



Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 5714B

**Entwicklung und Analyse
von Mausmodellen zur
Untersuchung von Glyzin-
rezeptordefekten *in vivo***

B. Hartenstein
Institut für Genetik

Mai 1996

FORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 5714 B

**Entwicklung und Analyse von
Mausmodellen zur Untersuchung von
Glyzinrezeptordefekten *in vivo***

Bettina Hartenstein

Institut für Genetik

Diese Dissertation wurde genehmigt vom Fachbereich Biologie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
1996

**Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

ISSN 0947-8620

PDF GENERATED BY FZKA-DRUCKEREI

Zusammenfassung

Die Erhaltung des Muskeltonus, der die Grundlage für die aufrechte Körperstellung und die Feinabstimmung von Bewegungsabläufen bildet, erfordert ein Gleichgewicht der inhibitorischen und exzitatorischen Impulse, die in den neuronalen Regelkreisen des Rückenmarks verarbeitet werden. Im Rückenmark und Stammhirn von Wirbeltieren wird die synaptische Inhibition vom Strychnin-sensitiven Glyzinrezeptor (GlyR) vermittelt. Dieser liganden-gesteuerte Ionenkanal ist ein pentamerer Proteinkomplex aus drei α - und zwei β -Untereinheiten, der durch ein peripheres Membranprotein, das Gephyrin, in der neuronalen Membran verankert ist. Für die ligandenbindende α -Untereinheit konnten eine Vielzahl von Varianten isoliert werden, die für die Bildung verschiedener GlyR-Isoformen verantwortlich sind. Mutationen, die die Gene für die GlyR-Untereinheiten betreffen, sind stets mit chronischen Bewegungsstörungen assoziiert. So sind Punktmutationen im Gen für die GlyR α 1-Untereinheit für die *Hyperekplexie (Startle Disease)* verantwortlich, eine humane Erbkrankheit, die durch ausgeprägte Schreckreaktionen und episodische Muskelsteifheit charakterisiert ist. Die spontanen Mausmutanten *spastic (spa)*, *spasmodic (spd)* und *oscillator (ot)*, die vergleichbare Bewegungsstörungen manifestieren, tragen ebenfalls Mutationen in den Genen für die GlyR-Untereinheiten. Bei der Mausmutante *spa* führt eine Transposoninsertion, die im Gen für die GlyR β -Untereinheit lokalisiert ist, zu einer Störung der GlyR β -Expression. Bei den Mausmutanten *spd* und *ot* wurden, wie bei Hyperekplexiepatienten, Mutationen im Gen für die α 1-Untereinheit identifiziert. Diese Mutation führt bei der *spasmodischen* Maus zu veränderten Rezeptoreigenschaften und bei *oscillator* zum völligen Verlust der α 1-Untereinheit. Die Analogie der murinen und humanen Erbkrankheiten ermöglicht die Verwendung der Mausmutanten bei der Entwicklung von *in vivo* Tiermodellen, die zur Erforschung der molekularen Grundlagen der Glyzinrezeptorfunktion und zur Untersuchung von GlyR-Defekten des Menschen geeignet sind. Für die Entwicklung solcher Tiermodelle wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die hereditären Bewegungsstörungen der Mausmutanten *spa*, *spd* und *ot* durch therapeutischen Gentransfer zu komplementieren. Hierbei sollten die in den Mausmutanten defekten Rezeptorstrukturgene durch solche fremder Spezies ersetzt werden.

Für die genetische Rettung der *spastischen* Mausmutante wurden transgene Mäuse entwickelt, die die β -Untereinheit der Ratte in ihrem Nervensystem überexprimieren. Durch Einbringen der Transgenallele in den genetischen Hintergrund der *spastischen* Maus konnte deren Menge an funktionellen GlyR β -Transkripten vergrößert werden. Hierdurch konnte eine Zunahme an funktionellen GlyR-Molekülen erreicht und die Manifestierung ihres mutanten Phänotyps verhindert werden. Dies lieferte zum einen den formalen Beweis für den Zusammenhang von identifiziertem Gendefekt und mutantem Phänotyp und zeigte, daß GlyR-Untereinheiten über Speziesbarrieren hinweg wirksam sind. Zum anderen wurde deutlich, daß das Erscheinen der adulten GlyR-Isoform (GlyR_A) an der Membranoberfläche *in vivo* direkt von der Verfügbarkeit

funktioneller β -Untereinheiten abhängig ist. Darüber hinaus konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß die normale Funktion des glyzineren Systems bereits dann gewährleistet ist, wenn nur 25% an funktionsfähigen β -Transkripten gebildet werden bzw. wenn nur ca. die Hälfte der im Wildtyp vorhandenen GlyR_A-Moleküle die neuronale Membranoberfläche erreichen.

Zur genetischen Rettung der Mausmutanten *spasmodic* und *oscillator* wurden, in analogen Versuchsansätzen, transgene Mauslinien etabliert, die die GlyR α 1-Untereinheit des Menschen in ihrem Nervensystem überexprimieren. Nach Einbringen der Transgenallele in den genetischen Hintergrund der *ot* Maus konnte deren Phänotyp partiell komplementiert werden. Eine vollständige Rettung dieser Mausmutante bzw. eine Komplementation des *spasmodischen* Phänotyps konnte, vermutlich aufgrund zu niedriger Transgenexpressionsrate, nicht erreicht werden. Dennoch zeigte das Ergebnis, daß die humane α 1-Untereinheit in der Maus Funktion übernehmen kann, eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung von Mausmodellen, die zur Untersuchung des Pathomechanismus mutierter GlyR-Untereinheiten des Menschen geeignet sind.

Zweites Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von transgenen Mäusen, die die rekombinante GlyR-Untereinheit "Ch1" in ihrem Nervensystem exprimieren, für die *in vitro* gezeigt wurde, daß sie eine dominant negative Wirkung auf die GlyR-Aktivität entfaltet. Durch den Einsatz dieser Untereinheit sollte die GlyR-Aktivität *in vivo* gezielt reduziert werden und damit der Pathomechanismus der α 1-Untereinheit in Hyperekplexiepatienten, die ebenfalls als dominant negative GlyR-Untereinheit wirkt, simuliert werden. Die molekularbiologischen Analysen der etablierten Ch1-transgen Linien zeigten, daß die transgene Untereinheit, anders als erwartet, die Expression der ligandenbindende α 1-Untereinheit beeinflusst. Dieses Erkenntnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen aus entsprechenden Experimenten mit *in vitro* Systemen und macht deutlich, daß *in vitro* Modelle die *in vivo* Situation nicht unbedingt repräsentieren müssen. Dies unterstreicht die Bedeutung von Tiermodellen bei der Untersuchung der molekularen Grundlagen der glyzineren Nervenübertragung und bei der Erforschung von humanen Glyzinrezeptordefekten.

Summary

Development and analysis of mouse models for the *in vivo* examination of glycine receptor defects

The maintenance of the muscle tone, which is the prerequisite for balance, posture and movement, depends on the balance of excitatory and inhibitory impulses, that are processed by the neuronal circuits of the spinal cord. In vertebrate brain stem and spinal cord, the postsynaptic inhibition is mediated by the strychnine-sensitive glycine receptor (GlyR). This ligand gated ion channel is a pentameric protein composed of three copies of the α subunit and two copies of the β subunit. The receptor protein is further associated with a peripheral membrane protein, named gephyrin, that is thought to be responsible for anchoring and synaptic localization of the GlyR. Several isoforms of the ligand binding α subunit create regional and developmental heterogeneity of the GlyR.

Mutations in the GlyR subunit genes are associated with neuromotor diseases in mouse and man. In particular, pointmutations in the $\alpha 1$ subunit have been identified in patients suffering from dominant and recessive forms of hereditary hyperekplexia (startle disease), a disease characterized by exaggerated startle reaction and generalized hypertonia. Related recessive mouse mutants exist, which suffer from similar symptoms and carry defects in either their GlyR $\alpha 1$ or β subunit gene, respectively. The mutations *spasmodic* (*spd*) and *oscillator* (*ot*) represent a partial or complete loss of function mutation of the $\alpha 1$ subunit. The mutant *spastic* (*spa*) has an intronic insertion of a transposable element in the GlyR β subunit gene leading to disturbed GlyR β expression. Because of the analogy of these murine and human diseases, the GlyR mouse mutants comprise unique experimental models of human hyperekplexia. To exploit this potential, it was attempted to rescue the mutant phenotype of the mouse mutants by introducing functional GlyR $\alpha 1$ and β subunit transgenes derived from other species.

For the complementation of the *spa* phenotype, transgenic mice were created that show neuronal overexpression of the GlyR β subunit gene of the rat. By introducing the transgene allele into the genetic background of homozygous *spa* mice, their amount of functional β transcripts and thereby GlyR level was increased. First, these experiments proved that the *spa* mutation is causal for the phenotype of the *spastic* mouse as expression of the transgene rescued the mutant phenotype. Second, by using a transgene derived from another species, it was shown that in glycinergic neurotransmission species barriers can be overcome. Third, it became clear that *in vivo* the adult GlyR subtype (GlyR_A) is only stable when complexed with the GlyR β subunit. Furthermore, it was demonstrated that partial restoration of GlyR β expression, i.e. 25% of full length β transcripts, and around 50% of functional GlyR_A-molecules are sufficient for proper function of glycinergic neurotransmission.

To rescue the *spasmodic* and *oscillator* phenotype, first transgenic mouse lines were generated showing neuronal overexpression of the human GlyR $\alpha 1$ subunit. Introducing the transgene

allele into the genetic background of the homozygous *ot* mouse allowed the partial rescue of its mutant phenotype. A complete rescue of their phenotype and a complementation of the spasmodic phenotype, respectively, has not been achieved, presumably because of low transgene expression level. However, by these experiments it has been demonstrated, that the human $\alpha 1$ subunit can substitute for the murine protein, a prerequisite for the development of transgenic mouse models expressing glycine receptors containing the human hyperekplexia mutations. These models will be an excellent tool to examine the precise effects of human startle mutations on the synaptic physiology *in vivo*.

Finally, transgenic mice were created that show neuronal overexpression of the recombinant GlyR subunit 'Ch1'. This GlyR subunit was shown to exert a dominant negative effect on the electrophysiological properties of the native GlyR *in vitro*. By using this subunit as a transgene, it was attempted to reduce GlyR activity *in vivo* and therefore to model the pathomechanism of the mutated $\alpha 1$ subunit of hyperekplexia patients, that also affects GlyR function in a dominant negative manner. Surprisingly, the expression of this molecule in the central nervous system of the Ch1 transgenic mice impaired their endogenous GlyR $\alpha 1$ expression. This finding is in contrast to the results obtained from corresponding experiments *in vitro*, pointing out the importance of *in vivo* systems to study the molecular aspects of glycinergic neurotransmission and the pathomechanism of human neuromotoric disorders, caused by GlyR defects.

Abkürzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Amoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytidin
cDNA	komplementäre DNA
CIP	Intestinale alkalische Phosphatase vom Kalb
cpm	<i>counts per minute</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Signalverstärkung durch Chemoluminiszenz
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Etbr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
G	Guanosin
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GABA	γ -Aminobuttersäure
GABAR	GABA-Rezeptor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GlyR	Glyzinrezeptor
h	Stunden
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-Piperazin-N'-
	Ethansulfonsäure
H ₂ O _d	destilliertes Wasser
kb	Kilobase (1000 bp)
kD	Kilodalton
l	Liter

VI

LB	Luria-Bertani-Medium
M	Molarität
Mab	monoklonaler Antikörper
min	Minuten
ml	Milliliter
MOPS	3-N-(Morpholino)-Propan-Sulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NH ₄ Ac	Amoniumacetat
NSE	neuronspezifische Enolase
OD	Optische Dichte
Oligo-dT	oligomeres Desoxythymidin
<i>ot</i>	<i>oscillator</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAsin	RNase-Inhibitor
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>spa</i>	<i>spastic</i>
<i>spd</i>	<i>spasmodic</i>
SSC	<i>Standard Saline Citrat</i>
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
SV40	Simian Virus 40
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-tetramethyl-ethylendiamin
tg	Transgen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan
U	<i>Units</i> (Enzymeinheiten)
ÜS	Überstand
V	Volt
w/v	<i>weight per volume</i>

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abkürzungen	III
Einleitung	1
1. Das glyzinerge System im zentralen Nervensystem von Säugetieren	1
2. Die Liganden des Glyzinrezeptors	3
3. Die Struktur des inhibitorischen Glyzinrezeptors und seine funktionellen Domänen	4
4. Die Isoformen und Untereinheitsvarianten des Glyzinrezeptors	7
5. Das Expressionsmuster der GlyR-Untereinheiten	8
6. Die Pathologie des Glyzinrezeptors	9
6.1 Humane Glyzinrezeptormutationen als Ursache für eine abnorme Schreckreaktion: Hyperekplexie	10
6.1.1 Dominant vererbte Hyperekplexie	10
6.1.2 Hyperekplexie mit rezessivem Erbgang	11
6.2 Glyzinrezeptordefekte der Maus	12
6.2.1 Die Mausmutante <i>spastic</i> (<i>spa</i>)	12
6.2.2 Die Mausmutante <i>albany</i> (<i>spa^{Alb}</i>)	13
6.2.3 Die Mausmutante <i>spasmodic</i> (<i>spd</i>)	14
6.2.4 Die Mausmutante <i>oscillator</i> (<i>spd^{ot}</i>)	14
7. Zielsetzung der Arbeit	15
Ergebnisse	17
Teil I: Ersatz defekter Rezeptorstrukturgene durch therapeutischen Gentransfer bei hereditären Bewegungsstörungen der Maus (<i>rescue</i>)	
A. Genetische Rettung der Mausmutante <i>spastic</i> (<i>spa rescue</i>)	17
1. Entwicklung des β -Expressionskonstrukts	18
2. Entwickeln transgener Mauslinien, die das Gen für die GlyR β -Untereinheit der Ratte in ihrem Nervensystem überexprimieren	19
2.1 Etablierung β -transgener Linien	19
2.2 Analyse der transgenen Transkription im Nervensystem der β -transgenen Mäuse	22
3. Einbringen der Transgenallele der β -Transgenlinien in den genetischen Hintergrund der Mausmutante <i>spastic</i>	25

3.1 Kreuzungsschema und die Verfahren zur genotypischen Analyse der Brütungsnachkommen	26
3.2 Entwicklung eines genetischen Markers für das <i>spa</i> Allel	27
3.2.1 Charakterisierung eines genomischen Fragments des Gens für die GlyR- β -Untereinheit	27
3.2.2 Der Mikrosatellit <i>Sat.2</i> ist polymorph und wird gekoppelt mit dem <i>spa</i> Allel vererbt	28
3.3 Entwicklung homozygoter <i>spa</i> Mäuse, die das GlyR β -Transgen der Linie 416 in ihrem Genom tragen	30
3.3.1 Die Kreuzungsexperimente	29
3.3.2 Phänotypische Analyse der <i>rescue</i> Maus	33
3.3.3 Analyse der funktionellen GlyR β -Transkripte im ZNS der <i>rescue</i> Maus	36
3.3.4 Analyse der GlyR _A -Oberflächenexpression im ZNS der <i>rescue</i> Maus	38
3.4 Entwicklung und Analyse homozygoter <i>spa</i> Mäuse, die das β -Transgen der Linien 456 bzw. 415 in ihrem Genom tragen	40
B. Genetische Rettung der Mausmutante <i>spasmodic</i> (<i>spd rescue</i>)	45
1. Das Expressionskonstrukt	45
2. Entwickeln transgener Mauslinien, die das Gen für die humane α 1-Untereinheit in ihrem Nervensystem überexprimieren	46
2.1 Etablierung α 1-transgener Linien	46
2.2 Expressionsanalyse der α 1-transgenen Mausstämme	48
2.2.1 RNA-Analyse	49
2.2.2 Analyse des transgenen Proteins	50
3. Einbringen der Transgenallele der α 1-Transgenlinien in die Mausmutante <i>spasmodic</i>	52
3.1 Kreuzungsschema und die Verfahren zur genotypischen Analyse der Brütungsnachkommen	52
3.2 Entwicklung homozygoter <i>spd</i> Mäuse, die das Transgen der Linie 44 in ihrem Genom tragen	54
3.3 Entwicklung homozygoter <i>spd</i> Mäuse, die das Transgen der Linie 43 in ihrem Genom tragen	56
4. Einbringen der α 1-Transgenallele der Linie 43 in die Mausmutante <i>oscillator</i> (<i>spd</i> ^{ot} <i>rescue</i>)	58
4.1 Das Kreuzungsschema und die Verfahren zur genotypischen Analyse der Brütungsnachkommen	59
4.2 Entwicklung homozygoter <i>ot</i> Mäuse, die das Transgen der Linie 43 in ihrem Genom tragen	60

Teil II: Expression einer dominant negativ wirkenden Glyzinrezeptor-Untereinheit im zentralen Nervensystem von transgenen Mäusen

1. Die chimäre Untereinheit Ch1 - eine dominant negativ wirkende GlyR-Untereinheit	65
2. Das Ch1-Expressionskonstrukt	68
3. Entwicklung transgener Mauslinien, die die Ch1-cDNA in ihrem Nervensystem exprimieren	68
3.1 Etablierung Ch1-transgener Linien	69
3.2 Phänotypische Analyse der Ch1-transgenen Mäuse	70
3.3 Expressionsanalyse der Ch1-transgenen Linien	71
3.3.1 RNA-Analyse	71
3.3.2 Analyse des transgenen Ch1-Proteins	73
Diskussion	76
1. Die Menge an funktionellen Glyzinrezeptormolekülen läßt sich durch Variation der Expression der strukturellen β -Untereinheit verändern	77
2. Eine GlyR-Expression von 60% ist ausreichend, um die Ausprägung aller <i>spastischen</i> Verhaltensmerkmale zu verhindern	80
3. Transgene Expression humaner GlyR α 1-Untereinheiten im ZNS der Mausmutante <i>oscillator</i> führt zu einer partiellen Komplementation ihres mutanten Phänotyps	82
4. Transgene Expression der dominant negativen GlyR-Untereinheit Ch1 führt zu einer veränderten Expression der ligandenbindenden α -Untereinheit und zu einem milden Phänotyp	86
Material und Methoden	89
A. Material	89
B. Methoden	94
Literaturverzeichnis	107

Einleitung

1. Das glyzinerge System im zentralen Nervensystem von Säugetieren

Die Leistungsfähigkeit des Nervensystems höherer Lebewesen beruht in erster Linie auf der synaptischen Kommunikation der vielen Milliarden Nervenzellen im komplexen neuronalen Netzwerk (Jessell und Kandel, 1993). Schon eine einzelne Nervenzelle kann mehrere tausend synaptische Verbindungen zu anderen Nervenzellen besitzen (Thompsons, 1990). Im Nervensystem der Säugetiere gehören fast alle zum Typ der chemischen Synapse, bei der der ankommende elektrische Impuls an der präsynaptischen Membran in einen chemischen Reiz umgewandelt wird (Jessell und Kandel, 1993; Kandel et al., 1991; Thompson, 1990). An der Nervenendigung werden durch die Depolarisation der Membran spannungsabhängige Calciumkanäle geöffnet, und der resultierende Calciumeinstrom hat eine Ausschüttung von chemischen Überträgerstoffen aus präsynaptischen Vesikeln zur Folge (Katz, 1966; Kandel et al., 1991).

Die Bindung der präsynaptisch freigesetzten Neurotransmittermoleküle an spezifische postsynaptische Rezeptoren führt, je nach Rezeptortyp, entweder direkt zu einer reversiblen Änderung der Membranleitfähigkeit (Kanalproteine) oder zur Aktivierung von *second messenger*-Systemen mit mehrfachen intrazellulären Folgeeffekten (Nichtkanalproteine, wie z.B. G-Protein gekoppelte Rezeptoren). Die *second messenger*-Systeme können wiederum Membrankanäle direkt oder indirekt über Proteinkinasen beeinflussen oder aber in andere molekulare Maschinerien des Neurons wie Beweglichkeit, Wachstum und Stoffwechsel eingreifen (Shepherd, 1993; Kandel et al., 1991). Während die Stimulation von *second messenger*-Systemen durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren verhältnismäßig langsam verläuft, führt die Aktivierung liganden-gesteuerter Ionenkanäle unmittelbar zu einer Änderung des postsynaptischen Membranpotentials (Hille, 1984; Kandel et al., 1991). Je nach der Ionenspezifität eines solchen Rezeptors kann eine Öffnung seines Kanals ein exzitatorisches postsynaptisches Membranpotential (EPSP, Membrandepolarisierung) oder ein inhibitorisches postsynaptisches Membranpotential (IPSP, Membranhyperpolarisierung) auslösen (Shepherd, 1993; Kandel et al., 1991; Hille, 1984).

Für die physiologische Funktion des Nervensystems ist ein Gleichgewicht exzitatorischer und inhibitorischer Impulse unerlässlich (Becker et al., 1994). Im zentralen Nervensystem von Säugetieren sind vornehmlich zwei Typen liganden-gesteuerter Chloridkanalrezeptoren für die Erzeugung inhibitorischer postsynaptischer Membranpotentiale (IPSP) verantwortlich: der GABA_A-Rezeptor, der durch γ -Aminobuttersäure (GABA) aktiviert wird, und der Strychnin-sensitive Glyzinrezeptor (GlyR), der Bindungsstellen für die niedermolekulare Aminosäure Glyzin besitzt (Betz, 1992; Langosch et al., 1990a, 1990b; Becker, 1992; Kandel et al., 1991; Shepherd, 1993). Werden diese Rezeptorkanäle nach der Bindung ihrer Liganden geöffnet, erhöht

sich kurzzeitig die Durchlässigkeit der postsynaptischen Membran für negativ geladene Chloridionen, und es kommt zu einer Hyperpolarisierung (Bormann et al., 1987). Die Hyperpolarisierung der postsynaptischen Membran kann die Amplitude eines gleichzeitig an anderer Stelle auftretenden exzitatorischen postsynaptischen Potentials (EPSP) reduzieren und so die Auslösung eines Aktionspotentials am Axonhügel des postsynaptischen Neurons verhindern (Coombs et al., 1955, Barker und Ransom, 1978, Bormann et al., 1987; Shepherd, 1993; Kandel et al., 1991).

Während GABA seine inhibitorische Wirkung in erster Linie in der Großhirnrinde (Cortex) und im Kleinhirn (Cerebellum) von Wirbeltieren entfaltet und ebenso im Nervensystem von Wirbellosen als Überträgerstoff fungiert, konnte für Glyzin eine Funktion als inhibitorisch wirkender Neurotransmitter bisher ausschließlich im Nervensystem von Vertebraten nachgewiesen werden (Shepherd, 1993). Neben seiner modulatorischen Funktion auf glutamerge Synapsen höherer Hirnregionen (Otterson und Storm-Mathisen, 1990) ist diese Aminosäure und ihr Strychnin-sensitiver Rezeptor für die Verarbeitung afferenter Signale im Stammhirn und vor allem im Rückenmark von großer Bedeutung (Betz und Becker, 1988; Langosch, 1990b; Aprison, 1990; Aprison und Wermann, 1965; Becker, 1992; Betz, 1992; Kandel et al., 1991; Holmes, 1990). So herrschen in vestibulären und auditorischen Systemen die glyzinerge Synapsen als inhibitorische synaptische Verbindungen vor (Triller et al., 1985; Araki et al., 1988; van den Pol und Gorcs, 1988; Becker, 1992; Becker et al., 1994; Otterson und Storm-Mathisen, 1990). Insbesondere jedoch reguliert Glyzin als Transmittermolekül spezieller Interneurone des Rückenmarks die Aktivität der Motoneurone, die den Bewegungsapparat kontrollieren (Wermann et al., 1968; Aprison und Daly, 1978; Krnjevic, 1981; Kandel et al., 1991; Holmes, 1990; Becker et al., 1994; Langosch et al., 1990a, 1990b). Sowohl die Kontrolle des Skelettmuskeltonus, die für die Erhaltung der aufrechten Körperstellung unentbehrlich ist, als auch der koordinierte Ablauf aller Bewegungen, willkürlich oder reflektorisch, bedarf einer exakten Feinabstimmung etlicher Muskelpartien (Katz, 1966; Kandel et al., 1991; Holmes, 1990; Shepherd, 1993). Für die hierzu erforderliche präzise Feinregulierung der spinalen motorischen Kontrollsysteme sind die inhibitorische Interneurone der Schaltkreise im Rückenmark durch ihren regulierenden Einfluß auf die Motoneurone von großer Bedeutung (Kandel et al., 1991). Während die Mitglieder der *Gruppe Ia Interneurone* den sensorischen und motorischen Neurone zwischengeschaltet sind (Kandel et al., 1991; Shepherd, 1993) und meist der Kontrolle der motorischen Systemen des Gehirns unterliegen, werden die *Renshaw-Zellen*, die für eine unmittelbare Feedbackkontrolle der Motoneurone verantwortlich sind, direkt von einer Axonkollaterale desjenigen Motoneurons stimuliert, das sie selbst inhibieren (Abb.1) (Eccles et al., 1954; Renshaw, 1941; Kandel et al., 1991; Shepherd, 1993). Das Renshaw-Interneuron wird dabei vom feuernenden Motoneuron durch präsynaptisch freigesetztes Acetylcholin aktiviert und zur Ausschüttung von Glyzin veranlaßt. Die Bindung an die in der postsynaptischen Membran des Motorneurons lokalisierten Glyzinrezeptoren

führt zu einer Membranhypervolarisierung und damit zu einer negative Rückkopplung des innervierenden Motoneurons (Eccles et al., 1954; Kandel et al., 1991). Diese rücklaufende Hemmung ist für die Regulation und Stabilisierung der Feuerungsrate der Motoneurone von großer Bedeutung (Eccles et al., 1954; Kandel et al., 1991).

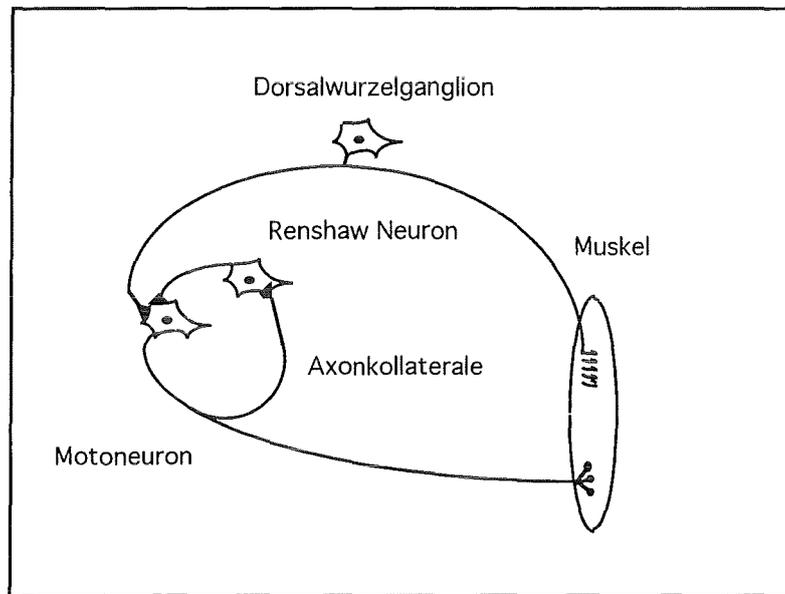


Abb.1 Renshaw Zellen, die von einer Axonkollateralen des Motoneurons innerviert werden, sind für eine negative Feedbackkontrolle verantwortlich. Sie inhibieren das Motoneuron durch Ausschütten von Glyzin, das an seine Rezeptoren an der postsynaptischen Membran bindet und so zum Einstrom von Chloridionen und damit zur Hypervolarisierung der postsynaptischen Membran führt (nach Schmidt und Thews, 1994).

2. Die Liganden des Glyzinrezeptors

Im Vergleich zu anderen Ionenkanalrezeptoren gibt es verhältnismäßig wenige Agonisten, für die der Glyzinrezeptor eine Affinität besitzt (Langosch et al., 1990a, 1990b). Neben Glyzin können eine Anzahl weiterer α - und β -Aminosäuren an den Glyzinrezeptor binden, wobei die Fähigkeit das Kanalprotein zu aktivieren in der Rangfolge Glyzin > β -Alanin > Taurin >> Alanin, Serin > Prolin abnimmt (Curtis et al., 1968, Werman et al., 1968, Davidoff et al., 1969; Langosch et al., 1990a, 1990b). Das Pflanzenalkaloid Strychnin und seine Derivate, die mit hoher Affinität an den GlyR binden können, führen zu einer kompetitiven Hemmung des Kanalproteins (Young und Snyder, 1973, 1974; Langosch et al., 1990a, 1990b; Betz und Becker, 1988; Betz, 1992). In Übereinstimmung mit der physiologischen Rolle des Kanalproteins führen subletale Strychningaben zu motorischen Störungen, die u.a. durch einen erhöhten Muskeltonus und Myoklonien charakterisiert sind (Becker, 1992; Becker et al., 1992). Zudem ist eine Veränderung der akustischen und visuellen Empfindungen zu beobachten (Becker, 1992). Bei einer

Strychninkonzentration von mehr als einem Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht kommt es zu einer Übererregung der motorischen Systeme. Der eintretende Atemstillstand führt in der Regel in kürzester Zeit zum Tode (Becker, 1992).

3. Die Struktur des inhibitorischen Glyzinrezeptors und seine funktionellen Domänen

Der GlyR war der erste Neurotransmitterrezeptor, der in reiner Form aus dem zentralen Nervensystem isoliert werden konnte (Betz et al., 1994). Das aus dem ZNS von Säugern gewonnene Rezeptorprotein (Abb.2) konnte als pentamerer Komplex, bestehend aus zwei Typen integraler, glykosylierter Proteine, der α - (48 kD) und der β -Untereinheit (58 kD), identifiziert werden (Pfeiffer et al., 1982; Graham et al., 1985; Becker et al., 1986; Langosch et al., 1988).

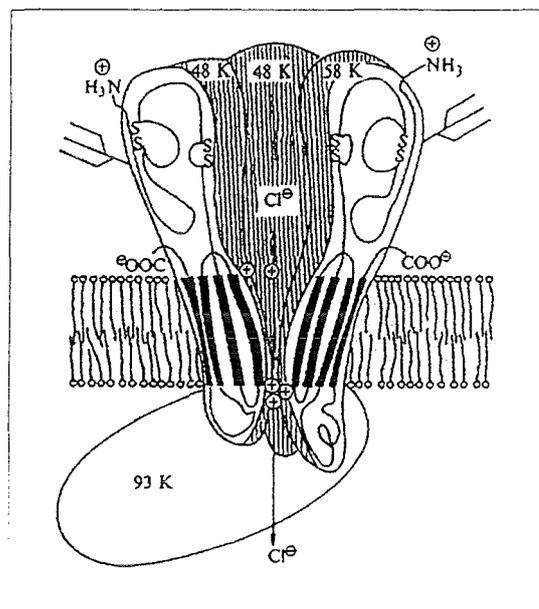


Abb.2 Die Struktur des Glyzinrezeptors

Schematische Darstellung des Membranrezeptors im Längsschnitt. Es sind zwei α -Untereinheiten (48kD), eine β -Untereinheit (58kD) und das cytoplasmatische Gephyrin (93kD) dargestellt. S-S symbolisiert Disulfidbrücken, die Äste stellen Glykosylierungen dar (aus Betz, 1992).

Jeweils drei α - und zwei β -Untereinheiten bilden ein rosettenförmiges Rezeptorpentamer (Langosch et al., 1988), das durch eine weitere Proteinkomponente, das cytoplasmatisch lokalisierte Gephyrin (93 kD), in der postsynaptischen Membran verankert ist (Graham et al., 1985; Pfeiffer et al., 1982; Schmitt et al., 1987; Prior et al., 1992; Betz et al., 1994; Kirsch et al., 1991, 1993b; Becker et al., 1989). Die α - und β -Untereinheit weisen einen hohen Grad an Homologie bezüglich ihrer Aminosäuresequenz und, dadurch bedingt, eine große Ähnlichkeit in der Organisation ihrer funktionellen Domänen auf (Grenningloh et al., 1987, 1990a; Langosch et

al., 1990a, 1990b; Pfeiffer et al., 1984). Ihr N-terminaler Bereich repräsentiert jeweils eine große hydrophile, extrazelluläre Domäne (Abb.3A). Im C-terminalen Bereich finden sich vier Sequenzbereiche (M1-M4) mit hohem Anteil an hydrophoben Aminosäuren (Grenningloh et al., 1987; Betz, 1990; Langosch et al., 1990a, 1990b; Betz et al., 1994). Die Domänen M1 bis M4 durchspannen die Lipidmembran vermutlich als α -Helices (Langosch et al., 1990a, 1990b, 1991) und sind für die Bildung der Kanalpore verantwortlich (Langosch et al., 1991; Betz et al., 1994). Man nimmt an, daß die M2-Transmembrandomänen der GlyR-Untereinheiten, die eine relativ große Anzahl polarer Aminosäuren besitzen, das Innere der Kanalpore auskleiden (Betz, 1990; Langosch et al., 1991; Pribilla et al., 1992). Die hydrophoben Elemente M1, M3 und M4 umgeben die M2-Domäne und bilden vermutlich die der Lipiddoppelschicht zugewandten Außenwand des Kanals (Langosch et al., 1990a, 1990b) (vgl. Abb.3B). Diese Transmembrandomänen wurden auch in den Untereinheiten des nicotinergen Acetylcholinrezeptors (nAChR) und des GABA_A-Rezeptors identifiziert und sind zwischen diesen ligandengesteuerten Ionenkanalproteinen hochgradig konserviert (Grenningloh et al., 1987; Betz, 1990; Ortells und Lunt, 1995; Unwin, 1993; Betz et al., 1994). Aufgrund der gemeinsamen Transmembrantopologie zählt man diese drei Rezeptoren zu einer Proteinsuperfamilie und es ist wahrscheinlich, daß sie durch Genduplikation aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden sind (Grenningloh et al., 1987; Betz, 1990, 1992; Ortells und Lunt, 1995; Betz et al., 1994).

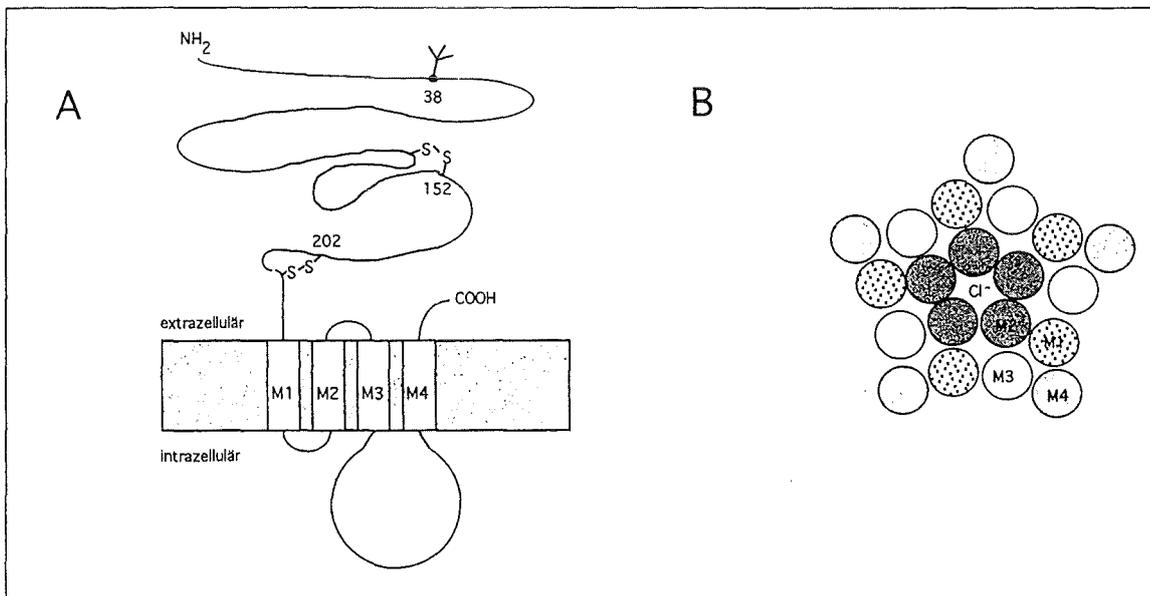


Abb. 3

(A) Schematische Darstellung der α 1-Untereinheit. Die Zahlen weisen auf Aminosäurepositionen hin. Die Aminosäure in Position 38 stellt eine putative Glykosylierungsstelle dar.

(B) Anordnung der Transmembrandomänen M1-M4 im Rezeptorkanal (nach Langosch et al., 1990a).

Die Bindungsstellen für den Antagonisten Strychnin und die Agonisten Glyzin, β -Alanin und Taurin wurden auf der extrazellulären, N-terminalen Domäne der α -Untereinheit lokalisiert (Marvizon et al., 1986; Schmieden et al., 1992, 1993; Ruiz-Gomez et al., 1990; Vandenberg et al., 1992a, 1992b, 1993; Graham et al., 1981, 1983; Kuhse et al., 1990; Grenningloh et al., 1990b; Rajendra et al., 1995c; Betz et al., 1994). Die ligandenbindene α -Untereinheit ist *in vitro* zur Bildung von funktionellen Homopentameren befähigt (Schmieden et al., 1989; Sontheimer et al., 1989). So sind z.B. in *Xenopus* Oocyten, in denen ausschließlich α -Untereinheiten exprimiert werden, glyzin-gesteuerte Chloridkanäle nachweisbar, die durch Strychnine kompetitiv gehemmt und durch die Aminosäuren β -Alanin und Taurin aktiviert werden können (Schmieden et al., 1989).

Die β -Untereinheit besitzt keine Affinität zu den Liganden des GlyR und ist ohne die α -Untereinheit *in vitro* nicht zur Bildung von funktionellen Chloridkanälen befähigt (Grenningloh et al., 1990a; Kuhse et al., 1993). Es konnte gezeigt werden, daß die β -Untereinheit die Kanalleitfähigkeit des GlyR kontrolliert (Bormann et al., 1993) und die Bindung des Rezeptors an das Ankerprotein Gephyrin vermittelt (Meyer et al., 1995; Kirsch et al., 1995). Weiterhin reduziert die Transmembrandomäne M2 der β -Untereinheit die Empfindlichkeit des heterooligomeren Rezeptors gegenüber Picrotoxinin (Pribilla et al., 1992), einem potenten Alkaloid, das bei GABA_A-R und α -Homopentameren zum Kanalblock führt (Schmieden et al., 1989; Sontheimer et al., 1989). Die Kopplung der β -Untereinheit an die cytoplasmatische Gephyrinkomponente erfolgt an der großen, cytoplasmatischen Schleife, die die Transmembrandomänen M3 und M4 verbindet (Meyer et al., 1995; Kirsch et al., 1995). *In vivo* scheint die Anwesenheit der β -Untereinheit für den Zusammenbau (*Assembly*), die Oberflächenexpression und/ oder die Stabilität des Rezeptormoleküls unerlässlich zu sein (Grenningloh et al., 1990a; Kuhse et al., 1993; Malosio et al., 1991a). So ist bei Mausmutanten, für die eine Reduktion an funktionellen β -Transkripten nachgewiesen werden konnte, die Oberflächenexpression des GlyR gestört und dadurch die glyzinerge Nervenübertragung erheblich beeinträchtigt (Becker et al., 1986, 1992; White und Heller, 1982; Kingsmore et al., 1994; Mülhardt et al., 1994).

Der GlyR liegt *in vivo* in einer unveränderlichen Stöchiometrie von drei α und zwei β -Untereinheiten vor (Bormann et al., 1993; Kuhse et al., 1993; Langosch et al., 1988). Die Sequenzmotive, die für den stöchiometrischen Zusammenbau eines stabilen $\alpha_3\beta_2$ -Pentamers verantwortlich sind, liegen zwischen der Aminosäure 1 und 135 der N-terminalen, extrazellulären Domäne beider Untereinheiten (Kuhse et al., 1993). Diese Motive verleihen jeder Untereinheit eine spezifische Verhaltensweise bezüglich des Rezeptorzusammenbaus und determinieren ihre Beteiligung am Rezeptorkomplex (Kuhse et al., 1993).

Auf der cytoplasmatischen Seite ist der GlyR mit dem peripheren Membranprotein Gephyrin assoziiert (Graham et al., 1985; Prior et al., 1992; Schmitt et al., 1987; Pfeiffer et al., 1982; Langosch et al., 1990a, 1990b, 1992; Triller et al., 1985, 1987, 1990a; Becker et al., 1989; Altschulter et al., 1986; Naas et al., 1991), das hochaffin an Tubulin bindet (Kirsch et al., 1991, 1993b; Prior et al., 1992; Betz et al., 1994). Der GlyR ist in kleinen Gruppen ("hot spot") an den synaptischen Verdichtungen lokalisiert (van den Pol und Gorcs, 1988; Seitanidou et al., 1988; Kirsch et al., 1991; Altschulter et al., 1986; Takagi et al., 1992; Betz et al., 1994; Triller et al., 1985, 1987, 1990a, 1990b). Man konnte zeigen, daß der GlyR-Akkumulation ein Zusammenlagern zahlreicher Gephyrinmoleküle an der Plasmamembran vorausgeht (Kirsch et al., 1993a; Alavarez et al., 1993; Béchade et al., 1994; Becker et al., 1988), und daß bei einer Hemmung der Gephyrinexpression die synaptische Lokalisation der GlyR-Komplexe verhindert wird (Kirsch et al., 1993a). Man nimmt daher an, daß dieses Protein, neben der Fixierung des Rezeptors in der Membran, wesentlich an der Organisation des GlyR in synaptische Mikrodomänen beteiligt ist (Kirsch et al., 1993a; Béchade et al., 1994).

Die Gephyrinexpression, die aufgrund alternativen Spleißens zusätzliche Variation erhält (Prior et al., 1992), ist nicht nur auf das Nervensystem beschränkt, sondern kann auch in vielen anderen Geweben, z.B. Leber, Niere und Lunge, nachgewiesen werden (Prior et al., 1992; Kirsch et al., 1993b, 1993c, 1995). Folglich kann Gephyrin nicht nur für die Verankerung des GlyR, sondern muß auch für die Vermittlung der Interaktionen anderer Proteine mit Mikrotubuli verantwortlich sein.

4. Isoformen und Untereinheitenvarianten des Glyzinrezeptors

Für den GlyR existieren wie für andere Neurotransmitterrezeptoren verschiedene Rezeptorsubtypen, deren Expression streng kontrolliert ist und an deren Zusammensetzung Untereinheiten beteiligt sind, die zwar nahe verwandt, aber nicht identisch sind (Becker et al., 1988; Betz, 1990; Betz et al., 1994). Soweit bekannt existiert für die β -Untereinheit des GlyR lediglich ein einziges Gen (Grenningloh et al., 1990a; Betz et al., 1994; Béchade et al., 1994). Das Spektrum an möglichen GlyR-Subtypen wird demzufolge vermutlich allein durch die α -Untereinheit bestimmt, für die bis heute, in Mensch und Ratte, vier verschiedene Gene identifiziert werden konnten (Grenningloh et al., 1990b; Kuhse et al., 1990; Matzenbach et al., 1994). Alternatives Spleißen ihrer Transkriptionsprodukte trägt zusätzlich zum Variantenreichtum der α -Untereinheiten bei (Malosio et al., 1991b; Matzenbach et al., 1994; Kuhse et al., 1991). Während die Aufgaben der Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 4$ bisher ungeklärt blieben, konnten die in Rückenmarksneuronen am stärksten vertretenen Hauptvarianten $\alpha 1$ (48kD) und $\alpha 2$ (49kD) entwicklungspezifisch regulierten GlyR-Subtypen zugeordnet werden (Becker et al., 1988).

Der ursprünglich isolierte Proteinkomplex, der, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, aus zwei β - (58 kD) und drei α -Untereinheiten (48 kD) besteht (Pfeiffer et al., 1982), erwies sich als die GlyR-Isoform (GlyR_A), die im Rückenmark adulter Wirbeltiere überwiegt (Akagi et al., 1989, 1991; Becker et al., 1988, 1993; Malosio et al., 1991b). Die α -Untereinheiten des GlyR_A wurde fortan als α 1-Untereinheit bezeichnet. Im neugeborenen Nager herrscht eine neonatale Rezeptorform (GlyR_N) vor, die zwei Wochen nach der Geburt durch den GlyR_A ersetzt wird (Becker et al., 1988; Malosio et al., 1991). An der Zusammensetzung des GlyR_N ist die Untereinheitsvariante α 2 (49 kD) beteiligt (Becker et al., 1988; Grenningloh et al., 1990b; Akagi et al., 1991). Es wird diskutiert, daß das GlyR_N-Pentamer ausschließlich aus fünf ligandenbindenden α 2-Untereinheiten besteht, daß die β -Untereinheit also die neonatale Rezeptorform nicht mitbestimmt (Betz et al., 1994).

Das Gen für die α 1-Untereinheit wurde im menschlichen Genom auf dem langen Arm von Chromosom 5 (5q) lokalisiert (Grenningloh et al., 1990b; Ryan et al., 1992b, 1994; Buckwalter et al., 1994; Baker et al., 1994). Bei der Maus liegt es auf Chromosom 11, auf dem sich eine syntäne Region zum entsprechenden Abschnitt im humanen Chromosom 5 befindet (Buckwalter et al., 1993, 1994). Diese Übereinstimmung weist auf den hohen Verwandtschaftsgrad dieser beiden Spezies hin und unterstützt die Verwendung von Mausmodellen zur Analyse von humanen Erbkrankheiten.

5. Das Expressionsmuster der GlyR-Untereinheiten

Eine detaillierte Untersuchung der Expressionsmuster der einzelnen GlyR-Untereinheiten ergab, daß die alle bekannten α -Varianten einer komplexen entwicklungspezifischen Expressionsregulation unterliegen (Malosio et al., 1991a, 1991b; Kuhse et al., 1991; Becker et al., 1988, 1993; Hoch et al., 1989, 1992; Akagi et al., 1989; Matzenbach et al., 1994). Die α 2-Untereinheit, die vermutlich allein für die Bildung des GlyR_N verantwortlich ist, wird im Nervensystem der Ratte vornehmlich prenatal exprimiert und ist in dieser Zeitspanne insbesondere im Rückenmark und in sehr geringem Maße auch im Großhirn anzutreffen (Malosio et al., 1991a; Akagi et al., 1991). In Übereinstimmung mit dem Wechsel von neonataler zu adulter GlyR-Isoform GlyR_A in der zweiten bis dritten Woche nach der Geburt (Becker et al., 1988; Hoch et al., 1989) nimmt die Expression der α 2-Untereinheit im Rückenmark und Stammhirn nach der ersten postnatalen Woche stark ab, während die Expression der α 1-Untereinheit bis zur dritten postnatalen Woche stetig zunimmt (Malosio et al., 1991a; Becker et al., 1988). Das Expressionsmuster der β -Untereinheit bleibt indessen während der gesamten Entwicklung des Nagers größtenteils unverändert (Grenningloh et al., 1990a; Malosio et al., 1991a). Sie kann in fast allen Regionen des zentralen Nervensystems nachgewiesen werden und ist dort ab dem

vierzehnten Tag der Embryonalentwicklung stets in großer Menge vorhanden (Malosio et al., 1991a). Erstaunlicherweise erscheint die β -Untereinheit auch in höheren Gehirnregionen (Kleinhirn, Thalamus, Bulbus olfactori und Striatum), in denen keine oder nur wenig ligandenbindende α -Untereinheiten exprimiert werden (Malosio et al., 1991a, 1991b; Young und Snyder, 1974; Zarbin et al., 1981; Probst et al., 1986). Darüber hinaus können β -Transkripte im Rückenmark bereits in denjenigen Entwicklungsstadien nachgewiesen werden, in denen die GlyR_N-Isoform für die glyzingerge Nervenübertragung verantwortlich ist (Malosio et al., 1991a; Becker et al., 1988, 1993; Hoch et al., 1989, 1992). Wie bereits erwähnt, wird diskutiert, daß an dieser GlyR-Isoform die β -Untereinheit nicht beteiligt ist (Betz et al., 1994).

Die Funktion der β -Untereinheit in den beschriebenen Geweben blieb bislang unbekannt. Die großräumige Verteilung der β -Untereinheit und ihre frühe Expression weisen jedoch darauf hin, daß dieses Protein in vielen neuronalen Geweben, neben der Beteiligung am Strychnin-sensitiven GlyR, eine bisher unbekannte Aufgabe erfüllt (Malosio et al., 1991a; Béchade et al., 1994).

6. Die Pathologie des Glyzinrezeptors

Die Struktur- und Expressionsdaten, die aufgrund der Klonierung der GlyR-Untereinheiten gewonnen werden konnten, vermitteln eine detaillierte Vorstellung von der Struktur des Ionenkanals und seiner Regulation während der Embryonalentwicklung und unterstreichen die Bedeutung des GlyR für die neuronale Aktivität (Betz et al., 1994). Insgesamt machen die Fortschritte, die in den letzten Jahren in der GlyR-Forschung erlangt werden konnten, eine molekulare Analyse genetischer Defekte, die das GlyR-System betreffen, möglich. Denn neben den Auswirkung einer Strychninvergiftung (Becker, 1992) veranschaulichen insbesondere Erbkrankheiten, die den GlyR betreffen, die Bedeutung dieses inhibitorischen Rezeptors für die Funktion des Nervensystems. Entsprechend den physiologischen Aufgaben des GlyR ist eine Beeinträchtigung der glyzineren Transmission stets mit Verlust der Funktion der sensorischen und motorischen Systeme verbunden (Floeter und Hallte, 1993; Betz et al., 1994). Der Ausfall der negativen Feedbackhemmung führt zu spastischen Bewegungsstörungen, Myoklonien und schließlich Krämpfen, die zu Atemlähmung und damit zum Tode führen können (Becker, 1992; Becker et al., 1992). So werden vermutlich die erblichen Myoklonien des Poll-Hereford Rinds (Gundlach, 1990; Gundlach et al., 1988) und des Peruanischen Paso Fohlen (Gundlach et al., 1993) durch GlyR-Defekte verursacht. Ein Hinweis hierauf gibt die erheblich reduzierte neuronale [³H]Strychninbindung im Rückenmark der betroffenen Tiere (Gundlach, 1990; Gundlach et al., 1988, 1993). Was die molekularen Ursachen für diese Reduktion sind, konnte jedoch bisher noch nicht zufriedenstellen geklärt werden (Gundlach, 1990; Gundlach et al., 1988, 1993). Für spezifische neurologische Erbkrankheiten bei Mensch (*Hyperekplexie*, *Stiff Baby Syndrome* oder

Startle disease) und Maus (*spastic* und *spasmodic*) indessen konnte nicht nur nachgewiesen werden, daß der GlyR an der Ausprägung der charakteristischen Bewegungsstörungen beteiligt ist. Durch genetische Studien konnten im Lauf des letzten Jahres auch die Mutationen identifiziert werden, die als molekulare Ursache für die Manifestierung der Krankheitssymptome gelten (Shiang et al., 1993; Rees et al., 1994; Schorderet et al., 1994; Buckwalter et al., 1994; Kingsmore et al., 1994; Mülhardt et al., 1994; Saul et al., 1994; Ryan et al., 1994).

6.1 Humane Glyzinrezeptormutationen als Ursache für eine abnorme Schreckreaktion : die Hyperekplexie

Die Hyperekplexie ist eine autosomal und vornehmlich dominant vererbte Bewegungsstörung des Menschen, zu deren Symptomatik Versteifungen der Muskulatur, durch unerwartete Reize ausgelöste Krämpfe und eine ausgeprägte Schreckreaktion (*startle*) gehören (Kirstein und Silfverskiöld, 1958; Suhren et al., 1966; Kok und Bryun, 1962; Ryan et al., 1992a, 1992b; Gastaut und Villeneuve, 1967; Andermann et al., 1980; Kurczynski, 1983; Morley et al., 1982; Andermann und Andermann, 1984; Saenz-Lope et al., 1984; Hayashi et al., 1991; Lingam et al., 1981). Bei neugeborenen Patienten sind die Muskelversteifungen besonders stark ausgeprägt und führen häufig zum Tod durch Atemlähmung (Nigro und Lim, 1989; Lingam et al., 1981).

