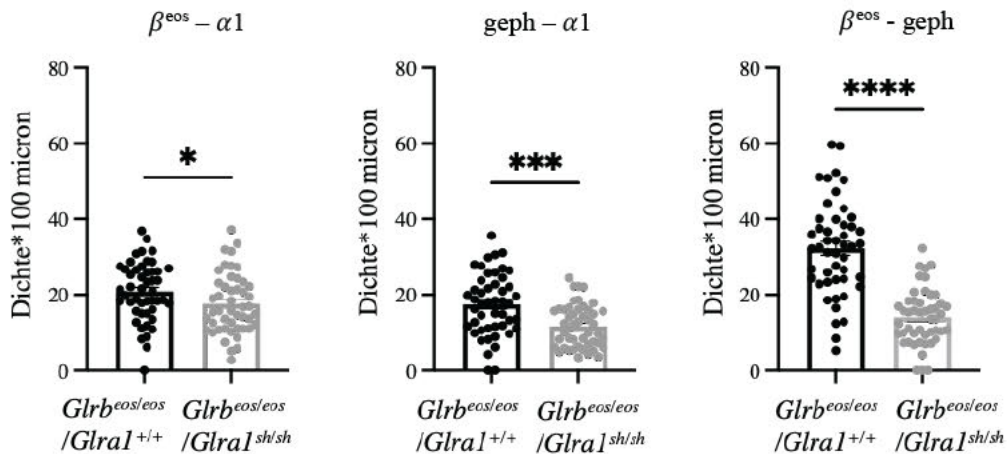


Abbildung 24 Kolokalisationen von Proteinen der inhibitorischen Synapse sind in *shaky* Tieren der Hybridlinie $Glrb^{eos} \times Glra1^{sh}$ vermindert

A, B: Die Rückenmarksneurone der Genotypen $Glrb^{eos/eos} \times Glra1^{+/+}$ (A) und $Glrb^{eos/eos} \times Glra1^{sh/sh}$ (B) wurden am 16. Tag nach Präparation gefärbt (n = 3). Die GlyR- $\alpha 1$ -UE wurde mit mAb2b *rabbit*, β^{eos} -UE mit anti-mEos-ATTO488, die Postsynapse mit Gephyrin *mouse* und der Zellkern mit DAPI detektiert. Einheit des Maßstabsbalkens: 50 μm ; C: Abgebildet sind die jeweiligen Mittelwerte der gemessenen Dichte pro 100 micron (Kolokalisationen) mit dem Standardfehler (x-Achse: Genotypen; y-Achse: Dichte * 100 micron). Die p-Werte (*t-Test/MW-Test*) sind wie folgt: *p < 0,05; ***p < 0,001; ****p < 0,0001; DZ^{WT}: 48; DZ^{HZ}: 48; DZ = Dendritenzahl; vs. = versus

Die statistischen Angaben der Einzelexpressionen sowie der Kollokationen von GlyR- $\alpha 1$, β^{eos} und Gephyrin sind in den *Tabellen 28 und 29* sowie in der *Abbildung 25* zusammengefasst. Die Mittelwerte sind in der Einheit Dichte pro 100 micron angegeben. Diese Auflistung der Ergebnisse der Hybridlinie dient als Übersicht der erhobenen Daten und wird anschließend in der Diskussion näher betrachtet.

Tabelle 28 Statistik der Linie 204 *Glr^{eos} x Glra^{sh}* Einzelexpressionen

DM = Differenz der Mittelwerte ($DM^{HZ} - DM^{WT}$) (Einheit: Dichte * 100 micron),
 HZ = Homozygot, MW = Mittelwert (Einheit: Dichte * 100 micron), * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$,
 SEM = Standardfehler, WT = Wildtyp

<i>Glr^{eos} x Glra^{sh}</i>	$\alpha 1 - \alpha 1$		geph - geph		$\beta^{eos} - \beta^{eos}$	
	WT	HZ	WT	HZ	WT	HZ
MW	35,59	40,55	28,93	12,25	36,08	18,06
SEM	1,283	1,533	1,885	0,9758	2,225	1,068
DM	4,96		-16,68		-18,02	
p-Wert	0,0341*		< 0,0001****		< 0,0001****	

Tabelle 29 Statistik der Linie 204 *Glr^{eos} x Glra^{sh}* Kollokationen

DM = Differenz der Mittelwerte ($DM^{HZ} - DM^{WT}$) (Einheit: Dichte * 100 micron),
 HZ = Homozygot, MW = Mittelwert (Einheit: Dichte * 100 micron), * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$;
 **** $p < 0,0001$, SEM = Standardfehler, WT = Wildtyp

<i>Glr^{eos} x Glra^{sh}</i>	geph - $\alpha 1$		$\beta^{eos} - \alpha 1$		$\beta^{eos} - geph$	
	WT	HZ	WT	HZ	WT	HZ
MW	17,45	11,73	20,88	17,54	32,22	14,07
SEM	1,182	0,8042	1,118	1,134	1,792	1,058
DM	-5,72		-3,34		-18,02	
p-Wert	0,0002***		0,0386*		< 0,0001****	

Die Differenz der Mittelwerte zwischen dem homozygot kranken *shaky* Tier und dem Wildtyp Kontrolltier ist bei β^{eos} (-16,68) und Gephyrin (-18,02) ähnlich groß und stimmt mit dem Wert der Kollokation von β^{eos} / Gephyrin (-18,02) überein, was darauf hindeutet, dass β^{eos} und Gephyrin weitestgehend kollokalisiert sind. Interessanterweise wurde bei beiden Genotypen mehr β^{eos} als Gephyrin einzeln exprimiert, welches wiederum auch die *Abbildung 25* verdeutlicht. Dies lässt die Vermutung zu, dass β^{eos} auch ohne Gephyrin an der Oberfläche lokalisiert sein könnte.

In der *Tabelle 29* zeigen die Werte der Kollokationen $\beta^{\text{eos}}/\alpha 1$ und Gephyrin/ $\alpha 1$, dass beim Homozygoten die einzeln exprimierten Proteine β^{eos} und Gephyrin fast ausschließlich mit $\alpha 1$ kollokalisiert detektiert wurden ($\text{MW}^{\text{HZ}} \beta^{\text{eos}} = 18,06$ entspricht $\text{MW}^{\text{HZ}} \beta^{\text{eos}}/\alpha 1 = 17,54$; $\text{MW}^{\text{HZ}} \text{geph} = 12,25$ entspricht $\text{MW}^{\text{HZ}} \text{geph}/\alpha 1 = 11,73$). Im Vergleich dazu zeigen die Daten des Wildtyps eine höhere Einzelexpression von β^{eos} und Gephyrin als die Kollokalisation mit $\alpha 1$ ($\text{MW}^{\text{WT}} \beta^{\text{eos}} = 36,08 > \text{MW}^{\text{WT}} \beta^{\text{eos}}/\alpha 1 = 20,88$; $\text{MW}^{\text{WT}} \text{geph} = 28,93 > \text{MW}^{\text{WT}} \text{geph}/\alpha 1 = 17,45$).

Zusammenfassend sind die Daten der Rückenmarksneuronen der Hybridlinie 204 *Glr β^{eos}* x *Glr $\alpha 1^{\text{sh}}$* mit der Linie 131 *Glr $\alpha 1^{\text{sh}}$* stark übereinstimmend. So zeigte sich in beiden Linien im homozygot kranken *shaky* Tier eine vermehrte GlyR- $\alpha 1$ Oberflächenexpression. Zudem zeigte die homozygote *shaky* Maus im Vergleich zum Wildtyp Kontrolltier in beiden Linien eine signifikant stark verringerte Synapsin und Gephyrin Einzelexpression, mit einer daraus resultierenden signifikant verminderten Kollokalisation mit GlyR- $\alpha 1$. Diese Ergebnisse wurde durch die β^{eos} Detektion in der Hybridlinie erweitert, welche sowohl einzeln als auch in der Kollokalisation $\beta^{\text{eos}}/\alpha 1$ und β^{eos} /Gephyrin im homozygoten *shaky* Tier signifikant verringerter exprimiert war als im Wildtyp Tier. Diese Daten deuten darauf hin, dass der heteromere GlyR $\alpha 1/\beta$ an der Postsynapse in Motoneuronen im Rückenmark der *shaky* Maus stark vermindert mit Gephyrin an der Oberfläche kollokalisiert ist und dass eine vermehrte GlyR- $\alpha 1$ Expression dieses Defizit zumindest postsynaptisch nicht kompensieren kann.

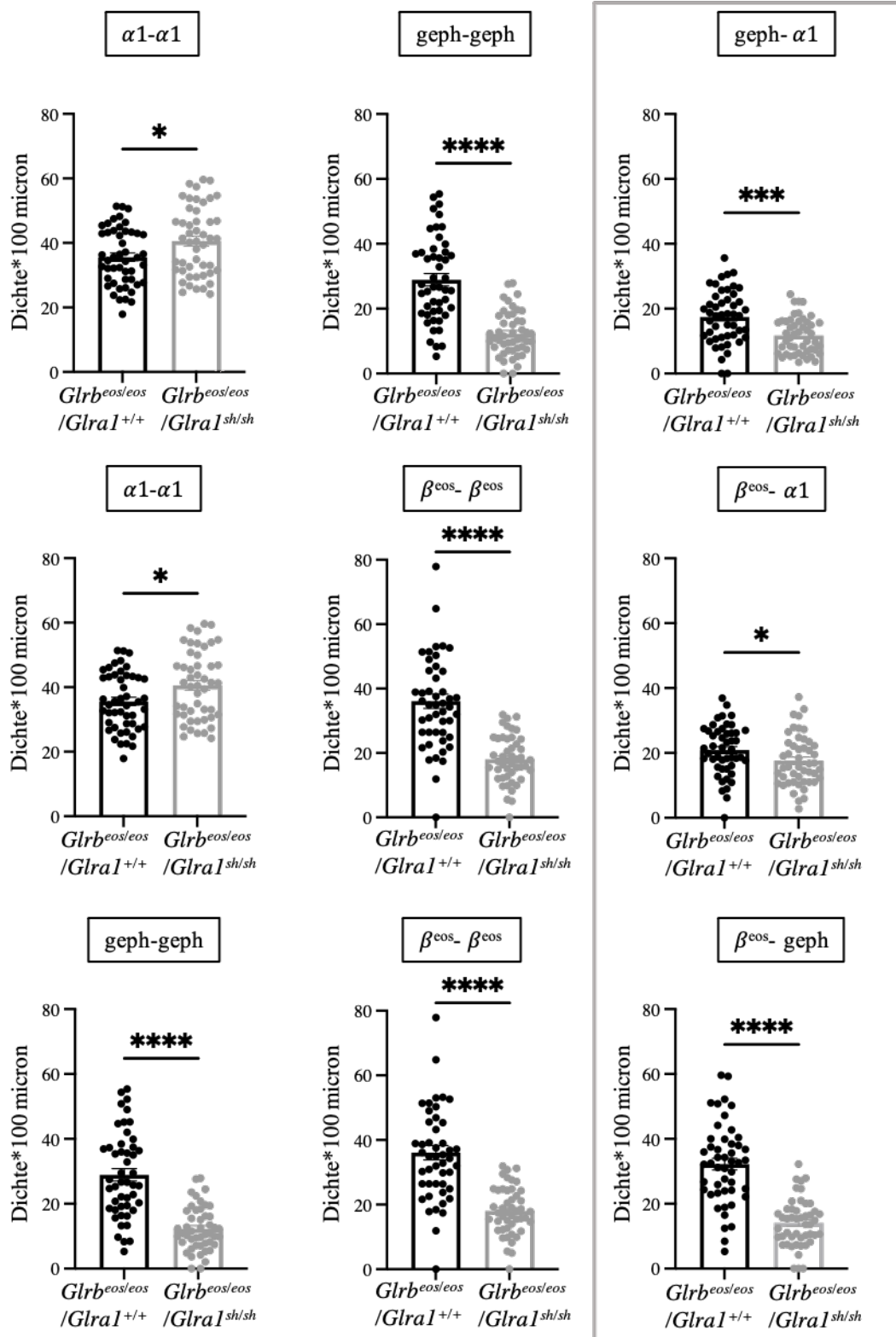


Abbildung 25 Zusammenfassung der Expressionsdaten der Hybridlinie 204 *Glrbeos* x *Glra1sh*

Die Darstellung der Expressionsdaten ist aus den *Abbildungen 23 und 24* zusammengefasst. Abgebildet sind die Mittelwerte der gemessenen Dichte pro 100 micron mit dem Standardfehler (x-Achse: Genotypen, y-Achse: Dichte * 100 micron). Die p-Werte (*t-Test/MW-Test*) sind wie folgt: *p < 0,05; ***p < 0,001; ****p < 0,0001; DZ^{WT}: 48; DZ^{HZ}: 48; DZ = Dendritenzahl

4.7 Expressionsverteilung von GlyR- α 1, β^{eos} und Gephyrin in Rückenmarksschnitten ($Glr^{eos} \times Glra1^{sh}$)

Die Expressionsmuster, die an dissoziierten Neuronen der verschiedenen Genotypen der Hybridlinie ermittelt worden waren, wurden nun mit den Expressionsmustern an Rückenmarksschnitten verglichen. Die Rückenmarksschnitte mit einer Dicke von $9 \mu m$ von Wildtyp-Tieren $Glr^{eos/eos} \times Glra1^{+/+}$ und mutierten *shaky* Tieren $Glr^{eos/eos} \times Glra1^{sh/sh}$ wurden auf die Expression verschiedener Marker der glycinergen Synapse untersucht, am Axio Imager 2 detektiert und im Programm *ImageJ* bearbeitet. Ein qualitativer Vergleich der Genotypen ist möglich, auch wenn die genaue Region des Rückenmarks nicht exakt übereinstimmt. Die unterschiedliche Rückenmarksschnittgröße wurde durch die Bildzuschnitte (Abb. 28) ausgeglichen, um so eine möglichst ähnliche Darstellung der Proteine aufzuzeigen. Weiterführende Informationen sind in *Kapitel 3.8.3* und im *Anhang 8.6* zu finden.

Die Schnitte wurden immunhistologisch mit den Antikörpern mAb2b *rabbit* für die GlyR- α 1-Untereinheit (rot), anti-mEos-ATTO488 für die β^{eos} -Untereinheit (grün), Gephyrin mouse für die Postsynapse (cyan/ magenta) und DAPI für den Zellkern (blau) angefärbt.

In den *Abbildungen 26* und *27* wird je eine Hälfte des Rückenmarksschnittes gezeigt. Im dorsalen Horn zeigt sich bei beiden Genotypen der Hybridlinie $Glr^{eos} \times Glra1^{sh}$ eine Detektion von β^{eos} und Gephyrin während GlyR- α 1 weniger stark erfasst wird. In diesem Bereich befinden sich beispielsweise GlyR α 3/ β , welche ebenfalls über β an Gephyrin gekoppelt sind und eine Rolle bei der zentralen Schmerzsensorik spielen (Lynch 2009). Daneben wurden auch Rezeptorkomplexe aus α 1 und α 3 beschrieben (Harvey, Depner et al. 2004). In diesem Bereich des Rückenmarks finden sich auch zahlreiche GABA_A-Rezeptoren, welche ebenfalls an Gephyrin binden (Kasaragod and Schindelin 2018).

Das ventrale Horn ist Teil der Nerv-Muskel-Synapse, welche sich durch heteromere GlyR $\alpha 1/\beta$ und weitere inhibitorische GABA_A- Rezeptoren auszeichnet (Schaefer, Vogel et al. 2012). Daher wird im Folgenden der ventrale Bereich näher betrachtet und in *Abbildung 28* durch vergrößerte Bildzuschnitte dargestellt, welche in den *Abbildungen 26* und *27* mit einem weißen Kasten gekennzeichnet sind.

Bei Wildtyp Tieren *Glr^{eos/eos} x Glra1^{+/+}* (Abb. 26) sind die Expressionssignale für die Kollokationen $\beta^{eos}/\alpha 1$ und Gephyrin/ $\alpha 1$ stark überlappend, was mit den Färbungen aus der dissoziierten Neuronenkultur (Kapitel 4.6.2) einhergeht.

Die Aufnahmen der Rückenmarksschnitte der *shaky* Mausmutante *Glr^{eos/eos} x Glra1^{sh/sh}* (Abb. 27) zeigen eine verminderte Expression für β^{eos} und Gephyrin im ventralen Bereich des Rückenmarks im Vergleich zu GlyR- $\alpha 1$, welches vermehrt exprimiert wird.

Glr^b eos/eos x Glra1^{+/+}

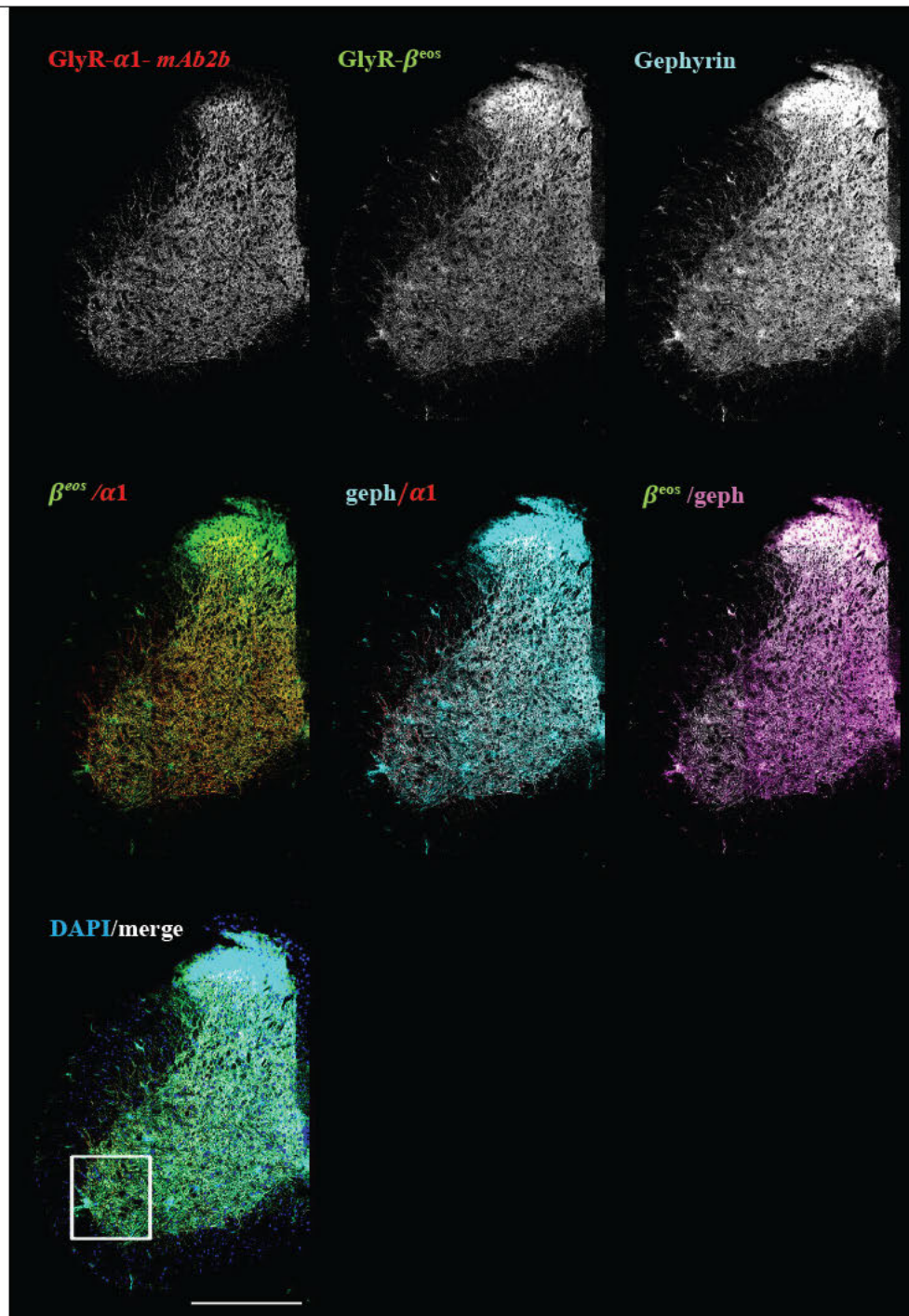


Abbildung 26 Expression von Proteinen der inhibitorischen Synapse in Rückenmarksschnitten von Wildtyp Tieren (*Glr^b eos/eos x Glra1^{+/+}*)

Dargestellt ist ein halbierter Rückenmarksschnitt (9 μ m) eines Wildtyp Tieres *Glr^b eos/eos x Glra1^{+/+}* (204). Die GlyR- α 1-Untereinheit wurde mit mAb2b *rabbit*, β^{eos} -Untereinheit mit anti-mEos-ATTO488, die Postsynapse mit Gephyrin *mouse* und der Zellkern mit DAPI detektiert. Einheit des Maßstabalkens: 500 μ m

Glrbeos/eos x Glra1sh/sh

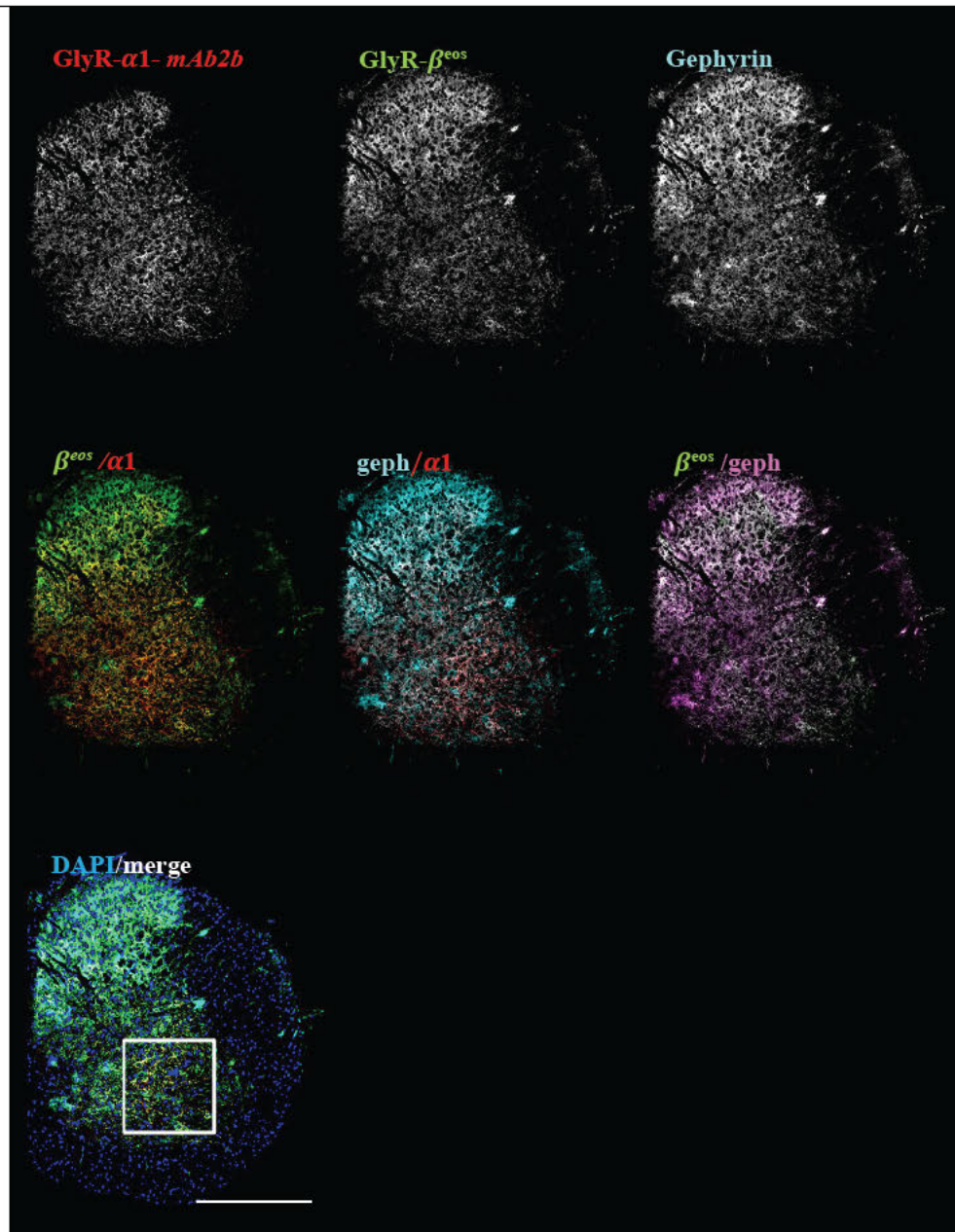


Abbildung 27 Expression von Proteinen der inhibitorischen Synapse in Rückenmarksschnitten von mutierten *shaky* Tieren (*Glrbeos x Glra1sh/sh*)

Dargestellt ist ein halbierter Rückenmarksschnitt ($9 \mu\text{m}$) eines mutierten *shaky* Tieres *Glrbeos/eos x Glra1sh/sh* (204). Die GlyR- α 1-Untereinheit wurde mit mAb2b *rabbit*, β^{eos} -Untereinheit mit anti-mEos-ATTO488, die Postsynapse mit Gephyrin *mouse* und der Zellkern mit DAPI detektiert.

