

Glycintransporter im Säuger-ZNS: Eine molekular- und zellbiologische Analyse

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim
Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von Wencke Armsen
aus Buxtehude

Frankfurt am Main 2006

Diese Arbeit wurde in der Abteilung Neurochemie am Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt am Main, durchgeführt und vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Betz
Prof. Dr. Bernd Ludwig

Datum der Disputation: 28.06.2006

„Alle Entdeckungen sind die Früchte von unzähligen Versuchen gewesen.“

Johannes Müller

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. Heinrich Betz für die Möglichkeit, dieses interessante Thema in seinem Labor bearbeiten zu können, sowie für seine ständige Unterstützung und Begeisterung. Bei Herrn Prof. Dr. Bernd Ludwig möchte ich mich für die bereitwillige Übernahme der Begutachtung bedanken.

Ebenso danke ich den Mitgliedern meines PACs (Ph.D. Advisory Committee), Herrn Dr. Volker Eulenburg, Herrn Prof. Dr. Heinrich Betz, Herrn Prof. Dr. Bernd Ludwig und Herrn Prof. Dr. Jürgen Bereiter-Hahn, die in den jährlichen Treffen nicht nur ihre Zeit opferten, sondern mit ihren anregenden Kommentaren immer wieder neue Ideen in das Projekt einbrachten.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Volker Eulenburg, der nicht nur für die Diskussion von Ergebnissen immer ein offenes Ohr hatte. An dieser Stelle möchte ich auch Dr. Jesús Gomeza nennen, der leider die Transportergruppe in der Anfangsphase meiner Dissertation verließ, sich dennoch Zeit nahm, mich bei auftretenden Schwierigkeiten zu unterstützen.

Eine große Hilfe waren auch meine Laborkollegen, die jederzeit für ein angenehmes Laborklima sorgten. Insbesondere Dr. Joanna Gruzinska, meine Konferenzmitbewohnerin, Dr. Bettina Himmel, mit der ich jederzeit, Leid (insbesondere Dienstags) und Freud teilen konnte, aber auch Thomas Kremer, der 21,1 km mit mir gelitten hat.

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die mir vielseitig geholfen haben, insbesondere Ina Bartnick, die mit mir die Primärkulturen präpariert hat, den einzelnen Mitgliedern des Tierstalls, stellvertretend für alle sei hier Frau Dr. Christiane Kiefert genannt, die Sekretärin Maren Baier, die trotz ihrer eigenen Arbeit immer hilfsbereit war, und das Spülküchen-Team für täglich saubere Flaschen, Messzylinder und allerlei anderes.

Es ist mir ein großes Bedürfnis, mich auch bei meinen Freunden zu bedanken. Ein großes Dankeschön an Florian Schütz, der mich während der gesamten Zeit in meinen Zielen bestärkt und meine Zweifel zunichte gemacht hat, sowie Wiebke Pflästerer und Sabine Dahle für eine grandiose Freundschaft.

Zu allerletzt gilt mein größter Dank meinen Eltern, Maritta und Erik Armsen, auf deren Hilfe ich jederzeit zählen konnte. Auch meinem Bruder sei für seine liebenswerte Art gedankt.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung.....	VII
1	Einleitung..... 1
1.1	Das Nervensystem – ein Zusammenspiel von Exzitation und Inhibierung 1
1.2	Glycin als inhibitorischer Neurotransmitter..... 2
1.3	Glycintransporter und ihre Familie 4
1.4	Regulation des GlyT2 6
1.5	Lokalisation von GlyTs 8
1.6	GlyTs – <i>in vivo</i> Studien..... 9
1.7	Zielsetzung der Doktorarbeit..... 11
2	Material und Methoden 13
2.1	Organismen..... 13
2.1.1	Mäuse und Ratten 13
2.1.2	Bakterien 13
2.1.3	Zelllinien 13
2.2	Chemikalien 13
2.2.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial 13
2.2.2	Membranen und Filme..... 14
2.2.3	Vektoren und BAC-Klone..... 14
2.2.4	Größenstandards 14
2.2.5	Oligonukleotide..... 15
2.2.6	Antikörper..... 17
2.2.6.1	Primärantikörper 17
2.2.6.2	Sekundärantikörper 18
2.2.7	Enzyme 18
2.2.8	Kits 18
2.2.9	Foto- und Computer-Arbeiten 18
2.2.10	Medien, Nährböden, Standard-Lösungen 19
2.3	Methoden 21
2.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> 21
2.3.1.1	Plasmidpräparation mit dem Qiagen Spin Mini Prep..... 21
2.3.1.2	Minipräparation von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse 21
2.3.1.3	Plasmid-Isolation mit dem QIAfilter Midi/(Maxi) Prep Kit 21
2.3.1.4	DNA-Isolierung aus einem BAC-Klon 22
2.3.1.5	DNA-Reinigung über einen CsCl-Gradienten..... 22

2.3.2	Genotypisierungen	23
2.3.2.1	Schwanzbiopsie	23
2.3.2.2	GlyT2-PCR	23
2.3.3	Molekularbiologische Arbeiten	24
2.3.3.1	Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen.....	24
2.3.3.2	Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR	25
2.3.3.3	Kolonie-PCR.....	25
2.3.3.4	Präparation von RNA und cDNA Synthese	26
2.3.3.5	Phosphorylierung von PCR Fragmenten.....	26
2.3.3.6	Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	26
2.3.3.7	Auffüllen von 5'-Restriktionsübergängen mit der Klenow-Polymerase.	26
2.3.3.8	Dephosphorylierungen von DNA-Enden	27
2.3.3.9	Ligation von DNA-Enden	27
2.3.3.10	Darstellung kompetenter Zellen	27
2.3.3.10.1	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	27
2.3.3.10.2	Herstellung chemokompenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	28
2.3.3.11	Transformation	28
2.3.3.11.1	Elektrokompetente Transformation	28
2.3.3.11.2	Chemische Transformation.....	29
2.3.3.12	Agarosegelelektrophorese	29
2.3.3.13	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	29
2.3.3.14	Sequenzierungen	29
2.3.3.15	Transfer von DNA auf Nylon-Membranen („Southern Blot“)	30
2.3.3.16	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden.....	31
2.3.3.17	Transfer von Bakterienkolonien auf Nylonmembranen.....	32
2.3.4	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	32
2.3.4.1	Passagieren von Zellen	33
2.3.4.2	Einfrieren von Zellen.....	33
2.3.4.3	Auftauen und Revitalisieren von Zellen.....	33
2.3.4.4	Transfektionen.....	34
2.3.4.4.1	Transfektionen mit HEBS	34
2.3.4.4.2	Transfektionen mit Polyfect	34
2.3.4.5	Herstellung von Zelllysaten nach der Transfektion.....	35
2.3.4.6	Proteinbestimmungen.....	35
2.3.4.7	Deglykosylierungen	35
2.3.4.8	Oberflächenbiotinylierungen	36
2.3.4.9	SDS-PAGE und Western Blot	38
2.3.4.10	Glycinaufnahme-Experiment.....	39
2.3.5	Gewebekulturen	41
2.3.5.1	Anfertigung von Gefrierschnitten	41

2.3.5.2	Rückenmarkskulturen.....	41
2.3.5.3	Präparation von hippocampalen Neuronen.....	42
2.3.5.4	Transfektion von hippocampalen Neuronen.....	43
2.3.6	Immunfärbungen auf Glasplättchen.....	44
2.3.7	Immunfärbungen auf Gewebsschnitten.....	44
2.3.8	Generierung von BAC-transgenen Mäusen.....	45
2.3.8.1	Subklonierung in die Konstruktionsvektoren.....	45
2.3.8.2	Subklonierung in den Shuttle Vektor.....	46
2.3.8.2.1	Präparation des pSV1.recA-Vektors.....	46
2.3.8.2.2	Subklonierung in den pSV1.recA.....	47
2.3.8.3	Modifizierung des BAC-Klons durch zweifache homologe Rekombination.....	47
2.3.8.3.1	Darstellung BAC-kompetenter Zellen.....	48
2.3.8.3.2	Kotransformation und Identifikation des Integrats.....	49
2.3.8.4	Deintegration des Shuttle Vektors durch homologe Rekombination....	50
2.3.8.5	Aufreinigung der DNA und Pronukleusinjektion.....	51
3	Ergebnisse.....	53
3.1	C-terminale Mutanten.....	53
3.1.1	Klonierung von Maus-GlyT2 wt cDNA.....	54
3.1.2	Analyse der unmarkierten und EGFP-markierten Mutanten.....	55
3.1.2.1	Proteinexpression und Glykosylierung der GlyT2 PDZ-DBM- Mutanten.....	55
3.1.2.2	Analyse des Oberflächenproteins.....	57
3.1.2.3	Lokalisationsanalyse der mGlyT2-PDZ-DBM-Mutanten.....	58
3.1.2.4	Glycinaufnahme der PDZ-DBM-Mutanten.....	62
3.1.3	Analyse der myc-markierten PDZ-DBM-Mutanten.....	64
3.1.3.1	Analyse der myc316-markierten GlyT2.....	64
3.1.3.2	Analyse der C-terminal markierten Konstrukte.....	66
3.1.4	Lokalisationsanalyse der GlyT2-PDZ-DBM Mutanten in hippocampalen Neuronen.....	68
3.1.5	Zusammenfassung C-terminale Mutanten.....	70
3.2	N-terminale Mutanten.....	72
3.2.1	Klonierung der N-terminalen Mutanten.....	72
3.2.2	Analyse der N-terminalen Mutanten.....	73
3.2.2.1	Expressions- und Glykosylierungsanalyse der N-terminalen Deletionsmutanten.....	73
3.2.2.2	Analyse der Oberflächenexpression und Lokalisation der N-terminalen GlyT2-Mutanten.....	74
3.2.2.3	Glycintransportaktivität der N-terminalen Deletionskonstrukte.....	76

3.2.2.4	[³ H]Glycinaufnahme-Experimente der N-terminalen GlyT2-Deletionsmutanten zu unterschiedlichen Zeitpunkten	77
3.2.3	Analyse der EGFP-markierten N-terminalen Deletionsmutanten.....	79
3.2.3.1	Herstellung der myc-markierten Konstrukte und Überprüfung der Funktionalität.....	81
3.2.4	Lokalisation in hippocampalen Neuronen	83
3.2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der N-terminalen Mutanten von GlyT2	85
3.2.6	Generierung BAC-transgener Mauslinien	86
3.2.6.1	Generierung von GlyT2-BAC-transgenen Mäuse.....	86
3.2.6.2	Strategie der Insertion der veränderten cDNAs in den BAC.....	87
3.2.6.3	Überprüfung der Konstrukte durch Southern Blot	90
3.2.6.4	Identifizierung der „Founder“.....	94
3.2.7	Darstellung einer GlyT2-Cre Mauslinie	95
3.3	Untersuchung des Glycinrezeptors in GlyT2-defizienten Mäusen	99
4	Diskussion	101
4.1	Analyse der PDZ-DBM-Mutanten	101
4.1.1	Biochemische und funktionelle Analyse der GlyT2-PDZ-DBM-Mutanten	102
4.1.2	Analyse des Plasmamembrananteils des GlyT2.....	102
4.1.3	Funktionsanalyse der GlyT2-PDZ-DBM-Konstrukte.....	103
4.1.4	Lokalisationsanalyse der GlyT2-PDZ-DBM-Mutanten	103
4.2	Analyse der Epitop-markierten GlyT2-Proteine	105
4.2.1	Charakterisierung des im EL2 myc-markierten GlyT2	106
4.2.2	Analyse des C-terminal myc-markierten GlyT2	108
4.2.3	C-terminal EGFP-markierte GlyT2s	109
4.3	N-terminale GlyT2-Mutanten.....	110
4.3.1	N-terminale Deletionen des GlyT2.....	110
4.3.1.1	Expression und Lokalisation der N-terminalen Deletionsmutanten....	110
4.3.1.2	Glycintransport in den Mutanten Δ AA1-174 und Δ AA1-184.....	110
4.3.1.3	Lokalisation der N-terminalen Deletionsmutanten	111
4.4	Generierung transgener Mäuse mit N-terminalen GlyT2-Deletionen .	113
4.5	Generierung einer GlyT2-Cre transgenen Mauslinie	115
4.6	GlyR-Cluster in GlyT2-defizienten Mäusen	117
5	Fazit.....	118
6	Anhang.....	129
6.1	Abbildungsverzeichnis	129
6.2	Tabellenverzeichnis.....	130
6.3	Abkürzungsverzeichnis.....	131
6.4	Lebenslauf.....	135

6.5	Publikationsliste.....	136
6.6	Posterpräsentationen	136
6.7	Präsentationen	136

ZUSAMMENFASSUNG

Glycin ist ein wichtiger inhibitorischer Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Um die glycinerge Erregungsübertragung zu sichern, muss die Glycinkonzentration an Synapsen präzise reguliert werden. Hierfür sind die Glycintransporter, GlyT1 und GlyT2, verantwortlich. Der GlyT2 ist ein präsynaptisches Protein, das in glycinergen Nervenendigungen nahe der aktiven Zone lokalisiert ist. Das über den Transporter aus dem extrazellulären Raum aufgenommene Glycin steht anschließend für die Befüllung der synaptischen Vesikel durch den vesikulären inhibitorischen Aminosäuretransporter (VIAAT) zur Verfügung. Die GlyT2-Defizienz führt in Mäusen zu einem letalen Phänotyp und verdeutlicht die Notwendigkeit eines hochaffinen Glycinaufnahmesystems in glycinergen Neuronen. Um mögliche Mechanismen zu untersuchen, die zur präzisen Lokalisation des GlyT2 in der Präsynapse führen, wurde das PDZ-Domänenbindungsmotiv (PDZ-DBM) am extremen C-Terminus bzw. die lange N-terminale Domäne dieses Transporters deletiert.