Durch molekulargenetische Studien und Kopplungsanalysen bei einer Anzahl betroffener Familien konnte das für Hyperekplexie verantwortliche Gen (STHE) auf dem langen Arm von Chromosom 5 lokalisiert werden (Ryan et al., 1992a, 1992b), eine Region, die Gene für verschiedene Neurotransmitterrezeptoren einschließt. Zu diesen zählen die Gene für Untereinheiten des inhibitorischen GlyR (GlyR α 1) und des GABA $_A$ -Rezeptors (GABA $R\alpha$ 1 und GABA $R\gamma$ 2) (Ryan et al., 1992b; Baker et al., 1994). Allerjüngste Studien haben nun gezeigt, daß Mutationen im Gen für die α 1-Untereinheit des GlyR für die Manifestierung der beobachteten Bewegungsstörungen verantwortlich sind, die bei Mitgliedern von sechs unabhängigen Familien mit dominant vererbter (Shiang et al., 1993; Schorderet et al., 1994; Rees et al., 1994) und von einer Familie mit rezessiv vererbten Hyperekplexie (Rees et al., 1994) beobachtet werden konnten.

6.1.1 Dominant vererbte Hyperekplexie

Mutationen im Gen für die α 1-Untereinheit des GlyRs, die zu einer Beeinträchtigung der GlyR-Funktion und damit zu Einschränkungen in der glyzinerger Nervenübertragung führen, konnten zunächst für den dominanten Erbgang der Hyperekplexie als Ursache für die beobachteten Krankheitssymptome nachgewiesen werden (Shiang et al., 1993). Ausgehend von genomischen Kartierungsstudien wurden zwei Punktmutationen im sechsten Exon des α 1-Gens identifiziert, die jeweils dasselbe Nukleotid in der Position 1192 betreffen. Diese Mutationen führen zu einem

Aminosäureaustausch, bei dem ein positiv geladenes Arginin (Arg271), das vermutlich am Kanaleingang des Rezeptors lokalisiert ist, durch die ungeladenen Aminosäuren Leuzin bzw. Glutamin ersetzt wird (Shiang et al., 1994). Elektrophysiologische Studien an homooligomeren Komplexen aus derart mutierten $\alpha 1$ -Untereinheiten *in vitro* haben gezeigt, daß eine Substitution des Arginins in Position 271 die Affinität zu Glyzin und zu den partiellen Agonisten β -Alanin und Taurin herabsetzt, die Kanalleitfähigkeit erheblich verringert und die durch diese Agonisten ausgelöste Stromantwort um das Vielfache reduziert. Die antagonistische Wirkung der Liganden Strychnin, β -Alanin und Taurin auf diese Homooligomere ist unverändert (Rajendra et al., 1994, 1995a, 1995b; Langosch et al., 1993, 1994; Laube et al., 1995). Diese Ergebnisse zeigen, daß der betroffene Aminosäurerest die Bindestelle für die Antagonisten nicht mitbestimmt, daß er jedoch für die Bindung der Agonisten essentiell ist und maßgeblich an der Kopplung von Agonistenbindung und Kanalöffnung beteiligt ist (Rajendra et al., 1995, 1995b, 1995c; Langosch et al., 1994; Laube et al., 1995).

Man nimmt an, daß durch die reduzierte Glyzinaffinität der mutierten $\alpha 1$ -Untereinheit in Hyperekplexiepatienten die physiologische Glyzinkonzentration von ca. 1 mM (Clements et al., 1992) nur einen Bruchteil der Stromantwort "gesunder" Rezeptoren auslöst, was eine enorme Beeinträchtigung der Wirksamkeit der glyzinerger Synapsen zur Folge hat (Langosch et al., 1994). Da die beschriebene Form der Hyperekplexie dominant vererbt wird, müssen die mutierten $\alpha 1$ -Untereinheiten einen dominant negativen Effekt auf den GlyR haben. So scheint bereits die Anwesenheit einer einzigen defekten Untereinheit auszureichen, um die Ligandenaffinität des GlyR-Komplexes herabzusetzen (Langosch et al., 1994; Ryan et al., 1994; Buckwalter et al., 1994; Rees et al., 1995). So besitzen auch heterozygote Hyperekplexiepatienten statistisch gesehen nur 12.5% "gesunde" GlyR und leiden damit an einer erheblich eingeschränkten Wirksamkeit des glyzinerger Systems (Ryan et al., 1994).

6.1.2. Hyperekplexie mit rezessivem Erbgang

Neben der dominant vererbten Hyperekplexie wurde auch ein Fall mit rezessivem Erbgang beschrieben, der sich erst durch eine Elternschaft von Blutsverwandten phänotypisch auswirkte. Auch hier konnte bei der Patientin eine Punktmutation im Gen für die $\alpha 1$ -Untereinheit des GlyR als Ursache für die Manifestierung ihrer Bewegungsstörung nachgewiesen werden (Rees et al., 1994). Welche Einfluß die identifizierte Punktmutation (T1112A), die zu einem Aminosäureaustausch (Ile244Asp) am C-terminalen Ende der ersten Transmembrandomäne führt, auf die Funktion der $\alpha 1$ -Untereinheit bzw. auf die des gesamten Rezeptorkomplexes hat und ob sie in der Tat kausal für die Ausprägung der Krankheitssymptome ist, muß noch geklärt werden (Rees et al., 1994).

6.2. Glyzinrezeptordefekte in der Maus

Die Rolle der GlyR in der Pathogenese neurologischer Erbkrankheiten konnte neben den jüngsten Erkenntnissen aus der Humangenetik (s.o.) insbesondere durch Entdeckung und Charakterisierung der autosomal-rezessiven Mausmutanten *spastic* (*spa*), *albany* (*spa^{Alb}*), *spasmodic* (*spd*) und *oscillator* (*spd^{ot}*) verdeutlicht werden. Die hereditären GlyR-Defekte und die damit verbundene Beeinträchtigung der glyzinerger Signalübertragung führen in den betroffenen homozygoten Tieren zwei bis drei Wochen nach der Geburt zu erheblichen motorischen Störungen, wie sie bei Gabe einer subletalen Strychnindosis beobachtet werden können (Davidoff et al., 1969; Smith, 1990). Insgesamt sind die Krankheitssymptomen der Mausmutanten denen der Hypereklexiepatienten sehr ähnlich. Zwar erscheinen im Gegensatz zu den betroffenen Säuglingen die neugeborenen Mausmutanten, die homozygot für den jeweiligen Defekt sind, normal, jedoch leiden die Mäuse zwei bis drei Wochen nach ihrer Geburt ebenfalls an erhöhtem Muskeltonus, Tremor, Myoklonien und einer ausgeprägten Schreckreaktion (Chai et al., 1961; Chai, 1961; White et al., 1987; Lane, 1987; Buckwalter et al., 1993; Dickie, 1967). Homozygote *spa^{Alb}* und *spd^{ot}* Mäuse zeigen im Vergleich zu den Mutanten *spa* und *spd* einen wesentlich stärker ausgeprägten Phänotyp und sterben innerhalb weniger Tage nach Ausprägung der Symptome an den Folgen ihres Defekts.

Im Laufe des letzten Jahres konnte gezeigt werden, daß *spa* und vermutlich auch *spa^{Alb}* Mutationen im Gen für die β -Untereinheit und *spd* und *spd^{ot}* Mutationen im Gen für die $\alpha 1$ -Untereinheit des GlyR tragen. Das Verstehen der molekularen Mechanismen, die in diesen Mausmutanten zur Manifestierung der Bewegungsstörungen führen, kann zum besseren Verstehen der Pathomechanismen, die in anderen Spezies zur Beeinträchtigung der glyzinerger Nervenübertragung führen, beitragen (Becker, 1990; Barasiter, 1990).

6.2.1 Die Mausmutante *spastic* (*spa*)

Die Ähnlichkeit des *spastischen* Phänotyps (Chai et al., 1961; Chai, 1961) zu den Symptomen einer Strychninvergiftung (Heller und Hallet, 1982; Davidoff et al., 1969; Smith, 1990) und die Elektrophysiologie der Mausmutante (Biscoe und Duchon, 1986) ließ bereits seit langem eine Beeinträchtigung der glyzin-vermittelten Hemmung vermuten (Chai et al., 1961; Chai, 1961; Hall et al., 1976; Heller und Hallet, 1982; White und Heller, 1982). Ein entscheidender Hinweis auf eine Beteiligung des GlyR an der Pathogenese der *spastischen* Bewegungsstörungen erbrachten Bindungsstudien mit dem GlyR-Antagonisten [³H]Strychnin (White, 1985; White und Heller, 1982). So konnte im Rückenmark adulter *spa/spa* Mausmutanten eine auf 20 % des Normalwerts reduzierte [³H]Strychninbindung festgestellt werden, was einer Minderung des GlyR_A-Gehalts um ca. 80% entspricht (White, 1985; White und Heller 1982; Becker, 1986). Die verbleibenden

GlyR_A-Moleküle sind strukturell unverändert und funktionell intakt (Becker et al., 1986, 1992; Becker, 1990). Die Funktion und der Gehalt des GlyR_N ist dagegen nicht betroffen (Becker et al., 1992), was erklärt, daß die Krankheitssymptome erst in der zweiten bis dritten Lebenswoche auftreten, also zum Zeitpunkt des Wechsels vom neonatalen zur adulten GlyR (Becker, 1990). Durch Kopplungsanalysen konnte gezeigt, daß das Gen der murinen β -Untereinheit, das in unmittelbarer Nähe des *spa* Allels auf Chromosom 3 lokalisiert ist (Kingsmore et al., 1994; Mülhardt et al., 1994; Lane, 1972, 1979; Eicher und Lane, 1980), in der *spa* Mausmutante eine Insertionsmutation trägt (Kingsmore et al., 1994; Mülhardt et al., 1994). Bei dieser Mutation handelt es sich um ein Transposonelement der Klasse LINE-1 (L1), das in antisense-Orientierung in das fünfte Intron des GlyR β -Gens inseriert ist (Kingsmore et al., 1994; Mülhardt et al., 1994). Diese Mutation führt zu einem Spleißdefekt der β -Transkripte und damit zur Störung der β -Expression. So konnten im ZNS der *spa* Maus größtenteils aberrant gespleißte, unvollständige β -Transkriptionsprodukte (Δ Exon4 und Δ Exon4/5) nachgewiesen werden (Mülhardt et al., 1994). Hinweise auf eine veränderte Expression des α -Proteins konnten dagegen nicht gefunden werden (Becker et al., 1992). Es ist also anzunehmen, daß der Mangel an vollständigen β -Transkripten, der einen Mangel an funktionellem β -Protein zur Folge hat, für die in der *spastischen* Maus beobachtete Minderung der GlyR_A-Moleküle verantwortlich ist. Hierfür sprechen auch die jüngsten Befunde, daß die GlyR β -Untereinheit die Kopplung des Ionenkanals an das Ankerprotein Gephyrin vermittelt und damit eine bedeutende Rolle für die synaptische Lokalisation des GlyR übernimmt (Meyer et al., 1995; Kirsch et al., 1995).

6.2.2 Die Mausmutante *albany* (*spa*^{Alb})

Wie bei der *spastischen* Maus war auch bei der Mutante *albany* die [³H]Strychninbindungsaktivität ihrer Rückenmarksneurone erheblich reduziert (White et al., 1987). Auch sie entwickelte zwei bis drei Wochen nach ihrer Geburt starke motorische Störungen, die jedoch, im Gegensatz zur Mausmutante *spa*, die eine normale Lebensdauer hat, wenige Tage später zum Tode führten (White et al., 1987). Da gezeigt werden konnte, daß *albany* zu *spastic* allelisch war (White et al., 1987), wird vermutet, daß in dieser Mausmutante ebenfalls eine Mutation im Gen für die β -Untereinheit des GlyR für den Verlust der GlyR-Oberflächenexpression und für die Ausprägung der Bewegungsstörungen verantwortlich war (Buckwalter et al., 1994). Eine Analyse des Gendefekts dieser Mausmutante ist jedoch nicht mehr möglich, da *albany* bereits ausgestorben ist (pers. Mitteilung, Anne Messer).

6.2.3 Die Mausmutante *spasmodic* (*spd*)

Der Phänotyp der Mausmutante *spasmodic* entspricht sowohl hinsichtlich der Krankheitssymptome als auch hinsichtlich des Zeitpunkts seiner Manifestierung dem Phänotyp der *spastischen* Maus (Buckwalter et al., 1993). Im Gegensatz dazu zeigen die Rückenmarksneurone adulter *spd/spd* Mäuse keinen Verlust von [³H]Strychninbindungsaktivität (Lane et al., 1987; Saul et al., 1994).

Im Laufe des letzten Jahres wurden gezeigt, daß die Mausmutante *spasmodic* zwei Punktmutationen in ihrem Gen für die GlyR α 1-Untereinheit trägt (Ryan et al., 1994; Saul et al., 1994). Beide Mutationen betreffen jeweils das dritte Exon des Gens. Während der Basenaustausch in Position 198 (T→C) keinen Einfluß auf die Aminosäuresequenz des α 1-Proteins hat, führt die Punktmutation in Position 238 (G→T) zu einem Aminosäureaustausch, bei dem ein Alanin in der Position 52 durch ein Serin ersetzt wird (Ryan et al., 1994; Saul et al., 1994). Dieses Alanin ist in den Untereinheiten α 1 und α 3 und einer Spleißvariante der α 2-Untereinheit konserviert (Grenningloh et al., 1987, 1990b; Kuhse et al., 1990, 1991). In *in vitro* Studien an homooligomeren Komplexen aus derart mutierten α 1-Untereinheiten konnte gezeigt werden, daß sich diese in ihrer Strychninempfindlichkeit nicht von den Komplexen aus gesunden α 1-Untereinheiten unterscheiden. Die Affinität dieser Homooligomere zu Glyzin, β -Alanin und Taurin ist dagegen erheblich reduziert (Saul et al., 1994). Dies deutet darauf hin, daß der betroffene Aminosäurerest an der Formation der Agonistenbindestelle beteiligt ist. Da sich diese Daten jedoch auf Versuche mit homooligomeren Komplexen stützen, müssen die Erkenntnisse aus den *in vitro* Studien die realen Auswirkungen der *spd* Mutation auf die Funktion des GlyR nicht unbedingt widerspiegeln. Die tatsächlichen Auswirkungen der *spd* Untereinheit auf das α 3/ β 2-Pentamer *in vivo* lassen sich letztlich nur im Tierexperiment klären.

6.2.4 Die Mausmutante *oscillator* (*spd^{ot}*)

Wie bedeutsam das glyzinerge System für das Überleben eines Organismus ist, zeigt sich insbesondere an der Mausmutante *oscillator* (*spd^{ot}* bzw. *ot*) (Dickie, 1967). Die *ot* Mutation, die auf Chromosom 11 lokalisiert wurde, ist allelisch zu *spd* und wird ebenfalls rezessiv vererbt (Dickie, 1967; Buckwalter et al., 1994). Die betroffenen Tiere entwickeln knapp zwei Wochen nach ihrer Geburt, also ebenfalls zum Zeitpunkt des Wechsels der neonatalen zur adulten GlyR-Isoform, einen schnell und stetig anwachsenden Tremor, der in einer Körperstarre endet und meist bereits zwei bis drei Tage nach Manifestierung der Bewegungsstörungen zum Tode führt. Die [³H]Strychninbindungskapazität der Rückenmarksneurone dieser Tiere ist, verglichen mit der von Wildtypmäusen, um 90% reduziert (Buckwalter et al., 1994). Durch genetische Analysen wurde eine Mutation im Gen für ihre GlyR α 1-Untereinheit identifiziert (Buckwalter et al., 1994). Eine

Deletion von neun Nukleotiden im achten Exon, das für die Transmembrandomäne M3 der $\alpha 1$ -Untereinheit kodiert und eine gleichzeitige Insertion von zwei Nukleotiden an derselben Position führen zu einer Verschiebung des Leserasters im Transkript. Die Folge dieser Mutation ist eine Veränderung der Aminosäuresequenz und ein vorzeitiger Translationsabbruch (Buckwalter et al., 1994). In der homozygoten Mausmutante hat dies den völligen Verlust der $\alpha 1$ -Untereinheit zur Folge. Da die $\alpha 1$ -Untereinheit offensichtlich nicht durch eine der anderen α -Untereinheiten ersetzt werden kann, kommt es bei Rückgang der Expression der neonatalen α -Isoform ($\alpha 2$) zum Ausfall des gesamten glyzinerigen Systems (Buckwalter et al., 1994).

Da man annimmt, daß der Wechsel von der neonatalen zur adulten Rezeptorform beim Menschen vor der Geburt erfolgt (Ryan et al., 1994; Saul et al., 1994), ist es wahrscheinlich, daß ein humaner, der *oscillator* Mutation analoger Gendefekt beim Menschen bereits vor der Geburt zum Tode führt und daher nicht erkannt werden kann (Buckwalter et al., 1994).

Die Charakterisierung der beschriebenen Mausmutanten bestätigt, daß sie den hypertonen Bewegungsstörungen des Menschen sowohl phänotypisch als auch genetisch weitgehend homolog sind. Es ist daher sinnvoll, diese Mutanten bei der Entwicklung von Tiermodellen einzusetzen, die zur Erforschung der Pathomechanismen humaner GlyR-Defekte geeignet sind und der detaillierten Untersuchung der molekularen Grundlagen der glyzinerigen Nervenübertragung dienen können.

7. Zielsetzung der Arbeit

Ersatz defekter Rezeptorstrukturgene durch therapeutischen Gentransfer bei hereditären Bewegungsstörungen der Maus (rescue)

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Phänotyp der Mausmutanten *spa*, *spd* und *ot* durch Expression von Transgenkonstrukten, die für funktionsfähige GlyR-Untereinheiten kodieren, zu komplementieren (*rescue*). Eine erfolgreiche Therapie der murinen GlyR-Defekte durch die eingebrachten Untereinheiten wäre ein formaler Beweis für den kausalen Zusammenhang von Gendefekt und Ausprägung des Phänotyps. Durch die Verwendung von transgenen Untereinheiten fremder Spezies sollte zudem überprüft werden, ob eine Komplementation der in den Mausmutanten veränderten GlyR-Untereinheiten über Speziesbarrieren hinweg möglich ist.

Die Komplementation des *spastischen* Phänotyps sollte durch transgene Überexpression der GlyR β -Untereinheit der Ratte im genetischen Hintergrund der Mausmutante erreicht werden. Hierbei sollte geklärt werden, ob sich die in der *spa* Maus beeinträchtigte GlyR α -Oberflächenexpression durch eine gezielte, quantitative Veränderung der β -Expression beeinflussen läßt. Durch

phänotypische Studien sollte weiterhin untersucht werden, inwieweit sich eine erzielte Zunahme der GlyR_A-Oberflächenexpression auf das Verhalten der Tiere auswirkt. Die Entwicklung von transgenen Mausmutanten mit unterschiedlicher Transgenexpressionsrate sollte zudem die Bestimmung des für eine normale Funktion des glyzinerigen Systems erforderlichen β - bzw. GlyR_A-Expressionsniveaus erlauben. Hierbei sollte auch gezeigt werden, ob sich der komplexe Phänotyp durch eine differentielle Expression des Rezeptor in einzelne Komponenten zerlegen läßt.

Eine erfolgreiche Komplementation des Phänotyps der Mausmutanten *spd* und *ot* durch die Überexpression einer transgenen α 1-Untereinheit humanen Ursprungs würde zeigen, daß "humanisierte" GlyR-Komplexe aus murinen und humanen Untereinheiten nicht nur *in vitro* (Pribilla et al., 1992; Langosch et al., 1994), sondern auch *in vivo* eine Funktion übernehmen können und eine biologische Wirksamkeit besitzen. Dies wäre die Voraussetzung für die Entwicklung von Mausmodellen, mit deren Hilfe man die Auswirkungen der α 1-Untereinheit von Hyperekplexiepatienten auf die Funktion des nativen α 3/ β 2-Pentamers *in vivo* erforschen kann.

Entwicklung von transgenen Mäusen, die eine dominant negativ-wirkende GlyR-Untereinheit in ihrem Nervensystem exprimieren

Die α 1-Untereinheit der Hyperekplexiepatienten wirkt als dominant negative Komponente auf die Funktion des GlyR. Eine Möglichkeit, den Einfluß solcher Untereinheiten auf die Funktion des glyzinerigen Systems *in vivo* zu erforschen, ist die Simulation entsprechender Rezeptordefekte im Tiermodell. Um murine Modellsysteme für die humane Erbkrankheit zu erhalten, sollte daher versucht werden, die Aktivität des Rezeptors gezielt zu verändern (*funktionseller Knockout*). Hierfür sollte die Ch1-cDNA, die für eine chimäre GlyR-Untereinheit kodiert, als Transgen eingesetzt werden. Für diese Chimäre war in *in vitro*- Experimenten gezeigt worden, daß sie einen dominant negativen Effekt auf die Aktivität des GlyR entfaltet. Molekularbiologische Analysen und Verhaltensstudien an Ch1-transgenen Tieren sollten den Einfluß dieser Untereinheit auf das glyzinerige System *in vivo* aufzeigen.

Teil I

Ersatz defekter Rezeptorstrukturgene durch therapeutischen Gentransfer bei hereditären Bewegungsstörungen der Maus (*rescue*)

A. Genetische Rettung der Mausmutante *spastic* (*spa rescue*)

Für die Mausmutante *spastic* konnte eine Insertionsmutation im Gen für die β -Untereinheit des GlyR identifiziert werden. Ein LINE 1-Transposonelement, das im fünften Intron integriert ist, beeinflusst das Spleißen der β -Transkripte, und so werden im Nervensystem der *spa/spa* Maus überwiegend verkürzte mRNAs gebildet. Der Mangel an vollständigen Transkripten führt zu einem Mangel an funktionellem β -Protein, und es wird vermutet, daß dies für die reduzierte GlyR_A-Oberflächenexpression in der homozygoten *spa* Maus verantwortlich ist. Der damit verbundene Funktionsverlust des glyzineren Systems hat vermutlich die Manifestierung der charakteristischen Bewegungsstörungen (Tremor, gestörter Aufrichtreflex, Zusammenpressen der Hinterbeine beim Hochnehmen am Schwanz und männliche Infertilität) in der dritten Lebenswoche zur Folge (Kingsmore et al., 1994; Mülhardt et al., 1994). Die Therapierbarkeit des mutanten Phänotyps durch die neuronale Expression einer funktionsfähigen β -Untereinheit wäre zum Einen ein formaler Beweis für den Kausalzusammenhang zwischen der identifizierten Mutation, die zum Mangel an β -Untereinheiten führt, und der Manifestierung der Bewegungsstörung. Ließe sich die Menge an funktionellen GlyR-Molekülen in der Mausmutante durch Variation der Expression ihrer β -Untereinheit verändern, so wäre dies zum Anderen der Beweis für die Abhängigkeit der GlyR_A-Oberflächenexpression von der Verfügbarkeit an funktionellem β -Protein *in vivo*. Um diese Beweise zu führen, sollte im Rahmen dieser Arbeit die GlyR β -Expression der *spastischen* Mausmutante mit Hilfe transgener Techniken verändert werden. Anschließend sollte untersucht werden, in wieweit sich dies auf die GlyR_A-Oberflächenexpression und den mutanten Phänotyp auswirkt.

Hierzu wurden zunächst mit Hilfe der β -cDNA der Ratte (Grenningloh et al., 1990a) ein geeignetes Expressionskonstrukt entwickelt und transgene Mauslinien etabliert, die eine neuronspezifische Überexpression dieser Untereinheit zeigen. Durch Kreuzungsexperimente wurde das Transgen anschließend in die Mausmutanten eingebracht. Durch Verhaltensanalysen wurde überprüft, ob die Ausprägung des mutanten Phänotyps homozygoter *spa* Mäuse durch das Transgen unterdrückt werden kann. Mittels molekularbiologischer Methoden wurde abschließend untersucht, inwieweit sich die GlyR_A-Oberflächenexpression bzw. die Funktionsfähigkeit des glyzineren Systems durch die Verfügbarkeit eines funktionsfähigen β -Proteins einer fremden Spezies verändert. Insgesamt sollten Mausmodelle entwickelt werden, die Unterschiede in ihrer β -Expression und damit in ihrer GlyR_A-Oberflächenexpression aufweisen. Diese Mausmodelle

sollten es ermöglichen, die für eine normale Funktion der glyzinerger Nervenübertragung erforderliche β -Expression und Menge an funktionellen GlyR-Molekülen zu bestimmen. Für die Entwicklung solcher Mausmodelle wurden Transgenlinien mit unterschiedlicher Transgenexpressionsrate etabliert und in den Kreuzungsexperimenten mit den *spastischen* Mäusen eingesetzt.

1. Herstellung des β -Expressionskonstrukts

Um die β -Untereinheit der Ratte (Grenningloh et al., 1990a) im Nervensystem von transgenen Mäusen exprimieren zu können, mußte die entsprechende cDNA in einem Expressionskonstrukt unter die Kontrolle eines geeigneten Promotors gebracht werden. Bei der Entwicklung des Expressionsplasmids p18SN β o.S., dessen Klonierung ausführlich im Methodenteil beschrieben ist, wurde die β -Untereinheit der Ratte unter die Kontrolle des neuronspezifischen Enolasepromotors der Ratte (NSE) (Sakimura et al., 1987) gebracht. Für diesen Promotor ist gezeigt, daß er für die Expression von transgenen Proteinen im zentralen Nervensystem von Mäusen geeignet ist (Forss-Petter et al., 1990). Für eine korrekte mRNA-Prozessierung wurde hinter die cDNA zusätzlich das Spleiß- und Polyadenylierungssignal des viralen *SV40-small T-Antigens* (Gorman et al., 1982) kloniert (Abb.4).

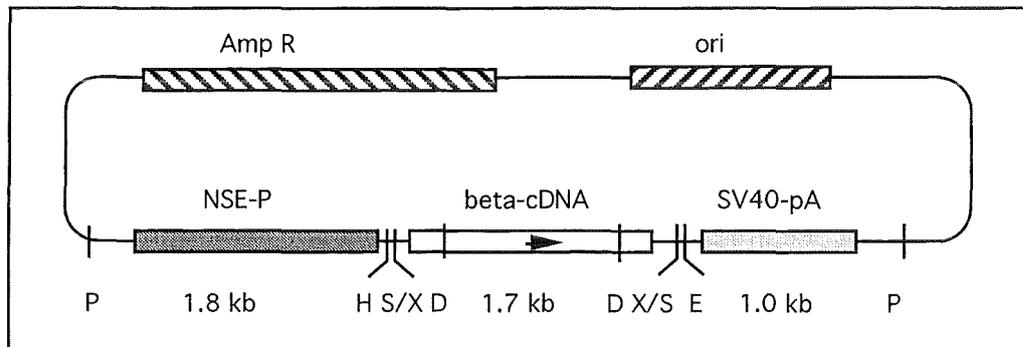


Abb.4 Schematische Darstellung des Plasmids p18SN β o.S. mit der cDNA der GlyR β -Untereinheit der Ratte (β -cDNA) unter der Kontrolle des neuronspezifischen Enolasepromotors der Ratte (NSE-P). Das Gen besitzt ein nachgeschaltetes Spleiß- und Polyadenylierungssignal des *small T-Antigens* des *SV40*-Virus. Das Expressionskonstrukt von insgesamt 4,5kb ist in den Plasmidvektor pUC18 eingebunden, der einen eigenen Replikationsursprung (ori) und ein Resistenzgen für das Antibiotikum Ampicillin (Amp R) beisteuert und damit die Vermehrung der Plasmid-DNA in *E.coli*-Bakterien erlaubt. Die Orientierung der cDNA ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. D=DraII, E=EcoRI, H=HindIII, P=PvuII, S=SalI, X=XhoI

Ein 4,5 kb großes PvuII-Fragment bestehend aus NSE-Promotor, β -cDNA und dem Spleiß- und Polyadenylierungssignal des viralen *SV40-small T-Antigens* wurde anschließend zur Herstellung β -transgener Mäuse eingesetzt.

2. Entwicklung transgener Mauslinien, die das Gen für die GlyR β -Untereinheit der Ratte in ihrem Nervensystem überexprimieren

Die Technik der Etablierung transgener Tiere beruht auf der Mikroinjektion genetisch manipulierter DNA in den Vorkern befruchteter Eizellen. Die injizierte DNA kann dann vom Rekombinationsapparat der Zelle spontan an einer zufälligen Position in das Erbgut der Eizelle integriert werden. Die Eizelle wird anschließend in den Eileiter einer scheinsschwangeren Maus transferiert (Embryotransfer) (Hogan et al., 1986). Erfolgte ein Rekombinationsereignis, so entwickelt sich die Eizelle zu einer transgenen Maus.

Mittels etablierter Methode (Hogan et al., 1986) wurde das Transgenkonstrukt in Eizellen von *DBA/2-C57/bl6* -Hybriden (B₆D₂F₁) eingebracht. Dieser genetischer Hintergrund wurde gewählt, da in diesen Tieren eine hormonelle Superovulation erfolgreich durchgeführt werden kann. Eine detaillierte Beschreibung der transgenen Techniken ist dem Methodenteil zu entnehmen.

2.1 Etablierung β -transgener Linien

Aus der Population der Nachkommen eines Embryotransfers müssen zunächst die Tiere identifiziert werden, die das Transgen in ihrem Genom tragen (*Founder*). Die Wahrscheinlichkeit, positive transgene Mäuse zu erhalten, beträgt in solchen Experimenten ca. 15-20% (Hogan et al., 1986). Anschließend muß für jeden Transgenträger eine große Population von transgenen Nachkommen gezüchtet werden (*Linien*), um für nachfolgende Expressionsanalysen und Kreuzungsexperimente ausreichend Transgenträger zur Verfügung zu haben.

Aus den Mikroinjektionsexperimenten mit dem entwickelten β -Expressionskonstrukt, die von Herrn Dr. Johannes Schenkel (IGen, Forschungszentrum Karlsruhe) durchgeführt wurden, wurden 41 phänotypisch gesunde Tiere geboren. Für die Identifizierung der *Foundertiere* wurde die DNA aus Schwanzbiopsien dieser Tiere zunächst mit Hilfe des *Southern Blot* Verfahren untersucht. Als Sonde diente hierbei ein 1.3 kb großes Fragment der GlyR β -cDNA, das durch Verdau mit dem Restriktionsenzym DraII aus dem Plasmid p18SN β o.S. gewonnen wurde (Nukleotid 363 bis 1394 der β -cDNA der Ratte; Grenningloh et al., 1990a). Im Autoradiogramm (Abb.5) konnten durch Nachweis der transgenspezifischen, 1.7 kb großen Hybridisierungsbande sechs *Foundertiere* (Nr.404, 409, 415, 416, 455 und 456) identifiziert werden.

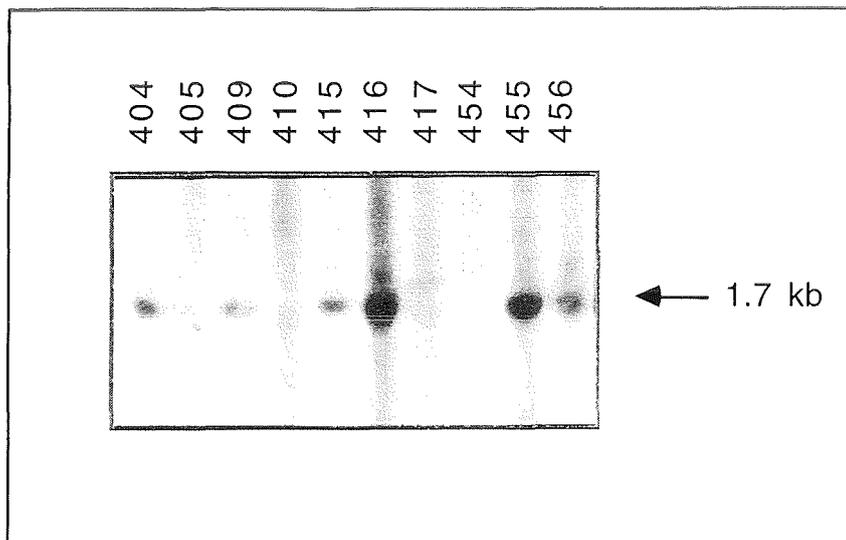


Abb.5 Beispiel einer genotypische Analyse der direkten Nachkommen der Mikroinjektionsexperimente mit dem GlyR β -Expressionskonstrukt

20 μ g DNA aus Schwanzbiopsien wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Hind III verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt. Als Donoren für die DNA dienten die Mäuse mit der Nummer 404, 405, 409, 410, 415, 416, 417, 454, 455 und 456. Nach Immobilisieren auf einer Nylonmembran wurde die DNA mit dem radioaktiv markierten, 1.3 kb großen DraII-Fragment der GlyR β -cDNA der Ratte hybridisiert. Die Transgenträger wurden durch eine 1.7 kb große Hybridisierungsbande, die das transgene cDNA-Fragment repräsentiert, identifiziert.

Zur Etablierung von β -transgenen Linien wurden die ermittelten *Foundertiere* anschließend in der Zucht mit Mäusen des *DBA/2*-Stammes eingesetzt. Um die Genotypen der zahlreichen Nachkommen dieser Zuchtbrütungen zügig analysieren zu können, wurde die Technik der Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt, mit der eine schnelle, zuverlässige DNA-Analyse im großen Maßstab möglich ist. Für den Nachweis einer genomischen Transgenintegration dienen die Startermoleküle β -3'UTR und SV40-2, von denen ausgehend ein 820 bp großes Fragment auf dem Transgenkonstrukt amplifiziert werden kann. Das Oligonukleotid β -3'UTR hybridisiert mit einem Bereich in der 3'-nicht-translatierten Region der transgenen β -cDNA (Position 1817 bis 1833, Grenningloh et al., 1990a). Das Oligonukleotid SV40-2 bindet an den komplementären Strang im Polyadenylierungssignals des kleinen *T-Antigens* des SV40-Virus (Position 2739 bis 2755, Tooze, 1980). Abb.6 zeigt als Beispiel für eine solche Genomanalyse die im Agarosegel aufgetrennten PCR-Produkte von Nachkommen der Linie 404 und 416.

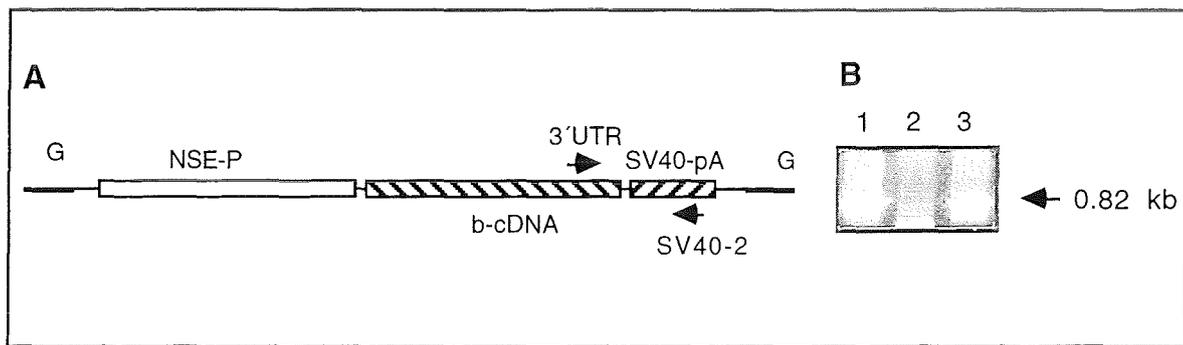


Abb.6 PCR-Analyseverfahren zur Überprüfung des Genotyps der β -Transgenen und ihrer Nachkommen.

(A) Schematische Darstellung des das Genom integrierten Transgenkonstrukts und der Hybridisierungsregionen der verwendeten Startermoleküle β -3'UTR (sense) und SV40-2 (antisense). Von ihnen ausgehend kann mit Hilfe der PCR-Technik ein 0.82 kb großes, für das Transgen spezifisches Fragment synthetisiert und amplifiziert werden.

G = angrenzende Sequenzbereiche des Integrationsortes im Genom der transgenen Maus

NSE-P = neuronspezifischer Enolasepromotor der Ratte

SV40-pA = Splice- und Polyadenylierungssignal des SV40-Virus.

Das Foto in (B) zeigt die im Agarosegel aufgetrennten PCR-Reaktionen, die an der DNA einer nicht-transgenen und zwei transgenen Mäusen durchgeführt wurden.

Bahn 1 = Transgen # 404

Bahn 2 = nicht transgen

Bahn 3 = Transgen # 416

Bei der Zucht der *Foundertiere* 409 und 455 und der Analyse ihrer Nachkommen zeigte sich, daß sie ihr Transgen nicht an ihre Nachkommen weitergaben. Mögliche Ursache hierfür ist, daß es sich bei diesen Tieren um sogenannte Mosaikmäuse handelte, bei denen sich die injizierte DNA nicht bereits im Ein- oder Zweizellstadium, sondern erst spät in der Entwicklung in das Zellgenom integriert hatte. Das Ergebnis ist, daß in solchen Embryonen nur wenige Zellen das Transgen tragen. Sind diese nicht an der Keimbahnentwicklung beteiligt, kann das Transgen nicht an die nachfolgende Generation weitergegeben werden.

Für die *Foundertiere* 404, 415, 416 und 456 konnten Transgenlinien etabliert werden. Zur Entwicklung von Tieren mit zwei Transgenallelen wurden die ermittelten Transgenträger einer Linie stets auch untereinander verpaart. Die DNA der Tiere aus den folgenden Generationen wurde anschließend mit Hilfe der *Slot Blot* Hybridisierungstechnik auf Homozygotie bezüglich des Transgenlocus untersucht. Als Sonde zur Bestimmung der Zahl an Transgenallelen diente das bereits im *Southern Blot* eingesetzte *DraII*-Fragment der GlyR β -cDNA der Ratte. Anhand der Schwärzung der transgenspezifischen Hybridisierungssignale und durch Vergleich mit einer Referenzsonde kann die relative Kopienzahl (0, 1, 2) und somit eine Homo- bzw. Heterozygotie bezüglich des Transgenlokus ermittelt werden. Als Referenzsonde zur Quantifizierung der aufgetragenen DNA-Menge diente die GAPDH-cDNA der Ratte (Fort et al., 1985). In Abb.7 ist das Ergebnis einer solchen Analyse dargestellt.

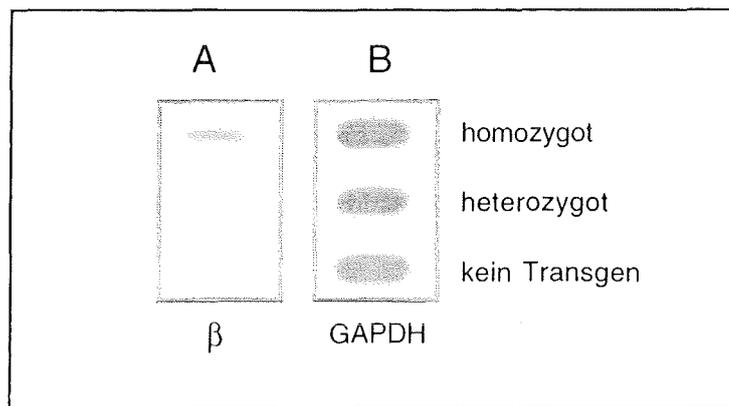


Abb.7 Analyse auf Homozygotie bzgl. des Transgenlocus

Für den Slot Blot wurden 40 µg DNA aus Schwanzbiopsien denaturiert und jeweils die Hälfte auf einer Nylonmembran immobilisiert. Als DNA-Donoren dienten ein homozygoter (oben), ein heterozygoter Transgenträger (mitte) und eine Maus ohne Transgenintegration (unten). Die Membran wurde in (A) mit der β-cDNA der Ratte hybridisiert. Zur Quantifizierung der aufgetragenen DNA-Menge wurde sie in (B) mit der Referenzsonde (GAPDH-cDNA) hybridisiert. Da sich die Referenzsignale (B) nicht in ihrer Schwärzung unterscheiden, können die transgenspezifischen Hybridisierungssignale (A) direkt miteinander verglichen werden. Das Signal des homozygoten Tiers zeigt eine wesentliche stärkere Schwärzung als das der heterozygoten Maus. Bei der nicht-transgenen Kontrollmaus konnte erwartungsgemäß kein transgenspezifisches Hybridisierungssignal nachgewiesen werden.

Während des Verlaufs dieser Arbeit wurden sämtliche Nachkommen, die aus Brütungen mit den β-transgenen Mäusen gewonnen wurden, mit der entwickelten PCR-Methode auf Transgenintegration und positive Tiere zusätzlich mittels *Slot Blot* Technik auf Homozygotie bezüglich ihres Transgenlocus hin untersucht.

2.2 Analyse der transgenen Transkription im Nervensystem der β-transgenen Mäuse

Nach einer ausreichenden Vermehrung der Nachkommenschaft der Linien 404, 415, 416 und 456 sollte die Analyse der mRNA aus den Nervenzellen des ZNS einzelner Individuen zeigen, ob der gewählte Promotor die erforderliche neuronale Transkription des Transgenkonstrukts vermittelt. Linien, die eine entsprechende Transkription aufwiesen, wurden anschließend auf Unterschiede in der Transkriptionsrate untersucht.

Der Nachweis der Transkription des Transgens wurde mit Hilfe der *RT-PCR*-Technik geführt. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus dem ZNS von Nachkommen der transgenen Linien isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA-Sequenzen übersetzt. cDNA-Fragmente, die aus Transkripten transgener Herkunft entstanden waren, sollten anschließend in einer PCR-Reaktion mit Hilfe transgenspezifischer Startermolekülen nachgewiesen werden. Hierbei fanden die Oligonukleotide β-3'UTR und SV40-2 Anwendung, die bereits zur Identifizierung der Transgenträger eingesetzt wurden und die dort zur Bildung eines transgenspezifischen

Amplifikationsprodukts von 821 bp führten (vgl. Kapitel A.2.1). Im Falle der RT-PCR waren, nach einer Amplifikation der entsprechenden Bereiche, Fragmente mit einer Länge von nur 755 bp zu erwarten, da das Prozessierungssignal im Expressionskonstrukt (SV40-polyA) einen 66 bp großen Intronbereich enthält, der nach der Transkription herausgespleißt wird.

Zur Überprüfung der RNA-Präparation auf DNA-Kontaminationen wurde für jede RT-PCR-Reaktion ein Kontrollansatz ohne Zugabe von reverser Transkriptase (-RT) mitgeführt. Weiterhin wurde, zum Nachweis einer erfolgreichen RNA-Präparation, der Reaktionsansatz, für den eine reverse Transkription durchgeführt worden war (+RT), in einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden GAPDH1 (Nukleotid 8 bis 29 der GAPDH-cDNA der Ratte; Fort et al., 1985) und GAPDH2 (Nukleotid 358 bis 339 der GAPDH-cDNA der Ratte; Fort et al., 1985) eingesetzt. Mit Hilfe dieser Startermoleküle wird ein ca. 350 bp großer Bereich auf endogenen GAPDH-Transkripten amplifiziert.

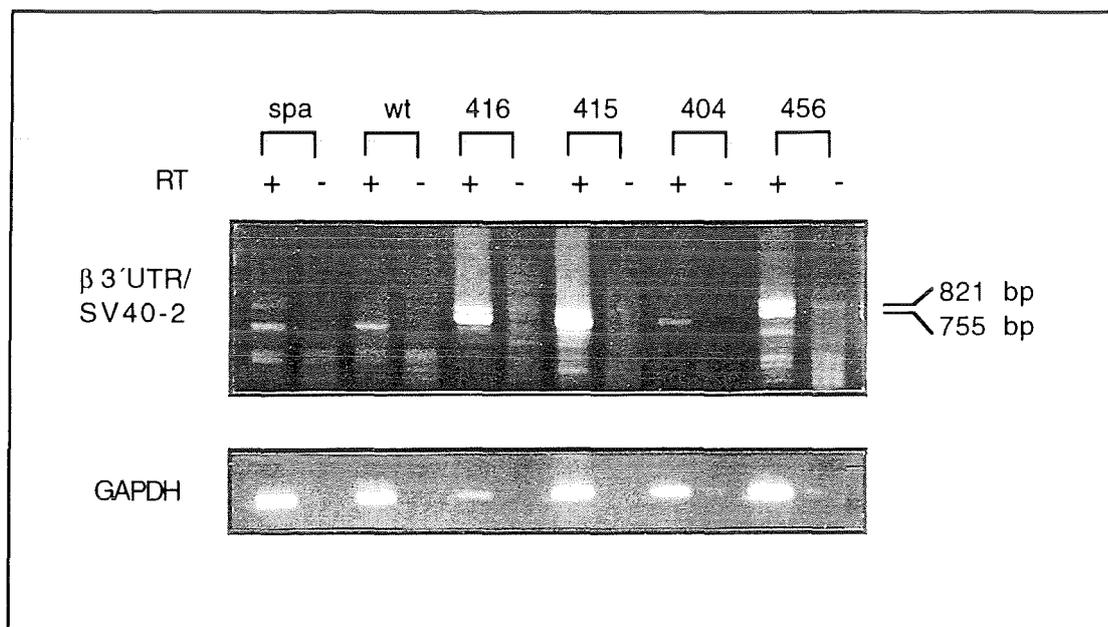


Abb.8 Neuronale Transgenexpression der ermittelten Transgenlinien

Nach Isolierung der Gesamt-RNA aus dem ZNS der Transgenlinien (404, 415, 416 und 456) wurden je 1.5 μ g mittels der Reversen Transkriptase (RT) in cDNA-Sequenzen übersetzt und in PCR-Reaktionen eingesetzt.

(oben) Die, im Agarosegel aufgetrennten PCR-Reaktionen, die mit den Oligonukleotide β -3'UTR und SV40-2 durchgeführt wurden. Zur Überprüfung der RNA-Präparation auf DNA-Kontaminationen wurde für jede RT-PCR-Reaktion einen Kontrollansatz ohne Zugabe von Reverser Transkriptase mitgeführt (-RT). Als negative Kontrollen diente die RNA aus dem Nervensystem von Wildtypmäusen (wt) und homozygoten *spastic* Mäusen (spa). In den RT-PCR-Ansätzen mit der RNA der Linien 415, 416 und 456 konnten jeweils Fragmente von 755 bp und 821 bp amplifiziert werden, die Transkripte transgenen Ursprungs repräsentieren. Für die Linie 404 konnte keine transgene Transkription im ZNS nachgewiesen werden.

(unten) Zur Kontrolle der RNA-Präparation wurde jede der RT-Reaktionen zusätzlich einer PCR-Reaktion unterzogen, in die die Oligonukleotide GAPDH1 und GAPDH2 eingesetzt wurden. Diese Oligonukleotide sind endogenen GAPDH-Sequenzen homolog und erlauben die Amplifikationen eines ca. 350 bp großen Fragments.

Mit der Methode der *RT-PCR* konnte für drei (Nr. 415, 416 und 456) der vier Transgenlinien eine transgene Transkription im ZNS nachgewiesen werden. Abb.8 zeigt, daß bei diesen Transgenlinien neben dem zu erwartenden Amplifikationsprodukt von 755 bp ein zweites Fragment von 821 bp gebildet wurde. Da die Kontrollansätze (-RT) den RNA-Ursprung beider Amplifikationsprodukte bestätigen und sich die Fragmente um eine Länge von ca. 66 bp voneinander unterscheiden, kann man darauf schließen, daß das große Fragment solche Transkripte repräsentiert, bei denen die Intronsequenz im SV40-Prozessierungssignal (66 bp) nicht herausgespleißt wurde.

Die Linie 404 zeigte keine Transkription des Transgens. Ein Einsatz dieser Linie in den folgenden Experimenten war daher nicht sinnvoll.

Für die Entwicklung von Mausmodellen mit unterschiedlicher GlyRA-Oberflächenexpressionsrate sollten transgene Mauslinien etabliert werden, die Unterschiede in ihrer transgenen Transkriptionsrate aufweisen. Ob dies erreicht worden war, sollte nun bei den Linien 415, 416 und 456 mit Hilfe einer *quantitativen RT-PCR*-Analyse überprüft werden. Hierfür wurden die Oligonukleotidkombinationen β -3'UTR/ SV40-2 und GAPDH1/ GAPDH2 in einem gemeinsamen PCR-Reaktionsansatz eingesetzt. Die Quantifizierung der Transgenexpression ist nur bei einer Linearität der gleichzeitig ablaufenden Amplifikationsreaktionen möglich. Um dies zu gewährleisten wurden lediglich 22 Amplifikationsrunden durchgeführt. Da bei diesen Reaktionsbedingungen die transgenspezifischen Amplifikationsprodukte im Agarosegel nicht nachzuweisen sind, wurde eine Southern Blot Hybridisierung angeschlossen. Als Sonden dienten hierbei das DraII-Fragment der β -cDNA (vgl. Kapitel A.2.1) und die GAPDH-cDNA der Ratte (Fort et al., 1985). Im Autoradiogramm (Abb.9) wird deutlich, daß sich die Raten der transkriptionellen Transgenexpression der einzelnen Linien in der Tat unterscheiden. Setzt man die Transkriptionsrate der Linie 416 willkürlich auf 100% fest, so beträgt die Transkriptionsrate der Linie 415 11% und die der Linie 456 39% (vgl. Tabelle in Abb.9). Die Linie 416 zeigt damit eine hohe, die Linie 415 eine niedrige und die Linie 456 eine intermediäre transgene Transkriptionsrate.

Es war also gelungen, neben der Entwicklung von transgenen Mäusen, die das Gen der β -Untereinheit der Ratte in ihrem Nervensystem transkribieren, Linien zu etablieren, die Unterschiede in ihrer Transkriptionsrate aufweisen. In den folgenden Kreuzungsexperimenten sollten die Transgenallele dieser Linien nun in den genetischen Hintergrund der *spastischen* Mausmutante eingebracht werden.

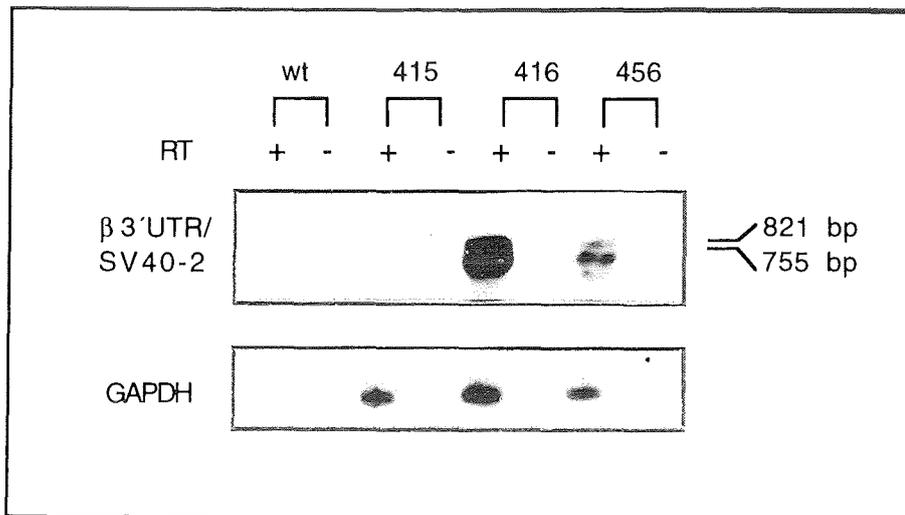


Abb.9 Vergleich der Transkriptionsrate der einzelnen Linien mit Hilfe der quantitativen RT-PCR

Nach Isolierung der Gesamt-RNA aus dem ZNS der Transgenlinien (415, 416 und 456) wurden je 1.5 μ g mittels der Reversen Transkriptase (RT) in cDNA-Sequenzen übersetzt und in PCR-Reaktionen eingesetzt. Die PCR-Reaktionen, die mit Hilfe der gleichzeitig eingesetzten Oligonukleotidkombinationen β -3'UTR/SV40-2 und GAPDH1/GAPDH2 durchgeführt wurden, wurden im Agarosegel aufgetrennt. Nach Immobilisierung der DNA-Fragmente auf einer Nylonmembran wurde diese mit dem radioaktiv markierten, 1.3 kb großen Drall-Fragment der GlyR β -cDNA der Ratte und der radioaktiv markierten GAPDH-cDNA hybridisiert. Zur Überprüfung der RNA-Präparation auf DNA-Kontaminationen wurde für jede RT-PCR-Reaktion ein Kontrollansatz ohne Zugabe von Reverser Transkriptase (-RT) mitgeführt. Als negative Kontrolle diente die RNA aus einer Wildtypmaus (wt). In den +RT-PCR-Ansätzen der Linien 415, 416 und 456 konnten jeweils transgenspezifische Fragmente von 755 bp und 821 bp sichtbar gemacht werden. In allen +RT-Ansätzen konnte ein GAPDH-spezifisches Fragment von ca. 350 bp amplifiziert werden, das die Quantifizierung der transgenen Produkte ermöglicht.