Einheit des Maßstabalkens: $500 \mu\text{m}$

Abbildung 28 zeigt einen Teil des ventralen Horns aus den Abbildungen 26 und 27 vergrößert dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass sowohl die GlyR- β^{eos} -Untereinheit als auch Gephyrin in *shaky* Tieren weniger exprimiert ist als die GlyR- $\alpha 1$ -Untereinheit (Abb. 28, B). Die gleiche verminderte Expression zeigt sich auch beim Vergleich von *shaky* Tieren und Wildtyp Kontrollen. Betrachtet man die Kolokalisation von β^{eos} und $\alpha 1$ (orange) sowie Gephyrin und $\alpha 1$ (weiß) ist diese in homozygoten *shaky* Tieren deutlich reduziert im Vergleich zu Wildtyp Kontrollen (Abb. 28). Dennoch ist in beiden Tiergruppen eine Kolokalisation von GlyR $\alpha 1/\beta$ an Gephyrin klar zu beobachten, so dass man in *shaky* Tieren hier von einer verminderten Expression sowie einer verminderten synaptischen Lokalisation der GlyR $\alpha 1/\beta$ sprechen kann. Allerdings zeigt sich kein genereller Verlust der exprimierten mutierten GlyR- $\alpha 1$ -Untereinheit in *shaky* Tieren.

Weiterhin wird in den Schnitten sichtbar, dass in homozygoten *shaky* Tieren β^{eos} und Gephyrin fast vollständig mit $\alpha 1$ kolokalisieren, während in Wildtyp Tieren β^{eos} und Gephyrin auch unabhängig von $\alpha 1$ detektiert werden können. Bei den Neuronen zeigten die Einzelexpressionen von β^{eos} und Gephyrin in homozygoten *shaky* Tieren übereinstimmende Werte mit den $\alpha 1$ Kolokalisationen, wohingegen beim Wildtyp mehr β^{eos} und Gephyrin einzeln exprimiert als mit $\alpha 1$ kolokalisiert wurde (Tabelle 28, 29). Beim Vergleich der Einzelexpressionen β^{eos} zu Gephyrin, wurde bei beiden Genotypen in den Neuronenkulturen im Kapitel 4.6.2 jeweils mehr β^{eos} im Vergleich zu Gephyrin detektiert. Dies konnte in den Aufnahmen der Rückenmarksschnitte nicht eindeutig gezeigt werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Färbungen der Rückenmarksschnitte mit den erhobenen Daten der Rückenmarksneurone vergleichbar sind. Die ermittelten Expressionsmuster und deren Quantifizierung stützten die Schlussfolgerungen früherer Arbeiten (Schaefer, Berger et al. 2017, Schaefer, Zheng et al. 2018), dass trotz der vermehrten $\alpha 1$ Expression der heteromere GlyR $\alpha 1/\beta$ sowohl bei *Glr1^{sh/sh}* als auch bei *Glr^{eos/eos} x Glr1^{sh/sh}* vermindert an der Oberfläche in Motoneuronen synaptisch mit Gephyrin lokalisiert ist.

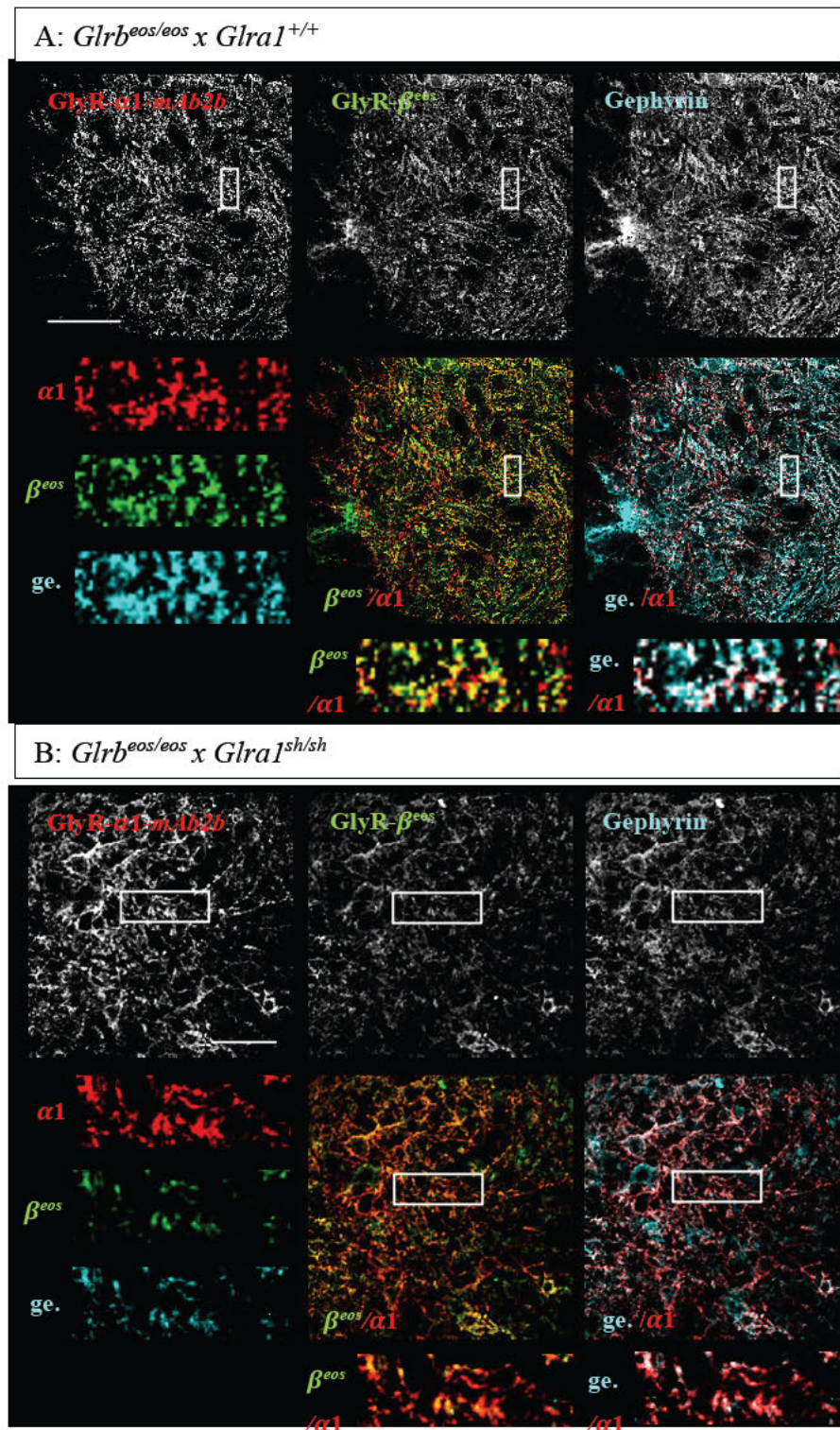


Abbildung 28 Vergleich des Expressionsmusters der GlyR-Untereinheiten und Gephyrin in Rückenmarksschnitten der Hybridlinie *Glr^b^{eos} x Glra1^{sh}*
 Dargestellt sind die vergrößerten Ausschnitte aus den Abbildungen 26 und 27 der halbierten Rückenmarksschnitte im Vergleich der Genotypen (A: *Glr^b^{eos/eos} x Glra1^{+/+}*; B: *Glr^b^{eos/eos} x Glra1^{sh/sh}*). Die GlyR- α 1-Untereinheit wurde mit mAb2b rabbit, β^{eos} -Untereinheit mit anti-mEos-ATTO488, die Postsynapse mit Gephyrin mouse und der Zellkern mit DAPI detektiert.
 Einheit des Maßstabalkens: 100 μ m

5. Diskussion

Bei Hyperekplexie kommt es zu einer fehlerhaften glycinergen Neurotransmission im Rückenmark und Hirnstamm (Bode and Lynch 2014). Der heteromere GlyR $\alpha 1/\beta$ ist in der Nerv-Muskel-Synapse im adulten Rückenmark der häufigste GlyR-Subtyp und zählt zu den wichtigsten synaptischen Inhibitoren im ZNS (Lynch 2004, Kasaragod and Schindelin 2018). Für die Erkrankung sind vor allem Genmutationen der GlyR- $\alpha 1$ -Untereinheit verantwortlich, gefolgt von Mutationen im GlyT2 und der GlyR- β -Untereinheit (Davies, Chung et al. 2010).

Zur weiteren Erforschung der molekularen Mechanismen bei Hyperekplexie wurde in dieser Arbeit das *shaky* Mausmodell herangezogen, welches die *Missense*-Mutation Q177K in der extrazellulären $\beta 8$ - $\beta 9$ Schleife der GlyR- $\alpha 1$ - Untereinheit trägt. Bereits bekannte Daten zeigten funktionelle Störungen mit einem letalen Phänotyp betroffener homozygoter Tiere sowie veränderte synaptische Integrationen. Als Hypothese wurde eine veränderte synaptische Lokalisation mit einer strukturvermittelten Konformationsänderung im GlyR $\alpha 1/\beta$ angenommen (Schaefer, Berger et al. 2017, Schaefer, Zheng et al. 2018). Jedoch wurden immunzytochemische Expressionsdaten aus Rückenmarksneuronen der *shaky* Maus nur begrenzt quantifiziert und aufgrund fehlender stabiler Antikörper konnte keine Aussage bezüglich der Beteiligung der GlyR- β -Untereinheit und deren Folgen getroffen werden, welche neben GlyR- $\alpha 1$ und Gephyrin im synaptischen GlyR Komplex mit vorliegt.

Dieser Kenntnisstand hinsichtlich der Bedeutung einer veränderten synaptischen Lokalisation bei Hyperekplexie konnte in dieser Arbeit mit Hilfe einer neuen *eos* Mauslinie erweitert werden, welche fluoreszenz-markierte β -Untereinheiten endogen exprimiert (Maynard, Rostaing et al. 2021). Durch die Kreuzung *Glrb^{eos} x Glra1^{sh}* wurde die Oberflächenexpression von Markerproteinen der glycinergen Synapse untersucht. Die vorliegende Arbeit zum Krankheitsmodell der *shaky* Maus zeigt erstmals, dass trotz einer vermehrten $\alpha 1$ Oberflächenexpression der heteromere GlyR $\alpha 1/\beta$ im mutierten *shaky* Tier signifikant vermindert an der Postsynapse von Motoneuronen synaptisch mit Gephyrin lokalisiert ist.

5.1 Glycin-Rezeptor in transfizierten HEK293-Zellen zeigt für GlyR- $\alpha 1^{Q177K}$ eine erniedrigte Oberflächenexpression

Um die Expression der Glycin-Rezeptorproteine GlyR- $\alpha 1^{wt}$, GlyR- $\alpha 1^{Q177K}$, Myc-GlyR- β^{wt} und Gephyrin zu vergleichen, wurden zunächst deren Plasmid-DNAs eingeschleust und in HEK293-Zellen exprimiert. Dabei akkumulierten Gephyrin und Myc-GlyR- β^{wt} deutlich kongruenter als GlyR- $\alpha 1^{Q177K}$.

In transfizierten HEK293-Zellen konnte eine verringerte Oberflächenexpression von GlyR- $\alpha 1^{Q177K}$ im Vergleich zu GlyR- $\alpha 1^{wt}$ detektiert werden. Ähnliche Befunde zeigte eine frühere Studie. Schaefer, Berger et al. (2017) kotransfizierten die GlyR- $\alpha 1$ -Untereinheit mit der GlyR- β -Untereinheit in HEK293-Zellen und ermittelten eine signifikante Abnahme der Oberflächenexpression von heteromeren GlyR $\alpha 1^{Q177K}\beta$ im Vergleich zum Wildtyp GlyR $\alpha 1^{wt}\beta$ mittels Quantifizierung von Western-Blots. Signifikant niedrigere Oberflächenexpressionen konnten auch in einer weiteren Studie von Janzen, Schaefer et al. (2017) bestätigt werden. Hierbei wurden verschiedene GlyR- $\alpha 1^{Q177x}$ Varianten sowohl singular als auch mit GlyR- β in HEK293-Zellen kotransfiziert, wobei x verschiedenen substituierten Aminosäuren an der Position 177 entspricht. Mit den substituierten Aminosäuren Lysin (K; entspricht *shaky* Mutation) und Arginin (R; ähnliches strukturelles Verhalten wie Lysin) wurden signifikant geringere Oberflächenexpressionen detektiert. Die Einführung eines Asparagins (N) an Position Glutamin 177, welches mit seiner hydrophilen Seitenkette dem ursprünglichen Glutamin ähnelt, zeigte keine veränderte Oberflächenexpression im Vergleich zum Wildtyp.

Die Analysen der Neuronenkulturen dieser Arbeit unterstreichen für GlyR- $\alpha 1$ im mutierten *shaky* Tier eine erhöhte Oberflächenexpression, welche im *Kapitel 5.4* näher diskutiert wird. Auch die Studie von Schaefer, Berger et al. (2017) konnte diese gegenläufige Oberflächenexpression von GlyR- $\alpha 1^{Q177K}$ in HEK293-Zellen und Neuronenkulturen von *Gral^{sh/sh}* feststellen.

Frühere Arbeiten (Janzen, Schaefer et al. 2017, Schaefer, Berger et al. 2017, Schaefer, Zheng et al. 2018) korrelierten die ermittelten Expressionsdaten mit funktionellen Analysen. Die Untersuchungen aus Ganzzelleableitungen von transfizierten HEK293-

Zellen ergaben keine veränderten maximalen Stromamplituden bei Präsenz von mutierten *Gla1^{sh/sh}* und bestätigten daher die Fähigkeit für mutierte GlyR $\alpha 1^{Q177K}\beta$, funktionelle Ionenkanäle auszubilden. Allerdings zeigte sich für GlyR $\alpha 1^{Q177K}\beta$ ein 6-fach erhöhter EC50-Wert mit dem Agonist Glycin (Schaefer, Berger et al. 2017). Der EC50-Wert beschreibt in einer Dosis-Wirkungskurve die mittlere effektive Konzentration, bei welcher ein halbmaximaler Effekt auftritt. Der EC50-Wert bei Glycin induzierten Strömen beschreibt die Glycin Konzentration, welche für einen halbmaximalen Strom benötigt wird. Ist dieser Wert erhöht, ist mehr Glycin notwendig, um den gleichen halbmaximalen Strom zu erreichen. Janzen, Schaefer et al. (2017) untersuchten den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion des GlyR mit verschiedenen in HEK293-Zellen transfizierten GlyR- $\alpha 1^{Q177x}$ Varianten. Ähnelten die substituierten Aminosäuren der *shaky* Mutation, wurden 4-5-fach erhöhte EC50-Werte erfasst. Bei einem dem ursprünglichen Glutamin ähnlichen strukturellen Verhalten wurden nur gering erhöhte EC50-Werte gemessen. Dabei konnte eine Korrelation zwischen einer reduzierten Glycin-Wirksamkeit und einem beeinträchtigten Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen Q177 und dem Rest 65 ermittelt werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen erneut den strukturellen Einfluss der $\beta 8$ - $\beta 9$ Schleife der GlyR- $\alpha 1$ -Untereinheit auf die Oberflächenexpression und die Glycin-Wirksamkeit des GlyR (Janzen, Schaefer et al. 2017).

In der vorliegenden Arbeit wurden keine funktionellen Analysen durchgeführt. Dennoch hat die strukturelle Veränderung bei der *shaky* Mutation Auswirkungen auf die Funktion. Die funktionellen Beeinträchtigungen waren jedoch nach Transfektion der mutierten GlyR in HEK293-Zellen nicht so deutlich erkennbar verglichen mit elektrophysiologischen Ableitungen von *ex vivo* Hirnschnitten. Untersuchungen mit GlyR- $\alpha 1$ haltigen Hirnstammkernen wie Motoneuronen des Hypoglossus (HM) oder des Pre-Bötzinger-Komplexes (PreBöC) zeigten für das homozygot erkrankte *shaky* Tier signifikant reduzierte glycinerge mIPSC-Amplituden, -Frequenzen und schnelleren Zerfall der mIPSCs auf, was auf eine schnellere Schließung der Ionenkanäle hindeutete (Schaefer, Berger et al. 2017, Schaefer, Zheng et al. 2018). Diese funktionellen Defekte konnten in transfizierten HEK293-Zellen nicht in der gleichen Ausprägung identifiziert werden, möglicherweise ist dies auf die unterschiedlichen Expressionsmuster im

Überexpressionssystem verglichen mit der endogenen Expression im Hirngewebe zurückzuführen (Schaefer, Berger et al. 2017). Dieser Vergleich verdeutlicht, dass mit den GlyR $\alpha 1^{Q177K}\beta$ transfizierten HEK293-Zellen zwar einige Erklärungen für die *shaky* Maus gewonnen werden konnten, aber für die Schwere des Phänotyps weitere Faktoren *in vivo* eine Rolle spielen müssen. Aus diesem Grund bieten Untersuchungen an Rückenmarksneuronen oder Gewebe eine höhere Aussagekraft und sollten daher der Überexpression vorgezogen bzw. ergänzend hinzugezogen werden.

5.2 Die eingefügte mEos4b-Sequenz besitzt keinen Einfluss auf den Phänotyp und das Gewicht von Tieren der Hybridlinie *Glr^b^{eos} x Glra¹^{sh}*

Um eine Beeinträchtigung der mEos4b-Sequenz auf die Entwicklung der Tiere auszuschließen, wurde das Körpergewicht der Tiere verschiedener Genotypen im Entwicklungsverlauf dokumentiert. Die Tiere der Hybridlinie *Glr^b^{eos} x Glra¹^{sh}* wurden 21 Tage lang gewogen und auf Veränderungen des Phänotyps hin beobachtet. Hierbei wurde nach Wildtyp Tieren, heterozygoten *Carrier* der *shaky* Mutation und der *eos*-Markierung sowie homozygoten Tieren für die *shaky* Mutation und die *eos*-Markierung unterschieden.

Zunächst ungeachtet der *eos*-Markierung, stieg das Gewicht der Gruppe mit dem homozygot mutierten *shaky* Allel ab Tag 15 langsamer und nahm im Zeitraum von Tag 19 bis 21 signifikant ab. Heterozygote *shaky* Tiere waren ähnlich vom Gewichtsverlauf wie Wildtyp Tiere und entwickelten sich daher vom Körpergewicht normal. Vorherige Studien bestätigen die Gewichtsabnahme der homozygoten *shaky* Tiere im zeitlichen Verlauf (Schaefer, Berger et al. 2017, Schaefer, Roemer et al. 2018). Ebenso unterschieden sich in diesen Studien heterozygote *shaky* Tiere nicht im Gewicht von Wildtyp Tieren. Schaefer, Berger et al. (2017) beobachteten für die *Startle* Erkrankung typische Symptome wie Tremor, Muskelspasmen oder das Umklammern der Hinterfüße beim Packen des Schwanzes ab dem postnatalen Tag 14 bei *Glra¹^{sh/sh}*. Diese verstärkten sich zunehmend, bis die erkrankten Tiere in den Wochen 3 bis 6 schließlich starben. Auch in dieser Arbeit zeigten *Glra¹^{sh/sh}* Tiere ab Tag 14 diese *Startle* Symptome mit Progredienz im Untersuchungszeitraum von 21 Tagen.

Beim direkten Vergleich der Wiegedaten lässt sich in der Studie Schaefer, Zheng et al. (2018) eine erste Gewichtsabweichung von *Glr1^{sh/sh}* ab der zweiten Woche erkennen, eine statistische Signifikanz hingegen wurde erst ab der vierten Woche quantifiziert. Allerdings wurden unterschiedliche Statistikttests benutzt, welche die bestehenden Diskrepanzen erklären könnten. Bei Verwendung des *One-Way-Anova-Tests* für die vorliegende Arbeit zeigte sich für den Vergleich der *shaky* Genotypen im Zeitraum von Tag 15 bis 18 ein P-Wert von 0,1723 und von Tag 19 bis 21 ein P-Wert von 0,0541. Es zeigt sich eine Annäherung an das Signifikanzlevel von 0,05. Somit bestätigen die Daten dieser Arbeit frühere Untersuchungen am *shaky* Mausmodell von Schaefer, Zheng et al. (2018).

Die Wiegekurven dieser Arbeit von Tieren, die entweder heterozygot oder homozygot für *Glr^{eos}*- Genotypen waren, zeigten einen homogenen Verlauf der Körpergewichte und keine statistische Signifikanz zwischen den einzelnen Gruppen. Bei den *Glr^{eos}*-Genotypen wurde kein offensichtlicher Phänotyp beobachtet. Maynard, Rostaing et al. (2021) zeigten bereits, dass *Glr^{eos}* Tiere keine phänotypischen Symptome und eine normale Lebenserwartung besitzen, welche über 600 Tage hin detektiert wurde. Auch die Verteilung der *Glr^{eos}*-Genotypen hinsichtlich der Mendel'schen Vererbungslehre wies keine Auffälligkeiten auf. Darüber hinaus führten Maynard, Rostaing et al. (2021) auch funktionelle Untersuchungen durch. Dabei wurden in Ganzzelleableitungen an kultivierten Rückenmarksneuronen *Glr^{+/+}* mit *Glr^{eos/eos}* Veränderungen in der Funktionalität der *eos* markierten *Glr*-Varianten überprüft. Nach Glycin Applikation zeigte sich zwar eine geringfügige Erhöhung der EC50-Werte für *Glr^{eos/eos}* im Vergleich zum Wildtyp, aber keine statistisch erhöhten oder erniedrigten maximalen Chlorid-Ströme (I_{MAX}) bei einer sättigenden Glycin Konzentration von 300 μ M. Außerdem waren die ermittelten Hill-Koeffizienten für *Glr^{+/+}* und *Glr^{eos/eos}* im Bereich von 3,5-4, so dass eine unbeeinflusste Kooperativität der Untereinheiten im Rezeptorkomplex während der Glycin Bindung angenommen werden kann. (Maynard, Rostaing et al. 2021)

Zusammenfassend ergab die Analyse, dass das Körpergewicht im zeitlichen Verlauf der Entwicklung bei Nachkommen der Hybridkreuzung *Glrb^{eos}* x *Glra1^{sh}* für die GlyR- α 1 nicht-mutierten Wildtyptieren sowie heterozygoten *shaky* Tieren unverändert ist, sich aber homozygote *shaky* Tiere zwei Wochen nach Geburt im Körpergewicht von den anderen Genotypen durch eine Reduktion des Körpergewichts auszeichnen. Diese Gewichtsreduzierung ist alleine auf die GlyR- α 1 Mutation zurückzuführen und nicht durch die Einführung der mEos4b-Sequenz in das *Glrb*-Gen bedingt. Aus diesen Ergebnissen folgert keine Beeinflussung der eingefügten mEos4b-Sequenz auf das Körpergewicht oder den Phänotyp der Tiere und daraus resultierend auch keine veränderte Glycin-Rezeptor Funktion.