Durch biochemische und pharmakologische Analysen von transfizierten HEKT-Zellen konnte gezeigt werden, dass der Verlust des PDZ-DBM oder der N-terminalen Domäne die Proteinexpression, die Glykosylierung und die Transportaktivität des GlyT2 nicht beeinflussten. Längere Deletionen des N-Terminus (Δ AA1-184) setzten jedoch die Effizienz der Glycinaufnahme herab und ergaben im Vergleich zum wt-Protein einen um 60% reduzierten v_{\max} -Wert, während die apparente Glycinaffinität (K_M -Wert) unverändert blieb. Lokalisationsstudien und Oberflächenbiotinylierungen zeigten GlyT2 wt-Immunreaktivität an der Plasmamembran, die sich qualitativ und quantitativ nicht von denen der N- und C-terminalen Mutanten unterschied. Das PDZ-DBM und die N-terminale Domäne spielen folglich in der Prozessierung und der Transportfunktion des GlyT2 eine untergeordnete Rolle. Möglicherweise reduziert die fast vollständige Deletion der N-terminalen Domäne jedoch die Stabilität des GlyT2.

In transfizierten hippocampalen Neuronen wurde der Einfluss des PDZ-DBM und der N-terminalen Domäne hinsichtlich der GlyT2 Lokalisation analysiert. Die transfizierten Mutantenproteine zeigten eine diffuse Verteilung mit partiellen Anreicherungen von GlyT2-Immunreaktivität. Das wt-Protein kolokalisierte mit Synaptophysin, exzitatorischen synaptischen Markern wie PSD95 und mit den inhibitorischen Markern Gephyrin und VIAAT. Nach Deletion des PDZ-DBM hingegen zeigte der GlyT2 eine um ca. 50% verminderte Kolokalisation mit allen untersuchten synaptischen Markern. Damit konnte hier erstmals eine Funktion des PDZ-DBM für die Anreicherung von GlyT2 an Synapsen gezeigt werden. Mit N-terminalen Deletionsmutanten transfizierte hippocampale Neurone wiesen kolokalisierende GlyT2 Δ N-PSD95-Puncta zumeist in MAP2-positiven Neuriten auf, während das wt-Protein zumeist in MAP2-negativen Neuriten kolokalisierte. MAP2 ist ein mikrotubuli-assoziiertes Protein, das in Dendriten, aber nicht in Axonen, auftritt und somit eine Unterscheidung derselben ermöglicht. Aufgrund der Überexpression in transfizierten Neuronen war die GlyT2-

Immunreaktivität aber sowohl in axonalen als auch dendritischen Neuriten zu beobachten. Zusätzlich zu der in größeren Clustern gefundenen synaptischen GlyT2 Δ N-Immunreaktivität war eine Färbung hauptsächlich in sehr kleinen Strukturen ($\leq 1 \mu\text{m}$) nachzuweisen, die Transportvesikeln entsprechen könnten. Dies ist mit einem längeren Verbleib der Deletionsmutanten in intrazellulären Strukturen erklärbar.

Im Hippocampus wird GlyT2 endogen nur sehr schwach in einer Subpopulation von putativ glycinergen Neuronen exprimiert. Um die Lokalisation der N-terminalen GlyT2-Proteine in Zellen zu untersuchen, die eine hohe endogene GlyT2-Expression aufweisen, wie spinalen Neuronen, die sich aber nur schlecht transfizieren lassen und in Kultur keine adulte GlyT2-Lokalisation aufweisen, wurden BAC-transgene Mäuse generiert, die myc-markierte GlyT2 Δ N-Proteine unter Kontrolle des GlyT2-Promotors exprimieren. Der Vorteil von BAC-transgenen Mauslinien ist, dass sie aufgrund der Verwendung des endogenen Promotors das Transgen nur schwach überexprimieren. Founder-Mäuse, in denen der jeweilige modifizierte BAC-Klon (mGlyT2 wt, Δ AA14-174 oder Δ AA14-184) integriert wurde, wurden identifiziert und mit C57BL/6J-Mäusen verpaart, um so transgene Mauslinien zu etablieren und die Lokalisation der mutierten GlyT2-Proteine zu analysieren. Zusätzlich wurde eine BAC-transgene Cre-Mauslinie generiert, die die Cre-Rekombinase in GlyT2-positiven Zellen exprimiert. Durch die Verpaarung mit konditionalen oder transgenen Mauslinien soll mit diesen GlyT2/Cre-Mäusen die Funktion einzelner Genprodukte in glycinergen Zellen untersucht werden.

In dieser Arbeit wurden außerdem die Glycinrezeptor (GlyR) α -Untereinheiten (UE) in GlyT2-defizienten Mäusen untersucht. GlyT2 $-/-$ Tiere sterben in der zweiten postnatalen Woche nach der Geburt und zeigen einen starken neuromotorischen Phänotyp. Da in demselben Zeitraum ein Austausch der embryonalen $\alpha 2$ - durch die adulte $\alpha 1$ -UE erfolgt, wurde die Entwicklung der $\alpha 1$ - und der Gesamt- α -Immunreaktivität in Rückenmarksschnitten von wt und GlyT2 $-/-$ Tieren analysiert und miteinander verglichen. Die Daten zeigen, dass der α -UE-Austausch in den GlyT2-defizienten Tieren ähnlich wie in wt Tieren erfolgt. In $\alpha 1$ -GlyRs ist die Öffnungszeit des aktivierten Kanals kürzer als bei $\alpha 2$ -GlyRs. Zusammen mit der geringeren Ausschüttung an Glycin aufgrund der GlyT2-Defizienz lässt sich so das Auftreten des Krampf-Phänotyps der GlyT2 $-/-$ Mäuse nach erfolgtem UE-Austausch erklären.

Durch die Analyse der intrazellulären Domänen des GlyT2 konnte dem C-terminalen PDZ-DBM eine Funktion in der Stabilisierung des Transporters an Synapsen zugewiesen werden, während die N-terminale Domäne wahrscheinlich eine Rolle im axonspezifischen Transport des Proteins hat. Weitere Aufschlüsse über die Funktion der N-terminalen Domäne soll aus den hier generierten BAC-transgenen Mauslinien gewonnen werden, in denen das Problem der Überexpression, wie es in transfizierten Neuronen auftritt, vermieden werden.

1 EINLEITUNG

Das Nervensystem ist ein kompliziertes Netzwerk aus Neuronen, deren Zusammenspiel nicht nur entscheidend zur Koordination aller Körperfunktionen beiträgt, sondern auch als Steuerungszentrale des menschlichen Denkens gilt. Aus diesem Grund hat die Funktion des Nervensystems die Menschheit seit jeher fasziniert. Ein Verständnis der molekularen Prozesse der Nervenübertragung kann zudem zu Therapien für Krankheiten führen, so könnten z. B. Fehlregulationen der Signalübertragung ausgeglichen werden. Die Neurobiologie hat sich zum Ziel gesetzt, diese Prozesse auf molekularer Ebene aufzuklären und neuronale Netzwerke zu entschlüsseln.

1.1 Das Nervensystem – ein Zusammenspiel von Exzitation und Inhibierung

Die Signalweiterleitung innerhalb eines Neurons wird durch sog. Aktionspotentiale erreicht. Das sind elektrische Impulse im Millisekundenbereich, deren Frequenz alle Informationen verschlüsselt. Die Übertragung von Nervenzelle zu Nervenzelle erfolgt an besonderen Strukturen, den Synapsen, die in elektrische und chemische Synapsen unterteilt werden und sich in ihrer Signalübertragungsweise unterscheiden. Erstere geben ihre Information durch elektrische Kopplung über sog. „Gap-junctions“ an die nächste Zelle weiter, während letztere chemische Botenstoffe zur Übertragung nutzen. Diese chemischen Botenstoffe, die Neurotransmitter, lassen sich in zwei Hauptklassen unterteilen: diejenigen, die in der postsynaptischen Zelle ein exzitatorisches Signal auslösen, wie z. B. Glutamat und Acetylcholin, und die inhibitorischen, γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glycin. Der Ablauf der Informationsweitergabe erfolgt, indem das Aktionspotential die zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration durch Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle erhöht. Synaptotagmin I, der Haupt- Ca^{2+} -Sensor der Synapse, reagiert auf die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration und ermöglicht zusammen mit dem SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive component attachment protein receptor)-Komplex, hauptsächlich bestehend aus Synaptobrevin, SNAP-25 und Syntaxin 1A, schließlich die Verschmelzung von fusionskompetenten Vesikeln mit der präsynaptischen Membran (Koh and Bellen, 2003; Legendre, 2001; Rosenmund *et al.*, 2003). Der Neurotransmitter wird in den synaptischen Spalt, der eine Weite von etwa 10-40 nm hat, ausgeschüttet und bindet in wenigen Millisekunden an Rezeptoren in der postsynaptischen Membran (Clements *et al.*, 1992; Gray, 1959). Hier wird durch die Bindung des Neurotransmitters eine Konformationsänderung am Rezeptor ausgelöst, die schließlich zur Öffnung ionenpermeabler Kanäle führt.

Die Signalübertragung im Nervensystem muss zwei Grundvoraussetzungen erfüllen, um funktionieren zu können. Zum einen muss sie eine hohe temporäre und räumliche Auflösung ermöglichen, zum anderen muss bei einer hohen Signaldichte die Möglichkeit bestehen, eine Übererregung des Neurons zu vermeiden. Hierfür stehen den Neuronen neben exzitatorischen auch inhibitorische Signale zur Verfügung. Eine Fehlregulation von Exzitation und Inhibierung kann fatale Folgen für den Organismus haben und verdeutlicht die Notwendigkeit einer präzisen Regulation. Stehen diese beiden Systeme im Ungleichgewicht, kann es zu schweren neurologischen Störungen wie Autismus (Rubenstein und Merzenich, 2003), Schizophrenie (Wassef *et al.*, 2003) oder Epilepsie kommen. Bei Patienten, die unter Epilepsie leiden, führt die zu geringe Inhibierung zu einer massiven oszillatorischen Hirnfunktion (Brenner, 2004).

Die Effizienz der Signalübertragung zwischen zwei Neuronen kann auf vielfältige Weise reguliert werden. Einerseits kann dies über die Anzahl der Synapsen, andererseits durch die Regulation der Effizienz einzelner Synapsen erreicht werden. Letzteres kann durch mehrere molekulare Mechanismen beeinflusst werden, so kann z. B. die von der Präsynapse ausgeschüttete Transmittermenge verändert oder die Aktivität von Ionenkanälen und Rezeptoren in der postsynaptischen Membran moduliert werden. Die ausgeschüttete Transmittermenge hat somit einen entscheidenden Einfluss auf die Stärke der Signalübertragung. Aber auch die Dauer, die der Transmitter im synaptischen Spalt verbleibt, bevor er entweder eliminiert oder inaktiviert wird, trägt entscheidend zur Regulation der Neurotransmission bei. Die Elimination des Neurotransmitters Acetylcholin beispielsweise wird durch die Acetylcholin-Esterase, eines der schnellsten und effizientesten Enzyme, hydrolysiert. Die Entfernung von Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt kann aber auch durch hochaffine Transportsysteme, wie sie in den meisten glycinergen Synapsen vorliegen, reguliert werden.