Das Autoradiogramm wurde "gescannt", um mittels der Schwärzung der spezifischen Hybridisierungsbanden die Menge an β -Transkripten voller Länge zu bestimmen. Der für die Linie 416 erhaltene Wert wurde als 100% festgesetzt:

	Linie 415	Linie 416	Linie 456
relative Transkriptionsrate	11%	100%	39%

3. Einbringen der Transgenallele der β -Transgenlinien in den genetischen Hintergrund der Mausmutante *spastic*

Durch Kreuzungsexperimente sollten die Transgenallele der Linien 415, 416 und 456, für die eine transgene Transkription nachgewiesen werden konnte, in den genetischen Hintergrund von *spastischen* Mausmutanten eingebracht werden. Verhaltensanalysen der transgenen Mausmutanten sollten zeigen, ob die Ausprägung des mutanten Phänotyps von *spal/spa* Mäusen durch den Gentransfer verhindert werden kann. In molekularbiologischen Studien sollte anschließend die Gesamtmenge an funktionellen GlyR β -Transkripten voller Länge im Nervensystem der Tiere ermittelt und untersucht werden, ob die GlyR_A-Oberflächenexpression erfolgreich verändert werden konnte.

3.1 Das Kreuzungsschema und die Verfahren zur genotypischen Analyse der Brütungsnachkommen

Um transgene Mausmutanten zu erhalten, wurden Transgenträger der einzelnen Linien mit den Mausmutanten in einem Kreuzungsexperiment eingesetzt. Das hierzu verwendete Kreuzungsschema ist in Abb.10 abgebildet.

P	<i>spa/spa</i> ^{-/-}	x	<i>wt/wt</i> tg/-
F1	<i>spa/wt</i> tg/-	x	<i>spa/wt</i> tg/-
F2	<i>wt/wt</i> ^{-/-} <i>wt/wt</i> tg/- <i>wt/wt</i> tg/tg	<i>spa/wt</i> ^{-/-} <i>spa/wt</i> tg/- <i>spa/wt</i> tg/tg	<i>spa/spa</i> ^{-/-} <i>spa/spa</i> tg/- <i>spa/spa</i> tg/tg

Abb.10 Kreuzungsschema zur genetischen Rettung der spastischen Mäuse

spa bzw. *wt* beschreibt den GlyR β -Locus auf Chromosom 3. Dabei bezeichnet "*spa*" ein mutiertes, "*wt*" ein gesundes Allel. Die hochgestellten Zeichen geben über den Transgenlocus Auskunft. Dabei gilt: -/- = kein Transgenallel, tg/- = heterozygoter Transgenlocus, tg/tg = homozygoter Transgenlocus. Die Generationsbezeichnungen sind auf der linken Seite aufgeführt.

Zunächst werden homozygote *spa* Mäuse mit den Transgenträgern verpaart (P) und ihre transgenen Nachkommen (F1) untereinander gekreuzt. Für die F2-Tiere sind alle Genkombinationen, die möglich sind, aufgeführt. Die für den Rettungsversuch erforderlichen Nachkommen sind fettgedruckt dargestellt.

Zunächst wurden für jeden Kreuzungsversuch homozygote *spa* Mausmutanten mit Mitgliedern der transgenen Linien verpaart. Hierbei wurden weibliche Tiere verwendet, da männliche Mäuse mit homozygotem *spa* Hintergrund, vermutlich aufgrund ihrer Bewegungsstörungen, nicht zur Zeugung von Nachkommen fähig sind. Diejenigen Nachkommen dieser Verpaarung, für die eine Transgenintegration nachgewiesen werden konnte und die per Definition heterozygot für den *spa* Locus waren, wurden anschließend untereinander weitergezüchtet und die F2-Tiere genotypisch analysiert. Zur Ermittlung der Transgenträger in der F2-Generation wurden Schwanzbiopsien der Tiere mit Hilfe der Startermoleküle β -3'UTR und SV40-2 einer transgenspezifischen PCR-Reaktion unterzogen.

Gelingt eine Komplementation des spastischen Phänotyps durch den therapeutischen Gentransfer, so ist eine Identifizierung homozygoter *spa* Mäuse, die ein Transgen tragen, anhand phänotypischer Parameter nicht mehr möglich. Für die Charakterisierung der Genotypen der F2-Tiere wurde daher ein genetischer Marker benötigt, der zuverlässig über die Weitergabe des *spa* Allels Auskunft gab.

3.2 Entwicklung eines genetischen Markers für das *spa* Allel

Das Genom von höheren Lebewesen ist von sogenannten Mikrosatelliten durchsetzt, deren Herkunft und Funktion weitgehend ungeklärt ist. Es ist jedoch bekannt, daß sich diese Tandemwiederholungen einfacher Nukleotidsequenzen in ihrer Länge beim Menschen von Individuum zu Individuum und, bei Inzuchtmausstämmen, von Mausstamm zu Mausstamm unterscheiden können. Solche polymorphen Mikrosatelliten sind daher hervorragend als genetische Marker geeignet und können zur Zuordnung von spezifischen Allelen von einzelnen Mausstämmen eingesetzt werden.

Für die Suche nach einem als genetischen Marker für das *spa* Allel geeigneten Mikrosatelliten wurde ein genomisches Fragment des Gens für die β -Untereinheit, in dem das *spa* Allel kartiert, herangezogen. Hierfür wurde das Fragment durch Subklonierung einzelner Unterfragmente detailliert charakterisiert und auf Mikrosatelliten hin untersucht, die zwischen *spa* und *wt* Unterschiede in ihrer Ausdehnung aufweisen.

3.2.1 Charakterisierung eines genomischen Fragments des Gens für die GlyR β -Untereinheit

Für die Suche nach einem polymorphen Mikrosatelliten im Gen für die GlyR β -Untereinheit wurde mir von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Heinrich Betz (MPI, Frankfurt) das Plasmid "Klon 6" überlassen, das ein genomisches Fragment der β -Untereinheit des Mausstamms *balb/c* enthält. Das 6 kb lange DNA-Fragment, das neben drei Introns die Exons zwei und drei umfaßt, war aus einer λ FIXI-*balb/c*-Genbibliothek isoliert und über endogene Schnittstellen (HindIII und EcoRI) in einen pBluescriptSKII-Vektor (Stratagene) kloniert worden (persönl. Mitteilung, Maria Fischer). Die kodierende Sequenz der Exons war bekannt, eine detaillierte Charakterisierung dieses genomischen Fragments war bis zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht vorgenommen worden.

Um Informationen über das Klon 6-Fragment (Abb. 11) zu erhalten, wurde zunächst das dem T3-Promotorbereich des Vektors zugewandte EcoRI-Ende des Fragments mittels eines von diesem Bereich ausgehenden Oligonukleotids (T3) ansequenziert. Diese Sequenzierung erlaubte das Einlesen in Sequenzen des dritten Exons. So konnte die Orientierung des DNA-Fragments im Vektor ermittelt werden. Um die Entfernung der beiden Exons, d.h. die Länge des dazwischenliegenden Introns zu bestimmen, wurde eine PCR-Reaktion mit Hilfe von aus Exonsequenzen abgeleiteten Oligonukleotiden (P9 und P6) durchgeführt. Hierbei konnte ein Fragment von ca. 0.95 kb amplifiziert und damit die Position des zweiten Exons ermittelt werden. Eine umfassende Restriktionsanalyse der Klon 6-DNA lieferte eine genaue Kartierung einzelner Restriktionsschnittstellen. Ein Ansequenzieren der DNA mit einem Oligonukleotid, das dem T7-

Promotorbereich des Vektors komplementär ist, lieferte zusätzliche Sequenzinformation über die, dem HindIII-Ende zugewandte Region des Fragments.

Für das Aufsuchen von Satellitensequenzen wurden anschließend einzelne Abschnitte der Klon6-DNA subkloniert. Hierbei wurde ein HindIII/SacI-Fragment von 0.5 kb Länge ("HS"), ein 1.1 kb langes SacI/XbaI-Fragment ("SX") und ein XbaI/EcoRI-Fragment von einer Länge von 4.4 kb ("A1") jeweils in den pBluescriptSKII-Vektor (Stratagene) kloniert (Abb.11). Zum Auffinden der gesuchten kurzen Tandemwiederholungen wurden alle subklonierten Abschnitte anschließend jeweils mit Hilfe von vektorspezifischen Oligonukleotiden (T3 und T7) ansequenziert. Bei der Sequenzierung des 3'-Bereichs des Subfragments "SX" konnte ein Mikrosatellit (*Sat.2*) im ersten Intron des Gens für die GlyR β -UE identifiziert werden. Die identifizierte Tandemwiederholung *Sat.2* hat die Nukleotidfolge (cg)₄(gt)₂₁.

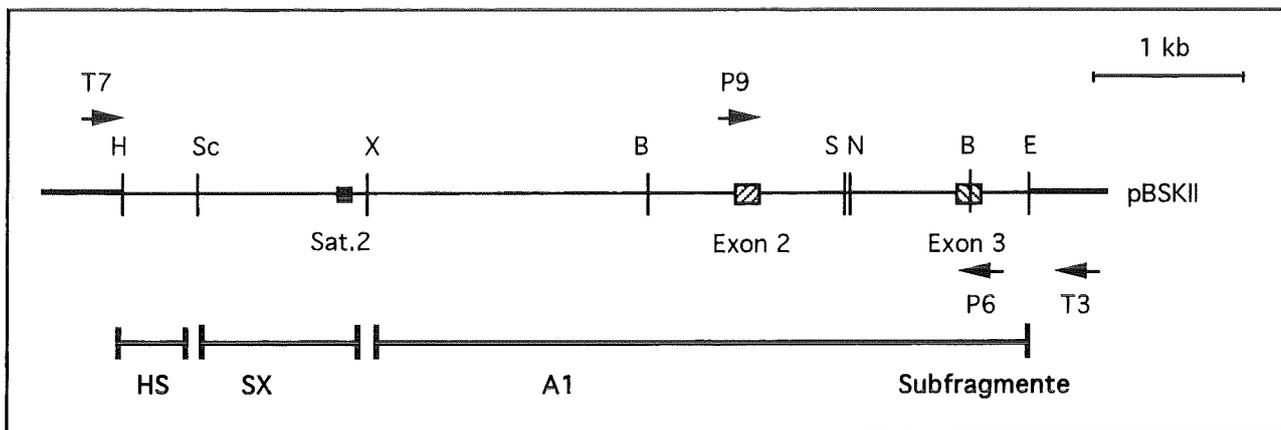


Abb.11 Schematische Darstellung des Plasmids Klon 6 und der Subfragmente

Die subklonierten Fragmente HS, SX und A1 sind gesondert dargestellt.

pBSKII = pBluescript Vektor

Sat.2 = Mikrosatellit im ersten Intron des Gens für die GlyR β -Untereinheit der Maus

T7/ T3 = Oligonukleotide, die den entsprechenden Promotoren im Vektor komplementär sind

P6 = antisense-Oligonukleotid, das zu Sequenzen des dritten Exons komplementär ist

P9 = sense-Oligonukleotid, das zu Sequenzen des zweiten Exons komplementär ist

Es wurden nur ausgewählte Schnittstellen dargestellt: H=HindIII, Sc=SacI, X=XbaI, B=BamHI, S=SphI, N=EcoNI, R=EcoRI

3.2.2 Der Mikrosatellit *Sat.2* ist polymorph und wird gekoppelt mit dem *spa* Allel vererbt

Im folgenden wurde der identifizierte Mikrosatellit *Sat.2* daraufhin untersucht, ob er zum Verfolgen des *spa* Allels während der Kreuzungsexperimente geeignet ist. Hierzu wurde für den Satelliten ein PCR-Analyseverfahren entwickelt, mit dem es möglich war, seine Ausdehnung im Genom homozygoter *spa* Mäuse und der etablierten β -Transgenträger zu erfassen. Als Startermoleküle wurden dabei Oligonukleotide verwendet, die zu flankierenden Sequenzen des Satelliten komplementär sind (Abb.12). Die für die Entwicklung der Oligonukleotide Pex1 (sense)

und Sat.2.2b (antisense) benötigten Sequenzen der flankierenden Regionen waren bei der Charakterisierung der Subfragmente "HS" und "SX" ermittelt worden. Die PCR-Amplifikation des betreffenden Bereichs ergab für alle, zu diesem Zeitpunkt verfügbaren *spa/spa* Mäuse, die anhand ihres mutanten Phänotyps identifiziert wurden, ein Fragment von ca. 325 bp. Diese Tiere zeigten die für *spastic* typischen Verhaltensmerkmale wie starken Tremor, gestörten Aufrichtreflex, männliche Infertilität sowie das charakteristische Zusammenpressen der Hinterbeine beim Hochnehmen am Schwanz (*hind feet clasp*). Die Amplifikation mit der DNA von *DBA/2*-Wildtypmäusen und von Mitglieder der β -Transgenlinien dagegen ergab ein Fragment von ca. 300 bp. Erwartungsgemäß konnten für Mäuse mit dem Genotyp *spa/wt*, die von der Firma "Jackson Laboratories" bezogen wurden, Fragmente beider Längen nachgewiesen werden (Abb.12). Der Mikrosatellit *Sat.2* weist also einen Längenpolymorphismus auf, der mit dem *spa* Allel kosegregiert. Damit konnte er als genetischer Marker zur Charakterisierung der Nachkommen der geplanten Kreuzungsexperimente herangezogen werden.

Um spontane Rekombinationsereignisse im Mikrosatelliten *Sat.2* auszuschließen, wurde die DNA aller verwendeten Tiere vor ihrem Einsatz im Kreuzungsexperiment im Satelliten-spezifischen PCR-Analyseverfahren überprüft.

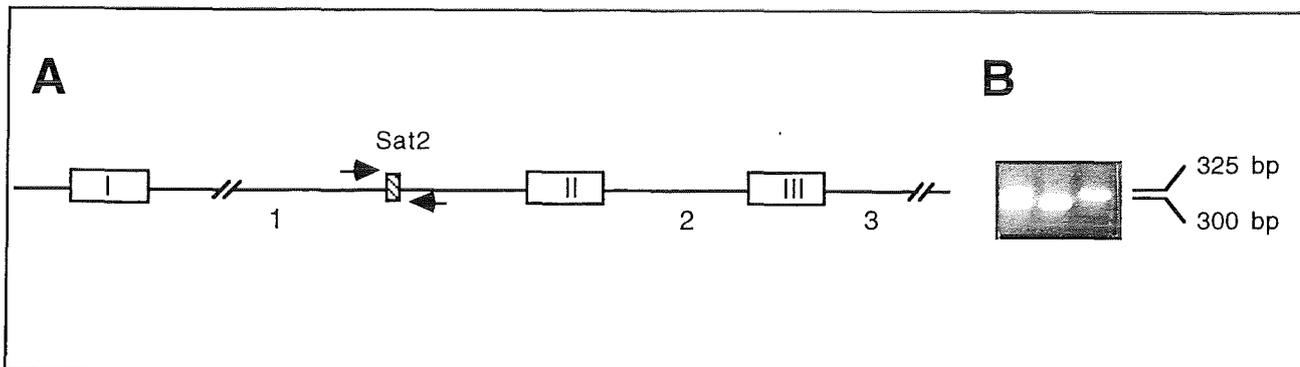


Abb.12 Der polymorphe Mikrosatellit *Sat.2* im Gen für die β -Untereinheit des GlyR

In (A) ist schematisch die Lage des Mikrosatelliten *Sat.2* im ersten Intron des Gens für die GlyR β -Untereinheit der Maus dargestellt, für den ein Längenpolymorphismus zwischen der Mausmutante *spastic* und den transgenen *DBA/2*-Mäusen nachgewiesen werden konnte. Die dargestellten Exons sind mit römischen, die Introns mit arabischen Zahlen gekennzeichnet. Die für die PCR-Analyse zum Nachweis des Längenpolymorphismus verwendeten Oligonukleotide *Pex1* (sense) und *Sat.2.2b* (antisense) wurden durch Pfeile dargestellt.

Das Foto in (B) zeigt die im 2%igen Agarosegel aufgetrennten PCR-Reaktionen, die mit den genannten Oligonukleotiden und der DNA einer heterozygoten *spa* Maus (*spa/wt*), einer β -transgenen *DBA/2*-Maus (*wt/wt^{tg}*) und einer homozygoten *spa* Maus (*spa/spa*) durchgeführt wurden. Amplifiziert wird im Falle des *spa* Allels ein Fragment von ca. 325 bp, im Falle des Wildtypallels der entwickelten β -Transgenträger ein Fragment von ca. 300 bp.

links = *spa/wt*

mitte = *wt/wt^{tg}*

rechts = *spa/spa*.

Nach Etablierung der erforderlichen Analyseverfahren zur Untersuchung der Tiere der F2-Generation konnten die Linien 415, 416 und 456 in den Kreuzungsversuchen eingesetzt werden.

3.3 Entwicklung homozygoter *spa* Mäuse, die das GlyR β -Transgen der Linie 416 in ihrem Genom tragen

3.3.1 Die Kreuzungsexperimente

Zur Entwicklung homozygoter *spastic* Mausmutanten mit Transgenallelen wurde zunächst die Linie 416 eingesetzt, für die in den vorangegangenen Expressionsanalysen eine hohe transgene Transkriptionsrate nachgewiesen werden konnte. Der Stammbaum in Abb.13 zeigt die für die ersten Kreuzungsexperimente eingesetzten Tiere und einzelne Individuen aus ihrer Nachkommenschaft. Für die Parentalgeneration wurde zunächst ein homozygotes *spa*-Weibchen (Nr.1106) mit dem heterozygoten Transgenträger Nr. 827 verpaart. Das homozygote *spa* Tier, das einer Verpaarung heterozygoter *spa* Mausmutanten der Firma "Jackson Laboratories" (Nr. 744 und 745) entstammte, war aufgrund seines mutanten Phänotyps ermittelt und die Länge des Mikrosatelliten *Sat.2* mit Hilfe der beschriebenen PCR-Analyse überprüft worden. Aus der Population der ersten Nachkommen der Parentalverpaarung 1106 x 827 konnten lediglich zwei Tiere weiblichen Geschlechts als Transgenträger ermittelt werden (Nr.1624 und 1625). Um längere Wartezeiten zu vermeiden, wurde das transgene F1-Weibchen Nr. 1625 mit einem heterozygoten *spa*-Männchen (Nr.1301) zurückgekreuzt, das ebenfalls aus der *spa* Zuchtverpaarung (744 x 745) stammte. Nach der genotypischen Analyse der Nachkommen dieser Rückkreuzung konnte für mehrere Tiere (Nr. 2161, 2425, 2428) der gewünschte Genotyp *spa/spa*⁴¹⁶ nachgewiesen werden (Abb.13). Keines dieser Tiere zeigte drei Wochen nach der Geburt den für homozygote Mausmutanten charakteristischen Phänotyp. In homozygoten Mausmutanten ohne Transgenallele, die ebenfalls aus der Brütung erhalten wurden, war er erwartungsgemäß ausgeprägt.

Es war also gelungen, durch Einbringen der Transgenallele der Linie 416 in den genetischen Hintergrund der *spa* Mausmutante die Manifestierung ihrer Krankheitssymptome zu verhindern.

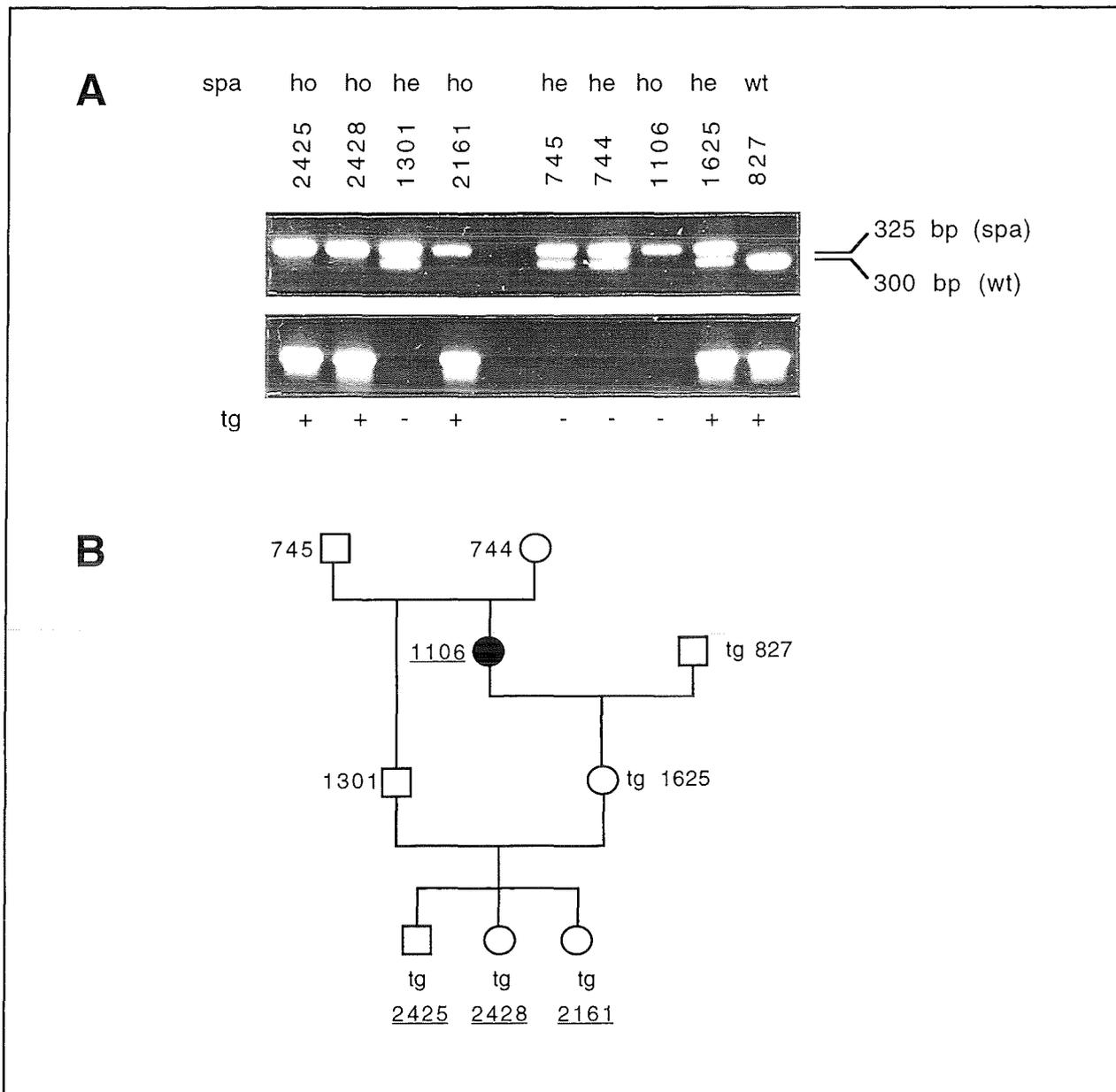


Abb.13 Herstellung homozygoter *spastic* Mausmutanten, die das Transgen der Linie 416 in ihrem Genom tragen

Das Foto in (A) zeigt die genotypische Analyse der Tiere einer "rescue" Verpaarung, deren Stammbaum in (B) dargestellt ist.

(A) Die Vererbung des *spa* Locus wurde in PCR-Reaktionen mit Hilfe der Oligonukleotide Pex1 und Sat.2.2b überprüft, die gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden (oben). Die Transgenträger wurden in der transgenspezifischen PCR-Amplifikation mit Hilfe der Oligonukleotidkombination β -3'UTR /SV40-2 ermittelt (unten).

(B) Männliche Tiere sind mit einem Quadrat gekennzeichnet, weibliche mit einem Kreis. Die homozygote *spastic* Mausmutante Nr.1106 entwickelte einen mutanten Phänotyp (ausgefüllter Kreis). Die transgenen Tiere aus der F2-Generation (Nr.2161, Nr.2425, Nr.2428) prägten keine *spa* typischen Krankheitssymptome aus, obgleich sie homozygot für den *spa* Locus waren. Die Nummern von, bzgl. des *spa* Allels homozygoten Tieren sind unterstrichen.

Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurden die aus den laufenden Brütungen hervorgegangenen Tiere mit dem Genotyp $spa/wt^{416/-}$ untereinander verpaart und ihre 119 Nachkommen genotypisch analysiert (vgl. Tab.1). Achzehn Tiere aus dieser Population waren homozygot für den spa Locus und trugen kein Transgen. Diese entwickelten in ihrer dritten Lebenswoche die charakteristischen Merkmale des *spastischen* Phänotyps.

Die homozygoten Tiere, die mindestens ein Transgenallel trugen, waren phänotypisch nicht von ihren gesunden Geschwistern (wt/wt und spd/wt) zu unterscheiden. Keines dieser Tiere hatte Schwierigkeiten beim Erreichen der aufrechten Körperposition, entwickelte einen Tremor oder zeigte beim Hochnehmen am Schwanz das charakteristische Zusammenpressen der Hinterbeine (Abb. 14). Die Tiere mit dem Genotyp $spa/spa^{416/-}$ und $spa/spa^{416/416}$ wurden daher *rescue* Tiere genannt.

Genotyp	Anzahl der F2 Tiere	Anzahl der Tiere mit mit mutantem Phänotyp
wt/wt	11	0
wt/wt^{tg}	17	0
spa/wt	22	0
spa/wt^{tg}	37	0
spa/spa	18	18
spa/spa^{tg}	14	0
total	119	18

Tab.1 Anzahl und Genotypen der Nachkommen aus der Verpaarung der F1-Generation ($spa/wt^{416/-}$ x $spa/wt^{416/-}$)

Nachkommen mit dem genetischen Hintergrund einer Wildtypmaus wurden mit "wt/wt" gekennzeichnet, solche mit einem spa Allel durch ein "spa/wt" und homozygote spa Nachkommen durch ein "spa/spa". Transgene Tiere sind durch ein "tg" gekennzeichnet. Nur die durch die Brütungen erhaltenen 18 nicht-transgenen Tiere mit homozygoten spa Locus entwickelten einen mutanten Phänotyp.

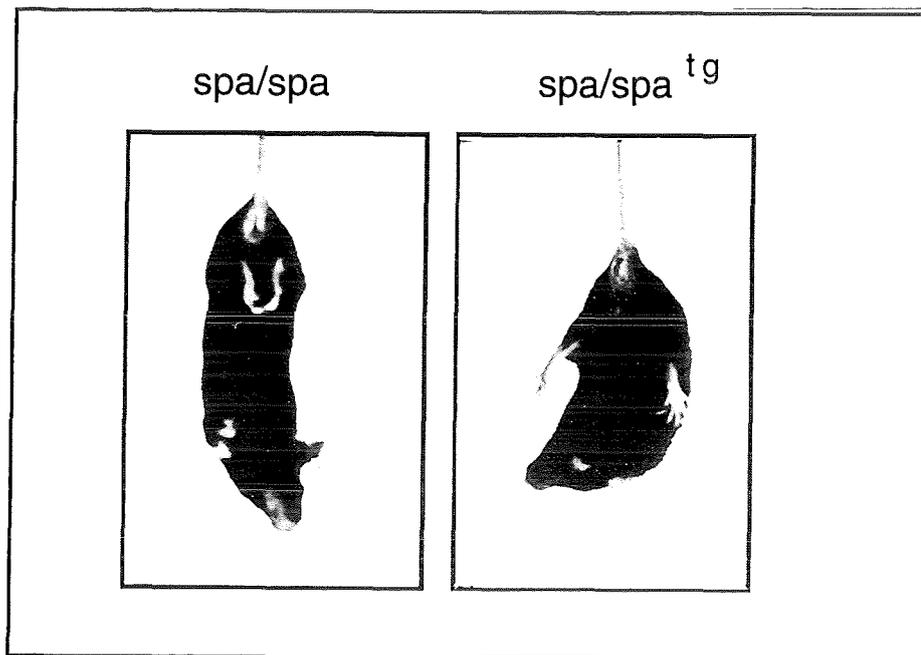


Abb.14 Mäuse, die homozygot für den *spa* Locus sind und das Transgen tragen, zeigen nicht das für *spa* typische *hind feet clasp*

Die *rescue* Tiere (rechts) strecken beim Hochnehmen am Schwanz ihre Hinterbeine von sich. Dagegen pressen nicht-transgene, homozygote *spa* Mäuse (links) bei der gleichen Behandlung ihre Hinterbeine fest an ihren Körper.

Zur abschließenden Beweisführung wurden *rescue* Mäuse (*spa/spa*^{416/-}) männlichen Geschlechts in Verpaarungen mit homozygoten *spa* Weibchen (*spa/spa*) eingesetzt. Sie waren ohne Ausnahme zur Zeugung von Nachkommen fähig. Neben der Unterdrückung der *spastischen* Bewegungsstörungen konnte durch das Transgen demnach auch die Zeugungsfähigkeit der *spa* Männchen wiederhergestellt werden. Entscheidend für die Beweisführung war, daß aus diesen Verpaarungen erwartungsgemäß nur homozygote Mausmutanten hervorgebracht wurden, wobei alle Nachkommen, die kein Transgen trugen, zwei bis drei Wochen nach ihrer Geburt erkrankten. Dieses Ergebnis bestätigte nochmals, daß der Polymorphismus des Mikrosatelliten *Sat.2* mit dem *spa* Allel kosegregiert. Alle Nachkommen, an die das Transgen vererbt worden war, hatten keine erkennbaren Bewegungsstörungen, bildeten keinen Tremor aus, und alle männlichen Transgenträger waren zudem zur Zeugung weiterer Nachkommen fähig.

3.3.2 Phänotypische Analyse der *rescue* Maus

Daß die genetische Rettung der *spa* Mausmutante durch Einbringen des Transgens der Linie 416 erfolgreich verlaufen war, sollte durch eine phänotypische Analyse verdeutlicht werden. Dazu wurde ein Versuchsaufbau entwickelt, mit dem es möglich war, den Aufrichtreflex von Mäusen zu untersuchen. Hierzu wurden die zu untersuchenden Tiere mit Hilfe einer Styroporplatte, an der sie sich zunächst festklammern konnten, in Rückenlage gebracht und durch Fixieren am Schwanz

kurzzeitig in dieser Position festgehalten. Anschließend wurde die Platte entfernt und die für ein vollständiges Wiederaufrichten benötigte Zeit gemessen.

Mit Hilfe des entwickelten Versuchsaufbaus wurde der Aufrichtreflex von *DBA/2* Wildtypmäusen, *rescue* Tieren und homozygoter *spa* Mausmutanten gleichen Alters (22 Tage) bestimmt (Abb.15). Während die *spa* Mausmutanten für ein Erreichen der aufrechten Körperhaltung eine Zeit von bis zu 50 Sekunden benötigen, geschieht dies bei den gesunden Tieren des *DBA/2* Mausstamms in weit weniger als einer Sekunde. Der Aufrichtreflex der homozygoten *spa* Tiere mit Transgenallelen ist von dem der Wildtypmäuse nicht zu unterscheiden.

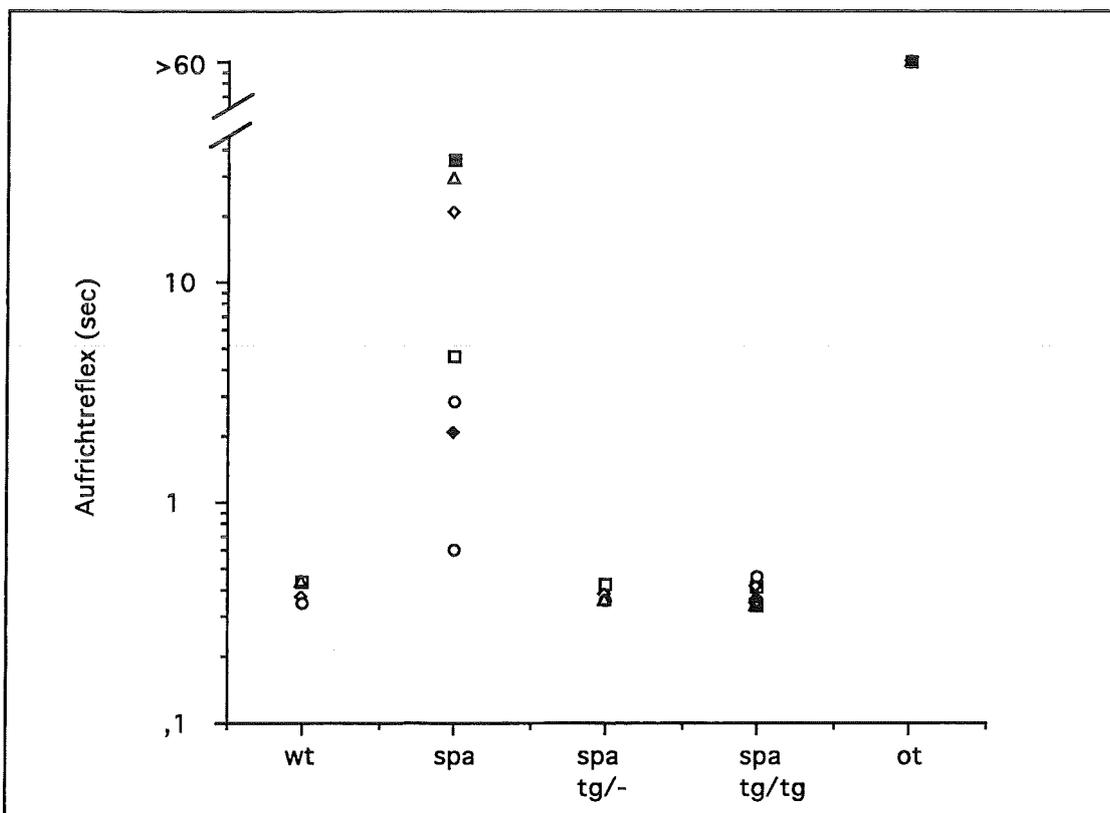


Abb.15 Analyse des Aufrichtreflex von Wildtypmäusen, homozygoten *spa* Mausmutanten und *rescue* Tieren

Jeweils sieben Tiere jeden Genotyps wurden im Alter von 22 Tagen in Rückenlage gebracht und die Zeit gemessen, die die Tiere zum Wiederaufrichten benötigten. Für jede Maus wurden jeweils fünf Messungen durchgeführt. Zum Vergleich wurden zusätzlich homozygoten Mausmutante *spd^{ot}* (*ot*) eingesetzt, die zum Erreichen der aufrechten Körperstellung nicht in der Lage sind. Gerettete Tiere mit heterozygotem (*tg/-*) und homozygotem (*tg/tg*) Transgenlocus wurden getrennt aufgeführt. Der Aufrichtreflex dieser Mäuse ist nicht von dem der Wildtypkontrollen zu unterscheiden.

wt = wt/wt

spa = spa/spa

Desweiteren wurde zur Verhaltensanalyse der Tremor der einzelnen Tiere dokumentiert. Hierzu diente ein *Transducer*, der mechanische Impulse in elektrische umwandelt (Hugo Sachs Elektronik). In Verbindung mit einem elektrischen Verstärker und einem Schreiber werden Gewichtsveränderungen, die sich aus den hochfrequenten Vibrationen des Tremors ergeben,

elektronisch aufgezeichnet. In Abb.16 sind der Versuchsaufbau und die entsprechenden Aufzeichnungen dargestellt. Die Aufzeichnungen zeigen, daß, im Gegensatz zu homozygoten Mausmutanten, Wildtypmäuse und *rescue* Tiere keinen Tremor besitzen.

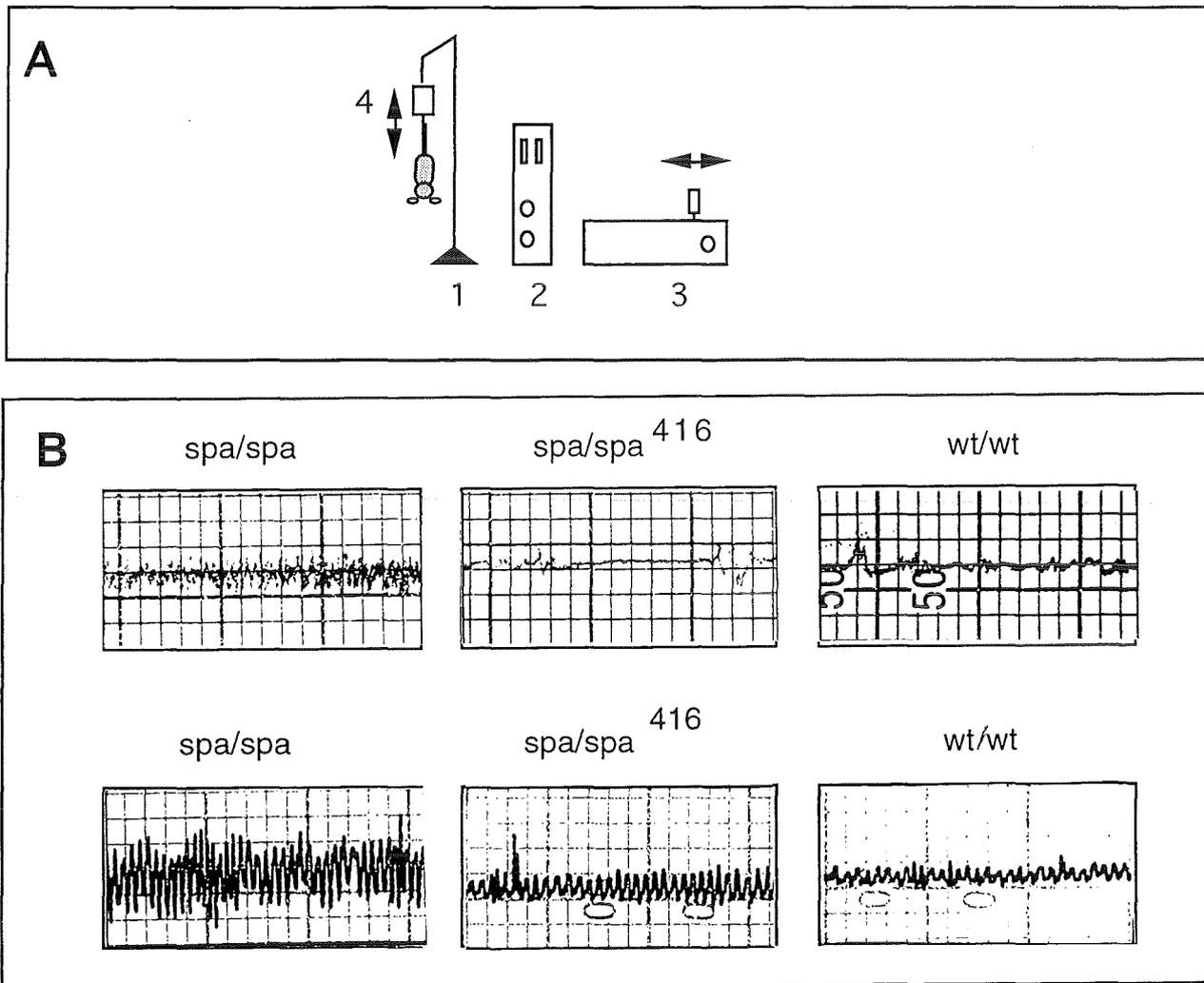


Abb.16 Tremoranalyse

(A) Versuchsaufbau zur Tremoranalyse

Mit Hilfe eines Verstärkergerätes (2) und Schreibers (3) können die mechanischen Schwingungen (\leftrightarrow) des Auslenkkopfes (4) am Meßgerät (1) aufgezeichnet werden. Die einzelnen Tiere wurden vorsichtig mit ihrem Schwanz am Auslenkkopf des Meßgerätes befestigt und ihre Bewegungen und eventuelle Körpervibrationen für kurze Zeit mit Hilfe des Schreibers aufgezeichnet. Die am Verstärkergerät und Schreibergerät eingestellten Parameter sind dem Methodenteil zu entnehmen.

(B) Tremoraufzeichnungen

Die Darstellung zeigt Messungen bei unterschiedlicher Empfindlichkeitseinstellungen des Schreibers (oben: 50 mV; unten 10 mV). Es wurden lediglich die Zeitausschnitte der Messungen dargestellt, in denen die Tiere keine willkürlichen Bewegungen ausübten. Durch den Tremor einer homozygoten *spa* Maus werden gleichförmige Schwingungen des Auslenkkopfes ausgelöst und mit dem Schreiber aufgezeichnet. Die Aufzeichnungen der kurzen Schwingungskurven bei Wildtyp- (wt/wt) und geretteten Maus (*spa/spa*⁴¹⁶) spiegeln lediglich die Atembewegung der Tiere wider.

Die durchgeführten phänotypischen Analysen zeigten, daß das Einbringen des Transgenlocus der Linie 416 in den genetischen Hintergrund der *spastischen* Mausmutante die Manifestierung ihrer gesamten Krankheitssymptome verhindert. Dies läßt darauf schließen, daß im Nervensystem dieser Tiere ein biologisch aktives Transgenprodukt gebildet wird, und daß die GlyR β -Untereinheit der Ratte das murine Protein über Speziesbarrieren hinweg ersetzen kann. Eine molekularbiologische Analyse der erzeugten *rescue* Tiere sollte nun zeigen, ob die Komplementation des *spastischen* Phänotyps, wie erwartet, mit einer Erhöhung der Menge an funktionellen GlyR β -Transkripten voller Länge und mit einer Verbesserung der GlyRA-Oberflächenexpression verbunden ist.

3.3.3 Analyse der funktionellen GlyR β -Transkripte im ZNS der *rescue* Maus

Zum Vergleich der Mengen an funktionellen GlyR β -Transkripten in der homozygoten *spa* Maus und der *rescue* Maus wurde zunächst eine RNA-Analyse durchgeführt. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus dem ZNS einer *spa/spa* Maus, einer *spa/wt* Maus, einer DBA/2-Wildtypmaus, einer *rescue* Maus mit einem Transgenallel (*spa/spa*^{416/-}) und einer *rescue* Maus mit zwei Transgenallelen (*spa/spa*^{416/416}) isoliert und die β -Transkripte mit Hilfe der *Northern Blot* Methode sichtbar gemacht. Im Laufe des letzten Jahres konnte gezeigt werden, daß in der Mausmutante *spastic*, neben der erheblich reduzierten Menge an Transkripten mit voller Länge (3.5 kb), GlyR β -Transkripte existieren, denen das vierte bzw. das vierte und das fünfte Exon fehlt (Mülhardt et al., 1994). Daher wurde als Sonde für den *Northern Blot* ein Fragment verwendet, das die Exons 4 und 5 der β -cDNA repräsentiert und mit der lediglich funktionsfähige β -Transkripte voller Länge sichtbar gemacht werden. Dieses Fragment wurde mittels eines NcoI/AatII-Verdau als 264 bp großes Fragment aus der GlyR β -cDNA der Ratte isoliert. Zur Quantifizierung der aufgetragenen mRNA-Menge wurde zusätzlich eine Kontrollhybridisierung mit der GAPDH-cDNA der Ratte durchgeführt. Anhand der Schwärzung der spezifischen Banden auf den Autoradiogrammen, die in Abb.17 dargestellt sind, wurde die GlyR β -Transkriptionsrate der einzelnen Tiere bestimmt (vgl. Tab. in Abb.17). In Übereinstimmung mit den publizierten Daten konnte hierbei gezeigt werden, daß die homozygote *spa* Mausmutante nur 8% der funktionellen β -Transkripte besitzt, die im ZNS der Wildtypmaus detektiert werden. Zudem wurde zum ersten Mal gezeigt, daß die Menge an vollständigen β -Transkripten im Nervensystem der *spa/wt* Maus, verglichen mit der einer Wildtypmaus, 68% beträgt. Im Nervensystem der *rescue* Mäuse konnten jeweils zusätzlich zwei mRNA Spezies transgenen Ursprungs identifiziert werden (vgl. Abb.17). Dabei entspricht das Hybridisierungssignal bei 2.5 kb den erwarteten transgenen Transkripten mit kurzem polyA-Schwanz. Eine zweite Spezies von ca. 3.3 kb Länge könnte auf das Vorhandensein eines sehr langen PolyA-Schwanzes oder auf ein "Read-through" in flankierende Sequenzen zurückzuführen sein.

Im Nervensystem der *rescue* Maus mit einem Transgenallel konnte eine Gesamtmenge an funktionellen β -Transkripten nachgewiesen werden, die 24% der Menge einer Wildtypmaus entspricht. Die in dieser Analyse eingesetzte *rescue* Maus war in ihrem Verhalten nicht von einer Wildtypmaus zu unterscheiden. Dies zeigt, daß weit weniger als die Hälfte der Menge an β -Transkripten einer Wildtypmaus für die normale Funktion des glyzinerigen Systems ausreichend ist.

Für die *rescue* Maus mit zwei Transgenallelen wurde, verglichen mit der der Wildtypmaus, eine β -Transkriptmenge von 45% nachgewiesen. Dies zeigt, daß die Gesamtmenge an β -Transkripten voller Länge durch Erhöhung der Zahl an Transgenallelen gesteigert werden kann. Die Transkriptmenge zeigt somit einen Gen-Dosis-Effekt.

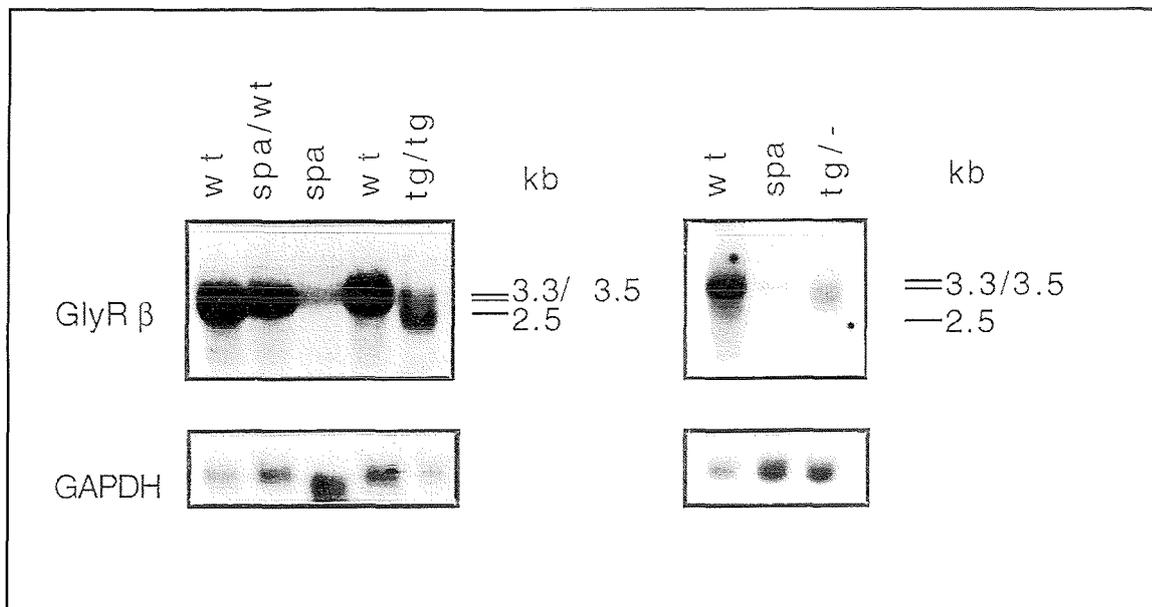


Abb.17 β -Transkripte im Nervensystem von *rescue* Mäusen, Wildtypmäusen und *spastischen* Mausmutanten

Jeweils 15 μ g Gesamt-RNA aus dem ZNS einer Wildtypmaus (wt), einer homozygoten Mausmutante (spa), einer heterozygoten Mausmutante (spa/wt), einer *rescue* Maus mit einem Transgenallel (tg/-) und einer *rescue* Maus mit zwei Transgenallelen (tg/tg) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Nach Hybridisierung mit einer Sonde, die die Exons 4 und 5 der β -cDNA repräsentiert, folgte eine Rehybridisierung mit der GAPDH-cDNA der Ratte.

Das Autoradiogramm wurde "gescannt", um mittels der Schwärzung der spezifischen Hybridisierungsbanden die Menge an β -Transkripten voller Länge zu bestimmen. Der für die Wildtyptiere erhaltene Wert wurde als 100% vollständige β -Transkripte festgesetzt. Für die *rescue* Mäuse wurde zusätzlich aus der Gesamt-Transkriptmenge, durch Abzug der in *spa/spa* gemessenen endogenen Transkriptmenge, die Transkriptmenge mit transgenem Ursprung (tg) errechnet:

	wt/wt	spa/wt	spa/spa	spa/spa416/-	spa/spa416/416
β -Transkript- menge	100%	68,1%	8%	24% tg: 16%	45% tg: 37%

3.3.4 Analyse der GlyRA-Oberflächenexpression im zentralen Nervensystem der *rescue* Maus

Durch die Reduktion der β -mRNA voller Länge ist in der homozygoten *spa* Mausmutante vermutlich auch die Menge an funktionellem β -Protein erheblich vermindert. Diese quantitative Veränderung des β -Proteins kann mit immunochemischen Nachweismethoden (*Western Blot*) nicht direkt gezeigt werden, da bis heute kein geeigneter, gegen das β -Protein gerichteter Antikörper zur Verfügung steht. Aus diesem Grund kann auch die Bildung des transgenen β -Proteins nicht im Nervensystem transgener Mäuse nachgewiesen werden. In adulten, homozygoten *spa* Mäusen ist jedoch gleichzeitig das Erscheinen der α -Untereinheit auf der Membranoberfläche beeinträchtigt (Becker et al., 1988), was im *Western Blot* mit Hilfe des α -spezifischen Antikörpers Mab 4a (Pfeiffer et al., 1984; Schröder et al., 1991) gezeigt werden kann (vgl. Abb. 18). Gelingt ein immunochemischer Nachweis von auf der neuronalen Membranoberfläche erscheinenden α -Proteinen im Nervensystem adulter *rescue* Mäuse, so läßt dies auf die Bildung eines funktionsfähigen Transgenprodukts schließen. Da weiterhin die Anzahl an GlyRA-Komplexen, die auf der Membranoberfläche der Neurone adulter Tiere erscheinen, mit der Menge an nachweisbarem α -Protein korreliert, kann ein Vergleich der α -Untereinheiten im Stammhirn von adulten *spalpa* und *rescue* Mäusen im *Western Blot* darüber Auskunft geben, inwieweit sich die GlyRA-Oberflächenexpression in den *rescue* Mäusen verändert hat.