GlyR-Untereinheiten sind entwicklungsbedingt unterschiedlich exprimiert. Während in der Embryonalentwicklung hauptsächlich GlyR- α 2 vorherrscht und GlyR- β auch bereits ab dem Zeitpunkt E14 vorliegt, werden Untereinheiten wie die GlyR- α 1 oder GlyR- α 3 erst nach der Geburt verstärkt exprimiert (Malosio, Marquèze-Pouey et al. 1991, Liu and Wong-Riley 2013). Man spricht hier von einem Untereinheiten *Shift* nach der Geburt, weshalb die Symptome der *Startle* Erkrankung beim Menschen direkt nach der Geburt beginnen (Davies, Chung et al. 2010). Bei Nagetieren wird der circa 14 Tage spätere Eintritt der ersten *Startle* Symptome mit einem zeitlich verzögerten GlyR-Wechsel begründet, wenn die GlyR- α 1-Untereinheit nahezu vollständig die GlyR- α 2-Untereinheit ersetzt hat (Lynch 2004). Der zeitliche Symptombeginn der *shaky* Mauslinie mit P14 stimmt demzufolge mit dem entwicklungsbedingten Wechsel vom neonatalen GlyR α 2 zum adulten GlyR α 1/ β überein und verstärkt dadurch die Bedeutung der Mutationen für die Reifung der glycinergen Synapse in adulten Rückenmarksneuronen (Lynch 2004, Schaefer, Berger et al. 2017).

Der Beginn und das Muster der Expression der GlyR- α 1-Untereinheit wurde bei der *shaky* Maus detailliert analysiert. Im Rückenmark und Hirnstamm von Wildtyp und homozygoten *shaky* Mäusen wurden die Entwicklungsstadien P0, P6 bis P28 untersucht und eine erste Detektion bei beiden Genotypen ab P6 festgestellt (Schaefer, Berger et al. 2017). Darüber hinaus wurden Rückenmarks- und Hirnstammproben von P0, P7 bis P28 aus Rückkreuzungsexperimenten der *shaky* Linie in die *spasmodic (spd)* Linie analysiert

(Schaefer, Zheng et al. 2018). Eine Punktmutation im *Glr1*-Gen führt bei der *spasmodic* Maus zu einer verminderten Glycin-Affinität. Im Gegensatz zu *shaky* zeigt das homozygote *spasmodic* Tier einen milderen Phänotyp mit einer normalen Lebensspanne (Saul, Schmieden et al. 1994, Schaefer, Vogel et al. 2012). Da die für beide mutierten Allele jeweils heterozygoten *Glr1^{sh/spd}* Mäuse einen ähnlich milden Phänotyp wie homozygote *spasmodic* Mäuse zeigten, sich nicht im Gewicht von *Glr1^{+/sh}*, *Glr1^{+/spd}* und *Glr1^{+/+}* unterschieden und überlebten, konnte mit dieser Kreuzung das Expressionsmuster ermittelt werden. Dabei wurde das GlyR- α 1 Protein ab P7 in Rückenmark und Hirnstamm bei *Glr1^{sh/spd}* detektiert und unterschied sich dabei nicht von *Glr1^{+/+}* (Schaefer, Zheng et al. 2018). Diese Ergebnisse früherer Studien zeigen, dass sich der Zeitpunkt der ersten GlyR- α 1-Untereinheit Detektion im *shaky* Mausmodell nicht vom Wildtyp unterscheidet.

Zusammenfassend unterscheidet sich der Expressionsbeginn der GlyR- α 1-Untereinheit in *shaky* Tieren nicht vom Wildtyp und ist zeitlich mit dem GlyR-Subtyp Wechsel im Rückenmark übereinstimmend. Auch eine unterschiedliche Anzahl von Motoneuronen oder eine veränderte Häufigkeit von GABAergen Strömen in der mutierten *shaky* Maus konnte ausgeschlossen werden (Schaefer, Berger et al. 2017, Schaefer, Zheng et al. 2018). Somit ist die Schwere des Phänotyps und die funktionellen Defizite auf den mutierten postsynaptischen GlyR α 1/ β im *shaky* Tier zurückzuführen, bei dem auf struktureller Ebene die Transition nach Ligandenbindung nicht vollständig in Kanalöffnung übersetzt wird.

5.3 Der Startle Phänotyp homozygoter *shaky* Tiere ist durch veränderte Expressionsmuster von Markern der glycinergen Synapse bedingt

Für die Analyse der synaptischen Lokalisation wurden kultivierte Rückenmarksneurone der Linie *Glr1^{sh}* und der Hybridlinie *Glr^{eos} x Glr1^{sh}* am 16. Tag nach Präparation hinsichtlich der Oberflächenexpression von GlyR- α 1, GlyR- β^{eos} , Gephyrin und Synapsin quantitativ ausgewertet. Die Daten beider Mauslinien zeigen, dass im homozygoten *shaky* Tier GlyR- α 1 signifikant erhöht, und GlyR- β^{eos} , Gephyrin sowie Synapsin signifikant erniedrigt an der Oberfläche exprimiert waren. Daraus resultierend ergaben sich signifikant verminderte Koloalationen für Gephyrin/ α 1, β^{eos}/α 1, β^{eos} /Gephyrin und Synapsin/ α 1 in der homozygoten *shaky* Maus im Vergleich zu Wildtyp Kontrolltieren.

Die erhöhte Expression der GlyR- α 1-Untereinheit an der Oberfläche von postsynaptischen Motoneuronen in der *shaky* Mauslinie sowie in der Hybridlinie *Glr^{eos} x Glr1^{sh}* steht im Einklang mit den Daten von Schaefer, Berger et al. (2017). Immunzytochemische Färbungen kultivierter Rückenmarksneurone von Schaefer, Berger et al. (2017) deuteten auf eine erhöhte GlyR- α 1 Oberflächenexpression in *Glr1^{sh/sh}* im Vergleich zu *Glr1^{+/+}* Tieren hin, die mittels Westernblot Analysen im Rückenmark und Hirnstamm quantifiziert wurden (Schaefer, Berger et al. 2017).

Die GlyR- α 1-Untereinheit ist im adulten Rückenmark die am häufigsten exprimierte α -Untereinheit und bildet neben prä- und extrasynaptischen homomeren Komplexen vor allem den postsynaptischen heteromeren GlyR 4 α 1:1 β an der Motoneuronen Membran (Jeong, Jang et al. 2003, Lynch 2004, Zhu and Gouaux 2021). Elektrophysiologischen Untersuchungen der Hirnstammschnitte bei *shaky* Tieren wiesen zusätzlich auf eine reduzierte präsynaptische glycinerge Neurotransmission im homozygoten *shaky* Tier hin (Schaefer, Zheng et al. 2018). Weiterhin können dysfunktionale präsynaptische homomere GlyR α 1 die Glycin Freisetzung in der *shaky* Maus herabsetzen. Zudem wäre auch ein Einfluss auf die postsynaptische Anordnung möglich. Dies verdeutlicht das Prinzip der transsynaptischen Nanosäulen, bei dem von einer Abhängigkeit zwischen Prä- und Postsynapse ausgegangen wird. Hierbei zeigten die gemischten GlyR/GABA_A inhibitorischen Synapsen in Rückenmarksneuronen bei gesteigerter Netzwerkaktivität eine Reduzierung sub-synaptischer GABA_A-Domänen mit einer zeitgleichen Erhöhung

synaptischer GABA_A-Rezeptoren (Yang, Le Corrionc et al. 2021). Auch wenn die GlyR in den gemischten GlyR/GABA_A Synapsen dieser Studie weitestgehend unbeeinflusst blieben (Yang, Le Corrionc et al. 2021), so könnte nach diesem Prinzip der transsynaptischen Nanosäulen ein präsynaptischer Einfluss auf die postsynaptischen einzelnen Glycin-Rezeptoren in der *shaky* Maus dennoch möglich sein.

In früheren Studien wurde ein Einfluss auf das postsynaptische Clusterverhalten der GlyR primär der β -Gephyrin-Interaktion zugeschrieben. Neuere Untersuchungen weisen jedoch auch auf eine mögliche Beteiligung der α 1-Untereinheit hin. So unterschied sich beispielsweise die Mobilität und Dichte heteromerer GlyR an Rückenmarkssynapsen zwischen den α -Untereinheiten α 3 und α 1 (Patrizio, Renner et al. 2017). Darüber hinaus besitzt die GlyR- α 1-Untereinheit in ihrer TM3-TM4 Schleife mögliche Bindestellen für Collybistin und Syndapin I, welche an der Verankerung von synaptischen GlyR beteiligt sind (Langlhofer, Schaefer et al. 2020, Breitingner, Weinländer et al. 2021). Die mutierte *shaky* α 1-Untereinheit könnte somit das Clusterverhalten der GlyR stören und zu einem Verlust von synaptisch lokalisierten GlyR führen.

In dieser Arbeit wurde das Strukturprotein Gephyrin in der homozygoten *shaky* Maus im Vergleich zum Wildtyp als signifikant stark reduziertes Protein identifiziert. Auch qualitativ war ein erheblich schwächeres Gephyrin Signal bei *Glr1^{sh/sh}* zu erkennen (Kapitel 4.6.2). Diese verminderte Gephyrin Detektion in Rückenmarksneuronen konnte bereits aus den Daten von Schaefer, Berger et al. (2017) vermutet werden. Dort zeigte sich in gefärbten Rückenmarkskulturen für *Glr1^{sh/sh}* im Vergleich zu *Glr1^{+/+}* eine reduzierte Gephyrin Oberflächenexpression. Zudem wurden die Expressionsdaten von den Proteinen Gephyrin und GlyR- α 1 innerhalb eines Genotyps quantifiziert und wiesen bei *Glr1^{sh/sh}* eine signifikante Reduktion bei Gephyrin bzw. Erhöhung bei GlyR- α 1 auf. Die Gephyrin Proteinexpression zeigte jedoch mittels Westernblot Quantifizierung im Rückenmark keine signifikante Erhöhung, im Hirnstamm hingegen wurde eine signifikant vermehrte Proteinexpression für das homozygot erkrankte Tier analysiert. (Schaefer, Berger et al. 2017). In der vorliegenden Arbeit konnte eine reduzierte Gephyrin Expression an der Oberfläche von Motoneuronen quantitativ bestätigt werden.

Daraus resultierend wurde in dieser Arbeit eine signifikant reduzierte Kollokalisierung von Gephyrin und $\alpha 1$ im homozygoten *shaky* Tier gezeigt. Die Kollokalisierung von GlyR- $\alpha 1$ und Gephyrin wurde bei Schaefer, Berger et al. (2017) nur anhand von Mikroskopie Aufnahmen von kultivierten Rückenmarksneuronen und Rückenmarksschnitten qualitativ bewertet. Dabei wurden für *Glr1^{sh/sh}* deutlich weniger Kollokalisierungen von Gephyrin und GlyR- $\alpha 1$ beobachtet als für das Wildtyp Kontrolltier. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Quantifizierungen synaptischer Gephyrin Cluster - ebenfalls positiv für GlyR- $\alpha 1$ - konnten die bisherigen qualitativen Daten von Schaefer, Berger et al. (2017) untermauern.

Gephyrin verankert durch die Interaktion mit der β -Untereinheit den GlyR $\alpha 1/\beta$ an der Postsynapse und ist als Strukturprotein für die neuronale Aktivität grundlegend (Groeneweg, Trattng et al. 2018). Die weitreichende Bedeutung von Gephyrin wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt, wo durch Eingreifen in die Gephyrin Synthese bei kultivierten Rückenmarksneuronen der Ratte ein Verlust von GlyR-Clustern zu verzeichnen war (Kirsch, Wolters et al. 1993).

Die neuartige *eos* Mauslinie ermöglichte nun erstmals eine stabile immunzytochemische Darstellung der GlyR- β -Untereinheit (Maynard, Rostaing et al. 2021). Da der heteromere GlyR $\alpha 1/\beta$ über ein Aminosäure-Motiv in der TM3-TM4-Schleife mit dem Strukturprotein Gephyrin verbunden ist (Meyer, Kirsch et al. 1995), konnte in der vorliegenden Arbeit GlyR- β ebenso wie Gephyrin als synaptisches Markerprotein betrachtet werden.

Die Analyse der Oberflächenexpression in Rückenmarksneuronen ergab in dieser Arbeit für das homozygot erkrankte *shaky* Tier eine signifikant stark verminderte β^{eos} Expression im Vergleich zum Wildtyp. Diese starke Reduktion ähnelt der Gephyrin Detektion und resultierte in einer ebenso verminderten Kollokalisierung $\beta^{eos}/$ Gephyrin in *Glr^{eos} x Glr1^{sh/sh}*. Diese enge Korrelation zwischen β^{eos} und Gephyrin beschrieben auch Maynard, Rostaing et al. (2021). Dafür wurde das *eos* KI-Mausmodell mit einem bereits etablierten Gephyrin Mausmodell gekreuzt, welches endogen mRFP-markiertes Gephyrin exprimiert. Durch duales *Superresolution Imaging* dorsaler und ventraler 2 μm

Kryo-Schnitte konnte eine enge räumliche Korrelation mit einem mittleren Intensitäts-Korrelations-Quotienten (ICQ) von 0,3 zwischen mEos-GlyR-Cluster und mRFP-Gephyrin-Cluster bestimmt werden. Da kein Unterschied zwischen den dorsalen und ventralen ICQ-Werten festgestellt werden konnte, wird von einer gleichwertigen GlyR- β -Gephyrin-Bindung in beiden Regionen des Rückenmarks ausgegangen (Maynard, Rostaing et al. 2021). Dazu ergänzend zeigten die konfokalen Aufnahmen dieser Arbeit starke Überlappung von β^{eos} und Gephyrin positiven Clustern. Auch Weltzien, Puller et al. (2012) analysierten eine Kolo-kalisation von $90,3 \pm 4,3\%$ von mAb-GlyR- β -Clustern und Gephyrin in Primärkulturen von Ratten-Rückenmarksneuronen.

Um die Daten der Quantifizierung bezüglich GlyR- β dieser Arbeit einzuordnen, wird das von Maynard, Rostaing et al. (2021) bereits untersuchte *oscillator* Mausmodell (*Glr1^{spdot}*) herangezogen. Hier wurden heterozygote *oscillator* Mäuse, die eine normale Lebenserwartung aufweisen, hinsichtlich der GlyR- β -Lokalisation untersucht (Maynard, Rostaing et al. 2021). Gephyrin wurde anschließend mittels eines Antikörpers immunzytochemisch dargestellt. Die Quantifizierung von 40 μm Vibratom-Rückenmarksschnitten ergab für das heterozygote *oscillator* Tier wesentlich niedrigere mEos4b-GlyR- β -Cluster Anzahlen, während die Anzahl der Gephyrin positiven Synapsen unverändert blieb. Zudem wurde kein ektopisches GlyR- β -Cluster beobachtet und daraus resultierend kein GlyR ohne Gephyrin detektiert. Ein direkter Vergleich zwischen der *shaky* und *oscillator* Maus ist nur eingeschränkt möglich. Beide sind zwar Mausmodelle der Hyperekplexie und tragen eine Mutation im *Glr1*-Gen, allerdings unterscheiden sie sich wesentlich in der Expression der GlyR- $\alpha 1$ -Untereinheit im Rückenmark (Kling, Koch et al. 1997, Schaefer, Berger et al. 2017). In beiden Mauslinien übereinstimmend scheint die starke GlyR- β Reduktion. Während jedoch Gephyrin in der heterozygoten *oscillator* Maus unverändert blieb (Maynard, Rostaing et al. 2021), zeigte die Quantifikation für Gephyrin in dieser Arbeit bezüglich der homozygoten *shaky* Maus deutlich reduziertere Werte.

Maynard, Rostaing et al. (2021) detektierten kein ektopisches GlyR- β und damit kein GlyR ohne Gephyrin. Hier zeigte sich für beide Genotypen, homozygote *shaky* Maus und Wildtypier, eine höhere Einzelexpression für β^{eos} als für Gephyrin. Somit deuten die

Ergebnisse daraufhin, dass β^{eos} auch ohne Gephyrin an der Oberfläche lokalisiert sein kann. Eine weitere Erklärung könnten die verwendeten Antikörper darstellen. Der für diese Arbeit verwendete anti-mEos-ATT488 Antikörper wurde bei Maynard, Rostaing et al. (2021) nicht angewendet, hierbei wurde die mEos4b-Sequenz direkt detektiert und somit die Signalschärfe erhöht.

Die GlyR- β -Untereinheit verbindet den heteromeren Glycin-Rezeptor mit Gephyrin und verankert diesen somit an die postsynaptische Membran. Die Bindungstasche wird aus zwei benachbarten Gephyrin Domänen gebildet, so dass eine Gephyrin-Dimerisierung durch GlyR-Bindung vorgeschlagen wurde (Kim, Schrader et al. 2006). Aus diesem Grund wird ein Verlust der GlyR- β -Untereinheit auch das Clusterverhalten von Gephyrin beeinflussen. Ein weiterer Interaktionspartner des GlyR Komplexes ist Syndapin I, welches wichtig für die Organisation glycinerner Synapsen ist und ebenso an die β -Untereinheit binden kann. Ein Mangel von Syndapin I führte in Rückenmarkskulturen von Mäusen zu einer signifikanten Reduktion in Größe und Anzahl von GlyR-Cluster, wohingegen die Gephyrin-Cluster keine signifikanten Veränderungen zeigten (Del Pino, Koch et al. 2014). Neuere Arbeiten mit Hilfe von ultrahochauflösenden Analysen von Syndapin-I-KO-Mäusen zeigten jedoch, dass die GlyR-Felder im Vergleich zum Wildtyp verringert vorlagen, aber die Häufigkeit von GlyR- β -Clustern und von zerstreut lokalisierten GlyR- β erhöht war, so dass dies eine Fragmentierung der GlyR zur Folge hatte. Als Grund für diese nicht vollständig im Einklang stehenden Ergebnisse wurde auf die mangelnde Auflösung klassischer Immunfluoreszenztechniken verwiesen. Syndapin I wurde neben der Rolle als regulierendes Gerüstprotein, ebenso als Förderer der GlyR- β Internalisierung beobachtet und trägt damit zur Feinabstimmung glycinerner Synapsen bei (Tröger, Seemann et al. 2022). Ein Mangel an GlyR- β im *shaky* Mausmodell könnte somit durch eine verminderte Syndapin I Interaktion diese Regulierung beeinflussen.

Um die Präsynapse darzustellen, wurden periphere synaptische Vesikelproteine mittels eines Antikörpers in dieser Arbeit markiert. Für homozygot erkrankte Tiere der Linien *Glr1^{sh}* und *Glr1^{eos} x Glr1^{sh}* wurde Synapsin signifikant reduziert an der Oberfläche exprimiert. Die Analyse Synapsin positiver Cluster für die GlyR- α 1-Untereinheit ergab ebenfalls eine signifikant erniedrigte Oberflächenexpression für die homozygote *shaky*

Maus im Vergleich zum Wildtyp und deutet somit auf reduzierte funktionelle Synapsen im homozygot erkrankten *shaky* Tier hin. Auch Schaefer, Berger et al. (2017) untersuchten die Präsynapse in der *shaky* Maus anhand von Mikroskopie Aufnahmen gefärbter Rückenmarksschnitte, allerdings ohne diese zu quantifizieren.

Maynard, Rostaing et al. (2021) untersuchten Synapsen-Fläche in Form und Anzahl mit der GlyR-Kopienzahl pro Synapse sowie die GlyR-Packungsdichte innerhalb der Synapse. Dorsales und ventrales Horn des Rückenmarks wurden dafür vergleichend ausgewertet. Interessanterweise fand sich im Wildtyp für das dorsale Horn eine kleinere Synapsen-Fläche mit einer erhöhten Synapsen-Anzahl, sowie eine reduzierte GlyR-Kopienzahl pro Synapse. Im ventralen Horn hingegen wurde eine größere und variabelere Synapsen-Fläche ermittelt. Die Synapsen-Anzahl war ventral reduziert und für den GlyR zeigte sich eine erhöhte Kopienzahl pro Synapse. Die GlyR-Packungsdichte blieb jedoch konstant, so dass ein mittlerer Wert von $2000 \mu\text{m}^2$ errechnet wurde.

Ähnliche Untersuchungen an *eos* heterozygoten *oscillator* Mäusen (*Glr^b^{eos/eos} x Glra1^{spd-ot/+}*) zeigten allerdings im ventralen Horn eine verringerte ventrale Synapsen-Fläche und eine ebenso erniedrigte GlyR-Kopienzahl pro Synapse (Maynard, Rostaing et al. 2021). Die GlyR-Packungsdichte hingegen war jedoch gleich. Die funktionellen Defizite der heterozygoten *oscillator* Maus könnten somit auf eine geringere Synapse-Fläche und bei gleicher GlyR-Packungsdichte auf weniger GlyR-Kopienzahlen pro Synapse beruhen. Die Synapsen-Anzahl im ventralen Horn des *eos* heterozygoten *oscillator* Tiers (*Glr^b^{eos/eos} x Glra1^{spd-ot/+}*) zeigte keine Abweichung vom Wildtyp (*Glr^b^{eos/eos} x Glra1^{+/+}*).

Die Ergebnisse der *oscillator* Mutation deuten darauf hin, dass sich im ventralen Horn die Synapsen-Fläche und die GlyR-Kopienzahl pro Synapse in Rückenmarksschnitten verringert, die Synapsen-Anzahl aber unverändert im Vergleich zum Wildtyp bleibt. Im *shaky* Mausmodell hingegen wurde in dieser Arbeit in kultivierten Rückenmarksneuronen eine verminderte Synapsin-Expression für homozygote Tiere ermittelt, was eine veränderte Synapsen-Anzahl bedingen könnte. Ob dies ebenfalls zu verringerter Anzahl präsynaptischer GlyR Komplexe an der Synapse führt, kann nur

durch Experimente mittels hochauflösender Mikroskopie wie bei Maynard, Rostaing et al. (2021) an ventralen Rückenmarksschnitten der *shaky* Maus näher betrachtet werden.

5.4 Expressionsmuster in Rückenmarksschnitten sind äquivalent zu *in vitro*

Rückenmarksneuronen-Kulturen

Rückenmarksschnitte wurden als Vergleich zu den Ergebnissen der Neuronenkulturen des Rückenmarks durchgeführt und hinsichtlich der Expression der GlyR-Untereinheiten betrachtet. Rückenmarksschnitte zeigten hier für das homozygote *shaky* Tier eine deutlich reduzierte β^{eos} und Gephyrin Expression, wobei kein Verlust der GlyR- $\alpha 1$ -Untereinheit detektiert wurde. Dies deckt sich mit den quantitativen Untersuchungen an Rückenmarkneuronen von Tieren des gleichen Genotyps dieser Arbeit. Daraus resultierend wurden bei den Rückenmarksschnitten auch verminderte Kollokalisierungen von Gephyrin/ $\alpha 1$, β^{eos} / $\alpha 1$ und β^{eos} / Gephyrin in *Glr $\beta^{eos/eos}$ x Glra1 $^{sh/sh}$* im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. Dies stimmt ebenso mit den Analysen der Rückenmarksneurone dieser Arbeit überein.

6. Zusammenfassung

Der Glycin-Rezeptor ist Teil der inhibitorischen liganden-gesteuerten Ionenkanäle im ZNS und wird am stärksten im adulten Rückenmark sowie im Hirnstamm exprimiert. In der Nerv-Muskel-Synapse sind GlyR für die rekurrente Hemmung der Motoneuronen wichtig und steuern das Gleichgewicht zwischen Erregung und Hemmung der Muskelzellen. Für die glycinerge Neurotransmission sind neben den präsynaptischen GlyR $\alpha 1$ insbesondere postsynaptische GlyR $\alpha 1/\beta$ verantwortlich. Durch Mutationen des GlyR entsteht das Erkrankungsbild der Hyperekplexie mit übersteigerter Schreckhaftigkeit, Muskelsteifheit und Apnoe. Hauptursächlich dafür sind Mutationen im *GLRA1*-Gen. Die *shaky* Maus stellt ein gutes Modell zur Erforschung dieser seltenen Erkrankung dar.