1.2 Glycin als inhibitorischer Neurotransmitter

Glycin und GABA sind die wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter des zentralen Nervensystems (ZNS) von Säugetieren. Während GABA im gesamten ZNS eine Inhibierung vermittelt, wird Glycin hauptsächlich von inhibitorischen Interneuronen im Rückenmark und im Hirnstamm verwendet (Betz *et al.*, 2000). An glycinergen inhibitorischen Synapsen bindet der Neurotransmitter Glycin an Glycinrezeptoren (GlyRs) in der postsynaptischen Membran, und im maturen Nervensystems führt dies aufgrund der unterschiedlichen Ionenkonzentrationen zwischen dem intrazellulären und dem extrazellulären Milieu zu einem Cl⁻-Einstrom (Abbildung 1-1). Es erfolgt eine Hyperpolarisation der postsynaptischen Zelle, die wiederum einer Depolarisation dieser Zelle entgegenwirkt und somit ihre Erregbarkeit erschwert (Lynch, 2004).

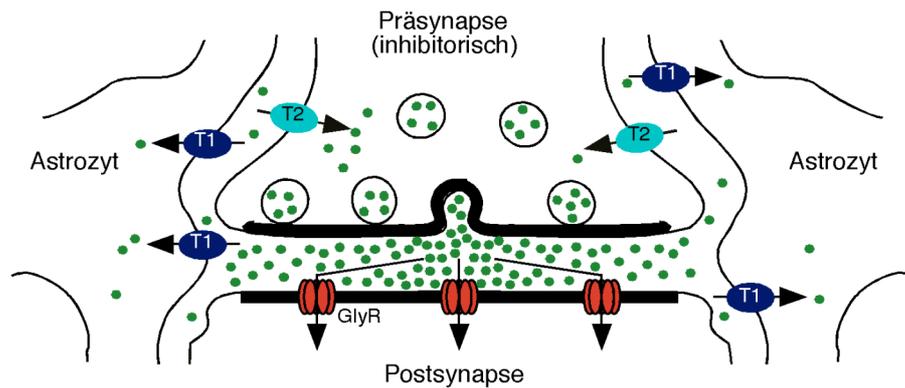


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung einer glycinergen inhibitorischen Synapse.

Zur Signalübermittlung wird die Fusion der Glycin-befüllten Vesikel an der präsynaptischen Membran ausgelöst, und es kommt zur Ausschüttung von Glycin in den synaptischen Spalt. Glycin bindet an GlyRs in der postsynaptischen Membran und führt dort zu einem inhibitorischen Signal. Der GlyT1 entfernt das Glycin aus dem synaptischen Spalt und beendet somit die Neurotransmission. Der GlyT2 stellt ausreichend Glycin in der Präsynapse bereit, damit die Vesikel erneut mit Glycin befüllt werden können. T1, GlyT1; T2, GlyT2.

Die GlyRs bestehen aus fünf Untereinheiten (UE), zusammengesetzt aus zwei α - und drei β -UE (Grudzinska *et al.*, 2005; Langosch *et al.*, 1988). Vier verschiedene α -UE ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) mit unterschiedlichen Eigenschaften im ZNS sind bis zum jetzigen Zeitpunkt kloniert worden (Grenningloh *et al.*, 1987; Grenningloh *et al.*, 1990; Matzenbach *et al.*, 1994). So ist die $\alpha 2$ -UE der wichtigste Subtyp während der Embryonalentwicklung. Im Laufe der postnatalen Entwicklung wird die $\alpha 2$ -UE durch die $\alpha 1$ -UE ersetzt, die eine schnellere Kinetik besitzt (Kuhse *et al.*, 1990; Singer *et al.*, 1998). Die $\alpha 3$ -UE kommt hauptsächlich in den oberen Schichten des dorsalen Horns des Rückenmarks vor und spielt in der Schmerzregulation durch Prostaglandine eine essentielle Rolle (Harvey *et al.*, 2004). Interessanterweise übermittelt Glycin während der pränatalen Entwicklung ein exzitatorisches Signal, da die Nervenzellen zu diesem Zeitpunkt eine hohe intrazelluläre Cl^- -Konzentration besitzen. Daher führt die Öffnung der Anionenkanäle zu einem Cl^- -Efflux und somit zu einem depolarisierenden Effekt (Singer *et al.*, 1998). Erst nachdem der K^+/Cl^- -Kotransporter KCC2 kurz nach der Geburt exprimiert wird, kommt es zu einer Absenkung der intrazellulären Cl^- -Konzentration (Hubner *et al.*, 2001; Rivera *et al.*, 1999). Von diesem Zeitpunkt an wirkt Glycin inhibitorisch.

Glycin spielt aber nicht nur an „klassisch“ glycinergen Synapsen eine wichtige Rolle, sondern reguliert auch exzitatorische glutamaterge Synapsen im Kortex. Neben D-Serin ist Glycin ein Ko-Agonist des ionotropen N-Methyl-D-Aspartat Rezeptors (NMDAR) (Johnson und Ascher, 1987; Verdoorn *et al.*, 1987). NMDARs binden Glycin mit einer ungefähr 100fach stärkeren Affinität als GlyRs, weswegen zunächst postuliert wurde, dass die Glycin-Bindungsstelle des NMDAR unter physiologischen Bedingungen permanent gesättigt ist. *In situ* Studien deuten jedoch auf eine Glycin-abhängige Aktivierung des NMDAR hin (Berger *et al.*, 1998). Sehr hohe Glycin-

2005). Der LeuT weist eine pseudo-zweifache Symmetrieachse in der Membranebene zwischen den Membransegmenten 1-5 und 6-10 auf, die aufgrund der Aminosäuresequenz nicht erwartet worden war. Die 12 TMDs sind durch 5 intrazelluläre (IL) und 6 extrazelluläre Loops (EL) miteinander verbunden, die teilweise α -helikale und im langen EL2 auch β -Faltblattstrukturen aufweisen (siehe Abbildung 1-2 B). Die Bindungstasche für das Substrat befindet sich zwischen der TMD1 und TMD6, in deren direkter Umgebung sich auch die Na^+ -Bindungsstellen befinden.

In den Transportern der *SLC6*-Familie konnte durch gerichtete („site-directed“) Mutagenese gezeigt werden, dass N-Glykosylierungen im EL2 auftreten. Im Falle von GlyTs findet die Glykosylierung an vier Asparaginresten statt, die eine wichtige Rolle für die Stabilisierung der GlyTs in der Zellmembran spielen (Olivares *et al.*, 1997). Die Mutation von einem bis zu allen vier Asparaginresten führt zu einer sequenziellen Reduktion der Glycinaufnahme-Aktivität sowie der Anzahl von GlyTs an der Zelloberfläche (Martinez-Maza *et al.*, 2001). Im Falle vom GlyT2 führt eine Entfernung der N-Glykosylierungen außerdem zu einer Reduktion der Transportaktivität, die vermuten lässt, dass die Kohlenhydratreste den Transporter in einer aktiven Konformation halten (Martinez-Maza *et al.*, 2001; Nunez und Aragon, 1994). Eine weitere Domäne, die im Transportmechanismus eine wichtige Rolle spielt, ist die TMD3, die laut der Kristallstruktur des LeuT in unmittelbarer Nachbarschaft zur Glycinbindungsstelle liegt (Yamashita *et al.*, 2005). Eine Mutation des Y289-Restes im GlyT2 führt zu einer Veränderung der Glycinaffinität (K_M) und einer stark veränderten Na^+ - und Cl^- -Abhängigkeit (Ponce *et al.*, 2000).

Die intrazellulären Domänen der meisten *SLC6*-Neurotransmitter-Transporter haben eine vergleichbare Länge von etwa 30-45 Aminosäuren (AA) für den C-Terminus und 30-90 AA für den N-Terminus. Interessanterweise verfügen beide GlyTs mit 60-70 AA über deutlich längere C-terminale Domänen. Der GlyT2 weist zusätzlich mit über 200 AA eine sehr lange, in der gesamten Familie einmalige, N-terminale Domäne auf. Trotz dieser Länge konnte ihr bis jetzt weder eine physiologische Funktion zugewiesen werden, noch sind in ihr bekannte Proteinmotive zu finden.

Die GlyTs importieren neben Na^+ - und Cl^- -Ionen auch Glycin. Eine Analyse der Stöchiometrie hat gezeigt, dass sich die beiden GlyTs in der Anzahl der kotransportierten Ionen unterscheiden. So wurde die Stöchiometrie vom GlyT1 mit 2 $\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{Glycin}$ bestimmt, während der GlyT2 3 Na^+ pro Transportzyklus importiert (Roux und Supplisson, 2000). Dieser Unterschied hat funktionelle Konsequenzen; so ist die treibende Kraft des GlyT2-Transports unter physiologischen Bedingungen erheblich höher als für den GlyT1. Das erklärt auch die höhere Kapazität des GlyT2, die Glycinkonzentration innerhalb der Zelle im millimolaren Bereich und extrazellulär im mikromolaren Bereich zu halten (Roux und Supplisson, 2000). Die hohe intrazelluläre Glycinkonzentration spielt für die effiziente Befüllung von synaptischen

Vesikeln in der Präsynapse durch den vesikulären inhibitorischen Aminosäuretransporter (VIAAT) eine entscheidende Rolle (Sagne *et al.*, 1997). Im Gegensatz zum GlyT2 kann der GlyT1 unter bestimmten Bedingungen auch in einem reversen Glycinaufnahme-Modus funktionieren, beispielsweise wenn sich die Ionenkonzentrationen innerhalb der Zelle oder die Membrankapazitäten verändern (Roux und Supplisson, 2000; Sakata *et al.*, 1997).

Vom GlyT2 sind drei unterschiedliche Isoformen (a-c) beschrieben worden, die durch alternativen Exongebrauch entstehen und sich nur im extremen N-Terminus unterscheiden (Abbildung 1-3). Der GlyT2a hat acht zusätzliche Aminosäuren, während GlyT2b und c sich nur in der 5'-untranslatierten Region unterscheiden, aber eine identische Aminosäuresequenz von 791 Aminosäuren haben (Ebihara *et al.*, 2004). Ob sich die einzelnen Splicevarianten in ihrer Lokalisation oder Funktion unterscheiden, ist noch nicht untersucht worden.

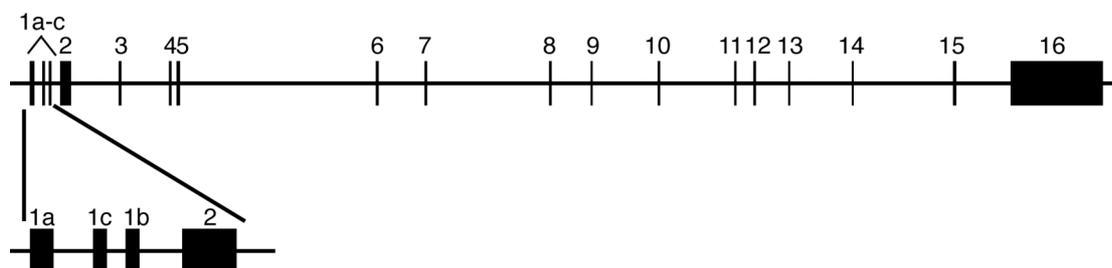


Abbildung 1-3: Genomische Struktur des Maus-GlyT2-Gens. Der GlyT2 ist durch 16 Exons kodiert (schwarze Kästen). Es existieren drei Splicevarianten des Exons 1 (a-c), die alternativ verwendet werden und nur im Falle des Exon 1a ein Start-ATG enthalten. Für die Isoformen 1b und 1c befindet sich das Start-ATG im Exon 2. Die beiden Isoformen unterscheiden sich somit nur in der 5'-untranslatierten Region.