Für einen immunochemischen Nachweis des α 1-Proteins mit Hilfe des Antikörpers Mab 4a wurden Membranproteine aus dem Stammhirn einer *DBA/2*-Wildtypmaus, einer homozygoten *spa* Maus und einer *rescue* Maus isoliert und im *Western Blot* analysiert. Zur Standardisierung der aufgetragenen Proteinmengen wurde der gegen das Vesikelprotein Synaptophysin gerichtete, monoklonale Antikörper Sy38 eingesetzt. Wie Abb.18 zeigt, konnte in der homozygoten *spa* Mausmutante, verglichen mit der Wildtypmaus, erwartungsgemäß nur sehr wenig α -Protein nachgewiesen werden. Für *rescue* Mäuse mit einem Transgenallel konnte, verglichen mit den *spalpa* Tieren, eine Zunahme an α -Protein nachgewiesen werden. Eine weitere Zunahme an membranständigem α -Protein war in denjenigen *rescue* Mäusen zu erkennen, die zwei Transgenallele trugen. Dies kann durch den Gen-Dosis-Effekt, der schon bei der Bestimmung der β -Transkriptmenge angesprochen wurde, erklärt werden.

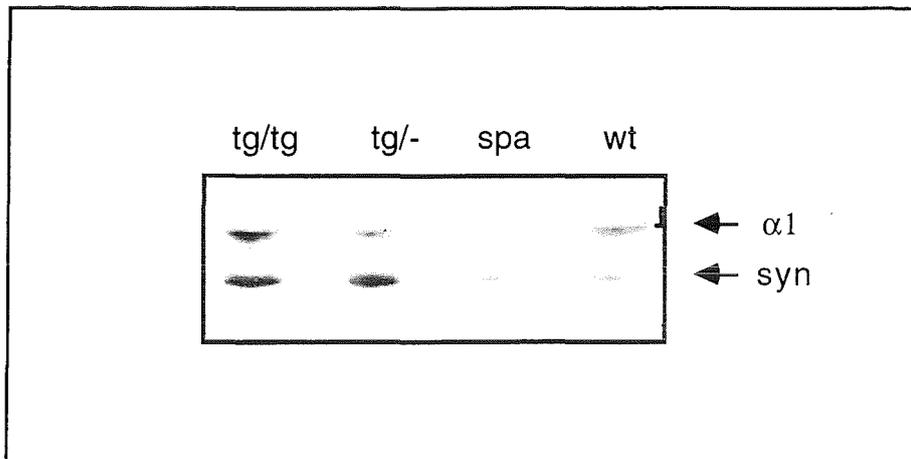


Abb.18 Analyse von membrangebundenem α -Protein im Stammhirn der *rescue* Mäuse

Das Stammhirn von Wildtypmäusen (*wt*), *spa/spa* Mäusen (*spa*) und *rescue* Tieren mit einem (*tg/-*) bzw. zwei Transgenallelen (*tg/tg*) wurden acht Wochen nach ihrer Geburt präpariert, die neuronalen Membranproteine isoliert, im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das α -Protein wurde anschließend mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Mab 4a als 49 kD-Bande sichtbar gemacht ($\alpha 1$). Zur Standardisierung der aufgetragenen Proteinmenge wurde ein, gegen das Vesikelprotein Synaptophysin (38 kD) gerichteter Antikörper eingesetzt (*syn*).

Zur Quantifizierung der GlyR_A-Oberflächenexpression im Stammhirn von *DBA/2*-Wildtyp-, *spa/spa* - und *spa/spa*^{416/-}-Mäusen wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Cord-Michael Becker (ZMBH, Heidelberg) Ligandenbindungsstudien mit [³H]Strychnin durchgeführt (Tab.2). Diese Analysen ergaben, daß *spa/spa* 20% der [³H]Strychninbindungskapazität der *DBA/2*-Wildtypmäuse (100%) besitzen. Für die untersuchten *rescue* Mäuse konnte dagegen eine [³H]-Strychninbindungskapazität von ca. 60% bestimmt werden. Die [³H]-Strychninbindungskapazität der *spa/wt* Mäuse unterscheidet sich nicht von der der *DBA/2*-Wildtypmäuse (persönl. Mitteilung, C.-M. Becker).

Genotyp	[³ H]Strychninbindung
<i>wt/wt</i>	100%
<i>spa/wt</i>	100%
<i>spa/spa</i>	20%
<i>spa/spa</i> ^{416/-}	60%

Tab.2 [³H]Strychninbindungskapazität neuronaler Membranen von *rescue* Mäusen

Diese Experimente wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Cord-Michael Becker (ZMBH, Heidelberg) durchgeführt.

Die erzielten Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die identifizierten Transgentranskripte erfolgreich translatiert werden, und daß das gebildete Transgenprodukt im glyzineren System der Maus eine Funktion übernehmen kann. Dabei konnte gezeigt werden, daß ein spezie fremdes Protein die murine β -Untereinheit in seiner Funktion als GlyRA-Komponente ersetzen kann. Zudem bestätigte sich die Erhöhung der Transgenexpression durch einen homozygoten Transgenlocus.

Diese Daten belegen außerdem, daß durch neuronale Expression einer funktionsfähigen GlyR β -Untereinheit die in der *spa/spa* Maus beeinträchtigte GlyRA-Oberflächenexpression beeinflusst werden kann. Das weist darauf hin, daß das Erscheinen des GlyRA auf der neuronalen Membranoberfläche kritisch von der Verfügbarkeit an funktionellen β -Untereinheiten bestimmt wird. Dabei war interessant zu erfahren, daß eine Erhöhung der Menge an funktionellen β -Transkripten in der *spa/spa* Maus um 16% zu einer Erhöhung der GlyRA-Oberflächenexpression um ca. 40% führt. Die Verhaltensanalysen und die Ligandenbindungsstudien lassen außerdem erkennen, daß für die Funktion der glyzineren Nervenübertragung eine GlyRA-Oberflächenexpression von lediglich 60% ausreichend ist. Das Unterdrücken des *spastischen* Phänotyps durch eine gezielte Veränderung der β -Expression bestätigt zudem die Kausalität der im β -Gen identifizierten Mutation für die Bewegungsstörungen der *spa* Maus.

3.4 Entwicklung und Analyse homozygoter *spa* Mäuse, die das β -Transgen der Linien 456 bzw. 415 in ihrem Genom tragen

Gleichzeitig zu der Entwicklung und Analyse des *spa/spa*⁴¹⁶ *rescue* Stammes wurden analoge Versuchsansätze mit den Nachkommen der Linie 415 und 456 durchgeführt. Um die Mäuse mit dem gewünschten Genotyp *spa/spa*⁴¹⁵ bzw. *spa/spa*⁴⁵⁶ zu erhalten, wurde ebenfalls das in Kapitel A.3.1 vorgestellte Kreuzungsschema verwendet und dabei die Genotypen der Tiere mit Hilfe der beschriebenen PCR-Analyseverfahren ermittelt.

Alle homozygoten *spa* Mausmutanten ohne Transgenintegration (*spa/spa*^{-/-}), die jeweils aus diesen Kreuzungen geboren wurden, entwickelten ein bis zwei Wochen nach ihrer Geburt den charakteristischen Phänotyp. Auch diejenigen, die ein Transgenallel der Linie 415 trugen (*spa/spa*^{415/-}), entwickelten zwei bis drei Wochen nach der Geburt einen starken Tremor (Abb.19) und hatten Schwierigkeiten beim Erreichen der aufrechten Körperstellung (Abb.20). Die weiblichen transgenen Mausmutanten wurden in weiteren Brütungen zur Entwicklung von Tieren mit homozygoten Transgenlocus (*spa/spa*^{415/415}) eingesetzt. Die Homozygotie bezüglich des Transgenlocus konnte die Manifestierung der Bewegungsstörungen jedoch nicht verhindern. In der phänotypischen Analyse unterschieden sie sich nicht von den Mausmutanten mit lediglich einem Transgenallel (Abb.20).

Die im Fall der Transgenlinie 456 erhaltenen, homozygoten Mausmutanten mit einem Transgenallel ($spa/spa^{456/-}$) entwickelten in ihrer dritten Lebenswoche ebenfalls den für spa charakteristischen Phänotyp (Abb.19 und 20). Dagegen war bei allen Brütungsnachkommen, die homozygot für den spa Locus waren und zwei Transgenallele trugen ($spa/spa^{456/456}$) eine deutliche Verbesserung der Krankheitssymptome zu beobachten. Zwar zeigten diese Tiere das *hind feet clasping*, jedoch manifestierten sie lediglich einen leichten Tremor (Abb.19) und die männlichen Tiere waren zur Zeugung von Nachkommen befähigt. Die phänotypische Analyse ihres Aufrichtreflexes (Abb.20) zeigte, daß sie zum vollständigen Wiederaufrichten wesentlich weniger Zeit benötigten als gleichaltrige (22 Tage), homozygote Mausmutanten ohne oder mit nur einem Transgenallel der Linie 456.

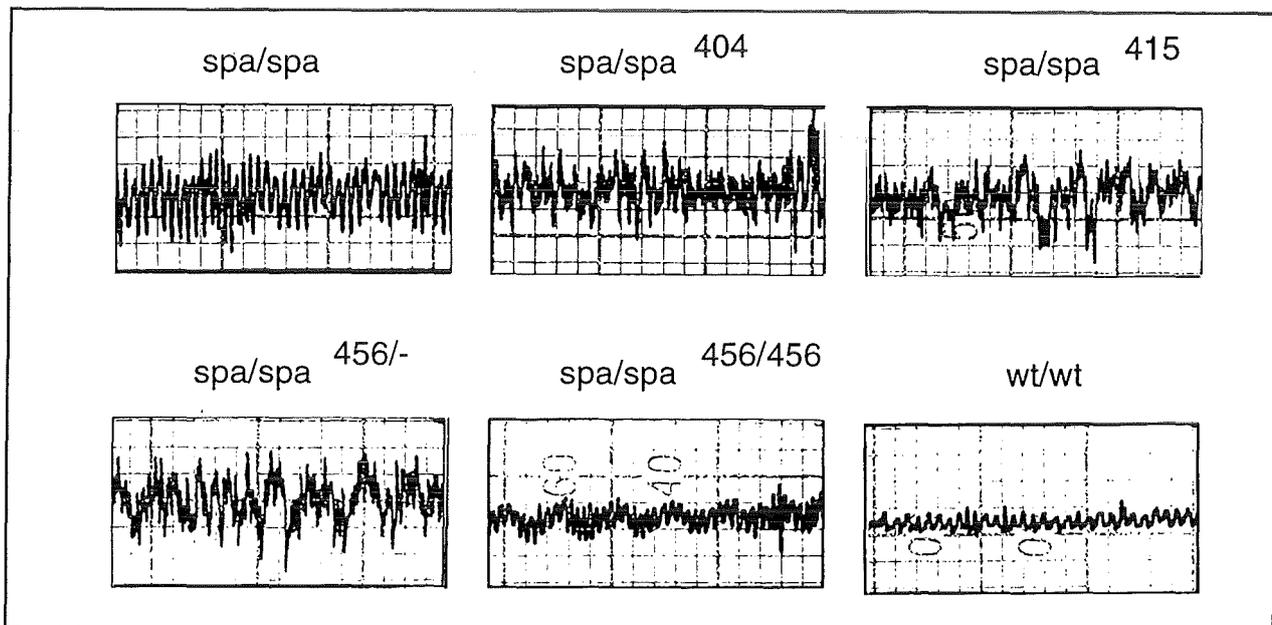


Abb.19 Tremoranalyse homozygoter Mausmutanten mit Transgenallelen der Linien 401, 415 bzw. 456

Im Alter von 22 Tagen ist das Tremorverhalten der Tiere mit dem Genotyp $spa/spa^{404/-}$, $spa/spa^{415/-}$ und $spa/spa^{456/-}$ nicht von dem der homozygoten spa Mäuse ohne Transgenallel (spa/spa) zu unterscheiden. Dagegen wird bei den Tieren mit dem Genotyp $spa/spa^{456/456}$ nur ein leichter Tremor nachgewiesen. Wildtypmäuse (wt/wt) zeigen keinen Tremor.

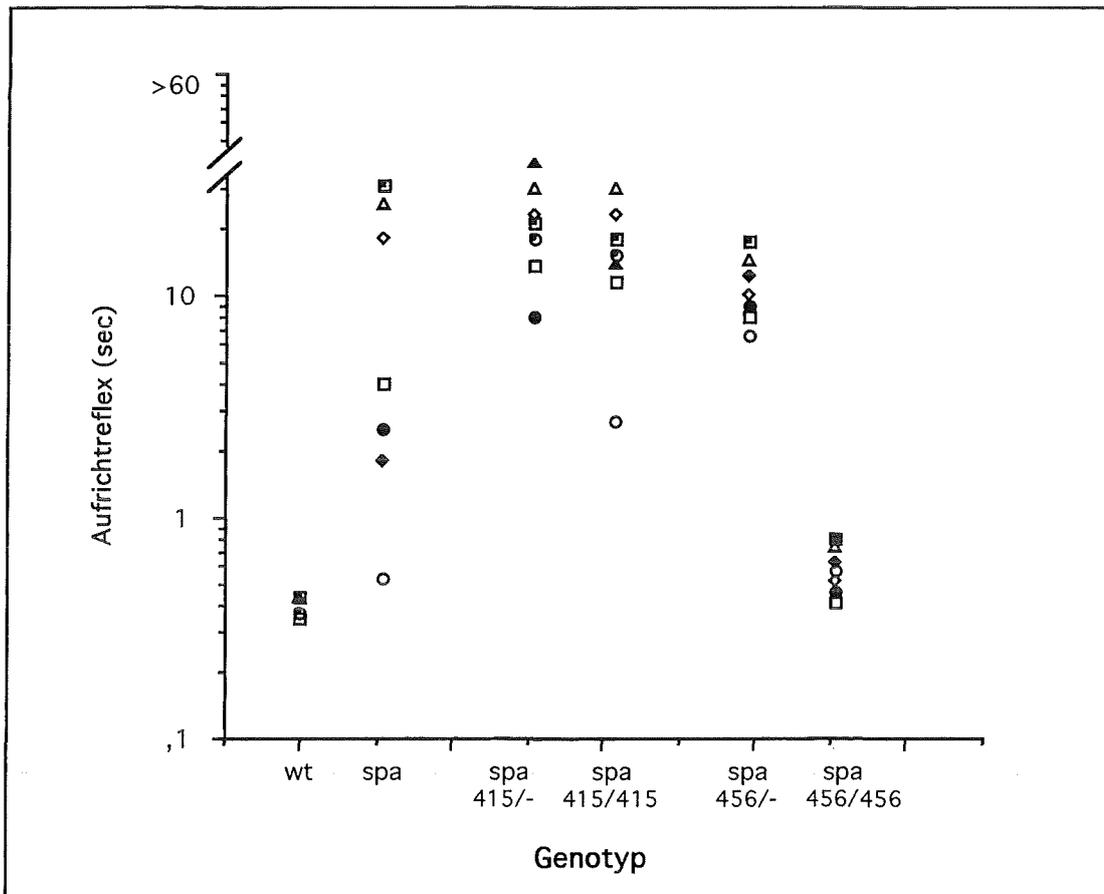


Abb.20 Analyse des Aufrichtreflex von homozygoten *spa* Mausmutanten, die das Transgen der Linien 415 bzw. 456 in ihrem Genom tragen

Jeweils sieben Tiere wurden im Alter von 22 Tagen in Rückenlage gebracht und die Zeit gemessen, die die Tiere zum Wiederaufrichten benötigten. Für jede Maus wurden jeweils fünf Messungen durchgeführt. Zum Vergleich wurden die Daten aus früheren Messungen mit Wildtypmäusen (wt) und homozygoten *spa* Mäusen (*spa*) (vgl. Abb.15) mit in das Diagramm aufgenommen. Tiere mit heterozygotem (415/- bzw. 456/-) und homozygoten Transgenlocus (415/415 bzw. 456/456) wurden getrennt aufgeführt. Der Aufrichtreflex der *spa* Mäuse mit homozygotem Transgenlocus der Linie 456 ist deutlich verbessert.

wt = wt/wt

spa = *spa/spa*

In vorangegangenen Versuchen war gezeigt worden, daß sich die einzelnen Transgenloci bezüglich ihrer Transkriptionsrate unterscheiden. So zeigte die Linie 416 eine starke, die Linie 415 eine schwache und die Linie 456 eine intermediäre Transkriptionsrate des Transgens (vgl. Kapitel A.2.2, Abb.9). Dies führt dazu, daß sich im Nervensystem der Transgenträger mit homozygotem *spa* Hintergrund (*spa/spa*^{415/-}, *spa/spa*^{456/-} und *spa/spa*^{416/-}) entsprechende Unterschiede bezüglich der Gesamtmenge an vollständigen β -Transkripten ergeben. Wie bereits gezeigt, besitzen die Tiere mit dem Transgenlocus der Linie 416, verglichen mit der Wildtypmaus (100%), insgesamt 24% funktionelle β -Transkripte (vgl. Kapitel A.3.3.3, Abb.17). Die entsprechende Analyse im Nervensystem der Tiere mit dem Genotyp *spa/spa*^{415/-} ergab dagegen nur einen Wert von etwa 9% und in den Tieren mit dem Genotyp *spa/spa*^{456/-} einen Wert von 13% (Daten nicht gezeigt).

Die Unterschiede im Verhalten der transgenen Mausmutanten, die mit Hilfe der verschiedenen β -Transgenlinien entwickelt wurden, spiegeln demnach die Unterschiede in ihrer β -Transkriptionsrate wider. Dies zeigt, daß die GlyRA-Oberflächenexpression, die Funktion der glyzineren Nervenübertragung und damit Leistungsfähigkeit des motorischen Systems direkt mit der Menge an funktionellen β -Transkripten korreliert. Die Analyse der neuronalen Membranproteine dieser Tiere im *Western Blot* sollte zeigen, inwieweit sie sich in ihrer GlyRA-Oberflächenexpression unterscheiden. Auch sollte überprüft werden, ob sich die, offenbar durch einen Gen-Dosis-Effekt verursachten Verhaltensunterschiede zwischen den $spa/spa^{456/-}$ und den $spa/spa^{456/456}$ -Mäusen in ihrem GlyRA-Gehalt widerspiegeln.

Für diese Analyse (Abb.21) wurden die Membranproteine aus dem Stammhirn der einzelnen transgenen Mausmutanten isoliert und, für die Bestimmung des GlyRA-Gehalts, das α 1-Protein im *Western Blot* mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Mab 4a sichtbar gemacht. Für den quantitativen Vergleich wurden zusätzlich Membranproteine aus dem Stammhirn von *DBA/2-*

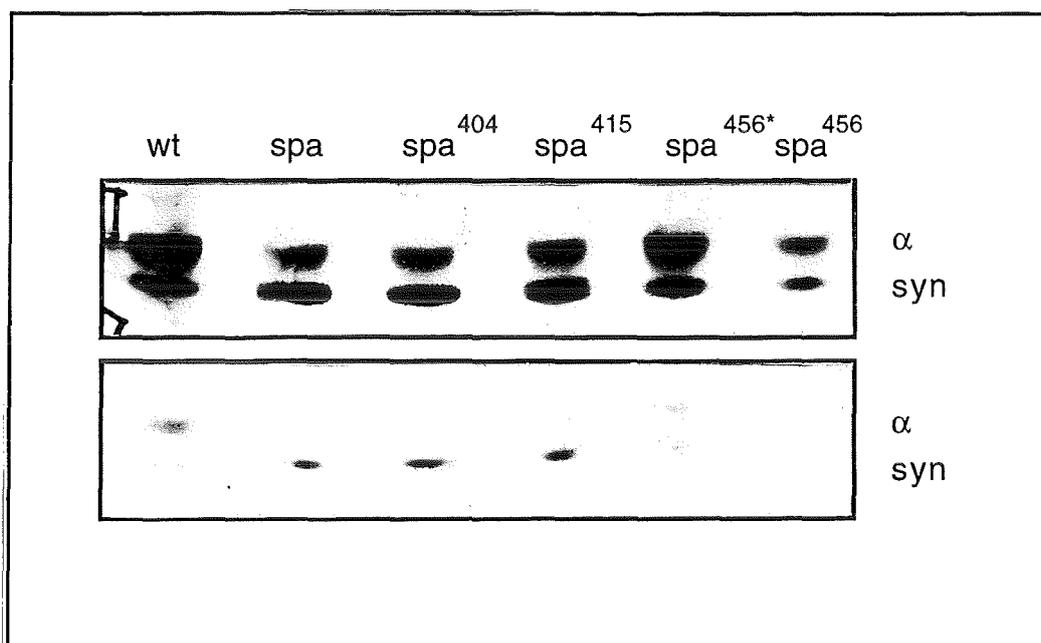


Abb.21 Analyse von membrangebundenem α -Protein im Stammhirn entwickelter Mäuse

Das Stammhirn von adulten *DBA/2*-Wildtypmäusen (wt), homozygoten *spa* Mausmutanten (*spa*) und den β -transgenen spa/spa Mäusen $spa/spa^{404/-}$ (spa^{404}), $spa/spa^{415/-}$ (spa^{415}), $spa/spa^{456/-}$ (spa^{456}) und $spa/spa^{456/456}$ (spa^{456*}) wurden präpariert, die neuronalen Membranproteine isoliert, im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das α -Protein wurde anschließend mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 4a als 48/49 kD-Bande sichtbar gemacht (α). Zur Standardisierung der aufgetragenen Proteinmenge wurde ein, gegen das Vesikelprotein Synaptophysin (38 kD) gerichteter Antikörper eingesetzt (*syn*). Während die Menge an α -Protein in den Mausmutanten spa/spa , $spa^{404/-}$, $spa^{415/-}$ und $spa^{456/-}$ erheblich reduziert ist, kann im Stammhirn der Tiere mit dem Genotyp $spa^{456/456}$ eine Zunahme an membranständigem α -Protein nachgewiesen werden. Zur Veranschaulichung der quantitativen Unterschiede wurde eine lange (oben) und eine kurze (unten) Exposition dargestellt.

Wildtypmäusen und homozygoten *spa* Mäusen ohne Transgenallel eingesetzt. Die *Western Blot* Analyse in Abb.21 zeigt, daß sich die Menge an α -Protein im Nervensystem von Mäusen mit dem Genotyp *spa/spa*^{415/-} bzw. *spa/spa*^{456/-} kaum von der der *spa/spa* Mäuse ohne Transgen unterscheidet. Dagegen konnte bei der Maus mit dem Genotyp *spa/spa*^{456/456} eine quantitative Zunahme an α -Protein auf der Membranoberfläche nachgewiesen werden. Für die Verbesserung des Krankheitsbildes dieser Tiere kann also eine Steigerung des GlyRA-Gehalts durch einen Gen-Dosis-Effekt verantwortlich gemacht werden. Dennoch erreichte der GlyRA-Gehalt in diesen Tieren offensichtlich nicht den Wert der *spa/spa*^{416/-}-Mäuse, worauf die, wenn auch schwach ausgeprägten Krankheitssymptome dieser Tiere hinweisen.

Mit der Entwicklung von transgenen Mausmutanten, die ihr Transgen jeweils unterschiedlich stark exprimieren, konnte gezeigt werden, daß die GlyRA-Oberflächenexpression, gemessen an der Menge an membrangebundenem α -Protein, unmittelbar von der Menge an funktionsfähigen GlyR β -Untereinheiten abhängig ist. Die Verhaltensanalyse der entwickelten Mausmodelle verdeutlichte, daß auch die Manifestierung der *spastischen* Verhaltensmerkmale direkt mit GlyRA-Oberflächenexpression verknüpft ist. Dies zeigte insbesondere die Verbesserung des *spastischen* Krankheitsbildes bei der Maus mit dem Genotyp *spa/spa*^{456/456}, deren Menge an membranständigem α -Protein und damit deren GlyRA-Oberflächenexpression durch einen Gen-Dosis-Effekt erhöht werden konnte. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß sich der komplexe Phänotyp der Mausmutante *spastic* bei einer schrittweisen Erhöhung ihrer β -Expression in seine Komponenten (Tremor, Aufrichtreflex und männliche Infertilität) zerlegen läßt.

B. Genetische Rettung der Mausmutante *spasmodic* (*spd-rescue*)

Die erfolgreiche Substitution der murinen GlyR β -Untereinheit durch die β -Untereinheit der Ratte bei der Komplementation des *spastischen* Phänotyps hatte gezeigt, daß GlyR-Untereinheiten im Nervensystem von Wildtypmäusen und Mausmutanten exprimiert werden können, und daß sie über Speziesbarrieren hinweg wirksam sein können. Eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung eines Mausmodells, mit dessen Hilfe die Pathomechanismen veränderter α 1-Untereinheiten des Menschen *in vivo* erforscht werden können, ist die Funktionsfähigkeit gemischter GlyR-Komplexe aus murinen und humanen GlyR-Untereinheiten, also "humanisierter" Glyzinrezeptoren in der Maus. Um diese Funktionsfähigkeit zu überprüfen, sollte die cDNA für die α 1-Untereinheit des Menschen in einem zum *spa rescue* analogen Experiment in das Genom der Mausmutanten *spasmodic* (*spd*) eingebracht werden, um deren mutanten Phänotyp zu komplementieren. Die Mausmutante *spd* trägt eine Punktmutation im Gen für ihre α 1-Untereinheit. Es gibt Hinweise, daß eine Beteiligung der mutierten α 1-Untereinheit am Glyzinrezeptorkomplex dessen Affinität zu den Agonisten Glyzin, β -Alanin und Taurin reduziert (Ryan et al., 1994; Saul et al., 1994). In der homozygoten *spd* Maus hat die eingeschränkte GlyR-Aktivität einen mutanten Phänotyp zur Folge, der mit dem der *spastischen* Maus vergleichbar ist. So zeigen homozygote *spd* Mäuse zwei bis drei Wochen nach der Geburt einen Tremor, haben Schwierigkeiten beim Erreichen der aufrechten Körperposition, zeigen das *hind feet clasping*, und männliche Tiere sind nicht zeugungsfähig.

Für die genetische Rettung der *spasmodischen* Mausmutante wurden zunächst, mit Hilfe eines Expressionskonstrukts, transgene Mauslinien etabliert, die das Gen für die α 1-Untereinheit des Menschen in ihrem Genom tragen und eine neuronspezifische Überexpression dieser Untereinheit zeigen. Durch Kreuzungsexperimente wurde der Transgenlocus dieser Tiere anschließend in den genetischen Hintergrund der Mausmutanten eingebracht.

1. Das Expressionskonstrukt

Die RNA-Analyse der entwickelten β -transgenen Mauslinien hatte gezeigt, daß der neuronspezifische Enolasepromotor der Ratte die Transkription der GlyR β -cDNA im Nervensystem der Maus vermitteln kann. Das entsprechende Konstrukt zur Expression der humanen GlyR α 1-Untereinheit (p18SN α 1, Abb.22) wurde mir freundlicherweise von Herrn Dr. Hans Weiher (IGen, Forschungszentrum Karlsruhe) zur Verfügung gestellt. In diesem Konstrukt steht die α 1-cDNA des Menschen (Grenningloh et al., 1990b) ebenfalls unter der

Transkriptionskontrolle des NSE-Promotors. Die korrekte mRNA-Prozessierung der cDNA wird durch das angefügte Spleiß- und Polyadenylierungssignal des viralen SV40-*small T-Antigens* (Gorman et al., 1982) gewährleistet.

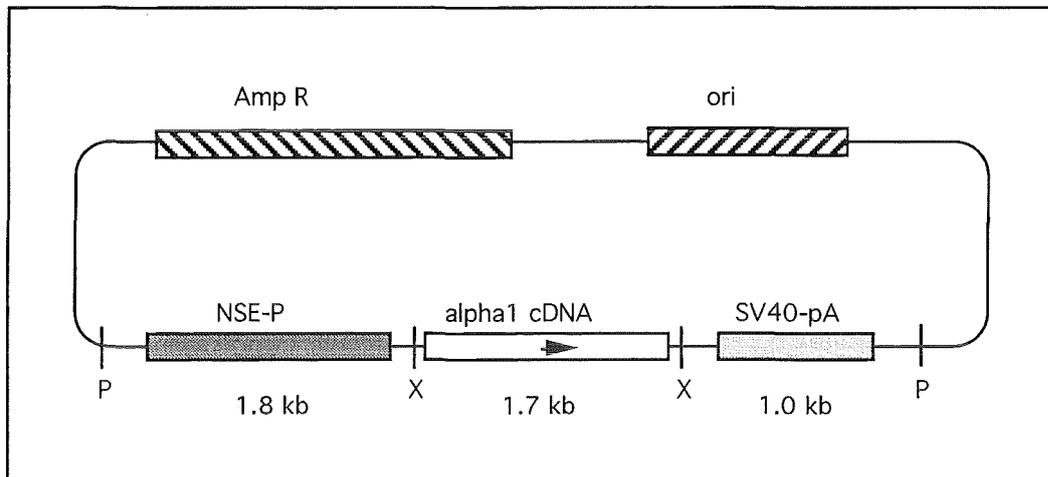


Abb.22 Schematische Darstellung des Plasmids p18SN α 1

Die cDNA der humanen α 1-Untereinheit des GlyRs (α 1-cDNA) steht unter der Kontrolle des neuronspezifischen Enolasepromotors der Ratte (NSE-P). Das Gen besitzt ein nachgeschaltetes Spleiß- und Polyadenylierungssignal des kleinen T-Antigens des SV40-Virus (SV40-pA). Das Transgenkonstrukt von insgesamt 4,5 kb ist in den Plasmidvektor pUC18 eingebunden, der einen eigenen Replikationsursprung (ori) und ein Resistenzgen für das Antibiotikum Ampicillin (Amp R) beisteuert und damit die Vermehrung der Plasmid DNA in *E.coli*-Bakterien erlaubt. Die Orientierung der cDNA ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

X=XbaI, P=PvuII

2. Entwicklung transgener Mauslinien, die das Gen für die humane α 1-Untereinheit überexprimieren

Ein 4,5 kb großes PvuII-Fragment, bestehend aus NSE-Promotor, α 1-cDNA und dem SV40-Spleiß- und Polyadenylierungssignal, wurde zur Herstellung α 1-transgener Mäuse eingesetzt. Die Herstellung dieser Transgenen erfolgte, wie die Herstellung der β -transgenen Mäuse (vgl. auch Kapitel A.2) nach etablierter Methode (Hogan et al., 1986) und wurde von Herrn Dr. Johannes Schenkel (IGen, Forschungszentrum Karlsruhe) durchgeführt. In den Mikroinjektionsexperimenten wurden Eizellen von *DBA/2-C57/bl6*-Hybriden (B6D2F1) eingesetzt.

2.1 Etablierung α 1-transgener Linien

Aus den Mikroinjektionsexperimenten mit dem α 1-Expressionskonstrukt wurden 36 phänotypisch

gesunde Nachkommen geboren. Analog der Entwicklung der β -transgenen Mausstämmen wurden zunächst die *Foundertiere* identifiziert. Um für die nachfolgenden Expressionsanalysen und Kreuzungsexperimente eine ausreichende Zahl an Transgenträgern zur Verfügung zu haben, wurden anschließend einzelne Linien etabliert. Für die Genomanalyse mittels *Southern Blot* Hybridisierung wurde die DNA aus Schwanzbiopsien eingesetzt. Als Sonde diente die vollständige humane $\alpha 1$ -cDNA, die durch Verdau mit dem Restriktionsenzym XbaI aus dem Plasmids p18SN $\alpha 1$ isoliert wurde. Das Autoradiogramm (Abb.23) erlaubte die Identifizierung der *Foundertiere* durch Nachweis der 1.7 kb großen, transgenspezifischen Hybridisierungsbande. Mit dieser Methode wurde eine Integration des $\alpha 1$ -Transgenkonstrukts für fünf (Nr. 13, 17, 43, 44 und 46) der insgesamt 36 direkten Nachkommen der Injektionsexperimente nachgewiesen (vgl. Abb.23).

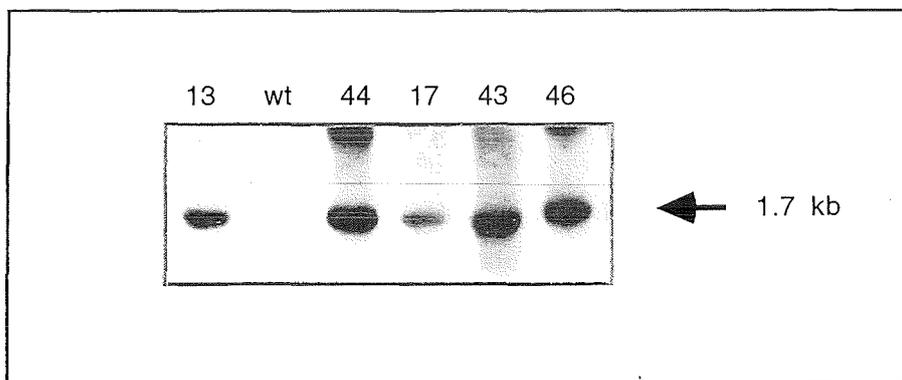


Abb.23 Genotypischen Analyse zur Identifizierung der $\alpha 1$ -Foundertiere

20 μ g der DNA aus Schwanzbiopsien wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt. Als DNA-Donoren dienten die Mäuse mit der Nr.13, 14, 17, 43, 44 und 46. Nach Immobilisieren auf eine Nylonmembran wurde die DNA mit der radioaktiv markierten $\alpha 1$ -cDNA hybridisiert. Die Transgenträger können durch eine 1.7 kb große Hybridisierungsbande, die das transgene cDNA-Fragment repräsentiert, identifiziert werden.

Zur Etablierung von $\alpha 1$ -transgenen Linien wurden die ermittelten Foundertiere anschließend in der Zucht mit Mäusen des *DBA/2*-Stammes eingesetzt. Ein entwickeltes PCR-Analyseverfahren diente der schnellen genotypischen Analyse ihrer Nachkommen. Hierfür wurde ein *sense*-Oligonukleotid (α -3'UTR), das der Sequenz der 3'-nicht-translatierten Region der $\alpha 1$ -cDNA komplementär ist (Position 1685 bis 1703 der humanen $\alpha 1$ -cDNA; Grenningloh et al., 1990b), mit dem bereits für die Analyse der β -Transgenen eingesetzten *antisense*-Oligonukleotid SV40-2 verwendet. Mit Hilfe dieser Oligonukleotidkombination konnte aus der genomischen DNA von Transgenträgern ein transgenspezifisches Produkt von 850 bp amplifiziert werden (Abb.24).

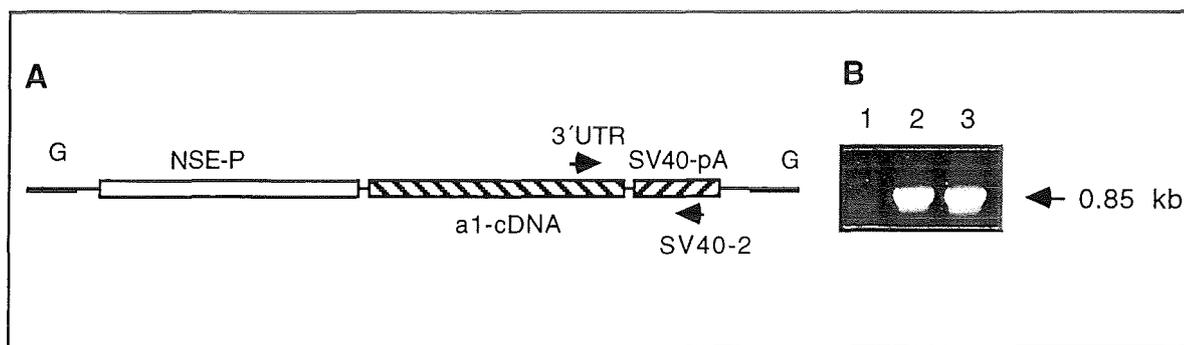


Abb.24 PCR-Analyseverfahren zur Überprüfung des Genotyps der $\alpha 1$ -Transgenen und ihrer Nachkommen

(A) Schematische Darstellung des in das Genom integrierten Transgenkonstrukts und der Hybridisierungsregionen der verwendeten Startermoleküle α -3'UTR (sense) und SV40-2 (antisense). Von ihnen ausgehend kann mit Hilfe der PCR-Technik ein 0.85 kb großes, für das Transgen spezifisches Fragment synthetisiert und amplifiziert werden.

G = angrenzende Sequenzbereiche des Integrationsortes im Genom der transgenen Maus

NSE-P = neuronspezifischer Enolasepromotor der Ratte

SV40-pA = Spleiß- und Polyadenylierungssignal des SV40-Virus.

Das Foto in (B) zeigt die im Agarosegel aufgetrennten PCR-Reaktionen, die an DNA einer nicht-transgenen und zwei transgenen Mäusen durchgeführt wurden.

Bahn 1 = nicht transgen

Bahn 2 = Transgen # 43

Bahn 3 = Transgen # 44

Zur Entwicklung von Tieren mit zwei Transgenallelen wurden die ermittelten Transgenträger einer Linie untereinander verpaart. Die DNA der Tiere aus den folgenden Generationen wurden analog der genotypischen Analyse der β -Transgenen (vgl. Abb.7) mit Hilfe der *Slot Blot* Technik auf Homozygotie bezüglich des Transgenlocus untersucht (Daten nicht gezeigt). Als Sonde zur Bestimmung der Zahl an Transgenallelen diente die bereits im Southern Blot eingesetzte $\alpha 1$ -cDNA-Insertion des Plasmids p18SN $\alpha 1$. Als Referenzsonde zur Quantifizierung der aufgetragenen DNA wurde die GAPDH-cDNA der Ratte verwendet.

Während des Verlaufs dieser Arbeit wurden sämtliche Nachkommen, die aus Brütungen mit $\alpha 1$ -transgenen Mäusen gewonnen wurden, mit der entwickelten PCR-Methode auf Transgenintegration untersucht. Falls erforderlich, wurde für eine Prüfung auf Homozygotie des Transgenlocus zusätzlich die *Slot Blot* Technik eingesetzt.

2.2. Expressionsanalyse der $\alpha 1$ -transgenen Mausstämme

Nach einer ausreichenden Vermehrung der Population $\alpha 1$ -transgener Tiere sollte die Analyse der mRNA aus dem Nervensystem einzelner Individuen aller Linien zeigen, ob der gewählte Promotor auch die neuronspezifische Transkription der humanen $\alpha 1$ -cDNA vermittelt. Anschließend wurde für einzelne Mitglieder der Linien, für die transgene Transkripte nachgewiesen werden konnten, überprüft, ob auch transgenes Protein auf der Membranoberfläche ihrer Neuronen erscheint.

2.2.1 RNA-Analyse

Die Analyse der β -transgenen Linien hatte gezeigt, daß der NSE-Promotor zwar prinzipiell die Transkription der transgenen cDNA vermitteln kann, daß jedoch die genomische Integration des Expressionskonstrukts allein nicht zwingend zu dessen Transkription führt. Daher wurde die RNA aus dem Nervensystem dieser Mäuse auf transgene $\alpha 1$ -Transkripte hin untersucht, für die eine Größe von 2.5 kb erwartet wurde. Um die Transkriptionsrate des NSE-Promotors im Transgenlocus der einzelnen Linien zu bestimmen, wurde Gesamt-RNA aus dem ZNS von Nachkommen der transgenen Linien isoliert und mittels der *Northern Blot* Analyse (Abb.25) untersucht. Als Negativkontrolle diente die RNA einer *DBA/2*-Wildtypmaus. Als Hybridisierungssonde fand erneut die cDNA-Insertion des Plasmids p18SN $\alpha 1$ Anwendung. Zur Quantifizierung der aufgetragenen mRNA-Menge wurde die Membran mit der GAPDH-cDNA der Ratte (Fort et al., 1985) hybridisiert.

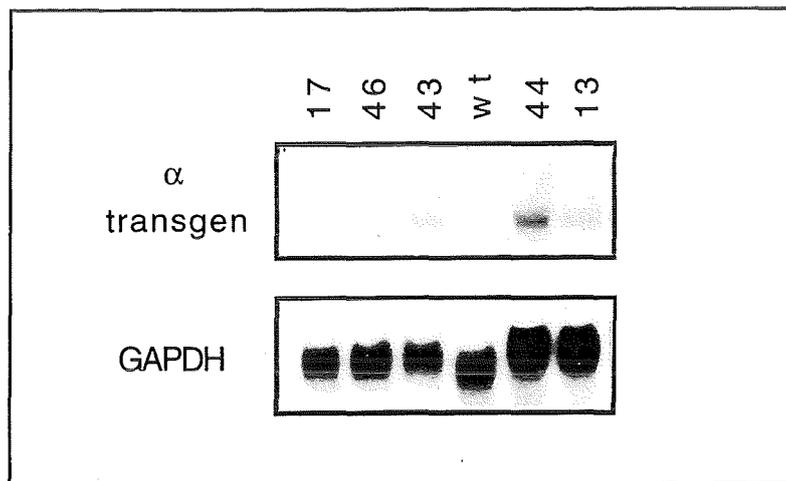


Abb.25 Transkriptionsrate des Transgens im Nervensystem der ermittelten Transgenlinien

Nach Isolierung der Gesamt-RNA aus dem ZNS von Mäuse der Transgenlinien (13, 17 43, 44 und 46) wurden je 15 μ g gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Nach der Hybridisierung mit der radioaktiv markierten $\alpha 1$ -cDNA folgte eine Kontrollhybridisierung mit der GAPDH-cDNA der Ratte. RNA aus einer nicht transgenen Wildtypmaus (wt) diente als Kontrolle. Für die Linien 13, 43 und 44 konnten transgenspezifische Transkripte von 2.5 kb nachgewiesen werden. Die Linien 17 und 46 zeigen keine Transgentranskription.

Das Autoradiogramm wurde "gescannt", um mittels der Schwärzung der spezifischen Hybridisierungsbanden die Menge an $\alpha 1$ -Transkripten transgenem Ursprungs zu bestimmen. Der für die Linie 44 erhaltene Wert wurde als 100% festgesetzt. Die Linien 17 bzw. 46 wurden aufgrund fehlender Transgentranskription nicht mit in die Tabelle aufgenommen:

	Linie 43	Linie 44	Linie 13
relative Transkriptionsrate	74%	100%	37%

Mit Hilfe der beschriebenen *Northern Blot* Analyse (Abb.25) konnten für drei (Linie 13, 43 und 44) der fünf untersuchten Transgenlinien transgene Transkripte nachgewiesen werden. Die Linien 17 und 46 zeigen keine transgene Transkription.

2.2.2 Analyse des transgenen $\alpha 1$ -Proteins

Die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß das $\alpha 1$ -Expressionskonstrukt im Nervensystem in den Linien 13, 43 und 44, erfolgreich transkribiert wird. Eine hohe Transkriptionsrate allein garantiert jedoch nicht dafür, daß die Transkripte auch ebenso effektiv translatiert und die dabei synthetisierten Proteine mit hoher Effizienz an die Membranoberfläche geschleust werden. Daher wurden die Linien 13, 43 und 44, für die eine transgene Transkription nachgewiesen worden war, einer *Western Blot* Analyse unterzogen. Hierbei sollte geprüft werden, ob transgenes $\alpha 1$ -Protein in neuronalen Membranfraktionen nachzuweisen ist.

Im Rückenmark und Hirnstamm adulter Nager wird das endogene $\alpha 1$ -Protein in großem Umfang gebildet, im Großhirn dagegen kann es nur in verschwindend geringen Mengen identifiziert werden (Malosio et al., 1991a). Um dieses Protein im Hirnstamm der Maus nachweisen zu können, findet der monoklonale Antikörper Mab 4a Einsatz, der die GlyR-Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ spezifisch erkennen kann (Pfeiffer et al., 1984; Schröder et al., 1991). Da die Aminosäuresequenz des humanen $\alpha 1$ -Proteins zu 99% mit der Aminosäuresequenz des murinen $\alpha 1$ -Proteins übereinstimmt (Ryan et al., 1994), werden beide $\alpha 1$ -Untereinheiten von diesem Antikörper erkannt. Da sich diese beiden $\alpha 1$ -Untereinheiten in ihrer Größe (48 kD) voneinander nicht unterscheiden, ist eine qualitative Identifizierung transgener $\alpha 1$ -Untereinheiten in Rückenmark und Hirnstamm nicht möglich. Der NSE-Promotor, der die Transkription der transgenen $\alpha 1$ -cDNA kontrolliert, vermittelt jedoch eine Transgenexpression im gesamten Nervensystem (Forss-Petter et al., 1990) und damit auch im Großhirn, wo die endogene $\alpha 1$ -Untereinheit nicht vertreten ist. Gelingt also ein Nachweis von α -Protein in diesem Gewebe, so läßt dies darauf schließen, daß es sich allein um Transgenprodukte handelt. Da der NSE-Promotor die Transgenexpression in Rückenmark und Stammhirn vermittelt (Forss-Petter et al., 1990), sollten diese in den transgenen Tieren auch auf den Neuronen dieser Gewebe erscheinen.

Für eine solche Analyse wurde Großhirn und Hirnstamm von transgenen und Wildtypmäusen präpariert und die Membranproteine isoliert. Das isolierte α -Protein wurde anschließend mit dem monoklonalen Antikörper Mab 4a sichtbar gemacht (Abb.26). Da dieser Antikörper ebenfalls die $\alpha 2$ -Untereinheit erkennt, waren für dieses Experiment Tiere ausgewählt worden, die das Alter von vier Wochen bereits überschritten hatten. In diesem Alter werden im Nager keine signifikanten Mengen an $\alpha 2$ -Untereinheiten gebildet (Becker et al., 1988). Zur Standardisierung der aufgetragenen Proteinmengen wurde der, gegen das Vesikelprotein Synaptophysin gerichtete, monoklonale Antikörper Sy38 eingesetzt. Wie Abb.26 zeigt, konnte mit dieser Methode das Transgenprodukt im Großhirn aller drei Transgenlinien nachgewiesen werden, wenn auch die Zunahme an α -Protein im Großhirn der Maus der Linie 13 verhältnismäßig gering ist. Da im Großhirn der Kontrollmaus erwartungsgemäß nur wenig α -Protein sichtbar gemacht werden

konnte, kann man insgesamt schlußfolgern, daß die erhöhte Menge an α -Untereinheiten im Großhirn der transgenen Tiere allein aus der Expression des Transgenkonstrukts resultiert. Da das endogene Protein hierbei jedoch nicht vom Transgenprodukt zu unterscheiden ist und da im Stammhirn aller Tiere stets eine große Menge an endogenen α 1-Untereinheiten vorhanden ist, konnte hier eine quantitative Veränderung in diesen Geweben nicht nachgewiesen werden.

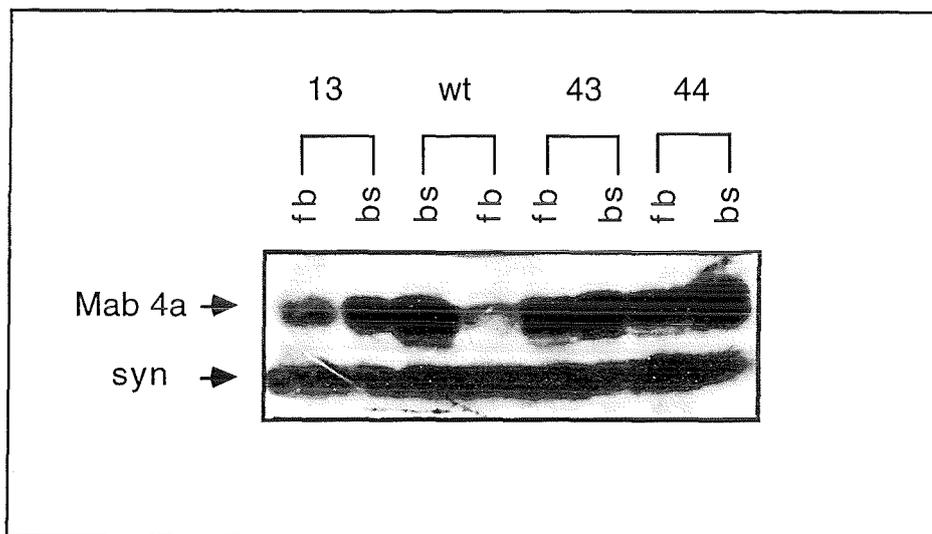


Abb.26 Analyse des transgenen α -Proteins in α -transgenen Mäusen

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Membranproteine des Großhirns (fb) und Stammhirns (bs) aus α 1-transgenen Mäusen (13, 43, 44) und Wildtypmäusen (wt) wurden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit dem Antikörper Mab 4a inkubiert. Zur Standardisierung der aufgetragenen Menge an Membranprotein wurde ein, gegen Synaptophysin (38 kD) gerichteter Antikörper eingesetzt (syn). Im Stammhirn aller Individuen kann endogenes α -Protein, im Großhirn der Mitglieder der Linie 13, 43 und 44 transgenes Protein nachgewiesen werden.

Der ektopische Nachweis zeigte, daß die gebildeten transgenen Transkripte im Großhirn in α 1-Untereinheiten übersetzt werden und dort in der Membranfraktion erscheinen. Da die transgenen Transkripte, vermittelt durch den NSE-Promotor, auch im Hirnstamm und Rückenmark gebildet werden, kann davon ausgegangen werden, daß die Transgenprodukte dort auch in den Membranfraktionen erscheinen. Es wurde gezeigt, daß α 1-Untereinheiten *in vivo* nur dann auf der neuronalen Membranoberfläche erscheinen, wenn sie durch eine Komplexierung an β -Untereinheiten stabilisiert werden (vgl. Teil I.A der vorliegenden Arbeit). Daher ist zu vermuten, daß sich die transgenen α 1-Untereinheiten mit endogenem GlyR β -Protein zu heterogenen Rezeptorkomplexen verbinden können. Die Anwesenheit dieser Komplexe im Nervensystem der transgenen Tiere hatte, soweit phänotypisch erkennbar, keine Auswirkungen auf ihren Organismus.

3. Einbringen der Transgenallele der $\alpha 1$ -Transgenlinien in die Mausmutante *spasmodic*

Daß sich das humane α -Transgenprodukt tatsächlich an der Bildung funktioneller GlyR-Komplexe beteiligen kann, sollte in Kreuzungsexperimenten mit den Mausmutanten *spd* überprüft werden. Eine erfolgreiche Substitution der in der Mausmutante defekten $\alpha 1$ -Untereinheit durch die humane $\alpha 1$ -Untereinheit wäre ein Beweis dafür, daß die *in vitro* funktionellen GlyR-Komplexe aus murinen und humanen Untereinheiten (Schmieden et al., 1989; Sontheimer et al., 1989) *in vivo* wirksam sind. Die Funktionsfähigkeit solcher "humanisierten" GlyR-Komplexe im murinen Nervensystem wäre die Voraussetzung für die Entwicklung eines Mausmodells, mit dessen Hilfe man durch Einbringen transgener Konstrukte, die für die mutierten Untereinheiten der Hyperekplexiepatienten kodieren, den Einfluß der STHE-Mutation auf die Funktion des glyzinerigen Systems *in vivo* studieren kann.