Die *shaky* Missense-Mutation Q177K in der extrazellulären $\beta 8$ - $\beta 9$ Schleife der Glycin-Rezeptor- $\alpha 1$ -Untereinheit zeigte strukturell ein gestörtes Wasserstoffbrückennetzwerk. Funktionell konnten eingeschränkt leitfähige Ionenkanäle identifiziert werden. Der letale Phänotyp äußert sich beim homozygoten *shaky* Tier durch Schrecksymptome mit einem einhergehenden zunehmenden Gewichtsverlust. Die Quantifizierung der Oberflächenexpression deutete auf einen Verlust synaptischer GlyR $\alpha 1/\beta$ hin. Aussagen bezüglich der GlyR- β -Untereinheit, die Teil des synaptischen GlyR Komplexes ist, waren aufgrund fehlender stabiler Antikörper bisher nicht möglich. Das neuartige KI-Mausmodell *Glr^{eos}* exprimiert endogen fluoreszierende β -Untereinheiten und ermöglicht damit erstmalig eine Betrachtung der GlyR- β -Expression in Tiermodellen der *Startle* Erkrankung.

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen der *shaky* Mutation auf die Interaktion mit der β -Untereinheit und Gephyrin zu erforschen. Dafür wurden Markerproteine der glycinergen Synapse in Rückenmarksneuronen der Kreuzung *Glr^{eos} x Glra1^{sh}* gefärbt und quantifiziert. Die durchgeführte Gewichtsbestimmung der Nachkommen im zeitlichen Verlauf zeigte keinen Einfluss der eingefügten mEos4b-Sequenz auf das Körpergewicht der Tiere und schließt damit funktionelle Einschränkungen bedingt durch die mEos4b-Sequenz aus. Zur Verstärkung des β^{eos} -Signals wurde ein Antikörper verwendet. Die Quantifizierung der GlyR- β -Untereinheit an Rückenmarksneuronen

zeigte für homozygote *shaky* Tiere im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduzierte β^{eos} Oberflächenexpressionen in Gephyrin Clustern sowie signifikant erniedrigte Kolokalisationen von Gephyrin/ $\alpha 1$, β^{eos} / $\alpha 1$ und β^{eos} /Gephyrin. Die mutierte GlyR- $\alpha 1$ -Untereinheit wurde hingegen vermehrt an der Oberfläche in *shaky* Tieren exprimiert. Die Ergebnisse der Rückenmarksschnitte unterstützen diese Befunde aus den Primärneuronen. Die Untersuchung der Präsynapse erbrachte für *Glr $\beta^{\text{eos/eos}}$ x Glra1 $^{\text{sh/sh}}$* eine signifikant verminderte Synapsin und Synapsin/ $\alpha 1$ Expression.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern die Daten früherer Arbeiten zur *shaky* Maus und zeigen einen starken Verlust synaptischer GlyR $\alpha 1 / \beta$ an der Oberfläche von Motoneuronen. Ein möglicher kompensatorischer Versuch durch erhöhte $\alpha 1$ Expression bleibt infolge der Funktionsbeeinträchtigung dieser mutierten GlyR- $\alpha 1$ Rezeptoren erfolglos mit letalem Ausgang. In vorherigen Arbeiten wurde vermutet, dass die Mutation in der extrazellulären Bindungsstelle in der Lage ist, Konformationsänderungen in die TM3-TM4-Schleifenstruktur zu übertragen und dadurch die Gephyrin Bindung und synaptische Verankerung zu stören. Die Daten dieser Arbeit stützen diese Annahme und weisen darüber hinaus auf eine gestörte Rezeptorkomplexbindung hin. Die vorliegende Arbeit trägt somit zum besseren Verständnis der *Startle* Erkrankung auf synaptischer Ebene bei.

Summary

The glycine receptor belongs to the inhibitory ligand-gated ion channels in the CNS and is most strongly expressed in the adult spinal cord and brainstem. In the nerve-muscle synapse, GlyR are important for recurrent inhibition of motor neurons and control the balance between excitation and inhibition of muscle cells. In addition to the presynaptic GlyR $\alpha 1$, postsynaptic GlyR $\alpha 1/\beta$ in particular are responsible for glycinergic neurotransmission. Mutations of the GlyR lead to the clinical symptoms of hyperekplexia with excessive startle responses, muscle stiffness and apnea. The main causes are mutations in the *GLRA1* gene. The *shaky* mouse is a good model for studying this rare disease.

The *shaky* missense mutation Q177K, located in the extracellular $\beta 8$ - $\beta 9$ loop of the glycine receptor $\alpha 1$ subunit, showed a disrupted hydrogen bond network at the structural level. Functionally restricted conductive ion channels could be identified. The lethal phenotype in the homozygous *shaky* mouse is manifested by startle symptoms with accompanied increasing weight loss. Quantification of surface expression indicated a loss of synaptic GlyR $\alpha 1/\beta$. So far, statements regarding the GlyR- β -subunit which is part of the synaptic receptor complex had not been possible due to the lack of stable antibodies. The novel KI mouse model *Glr^{eos}* endogenously expresses fluorescent β -subunits and thus allows an observation of GlyR β -expression in animal models of startle disease for the first time.

The aim of this study was to explore the effects of the *shaky* mutation on the interaction with the β -subunit and gephyrin. To this aim, marker proteins of the glycinergic synapse were stained and quantified in spinal cord neurons of *Glr^{eos} x Glra1^{sh}*. The performed weight determination of the littermates over time showed no influence of the inserted mEos4b-sequence on the bodyweight of the animals, thus ruling out functional limitations caused by the mEos4b-sequence. An antibody was used to amplify the β^{eos} signal. Quantification of the GlyR- β - subunit at spinal cord neurons demonstrated significantly reduced β^{eos} surface expressions in gephyrin clusters as well as significantly decreased colocalisations of gephyrin/ $\alpha 1$, $\beta^{eos}/\alpha 1$ and $\beta^{eos}/$ gephyrin for homozygous *shaky* animals compared to wild type. The mutant GlyR- $\alpha 1$ subunit exhibited enhanced expression at

the surface in isolated spinal cord neurons from *shaky* animals. Results from spinal cord tissues supported these findings from primary neurons. Examination of presynapses revealed significantly decreased synapsin and synapsin/ $\alpha 1$ expression for *Glr β ^{eos/eos} x Glra1^{sh/sh}*.

The results of this study extend the data of previous studies on the *shaky* mouse, showing a severe loss of synaptic GlyR $\alpha 1/\beta$ at the surface of motor neurons. A potential compensatory attempt through increased $\alpha 1$ expression remains unsuccessful with a lethal outcome due to the functional impairment of these mutated GlyR $\alpha 1$ receptors. Previous studies have suggested that the mutation in the extracellular binding site is able to transduce conformational changes in the TM3-TM4 loop structure, thereby disrupting gephyrin binding and synaptic integration. The data in this study support this hypothesis and furthermore indicate a disrupted receptor complex binding. The present study thus contributes to a better understanding of Startle disease at the synaptic level.

7. Literaturverzeichnis

Andermann, F., D. L. Keene, E. Andermann and L. F. Quesney (1980). "Startle disease or hyperekplexia: further delineation of the syndrome." Brain **103**(4): 985-997.

Avila, A., L. Nguyen and J. M. Rigo (2013). "Glycine receptors and brain development." Front Cell Neurosci **7**: 184.

Avila, A., P. M. Vidal, S. Tielens, G. Morelli, S. Laguesse, R. J. Harvey, J. M. Rigo and L. Nguyen (2014). "Glycine receptors control the generation of projection neurons in the developing cerebral cortex." Cell Death Differ **21**(11): 1696-1708.

Bakker, M. J., J. G. van Dijk, A. M. van den Maagdenberg and M. A. Tijssen (2006). "Startle syndromes." Lancet Neurol **5**(6): 513-524.

Beato, M., P. J. Groot-Kormelink, D. Colquhoun and L. G. Sivilotti (2004). "The activation mechanism of alpha1 homomeric glycine receptors." J Neurosci **24**(4): 895-906.

Bode, A. and J. W. Lynch (2014). "The impact of human hyperekplexia mutations on glycine receptor structure and function." Mol Brain **7**: 2.

Brams, M., A. Pandya, D. Kuzmin, R. van Elk, L. Krijnen, J. L. Yakel, V. Tsetlin, A. B. Smit and C. Ulens (2011). "A structural and mutagenic blueprint for molecular recognition of strychnine and d-tubocurarine by different cys-loop receptors." PLoS Biol **9**(3): e1001034.

Breitinger, U., K. Weinländer, Y. Pechmann, G. Langlhofer, R. Enz, C. M. Becker, H. Sticht, M. Kneussel, C. Villmann and H. G. Breitinger (2021). "A proline-rich motif in the large intracellular loop of the glycine receptor $\alpha 1$ subunit interacts with the Pleckstrin homology domain of collybistin." J Adv Res **29**: 95-106.

Buckwalter, M. S., S. A. Cook, M. T. Davisson, W. F. White and S. A. Camper (1994). "A frameshift mutation in the mouse alpha 1 glycine receptor gene (Gral1) results in progressive neurological symptoms and juvenile death." Hum Mol Genet **3**(11): 2025-2030.

Bult, C. J., J. T. Eppig, J. A. Blake, J. A. Kadin and J. E. Richardson (2013). "The mouse genome database: genotypes, phenotypes, and models of human disease." Nucleic Acids Res **41**(Database issue): D885-891.

Burzomato, V., M. Beato, P. J. Groot-Kormelink, D. Colquhoun and L. G. Sivilotti (2004). "Single-channel behavior of heteromeric alpha1beta glycine receptors: an attempt to detect a conformational change before the channel opens." J Neurosci **24**(48): 10924-10940.

Chapdelaine, T., V. Hakim, A. Triller, J. Ranft and C. G. Specht (2021). "Reciprocal stabilization of glycine receptors and gephyrin scaffold proteins at inhibitory synapses." Biophys J **120**(5): 805-817.

Chung, S. K., A. Bode, T. D. Cushion, R. H. Thomas, C. Hunt, S. E. Wood, W. O. Pickrell, C. J. Drew, S. Yamashita, R. Shiang, S. Leiz, A. C. Longardt, V. Raile, B. Weschke, R. D. Puri, I. C. Verma, R. J. Harvey, D. D. Ratnasinghe, M. Parker, C. Rittey, A. Masri, L. Lingappa, O. W. Howell, J. F. Vanbellinghen, J. G. Mullins, J. W. Lynch and M. I. Rees (2013). "GLRB is the third major gene of effect in hyperekplexia." Hum Mol Genet **22**(5): 927-940.

Chung, S. K., J. F. Vanbellinghen, J. G. Mullins, A. Robinson, J. Hantke, C. L. Hammond, D. F. Gilbert, M. Freilinger, M. Ryan, M. C. Kruer, A. Masri, C. Gurses, C. Ferrie, K. Harvey, R. Shiang, J. Christodoulou, F. Andermann, E. Andermann, R. H. Thomas, R. J. Harvey, J. W. Lynch and M. I. Rees (2010). "Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive GLRA1 mutations in hyperekplexia." J Neurosci **30**(28): 9612-9620.

Davies, J. S., S. K. Chung, R. H. Thomas, A. Robinson, C. L. Hammond, J. G. Mullins, E. Carta, B. R. Pearce, K. Harvey, R. J. Harvey and M. I. Rees (2010). "The glycinergic system in human startle disease: a genetic screening approach." Front Mol Neurosci **3**: 8.

Del Pino, I., D. Koch, R. Schemm, B. Qualmann, H. Betz and I. Paarmann (2014). "Proteomic analysis of glycine receptor β subunit (GlyR β)-interacting proteins: evidence for syndapin I regulating synaptic glycine receptors." J Biol Chem **289**(16): 11396-11409.

Du, J., W. Lü, S. Wu, Y. Cheng and E. Gouaux (2015). "Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy." Nature **526**(7572): 224-229.

Dumoulin, A., A. Triller and M. Kneussel (2009). "Cellular transport and membrane dynamics of the glycine receptor." Front Mol Neurosci **2**: 28.

Duricic, N., A. G. Godin, C. M. Wever, C. D. Heyes, M. Lakadamyali and J. A. Dent (2012). "Stoichiometry of the human glycine receptor revealed by direct subunit counting." J Neurosci **32**(37): 12915-12920.

Fischhaber, N., J. Faber, E. Bakirci, P. D. Dalton, S. Budday, C. Villmann and N. Schaefer (2021). "Spinal Cord Neuronal Network Formation in a 3D Printed Reinforced Matrix-A Model System to Study Disease Mechanisms." Adv Healthc Mater **10**(19): e2100830.

Gao, B. X., C. Stricker and L. Ziskind-Conhaim (2001). "Transition from GABAergic to glycinergic synaptic transmission in newly formed spinal networks." J Neurophysiol **86**(1): 492-502.

Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.

Grenningloh, G., I. Pribilla, P. Prior, G. Multhaup, K. Beyreuther, O. Taleb and H. Betz (1990). "Cloning and expression of the 58 kd beta subunit of the inhibitory glycine receptor." Neuron **4**(6): 963-970.

Grenningloh, G., A. Rienitz, B. Schmitt, C. Methfessel, M. Zensen, K. Beyreuther, E. D. Gundelfinger and H. Betz (1987). "The strychnine-binding subunit of the glycine receptor shows homology with nicotinic acetylcholine receptors." Nature **328**(6127): 215-220.

- Grenningloh, G., V. Schmieden, P. R. Schofield, P. H. Seeburg, T. Siddique, T. K. Mohandas, C. M. Becker and H. Betz (1990). "Alpha subunit variants of the human glycine receptor: primary structures, functional expression and chromosomal localization of the corresponding genes." Embo j **9**(3): 771-776.
- Griffon, N., C. Büttner, A. Nicke, J. Kuhse, G. Schmalzing and H. Betz (1999). "Molecular determinants of glycine receptor subunit assembly." Embo j **18**(17): 4711-4721.
- Groeneweg, F. L., C. Trattnig, J. Kuhse, R. A. Nawrotzki and J. Kirsch (2018). "Gephyrin: a key regulatory protein of inhibitory synapses and beyond." Histochem Cell Biol **150**(5): 489-508.
- Grudzinska, J., R. Schemm, S. Haeger, A. Nicke, G. Schmalzing, H. Betz and B. Laube (2005). "The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors." Neuron **45**(5): 727-739.
- Handford, C. A., J. W. Lynch, E. Baker, G. C. Webb, J. H. Ford, G. R. Sutherland and P. R. Schofield (1996). "The human glycine receptor beta subunit: primary structure, functional characterisation and chromosomal localisation of the human and murine genes." Brain Res Mol Brain Res **35**(1-2): 211-219.
- Hanus, C., C. Vannier and A. Triller (2004). "Intracellular association of glycine receptor with gephyrin increases its plasma membrane accumulation rate." J Neurosci **24**(5): 1119-1128.
- Harvey, R. J., U. B. Depner, H. Wässle, S. Ahmadi, C. Heindl, H. Reinold, T. G. Smart, K. Harvey, B. Schütz, O. M. Abo-Salem, A. Zimmer, P. Poisbeau, H. Welzl, D. P. Wolfer, H. Betz, H. U. Zeilhofer and U. Müller (2004). "GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization." Science **304**(5672): 884-887.
- Heinze, L., R. J. Harvey, S. Haverkamp and H. Wässle (2007). "Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha4 subunit." J Comp Neurol **500**(4): 693-707.
- Helenius, A. and M. Aebi (2004). "Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum." Annu Rev Biochem **73**: 1019-1049.
- Holland, K. D., M. T. Fleming, S. Cheek, J. L. Moran, D. R. Beier and M. H. Meisler (2006). "De novo exon duplication in a new allele of mouse Grl1 (spasmodic)." Genetics **174**(4): 2245-2247.
- Huang, X., H. Chen, K. Michelsen, S. Schneider and P. L. Shaffer (2015). "Crystal structure of human glycine receptor- α 3 bound to antagonist strychnine." Nature **526**(7572): 277-280.
- Janzen, D., N. Schaefer, C. Delto, H. Schindelin and C. Villmann (2017). "The GlyR Extracellular β 8- β 9 Loop - A Functional Determinant of Agonist Potency." Front Mol Neurosci **10**: 322.

- Jeong, H. J., I. S. Jang, A. J. Moorhouse and N. Akaike (2003). "Activation of presynaptic glycine receptors facilitates glycine release from presynaptic terminals synapsing onto rat spinal sacral dorsal commissural nucleus neurons." J Physiol **550**(Pt 2): 373-383.
- Jonsson, S., J. Morud, C. Pickering, L. Adermark, M. Ericson and B. Söderpalm (2012). "Changes in glycine receptor subunit expression in forebrain regions of the Wistar rat over development." Brain Res **1446**: 12-21.
- Kasaragod, V. B. and H. Schindelin (2018). "Structure-Function Relationships of Glycine and GABA(A) Receptors and Their Interplay With the Scaffolding Protein Gephyrin." Front Mol Neurosci **11**: 317.
- Kim, E. Y., N. Schrader, B. Smolinsky, C. Bedet, C. Vannier, G. Schwarz and H. Schindelin (2006). "Deciphering the structural framework of glycine receptor anchoring by gephyrin." Embo j **25**(6): 1385-1395.
- Kins, S., H. Betz and J. Kirsch (2000). "Collybistin, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin." Nat Neurosci **3**(1): 22-29.
- Kirsch, J., I. Wolters, A. Triller and H. Betz (1993). "Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons." Nature **366**(6457): 745-748.
- Kling, C., M. Koch, B. Saul and C. M. Becker (1997). "The frameshift mutation oscillator (Gla1(spd-ot)) produces a complete loss of glycine receptor alpha1-polypeptide in mouse central nervous system." Neuroscience **78**(2): 411-417.
- Kneussel, M. and H. Betz (2000). "Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations." J Physiol **525 Pt 1**(Pt 1): 1-9.
- Kuhse, J., B. Laube, D. Magalei and H. Betz (1993). "Assembly of the inhibitory glycine receptor: identification of amino acid sequence motifs governing subunit stoichiometry." Neuron **11**(6): 1049-1056.
- Langlhofer, G., N. Schaefer, H. M. Maric, A. Keramidas, Y. Zhang, P. Baumann, R. Blum, U. Breiting, K. Strømgaard, A. Schlosser, M. M. Kessels, D. Koch, B. Qualmann, H. G. Breiting, J. W. Lynch and C. Villmann (2020). "A Novel Glycine Receptor Variant with Startle Disease Affects Syndapin I and Glycinergic Inhibition." J Neurosci **40**(25): 4954-4969.
- Liu, Q. and M. T. Wong-Riley (2013). "Postnatal development of glycine receptor subunits $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, and β immunoreactivity in multiple brain stem respiratory-related nuclear groups of the rat." Brain Res **1538**: 1-16.
- Lynch, J. W. (2004). "Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel." Physiol Rev **84**(4): 1051-1095.
- Lynch, J. W. (2009). "Native glycine receptor subtypes and their physiological roles." Neuropharmacology **56**(1): 303-309.

- Maas, C., N. Tagnaouti, S. Loebrich, B. Behrend, C. Lappe-Siefke and M. Kneussel (2006). "Neuronal cotransport of glycine receptor and the scaffold protein gephyrin." J Cell Biol **172**(3): 441-451.
- Malosio, M. L., G. Grenningloh, J. Kuhse, V. Schmieden, B. Schmitt, P. Prior and H. Betz (1991). "Alternative splicing generates two variants of the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor." J Biol Chem **266**(4): 2048-2053.
- Malosio, M. L., B. Marquèze-Pouey, J. Kuhse and H. Betz (1991). "Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain." Embo j **10**(9): 2401-2409.
- Maynard, S. A., P. Rostaing, N. Schaefer, O. Gemin, A. Candat, A. Dumoulin, C. Villmann, A. Triller and C. G. Specht (2021). "Identification of a stereotypic molecular arrangement of endogenous glycine receptors at spinal cord synapses." Elife **10**.
- Mense, S. (2014). Nervensystem: Grundlagen. Duale Reihe: Anatomie. A. Bob and K. Bob. Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG: 194-220.
- Meyer, G., J. Kirsch, H. Betz and D. Langosch (1995). "Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit." Neuron **15**(3): 563-572.
- Mülhardt, C., M. Fischer, P. Gass, D. Simon-Chazottes, J. L. Guénet, J. Kuhse, H. Betz and C. M. Becker (1994). "The spastic mouse: aberrant splicing of glycine receptor beta subunit mRNA caused by intronic insertion of L1 element." Neuron **13**(4): 1003-1015.
- Nikolic, Z., B. Laube, R. G. Weber, P. Lichter, P. Kioschis, A. Poustka, C. Mülhardt and C. M. Becker (1998). "The human glycine receptor subunit alpha3. Glra3 gene structure, chromosomal localization, and functional characterization of alternative transcripts." J Biol Chem **273**(31): 19708-19714.
- Patrizio, A., M. Renner, R. Pizzarelli, A. Triller and C. G. Specht (2017). "Alpha subunit-dependent glycine receptor clustering and regulation of synaptic receptor numbers." Sci Rep **7**(1): 10899.
- Pfeiffer, F., D. Graham and H. Betz (1982). "Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord." J Biol Chem **257**(16): 9389-9393.
- Pribilla, I., T. Takagi, D. Langosch, J. Bormann and H. Betz (1992). "The atypical M2 segment of the beta subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels." Embo j **11**(12): 4305-4311.
- Rauschenberger, V., N. von Wardenburg, N. Schaefer, K. Ogino, H. Hirata, C. Lillesaar, C. J. Kluck, H. M. Meinck, M. Bormann, A. Weishaupt, K. Doppler, J. Wickel, C. Geis, C. Sommer and C. Villmann (2020). "Glycine Receptor Autoantibodies Impair Receptor Function and Induce Motor Dysfunction." Ann Neurol **88**(3): 544-561.
- Sato, K., J. H. Zhang, T. Saika, M. Sato, K. Tada and M. Tohyama (1991). "Localization of glycine receptor alpha 1 subunit mRNA-containing neurons in the rat brain: an analysis using in situ hybridization histochemistry." Neuroscience **43**(2-3): 381-395.

- Saul, B., V. Schmieden, C. Kling, C. Mülhardt, P. Gass, J. Kuhse and C. M. Becker (1994). "Point mutation of glycine receptor alpha 1 subunit in the spasmodic mouse affects agonist responses." FEBS Lett **350**(1): 71-76.
- Schaefer, N., A. Berger, J. van Brederode, F. Zheng, Y. Zhang, S. Leacock, L. Littau, S. Jablonka, S. Malhotra, M. Topf, F. Winter, D. Davydova, J. W. Lynch, C. J. Paige, C. Alzheimer, R. J. Harvey and C. Villmann (2017). "Disruption of a Structurally Important Extracellular Element in the Glycine Receptor Leads to Decreased Synaptic Integration and Signaling Resulting in Severe Startle Disease." J Neurosci **37**(33): 7948-7961.
- Schaefer, N., R. J. Harvey and C. Villmann (2022). "Startle Disease: New Molecular Insights into an Old Neurological Disorder." Neuroscientist: 10738584221104724.
- Schaefer, N., G. Langlhofer, C. J. Kluck and C. Villmann (2013). "Glycine receptor mouse mutants: model systems for human hyperekplexia." Br J Pharmacol **170**(5): 933-952.
- Schaefer, N., V. Roemer, D. Janzen and C. Villmann (2018). "Impaired Glycine Receptor Trafficking in Neurological Diseases." Front Mol Neurosci **11**: 291.
- Schaefer, N., N. Vogel and C. Villmann (2012). "Glycine receptor mutants of the mouse: what are possible routes of inhibitory compensation?" Front Mol Neurosci **5**: 98.
- Schaefer, N., F. Zheng, J. van Brederode, A. Berger, S. Leacock, H. Hirata, C. J. Paige, R. J. Harvey, C. Alzheimer and C. Villmann (2018). "Functional Consequences of the Postnatal Switch From Neonatal to Mutant Adult Glycine Receptor α 1 Subunits in the Shaky Mouse Model of Startle Disease." Front Mol Neurosci **11**: 167.
- Schrader, N., E. Y. Kim, J. Winking, J. Paulukat, H. Schindelin and G. Schwarz (2004). "Biochemical characterization of the high affinity binding between the glycine receptor and gephyrin." J Biol Chem **279**(18): 18733-18741.
- Schröder, S., W. Hoch, C. M. Becker, G. Grenningloh and H. Betz (1991). "Mapping of antigenic epitopes on the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor." Biochemistry **30**(1): 42-47.
- Shimizu-Okabe, C., S. Kobayashi, J. Kim, Y. Kosaka, M. Sunagawa, A. Okabe and C. Takayama (2022). "Developmental Formation of the GABAergic and Glycinergic Networks in the Mouse Spinal Cord." Int J Mol Sci **23**(2).
- Specht, C. G., I. Izeddin, P. C. Rodriguez, M. El Beheiry, P. Rostaing, X. Darzacq, M. Dahan and A. Triller (2013). "Quantitative nanoscopy of inhibitory synapses: counting gephyrin molecules and receptor binding sites." Neuron **79**(2): 308-321.
- Suhren, O., G. W. Bruyn and J. A. Tyuynman (1966). "Hyperekplexia - a hereditary startle syndrome." Journal Neurol Sci **3**: 577-605.
- Thomas, R. H., S. K. Chung, S. E. Wood, T. D. Cushion, C. J. Drew, C. L. Hammond, J. F. Vanbellin ghen, J. G. Mullins and M. I. Rees (2013). "Genotype-phenotype correlations

in hyperekplexia: apnoeas, learning difficulties and speech delay." *Brain* **136**(Pt 10): 3085-3095.