1.4 Regulation des GlyT2

Am C-terminalen Ende des GlyT2 befindet sich ein PDZ-Domänenbindungsmotiv. Der Name der PDZ-Domäne stammt von den ersten drei Proteinen, in denen eine solche Domäne identifiziert wurde: dem postsynaptische Dichte-Protein 95 (PSD95), dem Disc Large Homolog A (Dlg-A) und dem Zonula Occludens Protein (ZO1). Die Bindung der PDZ-Domäne an das Bindungsmotiv wird von den letzten drei Aminosäuren eines Proteins vermittelt (Doyle *et al.*, 1996). Der GlyT2 hat ein Klasse III-PDZ-Domänenbindungsmotiv mit der Sequenz TQC, an das die zwei PDZ-Domänen von Syntenin 1 binden (Ohno *et al.*, 2004). Syntenin 1 wurde als ein Syndecan-bindendes Protein identifiziert und kann mit mehreren Proteinen interagieren, die in der prä- und postsynaptischen Membran vorkommen (Grootjans *et al.*, 1997; Hirbec *et al.*, 2002; Koroll *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 1998). Daher wird dem Syntenin 1 eine Rolle in der Lokalisation von Proteinen in der prä- und postsynaptischen Membran zugesprochen. Interessanterweise bindet Syntenin 1

nicht nur GlyT2 sondern auch Syntaxin 1A, ein präsynaptisches Protein des SNARE-Komplexes (Geerlings *et al.*, 2000). Die Interaktion von Syntaxin 1A und Syntenin 1 wird über die PDZ-Domäne 1 des Syntenins hergestellt. Die Koexpression von GlyT2 und Syntaxin 1A in COS-7-Zellen verringert die Glycinaufnahme durch eine Erhöhung der Internalisierung durch Endozytose (Geerlings *et al.*, 2000). In Neuronen hat sich hingegen gezeigt, dass Syntaxin 1A für die Ca^{2+} -abhängige Integration von GlyT2 in die Oberfläche wichtig ist, die Internalisierung aber unabhängig von Syntaxin 1A erfolgt (Geerlings *et al.*, 2001). Somit könnten Syntaxin 1A mehrere regulatorische Funktionen zukommen. Bindungsstudien haben gezeigt, dass Syntenin 1 nicht GlyT2 und Syntaxin 1A gleichzeitig binden kann (Ohno *et al.*, 2004).

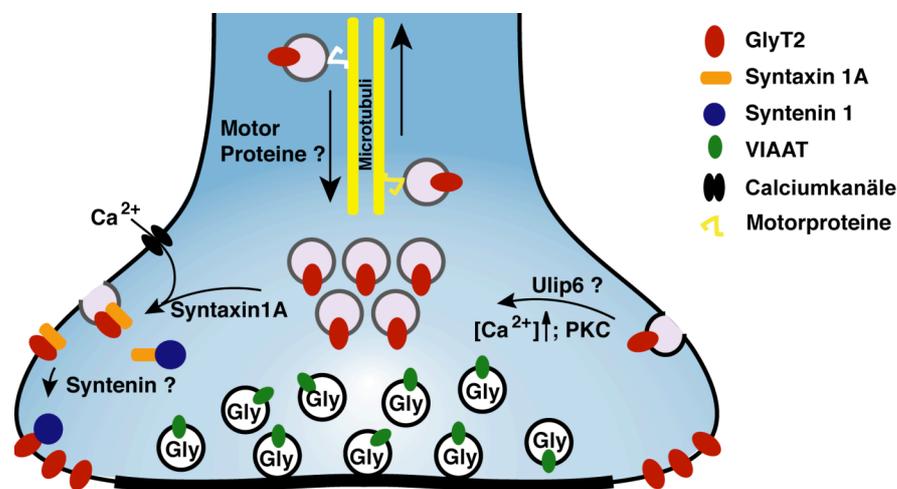


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der GlyT2-Transportwege im Neuron. Der GlyT2 wird in Transportvesikeln (lila) durch Motorproteine in die präsynaptische Terminalie transportiert. Dort kann ein schwacher Einstrom von Ca^{2+} -Ionen bzw. die Bindung von Syntaxin 1A zur Fusion dieser Vesikel mit der Plasmamembran führen. Die Internalisierung des GlyT2 kann entweder durch einen starken Einstrom von Ca^{2+} -Ionen, durch PKC-Aktivierung oder möglicherweise durch Ulip6 erfolgen.

Ein weiteres Protein, das mit der N-terminalen Domäne interagiert, ist Ulip6 (Horiuchi *et al.*, 2005), ein Mitglied der „Collapsin Response Mediator“-Proteinfamilie. Dieser Familie wird eine Funktion in der Endozytose zugeschrieben (Nishimura *et al.*, 2003), und Ulip6 könnte somit für die Entfernung des GlyT2 von der Plasmamembran wichtig sein. Die Behandlung von GlyT2 mit dem Phorbolster PMA, der zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) führt, resultiert in einer Reduktion des Oberflächen-GlyT2s. Diese Internalisierung wird von einem Motiv in der IL2 vermittelt (Fornes *et al.*, 2004; Gomeza *et al.*, 1995). Mutationen von geladenen Aminosäuren in der IL2 verhindern die Internalisierung von GlyT2 nach PMA-Behandlung.

1.5 Lokalisation von GlyTs

GlyTs zeigen in vielen Bereichen des ZNS ein überlappendes Expressionsmuster. Starke GlyT-Immunreaktivität kann im Rückenmark, Hirnstamm und Cerebellum detektiert werden (Jursky und Nelson, 1996; Luque *et al.*, 1995; Zafra *et al.*, 1995). Zudem ist GlyT1-Protein auch im Vorderhirn, dem Bulbus olfactorius und der Retina zu finden (Abbildung 1-5). Eine Expression außerhalb des Nervensystems wurde für beide GlyTs beschrieben, für GlyT1 in Pankreas, Leber und der Verbindung des Magendarmtrakts (Zafra *et al.*, 1995), während GlyT2 in den Langerhanszellen von A-Inseln im Pankreas vorkommt (Gammelsaeter *et al.*, 2004). Die Funktion der GlyTs in diesen Geweben ist nicht bekannt. Trotz ihrer großen Ähnlichkeit im Expressionsmuster zeigen GlyTs eine unterschiedliche zelluläre Lokalisation. Im kaudalen ZNS ist GlyT1 fast ausschließlich in Gliazellen, insbesondere in Astrozyten, lokalisiert, während GlyT2 die neuronale Isoform darstellt (Zafra *et al.*, 1995). In Regionen, die weitgehend frei von GlyT2-Immunreaktivität sind, wie dem Kortex und der Retina, ist der GlyT1 zusätzlich, bzw. in der Retina ausschließlich, in neuronalen Zellen zu finden, sowie in einer Subpopulation wahrscheinlich glutamaterger Neuronen des Hippocampus und Amacrin- und Ganglionneuronen in der Retina (Cubelos *et al.*, 2005; Pow und Hendrickson, 1999).

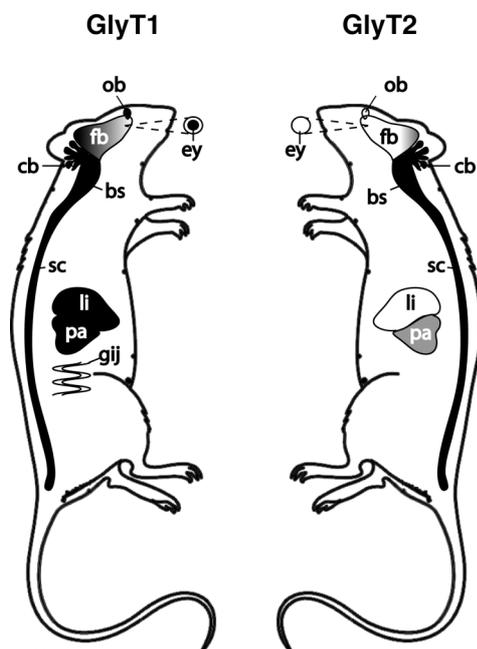


Abbildung 1-5: Expressionsmuster der GlyTs. Beide GlyTs zeigen ein ähnliches Expressionsmuster im ZNS mit besonders starker Expression im Rückenmark, im Hirnstamm und schwächerer im Cerebellum. Der GlyT1 zeigt zusätzliche Expression im Bulbus olfactorius, in Vorderhirnregionen, der Leber und dem Gastrointestinaltrakt. bs, Hirnstamm; cb, Cerebellum; ey, Auge; fb, Vorderhirn; gij, Verbindung des Gastrointestinaltrakts; li, Leber; ob, Bulbus olfactorius; pa, Pankreas; sc, Rückenmark.

Eine Analyse der GlyT2-Expression hat gezeigt, dass GlyT2 einen verlässlichen Marker für glycinerge Neuronen darstellt und ausschließlich in der präsynaptischen Terminalie gegenüber vom GlyR lokalisiert ist (Mahendrasingam *et al.*, 2003; Poyatos *et al.*, 1997). Elektronenmikroskopische Analysen haben gezeigt, dass der GlyT2 in der Plasmamembran angrenzend an die aktive Zone (CAZ), aber nicht in

ihr, vorkommt (Mahendrasingam *et al.*, 2003; Zafra *et al.*, 1995). Erst kürzlich wurde GlyT2-Immunreaktivität auch im Hippocampus identifiziert, von dem man früher annahm, dass er frei von glycinerner Neurotransmission sei (Danglot *et al.*, 2004). Aufgrund seiner Lokalisation in der Präsynapse glycinerner Neuronen wurde dem GlyT2 lange eine Funktion in der Entfernung von Glycin aus dem synaptischen Spalt zugeschrieben. Dieses konnte durch die Generierung von für jeweils ein GlyT-Gen defizienten Mäusen widerlegt werden.

1.6 GlyTs – *in vivo* Studien

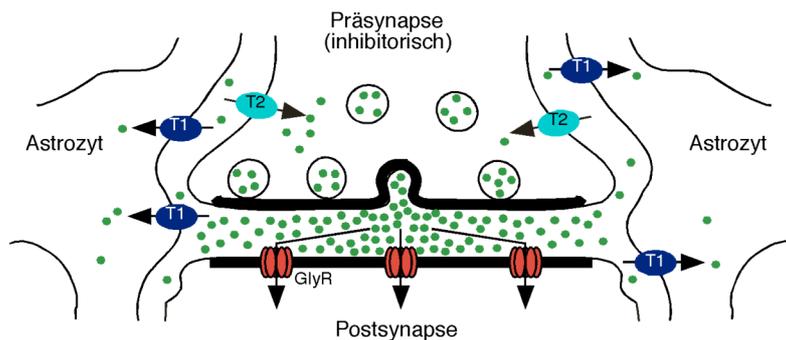
Die physiologischen Funktionen der einzelnen GlyTs konnten in GlyT-defizienten Mauslinien weiter geklärt werden (Gomez *et al.*, 2003a; Gomez *et al.*, 2003b), die u. a. eine essentielle Rolle der GlyTs in der frühen postnatalen Entwicklung aufzeigten. So sterben homozygot-defiziente (-/-) GlyT1-Tiere bereits am Tag der Geburt und zeigen einen Phänotyp, der durch Lethargie, Hypotonie und Hyporesponsivität charakterisiert ist. Zudem konnte durch Messungen der *in vivo* Respiration und durch elektrophysiologische Analysen in Schnitten gezeigt werden, dass diese Tiere einen gestörten Atemrhythmus haben, in dem die Atmung durch lange Phasen von Apnea unterbrochen ist (Gomez *et al.*, 2003a). Motorneuronen im Nucleus Hypoglossus, der für den Atemrhythmus essentiell ist, werden in den GlyT1 -/- Mäusen überinhibiert. Durch die Applikation von Strychnin, einem Inhibitor des GlyRs, konnte eine weitgehende Normalisierung der Motorneuronenaktivität in Schnittpräparaten erreicht werden. Dieser Phänotyp lässt auf eine unzureichende Entfernung von Glycin aus dem synaptischen Spalt schließen, was entsprechend zu einer Überaktivierung des GlyRs führt. In der Wildtyp (wt) Maus wird präsynaptisch freigesetztes Glycin durch den GlyT1 in benachbarte Gliazellen aufgenommen (Abbildung 1-6 A), ein Prozess der in den GlyT1-defizienten Mäusen ausgefallen ist (Abbildung 1-6 B). Entsprechend ist die Kinetik einzelner synaptischer Übertragungsereignisse verlängert und der inhibitorische Tonus insgesamt erhöht.