3.1 Das Kreuzungsschema und die Verfahren zur genotypischen Analyse der Brütungsnachkommen

Für das Einbringen der Transgenkopien in den genetischen Hintergrund der Mausmutanten wurden, analog zum *spa-rescue* Experiment, Kreuzungsversuche mit *spd* Mausmutanten und den transgenen Linien, für die eine hohe Transgenexpression nachgewiesen war, durchgeführt. Um die Genotypen der Nachkommen bezüglich ihres *spd* Locus charakterisieren zu können, wurde zunächst ein PCR-Analyseverfahren entwickelt, mit dem es möglich war, die Punktmutation (G238T) im $\alpha 1$ -Gen der *spd* Maus zu identifizieren. Hierzu wurden als 3'-Startermoleküle (antisense) zwei Oligonukleotide (*spd-sp*d und *spd-wt*) verwendet, die zum betroffenen Bereich des dritten Exons der $\alpha 1$ -cDNA (Position 238 bis 252; Ryan et al., 1994; Saul et al., 1994) komplementär sind (Abb.27). Das Oligonukleotid *spd-wt* besitzt ein Cytosin an seinem 5'-Ende. Damit erlaubt sein Einsatz nur die Amplifikation des Wildtypallels. Das entsprechende Nukleotid im Oligonukleotid *spd-sp*d dagegen ist ein Adenin, das dem für die Punktmutation im dritten Exon des *spd* Locus spezifischen Thymin komplementär ist. Somit ist mit dem Oligonukleotid *spd-sp*d allein die Amplifikation des *spd* Allels möglich. Als gemeinsames 5'-Startermolekül (sense) wurde ein Oligonukleotid ($\alpha 1$ -Intron2) gewählt, das zu einem Sequenzbereich im zweiten Intron des Gens für die GlyR $\alpha 1$ -Untereinheit der Maus komplementär ist. Dieser Sequenzbereich liegt 125 Basenpaare vor dem 5'-Ende des dritten Exons (Saul et al., 1994). Mit Hilfe dieser spezifischen Oligonukleotide wurden PCR-Reaktionen mit der DNA von heterozygoten *spd* Mäusen der Firma "Jackson Laboratories", von homozygoten *spd* Tieren aus Zuchtkreuzungen und von *DBA/2*-Wildtypmäusen durchgeführt. Die homozygoten Tiere wurden dabei anhand ihres mutanten Phänotyps, der dem Phänotyp der *spastischen* Mausmutanten entspricht, ermittelt. Wie Abb.27

zeigt, konnte mit der für den *spd* Locus spezifischen Oligonukleotidkombination ein 193 bp großes Amplifikationsprodukt erwartungsgemäß nur beim homozygoten und heterozygoten Tier nachgewiesen werden. Die Oligonukleotidkombination, die für den Wildtyplocus spezifisch ist, ermöglichte nur bei *DBA/2*-Wildtyp- und heterozygoten *spd* Mäusen eine Amplifikation des 193 bp Fragments.

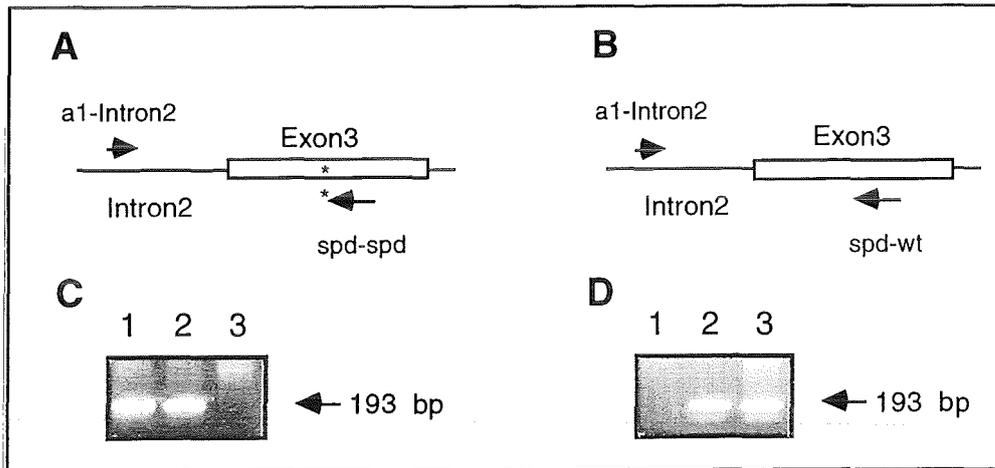


Abb.27 PCR-Analyse des *spd* Locus

Schematische Darstellung des *spd* Locus (A) und des Wildtyplocus (B). Die verwendeten Oligonukleotide sind durch einen Pfeil dargestellt.

(A) Mit den Oligonukleotiden a1-Intron2 (sense) und *spd-sp* (antisense) ist eine Amplifikation des mutierten Locus möglich. Die mutierte Base im *spd* Locus ist mit einem * gekennzeichnet.

(B) Die Oligonukleotide a1-Intron2 (sense) und *spd-wt* (antisense) dienen als Startermoleküle für eine Amplifikation des Wildtyplocus.

(C) zeigt die im Agarosegel aufgetrennten PCR-Reaktionen, die mit den Oligonukleotiden a1-Intron2 und *spd-sp* mit der DNA einer homozygoten (*spd/spd*), einer heterozygoten (*spd/wt*) *spd* Maus und einer *DBA/2*-Wildtypmaus (*wt/wt*) durchgeführt wurden. Bei (*spd/spd*) und (*spd/wt*) konnte ein Fragment von 193 Basenpaaren amplifiziert werden.

Bahn 1 = *spd/spd*

Bahn 2 = *spd/wt*

Bahn 3 = *wt/wt*

(D) zeigt die elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Reaktionen, die mit den Oligonukleotiden a1-Intron2 und *spd-wt* mit der DNA einer homozygoten (*spd/spd*), einer heterozygoten *spd* Maus (*spd/wt*) und einer *DBA/2*-Wildtypmaus (*wt/wt*) durchgeführt wurden. Bei Verwendung von (*spd/wt*) und (*wt/wt*) kann ein Fragment von 193 Basenpaaren amplifiziert werden.

Bahn 1 = *spd/spd*

Bahn 2 = *spd/wt*

Bahn 3 = *wt/wt*

Nach der Entwicklung des Analyseverfahrens für die Charakterisierung der Nachkommen wurden die transgenen Tiere im Kreuzungsversuch mit *spd* Mausmutanten eingesetzt. Das hierbei verwendete Kreuzungsschema ist in Abb.28 dargestellt.

Analog dem *spa rescue* Experiment wurden zunächst weibliche *spd* homozygote Tiere mit transgtragenden Männchen gebrütet, da *spd/spd* Männchen, wie homozygote *spa* Männchen, nicht zur Zeugung von Nachkommen befähigt sind. In der Parentalgeneration (P) wurden, wenn

möglich, homozygote Transgenträger eingesetzt. Die Nachkommen dieser Verpaarung (F1-Generation) sind, nach Mendel, per Definition sowohl für den *spd* Locus als auch für den Transgenlocus heterozygot. Die F1-Tiere wurden anschließend untereinander verpaart. Die DNA aus Schwanzbiopsien der Mitglieder der F2-Generation wurden mittels transgenspezifischer PCR-Analyse (vgl. Kapitel B.2.2) auf Transgenintegration hin untersucht. Das in Kapitel B.3.1 beschriebene PCR-Verfahren diente der Bestimmung ihres Genotyps bezüglich des *spd* Allels.

P		<i>spd/spd</i> ^{-/-}	x	<i>wt/wt</i> <i>tg/tg</i>
F1		<i>spd/wt</i> <i>tg/-</i>	x	<i>spd/wt</i> <i>tg/-</i>
F2		<i>wt/wt</i> ^{-/-}		<i>spd/spd</i> ^{-/-}
		<i>wt/wt</i> <i>tg/-</i>		<i>spd/spd</i> <i>tg/-</i>
		<i>wt/wt</i> <i>tg/tg</i>		<i>spd/spd</i> <i>tg/tg</i>
		<i>spd/wt</i> ^{-/-}		
		<i>spd/wt</i> <i>tg/-</i>		
		<i>spd/wt</i> <i>tg/tg</i>		

Abb.28 Kreuzungsschema zur Komplementation des *spasmodischen* Phänotyps

spd bzw. *wt* beschreibt den α 1-Locus auf Chromosom 11. Dabei bezeichnet "*spd*" ein mutiertes, "*wt*" ein gesundes Allel. Die hochgestellten Zeichen geben über den Transgenlocus Auskunft. Dabei gilt: ^{-/-} = kein Transgenallel, *tg/-* = heterozygoter Transgenlocus, *tg/tg* = homozygoter Transgenlocus. Die Generationsbezeichnungen sind auf der linken Seite aufgeführt.

Zunächst werden homozygote *spd* Mäuse mit homozygoten Transgenträgern verpaart und ihre Nachkommen (F1) untereinander gekreuzt. Für die F2-Tiere sind alle Genkombinationen, die möglich sind, aufgeführt. Die für den Rettungsversuch erforderlichen Nachkommen sind fettgedruckt dargestellt.

3.2 Entwicklung homozygoter *spd* Mäuse, die das Transgen der Linie 44 in ihrem Genom tragen

Bei den Kreuzungsexperimenten mit der Transgenlinie 44 wurde für die Parentalgeneration zunächst die männliche Maus Nr. 421, die Homozygotie bezüglich des Transgenlocus aufwies, mit einer weiblichen *spd/spd* Maus gekreuzt. Aus der Verpaarung ihrer Nachkommen entstanden 243 F2-Tiere (vgl. Tab.3), deren Transgen- und α 1-Locus mittels PCR-Verfahren analysiert wurde (Abb.29).

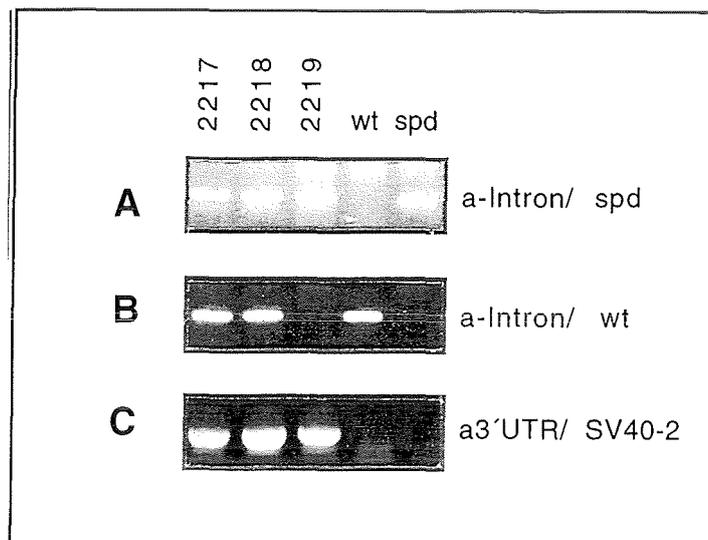


Abb.29 Genotypische Analyse (Auszug) der Mitglieder aus der Nachkommenschaft der Kreuzung $spd/wt^{44/-}$ x $spd/wt^{44/-}$ mittels PCR-Technik

20 Tage nach ihrer Geburt wurde die DNA aus Schwanzbiopsien der Mäuse Nr.2217, 2218 und 2219 isoliert und in der PCR-Analyse eingesetzt. Als Kontrollen diente DNA bereits getesteter, nicht-transgener Tiere mit zwei gesunden $\alpha 1$ -Allelen (wt) bzw. zwei mutierten $\alpha 1$ -Allelen (spd).

(A) Gelelektrophoretisch aufgetrennte PCR-Reaktionen, die mit Hilfe der Oligonukleotide a-Intron2 und spd-spd durchgeführt wurden. Bei Tieren, die mindestens ein mutiertes $\alpha 1$ -Allel tragen, kann ein Amplifikationsprodukt von 193 bp nachgewiesen werden.

(B) Gelelektrophoretisch aufgetrennte PCR-Reaktionen, die mit Hilfe der Oligonukleotide a-Intron2 und spd-wt durchgeführt wurden. Bei Tieren, die mindestens ein gesundes $\alpha 1$ -Allel tragen, kann ein Amplifikationsprodukt von 193 bp nachgewiesen werden.

(C) zeigt die PCR-Reaktionen, die zur Ermittlung der Transgenträger durchgeführt wurden. Als Startermoleküle dienten hierbei die Oligonukleotide $\alpha 3$ 'UTR und SV40-2. Die Transgenträger können durch 0.85 kb großes Amplifikationsprodukt identifiziert werden.

Die PCR-Analyse ergab: Die Mäuse mit der Nr. 2217 und 2218 sind heterozygot bzgl. des *spd*-Allels und transgen (spd/wt^{44}). Die Maus mit der Nr. 2219 ist homozygot bzgl. des *spd*-Allels und ebenfalls transgen (spd/spd^{44}).

Wie Tab.3 zeigt, wurde trotz zahlreicher F2-Nachkommen nur ein Tier mit dem gewünschten Genotyp spd/spd^{44} erhalten. Es liegt also in der Transgenlinie 44 offensichtlich eine Kopplung von Transgenallel und $\alpha 1$ -Wildtypallel vor. Diese ist sehr wahrscheinlich auf die Integration des Transgenlocus in der Nähe des $\alpha 1$ -Locus auf dem Chromosom 11 der Maus zurückzuführen.

Das einzige Tier dem Genotyp spd/spd^{44} (Nr.2219) manifestierte drei Wochen nach seiner Geburt den für *spd* typischen Phänotyp. Da es jedoch drei Tage nach der Manifestierung der Bewegungsstörungen starb, konnte keine detaillierte Verhaltensanalyse dieses Genotyps durchgeführt werden.

Genotyp	Anzahl der F2 Tiere	Anzahl der Tiere mit mit mutantern Phänotyp
<i>wt/wt</i>	7	0
<i>wt/wt^{tg}</i>	50	0
<i>spd/wt</i>	8	0
<i>spd/wt^{tg}</i>	134	0
<i>spd/spd</i>	43	43
<i>spd/spd^{tg}</i>	1	1
total	243	44

Tab.3 Anzahl und Genotypen der Nachkommen aus der Verpaarung der F1-Generation (*spd/wt^{44/-}* x *spd/wt^{44/-}*)

Nachkommen mit dem genetischen Hintergrund einer Wildtypmaus wurden mit "wt/wt" gekennzeichnet, solche mit einem *spd* Allel durch ein "spd/wt" und homozygote *spd* Nachkommen durch ein "spd/spd". Transgenträger sind durch ein "tg" gekennzeichnet.

3.3 Entwicklung homozygoter *spd* Mäuse, die das Transgen der Linie 43 in ihrem Genom tragen

Parallel zum Kreuzungsexperiment mit der Linie 44 wurde zur Komplementation des *spd* Phänotyps die Transgenlinie 43 eingesetzt. Die Kreuzungen wurden analog dem in Abb.28 dargestellten Schema durchgeführt. Nach Verpaarung eines *spd/spd* Weibchens mit einem homozygoten Transgenträger männlichen Geschlechts wurden deren Nachkommen (F1) untereinander weitergezüchtet. Aus diesen Verpaarungen entstanden 24 F2-Tiere (vgl. Tab.4), deren Transgen- und *spd*-Locus mittels der etablierten PCR-Verfahren analysiert wurde (Abb.30). Insgesamt zeigte die genotypische Analyse, daß sich unter den Mitgliedern der F2-Generation neun Tiere befanden, die homozygot für den *spd* Locus waren und gleichzeitig mindestens ein α 1-Transgenallel trugen (Tab.4). Bei diesen Tieren konnte keine Verbesserung bezüglich des mutanten Phänotyps festgestellt werden. So prägten sie, ebenso wie ihre nicht-transgenen Geschwister, zwei bis drei Wochen nach ihrer Geburt die für *spd* typischen Verhaltensmerkmale aus.

Die *Slot Blot* Analyse zeigte, daß unter diesen neun *spd/spd* Mäusen mit Transgenintegration fünf für den Transgenlocus homozygote Tiere waren (Daten nicht gezeigt). Eine Unterdrückung des mutanten Phänotyps durch Erhöhung der Transgenexpression mittels Gen-Dosis-Effekt konnte im Falle des *spd* Rettungsexperiments damit nicht erreicht werden.

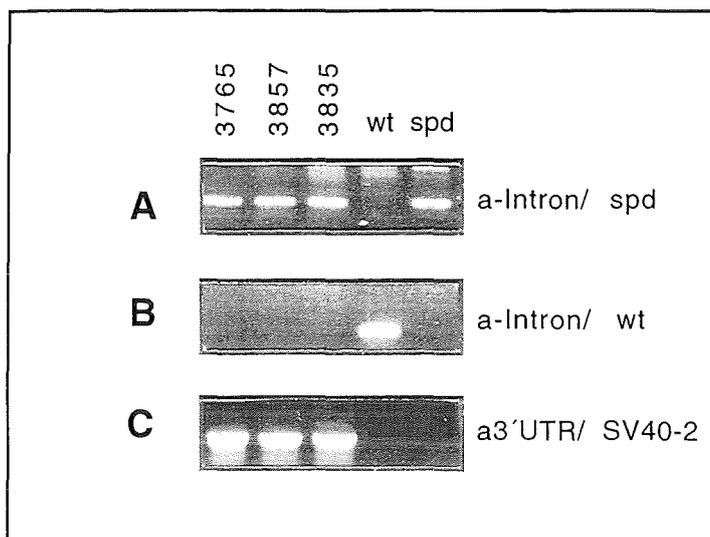


Abb.30 Genotypische Analyse (Auszug) der Mitglieder aus der Nachkommenschaft der Kreuzung $spd/wt^{43/-}$ x $spd/wt^{43/-}$ mittels PCR-Technik

20 Tage nach ihrer Geburt wurde die DNA aus Schwanzbiopsien der Mäuse Nr.3765, 3857 und 3835 isoliert und in der PCR-Analyse eingesetzt. Als Kontrollen diente DNA bereits getesteter nicht-transgener Tiere mit zwei gesunden $\alpha 1$ -Allelen (wt) bzw. zwei mutierten $\alpha 1$ -Allelen (spd).

(A) Gelelektrophoretisch aufgetrennte PCR-Reaktionen, die mit Hilfe der Oligonukleotide a-Intron2 und spd-spd durchgeführt wurden. Bei Tieren, die mindestens ein mutiertes $\alpha 1$ -Allel tragen, kann ein Amplifikationsprodukt von 193 bp nachgewiesen werden.

(B) Gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Reaktionen, die mit Hilfe der Oligonukleotide a-Intron2 und spd-wt durchgeführt wurden. Bei Tieren, die mindestens ein gesundes $\alpha 1$ -Allel tragen, kann ein Amplifikationsprodukt von 193 bp nachgewiesen werden.

(C) zeigt die PCR-Reaktionen, die zur Ermittlung der Transgenträger durchgeführt wurden. Als Startermoleküle dienen hierbei die Oligonukleotide $\alpha 3$ 'UTR und SV40-2. Die Transgenträger können durch ein 0.85 kb großes Amplifikationsprodukt identifiziert werden.

Die PCR-Analyse ergab: Alle analysierten Mäuse sind homozygot bzgl. des *spd*-Allels und tragen mindestens ein Transgenallel (spd/spd^{43}).

Genotyp	Anzahl der F2 Tiere	Anzahl der Tiere mit mutantem Phänotyp
<i>wt/wt</i>	1	0
<i>wt/wt</i> tg	1	0
<i>spd/wt</i>	4	0
<i>spd/wt</i> tg	8	0
<i>spd/spd</i>	2	2
<i>spd/spd</i> tg	9	9
total	25	11

Tab.4 Anzahl und Genotypen der Nachkommen aus der Verpaarung der F1-Generation ($spd/wt^{43/-}$ x $spd/wt^{43/-}$)

Nachkommen mit dem genetischen Hintergrund einer Wildtypmaus wurden mit "wt/wt" gekennzeichnet, solche mit einem *spd* Allel durch ein "spd/wt" und homozygote *spd* Nachkommen durch ein "spd/spd". Transgene Tiere sind durch ein "tg" gekennzeichnet. Alle Tiere mit homozygoten *spd* Locus entwickelten einen mutanten Phänotyp.

In den vorangegangenen Versuchen war gezeigt worden, daß die Manifestierung des *spasmodischen* Phänotyps durch Einbringen der Transgenallele der Linie 44 bzw. 43 nicht unterdrückt werden kann. Jedoch blieb bis zu diesem Zeitpunkt ungeklärt, was die Ursachen für den Ausgang dieses Experiments waren. Eine Voraussetzung für das Gelingen des Rettungsexperimentes war es, daß das Transgenprodukt in sehr hoher Konzentration in den Zielgeweben wie Rückenmark und Stammhirn erscheint. Bisher ist unklar, wieviel funktionelles Protein benötigt wird, um die defekte *spd* Untereinheit aus dem Rezeptorkomplex zu verdrängen. Geht man jedoch davon aus, daß für eine Unterdrückung des Phänotyps, wie für phänotypisch gesunde Tiere mit heterozygoten *spd* Locus angenommen, 50% der vorhandenen α 1-Untereinheiten funktionsfähig sein müssen, so muß das Transgenallel im homozygoten Tier ebenso stark exprimiert werden wie beide mutierten α 1-Allele.

Die durchgeführte Analyse des transgenen Proteins im *Western Blot* erlaubte lediglich den ektopischen Nachweis membranständiger α 1-Untereinheiten im Großhirn. Es konnte daher nicht geklärt werden, ob das transgene α 1-Protein die Membranoberfläche der neuronalen Zellen tatsächlich erreicht und ob es in den eigentlichen Zielgeweben, dem Rückenmark und Stammhirn exprimiert wird. Ist dies der Fall, so blieben dennoch die Fragen offen, ob die transgene Untereinheit auch die erforderlichen funktionellen und pharmakologischen Eigenschaften einer gesunden Untereinheit besitzt, und ob das humane α 1-Protein trotz seiner hohen (99%) Sequenzidentität zur murinen α 1-Untereinheit dieses überhaupt ersetzen kann.

4. Einbringen der Transgenallele der α 1-Transgenlinie 43 in die Mausmutante *spd^{ot}* (*spd^{ot} rescue*)

Eine Möglichkeit, die Fragen über die biologische Wirksamkeit der transgenen α 1-Untereinheit zu beantworten, bietet die Mausmutante *oscillator*. Die *ot* Maus trägt, wie *spd* Mutante eine Mutation im Gen für ihre α 1-Untereinheit. Jedoch führt hier eine Mutation im achten Exon des Gens für die α 1-Untereinheit zum Translationsabbruch. Bei der Mutation handelt es sich um eine Deletion von neun Nukleotiden und eine gleichzeitige Insertion von zwei Nukleotiden. In der homozygoten *ot* Maus hat dieser Defekt den völligen Verlust der α 1-Untereinheit zur Folge (Buckwalter et al., 1994). Aufgrund des damit verbundenen Verlusts der adulten GlyR-Isoform (GlyR_A) manifestieren diese Tiere vierzehn Tage nach der Geburt einen starken Tremor, der in der Regel zwei bis drei Tage später zum Tode führt.

Gelingt es, durch Einbringen der Transgenkopien der α 1-transgenen Linie 43 in den genetischen Hintergrund der homozygoten *ot* Mutante ihren letalen Phänotyp zu komplementieren oder zumindest zu verbessern, so wäre dies der Beweis für die Bildung funktioneller GlyR-Komplexe aus murinen und humanen Untereinheiten *in vivo*. Da die transgene, humane α 1-Untereinheit in

der *ot* Maus nicht wie bei *spd* ein defektes Protein verdrängen, sondern ganz für die fehlende endogene α 1-Untereinheit einspringen muß, bietet die *ot* Maus neben der Möglichkeit, die biologische Wirksamkeit der transgenen α 1-Untereinheit zu überprüfen, zudem die optimale Voraussetzung für die Entwicklung eines Mausmodells mit "humanisiertem" GlyR, das zur direkten Untersuchung humaner Erbkrankheiten herangezogen werden kann.

Die Kreuzungsversuche zur Komplementation des Phänotyps der Mausmutante *oszillator* wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Cord-Michael Becker in Heidelberg (ZMBH) durchgeführt. Dabei sollten zudem die den Kreuzungsversuchen folgenden biochemischen Analysen der transgenen *ot/ot* Tiere von dieser Arbeitsgruppe durchgeführt werden.

4.1 Das Kreuzungsschema und die Verfahren zur genotypischen Analyse der Brütungsnachkommen

Für das *ot*-rescue Experiment wurden analog den Kreuzungsversuchen zur Rettung der *spa* und *spd* Mausmutanten durch Brütungen Mäuse entwickelt, die einerseits homozygot für den *ot* Locus waren und andererseits mindestens ein Transgenallel trugen. Das verwendete Kreuzungsschema ist in Abb.31 dargestellt.

P	<i>ot/ot</i> ^{-/-}	x	<i>wt/wt</i> <i>tg/tg</i>
F1	<i>ot/wt</i> <i>tg/-</i>	x	<i>ot/wt</i> <i>tg/-</i>
F2	<i>wt/wt</i> ^{-/-}	<i>ot/wt</i> ^{-/-}	<i>ot/ot</i> ^{-/-}
	<i>wt/wt</i> <i>tg/-</i>	<i>ot/wt</i> <i>tg/-</i>	<i>ot/ot</i> <i>tg/-</i>
	<i>wt/wt</i> <i>tg/tg</i>	<i>ot/wt</i> <i>tg/tg</i>	<i>ot/ot</i> <i>tg/tg</i>

Abb.31 Kreuzungsschema zur genetischen Rettung der *ot* Mutanten

Die Buchstaben *ot* und *wt* beschreiben den α 1-Locus der Tiere. Dabei bezeichnet "*ot*" ein mutiertes und "*wt*" ein gesundes Allel. Die hochgestellten Zeichen geben über den Transgenlocus Auskunft. Dabei gilt: ^{-/-} = kein Transgenallel, *tg/-* = heterozygoter Transgenlocus, *tg/tg* = homozygoter Transgenlocus. Die Generationsbezeichnungen sind auf der linken Seite aufgeführt.

Zunächst werden heterozygote *ot* Mausmutanten mit homozygoten Transgenträgern verpaart und ihre Nachkommen (F1), die heterozygot für den *ot* Locus waren, unter sich gekreuzt. Für die F2-Tiere sind alle Genkombinationen, die möglich sind, aufgeführt. Die für den Komplementationsversuch erforderlichen Nachkommen sind fettgedruckt dargestellt.

Da homozygote *ot* Mäuse das Zeugungsalter nicht erreichen, wurden in der Parentalgeneration heterozygote Tiere der Firma "Jackson Laboratories" mit einem homozygoten Transgenträger

verpaart. Bei dieser Paarung sind alle Nachkommen transgen, es entstehen neben den gewünschten heterozygoten *ot* Mäusen jedoch auch Mäuse mit Wildtyphintergrund. Um diese voneinander unterscheiden zu können, wurde wiederum ein PCR-Analyseverfahren entwickelt. Dazu wurden die Oligonukleotide Pot1 (Position 1220 bis 1237 der $\alpha 1$ -cDNA der Maus; Ryan et al., 1994) und Pot2 (Position 1350 bis 1327 der $\alpha 1$ -cDNA der Maus; Ryan et al., 1994) verwendet, die den Sequenzbereich in Exon acht der $\alpha 1$ -cDNA der Maus einschließen, in der sich die *ot* Mutation befindet (Buckwalter et al., 1994). Durch Auftrennung der mit ihnen amplifizierten Fragmente in einem Agarosegel ist es möglich, die Deletion im Falle des mutierten $\alpha 1$ -Locus sichtbar zu machen (Abb.32).

Zur Herstellung GlyR $\alpha 1$ -transgener *ot/ot* Mäuse fand allein die Linie 43 Anwendung, da der Einsatz der Linie 44, trotz ihrer hohen Transgenexpression, durch die mögliche Kopplung ihres Transgenlocus an den *spd* Locus und damit auch an den allelischen *spd^{ot}* Locus nicht sinnvoll erschien.

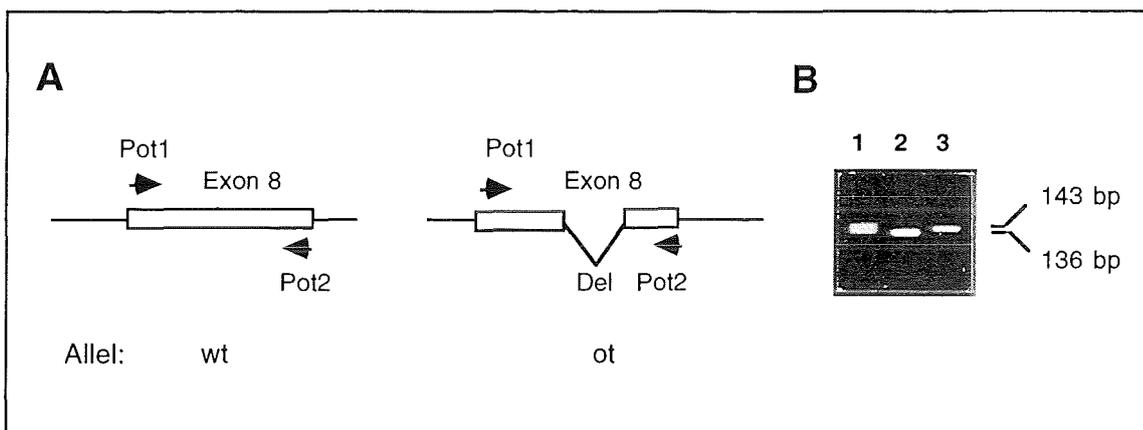


Abb.32 PCR-Analyseverfahren zur Überprüfung des *ot* Locus

In (A) ist schematisch das Prinzip der Amplifikation zum Nachweis der Deletion im *ot* Locus dargestellt. Die Oligonukleotide Pot1 (sense) und Pot2 (antisense) binden an Sequenzen in Exon 8 des $\alpha 1$ -Gens. Im gesunden Locus (wt Allel) kann ein Fragment von 143 bp amplifiziert werden. Im mutierten Locus (*ot* Allel) ist dieses aufgrund der Mutation um 7 Nucleotide (Del) verkürzt.

(B) zeigt die im 2.2% Agarosegel aufgetrennten PCR-Reaktionen, bei denen die Oligonukleotide Pot1 und Pot2 zur Amplifikation des achten Exon des $\alpha 1$ -Gens eingesetzt wurden.

Bahn 1 = *ot/wt*
 Bahn 2 = *ot/ot*
 Bahn 3 = *wt/wt*

4.2 Entwicklung homozygoter *ot* Mäuse, die das Transgen der Linie 43 in ihrem Genom tragen

Zunächst wurden heterozygote *ot* Mäuse mit homozygoten Transgenträgern der Linie 43 verpaart und die DNA der Nachkommen auf die *ot* Deletion hin untersucht. Die F1-Tiere, die neben der

Transgenintegration auch ein *ot* Allel besaßen, wurden untereinander verpaart und ihre Nachkommen genotypisch analysiert (Abb.33).

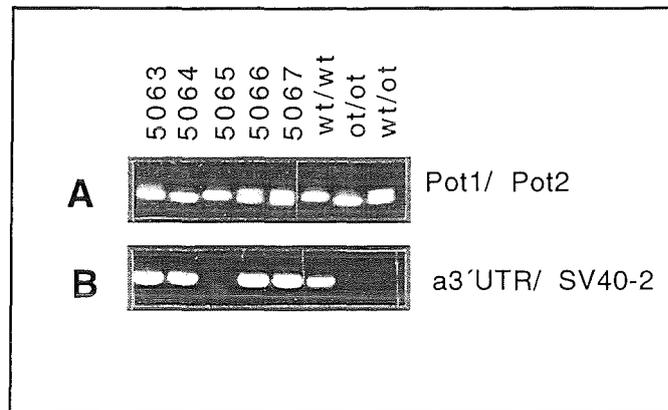


Abb.33 Genotypische Analyse (Auszug) der Mitglieder aus der Nachkommenschaft der Kreuzung $ot/wt^{43/-}$ x $ot/wt^{43/-}$ mittels PCR-Technik

DNA aus Schwanzbiopsien der Mäuse Nr. 5062 bis 5067 wurde isoliert und in der PCR-Analyse eingesetzt. Als Kontrollen diente DNA bereits getesteter Tiere mit zwei gesunden $\alpha 1$ -Allelen (*wt/wt*) und mit einem (*ot/wt*) bzw. zwei (*ot/ot*) mutierten $\alpha 1$ -Allelen. Die DNA des Tieres mit heterozygotem *ot*-Locus diente zusätzlich als Kontrolle für die transgenspezifische PCR.

(A) Gelelektrophoretisch aufgetrennte PCR-Reaktionen, die mit Hilfe der Oligonukleotide Pot1 und Pot2 durchgeführt wurden. Ein *ot* Allel ist anhand eines 136 bp Fragments, ein *wt* Allel anhand eines 143 bp Fragments identifizierbar.

(B) PCR-Reaktionen, die zur Ermittlung der Transgenträger durchgeführt und gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden. Als Startermoleküle dienten hierbei die Oligonukleotide $\alpha 3'$ UTR und SV40-2. Die Transgenträger können durch Nachweis des 0.85 kb großen Amplifikationsprodukts identifiziert werden.

Die Tiere der F2-Population wurden ab der ersten Lebenswoche regelmäßig einer phänotypischen Analyse unterworfen. Im Laufe der zweiten Lebenswoche wurden Schwanzbiopsien zur Isolierung von DNA und Durchführung der genotypischen Analyse entnommen. In der folgenden Auswertung wurden die in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Cord-Michael Becker (Brigitta Saul, ZMBH, Heidelberg) erhaltenen Ergebnisse berücksichtigt.

In der genotypischen Analyse (Abb.33) konnten 41 *ot/ot* Nachkommen mit Transgenlocus identifiziert werden. Der größte Teil dieser Transgenträger (72%) manifestierte die Krankheitssymptome nicht zwischen dem dreizehnten und vierzehnten postnatalen Tag, wie für *ot/ot* Mäuse typisch (*onset*: P13/P14), sondern später (*late onset*: Population; *onset*:: zwischen P15 und P19) (Abb.34A). Bei 62% dieser *late onset* Population waren die ersten Anzeichen für eine Erkrankung an P15, bei 10% an P16, bei 14% an P17 und bei jeweils 7% an P18 bzw. P19 zu erkennen (Abb.34B). Die Intensität des Phänotyps und der Verlauf des Krankheitsbildes war bei den *ot/ot* Mäusen mit und ohne Transgen identisch.

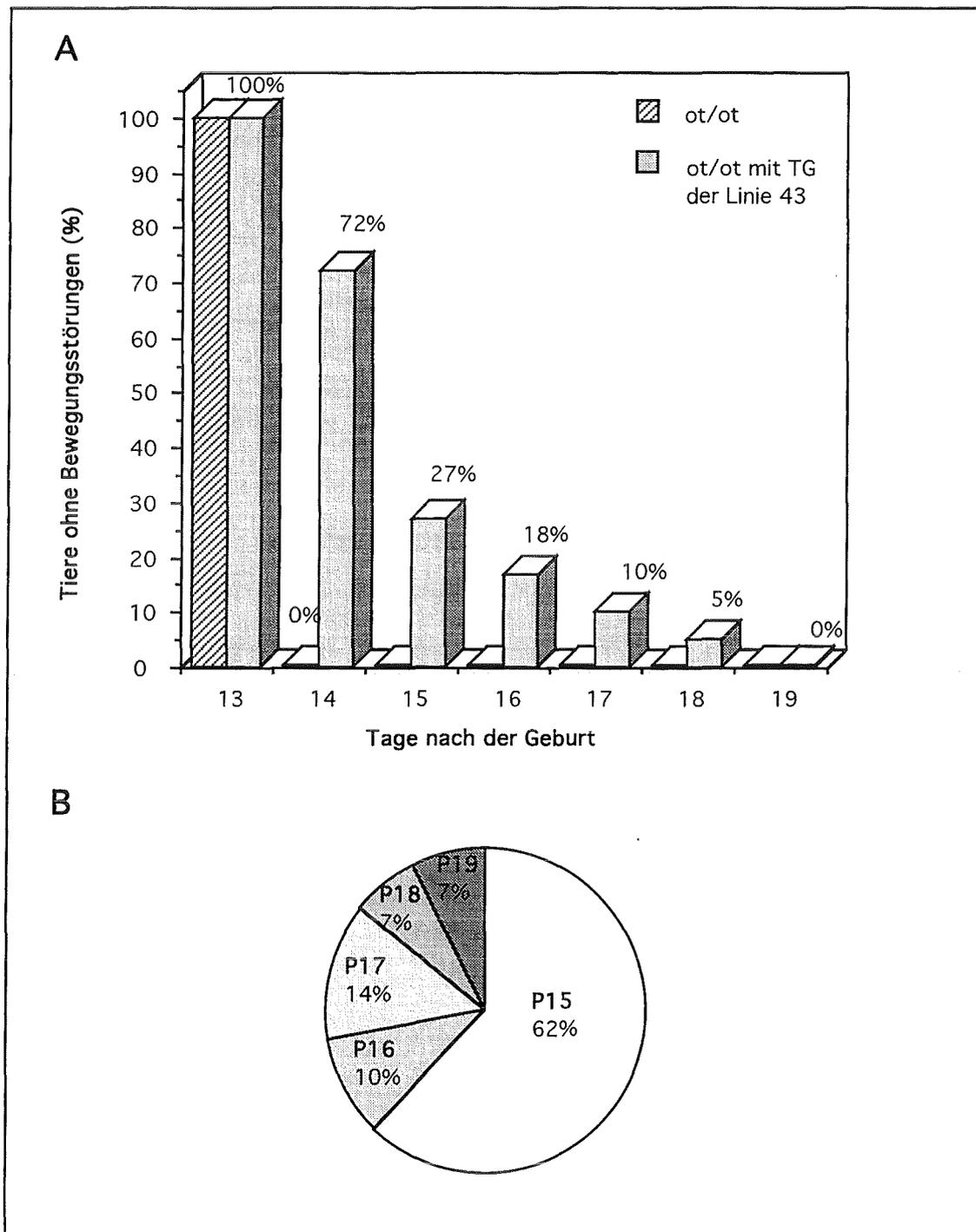


Abb.34 onset des oscillator Phänotyps bei Tieren mit dem Transgenlocus der Linie 43

(A) 72% der Gesamtpopulation der entwickelten *ot/ot* Mäuse mit Transgenlocus der Linie 43 (n=41) manifestieren ihren mutanten Phänotyp, im Gegensatz zu homozygoten *ot* Mäusen ohne Transgen (n=29), nicht zwischen P13 und P14 sondern zu einem späteren Zeitpunkt ("late onset-Population").

(B) Dabei war ein *onset* bei 62% der Mitglieder der "late onset-Population" an P15, bei 10% an P16, bei 14% an P17 und bei jeweils 7% an P18 bzw. P19 zu vermerken.

P = Tage nach der Geburt

TG = Transgenlocus

In dieser Abbildung sind die Ergebnisse aus den in Heidelberg und Karlsruhe durchgeführten Versuche zusammengefaßt.

Das Ergebnis des *ot*-Rettungsversuchs zeigt, daß die transgene $\alpha 1$ -Untereinheit der Linie 43 den mutanten Phänotyp der *ot* Maus nur partiell komplementieren kann. Eine vollständige Komplementation der murinen GlyR-Untereinheit durch eine Untereinheit einer fremden Spezies, wie sie in den Experimenten zur genetischen Rettung der Mausmutante *spastic* erreicht werden konnte, war hierbei nicht gelungen. Biochemische Analysen der transgenen *ot/ot* Mäusen müssen nun zeigen, welche Ursachen hierfür verantwortlich sind. So ist es möglich, daß die humane $\alpha 1$ -Untereinheit trotz ihrer biologischen Wirksamkeit im *in vitro* System (Sontheimer et al., 1989; Schmieden et al., 1989) die erforderlichen pharmakologischen Eigenschaften *in vivo* nicht entfalten kann, und daß sie trotz ihrer Homologie zum murinen Protein dieses nicht ersetzen kann. Wahrscheinlicher ist, daß im verwendeten Versuchsansatz die transgenen GlyR $\alpha 1$ -Untereinheiten nicht in ausreichender Anzahl im Rückenmark und Stammhirn der Tiere gebildet wird. Der Nachweis, daß transgenes $\alpha 1$ -Protein in neuronalen Membranen erscheint, konnte in den $\alpha 1$ -transgenen Linien lediglich ektopisch überprüft werden. Die Transgenexpression im Rückenmark der Tiere konnte aufgrund ihrer hohen endogenen $\alpha 1$ -Expression nicht nachgewiesen werden. Da die homozygote *ot* Maus zwei Wochen nach ihrer Geburt keine signifikanten Mengen an endogenem $\alpha 1$ -Protein exprimiert, kann dieser Nachweis nun in den transgenen *ot/ot*-Nachkommen geführt werden. Der Verlust der $\alpha 1$ -Untereinheit im Rückenmark und Stammhirn homozygoter *ot* Mäuse konnte mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Mab 2b, der die $\alpha 1$ -Untereinheit spezifisch erkennt (Pfeiffer et al., 1982; Schröder et al., 1991; Becker et al., 1988), dokumentiert werden (unveröffentlichte Daten, C.-M. Becker). Eine Analyse der Mab 2b-reaktiven Proteine im Nervensystem transgener *ot/ot* Mäuse wird zeigen, ob und in welcher Konzentration das transgene $\alpha 1$ -Protein auf der Membranoberfläche ihrer Neuronen im Stammhirn und Rückenmark erscheint. Diese Untersuchungen werden gegenwärtig von Brigitta Saul (ZMBH, Heidelberg) durchgeführt.

Teil II

Expression einer dominant negativ wirkenden Glyzinrezeptor-Untereinheit im Nervensystem von transgenen Mäusen

Hereditäre Hyperekplexie, eine motorische Störung, die dominant oder rezessiv vererbt werden kann, ist mit Mutationen im Gen für die $\alpha 1$ -Untereinheit des GlyR assoziiert. Durch molekulargenetische Studien und Kopplungsanalysen bei einer Anzahl betroffener Familien mit dominant vererbter Hyperekplexie konnten im Laufe des letzten Jahres Punktmutationen im sechsten Exon des Gens für die $\alpha 1$ -Untereinheit des GlyR identifiziert werden (Shiang et al., 1993; Schorderet et al., 1994). Diese Mutationen betreffen jeweils dasselbe Nukleotid und führen zum Austausch des Arginins an Position 271 durch ein Leuzin bzw. Glutamin (Shiang et al., 1993). Bei einer Patientin mit rezessiv vererbter Hyperekplexie konnte ebenfalls eine Punktmutation im selben Exon des Gens für die $\alpha 1$ -Untereinheit identifiziert werden (Rees et al., 1994). Diese Mutation betrifft jedoch ein Codon, das für eine Aminosäure in der ersten Transmembrandomäne kodiert. Während die Auswirkung dieser Punktmutation auf die Funktion der $\alpha 1$ -Untereinheit und auf die Eigenschaften des GlyR-Komplexes noch nicht untersucht wurde, haben elektrophysiologische *in vitro* Studien, die mit der $\alpha 1$ -Untereinheit von Patienten mit dominant vererbter Hyperekplexie durchgeführt wurden, gezeigt, daß die Leitfähigkeit und Pharmakologie des homooligomeren Rezeptors verändert ist (Langosch et al., 1993, 1994; Rajendra et al., 1994, 1995b). Ob die mutierten $\alpha 1$ -Untereinheiten einen vergleichbaren Effekt auch auf den nativen heterooligomeren Komplex *in vivo* haben, kann jedoch nur im Tiermodell untersucht werden. Zur Aufklärung des Pathomechanismus dieser humanen GlyR-Defekte ist es daher notwendig, mutierte Rezeptoruntereinheiten in der Maus zu testen. Von besonderem Interesse ist dabei die Tatsache, daß sich, je nach Mutation, der Phänotyp entweder dominant oder rezessiv vererbt. Da es sich beim GlyR um einen heterooligomeren Proteinkomplex handelt, können dominante Erbgänge verschiedene Ursachen haben. So könnten die Unterschiede im Erbgang dieser Bewegungsstörungen die Unterschiede in der Stärke der entsprechenden Mutation reflektieren, d.h. daß die mutierten Komponenten die Funktion des Komplexes in unterschiedlichem Ausmaß beeinflussen. Andererseits könnten Mutationen auch zur Bildung von dominant negativ wirkenden Molekülen führen, die zum Beispiel das *Assembly* des Komplexes verhindern, seine Struktur verändern oder seine Eigenschaften so beeinflussen, daß der gesamte Komplex funktionslos wird. Dabei erfordert speziell die Frage nach dominanten *Assembly*-Defekten das Studium von Rezeptoreigenschaften im Organismus. Auch können die Eigenschaften einer mutierten Untereinheit *in vivo* und ihre tatsächliche Auswirkung auf die Physiologie des Gesamtkomplexes nur im Tiermodell untersucht werden.

Durch die Expression einer rekombinanten GlyR-Komponente im Nervensystem transgener Mäuse, für die ein dominant negativer Einfluß auf die Funktionsfähigkeit des GlyR bereits *in vitro* nachgewiesen werden konnte, sollte ein der dominant vererbten Hyperekplexie entsprechender Glyzinrezeptordefekt simuliert werden. Dies sollte klären, ob es möglich ist, die Wirkmechanismen dominant negativ wirkender Untereinheiten *in vivo* aufzuklären.

1. Die chimäre Untereinheit Ch1 - eine dominant negativ wirkende GlyR-Untereinheit

Der native GlyR ist ein pentamerer Proteinkomplex mit einer unveränderlichen Stöchiometrie aus drei α 1- und zwei β -Untereinheiten. Die Sequenzmotive, die für das *Assembly* verantwortlich sind, wurden in der extrazellulären, N-terminalen Schleife beider Untereinheiten lokalisiert (Kuhse et al., 1993). Der C-terminale Teil jeder Untereinheit zeichnet sich durch vier transmembrane Domänen aus, die für die Bildung des Ionenkanals verantwortlich sind, wobei die zweite Transmembrandomäne (M2) jeweils die Kanalpore auskleidet (Grenningloh et al., 1987; Langosch et al., 1990a, 1990b; Betz, 1990; Betz et al., 1994). Exprimiert man α 1-Untereinheiten im *Xenopus* Oocyten-System, so bilden sich spontan homooligomere Pentamere, die durch die Agonisten des nativen GlyR aktiviert und durch Strychnine effektiv gehemmt werden (Schmieden et al., 1989). Solche Komplexe besitzen allerdings, im Vergleich zu den nativen heterooligomeren Komplexen, eine Empfindlichkeit gegen Picrotoxinin und eine veränderte Kanalleitfähigkeit. Die Koexpression der β -Untereinheit in diesem System führt zur Bildung von α 3/ β 2-Heteropentameren, die Picrotoxinin-unempfindlich sind und die die Kanalleitfähigkeit eines nativen GlyR-Rezeptors besitzen. Es ist gezeigt worden, daß die M2-Domäne der β -Untereinheit für diese Eigenschaften verantwortlich ist (Pribilla et al., 1992; Bormann et al., 1993). In Oocyten exprimierte β -Untereinheiten bilden alleine keine funktionellen Rezeptorkanäle.

Diese spezifischen Eigenschaften der beiden Untereinheiten wurden für die Entwicklung und die *in vitro* Analyse einer rekombinanten GlyR-Untereinheit mit dominant negativem Effekt auf die Kanalfunktion genutzt. Hierfür wurde von Jochen Kuhse (MPI, Frankfurt) die chimäre Untereinheit "Ch1" entwickelt, in der der N-terminale Bereich der humanen α 1-Untereinheit an den C-terminalen Bereich der β -Untereinheit der Ratte gekoppelt ist (Abb.35). Die extrazelluläre Domäne der α -Untereinheit liefert dabei neben den Ligandenbindungsstellen auch die Sequenzmotive, die für ein α -typisches Verhalten der Ch1-Untereinheit determinieren. Ihr β -spezifischer, C-terminaler Teil trägt die vier Transmembrandomänen, die für die Bildung des Rezeptorkanals verantwortlich sind. Für die Entwicklung der cDNA, die für dieses chimäre Protein codiert, war der 5'-Bereich der humanen α 1-cDNA (Position 220 bis 1043) und der 3'-Bereich der β -cDNA der Ratte (Position 1016 bis 1894) miteinander verbunden worden (Kuhse et al., 1993).

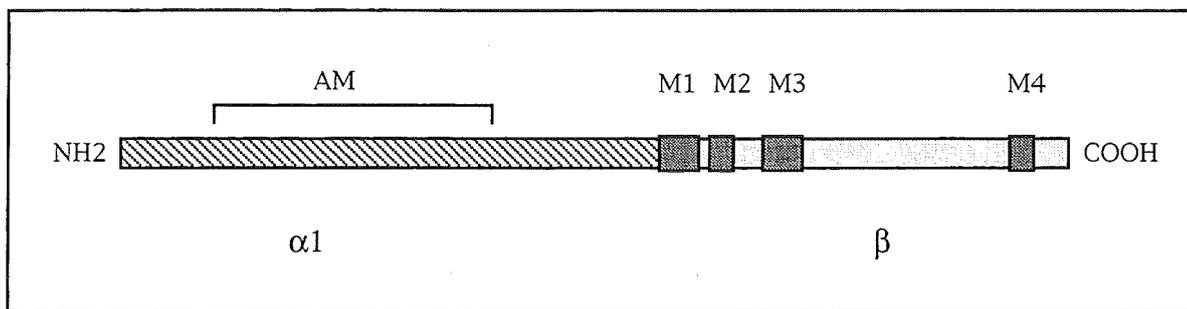


Abb.35 Schematische Darstellung der Ch1-Untereinheit

Der N-terminale Teil der humanen $\alpha 1$ -Untereinheit wurde an den C-terminalen Teil der β -Untereinheit der Ratte gekoppelt. AM= *Assembly-Motive*; M1-M4= *Transmembrandomänen*.

Mit elektrophysiologischen Methoden war der Einfluß des Ch1-Konstrukts auf die Aktivität des GlyR *in vitro* untersucht worden (Kuhse et al., 1993; Laube und Kuhse, unveröffentlicht). Dazu wurde $\alpha 1$ -, β - und Ch1-RNA in unterschiedlichen Mengenverhältnissen in einer *Xenopus* Oocyte exprimiert und anschließend der glyzin-induzierte Chloridstrom an der gesamten Zelle gemessen (*voltage clamp*). Abb.36A zeigt, daß die nativen Heteropentamere $\alpha 3/\beta 2$ eine hohen glyzin-induzierten Stromfluß vermitteln. Bei der Expression von ausschließlich β -Untereinheiten kann kein Stromfluß gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Es konnte gezeigt werden, daß bei allen Kombinationen, an denen die Ch1-Untereinheit beteiligt ist, der Stromfluß im Vergleich zum nativen Pentamer deutlich reduziert ist. Als Ursache hierfür wird angenommen, daß das Ch1-Protein aufgrund seiner extrazellulären Domäne mit anderen $\alpha 1$ -Untereinheiten um einen Platz im Pentamer konkurrieren kann. Bei einer Beteiligung Ch1-Untereinheit am Rezeptorpentamer nimmt die Zahl an β -typischen Transmembrandomänen zu und damit die Leitfähigkeit des Ionenkanals ab (Abb.36B).

In anderen Experimenten konnte gezeigt werden, daß das Ch1-Protein, wird es allein in der Oocyte exprimiert, keine funktionellen Chloridkanäle bildet (Kuhse et al., 1993). Nach Transfektion eines für das Ch1-Protein kodierenden Genkonstrukts in HEK293-Zellen wurde nachgewiesen, daß das Ch1-Molekül auf diesen Zellen exprimiert und dort auch zur Bindung von Glyzin bzw. [^3H]Strychnin befähigt ist (Kuhse et al., 1993). Die Koexpression von Ch1-Protein und humanen $\alpha 1$ -Untereinheiten führt zur Bildung von Komplexen, die nicht vom Alkaloid Picrotoxinin gehemmt werden. Dies weist darauf hin, daß der verbliebene Stromfluß nicht allein auf $\alpha 1$ -Homooligomere zurückzuführen ist, sondern daß es *in vitro* zur Bildung heterooligomerer Pentamere aus $\alpha 1$ - und Ch1-Untereinheiten kommt (Kuhse et al., 1993).

Insgesamt zeigen die *in vitro* Studien, daß das Ch1-Protein in der Tat einen dominant negativen Effekt auf die Funktion des GlyRs hat (Kuhse et al., 1993). Daher erschien die Ch1-cDNA für die Entwicklung transgener Mauslinien, mit deren Hilfe der Einfluß einer solchen Komponente auf das glyzinerge System *in vivo* untersucht werden sollte, geeignet.