Tijssen, M. A., M. N. Vergouwe, J. G. van Dijk, M. Rees, R. R. Frants and P. Brown (2002). "Major and minor form of hereditary hyperekplexia." *Mov Disord* **17**(4): 826-830.

Traka, M., K. L. Seburn and B. Popko (2006). "Nmf11 is a novel ENU-induced mutation in the mouse glycine receptor alpha 1 subunit." *Mamm Genome* **17**(9): 950-955.

Tröger, J., E. Seemann, R. Heintzmann, M. M. Kessels and B. Qualmann (2021). "Spinal cord synaptic plasticity by GlyR β release from receptor fields and syndapin-dependent uptake." *bioRxiv*: 2021.2008.2018.456917.

Tröger, J., E. Seemann, R. Heintzmann, M. M. Kessels and B. Qualmann (2022). "Spinal cord synaptic plasticity by GlyR β release from receptor fields and syndapin I-dependent uptake." *J Neurosci* **42**(35): 6706-6723.

Turecek, R. and L. O. Trussell (2001). "Presynaptic glycine receptors enhance transmitter release at a mammalian central synapse." *Nature* **411**(6837): 587-590.

van der Weyden, L. and A. Bradley (2006). "Mouse chromosome engineering for modeling human disease." *Annu Rev Genomics Hum Genet* **7**: 247-276.

Vogel, N., C. J. Kluck, N. Melzer, S. Schwarzinger, U. Breitinger, S. Seeber and C. M. Becker (2009). "Mapping of disulfide bonds within the amino-terminal extracellular domain of the inhibitory glycine receptor." *J Biol Chem* **284**(52): 36128-36136.

Weltzien, F., C. Puller, G. A. O'Sullivan, I. Paarmann and H. Betz (2012). "Distribution of the glycine receptor β -subunit in the mouse CNS as revealed by a novel monoclonal antibody." *J Comp Neurol* **520**(17): 3962-3981.

Xiong, W., S. R. Chen, L. He, K. Cheng, Y. L. Zhao, H. Chen, D. P. Li, G. E. Homanics, J. Peever, K. C. Rice, L. G. Wu, H. L. Pan and L. Zhang (2014). "Presynaptic glycine receptors as a potential therapeutic target for hyperekplexia disease." *Nat Neurosci* **17**(2): 232-239.

Yang, X., H. Le Corronec, P. Legendre, A. Triller and C. G. Specht (2021). "Differential regulation of glycinergic and GABAergic nanocolumns at mixed inhibitory synapses." *EMBO Rep* **22**(7): e52154.

Yang, Z., E. Taran, T. I. Webb and J. W. Lynch (2012). "Stoichiometry and subunit arrangement of $\alpha 1\beta$ glycine receptors as determined by atomic force microscopy." *Biochemistry* **51**(26): 5229-5231.

Yu, H., X. C. Bai and W. Wang (2021). "Characterization of the subunit composition and structure of adult human glycine receptors." *Neuron* **109**(17): 2707-2716.e2706.

Zafra, F., C. Aragón, L. Olivares, N. C. Danbolt, C. Giménez and J. Storm-Mathisen (1995). "Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells." J Neurosci **15**(5 Pt 2): 3952-3969.

Zeilhofer, H. U., B. Studler, D. Arabadzisz, C. Schweizer, S. Ahmadi, B. Layh, M. R. Bösl and J. M. Fritschy (2005). "Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice." J Comp Neurol **482**(2): 123-141.

Zhu, H. and E. Gouaux (2021). "Architecture and assembly mechanism of native glycine receptors." Nature **599**(7885): 513-517.

8. Appendix

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
Art. Nr.	Artikelnummer
Asc-1	Alanin-Serin-Cystein-1
bp	Basenpaare
CLRs	Cys-Loop-Rezeptoren
cm	Zentimeter
CTRL	<i>control</i> (Kontrolle)
C-Terminus	COOH-Terminus
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DW	Differenzwert
DZ	Dendriten Anzahl
E	Embryonaltag
ECD	<i>extracellular domain</i> (extrazelluläre Domäne)
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS/FCS	Fetal Bovine Serum / Fetal Calf Serum
FSP	Filterspitzen
gDNA	genomische DNA
ge./ gep	Gephyrin
GlyR	Glycin-Rezeptor
GlyT2	Glycin-Transporter 2
H / HEK	HEK293-Zellen (<i>human embryonal kidney</i>)
HBS-Puffer	HEPES gepufferte Kochsalzlösung
HZ	Homozygot
ICD	<i>intracellular domain</i> (intrazelluläre Schleife)
K	Lysin
kDA	Kilodalton
KI	<i>knock-in</i>
KO	<i>knock-out</i>
LGICs	<i>ligand-gated ion channels</i> (liganden-gesteuerter Ionenkanal)
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer (micron)
μ M	Mikromolar

min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MW	Mittelwert
<i>MW-Test</i>	<i>Mann-Whitney-Test</i>
NB	Neurobasalmedium
ng/ μ l	Nanogramm pro Mikroliter
NGS	<i>normal-goat-serum</i> (Ziegenserum)
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
N-Terminus	NH ₂ -Terminus
NV	Normalverteilung
<i>OWA-T</i>	<i>One-Way-Anova-Test</i>
P	Postnataler Tag
pDNA	Plasmid-DNA
p-Wert	p aus dem Lateinischen <i>probabilitas</i> = Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
Q	Glutamin
RMN	Rückenmarksneurone
RMS	Rückenmarksschnitt
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	signifikant
Sdp I	Syndapin I
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler
<i>sh</i>	<i>shaky</i>
<i>spa</i>	<i>spastic</i>
<i>spd</i>	<i>spasmodic</i>
<i>spd^{ot}</i>	<i>oscillator</i>
SPS	<i>Stiff-Person-Syndrom</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tens	Tris-EDTA-NaCl-SDS
TM	Transmembrandomäne
TS	Tierstall

UE	Untereinheit
VD	Verdünnung
VGAT/VIAAT	vesikulärer inhibitorischer Aminosäuretransporter
WT	Wildtyp

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Glycin-Rezeptor Aufbau	3
Abbildung 2 N-Terminus des Glycin-Rezeptors.....	4
Abbildung 3 GlyR regulieren Nerv-Muskel-Kreislauf	13
Abbildung 4 Nachweis des GlyR in HEK293-Zellen	51
Abbildung 5 Die <i>shaky</i> Mutation hat in HEK293-Zellen eine verringerte GlyR- α 1 Oberflächenexpression zur Folge.....	52
Abbildung 6 Immunzytochemische Färbung von Rückenmarksneuronen CD-1 (Teil 1)	54
Abbildung 7 Immunzytochemische Färbung von Rückenmarksneuronen CD-1 (Teil 2)	55
Abbildung 8 Immunzytochemische Färbung von Rückenmarksneuronen <i>GlyT2-eGFP</i>	56
Abbildung 9 Immunzytochemische Färbung von Rückenmarksneuronen <i>Glrb^{eos/eos} x Glra1^{+/+}</i> ..58	
Abbildung 10 Immunzytochemische Färbung von Rückenmarksneuronen <i>Glrb^{+/eos} x Glra1^{+/sh}</i> ..59	
Abbildung 11 Die <i>Glrb^{eos}</i> -Genotypen der Linie <i>Glrb^{eos} x Glra1^{sh}</i> unterscheiden sich nicht im Gewicht	61
Abbildung 12 Die <i>Glra1^{sh}</i> -Genotypen der Linie <i>Glrb^{eos} x Glra1^{sh}</i> weichen im Gewicht voneinander ab	62
Abbildung 13 Kreuzungsschema und Genotyp Nachweis mittels PCR	64
Abbildung 14 Expression von <i>Glrb^{eos/eos}</i> in Rückenmarksneuronen – (Teil 1).....	67
Abbildung 15 Expression von <i>Glrb^{eos/eos}</i> in Rückenmarksneuronen – (Teil 2).....	68
Abbildung 16 Expression von <i>Glrb^{eos/eos}</i> in Rückenmarksneuronen – (Teil 3)	69
Abbildung 17 Expression von Markerproteinen in Rückenmarksneuronen <i>Glrb^{eos/eos}</i> – (Teil 4) ..70	
Abbildung 18 Synapsin ist in homozygoten <i>shaky</i> Neuronen der Linie <i>Glra1^{sh}</i> vermindert.....	73
Abbildung 19 Gephyrin ist in homozygoten <i>shaky</i> Neuronen der Linie <i>Glra1^{sh}</i> stark verringert	75
Abbildung 20 Verminderte Expression von Synapsin in <i>shaky</i> Tieren der Hybridlinie <i>Glrb^{eos} x Glra1^{sh}</i>	77
Abbildung 21 Expression der GlyR-Untereinheiten und Gephyrin in <i>Glrb^{eos} x Glra1^{+/+}</i> Tieren ..79	
Abbildung 22 Expression der GlyR-Untereinheiten und Gephyrin in mutierten <i>shaky</i> Tieren der Hybridlinie <i>Glrb^{eos} x Glra1^{sh}</i>	80
Abbildung 23 In <i>shaky</i> Tieren der Hybridlinie <i>Glrb^{eos} x Glra1^{sh}</i> ist GlyR- α 1 vermehrt und β ^{eos} und Gephyrin vermindert exprimiert.....	82
Abbildung 24 Kolokalisationen von Proteinen der inhibitorischen Synapse sind in <i>shaky</i> Tieren der Hybridlinie <i>Glrb^{eos} x Glra1^{sh}</i> vermindert	83
Abbildung 25 Zusammenfassung der Expressionsdaten der Hybridlinie 204 <i>Glrb^{eos} x Glra1^{sh}</i> ..86	

Abbildung 26 Expression von Proteinen der inhibitorischen Synapse in Rückenmarksschnitten von Wildtyp Tieren (<i>Glr^b^{eos} x Glra¹^{+/+}</i>).....	89
Abbildung 27 Expression von Proteinen der inhibitorischen Synapse in Rückenmarksschnitten von mutierten <i>shaky</i> Tieren (<i>Glr^b^{eos} x Glra¹^{sh/sh}</i>)	90
Abbildung 28 Vergleich des Expressionsmusters der GlyR-Untereinheiten und Gephyrin in Rückenmarksschnitten der Hybridlinie <i>Glr^b^{eos} x Glra¹^{sh}</i>	92
Abbildung 29 Kontrollbilder	10
Abbildung 30 Beispiel für die Bearbeitung von Neuronenaufnahmen	13
Abbildung 31 Einteilung der Dendritenstärke (<i>Glr^b^{eos} x Glra¹^{sh}</i>) am Beispiel GlyR- α 1	26
Abbildung 32 Mittelstarke Dendriten (<i>Glr^b^{eos} x Glra¹^{sh}</i>) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β ^{eos} in I, II.....	28
Abbildung 33 Mittelstarke Dendriten (<i>Glr^b^{eos} x Glra¹^{sh}</i>) mit Kollokalisierungen von GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β ^{eos} in I, II.....	29
Abbildung 34 Alle Dendriten (<i>Glr^b^{eos} x Glra¹^{sh}</i>) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β ^{eos}	30
Abbildung 35 Alle Dendriten im Vergleich der Linie <i>Glra¹^{sh}</i> (131) und <i>Glr^b^{eos} x Glra¹^{sh}</i> (204)	31
Abbildung 36 Immunzytochemie der Linie <i>Glr^b^{eos} x Glra¹^{sh}</i> (α 1/ β /Gephyrin) – stark gefärbter Dendrit.....	32

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Chemikalien allgemein.....	24
Tabelle 2 Größenstandards.....	24
Tabelle 3 Plasmide	25
Tabelle 4 Primer	26
Tabelle 5 Enzyme.....	26
Tabelle 6 Primäre Antikörper.....	27
Tabelle 7 Sekundäre Antikörper	27
Tabelle 8 Zellkulturlösungen	28
Tabelle 9 Transfektion HEK293-Zellen.....	28
Tabelle 10 Zusammensetzung Vollmedium.....	28
Tabelle 11 DNA-Lösungen	29
Tabelle 12 Zusammensetzung Agarosegel.....	29
Tabelle 13 Lösungen/Reagenzien Immunzytochemie für Rückenmarksneurone.....	29
Tabelle 14 Lösungen/Reagenzien Immunzytochemie für Rückenmarksschnitte	29
Tabelle 15 Verbrauchsmaterialien.....	30
Tabelle 16 Geräte- und Softwareliste.....	30
Tabelle 17 Programmeinstellung für PCR	32
Tabelle 18 PCR Pipettierplan.....	32
Tabelle 19 Verdau des PCR-Produkts bei <i>Glr1^{sh}</i>	32
Tabelle 20 spezifische DNA-Basenpaare (bp)	33
Tabelle 21 Anzahl der Mäuse pro Genotyp	35
Tabelle 22 Kultivierung von HEK293-Zellen.....	37
Tabelle 23 Transfektion von HEK293-Zellen in 3 cm Schalen.....	37
Tabelle 24 Unterschiede der Präparation abhängig vom Genotyp.....	40
Tabelle 25 verwendete Antikörperkombinationen von HEK293-Zellen und Rückenmarksneuronen	44
Tabelle 26 Antikörperkombinationen Rückenmarksschnitten	45
Tabelle 27 Zuordnung der Mäuse pro Genotyp	60
Tabelle 28 Statistik der Linie 204 <i>Glr^{eos}</i> x <i>Glr1^{sh}</i> Einzelexpressionen.....	84
Tabelle 29 Statistik der Linie 204 <i>Glr^{eos}</i> x <i>Glr1^{sh}</i> Kolokalisationen	84
Tabelle 30 <i>Glr1^{sh}</i> – Genotyp mit Vergleich der <i>Glr^{eos}</i> -Varianten	11
Tabelle 31 MW mit SEM: <i>Glr1^{sh}</i> – Genotyp mit Vergleich der <i>Glr^{eos}</i> -Varianten	11
Tabelle 32 p-Werte: <i>Glr^{+/+}</i> vs. <i>Glr^{+/eos}</i> vs. <i>Glr^{eos/eos}</i> (inklusive der <i>Glr1^{sh}</i> -Varianten).....	12
Tabelle 33 MW mit SEM: <i>Glr^{+/+}</i> vs. <i>Glr^{+/eos}</i> vs. <i>Glr^{eos/eos}</i> (inklusive der <i>Glr1^{sh}</i> -Varianten)12	

Tabelle 34 p-Werte: <i>Glr1^{+/+}</i> vs. <i>Glr1^{+/^{sh}}</i> vs. <i>Glr1^{sh/sh}</i> (inklusive der <i>Glr1^{eos}</i> -Varianten)	12
Tabelle 35 MW mit SEM: <i>Glr1^{+/+}</i> vs. <i>Glr1^{+/^{sh}}</i> vs. <i>Glr1^{sh/sh}</i> (inklusive der <i>Glr1^{eos}</i> -Varianten)	12
Tabelle 36 Laser- und Bildbearbeitungsinformationen (Olympus) - Teil 1.....	14
Tabelle 37 Laser- und Bildbearbeitungsinformationen (Olympus) - Teil 2.....	15
Tabelle 38 Laser- und Bildbearbeitungsinformationen (Axio Imager 2).....	16
Tabelle 39 Zuordnung der Messbilder <i>Glr1^{sh}</i> (131) bei GlyR- α 1 und Synapsin.....	17
Tabelle 40 Zuordnung der Messbilder <i>Glr1^{sh}</i> (131) bei GlyR- α 1 und Gephyrin	17
Tabelle 41 Zuordnung der Messbilder <i>Glr1^{eos}/Glr1^{sh}</i> (204) bei GlyR- α 1 und Synapsin.....	17
Tabelle 42 Zuordnung der Messbilder <i>Glr1^{eos}/Glr1^{sh}</i> (204) bei GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β ^{eos}	18
Tabelle 43 Zuordnung der Dendriten <i>Glr1^{sh}</i> (131) bei GlyR- α 1 und Gephyrin	18
Tabelle 44 Zuordnung der Dendriten <i>Glr1^{eos}/Glr1^{sh}</i> (204) bei GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β ^{eos}	18
Tabelle 45 Mittelstarke Dendriten (<i>Glr1^{sh}</i>) mit GlyR- α 1 und Synapsin – Teil 1	19
Tabelle 46 Mittelstarke Dendriten (<i>Glr1^{sh}</i>) mit GlyR- α 1 und Synapsin – Teil 2	20
Tabelle 47 Mittelstarke Dendriten (<i>Glr1^{sh}</i>) mit GlyR- α 1 und Gephyrin – Teil 1.....	20
Tabelle 48 Mittelstarke Dendriten (<i>Glr1^{sh}</i>) mit GlyR- α 1 und Gephyrin – Teil 2.....	20
Tabelle 49 Alle Dendriten (<i>Glr1^{sh}</i>) mit GlyR- α 1 und Gephyrin – Teil 1	21
Tabelle 50 Alle Dendriten (<i>Glr1^{sh}</i>) mit GlyR- α 1 und Gephyrin – Teil 2	21
Tabelle 51 Mittelstarke Dendriten (<i>Glr1^{eos}/Glr1^{sh}</i>) mit GlyR- α 1 und Synapsin – Teil 1	21
Tabelle 52 Mittelstarke Dendriten (<i>Glr1^{eos}/Glr1^{sh}</i>) mit GlyR- α 1 und Synapsin – Teil 2	21
Tabelle 53 Mittelstarke Dendriten (<i>Glr1^{eos}/Glr1^{sh}</i>) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β ^{eos} – Teil 1	22
Tabelle 54 Mittelstarke Dendriten (<i>Glr1^{eos}/Glr1^{sh}</i>) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β ^{eos} – Teil 2.....	22
Tabelle 55 Mittelstarke Dendriten (<i>Glr1^{eos}/Glr1^{sh}</i>) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β ^{eos} – Teil 3.....	22
Tabelle 56 Mittelstarke Dendriten (<i>Glr1^{eos}/Glr1^{sh}</i>) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β ^{eos} – Teil 4.....	22
Tabelle 57 Mittelstarke Dendriten der Einzelexperimente I und II (<i>Glr1^{eos}/Glr1^{sh}</i>) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β ^{eos} – Teil 1	23
Tabelle 58 Mittelstarke Dendriten der Einzelexperimente I und II (<i>Glr1^{eos}/Glr1^{sh}</i>) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β ^{eos} - Teil 2	23

Tabelle 59 Mittelstarke Dendriten der Einzelexperimente I und II (<i>Glr^{b eos}/Glr^{1 sh}</i>) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} – Teil 3	23
Tabelle 60 Mittelstarke Dendriten der Einzelexperimente I und II (<i>Glr^{b eos}/Glr^{1 sh}</i>) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} – Teil 4	24
Tabelle 61 Mittelstarke Dendriten der Einzelexperimente I und II (<i>Glr^{b eos}/Glr^{1 sh}</i>) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} – Teil 5	24
Tabelle 62 Mittelstarke Dendriten der Einzelexperimente I und II (<i>Glr^{b eos}/Glr^{1 sh}</i>) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} – Teil 6	24
Tabelle 63 Alle Dendriten (<i>Glr^{b eos}/Glr^{1 sh}</i>) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} – Teil 1.....	25
Tabelle 64 Alle Dendriten (<i>Glr^{b eos}/Glr^{1 sh}</i>) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} – Teil 2.....	25
Tabelle 65 Alle Dendriten (<i>Glr^{b eos}/Glr^{1 sh}</i>) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} – Teil 3.....	25
Tabelle 66 Alle Dendriten (<i>Glr^{b eos}/Glr^{1 sh}</i>) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} – Teil 4.....	25
Tabelle 67 Einteilung der Dendritenstärke (<i>Glr^{b eos} x Glr^{1 sh}</i>) am Beispiel GlyR- α 1	26

8.4 Kontrollbilder

In der *Abbildung 29* sind die Kontrollbilder zu den im Ergebnisteil aufgeführten Abbildungen aufgelistet. *A* und *B* bilden die Kontrollen zu den HEK293-Zellen *Abbildung 4 und 5*. Bei den Aufnahmen der Rückenmarksneuronen wird *C* zu CD-1 (*Abb. 6, 7*), *D* zu *GlyT2-eGFP* (*Abb. 8*), *E* zu *Glr1^{sh}* (*Abb. 18-19*), *F* zu *Glr^{eos}* (*Abb. 14-17*) und *G* zu *Glr^{eos} x Glr1^{sh}* (*Abb. 20-24*) zugeordnet.

Bei allen Kontrolldeckgläschen wurde statt des primären Antikörpers PBS aufgetragen, um anschließend die spezifische Bindung der sekundären Antikörper zu testen. DAPI färbte den Zellkern und erbrachte damit den Nachweis von vorhandenen Zellen. Die dafür verwendeten sekundären Antikörperkombinationen sind in der *Tabelle 25* (Kapitel 3.8.2) für die verschiedenen Färbungen aufgelistet. In den konfokalen Mikroskopie Kanälen Cy3 und Cy5 wurde kein Signal erfasst, so dass die Bindung der sekundären Antikörper als spezifisch betrachtet werden kann.

Im Folgenden wird die Detektion im Diodenlaserbereich 473 nm (Alexa 488) näher erläutert. Bei den HEK293-Zellen wurde das zuvor transfizierte GFP (*A, B*) erfasst. Die Präsynapse wurde bei den Rückenmarksneuronen der Linie *GlyT2-eGFP* mittels GlyT2 detektiert (*D*). Die Aufnahmen *F* und *G* spiegeln das endogen fluoreszierende β^{eos} -Signal wider und können den Linien 202 *Glr^{eos}* und 204 *Glr^{eos} x Glr1^{sh}* zugeordnet werden. Im Vergleich dazu ist kein Signal in diesem Wellenbereich bei der Linie 131 *Glr1^{sh}* (*E*) zu erkennen und bestätigt damit wiederum die Aufnahmen von *F* und *G*.