GlyT2 -/- Tiere sterben ebenfalls während der frühen postnatalen Entwicklung in der zweiten Woche nach der Geburt, nachdem sie einen komplexen neuromotorischen Phänotyp entwickelt haben (Gomez *et al.*, 2003b). Diese Mäuse weisen neben motorischen Defekten, wie dem Unvermögen sich umzudrehen („impaired righting response“) und einem Klammern der Extremitäten, wenn die Tiere am Schwanz hochgehoben werden („hind feet clasp“), einen spontanen Tremor auf (Gomez *et al.*, 2003b). Dieser Phänotyp ähnelt dem, der in den GlyR-mutanten-Stämmen *spastic*, *spasmodic* und *oscillator* beobachtet wurde (Becker *et al.*, 1992). Molekulare und elektrophysiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass die präsynaptischen Vesikel von GlyT2-defizienten Mäusen nur wenig Glycin in den synaptischen Spalt ausschütten, da die Vesikel nur eine geringe Glycinkonzentration enthalten (Gomez *et al.*, 2003b; Kremer, 2004). Die Menge an ausgeschütteten Transmittern genügt

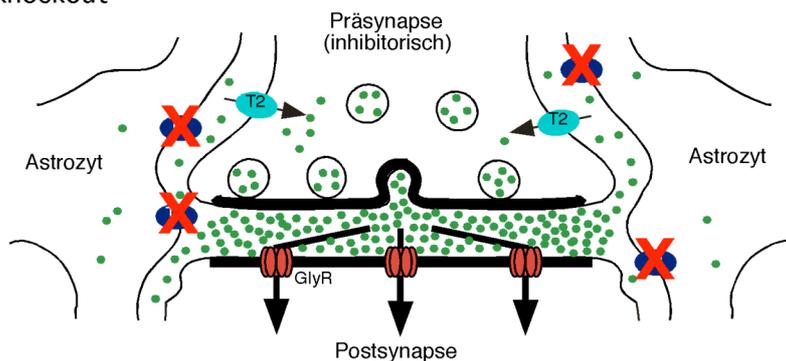
nicht, um postsynaptische GlyRs ausreichend zu aktivieren, und führt folglich zu einer verringerten Inhibition der Postsynapse (Abbildung 1-6 C).

Durch die Analyse dieser genetisch modifizierten Mäuse konnten den GlyTs komplementäre Funktionen zugeteilt werden. Während der GlyT1 wichtig für die Entfernung von Glycin aus dem synaptischen Spalt ist, besteht die Aufgabe des GlyT2 in einer effizienten Bereitstellung von intrazellulärem Glycin für den VIAAT, der seinerseits die präsynaptischen Vesikel mit Glycin befüllt.

A Wildtyp



B GlyT1 knockout



C GlyT2 knockout

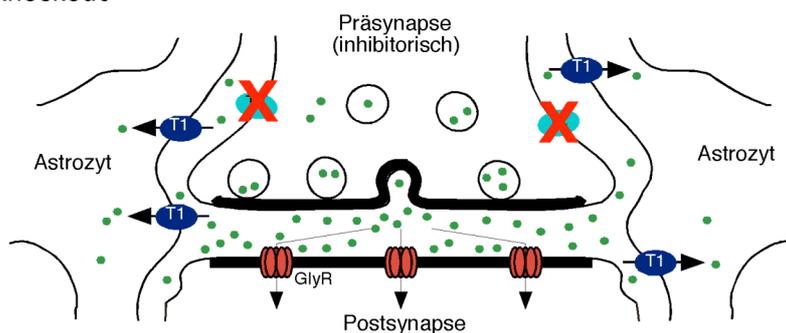


Abbildung 1-6: Schematische Abbildung der glycinergen Neurotransmission. In **A** ist die Neurotransmission in wt Mäusen dargestellt, in **B** in GlyT1 $-/-$ Mäusen und in **C** in der Abwesenheit von GlyT2. **B**, das Fehlen von GlyT1 führt zu einem Überschuss an Glycin im synaptischen Spalt und zu einer starken Aktivierung der GlyRs (dicke Pfeile). **C**, GlyT2 $-/-$ Mäuse weisen eine geringe Glycinkonzentration in den Vesikeln auf und folglich wird zu wenig Glycin in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Eine normale Inhibition des GlyRs wird nicht erreicht (dünne Pfeile). T1, GlyT1; T2, GlyT2.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welche Domänen bzw. Motive die spezifische Lokalisation des GlyT2 in der präsynaptischen Terminalie nahe der CAZ ermöglichen, die in elektronenmikroskopischen Studien aufgezeigt wurde (Mahendrasingam *et al.*, 2003; Zafra *et al.*, 1995). Neben der Lokalisation muss auch die Anzahl der GlyT2-Proteine in der Plasmamembran präzise reguliert werden, um die korrekte Funktion der glycinergen Neurotransmission zu sichern. Frühere Studien in Synaptosomen haben gezeigt, dass nur etwa 5-10% der GlyT2-Proteine in der Präsynapse in der Plasmamembran vorkommen, während der Rest in intrazellulären Kompartimenten verbleibt (Geerlings *et al.*, 2002). Welche Domänen für die Mobilisierung des intrazellulären GlyT2-Pools wichtig sind, sollte deswegen untersucht werden.

Für die Analyse wurden insbesondere die zwei langen intrazellulären Domänen, die N- und C-terminalen Regionen, des GlyT2 in Betracht gezogen. Die N-terminale Domäne mit ihren 200 Aminosäuren stellt innerhalb der *SLC6*-Familie eine Besonderheit dar, da sie im Vergleich zu den anderen Transportern deutlich länger ist. Trotz dieser Länge konnte dieser Domäne bislang keine Funktion zugeordnet werden. Interaktionspartner, die in Hefe-2 Hybrid-Screens für diese Domäne identifiziert werden konnten, wie beispielsweise Ulip6, deuten möglicherweise auf eine regulatorische Funktion dieser Domäne hin. Um die Funktion dieser Domäne weiter einzugrenzen, wurden GlyT2-Expressionskonstrukte generiert, in denen ein Großteil der N-terminalen Domäne deletiert wurde. Diese wurden mit biochemischen und zellbiologischen Methoden auf ihre Funktion untersucht. Zusätzlich wurden Vektoren für BAC-transgene Tiere kloniert, in denen die Eigenschaften der N-terminalen Domäne *in vivo* untersucht werden sollen.

Die Charakterisierung von PDZ-Domänen enthaltenden Proteinen hat gezeigt, dass diese bei der subzellulären Lokalisation und Regulation von Proteinen eine große Rolle spielen können (Bezprozvanny und Maximov, 2001; Kim und Sheng, 2004). Daher wurde auch das in der C-terminalen Domäne des GlyT2 gelegene PDZ-Domänenbindungsmotiv (PDZ-DBM) inaktiviert, um dessen Funktion in der Lokalisation oder Regulation des GlyT2 zu untersuchen.

In einem weiteren Teilprojekt dieser Dissertation sollten die GlyR-UE in GlyT2-defizienten Mäusen untersucht werden. GlyT2 *-/-* Mäuse sterben in der zweiten Woche nach der Geburt an einem neuromotorischen Phänotyp, der dem von spontan auftretenden GlyR-mutanten Mäusen ähnelt (Becker *et al.*, 1992). Da in dieser Zeit ein Austausch der embryonalen GlyR $\alpha 2$ -UE gegen die adulte $\alpha 1$ -UE stattfindet, wurde untersucht, ob eine Dysregulation des GlyR α -UE-Austausches in GlyT2-defizienten Mäusen möglicherweise zum Phänotyp beiträgt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Organismen

2.1.1 Mäuse und Ratten

Die in dieser Arbeit verwendete GlyT2-defizienten Mauslinie wurden von Jesús Gomeza unter Verwendung von SV129Ola ES-Zellen generiert (Gomeza *et al.*, 2003b). Alle verwendeten Mäuse wurden auf einen C57BL/6J Stamm für mindestens sechs Generationen rückgekreuzt.

Für Rattenpräparationen wurden Wistar Ratten verwendet.

2.1.2 Bakterien

E. coli XL-1 Blue (Stratagen, La Jolla, USA), Genotyp: supE44 hsdR17 recA1 gyrA46 thi relA1 lac F' [proAB+ lacIq lacZ DM15 Tn10(tetr)].

E. coli DH5 α (Invitrogen, Carlsbad, USA), Genotyp: F- ϕ 80/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r_k^- , m_k^+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ .

2.1.3 Zelllinien

Zur Expression von Proteinen wurden folgende Zelllinien verwendet:

Tabelle 2-1: Verwendete Zelllinien und ihre Spenderorganismen.

Abkürzung	Zelllinie	Spender-organismus	Firma
HEKT	Human embryonal kidney cells, transformed with the large T-Antigen	Mensch	ATCC, Manassas, USA, #CRL-1573
COS-7	African Green Monkey kidney cells	Affe	ATCC, Manassas, USA #CRL-1651
MDCK	Madin-Darby canine kidney cells	Hund	ATCC, Manassas, USA #CRL-2285

2.2 Chemikalien

2.2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalien wurden von den Firmen J.T. Baker (Deventer, Niederlande), Biomol (Ilvesheim), GIBCO-BRL (Bethesda Research Laboratories, Karlsruhe), Difco

Laboratories (Detroit, USA), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, UK), Applichem (Darmstadt), Cambrex (Rockland, USA), Riedel-deHaen (Seelze) und Sigma-Aldrich (München) bezogen. Alle Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad p. a. (zur Analyse).

Alle Plastikmaterialien wurden von den folgenden Firmen bezogen: Falcon (Le Pont De Claix, Frankreich), Roth (Karlsruhe), Greiner (Darmstadt) und Eppendorf (Hamburg).

[³H]Glycin in HCl (30 Ci/mmol) wurde von der Firma Movarek Biochemicals (Brea, USA), das γ -³²P-dCTP (5000 Ci/mmol) von der Firma Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig) bezogen.

2.2.2 Membranen und Filme

Nitrozellulosemembranen der Porengröße 0,45 μ m (Schleicher und Schuell GmbH, Dassel) wurden für Western Blots verwendet. Die Nylonmembranen Hybond-N+ für Southern Blots und „Koloniescreens“ wurden von der Firma Amersham Biotec (Little Chalfont, UK) bezogen.

Die Autoradiogramme wurden auf BIOMAX MR oder XAR-3, beide von der Firma Kodak (Cedex, Frankreich), exponiert.

2.2.3 Vektoren und BAC-Klone

Die GlyT2 cDNAs wurden in folgende Vektoren kloniert: pBluescript SKII+ (pBS SKII+) (Stratagen, La Jolla, USA), pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Carlsbad, USA) living colors-Vektoren (pEGFP-N1, -N2, -C3) (Invitrogen, Carlsbad, USA). Als ER-Marker wurde der Vektor pDsRed2-ER (BD Bioscience, Mountain View, USA) verwendet. Zur Generierung der transgenen Mauslinien wurden die GlyT2-Konstrukte zunächst in pBS SKII+ subkloniert und anschließend in den „Shuttle Vektor“ pSV1.recA (Yang *et al.*, 1997) kloniert. Der Shuttle Vektor wurde für die homologe Rekombination verwendet. Der BAC-Klon RPCI23 365E4 wurde von H.U. Zeilhofer zur Verfügung gestellt (Zeilhofer *et al.*, 2005).

2.2.4 Größenstandards

Als Größenstandards für die DNA-Gelelektrophorese wurden folgende Marker verwendet:

- a) 100 bp DNA-Längenstandard (Eurogentec, Seraing, Belgien):
bp: 1 000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100

- b) 1 kb DNA-Längenstandard (Eurogentec, Seraing, Belgien):
 bp: 10 000, 8 000, 6 000, 5 000, 4 000, 3 000, 2 500, 2 000, 1 500,
 1 000, 800, 600, 400, 200

Für die SDS-PAGE wurde der SeeBlue2 Marker von Invitrogen (Carlsbad, USA) verwendet (in kDa): 250, 148, 98, 64, 50, 36, 22, 16, 6, 4

2.2.5 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen. Sie dienen als Sequenzierprimer, Mutageneseprimer oder zur PCR.

Tabelle 2-2: Sinnstrangprimer für Klonierungen und Sequenzierungen. Besonderheiten sind durch unterstrichene oder kursive Markierungen hervorgehoben.