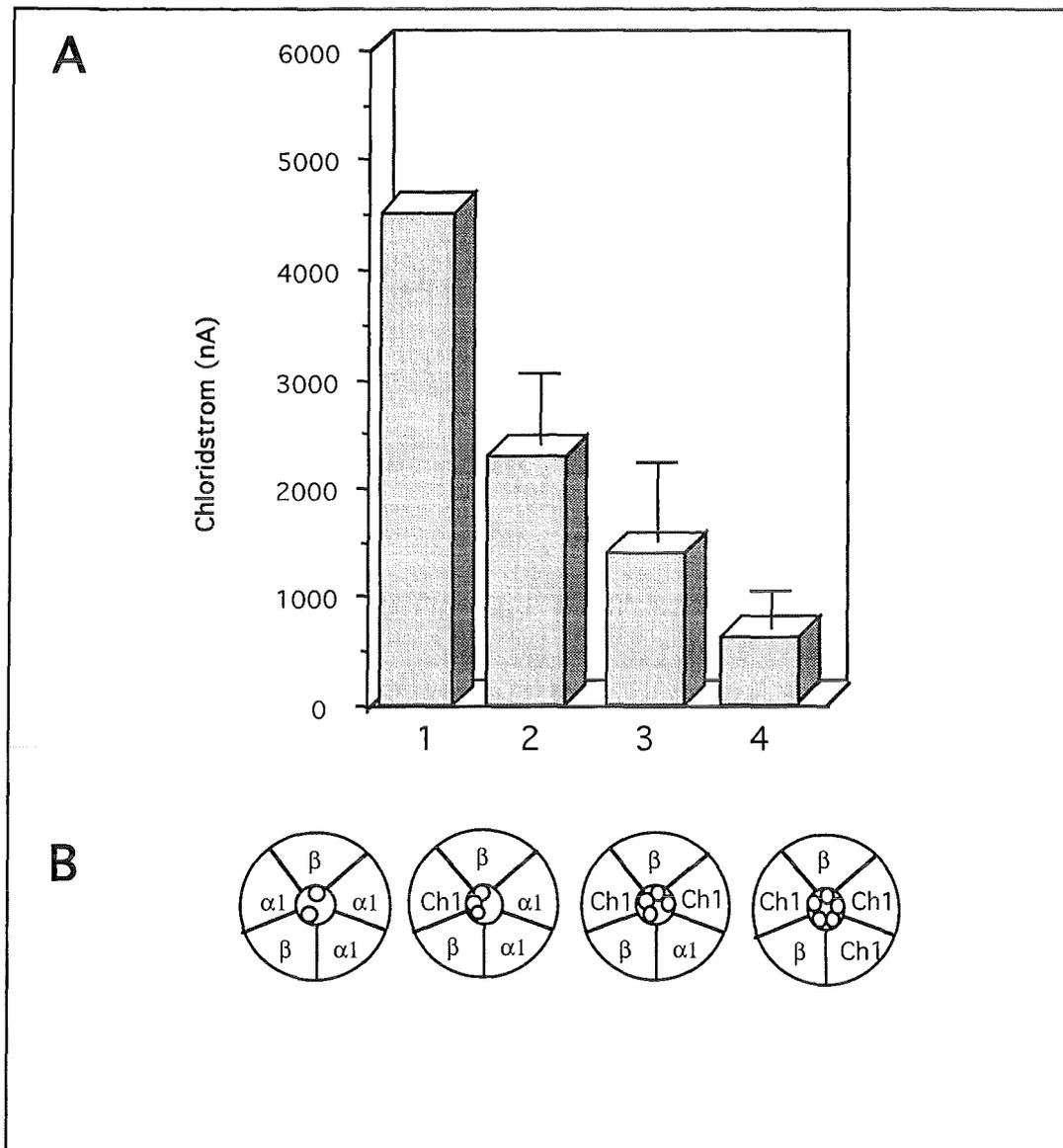


Abb.36 Anwesenheit der Ch1-Untereinheit im Rezeptorpentamer verringert die Leitfähigkeit des Kanals *in vitro*

(A) Die einzelnen GlyR-Untereinheiten wurden in unterschiedlichen Mengenverhältnissen ($\alpha 1$: Ch1: β) in die *Xenopus* Oocyte eingebracht und der glyzin-induzierte Chloridstrom [nA] an der gesamten Zelle gemessen.

Diese Messungen wurden von Herrn Dr. Bodo Laube und Dr. Jochen Kuhse am MPI für Hirnforschung (Frankfurt) durchgeführt. Die Säule 1 wurde anhand von Literaturangaben (Kuhse et al., 1993) erstellt.

$\alpha 1$: Ch1 : β

Säule 1 1 : 0 : 1

Säule 2 1 : 1 : 1

Säule 3 1 : 4 : 4

Säule 4 1 : 4 : 1

(B) zeigt schematisch die vermutete Wirkungsweise der Ch1-Untereinheit auf die Leitfähigkeit der Einzelkanäle *in vitro*. Aufgrund seiner extrazellulären Domäne kann das Ch1-Protein mit endogenen $\alpha 1$ -Untereinheiten um einen Platz im nativen Pentamer konkurrieren. Mit steigender Zahl an im Pentamer beteiligten Ch1-Untereinheiten (von links nach rechts), nimmt die Zahl an β -typischen Transmembrandomänen (O) zu und die Leitfähigkeit des Ionenkanals gleichzeitig ab.

2. Das Ch1-Expressionskonstrukt

Um die Expression des Ch1-Proteins im Nervensystem von Mäusen zu erreichen, wurde die für Ch1-Protein kodierende cDNA unter die Kontrolle des NSE-Promotors der Ratte gebracht, der sich bereits in vorangegangenen Experimenten für eine neuronspezifische Transgenexpression als geeignet erwiesen hatte. Für die mRNA-Prozessierung wurde erneut das Spleiß- und Polyadenylierungssignal des viralen SV40-kleinen *T-Antigen* hinter die cDNA kloniert.

Das Plasmid "pCIS-Ch1" (Kuhse et al., 1993), das die rekombinante Ch1-cDNA enthält, wurde mir freundlicherweise von Jochen Kuhse (MPI, Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Die Klonierung des Expressionsplasmids "p18SNCh1o.S." (Abb.37) ist ausführlich im Methodenteil der vorliegenden Arbeit aufgeführt.

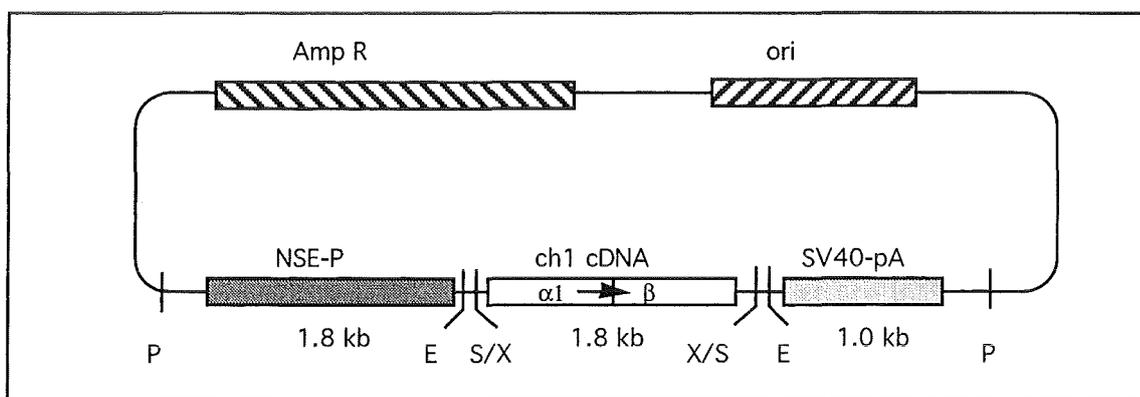


Abb.37 Schematische Darstellung des Plasmids p18SNCh1o.S.

Die chimäre Ch1-cDNA befindet sich unter der Kontrolle des neuronspezifischen Enolasepromotors der Ratte (NSE-P) und dem nachgeschalteten Spleiß- und Polyadenylierungssignal des kleinen T-Antigens des SV40-Virus. Das Expressionskonstrukt von insgesamt 4.6 kb ist in den Plasmidvektor pUC18 eingebunden, der einen eigenen Replikationsursprung (ori) und ein Resistenzgen für das Antibiotikum Ampicillin (Amp R) beisteuert und damit die Vermehrung der Plasmid DNA in *E.coli*-Bakterien erlaubt. Die Orientierung der cDNA ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. H=HindIII, P=PvuII, S=Sall, X=XhoI

3. Entwicklung transgener Mauslinien, die die Ch1-cDNA in ihrem Nervensystem exprimieren

Ein 4.6 kb großes PvuII Fragment bestehend aus NSE-Promotor, Ch1-cDNA und dem SV40-Spleiß- und Polyadenylierungssignal wurde von Herrn Dr. Johannes Schenkel (IGen, Karlsruhe) im Mikroinjektionsexperiment zur Herstellung Ch1-transgener Mäuse eingesetzt. Dieses Experiment wurde, analog den Mikroinjektionsexperimenten zur Herstellung der β - und α 1-transgenen Mäuse, nach etablierter Methode (Hogan et al., 1986) durchgeführt.

3.1 Etablierung Ch1-transgener Linien

Aus Mikroinjektionsexperimenten, in denen die DNA in befruchtete Eizellen aus *DBA/2-C57/bl6*-Hybriden (B₆D₂F₁) eingebracht wurde, wurden insgesamt 59 Tiere geboren. Die DNA aus Schwanzbiopsien dieser Nachkommen wurde mittels *Southern Blot* Analyse auf eine Transgenintegration untersucht wurde. Als Sonde diente hierbei die vollständige Ch1-cDNA. Im Autoradiogramm (Abb.38A) konnten drei Transgenträger (Nr. 344, 581 und 639) anhand der transgenspezifischen Bande von 1,8 kb identifiziert werden. Bei der Etablierung von transgenen Mäusen können normalerweise 10 bis 20% der geborenen Tiere als *Foundertiere* identifiziert werden. Dies wurde bei der Herstellung der α 1- (14%) und β - (15%) transgenen Mäuse bestätigt. Im Falle der Ch1-Transgenen jedoch konnten unter 59 geborenen Tiere lediglich drei *Foundertiere* ermittelt werden, was einer Effizienz von nur 5% entspricht. Dies läßt darauf schließen, daß eine Expression des Transgens einen negativen Effekt auf das Überleben der Embryonen hat, so daß bereits vor der Geburt eine Selektion auf Tiere mit niedriger Transgenexpressionsrate erfolgt war.

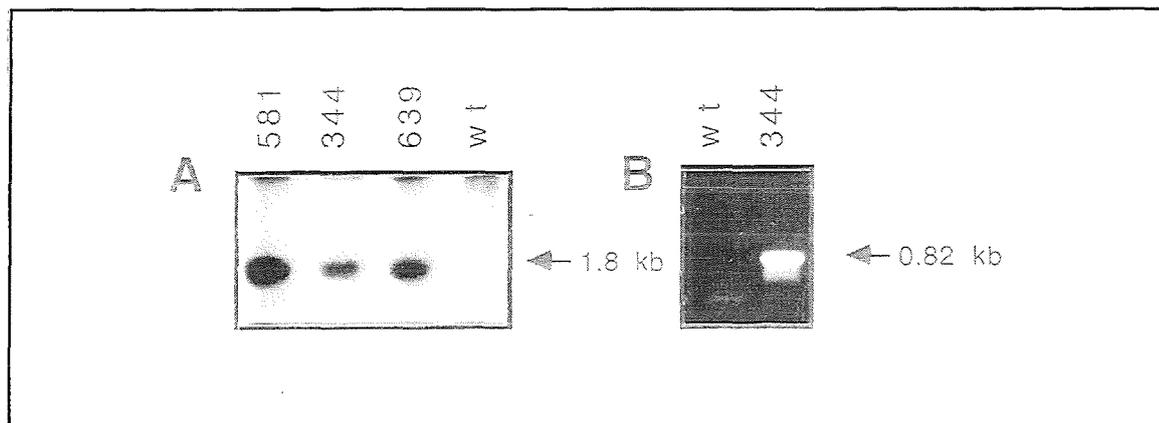


Abb.38 Genotypische Analyse der Tiere aus den Injektionsexperimenten und ihrer Nachkommen

(A) Autoradiogramm (Auszug) eines Southern Blots, für den 20 μ g genomische DNA aus Schwanzbiopsien mit dem Restriktionssenzym *EcoR* I verdaut, in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert wurde. Als Sonde diente die vollständige Ch1-cDNA. Die Transgenträger Nr.581, 344 und 639 können durch eine 1,8 kb große Hybridisierungsbande identifiziert werden. Als Kontrolle diente die DNA eines nicht-transgenen Tiers (wt).

(B) Transgennachweis durch PCR-Analyse. Mit den Oligonukleotiden β -3'UTR und SV40-2 wurden mit der DNA einer nicht-transgenen (wt) und einer Ch1-transgenen (344) Maus PCR-Reaktionen durchgeführt.

Zur Etablierung von Mauslinien wurden die drei *Foundertiere* in Zuchtbrütungen mit *DBA/2*-Wildtypmäusen eingesetzt. Für die genotypische Analyse ihrer Nachkommen wurde die PCR-Technik verwendet. Da sowohl der 3'-Bereich der β -cDNA als auch das SV40-Spleiß- und Polyadenylierungssignal im Transgenkonstrukt enthalten sind, konnte die Oligonukleotidkombination β -3'UTR/SV40-2, die bereits erfolgreich in der genotypischen Analyse der β -transgenen Mausstämme eingesetzt wurden, auch hier als PCR-Startermoleküle

Anwendung finden. Das Foto der gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Reaktionen in Abb.38B zeigt, daß erwartungsgemäß nur mit der DNA von Transgenträgern ein transgenspezifisches Produkt von 821 bp amplifiziert werden konnte.

Die zur Etablierung von Linien durchgeführten Brütungen zeigten, daß es sich bei den *Foundertieren* Nr. 344 und Nr. 639 um genetische Mosaik handelte. Es konnten jedoch für alle *Foundertiere* Transgenlinien etabliert werden.

Durch anschließende Kreuzungen, in denen die transgenen Nachkommen der *Foundertiere* untereinander verpaart wurden, wurden homozygote Transgenträger erhalten, die mit Hilfe der *Slot Blot* Technik ermittelt wurden. Zur Bestimmung der Reinerbigkeit bezüglich des Transgenlocus wurde, wie im Falle der β -Transgenlinien das 1.3 kb große *DraII*-Fragment der β -cDNA der Ratte (Grenningloh et al., 1990a) als transgenspezifische Sonde und die GAPDH-cDNA der Ratte (Fort et al., 1985) als Referenzsonde eingesetzt (vgl. Teil I, Abb.7).

3.2 Phänotypische Analyse der Ch1-transgenen Mäuse

Eine phänotypische Analyse der Nachkommen der Transgenlinien zeigte, daß alle Mitglieder der Linie 344, mit Ausnahme der *Foundermaus* selbst, beim Hochnehmen am Schwanz ihre Hinterbeine an den Körper preßten ("*hind feet clasping*", vgl. Abb.39C). Ihre nicht-transgenen Geschwister streckten bei der gleichen Behandlung ihre Hinterbeine weit vom Körper weg (Abb.39A). Das "*hind feet clasping*" ist ein für *spa* bzw. *spd* Mäuse typisches Verhalten (Abb.39B). Zwar konnten in der Population der Transgenträger Unterschiede bezüglich der Intensität des Phänotyps beobachtet werden, insgesamt jedoch wurde das beobachtete Verhaltensmerkmal bei allen Mitgliedern der Linie 344 mit zunehmendem Alter der Tiere auffälliger. Andere phänotypische Veränderungen konnten nicht beobachtet werden.

Der, wenn auch verhältnismäßig milde Phänotyp kann als partieller *spastischer* bzw. *spasmodischer* Phänotyp gedeutet werden und läßt eine teilweise Beeinträchtigung der GlyR-Funktion vermuten. Das Fehlen dieses Phänotyps im *Foundertier* 344 könnte auf ihren Mosaik-Genotyp zurückgeführt werden.

Keines der Mitglieder der Linien Nr. 639 und Nr. 581 zeigte das "*hind feet clasping*" oder eine andere phänotypische Veränderung. Eine molekularbiologische Analyse sollte nun darüber Auskunft geben, welche Ursachen zu den beobachteten Verhaltensunterschieden führten.

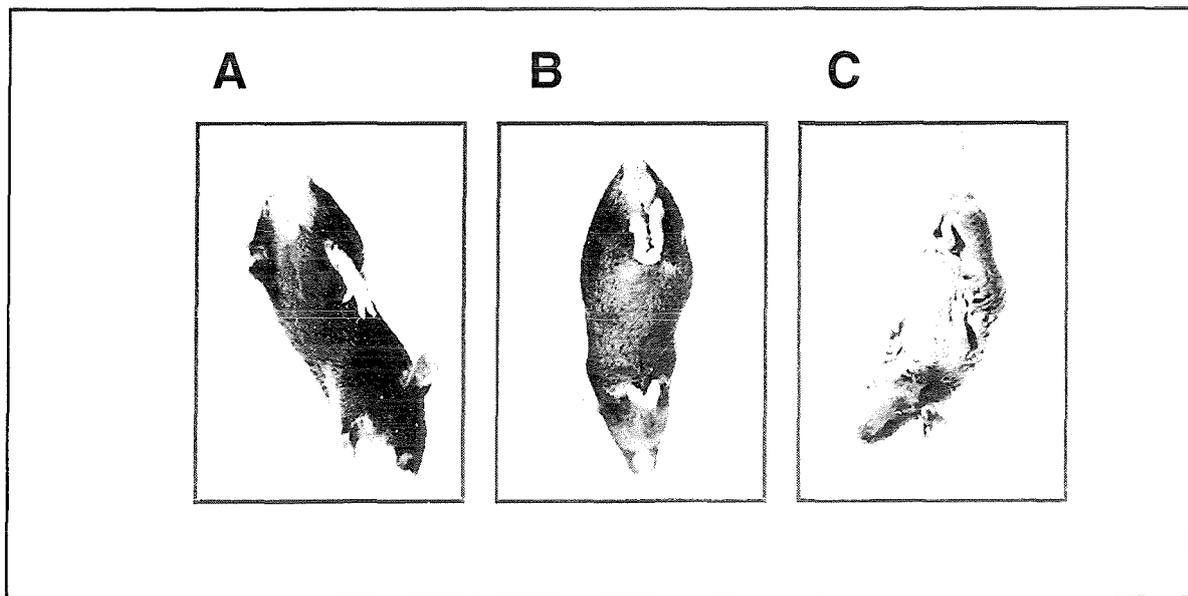


Abb.39 Phänotyp der Ch1-Transgenen der Linie 344 im Vergleich zu homozygoten *spa*- und Wildtypmäusen

Das *spa* bzw. *spd* typische Anpressen der Hinterbeine an den Körper beim Hochnehmen der Tiere am Schwanz (B) kann auch bei den Mitgliedern der Linie 344 beobachtet werden (C). Wildtypmäuse strecken ihre Hinterbeine bei der gleichen Behandlung weit vom Körper weg (A).

3.3 Expressionsanalyse der Ch1-transgenen Linien

Da das veränderte Verhalten nur bei den Mitgliedern der Linie 344, nicht aber bei den der anderen Linien beobachtet werden konnte, war anzunehmen, daß die einzelnen Linien Unterschiede in ihrer Transgenexpression aufwiesen. Dies wurde zunächst mit Hilfe einer RNA-Analyse überprüft. Anschließend sollte im *Western Blot* Verfahren das vom Transgen kodierte Protein in Membranfraktionen des ZNS der Tiere nachgewiesen werden.

3.3.1 RNA-Analyse

Durch eine Analyse der mRNA aus den Nervenzellen der transgenen Tiere wurde die transgene Transkriptionsrate der einzelnen Linien überprüft. Dieser Nachweis wurde mit Hilfe der *RT-PCR*-Technik geführt. Für die *RT-PCR* wurde die mRNA aus dem ZNS einzelner Mitglieder der Linien Nr. 344, 581 und 639 und einer *DBA/2*-Wildtypmaus, die als Negativkontrolle diente, isoliert. Die neuronalen Transkripte wurden anschließend mit Hilfe der reversen Transkriptase (RT) in cDNA-Sequenzen übersetzt. Die Transkripte transgenen Ursprungs sollten in einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden β -3'UTR und SV40-2 amplifiziert werden. Zur Überprüfung der RNA-Präparationen auf DNA-Kontaminationen wurde jeweils eine PCR-Reaktion ohne cDNA-Synthese angesetzt (-RT). Zur Kontrolle der erfolgreichen RNA-Präparation wurden PCR-Reaktionen mit

den Kontrolloligonukleotiden GAPDH1 und GAPDH2 durchgeführt. Mit dieser Methode konnte für alle drei etablierten Ch1-Transgenlinien die Transkription des Transgens nachgewiesen werden (Abb.40). Wie bei der analogen Analyse der β -transgenen Mäuse (vgl. Abb.8 und 9) wurden Amplifikationsprodukte von 755 und 821 bp detektiert, die transgenspezifische Transkripte repräsentieren. Das längere Produkt stellt hierbei vermutlich ebenfalls Transkripte dar, bei denen das SV40-Spleißsignal nicht genutzt worden war (vgl. auch Teil I, Kapitel A.2.2).

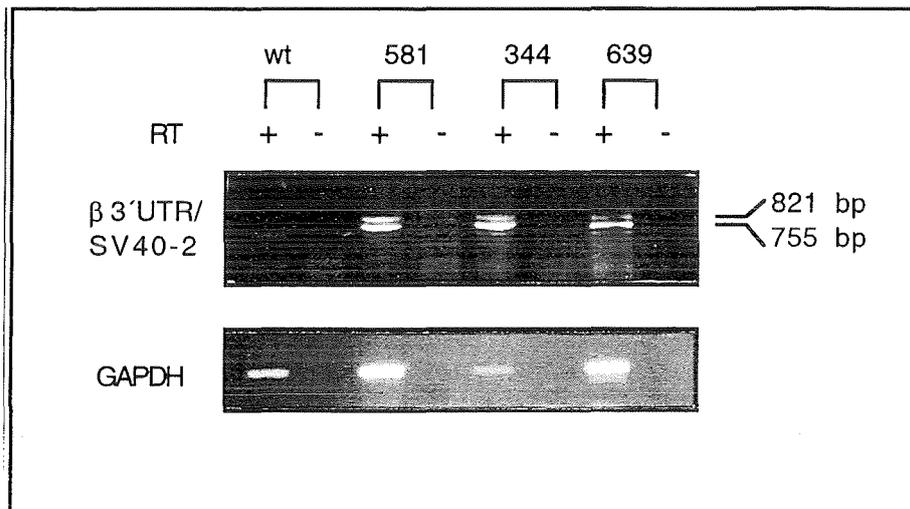


Abb.40 Nachweis transgener Transkripte im Nervensystem der Ch1-Transgenlinien

Nach Isolierung der Gesamt-RNA aus dem ZNS einzelner Mitglieder der Transgenlinien (344 581 639) und einer *DBA/2*-Wildtypmaus (wt), die als Negativkontrolle diente, wurden je 1.5 μ g mittels der Reversen Transkriptase in cDNA-Sequenzen übersetzt und anschließend in der PCR eingesetzt.

(oben) Die im Agarosegel aufgetrennten PCR-Reaktionen, die mit den Oligonukleotide β -3'UTR und SV40-2 durchgeführt wurden. Zur Überprüfung der RNA-Präparation auf DNA-Kontaminationen wurde für jede RT-PCR-Reaktion einen Kontrollansatz ohne Zugabe von Reverser Transkriptase mitgeführt (-RT). In den +RT-PCR-Ansätzen aller Transgenlinien wurden Fragmente von 755 bp und 821 bp amplifiziert.

(unten) Zur Kontrolle der RNA-Präparation wurde jede der RT-Reaktionen zusätzlich einer PCR-Reaktion unterzogen, in der Oligonukleotide eingesetzt wurden, die zu Sequenzen des endogenen GAPDH-Transkripts homolog sind.

Mittels der *RT-PCR*-Analyse wurden transgene Transkripte im Nervensystem aller etablierten Ch1-Transgenlinien nachgewiesen. In einer *quantitativen RT-PCR*-Analyse sollte nun überprüft werden, inwieweit die einzelnen Linien Unterschiede in der Transkriptionsrate aufwiesen. Hierbei wurden, analog der Analyse der GlyR β -Transgenlinien (vgl. Teil I, Kapitel A.2.2), die Oligonukleotidkombinationen β -3'UTR/SV40-2 und GAPDH1/GAPDH2 in einem gemeinsamen PCR-Reaktionsansatz eingesetzt und eine anschließende *Southern Blot* Hybridisierung durchgeführt. Als Sonden dienten erneut die GAPDH-cDNA und das DraII-Fragment der GlyR β -cDNA. Im Autoradiogramm (Abb.41) wird deutlich, daß sich die Transkriptionsraten der einzelnen Linien, wie erwartet, unterscheiden. So zeigt die Linie 344 eine deutlich höhere transgene Transkription als die Linien 581 und 639 (vgl. Tab. in Abb.41).

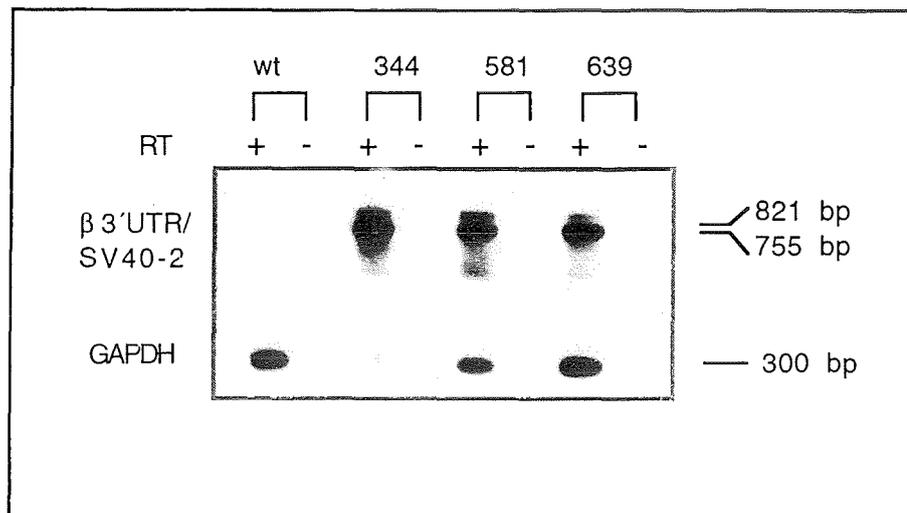


Abb.41 Vergleich der Transkriptionsrate der einzelnen Linien mit Hilfe der quantitativen RT-PCR

Nach Isolierung der Gesamt-RNA aus dem ZNS der Transgenlinien (344, 581 und 639) wurden je 1.5 µg mittels der Reversen Transkriptase in cDNA-Sequenzen übersetzt und in PCR-Reaktionen eingesetzt. Die PCR-Reaktionen, die mit Hilfe der gleichzeitig eingesetzten Oligonukleotidkombinationen β-3'UTR/SV40-2 und GAPDH1/GAPDH2 durchgeführt wurden, wurden im Agarosegel aufgetrennt. Nach Immobilisierung der DNA-Fragmente auf einer Nylonmembran wurde diese mit einer β-spezifischen und einer GAPDH-spezifischen Sonde hybridisiert. Zur Überprüfung der RNA-Präparation auf DNA-Kontaminationen wurde für jede RT-PCR-Reaktion ein Kontrollansatz ohne Zugabe von Reverser Transkriptase (-RT) mitgeführt. Als negative Kontrolle diente die RNA aus einer Wildtypmaus (wt). In den +RT-PCR-Ansätzen aller Transgenlinien wurden jeweils transgenspezifische Fragmente von 755 bp und 821 bp sichtbar gemacht. In allen +RT-Ansätzen konnte ein GAPDH-spezifisches Fragment von ca. 350 bp amplifiziert werden, daß die Quantifizierung der transgenen Produkte ermöglicht.

Das Autoradiogramm wurde zur Quantifizierung der Transkriptionsrate "gescannt". Der für die Linie 344 erhaltene Wert wurde willkürlich als 100% festgesetzt:

	Linie 344	Linie 581	Linie 639
relative Transkriptionsrate	100%	5.9%	7.1%

Insgesamt bestätigten diese Ergebnisse die Vermutung, daß die beobachteten Verhaltensunterschiede der einzelnen Ch1-Linien auf Unterschiede in der Transgenexpression zurückzuführen sind.

3.3.2 Analyse des transgenen Ch1-Proteins

Nach dem Nachweis der Transgenexpression auf RNA-Ebene sollte nun versucht werden, das Ch1-Protein in den neuronalen Membranen der Tiere mittels *Western Blot* Verfahren zu detektieren. Hierzu fand der monoklonale Antikörper Mab 4a (Pfeiffer et al., 1984) Anwendung, der ein Epitop im N-terminalen Bereich der α-Untereinheit (Schröder et al., 1991) erkennt und damit auch zum Nachweis des 53 kD großen Ch1-Proteins geeignet ist.

Für diesen Nachweis wurden die Membranproteine aus dem ZNS von Mitgliedern der Linien 344, 581 und 639 und einer *DBA/2*-Wildtypmaus isoliert und im *Western Blot* mit dem Antikörper Mab 4a inkubiert. Zur Standardisierung der aufgetragenen Proteinmenge wurde der gegen das Vesikelprotein Synaptophysin gerichtete, monoklonale Antikörper Sy38 eingesetzt. Der

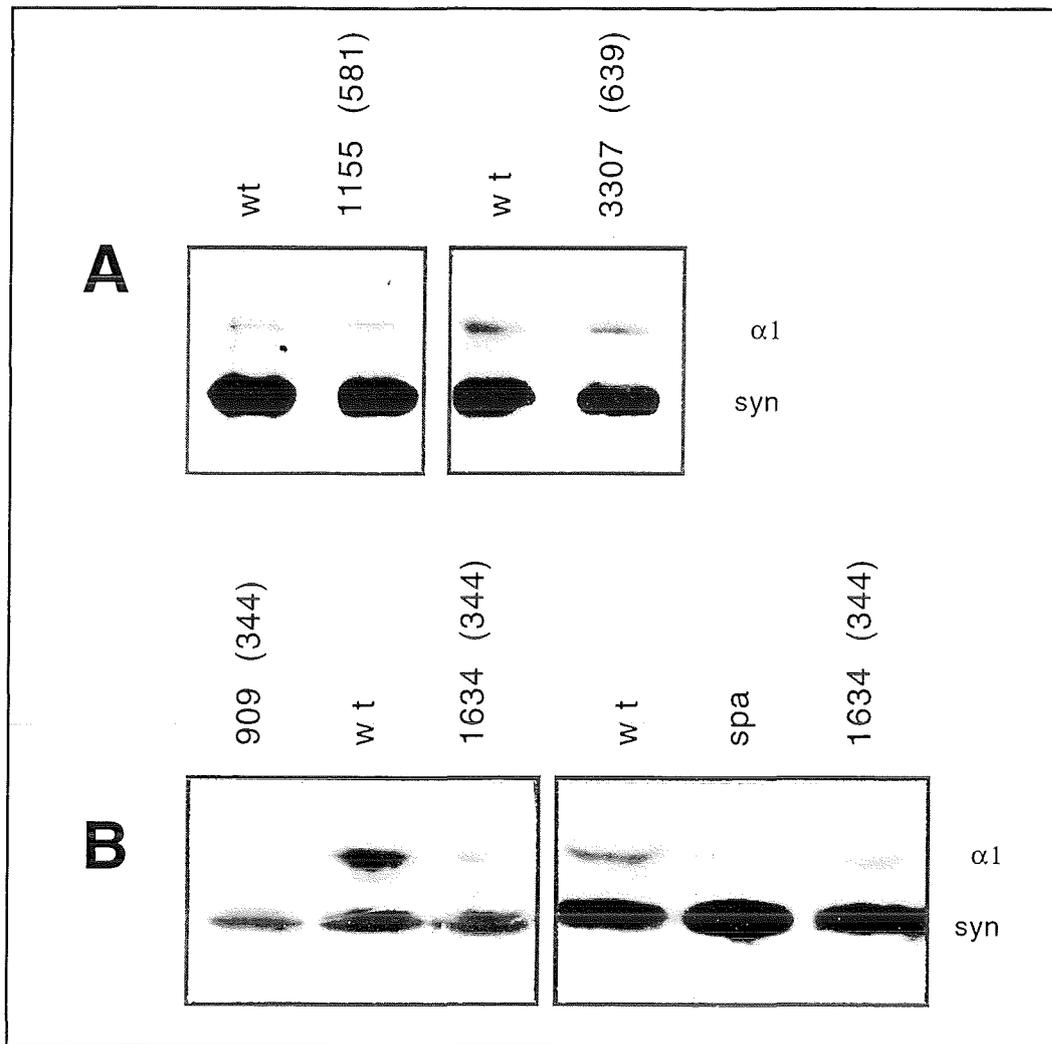


Abb.42 Analyse von membrangebundenem α -Protein im Gesamthirn der Ch1-transgenen Linien

Das Gesamthirn von Wildtypmäusen (wt), homozygoten *spa* Mausmutanten (*spa*) und den Ch1-transgenen Tieren (Linie 581: 1155; Linie 639: 3307; Linie 344: 909, 1634) wurde acht Wochen nach der Geburt der Mäuse isoliert, die neuronalen Membranproteine daraus gewonnen, diese im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das α -Protein und das Ch1-Protein sollten anschließend mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Mab 4a als 49 kD ($\alpha 1$) bzw. 53 kD-Bande sichtbar gemacht werden. Zur Standardisierung der aufgetragenen Proteinmenge wurde der gegen das Vesikelprotein Synaptophysin (38 kD) gerichteter Antikörper eingesetzt (syn).

(A) Das mit Hilfe des monoklonalen Antikörper Mab 4a identifizierte Proteinmuster der transgenen Mitglieder der Linie 581 und der Linie 639 im Vergleich mit der Wildtypkontrolle (wt).

(B) Analyse verschiedener Individuen der Linie 344 im Vergleich mit der Wildtypkontrolle (wt) und *spa/spa* Mäusen (*spa*).

Western Blot (Abb.42) zeigt, daß in keiner der Membranfraktion aus dem Gesamthirn der Tiere transgenes Protein nachweisbar war. Die Membranfraktion der Linien 581 und 629 zeigten bezüglich der Mab 4a-reaktiven Proteine keinerlei Unterschiede zum Proteinmuster der Wildtypmaus, die als negative Kontrolle diente. Die Untersuchung der Membranproteine der Mitglieder der Linie 344 jedoch ergab ein erstaunliches Ergebnis. Zwar war es ebenso unmöglich,

das chimäre Protein in den Hirnmembranfraktionen der Tiere nachzuweisen, jedoch war eine Reduktion an endogenem, membranständigem α -Protein zu erkennen. Dies läßt auf eine Beeinträchtigung der GlyR-Expression im Nervensystem dieser Tiere schließen und weist darauf hin, daß die Ch1-Untereinheit *in vivo*, anders als erwartet, entweder das *Assembly* des GlyR beeinflußt, oder daß ihre Beteiligung am Rezeptor dessen Stabilität mindert.

Die *Western Blot* Analyse der Membranproteine anderer Mitglieder der Linie 344 zeigte, daß zwar stets eine Reduktion der Mab 4a-reaktiven Proteine beobachtet werden konnte, daß der Umfang der Verminderung jedoch differierte (Daten nicht gezeigt). Ein Gen-Dosis-Effekt konnte dabei ausgeschlossen werden, da homozygote Transgenträger keine stärkere Beeinträchtigung aufwiesen. Die Inhomogenität in der Population der Linie 344 konnte, wie bereits erwähnt, auch bei der phänotypischen Analyse beobachtet werden (vgl. Kapitel B.3.2.). Ein signifikanter, quantitativer Zusammenhang zwischen der Stärke des "*hind feet claspings*" und der Beeinträchtigung der α -Expression konnte nicht hergestellt werden, da der verhältnismäßig milde Phänotyp eine nur sehr subjektive Bewertung ermöglichte. Da jedoch alle Mitglieder der Linie 344 stets das *hind feet claspings*-Verhalten manifestierten und auch stets eine Veränderung in der α 1-Immunreaktivität aufwiesen, kann angenommen werden, daß das Ch1-Transgen für die beobachteten Veränderungen verantwortlich ist. Die Auswirkungen des Ch1-Konstrukts auf den GlyR ist jedoch zwingend von der Dosis der Transgentranskripte abhängig, da die Linien 581 und 639, für die nur sehr wenig Transkripte nachgewiesen werden konnten, kein verändertes Verhalten zeigen.

Insgesamt ist die, im Nervensystem der Mitglieder der Linie 344 beobachtete Beeinflussung der GlyR-Expression, verglichen mit *spalpa* Mäusen, verhältnismäßig gering. Dies erklärt, daß es in diesen Tieren lediglich zur Ausprägung der vermutlich mildesten Form des für *spa* bzw. *spd* charakteristischen Phänotyps kommt. So ist die Menge an verbleibenden GlyR-Molekülen offenbar ausreichend, um das Ausprägen der dramatischeren Komponenten des mutanten Phänotyps (Tremor, Aufrichtreflex, männliche Infertilität) zu verhindern. Dies bestätigt das Ergebnis aus den Versuchen zur genetischen Rettung der Mausmutante *spastic*, in denen unter anderem gezeigt werden konnte, daß der mutante Phänotyp der *spastischen* Mausmutante bei einer schrittweisen Verbesserung der GlyR-Expression gemildert wird.

Diskussion

Der Muskeltonus, der die Grundlage für die aufrechte Körperstellung und für die Feinabstimmung von Bewegungsabläufen bildet, ist Ergebnis einer komplexen Verarbeitung exzitatorischer und inhibitorischer Impulse in den neuronalen Regelkreisen des Rückenmarks. Für seine Erhaltung ist ein Gleichgewicht dieser Impulse unerlässlich (Kandel, 1991). Im Rückenmark und Stammhirn von Wirbeltieren wird die synaptische Inhibition in erster Linie durch den strychnin-sensitiven GlyR vermittelt (Betz, 1988). Dieser Membranrezeptor ist entscheidend an der spinalen Regulation des Muskeltonus beteiligt (Betz, 1988; Becker, 1992), und ein Verlust seiner Funktion aufgrund einer Strychninvergiftung oder Mutationen in den Genen seiner Untereinheiten hat verhängnisvolle Folgen für die Leistungsfähigkeit des motorischen Systems (Becker, 1992).

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Vermutung, daß die Verhaltensstörungen der Mausmutanten *spasmodic* und *spastic* mit Mutationen in den Genen für ihre GlyR-Untereinheiten assoziiert sind und aus einem Mangel an funktionellen GlyR-Molekülen in ihrem zentralen Nervensystem resultieren. Grundlage für diese Vermutung war in erster Linie die Analogie ihres Phänotyps zu den Bewegungsstörungen, die bei Mäusen nach der Gabe sublethaler Strychnindosen zu beobachten sind (Becker et al., 1986, 1992; Lane et al., 1987). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Zusammenhang von Funktionsverlust der GlyR-Untereinheiten und dem mutanten Phänotyp nachzuweisen. Hierfür sollten erstens die Gene für die GlyR-Untereinheiten als Transgene in die einzelnen Mausmutanten eingeführt werden, um eine Komplementation des Phänotyps zu erzielen (*rescue*). Zweitens sollte die Rezeptoraktivität durch Einbringen einer dominant negativ wirkenden GlyR-Untereinheit mit Hilfe transgener Techniken reduziert und durch Verhaltensanalysen überprüft werden, ob eine so erzielte Beeinträchtigung des glyzinergeren Systems einen analogen Phänotyp zur Folge hat (*funktioneller Knockout*).

In den letzten zwei Jahren, also parallel zu den hier beschriebenen Arbeiten, gelangen mehrere prinzipielle Durchbrüche auf dem Gebiet der Erforschung von murinen und humanen Erbkrankheiten, die aus GlyR-Defekten resultieren. So konnte zunächst gezeigt werden, daß im Menschen bestimmte familiäre, neuromotorische Erkrankungen (hereditäre Hyperekplexie, *stiff baby syndrome* bzw. *startle syndrome*; Gensymbol: STHE) mit Mutationen im $\alpha 1$ -Gens des Glyzinrezeptors verbunden sind (Shiang et al., 1993; Rees et al., 1994; Schoderet et al., 1994). Ebenfalls in diesem Zeitraum wurde gezeigt, daß auch die Mausmutanten *spastic*, *spasmodic* und *oscillator* Mutationen in den Genen für die Untereinheiten des GlyR tragen (Ryan et al., 1994; Saul et al., 1994; Kingsmore et al., 1994; Mülhardt et al., 1994; Buckwalter et al., 1994). Diese Erkenntnisse bestätigten die Ausgangshypothese, daß die bei den Mausmutanten beobachteten Bewegungsstörungen aus GlyR-Defekten resultieren. Die Komplementation ihres Phänotyps durch Einbringen von funktionsfähigen GlyR-Untereinheiten sollte nun den formalen Beweis für

diesen Zusammenhang erbringen. Darüber hinaus sollten mit den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimenten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Läßt sich die Menge an funktionellen Glyzinrezeptormolekülen in der Mausmutante *spastic* durch Variation der Expression ihrer strukturellen β -Untereinheit verändern?
2. Inwieweit läßt sich der komplexe Phänotyp der Mausmutante *spastic* (Tremor, gestörter Aufrichtreflex, männliche Infertilität) durch eine veränderte GlyR-Expression in einzelne Komponenten zerlegen? Wieviel GlyR-Expression ist für ein Abklingen aller *spastischen* Krankheitssymptome, also für die normale Funktion des gesamten glyzinerigen Systems erforderlich?
3. Ist die ligandenbindende $\alpha 1$ -Untereinheit des humanen GlyR auch in der Maus funktionsfähig? Das heißt, besitzen "humanisierte" GlyR-Komplexe aus murinen und humanen Untereinheiten *in vivo* eine biologische Wirksamkeit? Dies ist die zwingende Voraussetzung für die Entwicklung eines Mausmodells zur Erforschung der Pathomechanismen veränderter $\alpha 1$ -Untereinheiten des Menschen *in vivo*.
4. Können die neuromotorischen Erbkrankheiten des Menschen, die aus GlyR-Defekten resultieren, durch neuronale Expression von dominant negativ wirkenden GlyR-Untereinheiten simuliert werden?

Im Folgenden sollen zunächst die Fortschritte bei der Beantwortung der Fragen 1 und 2 erläutert und diskutiert werden, die sich auf die Experimente zur Komplementation des Phänotyps der Mausmutante *spastic* beziehen.

1. Die Menge an funktionellen Glyzinrezeptormolekülen läßt sich durch Variation der Expression der strukturellen β -Untereinheit verändern

Die *spastische* Mausmutante trägt ein intronisches LINE1-Element im Gen für ihre β -Untereinheit des GlyR (Kingsmore et al., 1994; Mülhardt et al., 1994). Als Folge dieser Mutation exprimieren homozygote Tiere nur etwa 10% der normalen Menge an vollständigen β -Transkripten und zeigen zwei bis drei Wochen nach ihrer Geburt einen komplexen neuromotorischen Phänotyp. In diesen Tieren ist auch die Expression der ligandenbindenden $\alpha 1$ -Untereinheit des adulten GlyR betroffen, was in Ligandenbindungsstudien mit [^3H]-Strychnin (Becker et al., 1986; Becker, 1990) und in immunochemische Analysen mit $\alpha 1$ -reaktiven Antikörpern (Becker et al., 1992) gezeigt werden konnte. Dies läßt vermuten, daß das *Assembly* des GlyR_A, seine Stabilität oder seine synaptische Lokalisation *in vivo* zwingend an die Verfügbarkeit von β -Untereinheiten gebunden ist.

Um die Rolle der β -Untereinheit bei der GlyR_A-Expression *in vivo* studieren zu können, wurden Mäuse entwickelt, die intermediäre Mengen an β -Untereinheiten exprimieren. Dies wurde durch

Einführung eines, für die β -Untereinheit der Ratte spezifischen Transgens in den genetischen Hintergrund homozygoter *spa* Tiere erreicht. Eine zwingende Voraussetzung für den erfolgreichen Eingriff in das glyzinerge System dieser Mäuse war die Expression der transgenen Untereinheit in den Geweben des zentralen Nervensystems. Um eine neuronale Transgenexpression zu erzielen, wurde die transgene cDNA unter die Kontrolle des Promotors für die neuronspezifische Enolase (Sakimura et al., 1987) gebracht, für den bereits nachgewiesen worden war, daß er eine Expression in diesen Geweben vermitteln kann (Forss-Petter et al., 1990). Durch den Einsatz dieses Promotors konnte in drei von vier transgenen Mauslinien, die mit Hilfe des Expressionskonstrukts entwickelt worden waren, eine neuronale Transgenexpression erreicht werden. Die exprimierenden Linien wiesen zudem Unterschiede in ihrer Transgentranskriptionsrate auf. Dies ermöglichte es, durch Einkreuzen der Transgenallele der einzelnen Transgenlinien in den genetischen Hintergrund der *spastischen* Maus, Mausstämme zu erhalten, die Unterschiede bezüglich der Transkriptionsrate des GlyR β -Gens aufweisen.

Das Einbringen der Transgenkopien der Mauslinie mit der höchsten Transgentranskription (Linie 416) in den genetischen Hintergrund der *spastischen* Maus verhinderte die Ausprägung ihres dramatischen Phänotyps. Der mutante Phänotyp der homozygoten *spa* Maus kann also durch Erhöhung der GlyR β -Expression therapiert werden. Dies bestätigt den Kausalzusammenhang zwischen der identifizierten Mutation, die zum Mangel an β -Untereinheiten führt, und der Manifestierung der Bewegungsstörungen. Mit Hilfe der entwickelten Mausstämme war es darüber hinaus zum ersten Mal möglich, die Abhängigkeit der GlyR α -Expression von der Verfügbarkeit funktioneller β -Transkripte quantitativ zu erfassen.

Die Quantifizierung der β -Transkription im Nervensystem homozygoter *spa* Mausmutanten zeigte zunächst, daß diese in Übereinstimmung mit den publizierten Daten (Kingsmore et al., 1994; Mühlhardt et al., 1994) lediglich 8% der Menge an funktionellen β -Transkripten voller Länge einer Wildtypmaus besitzen (Tab.6). Auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunochemischen Analysen ihrer neuronalen Membranproteine bestätigten, daß es gleichzeitig mit der Beeinträchtigung der Expression der GlyR β -Untereinheit zur Reduktion der Menge an ligandenbindenden α -Untereinheiten kommt. Darüber hinaus bestätigten Ligandenbindungsstudien, daß die Menge an GlyR α -Komplexen im Nervensystem dieser Tiere verglichen zu Wildtypmäusen um 80% vermindert ist. In entsprechenden RNA-Analysen, die an Mäusen mit dem Genotyp *spa/spa*^{416/-} durchgeführt wurden, konnte eine Gesamtmenge an vollständigen β -Transkripten von 24% nachgewiesen werden. Da bis heute kein geeigneter, gegen das β -Protein gerichteter Antikörper verfügbar ist, war ein direkter Nachweis des transgenen β -Proteins bzw. eine quantitative Analyse der in der neuronalen Membranfraktion erscheinenden β -Untereinheiten bislang nicht möglich. Die gleichzeitig mit der Steigerung der β -Transkriptmenge beobachtete Zunahme des membrangebundenen α -Proteins im ZNS der *rescue* Mäuse, gemessen in der *Western Blot* Analyse, und die gesteigerte [³H]-Strychninbindungskapazität auf ca. 60% des

Normalwerts ließ jedoch darauf schließen, daß die nachgewiesenen Transgentranskripte in ein biologisch wirksames Transgenprodukt übersetzt wurden. Darüber hinaus zeigt dieses Ergebnis, daß die Zahl der an der Membranoberfläche erscheinenden, funktionellen GlyR_A-Molekülen *in vivo* unmittelbar an die Verfügbarkeit funktioneller β -Untereinheiten gebunden ist.

Genotyp	Menge an β -Transkripten mit voller Länge	α -Protein	GlyR _A
spa/spa	8%	(+)	20%
spa/spa ^{415/-}	9%	(+)	n.d.
spa/spa ^{456/-}	13%	+	n.d.
spa/spa ^{456/456}	n.d.	++	n.d.
spa/spa ^{416/-}	24%	+++	60%
spa/spa ^{416/416}	45%	++++	n.d.
spa/wt	68%	n.d.	100%
wt/wt	100%	+++++	100%

Tab.6 Korrelation von relativer GlyR β -Transkriptmenge und der Menge an membranständigem α -Protein (nachgewiesen mittels *Western Blot* Analyse) bzw. der Menge an GlyR_A-Molekülen, gemessen an der [³H]-Strychninbindungsaktivität spinaler Membranen. n.d. = Messung nicht durchgeführt.

Geht man davon aus, daß die Menge an identifizierten, vollständigen β -Transkripten in den Mäusen *spa/spa*, *spa/spa*^{456/-}, *spa/spa*^{416/-} und *spa/wt* die Menge an funktionellem β -Protein reflektiert, so zeigt die quantitative Analyse, daß die Menge an ligandenbindenden GlyR_A-Komplexen zunächst proportional mit der Menge an verfügbaren β -Untereinheiten steigt (Tab.6). Daß die β -Untereinheit auf die Akkumulation der ligandenbindenden α -Untereinheit, und damit die auf GlyR_A-Expression, direkt limitierend wirkt, wurde darüber hinaus durch die biochemischen Analysen der *spa/spa* Mäuse mit zwei Transgenallelen der Linie 416 bzw. der Linie 456 verdeutlicht. Im ZNS dieser Tiere, deren transgen-vermittelte β -Transkriptionsrate, im Vergleich zu den Tieren mit jeweils nur einem Transgenallel, durch einen Gen-Dosis-Effekt weiter angehoben werden konnte, war zudem ein quantitativer Anstieg an membrangebundenen α -Protein zu beobachten (Tab.6). Bei einer GlyR β -Transkriptmenge von 67%, die im Nervensystem heterozygoter *spa* Mäuse (*spa/wt*) nachgewiesen wurde, erreicht die [³H]-Strychninbindungskapazität der spinalen Neuronen den Maximalwert und ist mit der der Wildtypiere vergleichbar. Dies läßt darauf schließen, daß die GlyR_A-Expression lediglich bis zu einem Grenzwert von der Verfügbarkeit vollständiger β -Transkripte und damit funktioneller GlyR

β -Untereinheiten abhängig ist. Eine detaillierte Ligandenbindungsanalyse der Tiere mit dem Genotyp *spa/spa*^{416/416} könnte zeigen, ob der angesprochene Grenzwert bei 67% oder bereits bei 45% an β -Transkripten mit voller Länge erreicht ist.

Die Analyse der beschriebenen Mausstämmen machte deutlich, daß GlyR_A-Moleküle *in vivo* nur an der Membranoberfläche erscheinen, wenn die β -Untereinheit am Komplex beteiligt ist. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den jüngsten Erkenntnissen, denen zu Folge die β -Untereinheit die Bindung des Ankerproteins Gephyrin an das Rezeptorpentamer vermittelt und damit für die korrekte Lokalisation des GlyR_A-Komplexes essentiell ist (Meyer et al., 1995; Kirsch et al., 1995). Gleichzeitig steht das Ergebnis jedoch im Gegensatz zu den Erkenntnissen aus den Experimenten mit *in vitro* Systemen (Schmieden et al., 1989; Sontheimer et al., 1989; Kirsch et al., 1995). Hier konnte gezeigt werden, daß $\alpha 1$ -Untereinheiten *in vitro* auch ohne die Anwesenheit der β -Untereinheit zu funktionellen Chloridkanälen komplexieren. Diese Diskrepanz unterstreicht die Bedeutung von *in vivo* Tiermodellen für das Studium der physiologischen Funktion von Rezeptorkomponenten und der molekularen Grundlagen neuronaler Rezeptorfunktionen.