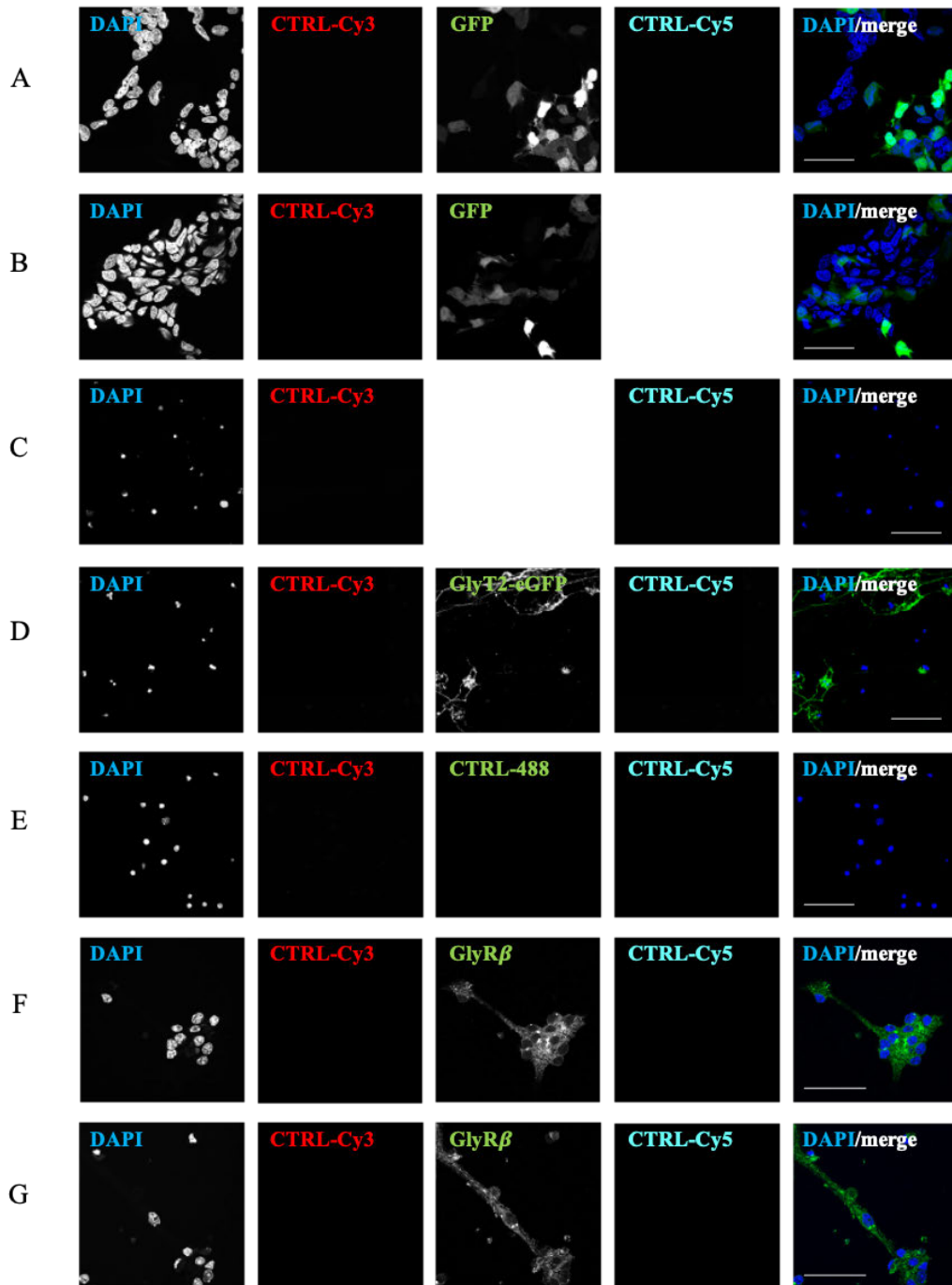


Abbildung 29 Kontrollbilder

DAPI: Zellkernmarkierung, CTRL-Cy3/-Cy5: PBS anstatt primärer AK verwendet, sekundärer AK als Kontrolle aufgetragen, DAPI/merge: Überlagerung der aufgelisteten Aufnahmen; **A:** HEK293 (Abb.4) CTRL-Cy3: Cy3 goat-anti-mouse, Cy3 goat-anti-rabbit, CTRL-Cy5: Cy5 goat-anti-mouse; **B:** HEK293 (Abb. 5). CTRL-Cy3: Cy3 goat-anti-mouse, **C-G:** Rückenmarksneurone ; **C:** CD1-Neurone & **D:** *GlyT2-eGFP*-Neurone CTRL-Cy3: Cy3 goat-anti-mouse, CTRL-Cy5: Cy5 goat-anti-mouse, Alexa Fluor 647 donkey-anti-chicken; **E:** *Glra1^{sh}* (131) CTRL-Cy3: Cy3 goat-anti-rabbit, CTRL-Cy5: Cy5 goat-anti-mouse, **F:** *Glr^{bos}* (202) CTRL-Cy3: Cy3 goat-anti-mouse, Cy3 goat-anti-rabbit, CTRL-Cy5: Cy5 goat-anti-mouse, Cy5 goat-anti-rabbit, Cy5 donkey-anti-guinea-pig, CTRL-488: anti-mEos-ATTO488; **G:** *Glr^{bos} x Glra1^{sh}* (204) CTRL-Cy3: Cy3 goat-anti-rabbit, CTRL-Cy5: Cy5 goat-anti-mouse, Alexa Fluor 647 donkey-anti-chicken, CTRL-488: anti-mEos-ATTO488; weißer Balken reflektiert 50µm

8.5 Statistik der Wiegedaten

Die *Tabellen 30-35* stellen die statistischen Ergebnisse der Wiegedaten dar. Als signifikant werden p-Werte kleiner 0,05 betrachtet ($s = *p < 0,05$), während p-Werte größer gleich 0,05 als nicht signifikant eingestuft werden ($ns = p \geq 0,05$). Die Abkürzung MW gibt die errechneten Mittelwerte für den angegebenen Zeitraum in Tagen an und ist in der Einheit Dichte*100 micron angegeben. SEM drückt den Standardfehler aus. Es wurden zwei Tests verwendet. Der *One-Way-Anova-Test (OWA-T)* vergleicht die Mittelwerte dreier Gruppen zueinander, während der ungepaarte *t-Test* die Wiegedaten zweier Genotypen vergleicht. Die Tabellen entsprechen der Reihenfolge der Abbildungen im Ergebnisteil. Zuerst werden die errechneten p-Werte aufgelistet, nachfolgend sind die Mittelwerte mit den Standardfehlern zu finden.

Tabelle 30 *Gla1^{sh}* – Genotyp mit Vergleich der *Glr^b^{eos}*-Varianten

ns = p \geq 0,05, OWA-T = One-Way-Anova-Test

Genotyp: <i>Gla1^{sh}</i> Vergleich: <i>Glr^b^{eos}</i> -Varianten innerhalb eines <i>Gla1^{sh}</i> -Genotyps	Tage	ungepaarter <i>t-Test</i>			<i>OWA-T</i>
		p-Wert: <i>Glr^b^{+/+}</i> → <i>Glr^b^{+/^eos}</i>	p-Wert: <i>Glr^b^{+/+}</i> → <i>Glr^b^{eos/eos}</i>	p-Wert: <i>Glr^b^{+/^eos}</i> → <i>Glr^b^{eos/eos}</i>	p-Wert
<i>Gla1^{+/+}</i>	0-21	0,8512	0,8780	0,9715	0,9795
<i>Gla1^{+/sh}</i>	0-21	0,5466	0,7501	0,3633	0,6372
<i>Gla1^{sh/sh}</i>	0-21	0,2007	0,6673	0,4073	0,4009

Tabelle 31 MW mit SEM: *Gla1^{sh}* – Genotyp mit Vergleich der *Glr^b^{eos}*-Varianten

MW = Mittelwert, SEM = Standardfehler

Genotyp: <i>Gla1^{sh}</i> Vergleich: <i>Glr^b^{eos}</i> -Varianten innerhalb eines <i>Gla1^{sh}</i> -Genotyps	Tage	<i>Glr^b^{+/+}</i>	<i>Glr^b^{+/^eos}</i>	<i>Glr^b^{eos/eos}</i>
		MW \pm SEM	MW \pm SEM	MW \pm SEM
<i>Gla1^{+/+}</i>	0-21	5,590 \pm 0,5509	5,448 \pm 0,5167	5,474 \pm 0,5139
<i>Gla1^{+/sh}</i>	0-21	5,303 \pm 0,4916	5,757 \pm 0,5621	5,086 \pm 0,4660
<i>Gla1^{sh/sh}</i>	0-21	4,705 \pm 0,3988	5,506 \pm 0,4702	4,960 \pm 0,4335

Tabelle 32 p-Werte: $Glr^{+/+}$ vs. $Glr^{+/eos}$ vs. $Glr^{eos/eos}$ (inklusive der Glr^{sh} -Varianten)

ns = $p \geq 0,05$, $OWA-T = One-Way-Anova-Test$, vs. = versus

Genotyp: Glr^{eos} Vergleich: $Glr^{+/+}$ vs. $Glr^{+/eos}$ vs. $Glr^{eos/eos}$	Tage	ungepaarter t -Test			$OWA-T$
		p-Wert: $Glr^{+/+} \rightarrow$ $Glr^{+/eos}$	p-Wert: $Glr^{+/+} \rightarrow$ $Glr^{eos/eos}$	p-Wert: $Glr^{+/eos} \rightarrow$ $Glr^{eos/eos}$	p-Wert
Glr^{eos} mit $Glr^{I^{(+/+,+/sh,sh/sh)}}$	0-21	0,5732	0,8768	0,6797	0,8390

Tabelle 33 MW mit SEM: $Glr^{+/+}$ vs. $Glr^{+/eos}$ vs. $Glr^{eos/eos}$ (inklusive der Glr^{sh} -Varianten)

MW = Mittelwert, SEM = Standardfehler, vs. = versus

Genotyp: Glr^{eos} Vergleich: $Glr^{+/+}$ vs. $Glr^{+/eos}$ vs. $Glr^{eos/eos}$	Tage	$Glr^{+/+}$	$Glr^{+/eos}$	$Glr^{eos/eos}$
		MW \pm SEM	MW \pm SEM	MW \pm SEM
Glr^{eos} mit $Glr^{I^{(+/+,+/sh,sh/sh)}}$	0-21	5,202 \pm 0,4911	5,608 \pm 0,5199	5,311 \pm 0,4919

Tabelle 34 p-Werte: $Glr^{I^{+/+}}$ vs. $Glr^{I^{+/sh}}$ vs. $Glr^{I^{sh/sh}}$ (inklusive der Glr^{eos} -Varianten)

ns = $p \geq 0,05$, * $p < 0,05$, $OWA-T = One-Way-Anova-Test$, vs. = versus

Genotyp: $Glr^{I^{sh}}$ Vergleich: $Glr^{I^{+/+}}$ vs. $Glr^{I^{+/sh}}$ vs. $Glr^{I^{sh/sh}}$	Tage	ungepaarter t -Test			$OWA-T$
		p-Wert: $Glr^{I^{+/+}} \rightarrow$ $Glr^{I^{+/sh}}$	p-Wert: $Glr^{I^{+/+}} \rightarrow$ $Glr^{I^{sh/sh}}$	p-Wert: $Glr^{I^{+/sh}} \rightarrow$ $Glr^{I^{sh/sh}}$	p-Wert
$Glr^{I^{sh}}$ mit $Glr^{(+/+,+/eos,eos/eos)}$	0-21	0,9753	0,6737	0,6976	0,8995
	0-14	0,9617	0,9569	0,9945	0,9982
	15-18	0,9213	0,0610	0,1323	0,1723
	19-21	0,9728	0,0394*	0,0349*	0,0541

ns = $p \geq 0,05$, * $p < 0,05$, $OWA-T = One-Way-Anova-Test$, vs. = versus

Tabelle 35 MW mit SEM: $Glr^{I^{+/+}}$ vs. $Glr^{I^{+/sh}}$ vs. $Glr^{I^{sh/sh}}$ (inklusive der Glr^{eos} -Varianten)

MW = Mittelwert, SEM = Standardfehler, vs. = versus

Genotyp: $Glr^{I^{sh}}$ Vergleich: $Glr^{I^{+/+}}$ vs. $Glr^{I^{+/sh}}$ vs. $Glr^{I^{sh/sh}}$	Tage	$Glr^{I^{+/+}}$	$Glr^{I^{+/sh}}$	$Glr^{I^{sh/sh}}$
		MW \pm SEM	MW \pm SEM	MW \pm SEM
$Glr^{I^{sh}}$ mit $Glr^{(+/+,+/eos,eos/eos)}$	0-21	5,488 \pm 0,5205	5,465 \pm 0,5192	5,196 \pm 0,4484
	0-14	4,243 \pm 0,4603	4,212 \pm 0,4494	4,208 \pm 0,4642
	15-18	7,340 \pm 0,1570	7,314 \pm 0,2030	6,932 \pm 0,0823
	19-21	9,239 \pm 0,4503	9,261 \pm 0,4385	7,824 \pm 0,1315

8.6 Bearbeitung der Abbildungsbilder

Konfokale Mikroskopie:

Da die Bilder mit der gleichen Objektivgröße aufgenommen wurden, konnte mit der gleichen Größe von Zuschnitten der Bilder auch vergleichbare Dendriten gezeigt werden. Die Bildzuschnitte und Bearbeitungen wurden mit der Software *ImageJ* (Version 2.3.0/1.53f) vorgenommen. Im Vergleich zweier Genotypen wurden die Aufnahmen beider (Wildtyp und Homozygot) mit den gleichen Einstellungen belichtet und bearbeitet. Die in den *Tabellen 36 – 38* erwähnte Einteilung („Bildzuschnitte in *Image J*“) der Zuschnitte 1 bis 3 ist in der *Abbildung 30* erläutert.

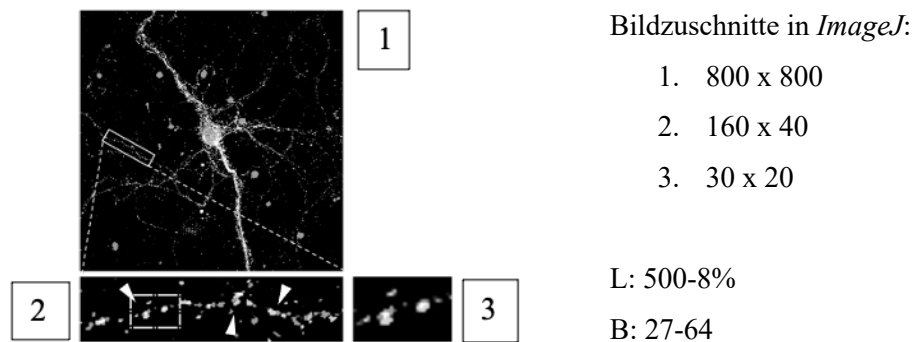


Abbildung 30 Beispiel für die Bearbeitung von Neuronenaufnahmen

Die Zahlen 1-3 erläutern die Reihenfolge der Bildzuschnitte in *ImageJ* mit den dazugehörigen x- und y-Größen des jeweiligen Bildausschnittes. Die verwendete Lasereinstellung (L) ist in Prozent mit der dazugehörigen Intensität angegeben. Die Bildbearbeitungseinstellung (B) stellt die Verstärkung (Minimum – Maximum) der einzelnen Farben in *ImageJ* dar.

Axio Imager 2:

Bei den Aufnahmen mittels Axio Imager 2 wurde ebenfalls das gleiche Objektiv verwendet, allerdings kann hier kein direkter Vergleich der Bilder zueinander gezogen werden. Im Folgenden sind die Gründe dafür dargelegt. Es lag keine Übereinkunft in der genauen Region des Rückenmarks vor und deshalb musste der Ausschnitt des Aufnahmerasters unterschiedlich gewählt werden. Um möglichst ähnlich große Vergrößerungen darzustellen, wurde der Zuschnitt der Bilder angepasst. Die Bearbeitung erfolgte ebenfalls in *ImageJ* mit gleich absteigender Bildzuschnitt-Reihenfolge.

Die Einstellungen sind in *Tabelle 38* erläutert.

Tabelle 36 Laser-und Bildbearbeitungsinformationen (Olympus) - Teil 1

Abb. = Abbildung

B = Bearbeitungseinstellung in *ImageJ* (Minimum – Maximum)

Abbildungen im Ergebnisteil	Olympuskanal: Primärer Antikörper	Cy3	Cy5	488	Bild-zuschnitte in <i>ImageJ</i>
HEK293 Abb. 4	Cy3: GlyR- α 1- mab2b Cy5: Gephyrin	B: 24-189	B: 34-189		1.450 x 450 2.150 x 150
	Cy3: Myc- <i>Tag</i> Cy5: GlyR- α - mab4a 488: Gephyrin	B: 34-201	B: 49-255	B: 34-201	1.450 x 450 2.200 x 200
HEK293 Abb. 5	Cy3: GlyR- α 1- mab2b	B: 29-189			1.450 x 450 2.150 x 150
CD-1 Abb. 6-7	Cy3: GlyR- α 1- mab2b Cy5: VGAT	B: 27-66	B: 25-66		1.800 x 800 2.160 x 40 3.30 x 20
	Cy3: mab4a Cy5: VGAT	B: 27-64	B: 27-66		
	Cy3: GlyR- α 1- mab2b Cy5: Synaptophysin	B: 9-54	B: 10-97		
	Cy3: GlyR- α - mab4a Cy5: Gephyrin	B: 23-73	B: 27-85		
	Cy3: MAP2 Cy5: VGAT	B: 0-120	B: 17-72		
<i>GlyT2-eGFP</i> Abb. 8	Cy3: GlyR- α 1- mab2b Cy5: VGAT	B: 22-63	B: 22-79		1.800 x 800 2.160 x 40 3.30 x 20
	Cy3: GlyR- α 1- mab2b Cy5: Synaptophysin	B: 22-64	B: 22-79		
	Cy3: GlyR- α - mab4a Cy5: Gephyrin	B: 27-66	B: 29-78		
	Cy3: MAP2 Cy5: VGAT	B: 22-80	B: 29-70		

Tabelle 37 Laser- und Bildbearbeitungsinformationen (Olympus) - Teil 2

Abb. = Abbildung, AK = Antikörper

B = Bearbeitungseinstellung in *ImageJ* (Minimum – Maximum)

L = Lasereinstellung am konfokalen Mikroskop (Intensität – Laserprozent)

Abbildungen im Ergebnisteil	Olympuskanal: Primärer Antikörper	Cy3	Cy5	488	Bild-zuschnitte in <i>ImageJ</i>
202: <i>Glr^b eos</i> Abb. 14-17	Cy3: GlyR- α 1-mab2b Cy5: VGAT	L: 500-8% B: 23-73	L: 546-12% B: 27-80	L: 650-10% B: 22-86	1.800 x 800 2.160 x 40 3.30 x 20
	Cy3: GlyR- α -mab4a Cy5: VGAT	L: 470-10% B: 26-70	L: 660-9% B: 10-90	L: 500-10% B: 7-85	
	Cy3: GlyR- α 1-mab2b Cy5: Gephyrin	L: 681-10% B: 22-130	L: 587-8% B: 22-113	L: 550-12% B: 22-127	
	Cy3: MAP2 Cy5: VGAT	L: 643-10% B: 93-196	L: 510-8% B: 148-201	L: 710-12% B: 98-212	
204: <i>Glr^b eos</i> x <i>Glr¹ sh</i> (ohne „eos“-AK) Abb. 9,10	Cy3: GlyR- α 1-mab2b Cy5: VGAT 488: GlyR- β^{eos}	L: 711-12% B: 24-76	L: 627-10% B: 24-92	L: 635-12% B: 21-151	1.800 x 800 2.160 x 40 3.30 x 20
131: <i>Glr¹ sh</i> Abb. 18,19	Cy3: GlyR- α 1-mab2b Cy5: Synapsin	L: 600-10% B: 52-122	L: 530-9% B: 46-122		1.800 x 800 2.160 x 40 3.30 x 20
	Cy3: GlyR- α 1-mab2b Cy5: Gephyrin	L: 600-10% B: 30-122	L: 625-9% B: 20-180		1.900 x 900 2.160 x 40 3.30 x 20
204: <i>Glr^b eos</i> x <i>Glr¹ sh</i> (mit „eos“-AK) Abb. 20-24	Cy3: GlyR- α 1-mab2b Cy5: Synapsin	L: 600-10% B: 12-122	L: 530-9% B: 46-122		1.800 x 800 2.120 x 30 3.30 x 20
	Cy3: GlyR- α 1-mab2b Cy5: Gephyrin 488: GlyR- β^{eos}	L: 600-10% B: 12-122	L: 720-9% B: 11-180	L: 621-10% B: 12-180	1.800 x 800 2.160 x 40 3.30 x 20

Tabelle 38 Laser- und Bildbearbeitungsinformationen (Axio Imager 2)

Abb. = Abbildung

B = Bearbeitungseinstellung in *ImageJ* (Minimum – Maximum)

L = Lasereinstellung am Axio Imager 2 (Intensität – Zeit in ms)

ms = Millisekunde

204: <i>Glrb^{eos}</i> x <i>Glr1^{sh}</i> Rückenmarks- schnitte Abb. 26-28	Cy3: GlyR- $\alpha 1$ -mab2b	Cy5: Gephyrin	488: GlyR- β^{eos}	Bild- zuschnitte in ImageJ
<i>Glrb^{eos}</i> x <i>Glr1^{+/+}</i>	L: 20%-300ms B: 28-170	L: 40%-1000ms B: 64-255	L: 20%-70ms B: 38-170	1: 2100-1400 2.400-400 3.20 x 60
<i>Glrb^{eos}</i> x <i>Glr1^{sh/sh}</i>	L: 20%-300ms B: 28-170	L: 40%-700 ms B: 64-255	L: 20%-70 ms B: 38-170	1.1836-1400 2.450-450 3.50-150

8.7 Embryo- und Messbilderzuordnung

In den *Tabellen 39-42* sind die ausgewerteten Messbilder der konfokalen Mikroskopie den jeweiligen Genotypen der Mauslinien *Gla1^{sh}* und *Glr^b^{eos} x Gla1^{sh}* zugeordnet, wobei sich *Glr^b^{eos}* immer auf homozygote *Glr^b^{eos/eos}* bezieht. Die Dendriten Einteilung in schwach, mittelstark und stark zu den jeweiligen Embryonen ist mit der Zuordnung „Embryo zu DZ“ beschrieben, wobei „DZ“ der gezählten Dendriten Anzahl entspricht (Tabelle 43, 44).

Der Kategorie „aussortierte Dendriten“ wurden teils unscharfe oder falsch gezählte Dendriten zugeteilt, welche jedoch in der Auswertung „aller Dendriten“ miteinbezogen wurden, um den Bias durch die Auswerterin (Doktorandin Isabell Fuhl) zu verringern. Die römische Einteilung I und II stellt die Anzahl und Unterteilung der einzelnen Färbungen pro Mauslinie da und ist mit der Anzahl von Experimenten gleich zu setzen.