Name	Sequenzen	Besonderheiten
WA-403	5' CG <u>agatct</u> ATGCGAGGGA <u>ACTGGTCCAGC</u> 3'	Konstrukt: ΔAA1-184, <i>BglIII</i> Seite
WA-405	5' CG <u>agatct</u> ATGGAGGACGAGCAAGGGGAT 3'	Konstrukt: ΔAA1-174, <i>BglIII</i> Seite
WA-406	5' TCTACTTTCTGCATGACTGC 3'	Sequenzierprimer T2
WA-408	5' CCG <u>ctcgag</u> AATTATTGGATTGCAGTGCTCC 3'	Konstrukt: wt, <i>XhoI</i>
WA-411	5' AGCCACATTCCCTTATGTCGT 3	Sequenzierprimer T2
WA-415	5' CCG <u>ctcgag</u> AATAAACAGCCAGCCAACATC 3'	Konstrukt: wt ohne ATG, <i>XhoI</i>
WA-418	5' AAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGTGCAAAGATAA AACCAA <u>ACTTTTACTAGAT</u> 3'	Konstrukt: GlyT2 myc316, <u>myc</u>
WA-420	5' AAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGGGGAGATTTATT GAGAGGCTG 3	Konstrukt: GlyT2 myc738, <u>myc</u>
WA-423	5' CCC <u>aagctt</u> GCCACCATGAATAAACAGCCAGCCAACA TCTTGGAGGCAG 3'	Konstrukt: wt + Kozak, <i>HindIII</i>
WA-424	5' CCC <u>aagctt</u> GCCACCATGGAGGACGAGCAAGGGGAT 3'	Konstrukt: ΔAA1-174 + Kozak, <i>HindIII</i>
WA-425	5' CCC <u>aagctt</u> GCCACCATGCGAGGGA <u>ACTGGTCCAGC</u> 3'	Konstrukt: ΔAA1-184 + Kozak, <i>HindIII</i>
WA-427	5' CCC <u>aagctt</u> GCCACCATGGATTGCAGTGCTCCCAA GGAAAT 3'	Konstrukt: GlyT2a wt + Kozak, <i>HindIII</i>
WA-444	5' AAGCTTATGGAGCAGAAGCTGATCTCCGAGGAG <u>GATTGCAGTGCTCCCAAGGAA</u> 3'	Konstrukt: wt myc13, <u>myc</u>
WA-445	5' CCC <u>aagctt</u> CCACCATGGATTGCA 3'	Konstrukt: GlyT2a, <i>HindIII</i>
WA-446	5' GAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGGAGGA CGAGCAAGGGGATGAG 3'	Konstrukt: ΔAA1-174, myc13, <u>myc</u>
WA-447	5' GAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGCGAG GGA <u>ACTGGTCCAGCAA</u> 3'	Konstrukt: ΔAA1-184, myc13, <u>myc</u>
WA-448	5' GAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGGCC AACATCTTGGAGGCAGCG 3'	Konstrukt: wt myc13, <u>myc</u>
WA-456	5' TTCTCTAGAAAGTATAGGA <u>ACTTCGTAAGCAGGTCAC AAGCGGC</u> 3'	Transgen: Homologiearm B; <u>FRT</u>

Name	Sequenzen	Besonderheiten
WA-457	5' ttgtgtttgcagGATTGCAGTGCTCCCAAGGA 3'	Transgen: Intron und Exon 2
WA-458	5' ATAgtcgacTGACCAAGGTAGGCTGAATGCTGG 3'	Transgen: Homologiearm A; <i>Sall</i>
WA-460	5' TTGTGTTTGCAGGATTGCagcgctCCCAAGGA 3'	Transgen: Intron u. Exon2, <u>Mut.</u> ; <i>AfeI</i>
WA-461	5' GAACTTGACATTGTGTTTGCAGATGGTGCCCAAGA <u>AGAAGAGG</u> 3'	Transgen: Homologiearm A + <u>Cre</u>
WA-462	5' TTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTC 3'	Transgen: FRT-Seite; Screening
WA-463	5' CATTGGAGGGGTCTGGAATC 3'	Transgen: vor Homologiearm A
WA-464	5' TGAAATCCACAGAGGGCAG 3'	Transgen: in Homologiearm A
WA-465	5' GGACGGGAAGTATCAGCTCGA 3'	Transgen: in pA-Kassette; Screening

Tabelle 2-3: Gegenstrangprimer für Klonierungen und Sequenzierungen. Besonderheiten sind durch unterstrichene oder kursive Markierungen hervorgehoben.

Name	Sequenz	Besonderheiten
WA-503	5' CAgaattcGCACTGAGTGCCCAGTTCC 3'	Konstrukt: wt für pEGFP-N2, <i>EcoRI</i>
WA-503A	5' CAgaattcGGCACTGAGTGCCCAGTTCC 3'	Konstrukt: wt für pEGFP-N1, <i>EcoRI</i>
WA-507	5' CAgaattcCTAcgcGCACTGAGTGCCCAGTTCC 3'	Konstrukt. +A, <i>EcoRI</i>
WA-508	5' CAgaattcCTAGCCCAGTTCCAAATCCTTCA 3'	Konstrukt. ΔTQC, <i>EcoRI</i>
WA-513	5' CCGGATCTCACCCGGATAT 3'	Sequenzierprimer T2
WA-514	5' TTCTCAATGTTGACTTTGCGC 3'	Sequenzierprimer T2
WA-518	5' CAgaattcCTAGCACTGAGTGCCCAGTTC 3'	Konstrukt: wt für pEGFP-C3, <i>EcoRI</i>
WA-520	5' <u>CTCCTCTGAGATCAGCTTCTGCTCTTCTGGTGT</u> GTTCCACGG 3'	Konstrukt: GlyT2 myc316, <u>myc</u>
WA-522	5' <u>CTCCTCTGAGATCAGCTTCTGCTCGGGAGCCA</u> GATACATTTTTATC 3'	Konstrukt: GlyT2 myc738, <u>myc</u>
WA-540	5' <u>CAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTCTGGCT</u> GTTTATTCATTTCTTGGG 3'	Konstrukt: GlyT2 <u>myc13</u>
WA-551	5' TCCTTGGGagcgctGCAATCCTGCAAACACAATGT CAAGTTC 3'	Transgen: Homologiearm A, zw. Intron u. Exon2, <u>Mut.</u> , <i>AfeI</i>
WA-552	5' GACAgcggccgcATAgtcgacACTTACgtttaaacCCAGATT AAGAGACCCTGATG 3'	Transgen: Homologiearm B, <i>NotI</i> , <i>Sall</i> , <i>PmeI</i>
WA-553	5' <u>CCTCTTCTTCTTGGGCACCATCTGCAAACACAAT</u> GTCAAGTTC 3'	Transgen: Homologiearm A u. <u>Cre</u>
WA-554	5' CAgaatccTCAGTCCCCATCCTCGAGCA 3'	Transgen: <i>Cre</i> , <i>EcoRI</i>
WA-555	5' AACCGAACCGAACCAAACC 3'	Transgen: hinter Homologiearm B, Screening
WA-558	5' CAGATCCTCTTCTGAGATGAG 3'	Transgen: im myc; Screening

Für die Genotypisierungen der Mäuse wurden folgende Primer verwandt:

Tabelle 2-4: Genotypisierungsprimer für die GlyT2-Mauslinie.

Name	Sequenz	Besonderheiten
OL-neo (as)	5' CAGCTCATTCCCTCCCACTCATGAT 3'	GlyT2 geno: ko
WA-426 (s)	5' CCTCTTCTGCCTTTTTTGAGACTG 3'	GlyT2 geno: wt
Bingobongo (as)	5' ATAGCCCCACAGCATTATCCTG 3'	GlyT2 geno: wt
WA-221 (s)	5' AGCATGCCTAGTACAACCTCGA 3'	GlyT2 geno: ko

2.2.6 Antikörper

2.2.6.1 Primärantikörper

Tabelle 2-5: Verwendete Primärantikörper und ihre Herstellerangaben.

Name	immunisierte Spezies	Verdünnung		Quelle/Referenz
		Western Blot	Immunos	
GlyT2 N-Terminus	polyklonal Kaninchen	1:2000	1:200-1:500	gegen Ratten-GlyT2 (Gomez <i>et al.</i> , 2003a)
GlyT2 C-Terminus	monoklonal Meerschweinchen	1:10000	1:5000	Chemicon Int. Temecula, USA (AB1773)
GlyR α 1 (mab2b)	monoklonal Maus	-	1:200	(Pfeiffer <i>et al.</i> , 1984)
GlyR α 2 (mab4a)	monoklonal Maus	-	1:200	(Schroder <i>et al.</i> , 1991)
Geph (mab7)	monoklonal Maus	-	1:200	(Pfeiffer <i>et al.</i> , 1984)
VGAT	polyklonal Meerschweinchen	-	1:3000	Chemicon Int. Temecula, USA (AB5855)
JL-8 (α EGFP)	monoklonal Maus	1:2000	-	Clontech, Mountain View, USA (Nr. 8371)
Myc-9E10	monoklonal Maus	1:1000	1:100	(Evan <i>et al.</i> , 1985)
synaptophysin	monoklonal Maus	-	1:200	Chemicon Int. Temecula, USA (MAB368)
PSD95	monoklonal Maus	-	1:40	Chemicon Int. Temecula, USA (MAB1596)
MAP2	polyklonal Kaninchen	-	1:1000	Chemicon Int. Temecula, USA (AB5622)
myc	monoklonal Kaninchen	-	1:200	Abcam, Cambridge, UK (ab9106)

2.2.6.2 Sekundärantikörper

Tabelle 2-6: Sekundärantikörper für Western Blots, Immunhisto- und Immunzytochemie.

Name	eingesetzte Verdünnung	Firma
HRP α Maus	1:10000	Promega, Madison, USA
HRP α Meerschweinchen	1:10000	Promega, Madison, USA
HRP α Kaninchen	1:10000	Promega, Madison, USA
Alexa 488 α Maus	1:500 - 1:1000	Molecular Probes, Eugene, USA
Alexa 488 α Kaninchen	1:500 - 1:1000	Molecular Probes, Eugene, USA
Alexa 488 α Meerschweinchen	1:500 - 1:1000	Molecular Probes, Eugene, USA
Alexa 546 α Maus	1:500 - 1:1000	Molecular Probes, Eugene, USA
Alexa 546 α Kaninchen	1:500 - 1:1000	Molecular Probes, Eugene, USA
Alexa 546 α Meerschweinchen	1:500 - 1:1000	Molecular Probes, Eugene, USA
Alexa 635 α Maus	1:500 – 1:750	Molecular Probes, Eugene, USA
Alexa 635 α Kaninchen	1:500 – 1:750	Molecular Probes, Eugene, USA
Alexa 635 α Meerschweinchen	1:500 – 1:750	Molecular Probes, Eugene, USA

2.2.7 Enzyme

Soweit nicht anders vermerkt, wurden Enzyme von den Firmen Roche Applied Biosystems (Mannheim) oder New England Biolabs (Beverly, USA) verwendet.

2.2.8 Kits

Von der Firma Qiagen (Hilden) wurden für die DNA-Präparation das QIAquick-Mini-Kit, das QIAfilter-Midi-Kit und das QIAfilter-Maxi-Kit, für das Aufreinigen von DNA-Fragmenten z. B. aus PCR-Reaktionen das Qiagen-PCR-Purification-Kit, für die Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen das Qiagen-Gelextraction-Kit verwendet.

2.2.9 Foto- und Computer-Arbeiten

Die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden an einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop DMIRBE (Leica) soweit nicht anders vermerkt mit 63iger Vergrößerung und 2-fachem Zoom aufgenommen und mit der Software „Leica Confocal Software“ bearbeitet. Die Gelbilder und Western Blot Filme wurden mit einem Epson2000 Scanner (Epson) eingescannt. Alle Aufnahmen wurden mittels des Programms „Photoshop 7.0“ (Adobe) für die Graphikdarstellung bearbeitet. Die graphische Darstellung wurde mit „Canvas 9“ (Deneba Systems) oder „Illustrator 10“ (Adobe) erstellt. Zum Bearbeiten und Verwalten von Sequenzen wurde das Computerprogramm „MacVector“ (Oxford Molecular) verwandt. Sequenzvergleiche wurden mit Hilfe der Programme „Blast“ (NCBI; Altschul *et al.*, 1990) und „ensembl“ (www.ensembl.org) durchgeführt. Üblicherweise wurde auf Computern der Firma Apple gearbeitet.