2. Eine GlyR_A-Expression von 60% ist ausreichend, um die Ausprägung aller spastischen Verhaltensmerkmale zu verhindern

Neben dem Einfluß der β -Untereinheit auf die GlyR_A-Expression konnte durch die Verwendung von *in vivo* Modellen zum ersten Mal untersucht werden, in wieweit sich eine gezielte quantitative Veränderung der GlyR_A-Menge auf den gesamten Organismus auswirkt.

Durch die Charakterisierung der *spastischen* Maus war bereits bekannt, daß der fast vollständige Verlust des glyzinergeren Systems im homozygoten Tier zur Ausprägung von komplexen Verhaltens- und Bewegungsstörungen führt (Becker et al., 1988). In Ligandenbindungsstudien an neuronalen Membranen heterozygoter *spa* Mutanten konnte, gemessen an der Strychninbindungskapazität, keine Beeinträchtigung der GlyR_A-Expression nachgewiesen werden. Die spontan entstandene Mausmutante *spastic* stellt somit lediglich ein "Alles-oder-Nichts-Tiermodell" dar. Im Gegensatz dazu ließ die Analyse der GlyR β -transgenen Mausstämmen quantitative Aussagen über die Wechselbeziehung von GlyR_A-Expression und den phänotypischen Komponenten (Tremor, "*hind feet clasping*", Aufrichtreflex, männliche Infertilität) zu. Hierbei zeigte sich, daß bei Zunahme der GlyR_A-Expression, gemessen an der Menge des im *Western Blot* nachweisbaren α -Proteins, der mutante Phänotyp schrittweise gemildert wird und sich dabei in die einzelnen Komponenten zerlegen läßt (Tab.7). So litten die Mäuse (*spa/spa*^{456/-}), deren GlyR_A-Menge sich nur geringfügig von der der *spa/spa* Maus unterschied, unter einem starken Tremor, pressten ihre Hinterbeine an den Körper und die

Männchen waren zeugungsunfähig. Bezüglich ihres Aufrichtreflexes war jedoch eine, wenn auch geringfügige Verbesserung zu beobachten. Eine Steigerung der GlyRA-Expression (*spa/spa*^{456/456}) führte zu einer weiteren Verbesserung des Aufrichtreflexes und zur Wiederherstellung der männlichen Fertilität. Das "*hind feet clasping*" blieb in diesen Tieren dagegen erhalten, und sie manifestierten weiterhin einen leichten Tremor. Die Erhöhung der GlyRA-Expression auf 60% des Normalwerts (*spa/spa*^{416/-}) reichte bereits aus, um die Ausprägung aller *spastischen* Verhaltensmerkmale zu verhindern. Dies zeigt einerseits, daß eine verhältnismäßig geringe Menge an funktionellen GlyRA-Molekülen ausreicht, um die vollständige Wirksamkeit des glyzinergeren Systems zu gewährleisten. Andererseits kann die absolute "Mindestmenge" an GlyRA-Molekülen, die für die vollständige Funktion der glyzinergeren Nervenübertragung bzw. für das Ausbleiben der einzelnen phänotypischen Komponenten erforderlich ist, erst nach Durchführung der, für die Zukunft geplanten Ligandenbindungsstudien an Rückenmarkspräparation der *spa/spa*^{456/-} und *spa/spa*^{456/456} Mäuse weiter eingegrenzt werden.

Genotyp	Tremor	<i>hind feet clsp.</i>	Aufrichtreflex	Infertilität	GlyR	
					α	[³ H]Str.
<i>spa/spa</i>	+++	+++	+++	+++	(+)	20%
<i>spa/spa</i> ^{456/-}	+++	+++	++	+++	(+)	n.d.
<i>spa/spa</i> ^{456/456}	+	+++	+	-	++	n.d.
<i>spa/spa</i> ^{416/-}	-	-	-	-	+++	60%
<i>spa/spa</i> ^{416/416}	-	-	-	-	++++	n.d.
<i>spa/wt</i> bzw. <i>wt/wt</i>	-	-	-	-	+++++	100%

Tab.7 Komponentenzerlegung des Phänotyps bei differentieller GlyRA-Expression

Die Anzahl der "+" in der Tabelle gibt über die Intensität der jeweiligen Komponente des mutanten Phänotyps Auskunft, wobei "-" den Wildtypphänotyp und "+++" den *spastischen* Phänotyp darstellt. Die phänotypischen Komponenten sind die Manifestierung des Tremors (Tremor), das Anpressen der Hinterbeine an den Körper (*hind feet clsp.*), Schwierigkeiten bei Erreichen der aufrechten Körperstellung (Aufrichtreflex) und die Zeugungsunfähigkeit männlicher Tiere (Infertilität).

GlyR: GlyRA-Expression.

α : Relative Menge an α -Protein, das mit Hilfe der *Western Blot* Analyse im Nervensystem der Tiere nachgewiesen wurde.

[³H]Str.: Menge an funktionellen GlyRA-Molekülen, gemessen an der [³H]-Strychninbindungskapazität spinaler Membranen.

n.d. = Messung nicht durchgeführt

Die Möglichkeiten der Therapie von Hyperekplexiepatienten sind unbefriedigend und beschränken sich auf die Gabe von Relaxantien (Meinck et al., 1994, 1995). Das Entwickeln wirksamer therapeutischer Möglichkeiten ist daher dringlich. Insbesondere von der Anwendung molekulargenetischer Methoden werden neue Therapieansätze erhofft. Die entwickelten Tiermodelle zeigen, daß eine Therapie von GlyR-Defekten durch einen genomischen Gentransfer grundsätzlich möglich ist. Dies unterstützt die Bemühungen um die Entwicklung von somatischen Gentransfermethoden, die zur Therapie von Erbkrankheiten auch beim Menschen einsetzbar sind. Für eine somatische Gentherapie von Hyperekplexiepatienten müßten sich Neurone selektiv transfizieren lassen. Hierfür wird der Einsatz von neurotrophen viralen Vektoren, wie z.B. replikationsdefiziten, adenoviralen Vektoren diskutiert, die bereits erfolgreich für den Gentransfer in neuronale Gewebe herangezogen wurden (Stratford-Perricaudet und Perricaudet, 1994). Darüber hinaus kann die Erkenntnis aus der Analyse der entwickelten Tiermodelle, daß bei der Maus bereits durch eine geringfügige Verbesserung der glyzinergen Nervenübertragung eine wesentliche Verbesserung der dramatischen Bewegungsstörungen erreicht werden kann, bei der Entwicklung von neuen Behandlungsmethoden für Hyperekplexiepatienten nützlich sein.

3. Transgene Expression humaner $\alpha 1$ -Untereinheiten im zentralen Nervensystem der Mausmutante *oscillator* führt zu einer partiellen Komplementierung ihres mutanten Phänotyps

Voraussetzung für die Untersuchung des Pathomechanismus der mutierten GlyR $\alpha 1$ -Untereinheiten von Hyperekplexiepatienten im Mausmodell ist, daß gemischte GlyR-Komplexe aus murinen GlyR β - und humanen GlyR $\alpha 1$ -Untereinheiten in der Maus funktionsfähig sind. Die erfolgreiche Substitution der murinen GlyR β -Untereinheit durch die β -Untereinheit der Ratte bei der Komplementation des *spastischen* Phänotyps hatte bereits gezeigt, daß GlyR-Untereinheiten über Speziesbarrieren hinweg wirksam sein können. Um zu überprüfen, ob humane GlyR $\alpha 1$ -Untereinheiten die murinen *in vivo* substituieren können, wurde versucht, den mutanten Phänotyp der $\alpha 1$ -defizienten Mausmutanten *spasmodic* und *oscillator* durch Einbringen der cDNA für die $\alpha 1$ -Untereinheit des Menschen zu komplementieren.

Für die Beantwortung dieser Fragestellung wurde zunächst versucht, den mutanten Phänotyp der *spasmodischen* Mausmutante durch neuronale Expression der humanen GlyR $\alpha 1$ -Untereinheit zu komplementieren. Diese Mausmutante trägt eine Punktmutation im Gen für ihre $\alpha 1$ -Untereinheit. Es gibt Hinweise, daß eine Beteiligung der mutierten $\alpha 1$ -Untereinheit am Glyzinrezeptorkomplex

dessen Affinität zu den Agonisten Glyzin, β -Alanin und Taurin reduziert (Ryan et al., 1994; Saul et al., 1994).

In einem zum Komplementationsexperiment der *spa* Maus analogen Versuchsansatz wurden zunächst Mauslinien entwickelt, die die GlyR α 1-Untereinheit des Menschen in ihrem Nervensystem überexprimieren. Anschließend wurde das Transgen der Linie 43, die neben der Linie 44 die höchste Transgenexpression aufwies, durch Brütungen in den genetischen Hintergrund der *spasmodischen* Maus eingebracht. Ein Einsatz der Linie 44 war nicht möglich, da deren Transgenlocus auf Chromosom 11 lag und damit mit dem *spd* Locus gekoppelt vererbt wurde.

Die phänotypische Analyse der Mäuse mit dem Genotyp *spd/spd*⁴³ zeigte, daß, im Gegensatz zu der erfolgreichen Therapie des *spastischen* Phänotyps, die Expression der humanen GlyR α 1-Untereinheit die Manifestierung des *spasmodischen* Phänotyps nicht verhindern kann. Hierfür können mehrere Ursachen diskutiert werden:

1. *Die transgene α 1-Untereinheit erscheint nicht in der Plasmamembran von Rückenmarks- und Stammhirnneuronen*

Aufgrund der hohen Konzentration an endogenem α 1-Protein im Rückenmark war ein direkter Nachweis des gleichgroßen, transgenen Proteins dort nicht möglich. Mit Hilfe der durchgeführten *Western Blot* Analyse konnte lediglich gezeigt werden, daß das Transgenprodukt in den Membranen von Zellen des Großhirns erscheint. Dabei konnte zum Einen nicht geklärt werden, ob das transgene α 1-Protein die Plasmamembran dieser Zellen erreicht. Zum anderen blieb unklar, ob es in den eigentlichen Zielgewebe, dem Rückenmark und Stammhirn exprimiert wird. Die Tatsache jedoch, daß die transgene β -Untereinheit, deren cDNA unter demselben Promotor steht, den *spastischen* Phänotyp komplementieren kann, also offensichtlich in den Zielzellen exprimiert wird, spricht gegen diese Hypothese. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß der transgenen cDNA durch die Veränderung ihrer 3'- bzw. 5'-untranslatierten Bereiche, die bei der Klonierung der cDNA vorgenommen wurden, Sequenzbereiche entfernt wurden, die für eine positive, posttranskriptionelle Regulation der α 1-cDNA im Rückenmark von Bedeutung sind.

2. *Die Konzentration des Transgenprodukts ist zu gering, um die defekte GlyR α 1-Untereinheit aus dem Rezeptorkomplex zu verdrängen.*

Bisher ist unklar, wieviel funktionelles Protein benötigt wird, um defekte α 1-Untereinheiten aus dem Rezeptorkomplex zu verdrängen. Nimmt man an, daß in heterozygoten *spd* Mäusen keines der Allele bevorzugt exprimiert wird, so sind in diesen Tieren ebenso viele funktionsfähige wie mutierte α 1-Untereinheiten verfügbar. Das Ausbleiben eines mutanten Phänotyps in diesen Tieren läßt darauf schließen, daß bei einer solchen Verteilung der Untereinheiten die Funktionsfähigkeit des glyzinerigen Systems erhalten bleibt. In der homozygoten *spd* Maus sind alle vorhandenen α 1-

Untereinheiten mutiert. Eine Voraussetzung für das Gelingen des Rettungsexperimentes war folglich, daß das Transgenprodukt in ebenso hoher Konzentration in den Zielgeweben vorliegt wie die endogene, defekte $\alpha 1$ -Untereinheit. Es ist also denkbar, daß die durch den NSE-Promotor vermittelte Transgenexpression der Linie 43 nicht ausreichte, um die für eine erfolgreiche Verdrängung erforderliche Konzentration an funktionellen $\alpha 1$ -Untereinheiten zu erhalten. Die Entwicklung neuer Transgenkonstrukte mit stärkeren Promotoren, die nun zur Verfügung stehen, wird zeigen, ob durch eine Erhöhung der Konzentration an Transgenprodukt die Verdrängung der defekten $\alpha 1$ -Untereinheit aus dem GlyR-Pentamer möglich ist.

3. Die humane $\alpha 1$ -Untereinheit kann das murine Protein nicht ersetzen.

In den *in vitro* Systemen wurde die humane GlyR $\alpha 1$ -Untereinheit stets allein oder lediglich gemeinsam mit der β -Untereinheit der Ratte eingesetzt und auf ihre Eigenschaften hin untersucht (Schmieden et al., 1989, 1992; Sontheimer et al., 1989; Kuhse et al., 1990a, 1990b; Grenningloh et al., 1990b). Es ist also nicht bekannt, ob das humane $\alpha 1$ -Protein mit der murinen β -Untereinheit *in vivo* einen funktionellen GlyR-Komplex bilden kann. Aufgrund der außerordentlich hohen (99%) Sequenzidentität zwischen den murinen und humanen $\alpha 1$ -Untereinheiten scheint dies jedoch äußerst wahrscheinlich. Inwieweit humane und murine GlyR-Komponenten tatsächlich miteinander in eine funktionelle Wechselwirkung treten, könnte durch den Einsatz der cDNA für die humane $\alpha 1$ -Untereinheit mit den kürzlich klonierten cDNAs für die murine $\alpha 1$ - bzw. β -Untereinheit im *Xenopus* Oocytensystem untersucht werden.

Eine weitere Möglichkeit, diese Fragen zu beantworten, bot die Mausmutante *oscillator*. Die *ot* Maus trägt, wie die *spd* Mutante, eine Mutation im Gen für ihre $\alpha 1$ -Untereinheit. Jedoch führt die *ot* Mutation zu einem Translationsabbruch, was in der homozygoten *ot* Maus den völligen Verlust der $\alpha 1$ -Untereinheit zur Folge hat (Buckwalter et al., 1994). Zur Wiederherstellung des glyzinerigen Systems dieser Maus muß die transgene Untereinheit keine defekte Untereinheit verdrängen, sondern lediglich eine fehlende ersetzen. Für eine solche Substitution wird vermutlich eine geringere Konzentration an funktionellen Untereinheiten benötigt. Wenn das transgene, humane $\alpha 1$ -Protein in der Maus funktionell wäre und zudem in ausreichender Konzentration vorläge, müßte der mutante Phänotyp der *ot* Maus durch die Expression des Transgens komplementiert werden.

Nach Einbringen des Transgenlocus der Linie 43 in den genetischen Hintergrund der homozygoten *ot* Maus konnte eine vollständige Komplementation ihres mutanten Phänotyps nicht festgestellt werden. So manifestierten alle aus den Kreuzungsexperimenten erhaltenen *ot/ot* Mäuse, ungeachtet dessen, ob der Transgenlocus vererbt worden war oder nicht, die für *ot* typischen Krankheitssymptome mit gleicher Intensität. Bei genauerer Analyse stellte sich jedoch heraus, daß 72% der homozygoten *ot/ot* Mäuse mit Transgen die Krankheitssymptome zwischen ein und fünf

Tage später manifestierten als ihre nicht-transgenen Geschwister. Dies läßt vermuten, daß heterogene Komplexe aus murinen und humanen GlyR-Untereinheiten gebildet werden und funktionell sind. Als Erklärung für die lediglich partielle Komplementation bieten sich zwei Alternativen:

Eine Möglichkeit wäre, daß die entstandenen Komplexe, an denen die humanen α 1-Untereinheit beteiligt ist, nicht vollständig aktiv sind. Dies ist zwar denkbar, jedoch sind, wie bereits erwähnt, weitreichende Sequenzbereiche der α 1-Untereinheit in Mensch und Maus vollständig konserviert. Daß die humane α 1-Untereinheit das murine Protein nur unvollständig ersetzen kann, ist daher eher unwahrscheinlich, muß jedoch in *in vitro* Experimenten geprüft werden.

Wahrscheinlicher ist, daß die Transgenprodukte nicht in der Konzentration vorliegen, die für die Bildung einer für eine normale Funktion des glyzinerge System ausreichenden Menge an GlyRA-Molekülen erforderlich ist. Dies könnte auch das verzögerte Einsetzen der Krankheitssymptome bei den entwickelten Tieren erklären: Bei *ot/ot* Mäusen manifestieren sich die Krankheitssymptome, wenn die Menge an verfügbarem α -Protein durch den Rückgang der α 2-Expression einen "Mindestwert" unterschreitet (zwischen dem dreizehnten und vierzehnten Tage nach der Geburt, P13/ P14). Bei gesunden Tieren wird die Unterschreitung dieser "Mindestmenge" durch das zur Verfügungstellen von α 1-Untereinheiten, die frühzeitig in ausreichender Menge gebildet werden, vermieden. Bei den α 1-transgenen *ot/ot* Mäusen wird die Unterschreitung des Mindestwerts an P13/ P14, aufgrund der Verfügbarkeit zusätzlicher α -Untereinheiten transgenen Ursprungs, zunächst verhindert. Die transgen-vermittelte Expression reicht jedoch nicht aus, um die erforderliche Gesamtmenge an α -Protein bei einem weiteren Rückgang an endogener α 2-Expression bereitzustellen und es kommt, zu einem späteren Zeitpunkt, zur Ausprägung der Krankheitssymptome. Die geplante Entwicklung von Tieren mit höherer Transgenexpression wird zeigen, ob es möglich ist, die, für eine normale Funktion des glyzinerge Systems erforderliche Mindestmenge an funktionellem α -Protein bereitzustellen und damit auch den Phänotyp dieser Mutante vollständig zu komplementieren.

Mit der Verwendung der Mausmutante *oscillator* ist es gelungen, die Wirksamkeit von gemischten GlyR-Komplexen aus murinen und humanen Untereinheiten *in vivo* aufzuzeigen. Darüber hinaus ermöglichen die hier entwickelten Mausmodelle zum ersten Mal den Nachweis des humanen α 1-Proteins im Rückenmark von Mäusen. So wird es möglich sein, mit Hilfe von immunochemischen Untersuchungen und Ligandenbindungsstudien an Rückenmarkspräparationen dieser Tiere, den Einfluß der transgenen GlyR α 1-Untereinheiten auf die GlyRA-Expression der Mausmutante *oscillator* quantitativ zu erfassen.

4. Transgene Expression der dominant negativen GlyR α -Untereinheit Ch1 führt zu einer beeinträchtigten Expression der ligandenbindenden α -Untereinheit und zu einem milden Phänotyp

Die α 1-Untereinheit der Hyperekplexiepatienten wirkt als dominant negative Rezeptorkomponente auf die Funktion des Glyzinrezeptors. Die Eigenschaften solcher GlyR-Komponenten wurden bis heute ausschließlich in *in vitro* Systemen untersucht. Die vollständige Aufklärung des Pathomechanismus dominant negativ wirkender GlyR-Untereinheiten erfordert jedoch das Studium ihrer Eigenschaften in Tiermodellen, mit denen ihre Einflüsse auf die komplexen Mechanismen im gesamten Organismus erfaßt werden können. Ein zweites Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, durch die gezielte Veränderung der GlyR-Aktivität *in vivo* (*funktionaler Knockout*) ein weiteres Modellsystem zu schaffen, das zum Studium von dominant negativen GlyR-Defekten und ihren Auswirkungen auf die glyzinerge Nervenübertragung geeignet ist, und mit dessen Hilfe neue Erkenntnisse über die molekularen Grundlagen des glyzinergen Systems auch im Gesamtzusammenhang des Organismus gesammelt werden können.

Zur Entwicklung eines solchen Mausmodells wurden Mauslinien etabliert, die die cDNA der rekombinanten GlyR-Untereinheit Ch1 als Transgen in ihrem Genom tragen. Für diese Untereinheit konnte in *in vitro*-Experimenten ein dominant negativer Effekt auf die Aktivität des GlyR nachgewiesen werden. Molekularbiologische Analysen und Verhaltensstudien an den entwickelten Tieren sollten ihren Einfluß auf das glyzinerge System *in vivo* aufzeigen:

Die Analyse der mRNAs aus dem Nervensystem der drei etablierten Ch1-transgenen Linien zeigte zunächst, daß der Transgenlocus in allen Linien, wenn auch mit niedriger Rate, transkribiert wurde. Bei den Mitgliedern der Linie 344, die im Vergleich zu den Linien 581 und 639 die höchste transgene Transkriptionsrate aufwies, wurde ein milder Phänotyp mit geringer Penetranz induziert. Diese Tiere pressten beim Hochnehmen am Schwanz ihre Hinterbeine fest an ihren Körper (*hind feet clasp*), ein Verhaltensmerkmal, das sich nur sehr subjektiv beurteilen läßt und nicht meßbar ist. Jedoch waren zwischen einzelnen Individuen der Linie 344 Unterschiede bezüglich der Intensität dieses Verhaltensmerkmals zu erkennen. Das "*hind feet clasp*" war bei den Transgenträgern, die ein Transgenallel der Linie 581 bzw. 639 in ihrem Genom tragen, nicht zu beobachten.

Das Auftreten dieser, für *spa* bzw. *spd* Mäuse charakteristischen Bewegungsstörung ließ eine Beeinträchtigung der glyzinerge Nervenübertragung vermuten. Dies konnte in biochemischen Analysen bestätigt werden: So konnten im Nervensystem der Tiere der Linie 344, verglichen mit *DBA/2*-Wildtypmäusen, jeweils geringere Mengen an ligandenbindendem α -Protein an der Membranoberfläche nachgewiesen werden. Da die Menge an nachweisbarem α -Protein über die Menge an funktionellen GlyR-Molekülen Auskunft gibt, weist dieser Befund gleichzeitig auf eine

veränderte GlyR_A-Expression hin. Die Beeinträchtigung der α -Expression war jedoch in allen untersuchten Tieren geringer als in homozygoten *spa* Mäusen und differierte, wie die Intensität des Phänotyps, jeweils von Tier zu Tier. Die geringfügige Beeinflussung der α -Expression erklärt, daß es in diesen Tieren nicht zur Ausprägung des gesamten Krankheitsbildes der Mausmutante *spastic*, sondern lediglich zur Ausprägung der vermutlich mildesten Form des *spastischen* Phänotyps kam. So ist die Menge an verbleibenden, funktionellen GlyR_A-Molekülen offenbar ausreichend, um die Manifestierung der dramatischeren Merkmale des mutanten Phänotyps (Tremor, gestörter Aufrichtreflex, männliche Infertilität) zu verhindern. Dies bestätigt die Erkenntnisse aus den Experimenten zur Komplementation des *spastischen* Phänotyps, in denen unter anderem gezeigt werden konnte, daß bei einer allmählichen Steigerung der GlyR_A-Expression die einzelnen Verhaltensmerkmale dieses komplexen Phänotyps schrittweise verschwinden, und daß für die Funktion des glyzineren Systems bereits eine verhältnismäßig geringe Menge an intakten GlyR_A-Molekülen ausreichend ist.

Insgesamt hatte die Ch1-Untereinheit in den erzielten Transgenlinien eine verhältnismäßig geringe Wirkung auf deren glyzineres System. Die niedrige Ausbeute an *Foundertieren* bei der Etablierung der Ch1-transgenen Mäuse läßt jedoch vermuten, daß die Ch1-Komponente, wird sie in großen Mengen gebildet, letale Auswirkung auf das Überleben der Embryonen hat, und daß daher nur Tiere geboren werden, die lediglich eine niedrige Transgenexpression aufweisen. So wird das Transgenprodukt, vermittelt durch den NSE-Promotor, der eine Promotoraktivität bereits am vierzehnten Tag der Embryonalentwicklung entfaltet (Forss-Petter et al., 1990), vermutlich auch prenatal exprimiert. Da α 1-Untereinheiten und α 2-Untereinheiten Heteropentamere bilden können (Kuhse et al., 1993), könnte sich die Ch1-Untereinheit an der neonatalen Glyzinrezeptorform beteiligen und, durch Einbringen β -typischer Transmembrandomänen, die im nativen GlyR_N vermutlich nicht vorkommen (Betz et al., 1994), dessen Eigenschaften völlig verändern. Eine hohe Transgenexpression hätte demnach eine stark beeinträchtigte physiologische Funktion des GlyR_N im sich entwickelnden Embryo zur Folge.

Auf welche Weise die Ch1-Untereinheit die GlyR α -Expression im Nervensystem der Mitglieder der Linie 344 beeinflusst, muß noch geklärt werden, jedoch wäre folgender Mechanismus denkbar: Im adulten Tier konkurrieren die Ch1-Untereinheiten beim Rezeptorzusammenbau mit endogenen α 1-Untereinheiten um einen Platz im Pentamer. Nimmt man an, daß GlyR-Komplexe, an denen Ch1-Untereinheiten beteiligt sind, *in vivo* instabil sind, so sind weder die Ch1-Untereinheiten noch die α 1-Untereinheiten dieser Heteropentamere in der Membranfraktion nachzuweisen. Nimmt man zudem an, daß bereits eine Ch1-Untereinheit im Pentamer einen negativen Effekt ausübt, so ist schon eine relativ geringe Ch1-Proteinexpression ausreichend, um die Menge an funktionellem Rezeptor wesentlich herabzusetzen.

Ursache für die Instabilität dieser Komplexe *in vivo* wäre die Zunahme an β -typischen Transmembranbereichen durch die Beteiligung der Ch1-Komponente: So ist das Rezeptorankerprotein Gephyrin an die cytoplasmatische Schleife zwischen der dritten und vierten Transmembrandomäne der β -Untereinheit gekoppelt (Meyer et al., 1995). Eine zusätzliche β -typische Transmembrandomäne im Rezeptorprotein könnte demnach zur Beteiligung einer zusätzlicher Gephyrinkomponente und damit zu sterischen Hinderungen führen. Wieviele $\alpha 1$ -Untereinheiten verdrängt werden bzw. wieviele GlyR-Moleküle betroffen sind, wäre dabei unmittelbar von der Konzentration der gebildeten Ch1-Untereinheiten abhängig. Dies würde erklären, daß das glyzinerge System der erzielten *Founderlinien*, die vermutlich aufgrund ihrer verhältnismäßig niedrigen Transgenexpression überlebt haben, nur geringfügig beeinträchtigt ist.

Die Erkenntnisse, die durch den Einsatz des Ch1-Transgenkonstrukts im Tiermodell gewonnen wurden, stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen aus entsprechenden Experimenten mit *in vitro* Systemen. So konnte ein Einfluß der Ch1-Komponente auf die posttranslationale Regulation des Rezeptors im Oocyten-System nicht nachgewiesen werden (Kuhse et al., 1993; Kuhse und Borman, unveröffentlichte Daten). Diese Abweichung im Wirkmechanismus der Ch1-Untereinheit weist daraufhin, daß *in vitro* Systeme die *in vivo* Situation nicht unbedingt repräsentieren. Dies unterstreicht die Bedeutung von Tiermodellen bei der Untersuchung der molekularen Grundlagen der glyzinerger Nervenübertragung und der Erforschung der Pathomechanismen mutierter GlyR-Untereinheiten von Mensch und Tier.

Material und Methoden

A. Materialien

Allgemein gebräuchliche Chemikalien

Merck, Darmstadt
 Roth, Karlsruhe
 Serva, Heidelberg
 Sigma, München

Spezielle Chemikalien

Ampicillin	Sigma, München
APS	Appligen, Heidelberg
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit
Desoxynucleosidtriphosphate	Pharmacia, Freiburg
	Boehringer, Mannheim
Ethidiumbromid	Sigma, München
β -Mercaptoethanol	BioRad, München
Oligonukleotide	MWG Biotech, Ebersberg
Polyacrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Seakem LE Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
TEMED	BioRad, München
BSA	Serva, Heidelberg

Enzyme

alkalische Phosphatase (CIP)	Böhringer, Mannheim
AMV Reverse Transkriptase	Stratagene, Heidelberg
Klenow Enzym	Promega Biotec, Heidelberg
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim
	Biolabs, Frankfurt
	Pharmacia, Freiburg
	USB/ Amersham, Braunschweig
	Promega Biotec, Heidelberg
RNase A (Rinderpankreas)	Sigma, München
RNase A	Boehringer, Mannheim

T4-DNA Ligase	Promega Biotec, Heidelberg
T4-Polynukleotidkinase	USB/ Amersham Braunschweig
Taq Polymerase	Amersham, Braunschweig Pharmacia, Freiburg

Radiochemikalien

α - ³² P-dCTP (370 MBequerel/ml)	Amersham, Braunschweig
α - ³⁵ S-dATP (296 MBequerel/ml)	Amersham, Braunschweig

Kits

JETSorb	Genomed, Bad Oyenhausen
Prime It II	Stratagene, Heidelberg
Qiagen tip 500	Diagen, Düsseldorf
Sequenase Sequencing Kit	USB/ Amersham, Braunschweig

sonstige Materialien

Bakterienschalen	Greiner, Nürtingen
Blaukappengefäße (15 und 50 ml)	Greiner, Nürtingen
HybondN ⁺ Membranen	Amersham, Braunschweig
Hyperfilm TM Röntgenfilme	Amersham, Braunschweig
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel
PCR Reaktionsgefäße	Perkin Elmer Cetus, Norwalk (USA)
Eppendorfreaktionsgefäße	Greiner, Nürtingen
Whatmann 3MM Papier	Bender & Hobein, Karlsruhe

Geräte

PCR-Cycler: Gene Amp PCR System 9600	Perkin Elmer Cetus, Norwalk (USA)
HSE Kraftaufnehmer F30 Typs 372 (Transducer)	Hans Sachs Elektronik, Freiburg
Bridge Amplifier Typ 336	Hans Sachs Elektronik, Freiburg
One Channel Recorder Rec1 (Schreibgerät)	Pharmacia, Freiburg

Bakterienstämme

E. coli K12/DH5 α F⁻; endA1; hsdR17 (rk⁻, mk⁺), supE44; thi-1; λ ⁻; recA1; gyrA96; relA1

Der Bakterienstamm wurde aus der Stammsammlung des IGen, Forschungszentrum Karlsruhe bezogen

Kulturmedien für Bakterien

LB:	1 % Bacto-Tryptone (w/v), 0.5 % Bacto-Hefeextrakt (w/v), 1% NaCl, 1 g (w/v) Glukose, mit Wasser auf 1 l aufgefüllt
LB-Selektionsmedium:	LB mit 100µg/ml Ampicillin

Mausstämme

C57/bl6	Charles River, Sulzfeld
DBA/2	Charles River, Sulzfeld
Oscillator (<i>spd^{ot}</i>)	Jackson Laboratory, Bar Harbor (USA)
Spasmodic (<i>spd</i>)	Jackson Laboratory, Bar Harbor (USA)
Spastic (<i>spa</i>)	Jackson Laboratory, Bar Harbor (USA)

Plasmide

pBlueskript SKII+	bakterieller Klonier- und Expressionsvektor Stratagene, Heidelberg
p18SN α 1	von pUC18 (USB/ Amersham) abgeleiteter eukaryontischer Expressionsvektor mit der cDNA für die humane GlyR α 1-Untereinheit (Grenningloh et al., 1990b) unter der Transkriptionskontrolle des NSE-Promotors der Ratte (Sakimura et al., 1987) und der Prozessierungskontrolle des Spleiß- und Polyadenylierungssignal des kleinen T-Antigens des SV40-Virus (Gorman et al., 1982; Hall et al., 1983). Zur Verfügung gestellt von Dr. Hans Weiher, Forschungszentrum Karlsruhe

Antikörper

Mab 4a*	monoklonaler Antikörper der Maus, gerichtet gegen das GlyR α 1- und das GlyR α 2-Protein der Ratte (Pfeiffer et al., 1984)
Mab 2b*	monoklonaler Antikörper der Maus, gerichtet gegen das GlyR α 1-Protein der Ratte (Pfeiffer et al., 1984)
Mab sy38*	monoklonaler Antikörper der Maus, gerichtet gegen das Vesikelprotein Synaptophysin der Ratte (Devoto et al., 1987)
Ziege-anti-Maus-IgG	Sekundärantikörper; polyklonales Antiserum der Ziege, gerichtet gegen Maus Immunoglobulin; Meerrettichperoxidase-konjugiert Amersham, Braunschweig

*Der Antikörper wurde zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe von Prof. Heinrich Betz, MPI für Hirnforschung, Frankfurt/ Main

Oligonukleotide

pNSE*: 5'- CCACTCCTGCTCTCTCT -3'

Nukleotid -86 bis -70 des neuronspezifischen Enolasepromotor (Sakimura et al., 1987)

P6*: 5'- TCCAAAACCTATTAATAAAAAT -3'

Nukleotid 270 bis 256 der GlyR β -cDNA der Maus (Mülhardt et al., 1994)

P9*: 5'- CCCGTGTGCCCCCAACT -3'

Nukleotid 142 bis 159 der GlyR β -cDNA der Maus (Mülhardt et al., 1994)

Pex1*: 5'- CCAGACTTCATGCCTATG -3'

bindet an eine, den Mikrosatelliten *Sat.2* 5'-flankierende Sequenz in Intron 2 des Gens für die GlyR β -Untereinheit der Maus.

Sat.2.2b*: 5'- TATTCCCCTTAGAGTCAG -3'

bindet an eine, den Mikrosatelliten *Sat.2* 3'-flankierende Sequenz in Intron 2 des Gens für die GlyR β -Untereinheit der Maus.

α 3'UTR*: 5'- GTGGGAATAGCACAGGA -3'

Nukleotid 1685 bis 1703 der GlyR α 1-cDNA des Menschen (Grenningloh et al., 1990b)

β 3'UTR*: 5'- GCATTTTGGATGCCACT -3'

Nukleotid 1817 bis 1833 der GlyR β -cDNA der Ratte (Grenningloh et al., 1990a)

SV40-2*: 5'- GTGGTATGGCTGATTAT -3'

Nukleotid 2739 bis 2755 des Polyadenylierungssignals des *small T-Antigens* des SV40-Virus (Tooze, 1980)

GAPDH1*: 5'- AGACAGCCGCATCTTCTTGTGC -3'

Nukleotid 8 bis 29 der GAPDH-cDNA der Ratte (Fort et al., 1985)

GAPDH1*: 5'- CTCCTGGAAGATGGTGATGG -3' (

Nukleotid 358 bis 339 der GAPDH-cDNA der Ratte (Fort et al., 1985)

α 1-Intron 2*: 5'- CCAGGCACTTAGGGGTGG -3'

Nukleotid -122 bis -105 vor Exon 3 im zweiten Intron der GlyR α 1-cDNA der Maus (Saul et al., 1994)

spd/wt*: 5'- CATGGTTGTCTCAGC -3'
Nukleotid 252 bis 238 der GlyR α 1-cDNA der Wildtypmaus (Saul et al., 1994; Ryan et al., 1994)

spd/spd*: 5'- CATGGTTGTCTCAGA -3'
Nukleotid 252 bis 238 der GlyR α 1-cDNA der *spd* Mausmutante (Saul et al., 1994; Ryan et al., 1994)

Pot1*: 5'- GTGTCCTACGTGAAAGCTATTGACATTTG -3'
Nukleotid 1209 bis 1237 der GlyR α 1-cDNA der *spd* Maus (Ryan et al., 1994)

Pot2*: 5'- TGATGTCGCCTCTTCCTCCTAAATC -3'
Nukleotid 1350 bis 1327 der GlyR α 1-cDNA der Maus (Ryan et al., 1994; Buckwalter et al., 1994)

T7: 5'- AATTACGACTCACTATAG -3'
Nukleotid -16 bis +1 des T7-Promotors (Stratagene, Heidelberg)

T3: 5'- ATTAACCCTCACTAAAG -3'
Nukleotid -16 bis +1 des T3-Promotors (Stratagene, Heidelberg)

*Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg bezogen.

Lösungen

20xSSC 175.3 g/l NaCl, 88.2 g/l NaCitrat, pH7.0

TE 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0

10xTBE 54 g/l Tris-Base, 27.5 g/l Borsäure, 10 mM EDTA

PBS 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.7 mM CaCl₂, 0.6 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄

DNA/RNA-Probenpuffer

8% Saccharose (w/v), 50 mM Tris/HCl pH 8, 50 mM EDTA, 5 % Triton X100 (w/v)

Formamid-Denaturierungspuffer

35 µl 37 % Formaldehyd (w/v), 1 µl Etbr (10 mg/ml), 10 µl 20xMOPS, 100 µl Formamid (deionisiert), 54 µl H₂O

20xMOPS 400 mM 3-(N-Morpholino)-Propan-Sulfonsäure (MOPS), 100 mM NaAcetat, 10 mM EDTA, pH7

5xLaemmli-Probenpuffer

10 % SDS (w/v), 50 % Glycerol (w/v), 25 % β-Mercaptoethanol (w/v), 31.25 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.005 % Bromphenolblau (w/v)

Western Transfer Puffer

29 g Tris Base, 145 g Glyzin, 5 g SDS, 1 l Methanol, mit Wasser auf 5 l aufgefüllt

B. Methoden

1. Behandlung von Nucleinsäuren

Auf grundlegende Methoden der Reinigung und Ausfällung von Nucleinsäuren wird nicht eingegangen, da die Methoden standardisiert sind und in molekularbiologischen Laborhandbüchern (Maniatis et al., 1982) nachgeschlagen werden können.

1.1 Bestimmung der Konzentration von Nucleinsäuren

Die Konzentration von Nucleinsäuren in wässriger Lösung wurde spektrometrisch durch Messen ihrer optischen Dichte (OD) bei 260nm bestimmt. Eine OD₂₆₀ von 1.0 entspricht einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40µg/ml RNA. Einen Hinweis auf die Reinheit der Nucleinsäurelösung gibt das Verhältnis OD₂₆₀ zu OD₂₈₀. Dieses sollte bei DNA 1.8:1 und bei RNA 2:1 betragen.

2. Transformation von Bakterien

2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Der Bakterienstamm DH5 α wurde auf einer Agarplatte mit LB-Medium ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Einzelkolonie gepickt und damit eine 6 ml Kultur mit LB-Medium angeimpft. Diese Kultur wurde unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD von 0.28 (bei 600 nm) inkubiert. Mit diesem Ansatz wurde eine 100 ml Kultur mit LB-Medium angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD von 0.48 (bei 600nm) inkubiert. Danach wurden die Bakterien sofort auf Eis gestellt. Nach Sedimentieren der Bakterien bei 1500xg für 10 min bei 4 °C, wurden diese in 10 ml vorgekühltem TFBII-Puffer (100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM KAc, 10 mM CaCl₂, pH 7.2 mit 0.2 M Essigsäure eingestellt) für 3 h auf Eis gestellt. Nach dieser Zeit wurden die Bakterien bei 1500xg für 5 min bei 4 °C sedimentiert, in 10 ml vorgekühltem TFBII-Puffer (10 mM MOPS pH7, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 15% Glycerin (w/v)) resuspendiert, zu je 100 μ l aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2 Transformation kompetenter Bakterien

Ein 100 μ l Aliquot mit kompetenten Bakterien wurde auf Eis aufgetaut, 5 μ l eines Ligationsansatzes (vgl. 5.4) bzw. 20 ng *supercoiled* DNA zugemischt und eine Stunde auf Eis gestellt. Nach 3 min Hitzeschock bei 37 °C und 3 min auf Eis wurden 400 μ l LB-Medium zugegeben und 60 min bei 37 °C geschüttelt. 50, 100 und 200 μ l der Bakteriensuspension wurden anschließend jeweils auf eine Selektiv-Agarplatte ausgestrichen.

2.3 Herstellung von Selektiv-Agarplatten

In einem 2 l Kolben wurden 5 g Hefeextrakt, 10 g Bacto-Trypton, 10 g NaCl, 1 g Glukose und 15 g Bacto-Agar auf 1 Liter mit Wasser aufgefüllt. Diese Mischung wurde autoklaviert. Nach Abkühlen auf etwa 50 °C wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 μ l /ml zugegeben. Die Lösung wurde in Agarplatten (9 cm Durchmesser) gegossen, die, nach Erstarren des Agars, bei 4 °C gelagert wurden.

3. DNA-Techniken

3.1 Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (Miniprep; modifizierte Version nach Birnboim und Doly, 1979)

1.5 ml einer dichtgewachsenen Bakterienkultur wurden in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Die Bakterien wurden dann für 5 min bei 5000xg sedimentiert und der ÜS bis auf einen Rest von 100 µl verworfen. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 200 µl alkalischer SDS-Lösung (200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)). Nach vorsichtigen Mischen wurden 150 µl 3 M Natriumacetat zugegeben und wiederum vorsichtig gemischt. Nach einer zehnmütigen Inkubation auf Eis wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die wässrige Oberphase, welche die DNA enthält, wurde durch Zugabe des 2 1/2fachen Volumens EtOH ausgefällt (15 min bei -80 °C). Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation (10 min, 4°C und 1000xg) pelletiert, in 70%igen EtOH (w/v) gewaschen, erneut abzentrifugiert und im Exsikkator getrocknet. Abschließend wurde die DNA in 100 µl H₂O aufgenommen, 1 µl RNase A (10mg/ml) und 1-2 µl davon der Analyse durch Verdau mittels Restriktionsenzyme unterzogen.

3.2 Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab (Maxiprep nach der Qiagen-Methode)

Die Präparation erfolgte nach dem Protokoll für Quiagen-Ionenaustauschersäulen der Firma Qiagen, Düsseldorf. Dabei wird nach alkalischem Aufschluß der Bakterien (Birnboim et al., 1979) die Plasmid-DNA an einer Säulenmatrix gebunden, gereinigt und anschließend durch Elution gewonnen.

Bakterien einer 250 ml Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation sedimentiert (5 min bei 4 °C und 5000xg). Nachfolgend wurden die Bakterien in 10 ml Puffer P1 (50 mM Tris pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 10 µg/ml RNase A) resuspendiert und nach einer Inkubation von 5 min bei RT mit 10 ml Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)) lysiert. Anschließend wurden 10 ml Puffer P3 (2.55 mM KaAc pH 4.8) zugegeben, vorsichtig geschüttelt und das Gemisch bei 4 °C und 20.000xg für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine, mit Puffer QB (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% EtOH (w/v), pH 7) equilibrierte Qiagen tip 500-Säule gegeben. Nach Bindung der DNA an die Säulenmatrix wurde mit insgesamt 20 ml Puffer QC (1 M NaCl, 5 mM MOPS, 15 % EtOH (w/v), pH 7.0) gewaschen und mit 5ml Puffer QF (1.2 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% EtOH (w/v), pH 8.0) eluiert. Anschließend an eine Isopropanolfällung wurde die DNA gewaschen, getrocknet und in 500 µl H₂O resuspendiert.

3.3 Präparation von DNA aus Mausschwanzbiopsien

Ca. 2 cm einer Mausschwanzbiopsie wurde in 750 µl MT-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS (w/v), 0.5 mg/ml Proteinase K) gegeben und über Nacht bei 55 °C inkubiert. Die Lösung wurde für 5 min in einem Eppendorf-Mixer geschüttelt, 250 µl 5 M NaCl zugegeben und wiederum für 5 min geschüttelt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 5000xg. Anschließend wurde die DNA aus 800 µl des Überstandes mit Isopropanol gefällt, gewaschen und luftgetrocknet. Die getrocknete DNA wurde in 500 µl H₂O resuspendiert und 5 µl RNase A (10 mg/ml) zugegeben. Für einen Restriktionsverdau (vgl 3.4) wurden 50 µl in einem Gesamtvolumen von 100 µl eingesetzt.

3.4 Fragmentierung der DNA durch Restriktionsendonukleasen

Eine Einheit (1U) einer Restriktionsendonuklease ist definiert als die Enzymmenge, die 1 µg DNA des Phagen λ in einer Stunde verdaut. In der Regel wurde ein 2-3facher Überschuß an Enzym verwendet, um einen vollständigen Verdau zu gewährleisten. Die vom Hersteller für die einzelnen Restriktionsenzyme empfohlene Puffer- und Reaktionsbedingungen wurden eingehalten.

4. Agarose-Gelelektrophorese

4.1 Auftrennen von DNA-Fragmenten im Agarosegel

Zur Auftrennung von DNA-Gemischen sowie zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Agarose-Gele verwendet. Die Agarosekonzentration betrug in der Regel 1% (w/v). Zur Auftrennung von Fragmenten mit einer Größe von kleiner 350 bp wurden 2.2% (w/v) Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in TBE-Puffer durch Erhitzen im Mikrowellenherd gelöst und nach Abkühlen auf ca. 60 °C mit Etbr (0.5 µg/ml) versetzt. Die Proben wurden mit 1/5 ihres Volumens mit DNA-Probenpuffer vermischt. Als Laufpuffer diente TBE-Puffer. Die Auftrennung erfolgte bei Feldstärken um 7 V/cm. Die Detektion der DNA-Fragmente im Gel erfolgte durch Fluoreszenz im UV-Licht.

4.2 Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Präparation von DNA-Fragmenten aus Gelstücken wurde mit dem JETSorb Kit der Firma Genomed, exakt nach dem von der Firma empfohlenen Protokoll durchgeführt. Hierbei wird, nach Auflösen des Gelstücks in einer Natriumperchloratlösung, die DNA an Matrixkügelchen gebunden, gewaschen und anschließend durch Elution mit TE gewonnen.

5. Klonierungstechniken

5.1 Dephosphorylierung von DNA

Für das Entfernen von 5'-Phosphatgruppen von linearisierter DNA wurde eine Phosphatasebehandlung durchgeführt. Dabei wurden 5 µg DNA in 1x CIP-Puffer (100 mM Glyzin pH 10.5, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnCl₂) mit 10 U CIP für 60 min bei 37°C inkubiert. Um die DNA anschließend von der Phosphatase zu reinigen wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die DNA wurde mit EtOH ausgefällt, mit 70% EtOH (w/v) gewaschen, getrocknet und in H₂O aufgenommen.

5.2 S1-Nukleaseverdau

Zur Entfernung kurzer DNA-Sequenzen wurden 2 µg linearisierte Plasmid-DNA in 20 µl S1-Reaktionsmix (200 mM NaCl, 50 mM NaAc pH 4.5, 1 mM ZnSO₄, 0.5% Glyzerin (w/v), 10 U S1-Nuklease) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 1 µl 0.5 M EDTA pH 8.0 abgestoppt. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die DNA mit EtOH gefällt, mit 70% EtOH (w/v) gewaschen und getrocknet.

5.3 Auffüllen überhängender Enden mit Klenow-Enzym ("blunting")

Um überhängende 3'-Enden aufzufüllen wurde DNA-Polymerase I-Klenow-Fragment eingesetzt. 1-2 µg DNA wurden in 1x Polymerase-Puffer (7 mM Tris pH 7.5, 7 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT) aufgenommen und in Anwesenheit von 250 µmol dNTPs mit 1U Klenow Enzym für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Zugabe von 1 µl 0.2 M EDTA pH 8.0 inaktiviert und durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion aus der Lösung entfernt. Die DNA wurde mit EtOH ausgefällt, mit 70% EtOH (w/v) gewaschen, getrocknet und in H₂O aufgenommen.

5.4 Ligation von DNA

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten wurden Vektor und Fragment mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten bzw. überhängende Enden aufgefüllt und der Vektor dephosphoryliert. Bei der enzymatischen Verknüpfung von Fragment und Vektor (Ligation) wurden, in einem Reaktionsvolumen von 20 µl, Vektor und Fragment in einem molarem Verhältnis von 1:3 (Gesamt-DNA-Menge: ca. 400 ng) in 1 x Ligasepuffer (20 mM Tris pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT) in Anwesenheit von 1 U T4-Ligase bei 15 °C über Nacht inkubiert.

5.5. cDNA-Synthese (Erststrangsynthese)

1.5 µg gesamt-RNA wurden in einem Endvolumen von 20 µl in 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 5 mM MgCl₂ mit je 1 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 10 U RNase Inhibitor (USB), 2.5 µM *random* Hexanukleotide (Boehringer Mannheim) und 2.5 U AMV-RT (avian myeloblastosis virus reverse transcriptase) 15 min bei 42 °C, 5 min bei 99 °C und 5 min bei 5 °C inkubiert.

5.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

5 µl Erstreaktion (vgl.5.5) oder 2 µl der aus Schwanzbiopsien gewonnenen DNA-Lösung (vgl.3.3) wurden in einem Endvolumen von 50 µl mit je 50 pmol *sense* bzw. *antisense* Startmolekülen in 1xPCR-Puffer (25 mM Tris-HCl pH 9.5, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mg/ml BSA), je 50 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP und 1 U Taq Polymerase in einem PCR-Reaktionsgefäß vermischt. Die PCR-Amplifikationen wurden jeweils im Perkin Elmer GeneAmp 9600 bei folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung:	1 min bei 94 °C
Annealing	1 min bei 55 °C
Synthese	45 sec bei 72 °C

Nach Abschluß von 35 Amplifizierungszyklen bzw. von 22 Amplifikationszyklen bei der Durchführung einer *quantitativen RT-PCR* wurden 20 µl der Reaktion in einem Agarosegel analysiert.

6. Transfer von DNA auf Nylonmembranen (Southern Blotting)

PCR-Reaktionsansätze bzw., mit spezifischen Restriktionsenzymen verdaute, genomische DNA wurden jeweils auf einem Agarosegel geeigneter Konzentration aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel photographiert. Bei Verwendung von genomischer DNA wurde das Gel anschließend 30 min in 0.25 N HCl denaturiert und 30 min in 0.4 NaOH neutralisiert. Zum Transfer der DNA aus dem Agarosegel auf eine Hybond N⁺-Nylonmembran wurde die Kapillarblottechnik (Southern, 1975) angewendet. Der Transfer wurde mit 20xSSC über Nacht bei RT durchgeführt. Anschließend wurde, nach kurzem Spülen der Membran in 5xSSC, die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm, 120 mJ/cm²) kovalent an die Membran gebunden.

7. RNA-Techniken

7.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Gewebe

Zur Präparation von Gesamt-RNA aus Gewebe wurde die Guanidiniumisothiocyanat-Methode nach Chirgwin et al. (1979) verwendet. Hierzu wurde das Gewebestück (2g) in ein Corex-Röhrchen mit 2 ml Guanidiniumlösung (4 M Guanidiniumisothiocyanat, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 5% β -Mercaptoethanol (w/v)) überführt. Das Lysat wurde 30 Sekunden mit einem Ultra-Turrax-Homogenisator homogenisiert. Danach folgte eine 10 min Zentrifugation bei 10.000 rpm in einem Beckmann JA-13 Rotor. Der Überstand wurde in ein 15 ml Blaukappenröhrchen überführt und mit 400 μ l 10% Sarkosyllösung (w/v) versetzt. Nach Vortexen und Inkubation für 2 min bei 65 °C, wurden 0.2 g Cäsiumchlorid zugefügt. Anschließend wurde 1 ml einer 5.7 M Cäsiumchloridlösung (in 0.1 mM EDTA) in ein SW56-Polyallomer-Röhrchen vorgelegt und vorsichtig mit dem Lysat überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation über Nacht in einem SW56-Swingout-Rotor bei 28.000 rpm und 20 °C in einer Beckmann Ultrazentrifuge. Das Pellet wurde in 400 μ l TE resuspendiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die RNA ausgefällt und das Pellet in 30 μ l DEPC-behandeltem H₂O aufgenommen. 1 μ l der RNA-Lösung wurde zur Bestimmung der Konzentration (vgl. 1.1) eingesetzt.