Tabelle 39 Zuordnung der Messbilder *Gla1^{sh}* (131) bei GlyR- α 1 und Synapsin

Embryoanzahl	2	2
Messbilder pro Embryo	3/4	3
Messbilder pro Genotyp	7	6
Messbilder insgesamt	15	

Tabelle 40 Zuordnung der Messbilder *Gla1^{sh}* (131) bei GlyR- α 1 und Gephyrin

131	<i>Gla1^{+/+}</i>	<i>Gla1^{sh/sh}</i>
Embryoanzahl	2	2
Messbilder pro Embryo	4	4
Messbilder pro Genotyp	8	8
Messbilder insgesamt	16	

**Tabelle 41 Zuordnung der Messbilder *Glr^b^{eos}/Gla1^{sh}* (204) bei GlyR- α 1 und Synapsin
1 bei (II) = 1 Embryo pro Genotyp bei der Färbung Nummer II**

204	<i>Glr^b^{eos}/Gla1^{+/+}</i>	<i>Glr^b^{eos}/Gla1^{sh/sh}</i>
Embryoanzahl	1 bei (II)	1 bei (II)
Messbilder pro Embryo	5	5
Messbilder pro Genotyp	5	5
Messbilder insgesamt	10	

Tabelle 42 Zuordnung der Messbilder *Glr^b^{eos}/Glr^a^{1sh}* (204) bei GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β ^{eos}

204	<i>Glr^b^{eos}/Glr^a^{1+/+}</i>		<i>Glr^b^{eos}/Glr^a^{1sh/sh}</i>	
Färbung	I	II	I	II
Embryoanzahl	2	1	2	1
Messbilder pro Embryo	3	6	3	6
Messbilder pro Genotyp	6	6	6	6
Messbilder insgesamt	24			

Tabelle 43 Zuordnung der Dendriten *Glr^a^{1sh}* (131) bei GlyR- α 1 und Gephyrin

DZ = Dendritenzahl, ges. = gesamt

131	<i>Glr^a^{1+/+}</i>			<i>Glr^a^{1sh/sh}</i>		
Dendritenstärke	Färbung	Embryo zu DZ	ges. DZ	Färbung	Embryo zu DZ	ges. DZ
schwach	I	1.: 3	18	I	1.: 14	19
		2.: 15			2.: 5	
mittelstark	I	1.: 9	22	I	1.: 11	19
		2.: 13			2.: 8	
stark	I	1.: 14	21	I	1.: 12	24
		2.: 7			2.: 12	
aussortierte Dendriten	I	1.: 1	2	I	1.: 1	2
		2.: 1			2.: 1	
alle Werte	63			64		

Tabelle 44 Zuordnung der Dendriten *Glr^b^{eos}/Glr^a^{1sh}* (204) bei GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β ^{eos}

DZ = Dendritenzahl, ges. = gesamt

204 I+II	<i>Glr^b^{eos}/Glr^a^{1+/+}</i>				<i>Glr^b^{eos}/Glr^a^{1sh/sh}</i>			
Dendritenstärke	Färbung	DZ	Embryo zu DZ	ges. DZ	Färbung	DZ	Embryo zu DZ	ges. DZ
schwach	I	5	1.: 3	15	I	9	1.: 0	18
			2.: 2				2.: 9	
	II	10	3.: 10		II	9	3.: 9	
mittelstark	I	22	1.: 11	48	I	24	1.: 12	48
			2.: 11				2.: 12	
	II	26	3.: 26		II	24	3.: 24	
stark	I	4	1.: 2	21	I	9	1.: 4	23
			2.: 2				2.: 5	
	II	17	3.: 17		II	14	3.: 14	
aus-sortierte Dendriten	I	9	1.: 6	13	I	5	1.: 4	9
			2.: 3				2.: 1	
	II	4	3.: 4		II	4	3.: 4	
alle Werte	97				98			

8.8 Tabellen statistischer Auswertung

Im Folgenden ist die statistische Auswertung der Linien *Glr1^{sh}* und *Glr1^{eos} x Glr1^{sh}* tabellarisch dargestellt (Tabelle 45-66), wobei sich *Glr1^{eos}* immer auf homozygote *Glr1^{eos/eos}* bezieht. Dabei entspricht „DZ“ den gezählten Dendriten pro Genotyp und „NV“ der Normalverteilung. Falls die DZ-Zahl abweicht, so wurden Ausreißer mittels *ROUT-Methode* (Q =1%) identifiziert und vom Datensatz ausgeschlossen.

Die Stärke der Abweichung von der Normalverteilung wurde statistisch mit den p-Werten: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 und ****p < 0,0001 angegeben; dabei ist ein Wert nicht signifikant, wenn p ≥ 0,05 ist. Der errechnete p-Wert der Normalverteilung wurde auf ein „nein“ reduziert und mit der Angabe des Signifikanzniveaus ergänzt. Der p-Wert des durchgeführten ungepaarten *t-Tests* oder *Mann-Whitney-Tests* wurde ebenfalls mit dem gleichen Signifikanzlevel eingeteilt und dabei in signifikant (s) und nicht signifikant (ns) unterschieden. Der Standardfehler (SEM) gibt das Streuungsmaß an. Der Mittelwert (MW) und der Differenzwert (DW) sind in der Einheit Dichte*100 micron angegeben. Der Differenzwert wurde wie folgt errechnet: MW (Homozygot) - MW (Wildtyp), mit dem Beispiel MW (*Glr1^{sh/sh}*) – MW (*Glr1^{+/+}*). Die Tabellen 45-48, 51-61 vergleichen jeweils die mittelstarken Dendriten, wohingegen die Tabellen 49,50,63-66 alle gezählten Dendriten (schwach + mittelstark + stark + aussortiert) der entsprechenden Mauslinie zeigen.

Tabelle 45 Mittelstarke Dendriten (*Glr1^{sh}*) mit GlyR- α 1 und Synapsin – Teil 1

*p < 0,05, **p < 0,01, #Abkürzungen sind unter 8.8 näher erklärt

131 Genotyp	α 1- α 1		Synapsin - Synapsin	
	<i>Glr1^{+/+}</i>	<i>Glr1^{sh/sh}</i>	<i>Glr1^{+/+}</i>	<i>Glr1^{sh/sh}</i>
DZ	22	19	22	19
NV	ja	ja	ja	nein*
MW	35,32	41,48	31,85	23,29
SEM	1,826	2,341	2,273	2,355
DM	6,16		-8,56	
p-Wert	s: 0,0420*		s: 0,0097**	

Tabelle 46 Mittelstarke Dendriten (*Glr1^{sh}*) mit GlyR- α 1 und Synapsin – Teil 2

**p < 0,01, #Abkürzungen sind unter 8.8 näher erklärt

131	Synapsin - α 1	
Genotyp	<i>Glr1^{+/+}</i>	<i>Glr1^{sh/sh}</i>
DZ	22	19
NV	ja	nein*
MW	23,67	17,23
SEM	1,665	1,444
DM	-6,44	
p-Wert	s: 0,0064**	

Tabelle 47 Mittelstarke Dendriten (*Glr1^{sh}*) mit GlyR- α 1 und Gephyrin – Teil 1

ns = p \geq 0,05, ***p < 0,001, #Abkürzungen sind unter 8.8 näher erklärt

131	α 1- α 1		Gephyrin - Gephyrin	
Genotyp	<i>Glr1^{+/+}</i>	<i>Glr1^{sh/sh}</i>	<i>Glr1^{+/+}</i>	<i>Glr1^{sh/sh}</i>
DZ	22	19	22	19
NV	ja	ja	nein*	nein*
MW	35,98	41,21	33,49	15,32
SEM	1,645	2,369	3,117	2,367
DM	5,23		-18,17	
p-Wert	ns: 0,0717		s: 0,0001***	

Tabelle 48 Mittelstarke Dendriten (*Glr1^{sh}*) mit GlyR- α 1 und Gephyrin – Teil 2

**p < 0,01, #Abkürzungen sind unter 8.8 näher erklärt

131	Gephyrin - α 1	
Genotyp	<i>Glr1^{+/+}</i>	<i>Glr1^{sh/sh}</i>
DZ	22	18
NV	ja	ja
MW	18,76	11,37
SEM	1,705	1,156
DM	-7,39	
p-Wert	s: 0,0015**	

Tabelle 49 Alle Dendriten (*Glr1^{sh}*) mit GlyR- α 1 und Gephyrin – Teil 1

ns = $p \geq 0,05$, **** $p < 0,0001$, #Abkürzungen sind unter 8.8 näher erklärt

131	α 1- α 1		Gephyrin - Gephyrin		
	Genotyp	<i>Glr1^{+/+}</i>	<i>Glr1^{sh/sh}</i>	<i>Glr1^{+/+}</i>	<i>Glr1^{sh/sh}</i>
DZ		63	64	63	60
NV		nein**	nein****	nein***	nein**
MW		41,62	46,52	40,53	22,44
SEM		3,210	3,253	3,205	2,184
DM		4,9		-18,09	
p-Wert		ns: 0,2638		s: <0,0001****	

Tabelle 50 Alle Dendriten (*Glr1^{sh}*) mit GlyR- α 1 und Gephyrin – Teil 2

ns = $p \geq 0,05$, #Abkürzungen sind unter 8.8 näher erklärt

131	Gephyrin - α 1		
	Genotyp	<i>Glr1^{+/+}</i>	<i>Glr1^{sh/sh}</i>
DZ		63	62
NV		nein****	nein****
MW		28,89	22,41
SEM		3,208	2,633
DM		-7,86	
p-Wert		ns: 0,1439	

Tabelle 51 Mittelstarke Dendriten (*Glr^{eos}/Glr1^{sh}*) mit GlyR- α 1 und Synapsin – Teil 1

ns = $p \geq 0,05$, ** $p < 0,01$, #Abkürzungen sind unter 8.8 näher erklärt

204	α 1- α 1		Synapsin - Synapsin		
	Genotyp	<i>Glr^{eos}/Glr1^{+/+}</i>	<i>Glr^{eos}/Glr1^{sh/sh}</i>	<i>Glr^{eos}/Glr1^{+/+}</i>	<i>Glr^{eos}/Glr1^{sh/sh}</i>
DZ		28	14	28	13
NV		ja	ja	ja	nein**
MW		34,83	37,94	34,56	22,18
SEM		2,229	2,923	2,382	3,221
DM		3,11		-12,38	
p-Wert		ns: 0,4140		s: 0,0012**	

Tabelle 52 Mittelstarke Dendriten (*Glr^{eos}/Glr1^{sh}*) mit GlyR- α 1 und Synapsin – Teil 2

* $p < 0,05$, #Abkürzungen sind unter 8.8 näher erklärt

204	Synapsin - α 1		
	Genotyp	<i>Glr^{eos}/Glr1^{+/+}</i>	<i>Glr^{eos}/Glr1^{sh/sh}</i>
DZ		28	14
NV		ja	ja
MW		23,99	18,47
SEM		1,693	1,806
DM		-5,52	
p-Wert		s: 0,0492*	

Tabelle 53 Mittelstarke Dendriten (*Glrb^{eos}/Glr1^{sh}*) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} – Teil 1
 * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$, #Abkürzungen sind unter 8.8 näher erklärt

204	$\alpha 1 - \alpha 1$		Gephyrin - Gephyrin	
Genotyp	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{+/+}</i>	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{sh/sh}</i>	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{+/+}</i>	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{sh/sh}</i>
DZ	48	48	48	48
NV	nein*	nein**	ja	ja
MW	35,59	40,55	28,93	12,25
SEM	1,283	1,533	1,885	0,9758
DM	4,96		-16,68	
p-Wert	s: 0,0341*		s: <0,0001****	

Tabelle 54 Mittelstarke Dendriten (*Glrb^{eos}/Glr1^{sh}*) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} – Teil 2
 **** $p < 0,0001$, #Abkürzungen sind unter 8.8 näher erklärt

204	$\beta^{eos} - \beta^{eos}$	
Genotyp	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{+/+}</i>	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{sh/sh}</i>
DZ	48	47
NV	nein*	ja
MW	36,08	18,06
SEM	2,225	1,068
DM	-18,02	
p-Wert	s.: <0,0001****	

Tabelle 55 Mittelstarke Dendriten (*Glrb^{eos}/Glr1^{sh}*) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} – Teil 3
 * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, #Abkürzungen sind unter 8.8 näher erklärt

204	Gephyrin - $\alpha 1$		$\beta^{eos} - \alpha 1$	
Genotyp	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{+/+}</i>	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{sh/sh}</i>	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{+/+}</i>	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{sh/sh}</i>
DZ	46	48	47	48
NV	ja	nein*	ja	ja
MW	17,45	11,73	20,88	17,54
SEM	1,182	0,8042	1,118	1,134
DM	-5,72		-3,34	
p-Wert	s: 0,0002***		s: 0,0386*	

Tabelle 56 Mittelstarke Dendriten (*Glrb^{eos}/Glr1^{sh}*) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} – Teil 4
 **** $p < 0,0001$, #Abkürzungen sind unter 8.8 näher erklärt

204	$\beta^{eos} - \text{Gephyrin}$	
Genotyp	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{+/+}</i>	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{sh/sh}</i>
DZ	48	48
NV	ja	ja
MW	32,22	14,07
SEM	1,792	1,058
DM	-18,15	
p-Wert	s: <0,0001****	

Tabelle 57 Mittelstarke Dendriten der Einzelerperimente I und II (*Glrbeos/Glra1^{sh}*) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} – Teil 1

ns = p \geq 0,05, #Abkürzungen sind unter 8.8 näher erklärt

204	I α 1- α 1		II α 1- α 1	
Genotyp	<i>Glrbeos/Glra1^{+/+}</i>	<i>Glrbeos/Glra1^{sh/sh}</i>	<i>Glrbeos/Glra1^{+/+}</i>	<i>Glrbeos/Glra1^{sh/sh}</i>
DZ	22	24	26	24
NV	nein*	ja	ja	nein*
MW	36,30	40,74	34,98	40,36
SEM	2,021	1,804	1,667	2,518
DM	4,44		5,38	
p-Wert	ns: 0,1218		ns: 0,2124	

Tabelle 58 Mittelstarke Dendriten der Einzelerperimente I und II (*Glrbeos/Glra1^{sh}*) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} - Teil 2

****p < 0,0001, #Abkürzungen sind unter 8.8 näher erklärt

204	I Gephyrin - Gephyrin		II Gephyrin - Gephyrin	
Genotyp	<i>Glrbeos/Glra1^{+/+}</i>	<i>Glrbeos/Glra1^{sh/sh}</i>	<i>Glrbeos/Glra1^{+/+}</i>	<i>Glrbeos/Glra1^{sh/sh}</i>
DZ	22	24	26	24
NV	ja	ja	ja	nein**
MW	27,97	12,31	29,75	12,19
SEM	2,593	1,372	2,737	1,417
DM	-15,66		-17,56	
p-Wert	s: <0,0001****		s: <0,0001****	

Tabelle 59 Mittelstarke Dendriten der Einzelerperimente I und II (*Glrbeos/Glra1^{sh}*) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} – Teil 3

p < 0,001, *p < 0,0001, #Abkürzungen sind unter 8.8 näher erklärt

204	I β^{eos} - β^{eos}		II β^{eos} - β^{eos}	
Genotyp	<i>Glrbeos/Glra1^{+/+}</i>	<i>Glrbeos/Glra1^{sh/sh}</i>	<i>Glrbeos/Glra1^{+/+}</i>	<i>Glrbeos/Glra1^{sh/sh}</i>
DZ	22	24	26	23
NV	nein*	ja	ja	ja
MW	33,41	18,81	38,34	17,28
SEM	3,260	1,737	3,029	1,236
DM	-14,60		-21,06	
p-Wert	s: 0,0002****		s: <0,0001****	

Tabelle 60 Mittelstarke Dendriten der Einzelerperimente I und II (*Glr^{eos}/Glr1^{sh}*) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} – Teil 4

* $p < 0,05$, #Abkürzungen sind unter 8.8 näher erklärt

204	I Gephyrin - α 1		II Gephyrin - α 1	
Genotyp	<i>Glr^{eos}/Glr1^{+/+}</i>	<i>Glr^{eos}/Glr1^{sh/sh}</i>	<i>Glr^{eos}/Glr1^{+/+}</i>	<i>Glr^{eos}/Glr1^{sh/sh}</i>
DZ	22	24	26	24
NV	ja	nein*	ja	ja
MW	17,87	10,91	17,09	12,55
SEM	2,138	1,036	1,260	1,229
DM	-6,96		-4,54	
p-Wert	s: 0,0116*		s: 0,0133*	

Tabelle 61 Mittelstarke Dendriten der Einzelerperimente I und II (*Glr^{eos}/Glr1^{sh}*) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} – Teil 5

ns = $p \geq 0,05$, #Abkürzungen sind unter 8.8 näher erklärt

204	I β^{eos} - α 1		II β^{eos} - α 1	
Genotyp	<i>Glr^{eos}/Glr1^{+/+}</i>	<i>Glr^{eos}/Glr1^{sh/sh}</i>	<i>Glr^{eos}/Glr1^{+/+}</i>	<i>Glr^{eos}/Glr1^{sh/sh}</i>
DZ	22	24	26	24
NV	ja	ja	ja	ja
MW	21,17	17,34	20,63	17,73
SEM	1,837	1,508	1,391	1,726
DM	-3,83		-2,9	
p-Wert	ns: 0,1119		ns: 0,1943	

Tabelle 62 Mittelstarke Dendriten der Einzelerperimente I und II (*Glr^{eos}/Glr1^{sh}*) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} – Teil 6

**** $p < 0,0001$, #Abkürzungen sind unter 8.8 näher erklärt

204	I β^{eos} - Gephyrin		II β^{eos} - Gephyrin	
Genotyp	<i>Glr^{eos}/Glr1^{+/+}</i>	<i>Glr^{eos}/Glr1^{sh/sh}</i>	<i>Glr^{eos}/Glr1^{+/+}</i>	<i>Glr^{eos}/Glr1^{sh/sh}</i>
DZ	22	24	26	23
NV	ja	ja	ja	nein*
MW	32,02	13,22	32,39	14,93
SEM	2,441	1,525	2,627	1,478
DM	-18,80		-17,46	
p-Wert	s: <0,0001****		s: <0,0001****	

Tabelle 63 Alle Dendriten (*Glrb^{eos}/Glr1^{sh}*) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} – Teil 1

ns = p \geq 0,05, ****p < 0,0001, #Abkürzungen sind unter 8.8 näher erklärt

204	$\alpha 1 - \alpha 1$		Gephyrin - Gephyrin	
Genotyp	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{+/+}</i>	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{sh/sh}</i>	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{+/+}</i>	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{sh/sh}</i>
DZ	97	98	97	91
NV	ja	ja	nein**	nein****
MW	41,13	44,92	33,56	14,83
SEM	2,178	2,322	2,157	1,202
DM	3,79		-18,73	
p-Wert	ns: 0,2352		s: <0,0001****	

Tabelle 64 Alle Dendriten (*Glrb^{eos}/Glr1^{sh}*) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} – Teil 2

****p < 0,0001, #Abkürzungen sind unter 8.8 näher erklärt

204	$\beta^{eos} - \beta^{eos}$	
Genotyp	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{+/+}</i>	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{sh/sh}</i>
DZ	97	95
NV.	nein***	nein****
MW	41,00	24,50
SEM	2,314	1,696
DM	-16,50	
p-Wert	s.: <0,0001****	

Tabelle 65 Alle Dendriten (*Glrb^{eos}/Glr1^{sh}*) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} – Teil 3

*p < 0,05, **p < 0,01, #Abkürzungen sind unter 8.8 näher erklärt

204	Gephyrin – $\alpha 1$		$\beta^{eos} - \alpha 1$	
Genotyp	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{+/+}</i>	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{sh/sh}</i>	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{+/+}</i>	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{sh/sh}</i>
DZ	89	88	97	90
NV	nein****	nein****	nein****	nein****
MW	21,07	14,10	27,89	21,28
SEM	1,804	1,215	2,018	1,771
DM	-6,97		-6,61	
p-Wert	s: 0,0067**		s: 0,0114*	

Tabelle 66 Alle Dendriten (*Glrb^{eos}/Glr1^{sh}*) mit GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} – Teil 4

****p < 0,0001, #Abkürzungen sind unter 8.8 näher erklärt

204	$\beta^{eos} - \text{Gephyrin}$	
Genotyp	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{+/+}</i>	<i>Glrb^{eos}/Glr1^{sh/sh}</i>
DZ	97	89
NV	nein*	nein***
MW	36,77	16,23
SEM	2,216	1,211
DM	-20,54	
p-Wert	s.: <0,0001****	

8.9 Dendriten Einteilung am Beispiel GlyR- $\alpha 1$

Nachfolgend ist die Dendriten Einteilung nach der Stärke in schwach, mittelstark und stark dargestellt. Die Daten wurden von Rückenmarksneuronen der Linie 204 (*Glrbeos* x *Glr1sh*) aus der Färbereihe mit Gephyrin und β^{eos} erhoben (Abb. 21-24, Tabelle 67). Die Auswertung erfolgte wie in *Kapitel 3.10.2* beschrieben. In den Balkendiagrammen stellt die y-Achse die Dichte pro 100 micron dar, während die x-Achse die Genotypen abbildet.

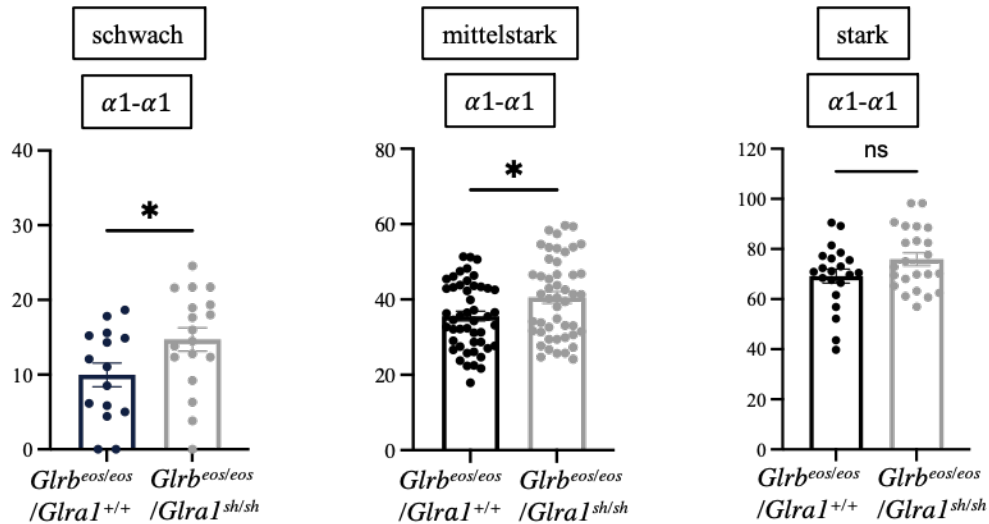


Abbildung 31 Einteilung der Dendritenstärke (*Glrbeos* x *Glr1sh*) am Beispiel GlyR- $\alpha 1$

Die Darstellung zeigt eine Einteilung der Dendritenstärke (schwach, mittelstark, stark) für den Marker GlyR- $\alpha 1$. Die Daten wurden in der Färbereihe der Rückenmarksneurone *Glrbeos* x *Glr1sh* (204) mit Gephyrin und GlyR- β^{eos} ermittelt und stellen die zusammengeführten Daten aus den Färbungen I und II dar. x-Achse = Genotypeneinteilung, y-Achse = Dichte pro 100 micron; p-Werte (*t-Test*/*MW-Test*) sind wie folgt zu verstehen: ns = $p \geq 0,05$; * $p < 0,05$; ns = nicht signifikant

Tabelle 67 Einteilung der Dendritenstärke (*Glrbeos* x *Glr1sh*) am Beispiel GlyR- $\alpha 1$

ns = $p \geq 0,05$, * $p < 0,05$, WT = Wildtyp, HZ = Homozygot, DZ = Dendritenzahl, NV = Normalverteilung, MW = Mittelwert, SEM = Standardfehler, DM = Differenz der Mittelwerte (HZ) – (WT), s = signifikant, ns = nicht signifikant, #Abkürzungen sind unter 8.8 näher erklärt

204 <i>Glrbeos</i> x <i>Glr1sh</i>	schwach		mittelstark		stark	
	$\alpha 1 - \alpha 1$		$\alpha 1 - \alpha 1$		$\alpha 1 - \alpha 1$	
Genotyp	WT	HZ	WT	HZ	WT	HZ
DZ	15	18	48	48	21	23
NV	ja	ja	nein*	nein**	ja	ja
MW	9,97	14,70	35,59	40,55	69,20	75,89
SEM	1,592	1,571	1,283	1,533	2,808	2,571
DM	4,73		4,96		6,69	
p-Wert	s: 0,0439*		s: 0,0341*		ns: 0,0858	

Auch wenn der errechnete p-Wert nicht bei allen drei Einteilungen signifikant ist, so zeigt die Einzelexpression von GlyR- α 1 bei *Glrb^{eos/eos} x Glra1^{sh/sh}* konstant höhere Mittelwerte als der Wildtyp. Diese Darstellung stützt die von der Doktorandin Isabell Fuhl gewählte Einteilung.

8.10 Abbildungen statistischer Auswertung

Die *Abbildungen 32-35* beziehen sich auf die Daten der statistischen Auswertung (Kapitel 8.8). Auf der y-Achse ist die Einheit in Dichte*100 micron angegeben während auf der x-Achse der jeweilige Genotyp zugordnet ist. Das Signifikanzlevel der p-Werte wurde statistisch mit: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 und ****p < 0,0001 eingeteilt, dabei ist ein Wert nicht signifikant (ns), wenn p \geq 0,05 ist.

Verglichen werden die detektierten Marker GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β ^{eos} als Einzelexpression und Kolo-kalisation zueinander. Die als mittelstark gezählten Dendriten der Einzelexperimente (*Glrb^{eos} x Glra1^{sh}*) sind in I und II aufgetrennt und in I+II zusammengeführt (*Abbildung 32, 33*). Alle gezählten (schwach + mittelstark + stark + aussortiert) Dendriten der Linie *Glrb^{eos} x Glra1^{sh}* sind in *Abbildung 34*, der Linie *Glra1^{sh}* in *Abbildung 35* dargestellt. Ebenso ist ein Vergleich aller gezählten Dendriten zwischen den Mauslinien *Glra1^{sh}* (131) und *Glrb^{eos} x Glra1^{sh}* (204) zueinander gezeigt (*Abbildung 35*).