2.2.10 Medien, Nährböden, Standard-Lösungen

Alle Lösungen wurden mit Wasser, das über eine Reinigungsanlage der Firma Millipore (Bedford, USA) aufbereitet wurde, angesetzt. Anschließend wurden die Lösungen, soweit nicht anders erwähnt, autoklaviert oder sterilfiltriert. Zur Vereinfachung werden Lösungen, die Bestandteil verschiedener Protokolle sind zu Anfang genannt und bei den einzelnen Methoden nur noch namentlich erwähnt.

LB (Lucia Bertani) Medium:

1% (w/v) NaCl

1% (w/v) Trypton

0,5% (w/v) Hefeextrakt

in 1 L H₂O, pH 7.0

Nährböden enthielten zusätzlich 1,5% (w/v) Agar.

Antibiotika-Stammlösungen:

Antibiotikum	Stockkonz. (mg/ml)	Endkonz. (µl/ml)	gelöst in
Ampicillin	25	25	Wasser
Tetracyclin	12,5	12,5	70% (v/v) Ethanol
Kanamycin	10	50	Wasser
Chloramphenicol	20	20	Methanol

Alle Antibiotika wurden sterilfiltriert und bei –20°C gelagert.

Ethidiumbromid (EtBr):

100 mg EtBr wurden in 10 ml Millipore-Wasser gelöst und im Dunkeln aufbewahrt. In den Agarosegelen war die verwendete Endkonzentration 0,5 µg/ml.

4% (w/v) Paraformaldehyd(PFA)/PBS:

4 g PFA wurden in 100 ml 1x PBS mit 1-2 Tropfen 5 M NaOH versetzt. Die Suspension wurde auf 50°C erhitzt bis sich das PFA löste. Zum Fixieren von Zellen wurden das PFA auf 4°C gekühlt.

1x SSC

0,15 M NaCl

15 mM NaCitrat

pH 7.0

TE

1 mM EDTA

10 mM Tris/Cl

pH 7.5

<u>50x TAE</u>	50 mM EDTA 17,5% (v/v) Eisessig 2 M Tris/Cl	pH 8.0
<u>10x DNA-Ladepuffer</u>	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylene Cyanol FF 25% (v/v) Glycerin 1 mM EDTA	pH 8.0
<u>10x PBS Puffer</u>	1,3 M NaCl 70 mM Na ₂ HPO ₄ 30 mM NaH ₂ PO	pH 7.4
<u>Resuspensierungs- puffer P1</u>	10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A 50 mM Tris/Cl bei 4°C aufbewahren	pH 8.0
<u>Lysepuffer P2</u>	200 mM NaOH 1% (w/v) SDS	
<u>Neutralisierungs- Puffer P3</u>	3 M KAc	pH 5.5
<u>4x Lämmli-Puffer</u>	8-15% (w/v) SDS 40% (v/v) Glycerin 0,04% (w/v) Pyronin Y 20% (v/v) β-Mercaptoethanol 250 mM Tris/Cl	pH 6.8
<u>Zellysepuffer</u>	150 mM NaCl 5 mM EDTA 1% (v/v) Triton 100X 0,25% (w/v) Deoxycholate 0,1% (w/v) SDS 50 mM HEPES Tris Protease Inhibitor komplett (Roche)	pH 7.4

2.3 Methoden

2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

2.3.1.1 Plasmidpräparation mit dem Qiagen Spin Mini Prep

Eine Einzelkolonie wurde in 3-5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum schüttelnd ü. N. inkubiert und dann 2 ml der Lösung in einem Eppendorfgefäß 1 Min. bei 17900 x *g* pelletiert. Die Pufferzusammensetzungen sowie das Aufreinigungsprotokoll sind den Herstellerangaben zu entnehmen (Qiagen, 2003). Die DNA konnte durch Restriktionsverdau analysiert, direkt sequenziert und bei -20°C gelagert werden.

2.3.1.2 Minipräparation von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse

Eine Bakterienkolonie wurde in 2-5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überführt und für 8-12 Std. bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 2 ml (bei low copy-Plasmiden: 4 ml) dieser Kultur wurden in ein Eppendorfgefäß gegeben, für 1 Min. bei 17900 x *g* zentrifugiert und der Überstand vom Bakteriensediment abgenommen. Die alkalische Lyse wurde wie folgt durchgeführt:

250 µl P1 (Resuspensionpuffer), durch Vortexen resuspendieren,
250 µl P2 (Lysepuffer), vorsichtig durchmischen, 5 Min. bei RT,
350 µl P3 (Neutralisierungspuffer), vorsichtig durchmischen.

Es folgten 10 Min. Zentrifugation bei 17900 x *g*. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß mit 750 µl 100% (v/v) Isopropanol überführt und 10 Min. bei 17900 x *g* zentrifugiert. Das Präzipitat wurde einmal mit 70% (v/v) Ethanol (EtOH) gewaschen, bei 37°C getrocknet und schließlich in 50 µl TE bei 37°C für 10 Min. auf einem Schüttler resuspendiert. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.3.1.3 Plasmid-Isolation mit dem QIAfilter Midi/(Maxi) Prep Kit

25 ml (100 ml) LB-Medium mit Antibiotikum wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und 16 Std. bei 37°C unter Schütteln bei 250 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden bei 4°C durch Zentrifugation mit 6000 x *g* für 15 Min. pelletiert. Die Pufferzusammensetzungen sowie ein detailliertes Protokoll zur DNA-Aufreinigung sind in den Herstellerangaben zu finden (Qiagen, 2003). Die DNA wurde schließlich in 100-500 µl TE aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt.

2.3.1.4 DNA-Isolierung aus einem BAC-Klon

Eine 500 ml LB-Chloramphenicol-Kultur wurde mit einer BAC-Kolonie inokuliert und bei 30°C ü. N. unter Schütteln inkubiert. Es wurde 10 Min. bei 1200 x *g* zentrifugiert und das Pellet in 15 ml Resuspensionpuffer P1 resuspendiert. Anschließend erfolgte die alkalische Lyse durch Zugabe von 15 ml frisch angesetztem (!) Lysepuffer P2. Das 50 ml Falcon-Röhrchen wurde vorsichtig geschwenkt, 5 Min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend 20 ml Neutralisierungspuffer P3 hinzugegeben, geschüttelt, 10 Min. auf Eis inkubiert und das Debris bei 800 x *g* bei 4°C für 45 Min. pelletiert. Der Überstand wurde durch einen Rundfilter filtriert und in einem neuen 50 ml Falcon gesammelt. Hierzu wurden 0,7 Volumen Isopropanol gegeben, die Lösungen gut durchmischt und bei 4°C für 45 Min. und 800 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet in 10 ml 70% EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert (10 Min., 800 x *g*, 4°C). Das Pellet wurde getrocknet, in 500 µl TE pH 8.0 aufgenommen und entweder sofort eingefroren oder zur weiteren Aufreinigung einer Dichtegradientenzentrifugation unterworfen.

2.3.1.5 DNA-Reinigung über einen CsCl-Gradienten

Besonders für Transfektionen von primären Zelllinien wurde Plasmid-DNA von großer Reinheit und ohne Endotoxine benötigt. Hierzu wurde die DNA über einen CsCl-Gradienten aufgereinigt.

Eine einzelne Bakterienkolonie wurde in 1 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum für mehrere Std. bei 37°C inkubiert und anschließend in 500 ml Medium ü. N. bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Bakterienkulturen bei 1200 x *g* sedimentiert und in 16 ml Lösung 1 resuspendiert. Anschließend wurden 32 ml Lysepuffer P2 hinzugegeben, 5 Min. inkubiert und mit 24 ml Puffer P3 neutralisiert. Die Suspension wurde 10 Min. bei 6000 x *g* und 4°C zentrifugiert und der Überstand filtriert. Er wurde mit 200 ml 100% EtOH vermengt, 10 Min. auf Eis inkubiert, bevor die DNA durch Zentrifugation bei 15000 x *g* bei 4°C für 10 Min. pelletiert wurde. Das Pellet wurde in 5 ml TE aufgenommen, in 50 ml Röhrchen transferiert und nach Zugabe von 2,5 ml 7,5 M NH₄-Acetat 10 Min. auf Eis gestellt. Es wurde für 10 Min. bei 15000 x *g* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 20 ml 100% EtOH gegeben, 10 Min. auf Eis inkubiert und die DNA 10 Min. bei 4°C und 15000 x *g* pelletiert. Die DNA wurde kurz bei RT getrocknet und dann in 2 ml CsCl (1 g/ml) resuspendiert. Dieses Gemisch wurde in 2 ml-Polyallomer Zentrifugationsröhrchen (Beckman) mit einer Injektionsnadel überführt und 10 µl 10mg/ml EtBr hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde randvoll mit CsCl-Lösung befüllt und auf einer Feinwaage auf 1 mg genau abgewogen. Anschließend wurden die Röhrchen verschweißt, in den Rotor SW90 gestellt und ü. N. bei 350000 x *g* und 4°C im Vakuum ultrazentrifugiert (Beckman L-170 Ultrazentrifuge). Unter UV-Licht wurde die untere der zwei DNA-Banden mit einer Injektionsnadel (G20) abgezogen und in ein 12 ml Falcon-

Röhrchen überführt. Das EtBr wurde mit 1 ml Salz-gesättigtem Isopropanol ausgeschüttelt und die obere Phase abgenommen. Dieser Schritt wurde solange wiederholt, bis die untere Phase keine rosa Färbung mehr aufwies. Die untere Phase wurde mit TE auf ein Volumen von 4 ml aufgefüllt und durch Zugabe von 0,4 ml 3 M Natriumacetat pH 5.2 und 9 ml 100% EtOH zunächst 20 Min. bei -20°C gefällt. Schließlich wurde die DNA 10 Min. bei $15000 \times g$ bei 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit 2 ml 70% (v/v) EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert. Die DNA wurde anschließend getrocknet, in $500 \mu\text{l}$ TE gelöst, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und einer Konzentrationsbestimmung unterzogen.

Lösung 1:

0,1 M EDTA

0,25 M Tris/Cl pH 8.0

Salz-gesättigtes Isopropanol:

300 ml Isopropanol

100 ml 5 M NaOH

2.3.2 Genotypisierungen

2.3.2.1 Schwanzbiopsie (Miller *et al.*, 1988)

Ca. 2-3 cm einer Schwanzspitze einer Maus wurden zu $350 \mu\text{l}$ Tail-Lysepuffer gegeben, $3,5 \mu\text{l}$ Proteinase K (20 mg/ml) hinzugefügt und ü. N. bei 56°C inkubiert. Vor der Weiterbearbeitung wurden die Proben durch Vortexen gut gemischt und anschließend 10 Min. bei $17900 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß gegeben und $150 \mu\text{l}$ gesättigte NaCl-Lösung (6 M) hinzugefügt, vermischt, 10 Min. auf Eis gestellt und anschließend 10 Min. bei $17900 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und die DNA durch Zugabe von 2 Volumen 100% EtOH gefällt. Die DNA wurde durch zweiminütige Zentrifugation pelletiert, mit $250 \mu\text{l}$ 70% (v/v) EtOH gewaschen, 5 Min. bei $17900 \times g$ zentrifugiert, getrocknet und schließlich in $100\text{-}500 \mu\text{l}$ low salt-TE pH 8.0 resuspendiert. Die DNA konnte direkt in einer Genotypisierungs-Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) eingesetzt werden.