7.2 Formaldehyd-Gelelektrophorese von RNA

Es wurden 1 g Agarose in 5 ml 20x MOPS-Puffer und 86 ml H₂O durch Erhitzen im Mikrowellenherd gelöst und nach Ausgleichen des Volumenverlustes mit H₂O und Abkühlen auf 60 °C 9 ml 34,7% Formaldehyd (w/v) sowie 0.5 μ g/ml EtBr zugemischt. Das Gel wurde in eine horizontale Gelkammer gegossen.

Die aufgetragenen Proben wurden wie folgt vorbereitet: ca. 15 μ g Gesamt-RNA wurden zusammen mit 10 μ l Formamid-Denaturierungspuffer für 10 min auf 65 °C erhitzt und nach Zufügen von 5 μ l RNA-Probenpuffer auf das Gel aufgetragen. Als Elektrophoresepuffer diente 1x MOPS-Puffer.

7.3 Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Northern Blotting)

Das Formaldehydgel (vgl. 7.2) wurde nach der Elektrophorese unter UV-Licht photographiert. Zum Transfer der RNA wurde die Kapillarblottechnik (Southern, 1975) angewendet. Als Fließmittel diente 20xSSC. Der Transfer wurde über Nacht bei RT durchgeführt. Anschließend wurde die Membran kurz mit 5xSSC gespült und zur kovalenten Bindung der RNA mit UV-Licht (254 nm, 120 mJ/cm²) bestrahlt.

8. Replikablotting von Bakterienkolonien auf Nitrozellulosemembran ("Colonylift")

Für die "in situ"-Hybridisierung von Bakterienkolonien wurden die Kolonien auf "GeneScreen Colony/Plaque-Hybridisation" Rundfilter übertragen, lysiert und die DNA denaturiert. Hierzu wurden die Filter zunächst auf einer unbenutzte Agarplatte angefeuchtet. Anschließend wurde ein Rundfilter vorsichtig auf die Bakterienplatte gelegt, die Orientierung des Filters durch Durchstechen mit einer Nadel markiert und nach Markierung der Durchstichlöcher auf der Agarplattenunterseite wieder heruntergenommen. Der Filter wurde dann, mit der Bakterienseite nach oben, auf ein, mit 10% SDS (w/v) getränktes 3MM Papier gelegt. Nach Inkubation für 3 min wurde der Filter auf ein mit Denaturierungslösung (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl) getränktes 3MM Papier gelegt. Es folgte eine erneute Inkubation für 3 min. Zur Neutralisierung wurde der Filter 3 min auf ein mit Neutralisierungslösung (1.5M NaCl, 0.5 M Tris pH 7.4) getränktes 3MM Papier gelegt. Anschließend wurde der Filter mit 2xSSC abgespült, getrocknet und zur kovalenten Bindung der Bakterien-DNA mit UV-Licht (254 nm, 120 mJ/cm²) bestrahlt.

9. Hybridisierungstechniken

9.1 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Für Hybridisierungen von Southern Blots, Northern Blots und Colonylift-Rundfiltern wurden DNA-Proben nach dem "*random priming*"-Verfahren nach Feinberg und Vogelstein (1983) radioaktiv markiert. Hierfür wurde das "prime it" Kit der Firma Stratagene eingesetzt.

40 ng linearisierte DNA wurden in 23 µl H₂O aufgenommen, mit 10 µl Primerlösung versetzt und zur Denaturierung für 5 min bei 100 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 10 µl 5x dCTP-Reaktionspuffer, 5 µl α-³²P-dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) und 2 µl T7-DNA-Polymerase (1U/µl) wurde der Ansatz für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Abtrennung nichteingebauter Radionukleotide erfolgte über eine NACS Prepac-Säule der Firma Gibco nach dem Protokoll des Herstellers. Dabei wird die radioaktiv markierte DNA an eine Säulenmatrix gebunden, gereinigt und anschließend durch Elution gewonnen. Unmittelbar vor ihrem Einsatz in der Hybridisierung wurde die radioaktiv markierten DNA (Probe) 10 min bei 100 °C denaturiert und anschließend für 10 min auf Eis gestellt.

9.2 Hybridisierung

Die Nylonmembranen wurden in einem Polypropylenzylinder mit 20 ml Hybridisierungslösung (7% SDS (w/v), 0.5 M Phosphatpuffer pH 7.2 [0.5M Na₂HPO₄, 0.5 M NaH₂PO₄], 1 mM

EDTA) für 2 h bei 65 °C im Hybridisierungssofen (Bachofer, Reutlingen) vorhybridisiert. Die Hybridisierungslösung wurde anschließend durch 5 ml frische ersetzt und $2-5 \times 10^6$ cpm hitzedenaturierte Probe (vgl. 9.1) hinzugegeben. Der Zylinder wurde über Nacht bei 65 °C inkubiert. Zum Waschen der Membranen wurde der Hybridisierungszylinder, nach Entfernen der Hybridisierungslösung, zunächst mit Lösung I (2xSSC, 0.1% SDS (w/v)) ausgespült, die Membran entnommen und in Lösung I bei 65 °C für 20 min geschwenkt. Dann wurde die Membran jeweils für 20 min bei 65 °C zunächst in Lösung II (1xSSC, 0.1% SDS (w/v)) und abschließend in Waschlösung III (0.5xSSC, 0.1% SDS (w/v)) geschwenkt. Nach kurzem Trocknen der Membran auf einem 3MM Papier wurde zur Autoradiographie ein Röntgenfilm aufgelegt.

10. Sequenzierung von DNA

10.1 Die Sequenzierreaktion

DNA wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977) mit dem Sequencing-2 Kit der Firma USB/Amersham sequenziert. Die Durchführung erfolgte nach den Angabe des Herstellers.

10 µg DNA wurden in 0.4 M NaOH für 5 min bei RT denaturiert und anschließend mit EtOH und 1/10 Vol. 2 M NH₄Ac pH 4.6 ausgefällt, gewaschen und getrocknet. Zu der getrockneten DNA wurden 5 pmol des entsprechenden Sequenzieroligonukleotids und 2 µl 5xReaktionspuffer (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 250 mM NaCl) zugegeben, auf 10 mit H₂O aufgefüllt und gemischt. Diese Lösung wurde anschließend für 2 min bei 65 °C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt. Nach einer Strangverlängerung mit α-³⁵S-ATP für 4-5 min erfolgte die eigentliche Kettenabbruchreaktion mit vier Didesoxy-Nukleosidtriphosphaten. Nach Abstoppen der Reaktion mit Formamid-Probenpuffer (20 mM EDTA pH 7.8, 99% Formamid (w/v), 0.03% Xylencyanol (w/v), 0.03% Bromphenolblau (w/v)), 3 min Denaturierung bei 100 °C und 2 min auf Eis wurden die Proben in einem denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetrennt.

10.2 Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff-Gele

Diese Gele dienen zur Auftrennung von DNA unter denaturierenden Bedingungen, hervorgerufen durch 8.3 M Harnstoff und hoher Temperatur während der Auftrennung. Es wurden 20x39 cm große, mit Seife und EtOH gründlich gereinigte Glasplatten und 0.1 mm dicke Abstandshalter verwendet. Für ein 6% Gel wurden 30-40 ml einer 6% Acrylamid-Harnstoff-Lösung (100 ml deionisiertes Acrylamid:Bisacrylamid (30:0.8), 50 ml 10xTBE,

250 g Harnstoff, auf 500 ml mit H₂O aufgefüllt) mit 30 µl TEMED und 300 µl 10% APS (w/v) vermischt. Das Gel wurde gegossen und der Kamm eingesetzt.

Nach der Polymerisierung wurde das Gel in eine Elektrophorese-Apparatur eingespannt und zur gleichmäßigen Wärmeverteilung mit einer Aluminiumplatte bedeckt. Als Laufpuffer wurde 1xTBE-Puffer verwendet. Nach einem Vorlauf von 30 min bei 1400 Volt, der zur Erwärmung des Gels diente, wurden je 4 µl der denaturierten Sequenzierreaktionen (vgl. 10.1.) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 1400 Volt. Anschließend wurde das Gel auf 3MM Papier übertragen, mit Frischhaltefolie abgedeckt und 2 h bei 80 °C getrocknet. Nach Abziehen der Frischhaltefolie wurde über Nacht ein Röntgenfilm aufgelegt.

11. Protein-Techniken

11.1 Präparation von Membranproteinen aus Geweben

Zur Gewinnung von Membranproteinen aus nativem Gewebe (Gesamthirn- und Rückenmarkspräparationen der Maus) wurde das Gewebe zunächst in einem isotonen Puffer homogenisiert, die Zellkerne durch eine differentielle Zentrifugation abgetrennt, danach die Plasmamembranen sedimentiert, die Membranproteine durch Solubilisierung aus der Membranpräparation gelöst und ausgefällt.

Das neuronale Gewebe (ca. 0.5 g) wurde zügig präpariert und sofort in 4 ml vorgekühltem Puffer A (25 mM KPi pH 7.4 [25 mM K₂HPO₄, 25 mM KH₂PO₄], 40 µl 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid [PMSF]) für 2 x 20s mit einem Ultra-Turrax-Homogenisator auf Eis homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 50.000xg für 30 min. Das Pellet wurde erneut in 4 ml Puffer A resuspendiert, 2x20s homogenisiert und zentrifugiert (30 min bei 50.000xg und 4 °C). Das Pellet wurde nun in 4 ml vorgekühltem Puffer C (25 mM KPi pH 7.4, 40 µl 1mM PMSF, 0.6 M Sucrose) resuspendiert, 2x20s homogenisiert und zentrifugiert (30 min bei 50.000xg und 4 °C). Anschließend wurde das Pellet in 900 µl vorgekühltem Puffer B (25 mM KPi pH 7.4, 40 µl 1mM PMSF, 200 mM KCl) resuspendiert. Je 300 µl dieser Lösung wurde in 1.5 ml Beckmann Zentrifugationsröhrchen überführt und mit 600 µl vorgekühltem Solubilisierungspuffer (25 mM KPi pH 7.4, 10 µl 1mM PMSF, 1.66 M KCl, 5% Triton X100 (w/v), 10 mM EDTA, 5 mM DTT) versetzt. Zur Solubilisierung wurden die Röhrchen für 1 h bei 4 °C auf eine Rotationsscheibe langsam rotiert. Anschließend folgte eine Ultrazentrifugation für 30 min bei 4 °C und 100.000xg. Nach Abschluß der Zentrifugation wurde der Überstand ("Solub") vorsichtig abgenommen und in je 100 µl Aliquots aufgeteilt. Bis zur Proteinfällung, die direkt vor der Auftrennung der Membranproteine im SDS-Polyacrylamidgel erfolgte, wurden die "Solub"-Aliquots bei -80 °C gelagert.

Die Proteinfällung diente dazu, die Proben für die Gelelektrophorese zu konzentrieren und von störenden Begleitsubstanzen (Triton X100, Lipide und Salze) zu befreien. Hierzu wurden 100 µl "Solub" auf Eis aufgetaut, mit 400 µl Methanol versetzt und durch Vortexen vermischt. Nach Zugabe von 300 µl H₂O und Vortexen, wurden schließlich 100 µl Chloroform zugegeben und nochmals durch Vortexen gemischt. Nach einer Zentrifugation bei 5000xg für 5 min wurde die, über dem Proteinpellet befindliche Phase vorsichtig abgenommen und verworfen. Zu Unterphase und Proteinpellet wurde 400 µl Methanol zugegeben, durch Vortexen gemischt und nochmals abzentrifugiert (5 min bei 5000xg). Das Pellet wurde im Exsikkator getrocknet, je nach Größe mit 50 bis 80 µl Laemmli-Probenpuffer versetzt, nach Erhitzen für 5 min bei 100 °C, 5 min auf Eis abgekühlt und im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

11.2 Auftrennen von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel

Die elektrophoretische Auftrennung der präparierten Membranproteine wurde nach Laemmli (1970) in einem 10% Polyacrylamid-Trenngel (50 ml deionisiertes Acrylamid: Bisacrylamid (30:0.8), 375 mM Tris pH 8.8, 0.1% SDS (w/v)) in Tris/Glyzin-Laufpuffer pH 8.3 durchgeführt. Als Sammelgel diente ein 5% Polyacrylamidgel (4.8% Acrylamid, 0.2% Bisacrylamid, 375 mM Tris pH 6.8, 1% SDS (w/v)), das über das Trenngel geschichtet wurde. Die Proteinproben (20 µl der zuvor erhitzten Membranproteinpräparationen in Laemmli-Probenpuffer [vgl. 11.1]) wurden auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker diente der "Prestained SDS-PAGE Standard (low range)" der Firma Biorad. Die Elektrophorese erfolgte bis zum Erreichen der Bromphenolblaufront im Trenngel bei 20 mA, dann bei 40 mA. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel von den Glasplatten gelöst und in Western Transfer Puffer überführt.

11.3 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Western Blot)

Der Transfer der, im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell) erfolgte mittels einer *Western Blot* Apparatur. Hierfür wurde zunächst ein "Sandwich" in folgender Reihenfolge luftblasenfrei zusammengestellt: 3 Lagen, mit Western Transfer Puffer getränktes 3 MM Papier, Membran, Gel und nochmals 3 Lagen, mit Western Transfer Puffer getränktes 3 MM Papier. Dieses Sandwich wurde mittels eines Trägers senkrecht so in eine mit Western Transfer Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gebracht, daß die Membran der Anode und das Gel der Kathode zugewandt war. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 4 °C und einer Stromstärke von 300 mA. Nach dem Transfer wurde das Sandwich zerlegt und Größenmarker sowie Orientierung der Membran mit Kugelschreiber markiert.

11.4 Detektion von Proteinen auf Membranen

Die Western Blot-Membran mit den immobilisierten Proteinen (vgl. 11.3) wurde in 100 ml Blockierungslösung (10% Magermilchpulver (w/v) in PBS) für mindestens 60 min unter Schütteln inkubiert. Dann wurde die Membran mit 2 ml einer Lösung aus 1 μ l/ml Primärantikörper (Mab 2b, Mab 4a bzw. Mab sy38) in 5% Milchpulver/ 0.3% Tween (w/v) in PBS in eine Folie eingeschweißt und 1 h auf einer rotierenden Plattform bei RT inkubiert. Die Membran wurde dreimal für 5 min unter Schütteln mit 5% Milchpulver/ 0.3% Tween (w/v) in PBS gewaschen. Analog erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus-Antikörper, Meerrettich-Peroxydase-konjugiert, 1:2000 verdünnt) und anschließendem Waschen. Nach Spülen der Membran in 0.3% Tween (w/v) in PBS und Abtropfen wurde die Proteinseite mit 2 ml einer frisch zubereiteten 1:1 Mischung der beiden ECL-Detektionslösungen (Amersham) für 1 min bedeckt. Nach erneutem Abtropfen und Einwickeln in Frischhaltefolie wurde für 1 min ein Röntgenfilm aufgelegt.

12. Transgen Techniken

Die zur Herstellung der α 1-, β - und Ch1- transgenen Mäuse eingesetzten Transgenkonstrukte wurden zunächst durch einen PvuII-Restriktionsverdau als lineare DNA-Fragmente ohne Vektorsequenzen aus den Plasmiden p18SN α 1, p18SN β o.S. und p18SNCh1 o.S. (vgl. 13.) isoliert. Die DNA wurden in Injektionsbuffer (10 mM Tris pH 7.5, 0.1 mM EDTA) in einer Konzentration von 5 ng/ μ l aufgenommen und sterilfiltriert, um Verunreinigungen zu entfernen. Die DNA-Lösung wurde anschließend nach etablierter Methode (Hogan et al., 1986) in den Vorkern von befruchteten Eizellen injiziert. Für die Gewinnung befruchteter Eizellen wurden weibliche B₆D₂F₁-Mäuse superovuliert. Hierzu wurden zunächst 10 U PMSG (pregnant mare serum gonadotropin, Sigma) und nach 48 h 10 U hCG (human chorionic gonadotropin, Sigma) intraperitoneal injiziert. Anschließend wurden die superovulierten Tiere mit männlichen DBA/2-Mäusen verpaart und die befruchteten Eizellen am folgenden Tag aus Vaginalpfropf-positiven Mäusen isoliert (Schenkel, 1995). Die, die DNA-Mikroinjektion überlebenden Zygoten wurden nach der Methode von Hogan et al. (1986) in den Eileiter pseudoträchtiger Mäuse implantiert (Embryotransfer).

Die Mikroinjektion mit anschließendem Embryotransfer zur Erzeugung transgener Mäuse wurde von Herrn Dr. Johannes Schenkel durchgeführt.

13. Klonierung der Plasmide p18SN β o.S. bzw. p18SNCh1 o.S.

Das Plasmid "pCIS- β " (Grenningloh et al., 1990a), das die 1.7 kb große cDNA für die GlyR β -Untereinheit der Ratte trägt, und das Plasmid "pCIS-Ch1" (Kuhse et al., 1993), das die

1.8 kb große, rekombinante Ch1-cDNA enthält, wurden mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Heinrich Betz (MPI, Frankfurt/M) zur Verfügung gestellt. Für die Klonierung der zunächst entwickelten Plasmide "p18SN β " bzw. "p18SNCh1" wurde jeweils die humane GlyR α 1-cDNA-Insertion des Plasmids "p18SN α 1", das mir freundlicherweise von Herrn Dr. Hans Weiher (IGen, Forschungszentrum Karlsruhe) überlassen worden war, durch die entsprechende cDNA ersetzt. Hierbei wurde die Kompatibilität der Schnittstellen SalI und XhoI genutzt.

Zunächst wurden β -cDNA und Ch1-cDNA jeweils als XhoI-Fragmente (β -cDNA_{XhoI} bzw. Ch1-cDNA_{XhoI}) aus den Plasmiden `pCIS- β ` bzw. `pCIS-Ch1` isoliert. Das Plasmid `p18SN α 1` wurde gleichzeitig mittels eines Sal I-Verdau von seiner cDNA-Insertion befreit (p18SN_{SalI}). Dann wurde 18SN_{SalI} mit β -cDNA_{XhoI} bzw. Ch1-cDNA_{XhoI} ligiert. Die korrekte Orientierung der cDNAs wurde jeweils durch asymmetrische Restriktionsverdau überprüft. Anschließend wurden zwei Schnittstellen für das Restriktionsenzym SphI, in deren Nukleotidabfolge ein Translationsstartsignal "ATG" enthalten ist, aus der, die cDNAs 5'-flankierenden *Multicloning site* entfernt. Grund hierfür war, daß ein Translationsstart an dieser Position eine Verschiebung des Leserasters zur Folge gehabt hätte. Für die Entfernung der SphI-Schnittstellen wurden die Plasmide "p18SN β " bzw. "p18SNCh1" zunächst mit dem Restriktionsenzym SphI verdaut. Die linearisierte DNA wurde anschließend einem S1-Nucleaseverdau unterzogen und, nach Auffüllen überhängender Enden, religiert. Abschließend wurde die Nukleotidabfolge des Promotor-cDNA-Übergangs in den so entwickelten Plasmiden `p18SN β o.S.` bzw. `p18SNCh1o.S.` überprüft. Hierfür erfolgte eine Sequenzierung mit Hilfe des Oligonukleotids pNSE, das an die Position -86 bis -70 des NSE-Promotors der Ratte (Sakimura et al., 1987) bindet. Diese Sequenzierung zeigte, daß im Plasmid "p18SN β o.S." die Nukleotide 1 bis 157 der β -cDNA und damit u.a. die endogene PvuII-Restriktionschnittstelle entfernt worden waren. Im Plasmid "p18SNCh1o.S." war die Sequenz der cDNA durch den Nucleaseverdau nicht verändert worden.

14. Parametereinstellung an den Meßgeräten zur Tremoranalyse

Verstärker:	Filter	0.3 Hz
	Excitation	4 V
	Cal.value	10 V
	gain	20 x 1.5
Schreiber:	range	5- 20 mV je nach gewünschter Empfindlichkeit
	chart speed	100 mm/ min

- Akagi, H., Patton, D. E., Miledi, R. (1989). Discrimination of heterogenous mRNAs encoding strychnine-sensitive glycine receptors in *Xenopus* oocytes by antisense oligonucleotides. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8103- 8107
- Akagi, H., Hirai, K., Hishinuma, F. (1991). Cloning of a glycine receptor subtype expressed in rat and spinal cord during a specific period of neuronal development. *FEBS Lett.* 281, 160- 166
- Altschulter, R. A., Betz, H., Parakkal, M. H., Reeks, K. A., Wenthold, R. J. (1986). Identification of glycinergic synapses in the cochlear nucleus through immunocytochemical localization. *Brain Res.* 369, 316- 320
- Alvarez, F. J., Harrington, D., Dewey, D. E., Fyffe, R. E. W. (1993). Distribution of glycine receptors on single intracellularly labeled motoneurons of the cat lumbar spinal cord. *Soc. Neurosci. Abstract* 19, 983
- Andermann, F., Keene, D. L., Andermann, E., Quesney, L. F. (1980). Startle disease or hyperekplexia: further delineation of the syndrome. *Brain* 103, 985- 997
- Andermann, F. und Andermann, E. (1984). Startle disease, or hyperekplexia. *Ann. Neurol.* 16, 367- 368
- Aprison, M. H. und Wermann, R. (1965). The distribution of glycine in rat spinal cord and roots. *Life Sci.* 4, 2075- 2083
- Aprison, M. H. und Daly, E. (1978). Biochemical aspects of transmission at inhibitory synapses: The role of glycine. *Adv. Neurochem.* 3, 203- 294
- Aprison, M. H. (1990). The discovery of the neurotransmitter role of glycine. *In Glycine Neurotransmission.* Ed. by Otterson, O.P. and Storm-Mathisen, J., John Wiley and Sons Ltd., Cichester, pp. 1- 24
- Araki, T., Yamano, M., Murakami, T., Wanaka, A., Betz, H., Tohyama, M. (1988). Localization of glycine receptors in the rat central nervous system: an immunocytochemical analysis using monoclonal antibody. *Neurosci.* 25, 613- 624
- Baker, E., Sutherland, G. R., Schofield, P. R. (1994). Localization of the glycine receptor α 1 subunit gene (GLRA1) to chromosome 5q32 by FISH. *Genomics* 22, 491- 493
- Barasiter, M. (1990). *The genetics of neurological disorders.* Oxford University Press, New York (2nd Ed.)
- Barker, J. L. und Ransom, B. R. (1978). Amino acid pharmacology of mammalian central neurons grown in tissue culture. *J. Physiol.* 280, 331- 354
- Béchade, C., Sur, C., Triller, A. (1994). The inhibitory neuronal glycine receptor. *BioEssays* 16, 735- 744
- Becker, C.-M., Hermans-Borgmeyer, I., Schmitt, B., Betz, H. (1986). The glycine receptor deficiency of the mutant mouse *spastic*: evidence for normal glycine receptor structure and localization. *J. Neurosci.* 5, 1358- 1364.
- Becker, C.-M., Hoch, W., Betz, H. (1988). Glycine receptor heterogeneity in rat spinal cord during postnatal development. *EMBO J.* 7, 3717- 3726

- Becker, C.-M., Hoch, W., Betz, H. (1989). Sensitive immunoassays show selective association of peripheral and integral membrane proteins of the inhibitory glycine receptor complex. *J. Neurochem.* 53, 124- 131
- Becker, C.-M. (1990). Disorders of the inhibitory glycine receptor: the spastic mouse. *FASEB J.* 4, 2767- 2774
- Becker, C.-M. (1992). Convulsants Acting at the Inhibitory Glycine Receptor. *In Handbook of Experimental Pharmacology, Vol.102 Selective Neurotoxicity*, Ed. by Herken H., Hucho, F. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp 539- 575
- Becker, C.-M., Schieden, V., Tarroni, P., Strasser, U., Betz, H. (1992). Isoform-selective deficit of glycine receptors in the mouse mutant *spastic*. *Neuron* 8, 283- 289
- Becker, C.-M., Betz, H., Schröder, H. (1993). Expression of inhibitory glycine receptors in postnatal rat cerebral cortex. *Brain Res.* 606, 220- 226
- Becker, C.-M., Kling, C., Mülhardt, C., Saul, B., Herkert, M., Kuhse, J. (1994). The inhibitory Glycine Receptor. A Candidate Protein of Signal Transduction in Neuroendocrine Tissue. *Annals New York Academy of Science.* pp. 155- 162
- Betz, H. und Becker, C.-M. (1988). The mammalian glycine receptor: biology and structure of neuronal chloride channel protein. *Neurochem. Int* 13, 137- 146
- Betz, H. (1990). Ligand-gated ion channels in the brain: the amino acid receptor superfamily. *Neuron* 5, 383- 392
- Betz, H. (1992). Structure and function of inhibitory glycine receptors. *Q. Rev. Biophys.* 25, 381- 392
- Betz, H., Kuhse, J., Fischer, M., Schmieden, V., Laube, B., Kuryatov, A., Langosch, D., Meyer, G., Bormann, J., Rundström, N., Matzenbach, B., Kirsch, J., Ramming, M. (1994). Structure, diversity and synaptic localization of the inhibitory glycine receptor. *J. Physiology* 88, 243- 248
- Birnboim, P. M. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513- 1523
- Biscoe, T. J. und Duchon, M. R. (1986). Synaptic physiology of spinal motoneurons of normal and *spastic* mice: an *in vitro* study. *J. Physiol.* 379, 275- 292
- Bormann, J., Hamill, O. P., Sakmann, B. (1987). Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and γ -aminobutyric acid in mouse cultured spinal cord neurons. *J. Physiol. (London)* 385, 243- 286
- Bormann, J., Rundström, N., Betz, H., Langosch, D. (1993). Residues within transmembran segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- und hetero-oligomers. *EMBO J.* 12, 3729- 3737
- Buckwalter, M. S., Testa, C., Noebels, J. L., Camper, S. A. (1993). Genetic mapping and evaluation of candidate genes for spasmodic, a neurological mouse mutation with abnormal startle response. *Genomics* 17, 279- 286

- Buckwalter, M. S., Cook, S. A., Davisson, M. T., White, W. F., Camper, S. A. (1994). Frameshift mutation in the mouse glycine receptor gene (*Glr1*) results in progressive neurological symptoms and juvenile death. *Hum. Mol. Gen.* 3, 2025- 2030
- Chai, C. K. (1961). Hereditary spasticity in mice. *J. Hered.* 52, 241- 243
- Chai, C. K., Roberts, E., Sidman, R. L. (1961). Influence of amino-oxyacetic acid, a gamma-butyrate transaminase inhibitor on hereditary spasticity in mice. *J. Hered.* 52, 241- 243
- Chirgwin, J. J., Przbyla, A. E., MacDonald, R. J., Rutter, W. J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem.* 18, 5294
- Clements, J. D., Lester, R. A. J., Tong, G., Jahr, C. E., Westbrook, G. L. (1992). The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 258, 1498- 1501
- Coombs, J. S., Eccles, J. C., Fatt, P. (1955). The specific ionic conductances and the ionic movements across the motoneural membrane that produce the inhibitory postsynaptic potential. *J. Physiol. (London)* 130, 326- 373
- Curtis, D. R., Hösli, L., Johnston, G. A. R. (1968). A pharmacological study of the depression of spinal neurons by glycine and related amino acids. *Exp. Brain Res.* 6, 1- 18
- Davidoff, R. A., Aprison, M. A., Werman, R. (1969). The effects of strychnine on the inhibition of interneurons by glycine and γ -aminobutyric acid. *Neuropharmacol.* 8, 191- 194
- Devillers-Thiery, A., Galzi, J. L., Eisele, J. L., Bertrand, D., Changeux, J. P. (1993). Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: a prototype of ligand-gated ion channels. *J. Membr. Biol.* 136, 97- 112
- Devoto, F. H. und Barnstable, C. J. (1987). SVP: A synaptic vesicle protein whose appearance correlates closely with synaptogenesis in rat nervous system. *Annal. N.Y. Acad. Sci.* 493, 493- 496
- Dickie, M. M. (1967). New mutations. *Mouse Newslett.* 36, 39
- Eccles, J. C., Fatt, P., Koketsu, K. (1954). Cholinergic and inhibitory synapses in a pathway from motor-axon collaterals to motoneurons. *J. Physiol. (London)* 126, 524- 562
- Eicher, E. M. und Lane, P. W. (1980). Assignment of LG XVI to chromosome 3 in the mouse. *J. Hered.* 71, 315- 318
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* 132, 6-13
- Floeter, M. K. und Hallet, M. (1993). Glycine receptors: a startling connection. *Nature Genet.* 5, 319- 320
- Forss-Petter, S., Danielson, P. E., Catsicas, S., Battenberg, E., Price, J., Nerenberg, M., Sutcliff, J. G. (1990). Transgenic mice expressing β -galactosidase in mature neurons under neuron-specific enolase promoter control. *Neuron* 5, 187- 197
- Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., Elsabrouly, S., Dani, C., Jeanteur, P., Blanchard, J. (1985). Various rat adult tissues express only one major mRNA species from glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res.* 13, 1431- 1442

- Gastaut, H. und Villeneuve, A. (1967). The startle disease or Hyperekplexia. Pathological surprise reaction. *J. neurol. Sci.* 5, 523- 542
- Gorman, C. M., Moffat, L. F., Horward, B. H. (1982). Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2, 1044- 1051
- Graham, D., Pfeiffer, F., Betz, H. (1981). UV light-induced crosslinking of strychnine to the glycine receptor of rat spinal cord membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102, 1330-1335
- Graham, D., Pfeiffer, F., Betz, H. (1983). Photoaffinity-labelling of the glycine receptor of rat spinal cord. *Eur. J. Biochem.* 131, 519- 525
- Graham, D., Pfeiffer, F., Simler, R., Betz, H. (1985). Purification and characterization of the glycine receptor of pig spinal cord. *Biochemistry* 24, 990- 994
- Grenningloh, G., Rienitz, A., Schmitt, B., Methfessel, C., Zensen, M., Beyreuther, K., Gundelfinger, E. D., Betz, H. (1987). The strychnine-binding subunit of the glycine receptor shows homology with nicotinic acetylcholine receptors. *Nature* 328, 215- 229
- Grenningloh, G., Pribilla, I., Prior, P., Multhaupt, G., Beyreuther, K., Taleb, O., Betz, H. (1990a). Cloning and expression of the β -subunit of the inhibitory glycine receptor. *Neuron* 4, 963- 970
- Grenningloh, G., Schmieden, V., Schofield, P. R., Seeburg, P. H., Siddique, T., Mohandas, T. K., Becker, C.-M., Betz, H. (1990b). Alpha subunit variants of the human glycine receptor: primary structures, functional expression and chromosomal localization of corresponding genes. *EMBO J.* 9, 771- 776
- Gundlach, A. L., Dodd, P. R., Grabara, S. G., Watson, W. E. J., Johnston, G. A. R., Harper, P. A. W., Dennis, J. A., Healy, P. J. (1988). Deficit of spinal cord glycine/ strychnine receptors in inherited myoclonus of Poll Hereford calves. *Science* 241, 1807- 1810
- Gundlach, A. L. (1990). Disorder of the inhibitory glycine receptor: inherited myoclonus in Poll Hereford calves. *FASEB J.* 4, 2761- 2766
- Gundlach, A. L., Korz, G., Burazin, T. C. D., Madigan, J., Higgins, R. J. (1993). Deficit of inhibitory glycine receptors in spinal cord from Peruvian Pasos: evidence for an equine form of inherited myoclonus. *Brain Res.* 628, 263- 270
- Hall, P. V., Smith, J. E., Campbell, R. L., Felten, D. L., Aprison, M. H. (1976). Neurochemical correlates of spasticity. *Life Sci.* 18, 1467- 1472
- Handford., C. A., Lynch, J. W., Baker, E., Webb, G. C., Ford, J. H., Sutherland, G. R., Schofield, P. R. (1995). The human glycine receptor β subunit: primary structure, functional characterisation and chromosomal localisation of the human and murine genes. *Mol. Brain Res.*, *in press*
- Hayashi, T., Tachibana, H., Kaji, T. (1991). Hyperekplexia: Pedigree studies in two families. *Am. J. Med. Genet.* 40, 138- 143
- Heller, A. H. und Hallett, M. (1982). Electrophysiological studies with the spastic mutant mouse. *Brain Res.* 234, 299- 308
- Hille, B. (1984). Ionic channels of excitable membranes. Sinauer, Sunderland

- Hoch, H., Betz, H., Becker, C.-M. (1989). Primary cultures of mouse spinal cord express the neonatal isoform of the inhibitory glycine receptor. *Neuron* 3, 339- 348
- Hoch, W., Betz, H., Schramm, M., Wolter, I., Becker, C.-M. (1992). Modulation by NMDA-receptor antagonists of glycine receptor isoform expression in cultured spinal cord neurons. *Eur. J. Neurosci.* 4, 389- 395
- Hogan, B., Constantini, F., Lacy, E. (1986). Manipulating the mouse embryo. A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York
- Holmes, O. (1990). Human Neurophysiology. A student text. Unwin Hyman Ltd., London
- Jessell, T. M. und Kandel, E. R. (1993). Synaptic Transmission: A Bidirectional and Self-Modifiable Form of Cell-Cell Communication. *Cell* 72/ *Neuron* 10, 1- 30
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M. (1991). Principles of neural science. (3rd ed.), Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York
- Katz, B. (1966). Nerve, muscle and synapse. McGraw Hill, New York
- Kingsmore, S. F., Giros, B., Suh, D., Bienarz, M., Caron, M. G., Seldin, M. F. (1994). Glycine receptor β -subunit gene mutation in *spastic* mouse associated with LINE-1 element insertion. *Nature Genet.* 7, 136- 142
- Kirsch, J., Langosch, D., Prior, P., Littauer, U. Z., Schmitt, B., Betz, H. (1991). The 93-kD glycine receptor associated protein binds to tubulin. *J. Biol. Chem.* 266, 22242- 22245
- Kirsch, J., Wolters, I., Triller, A., Betz, H. (1993a). Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons. *Nature* 366, 745- 748
- Kirsch, J., Betz, H. (1993b). Widespread expression of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein, in rat brain. *Brain Res.* 621, 301- 310
- Kirsch, J., Malosio, M. L., Wolters, I., Betz, H. (1993c). Distribution of gephyrin transcripts in the adult and developing rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 5, 1109- 1117
- Kirsch, J., Kuhse, J., Betz, H. (1995). Targeting of glycine receptor subunits to gephyrin-rich domains in transfected human embryonic kidney cells. *Mol. and Cell. Neurosci.* 6, 450- 461
- Kirstein, L. und Silfverskiöld, B. P. (1958). A family with emotionally precipitated "drop seizures". *Acta Psychiatr. Neurol. Scand.* 33, 471- 476
- Kok, O. und Bruyn, G. W. (1962). An unidentified hereditary disease. *Lancet* 1, 1359
- Krnjevic, K. (1981). Transmitters in the motor system. *In Handbook of Physiology.* Ed. by S.R. Geiger, American Physiological Society, Baltimore. pp.107- 154
- Kuhse, J., Schmieden, V., Betz, H. (1990). Identification and functional expression of a novel binding subunit of the inhibitory glycine receptor. *J. Biol. Chem.* 265, 22317- 22320
- Kuhse, J., Kuryatow, A., Maulet, Y., Malosio, M. L., Schmieden, V., Betz, H. (1991). Alternative splicing generates two isoforms of the α 2-subunit of the inhibitory glycine receptor. *FEBS Lett.* 283, 73- 77

- Kuhse, J., Laube, B., Magalei, D., Betz, H. (1993). Assembly of the inhibitory glycine receptor: identification of amino acid sequence motifs governing subunit stoichiometry. *Neuron* 11, 1049-1056
- Kuhse, J., Betz, H., Kirsch, J. (1995). The inhibitory glycine receptor: architecture, synaptic localization and molecular pathology of a postsynaptic ion-channel complex. *Curr. Op. Neurobiol.* 5, 318- 323
- Kurczynski, T. W. (1983). Hyperekplexia. *Arch. Neurol.* 40, 246- 248
- Lane, P. W. (1972). Two new mutations in linkage group XVI of the house mouse, Flaky tail and varitint-waddler. *J. Hered.* 63, 135- 140
- Lane, P. W. (1979). Gene order in linkage group XVI of the house mouse. *J. Hered.* 70, 315-318
- Lane, P. W., Ganser, A. L., Kerner, A. L., White, W. F. (1987). *Spasmodic*, a mutation on chromosome 11 in the mouse. *J. Hered.* 78, 353- 356
- Langosch, D., Thomas, L., Betz, H. (1988). Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 7394- 7398
- Langosch, D., Betz, H., Becker, C.-M. (1990a). Molecular Structure and Developmental Regulation of the Inhibitory Glycine Receptor. *In Glycine Transmission*, Ed. by Otterson, O.P. and Storm-Mathisen, J., John Wiley & Sons Ltd., Chichester. pp. 67- 82
- Langosch, D., Becker, C.-M., Betz, H. (1990b). The inhibitory glycine receptor: A ligand-gated chloride channel of the central nervous system. *Eur. J. Biochem.* 194, 1- 8
- Langosch, D., Hartung, K., Grell, E., Bamberg, E., Betz, H. (1991). Ion channel formation by synthetic transmembrane segments of the inhibitory glycine receptor - a model study. *Biochim. Biophys. Acta* 1036, 36- 44
- Langosch, D., Hoch, W., Betz, H. (1992). The 93 kDA protein gephyrin and tubulin associated with the inhibitory glycine receptor are phosphorylated by endogenous protein kinase. *FEBS Lett.* 298, 113- 117
- Langosch, D., Herbold, A., Schmieden, V., Bormann, J., Kirsch, J. (1993). Importance of Arg-219 for correct biogenesis of $\alpha 1$ homooligomeric glycine receptors. *FEBS Lett.* 336, 540- 544
- Langosch, D., Laube, B., Rundström, N., Schmieden, V., Bormann, J., Betz, H. (1994). Decreased agonist affinity and chloride conductance of mutant glycine receptors associated with human hereditary hyperekplexia. *EMBO J.* 13, 4223- 4228
- Laube, B., Langosch, D., Betz, H., Schmieden, V. (1995). Hyperekplexie mutations of the glycine receptor unmask the inhibitory subsite for β -amino-acid. *Neuroreport* 6, 897- 900
- Lingam, S., Wilson, J., Hart, E. W. (1981) Hereditary stiff-baby syndrome. *Am. J. Dis. Child.* 135, 909- 911
- Malosio, M. L., Marquèze-Pouey, B., Kuhse, J., Betz, H. (1991a). Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *EMBO J.* 10, 2401- 2409

- Malosio, M. L., Grenningloh, G., Kuhse, J., Schmieden, V., Schmitt, B., Prior, P., Betz, H. (1991b). Alternative splicing generates two variants of the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor. *J. Biol. Chem* 266, 2048- 5203
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning. A laboratory manual*. CSH Press
- Marvizon, J. C. G., Vazques, J., Calvo, M. G., Mayor, F. Jr., Gomez, A. R., Valdivieso, F., Benavides, J. (1986). The glycine receptor: Pharmacological study and mathematical modelling of the allosteric interaction between the glycine- and strychnine-binding sites. *Mol. Pharmacol.* 30, 590- 597
- Matzenbach, B., Maulet, Y., Sefton, L., Courtier, B., Avner, P., Guénet, J. L., Betz, H. (1994). Structural analysis of mouse glycine receptor α subunit genes. *J. Biol. Chem.* 265, 22317- 22320
- Meyer, G., Kirsch, J., Betz, H., Langosch, D. (1995). Identification of a Gephyrin Binding Motif on the Glycine Receptor β Subunit. *Neuron* 15, 563- 572
- Morley, D. J., Weaver, D. D., Garg, B. P., Markland, O. N. (1982). Hyperekplexia: an inherited disorder of the startle response. *Clin. Genet.* 21, 388- 396
- Mülhardt, C., Fischer, M., Gass, P., Simon-Chazottes, D., Guénet, J. L., Kuhse, J., Betz, H., Becker, C.-M. (1994). The *spastic* mouse: Aberrant splicing of glycine receptor β subunit mRNA caused by intronic insertion of L1 element. *Neuron* 13, 1003- 1015
- Naas, E., Zilles, K., Gnahn, H., Betz, H., Becker, C.-M., Schröder, H. (1991). Glycine receptor immunoreactivity in rat and human cerebral cortex. *Brain Res.* 561, 139- 146
- Nigro, M. A. und Lim H. C. (1989). Hyperekplexia: its role in sudden infant death. *Ann. Neurol.* 26, 142
- Ortells, M. O. und Lunt, G. G. (1995). Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci.* 18, 121- 127
- Otterson, O. P. und Storm-Mathisen, J. (Ed.) (1990). *Glycine Neurotransmission*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester
- Pfeiffer, F., Graham, D., Betz, H. (1982). Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J. Biol. Chem.* 257, 818- 823
- Pfeiffer, F., Simler, R., Grenningloh, G., Betz, H. (1984). Monoclonal antibodies and peptide mapping reveal structural similarities between the subunits of the glycine receptor of rat spinal cord. *J. Biol. Chem.* 257, 9389- 9393
- Pribilla, I., Takagi, T., Langosch, D., Bormann, J., Betz, H. (1992). The atypical M2 segment of the β subunit confers picrotoxinin resistance to the inhibitory glycine receptor channels. *EMBO J.* 11, 4305- 4311
- Prior, P., Schmitt, B., Grenningloh, G., Pribilla, I., Mulhaupt, G., Beyreuther, K., Maulet, Y., Werner, P., Langosch, D., Kirsch, J., Betz, H. (1992). Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. *Neuron* 8, 1161- 1170
- Probst, A., Cortes, R., Palacios, J. M. (1986). The distribution of glycine receptors in the human brain. A light microscopic autoradiographic study using [3 H]strychnine. *Neurosci.* 17, 11- 35

- Rajendra, S., Lynch, J. W., Pierce, K. D., French, C. R., Barry, P. H., Schofield, P. R. (1994). Startle disease mutations reduce the agonist sensitivity of the human inhibitory glycine receptor. *J. Biol. Chem.* *269*, 18739- 18742
- Rajendra, S. und Schofield, P. R. (1995a). Molecular mechanisms of inherited startle syndromes. *Trends Neurosci.* *18*, 80- 82
- Rajendra, S., Lynch, J. W., Pierce, K. D., French, C. R., Barry, P. H., Schofield, P. R. (1995b). Mutation of an arginine residue in the human glycine receptor transforms β -alanine and taurine from agonist into competitive antagonists. *Neuron* *14*, 169- 175
- Rajendra, S., Vandenberg, R. J., Pierce, K. D., Cunningham, A. M., French, P. W., Barry, P. H., Schofield, P. R. (1995c). The unique extracellular disulfide loop of the glycine receptor is a principal ligand binding element. *EMBO J.* *14*, 2987- 2998.
- Rees, M. I., Andrew, M., Jawad, S., Owen, M. J. (1994). Evidence for recessive as well as dominant forms of startle disease (hyperekplexia) caused by mutations in the α 1 subunit of the inhibitory glycine receptor. *Hum. Mol. Genet.* *3*, 2175- 2179
- Renshaw, B. (1941). Influence of discharge of motoneurons upon excitation of neighboring motoneurons. *J. Neurophysiol.* *4*, 167- 183
- Ruiz-Gomez, A., Morato, E., Garcia-Calvo, M., Valdivieso, F., Mayor, F. Jr. (1990). Location of the strychnine binding site on the 48-kilodalton subunit of the glycine receptor. *Biochemistry* *29*, 7033- 7040
- Ryan, S. G., Sherman, S. L., Terry, J. C., Sparkes, R. S., Torres, M. C., Mackey, R. W. (1992a). Startle disease, or hyperekplexia: response to clonazepam and assignment of the gene (STHE) to chromosome 5q by linkage analyses. *Ann. Neurol.* *31*, 663- 668
- Ryan, S. G., Dixon, M., Nigro, M., Kelts, K., Markland, O., Terry, J. C., Shiang, R., Wasmuth, J., O'Connell, P. (1992b). Genetic and radiation hybrid mapping of the hyperekplexia region on chromosom 5qP. *Am. J. Hum. Genet.* *51*, 1334- 1343
- Ryan, S. G., Buckwalter, M. S., Lynch, J. W., Handford, C. A., Segura, L., Hiang, R., Wasmuth, J. J., Camper, S. A., Schofield, P., O'Connell, P. (1994). A missense mutation in the gene encoding the α 1 subunit of the inhibitory glycine receptor in the *spasmodic* mouse. *Nat. Genet.* *7*, 131- 135
- Saenzs-Lope, E., Herranz-Tannaro, F. J., Masdeu, J. C., Pena, J. R. (1984). Hyperekplexia: a syndrome of pathological startle response. *Ann. Neurol.* *15*, 36- 41
- Sakimura, K., Kushiya, E., Takahaschi, Y., Suzuki, Y. (1987). The structure and expression of neuron-specific enolase gene. *Gene* *60*, 103- 113
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. USA* *74*, 5463- 5467
- Saul, B., Schmieden, V., Kling, C., Mühlhardt, C., Gass, P., Kuhse, J., Becker, C.-M. (1994). Point mutation of glycine receptor α 1 subunit in the *spasmodic* mouse affects agonist response. *FEBS Lett.* *350*, 71- 76

- Schenkel, J. (1995). Transgene Tiere. Aus der Reihe *Labor im Fokus*, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg/ Berlin/ Oxford
- Schmidt, R. F. und Thews, G. (1995). Physiologie des Menschen. Springer Verlag Berlin, Heidelberg
- Schmieden, V., Grenningloh, G., Schofield, P., Betz, H. (1989). Functional expression in *Xenopus* oocytes of the strychnine binding 48 kd subunit of the glycine receptor. *EMBO J.* 8, 695- 700
- Schmieden, V., Kuhse, J., Betz, H. (1992). Agonist pharmacology of neonatal and adult glycine receptor α subunits: identification of amino acid residues involved in taurine activation. *EMBO J.* 11, 2025- 2032
- Schmieden, V., Kuhse, J., Betz, H. (1993). Mutation of glycine receptor subunit creates β -alanine receptor responsive to GABA. *Science* 262, 256- 258
- Schmitt, B., Knauss, P., Becker, C.-M., Betz, H. (1987). The Mr 93,000 polypeptide of the postsynaptic glycine receptor is a peripheral membran protein. *Biochemistry* 26, 805- 811
- Schorderet, D. F., Pescia, G., Bernasconi, A., Regli, F. (1994). An additional family with Starle disease and a G1192A mutation at the $\alpha 1$ subunit of the inhibitory glycine receptor gene. *Hum. Mol. Genet.* 3, 1201
- Schröder, S., Hoch, W., Becker, C.-M., Grenningloh, G., Betz, H. (1991). Mapping of antigenic epitopes of the $\alpha 1$ subunit of the inhibitory glycine receptor. *Biochem.* 30, 42- 47
- Seitanidou, T., Triller, A., Korn, H. (1988). Distribution of glycine receptors on the membrane of a central neuron: an immunoelectron microscopy study. *J. Neurosci.* 8, 4319- 4333
- Shepherd, G. M. (1993). Neurobiologie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Shiang, R., Ryan, S. G., Zhu, Y. Z., Hahn, A. F., O'Connell, P., Wasmuth, J. J. (1993). Mutations in the $\alpha 1$ subunit of the inhibitory glycine receptor cause the dominant neurologic disorder, hyperekplexia. *Nature Genet.* 5, 351- 357
- Smith, B. A. (1990). Strychnine poisoning. *J. Emerg. Med.* 8, 321- 330
- Sontheimer, H., Becker, C.-M., Pritchett, D.B., Schofield, P. G., Grenningloh, G., Kettenmann, H., Betz, H., Seeburg, P. H. (1989). Functional chloride channels by mammalian cell expression of rat glycine receptor subunit. *Neuron* 2, 1491- 1497
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503- 517
- Stratford-Perricaudet, L. D., Perricaudet, M. (1994). Gene Therapy: The advent of adenovirus. In: Wolf, J. A. *Gene therapeutics*. Birkhäuser: Boston, pp. 344- 362
- Suhren, O., Bruyn, G. W., Tuynman, J. A. (1966). Hyperekplexia: a hereditary startle syndrome. *J. Neurol. Sci.* 3, 577- 605

- Takagi, T., Pribilla, I., Kirsch, J., Betz, H. (1992). Coexpression of the receptor-associated protein gephyrin changes the ligand binding affinities of $\alpha 2$ glycine receptor. *FEBS Lett.* **303**, 178- 180
- Thompsen, R. F. (1990). *Das Gehirn. Von der Nervenzelle zur Verhaltenssteuerung.* Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg
- Tooze, J. (ed.) (1980). *DNA Tumor Viruses.* Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York
- Triller, A., Cluzeaud, F., Pfeiffer, F., Betz, H., Korn, H. (1985). Distribution of glycine receptors at the central synapses: An immunoelectron microscopy study. *J. Cell Biol.* **101**, 683-688
- Triller, A., Cluzeaud, F., Korn, H. (1987). Gamma-aminobutyric acid-containing terminals can be apposed to glycinergic receptors at central synapses. *J. Cell. Biol.* **104**, 947- 956
- Triller, A., Seitanidou, T., Franksson, O., Korn, H. (1990a). Size and shape of glycine receptor clusters in a central neuron exhibit a somato-dendritic gradient. *New Biol.* **2**, 637- 641
- Triller, A., Cluzeaud, F., Seitanidou, T. (1990b). Immunocytochemical Localization of the Glycine Receptor. In *Glycine Neurotransmission.* Ed. by Otterson, O.P. and Storm-Mathisen, J., John Wiley and Sons Ltd. pp. 83- 109
- Unwin, N. (1993). Neurotransmitter action: opening of ligand gated ion channels. *Cell* **72/Neuron** **10**, 31- 41
- Vandenberg, R. J., French, C. R., Barry, P. H., Shine, J., Schofield, P. R. (1992a). Antagonism of ligand-gated ion channel receptors: two domains of the glycine receptor a subunit form the strychnine binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1765- 1769
- Vandenberg, R. J., Handford, C.A., Schofield, P. R. (1992b). Distinct agonist- and antagonist-binding sites on the glycine receptor. *Neuron* **9**, 491- 496
- Vandenberg, R. J., Rajendra, S., French, C. R., Barry, P. H., Schofield, P. R. (1993). The extracellular disulfide loop motif of the inhibitory glycine receptor does not form the agonist binding site. *Mol. Pharmacol.* **44**, 198- 203
- van den Pol, A. N. und Gorcs, T. (1988). Glycine and glycine receptor immunoreactivity in brain and spinal cord. *J. Neurosci.* **8**, 472- 492
- Werman, R., Davidoff, R. A., Aprison, M. H. (1968). Inhibitory actions of glycine on spinal neurons in the cat. *J. Neurophysiol.* **31**, 81- 95
- White, W. F. und Heller, A. H. (1982). Glycine receptor alteration in the mutant mouse *spastic*. *Nature* **298**, 655- 657
- White, F. W. (1985). The glycine receptor in the mutant mouse *spastic* (*spa*): Strychnine Binding characteristics and pharmacology. *Brain Res.* **329**, 1- 6
- White, F. W., Regan, L. J., Roe, A. W., Messer, A. (1987). Behaviour, genetics and biochemistry of an allele of the mutant mouse *spastic*, *spa^{Alb}*. *J. Neurogenet.* **4**, 253- 258.
- Young, A. B. und Snyder, S. H. (1973). Strychnine binding associated with glycine receptors in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 2832- 2836

Young, A. B und Snyder, S. H. (1974). Strychnine binding in rat spinal cord membranes associated with the synaptic glycine receptor: Cooperativity of glycine interactions. *Mol. Pharmacol.* *10*, 790- 809

Zarbin, M. A., Wamsley, J. K., Kuhar, M. J. (1981). Glycine receptor: Light microscopic autoradiographic localization with [³H]strychnine. *J. Neurosci.* *1*, 532- 547

Eigene Publikationen

Hartenstein, B., Schenkel, J., Kuhse, J., Besenbeck, B., Kling, C., Becker, C.-M., Betz, H., Weiher, H. (1995). Low level expression of glycine receptor β subunit transgene is sufficient for phenotype correction in *spastic* mice. *EMBO J.* (in press)