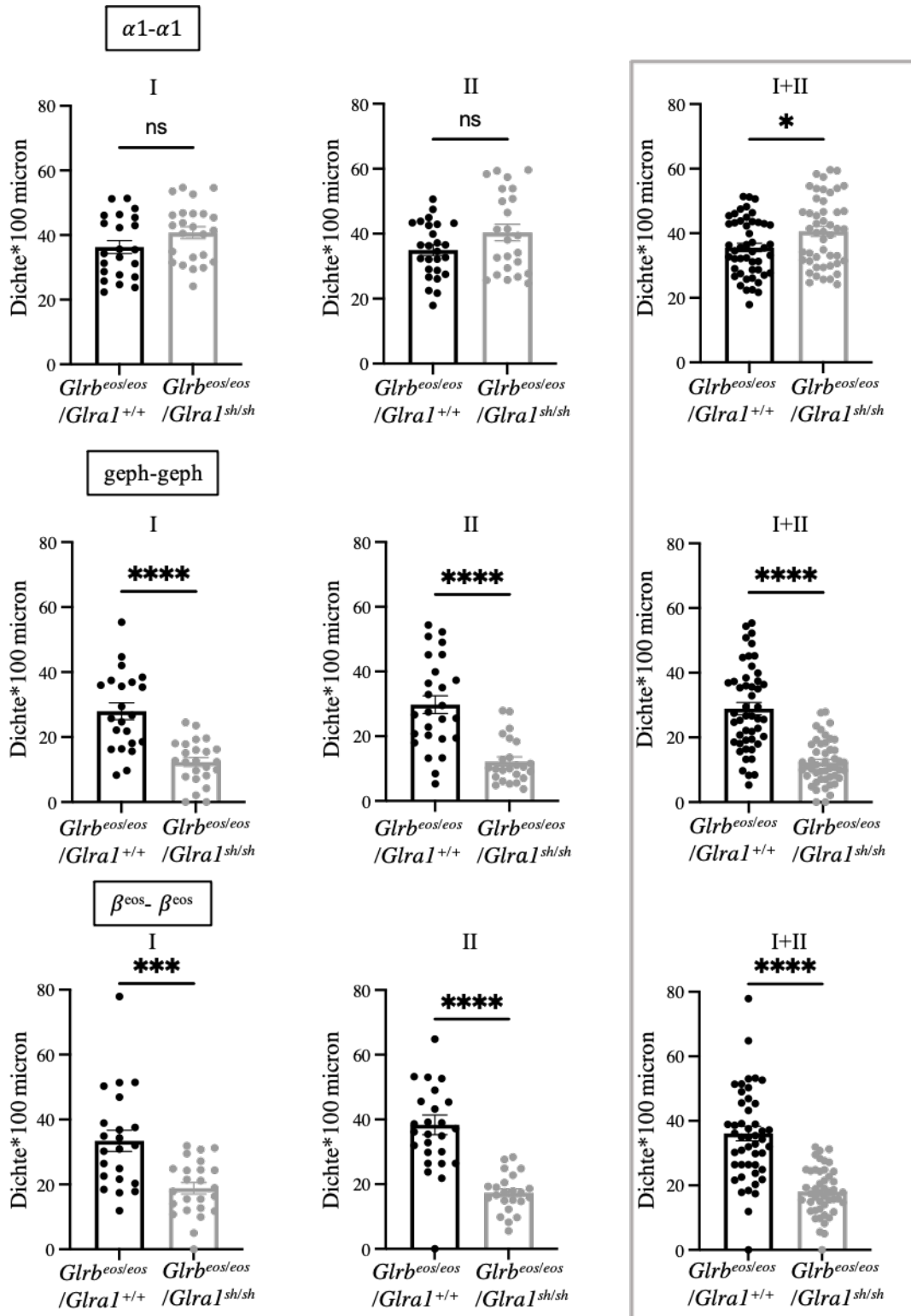


Abbildung 32 Mittelstarke Dendriten ($Glr^{eos} \times Glra1^{sh}$) mit GlyR- $\alpha 1$, Gephyrin und GlyR- β^{eos} in I, II

Die Darstellung zeigt mittelstarke Dendriten der Einzelexperimente I und II der Linie $Glr^{eos} \times Glra1^{sh}$ (204). Die Marker GlyR- $\alpha 1$, Gephyrin und GlyR- β^{eos} wurden im Einzelkanal detektiert. x-Achse = Genotypeneinteilung, y-Achse = Dichte pro 100 micron; Die p-Werte (*t-Test/MW-Test*) sind wie folgt zu verstehen: ns = $p \geq 0,05$; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$; ns = nicht signifikant

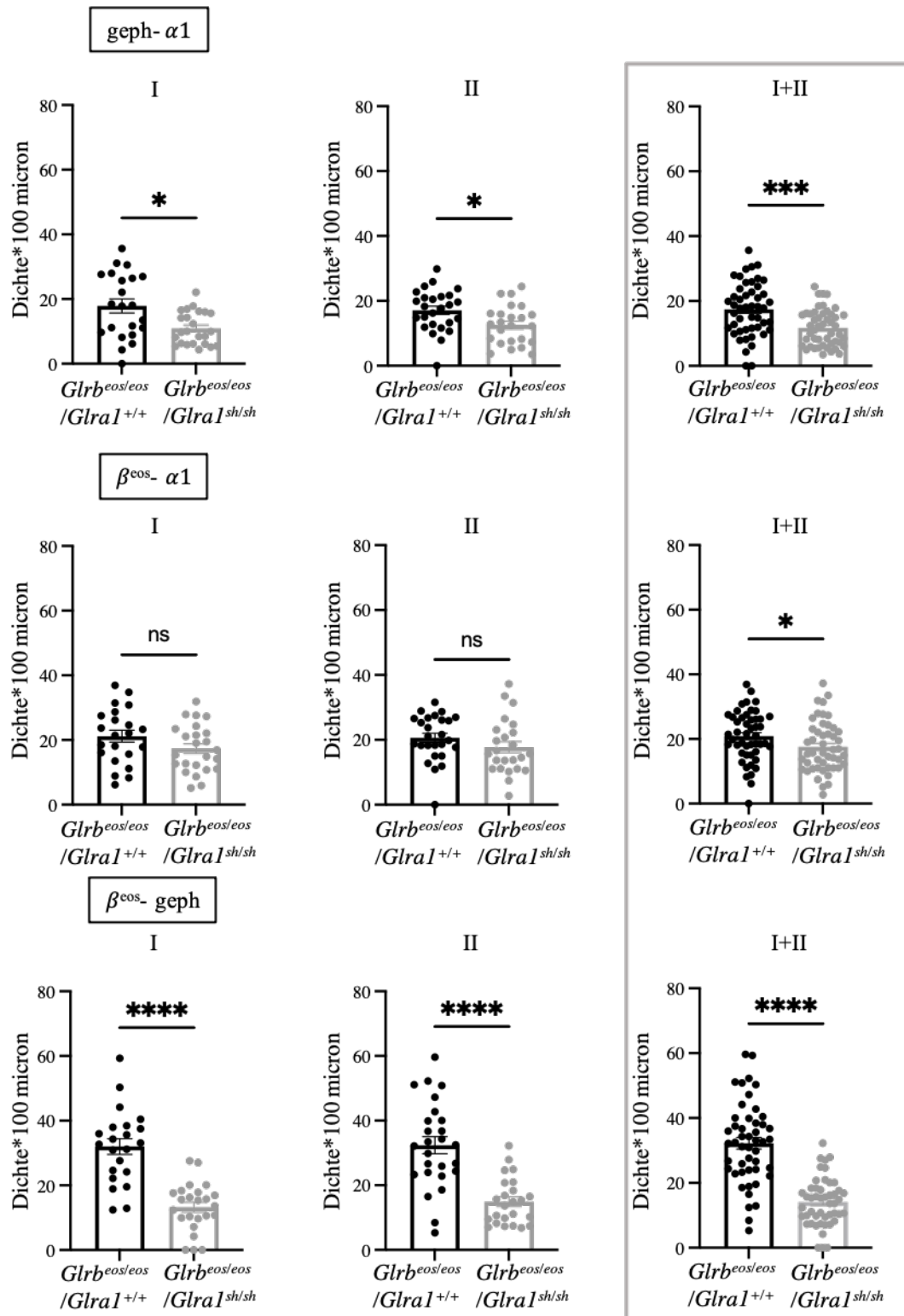


Abbildung 33 Mittelstarke Dendriten ($Glr^{eos} \times Glra1^{sh}$) mit Kollateralisationen von GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} in I, II

Die Darstellung zeigt mittelstarke Dendriten der Einzelexperimente I und II der Linie $Glr^{eos} \times Glra1^{sh}$ (204). Die Marker GlyR- α 1, Gephyrin und GlyR- β^{eos} sind in Kollateralisationen zueinander detektiert worden. x-Achse = Genotypeneinteilung, y-Achse = Dichte pro 100 micron; p-Werte (*t-Test/MW-Test*): ns = $p \geq 0,05$; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$; ns = nicht signifikant

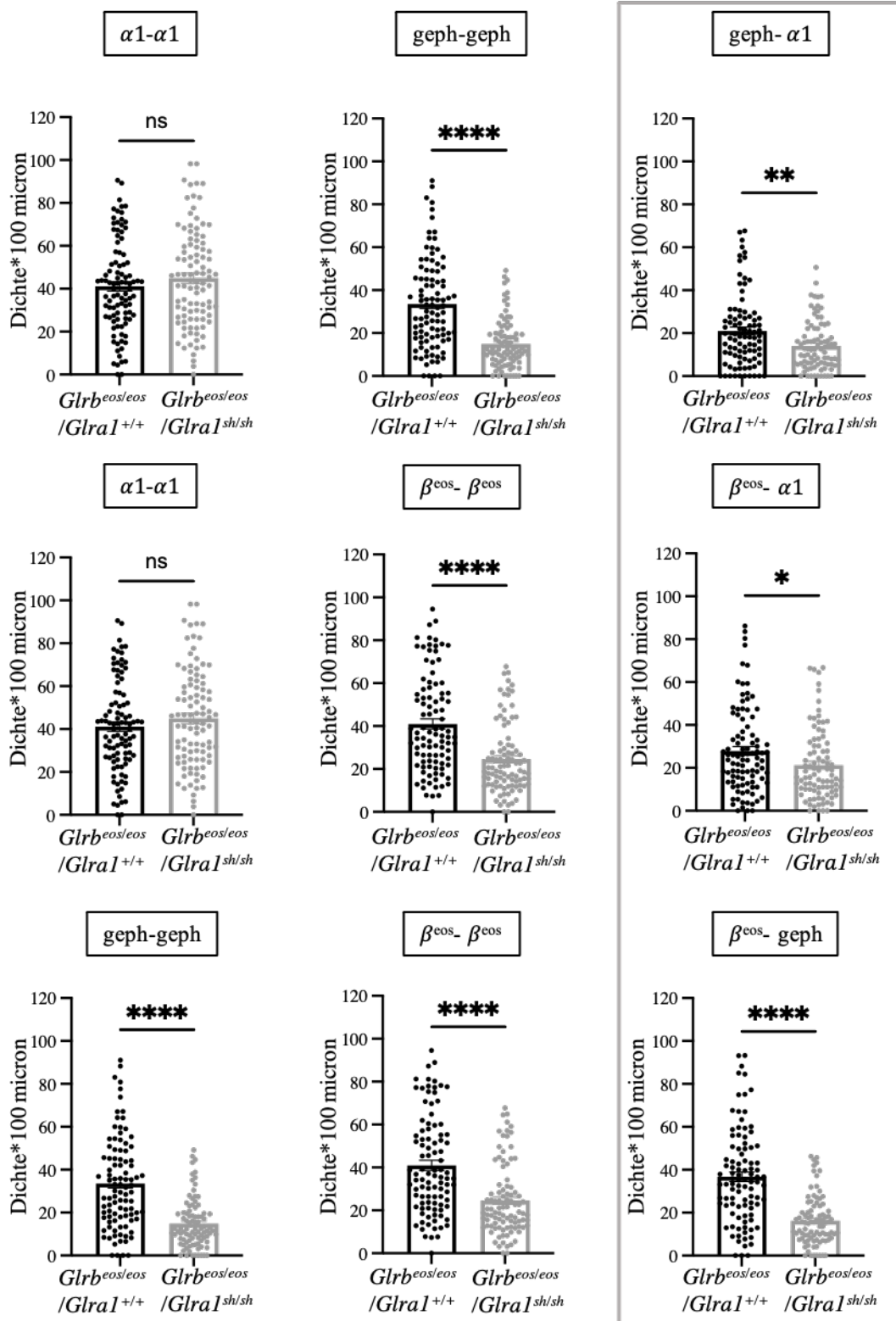


Abbildung 34 Alle Dendriten (*Glr^b^{eos} x Glra1^{sh}*) mit GlyR- $\alpha 1$, Gephyrin und GlyR- β^{eos}

Dargestellt sind alle Dendriten der Linie *Glr^b^{eos} x Glra1^{sh}* (204) mit den Markern GlyR- $\alpha 1$, Gephyrin und GlyR- β^{eos} sowohl einzeln als auch in Kolokalisation zueinander. x-Achse = Genotypeneinteilung, y-Achse = Dichte pro 100 micron; p-Werte (*t-Test/MW-Test*): ns = $p \geq 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und **** $p < 0,0001$; ns = nicht signifikant

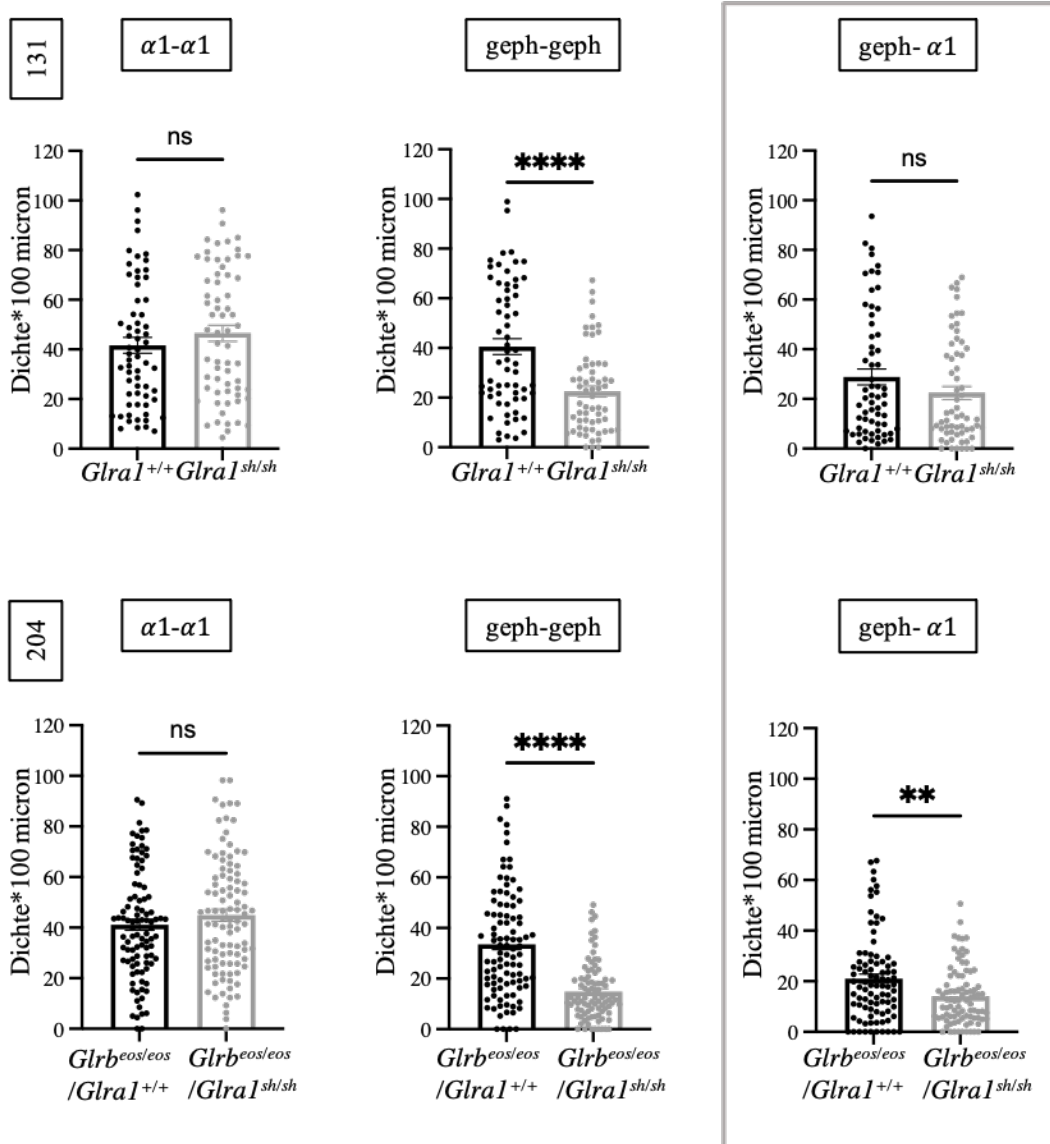


Abbildung 35 Alle Dendriten im Vergleich der Linie *Glra1*^{sh} (131) und *Glr^b^{eos} x Glra1*^{sh} (204)

Die Zahl 131 entspricht der Linie *Glra1*^{sh}, 204 der Linie *Glr^b^{eos} x Glra1*^{sh}. Die Darstellung zeigt alle Dendriten mit den Markern GlyR-α1 und Gephyrin sowohl einzeln als auch in Kolokalisation zueinander.

x-Achse = Genotypeneinteilung, y-Achse = Dichte pro 100 micron;

p-Werte (*t*-Test/*MW*-Test): ns = p ≥ 0,05; **p < 0,01, ****p < 0,0001; ns = nicht signifikant

8.11 Beispielbild für stark gefärbte Dendriten

Die *Abbildung 36* ist ein Beispiel für einen als stark eingestuften Dendriten der Rückenmarksneurone *Glrbeos x Glra1^{sh}*. Die konfokalen Aufnahmen stimmen mit denen der *Abbildung 21* und *22* im Ergebnisteil überein. Der vergrößerte Dendrit verdeutlicht den Unterschied zwischen den Genotypen, der im Ergebnisteil (Kapitel 4.6.2) näher erläutert wird.

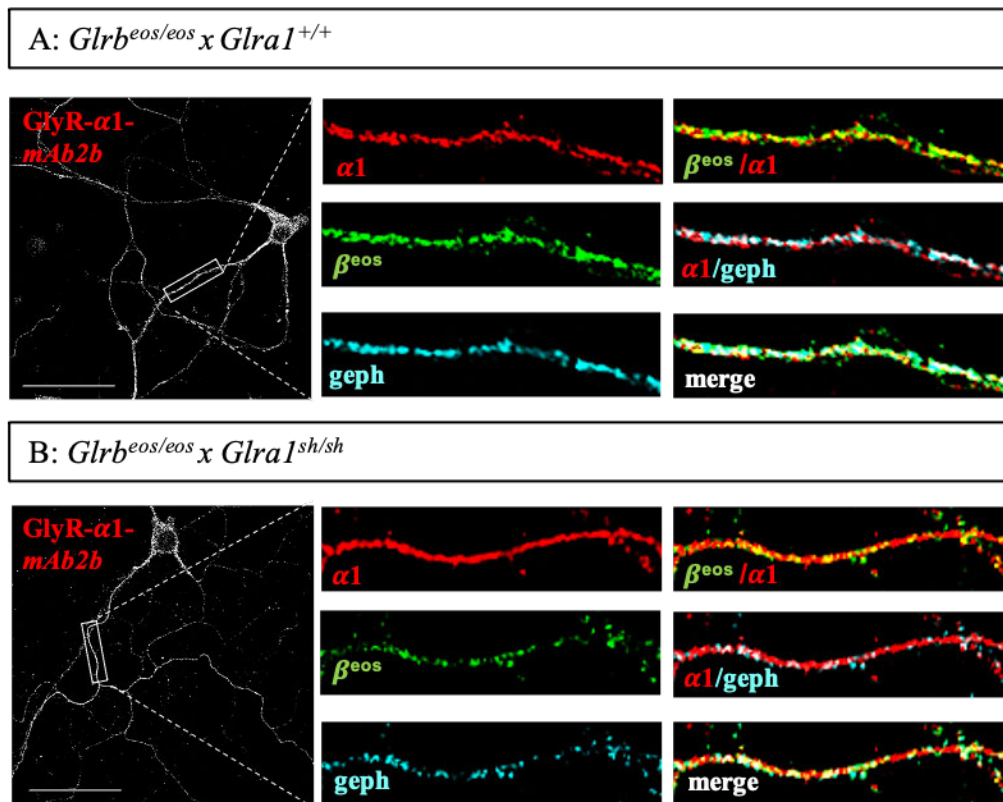


Abbildung 36 Immunzytochemie der Linie *Glrbeos x Glra1^{sh}* ($\alpha 1/\beta$ /Gephyrin) – stark gefärbter Dendrit

A, B: Die Rückenmarksneurone des Genotyps *Glrbeos x Glra1^{sh}* (204) wurden am 16. Tag nach Präparation gefärbt (n = 3). Die GlyR- $\alpha 1$ -Untereinheit wurde mit mAb2b rabbit, die β -Untereinheit mit anti-mEos-ATTO488 und die Postsynapse mit Gephyrin mouse detektiert.

A: *Glrbeos/eos x Glra1^{+/+}*

B: *Glrbeos/eos x Glra1^{sh/sh}*

Einheit des Maßstabalkens: 50 μm

8.12 Lizenzen

Bestätigung der Vervielfältigungs- und Lizenzierungsrechte

Der Doktorandin Isabell Fuhl wurde für die Abbildung „GlyR regulieren Nerv-Muskel-Kreislauf“ die Modifizierung und Druckerlaubnis in ihrer Doktorarbeit von Frau Dr. Natascha Schäfer, wissenschaftliche Mitarbeiterin des Institutes für Klinische Neurobiologie Würzburg, erteilt. Diese Abbildung wurde in folgendem Paper veröffentlicht: „*Glycine receptor mutants of the mouse: what are possible routes of inhibitory compensation?*“ (Schaefer, Vogel et al. 2012)

Würzburg, __04.05.2023_____

Dr. Natascha Schäfer

8.13 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Carmen Villmann. Danke für die Bereitstellung dieses spannenden Forschungsthemas sowie die strukturelle Einarbeitung in die experimentellen Fertigkeiten. Hervorzuheben ist die engagierte Betreuung mit regelmäßigen Meetings, schnellen Korrekturen, zahlreichen wertvollen Ratschlägen und das Verständnis für eine krankheitsbedingte Pause. Daneben möchte ich mich bei Frau Dr. Natascha Schäfer für die vielen wertvollen Hilfestellungen bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Robert Blum und Herrn Priv.-Doz. Dr. Frank Döring für die Begutachtung meiner Dissertation bedanken. Herrn Prof. Dr. Michael Sendtner möchte ich für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Klinische Neurobiologie danken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Christian G. Specht (Universität Paris-Saclay) für die Bereitstellung der *eos*-KI-Maus, mit welcher dieses Forschungsthema erst ermöglicht wurde. Außerdem möchte ich mich auch bei der Forschungsgruppe von Dr. Christian G Specht für die Zusammenarbeit im Hinblick auf eine wissenschaftliche Veröffentlichung bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeiter*innen der AG Villmann bedanken. Danke Anna-Lena Eckes für die Einarbeitung in die Präparation von Rückenmarksneuronen sowie die fachlichen Ratschläge. Danke Christine Schmitt und Dana Wegmann für die unermüdliche Hilfsbereitschaft und herzliche Zusammenarbeit.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder Alexander bedanken. Dank eurer stetigen Unterstützung und liebevollen Ermutigung konnte ich mein Interesse an diesem Forschungsthema aufrechterhalten und diese Dissertation zu einem gelungenen Abschluss führen.