Tail-Lysepuffer

5 mM EDTA

0,1 % (w/v) SDS

20 mM NaCl

10 mM Tris/Cl, pH 8.5

low salt-TE

0,1 mM EDTA

10 mM Tris/Cl, pH 8.0

2.3.2.2 GlyT2-PCR

Zur Analyse der Genotypen wurde eine spezielle Taq-Polymerase (Gold-Taq, #N2080244, Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet, die erst nach einer Inkubation von 10 Min. bei 94°C in eine aktive Form überführt wird. Das aktive

Zentrum der Polymerase ist vor der Aktivierung durch einen Antikörper blockiert. Damit werden unerwünschte Reaktionen vermindert und der Hintergrund der PCR-Reaktion reduziert. Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet:

	GlyT2 Mäuse (in μ l)	
	wt	ko
DNA	1	0,5
H ₂ O	18,5	19,4
10x PCR-Puffer	2,5	2,5
Sinnstrangprimer (50ng/ μ l)	1	1
Gegenstrangprimer (50 ng/ μ l)	1	1
dNTPs (25 mM, Boehringer)	0,5	0,5
Gold-Taq	0,1	0,1

Die Reaktionsbedingungen für die PCR wurden wie folgt gewählt:

	GlyT2 PCR	
Aktivierung der Taq	94°C	10 Min.
Denaturierung	94°C	30 Sek.
Hybridisierung	50°C	30 Sek.
Elongation	72°C	1 Min.
	für 30 Zyklen	
Endelongation	72°C	7 Min.
Aufbewahrung	4°C	

Die PCR-Proben wurden mit 2,5 μ l 10x DNA-Probenpuffer versetzt und auf ein 1,5% (w/v) Agarosegel einer Gelelektrophorese unterzogen (siehe 2.3.3.12). Folgende Bandengrößen waren zu erwarten:

	GlyT2.2
wt	250 bp
ko	400 bp

2.3.3 Molekularbiologische Arbeiten

2.3.3.1 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die betreffende DNA-Lösung wurde unverdünnt in ein Spektrophotometer ND-100 (Nanodrop) gegeben und die Absorption der Lösung spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine optische Dichte (OD_{260}) von 1,0 entspricht einer Konzentration doppelsträngiger DNA von 50 mg/ml.

2.3.3.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Die PCR (Saiki *et al.*, 1985) ist ein *in vitro* Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge und Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen. Hierzu wird die Eigenschaft von DNA-Polymerasen ausgenutzt, einen Einzelstrang zum Doppelstrang polymerisieren zu können, sofern ihnen ein kurzer, doppelsträngiger Bereich zur Verfügung steht. DNA einer Länge bis zu 2-3 kb können amplifiziert werden.

Für eine exponentielle Vervielfältigung der Zahl der DNA-Fragmente sind zwei einzelsträngige Oligonukleotid-Primer notwendig, die aus den Randbereichen der zu amplifizierenden Sequenz stammen. Ein Primer ist zum Sequenzabschnitt des kodierenden, der andere zum Sequenzabschnitt des kodogenen Stranges komplementär. Die Reaktion besteht aus 25-40 Zyklen einer Abfolge von drei unterschiedlichen Reaktionsschritten: Denaturierung, Anlagerung der Primer und Elongation. Für eine PCR wurden folgende Komponenten zusammenpipetiert:

50 ng DNA
 2 µl 10x PCR-Puffer
 0,8 µl 50 mM MgCl₂
 0,1 µl 100 pmol Primer 1
 0,1 µl 100 pmol Primer 2
 0,5 µl 20 mM dNTPs
 0,2 µl Taq-Polymerase
 ad 20 µl H₂O

In den meisten Fällen wurde folgendes Standardprogramm verwendet:

Denaturierung	94°C	5 Min.
Denaturierung	94°C	30 Sek.
Anlagerung	56°C	30 Sek.
Elongation	72°C	45 Sek. - 2 Min.
		für 25 Zyklen
Endelongation	72°C	7 Min.
Aufbewahrung		4°C

2.3.3.3 Kolonie-PCR

Eingefrorene Bakterienkulturen oder Einzelkolonien wurden direkt in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Die Bakterien wurden in 50 µl TE resuspendiert. Für Einzelkolonien einer Platte wurden hieraus 30 µl in 500 µl LB-Medium mit Antibiotikum in ein Eppendorfreaktionsgefäß pipetiert und bei 37°C zunächst in den Wärmeschrank gestellt. Der Rest wurde für 5 Min. auf 95°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und

anschließend einer Standard-PCR, wie unter Abschnitt 2.3.3.2 beschrieben, unterzogen. Es wurden jeweils 5 µl Template eingesetzt. Anschließend wurde die PCR auf ein Agarosegel aufgetragen und von positiven Kolonien wurde eine Minikultur aus den Wärmeschrankkulturen angeimpft.

2.3.3.4 Präparation von RNA und cDNA Synthese

Es wurde Gewebe aus einer Maus präpariert und bei -70°C gelagert, sofern es nicht sofort weiterverwendet wurde. Für die Präparation der RNA aus Gewebe wurde das RNAeasy Mini Kit (#74104) der Firma Qiagen benutzt. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben (Qiagen, 2001). Die RNA wurde in 50 µl RNase-freies Wasser aufgenommen.

Die anschließende Synthese von RNA erfolgte über das Titan One Tube RT-PCR Kit (#11939823001, Roche). Die hergestellte cDNA konnte dann in einer PCR eingesetzt werden, um bestimmte cDNAs zu amplifizieren.

2.3.3.5 Phosphorylierung von PCR Fragmenten

Für PCR-Proben, die für eine „blunt-end“-Ligation eingesetzt werden sollten, musste an den Enden der PCR-Fragmente zunächst ein Phosphatrest angehängt werden. Die Addition von Phosphatresten erfolgt durch das Enzym Polynukleotid-Kinase (PNK).

Für die Reaktion wurden 1/10 10x PNK-Puffer zu dem aufgereinigten PCR-Produkt gegeben. Anschließend wurde 1 µl 10 mM ATP und 1 µl PNK (Roche) hinzugegeben und für eine Std. bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde über das PCR-Purification-Kit (Qiagen) aufgereinigt, bevor die DNA in einer Ligation eingesetzt wurde.

2.3.3.6 Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die DNA-Spaltung erfolgt sequenzspezifisch durch Restriktionsendonukleasen. Diese Enzyme bakteriellen Ursprungs erkennen auf einem doppelsträngigen DNA-Molekül sequenzspezifische Bindungsstellen (Roberts, 1985). Die Restriktionsspaltung wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Restriktionsansätze mit mehreren Enzymen erfolgten gleichzeitig, wenn die Enzyme dieselben Reaktionsbedingungen erforderten. Ansonsten mussten die einzelnen Restriktionen sequentiell erfolgen.

2.3.3.7 Auffüllen von 5'-Restriktionsübergängen mit der Klenow-Polymerase

Für das Auffüllen der beim Schneiden mit den meisten Restriktionsendonukleasen entstehenden 5'-Einzelstrang-Überhänge wurde das große Klenow-Fragment der DNA Polymerase I aus *E. coli* verwendet. Die Reaktion wurde ohne weitere Aufreinigungsschritte direkt im Anschluss an einen Restriktionsverdau wie folgt durchgeführt:

0,05 mg/ml DNA
1x NEB-Puffer
je 33 mM dNTP
1,0-1,5 U/mg DNA Klenow-Polymerase (Roche)

Es wurde für 5 Min. bei RT und weitere 15 Min. bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde entweder durch Zugabe von EDTA zu einer Endkonzentration von 10 mM oder 10-minütiges Erhitzen auf 70°C beendet und die Reaktion durch Agarosegelelektrophorese (siehe 2.3.3.12) aufgereinigt.

2.3.3.8 Dephosphorylierungen von DNA-Enden

Zur Entfernung von 5'-Phosphatgruppen von DNA-Enden zwecks Verhinderung von Religationen linearer Vektor-DNA-Fragmente wurde Kalbsdarmphosphatase (CIP) nach dem Restriktionsverdau hinzugegeben. Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen:

50-100 ng/ml DNA in 1x CIP-Puffer
1 U/pmol CIP

Die Inkubation erfolgte für 30-60 Min. bei 37°C. Anschließend wurde die Probe mittels Agarosegelelektrophorese aufgereinigt (siehe 2.3.3.12).

2.3.3.9 Ligation von DNA-Enden

DNA-Ligationen wurden in einem Volumen von 15 µl durchgeführt. Hierfür wurden ungefähr 1 mM DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 Vektor/Insert in 12,5 µl H₂O aufgenommen und mit 1,5 µl 10x Ligasepuffer und 1 µl T4 DNA-Ligase (Roche) versetzt. Es wurde eine Std. bei RT inkubiert. Zur Deaktivierung der Ligase wurde der Ansatz 10 Min. auf 70°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und direkt für die Transformation verwendet.

2.3.3.10 Darstellung kompetenter Zellen

2.3.3.10.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

E. coli-XL-1 Blue wurden aus einer Glycerol-Stammsuspension auf LB-Platten (für XL1-Blue mit Tetracyclin) ausgestrichen und ü. N. bei 37°C inkubiert. Mit einer Kolonie wurden 10 ml LB-Medium (XL-1 Blue mit Tetracyclin) angeimpft und ü. N. bei 37°C inkubiert. Mit 2,5 ml dieser Vorkultur wurden 500 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 inkubiert. Die Suspension wurde 15 Min. auf Eis gestellt und anschließend 20 Min. mit 1000 x *g* bei 4°C zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde mit 500 ml eiskaltem dH₂O auf Eis resuspendiert und

erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde mit 300 ml und anschließend mit 100 ml dH₂O wiederholt. Anschließend wurde das Sediment in 40 ml eiskaltem 10% (v/v) Glycerin gewaschen. Schließlich wurde das Volumen des Bakteriensediments abgeschätzt und im gleichen Volumen 10% (v/v) Glycerin resuspendiert, in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

2.3.3.10.2 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Der Bakterienstamm DH5α-Zellen wurde für die Herstellung chemokompetenter Zellen verwendet. Es wurden 10 ml LB-Medium mit einer Kolonie angeimpft und ü. N. bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurden 400 ml LB mit 4 ml der ü. N.-Kultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ 0,375 wachsen gelassen. Die Kultur wurde in autoklavierten 250 ml Bechern 10 Min. bei 1000 x g pelletiert. Das Pellet wurde in 40 ml CaCl₂-Lösung resuspendiert, 30 Min. auf Eis inkubiert und in vorgekühlte 50 ml Falcon-Röhrchen transferiert. Die Suspension wurde 7 Min. bei 1000 x g pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 4 ml CaCl₂-Lösung resuspendiert und jeweils 250 µl in vorgekühlte Eppendorfgefäße in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen konnten bei –70°C für bis zu 3 Monaten gelagert werden.

CaCl₂-Lösung:

60 mM CaCl₂

15 % (v/v) Glycerin

10 mM PIPES

pH 7.0

Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4°C gelagert.

2.3.3.11 Transformation

2.3.3.11.1 Elektrokompente Transformation

Elektrokompente *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 3-6 µl Ligationsansatz gemischt. Der Ansatz wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Eurogentec) überführt. Transformiert wurde mit einem Gene Pulser (Biorad) mit den folgenden Einstellungen: 25 µF, 2,5 kV und 200 Ω. Nach der Transformation wurden die Zellen sofort mit 750 µl LB-Medium gemischt und für 30-45 Min. bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension abzentrifugiert, in unterschiedlichen Verdünnungen auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und ü. N. bei 37°C inkubiert.

2.3.3.11.2 Chemische Transformation

Ein Aliquot chemokompetenter *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut und 4-6 µl des Ligationsansatzes hinzugegeben, gemischt und 30 Min. auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde für 45 Sek. bei 42°C erhitzt und anschließend sofort 750 µl LB-Medium hinzugegeben. Die Zellen wurden weitere 30-60 Min. bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden 1 Min. bei 1000 x *g* zentrifugiert und auf eine Agarplatte mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert. Anschließend wurden die Platte ü. N. bei 37°C inkubiert.

2.3.3.12 Agarosegelelektrophorese

Agarose (Seakem) wurde in 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und nach dem Abkühlen auf 55°C mit 5 µl EtBr-Lösung/100 ml (10 mg/ml) versetzt. Die Agaroselösung wurde dann in eine Gelform gegossen, in die Probenkämme gesteckt wurden. Das erstarrte Gel wurde ohne die Kämme in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Die DNA-Lsg. wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipetiert. Als Größenmarker dienten 5 µl Größenstandard (100-bp oder 1kb-Standard). Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 4 V/cm Gel durchgeführt. Durch das mit der DNA interkalierende EtBr wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht als Banden sichtbar und konnten mit einem UV-Transilluminator (Biorad) bei 300 nm detektiert werden. Die präparative Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte bei Wellenlängen von über 358 nm zur Vermeidung von Thymidindimerbildung.

2.3.3.13 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die entsprechenden Banden wurden unter langwelligem UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in Eppendorfgefäße überführt. Die Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des QIAquick Gelextraction Kit von der Firma Qiagen durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (Qiagen, 2002).

2.3.3.14 Sequenzierungen

Zum Sequenzieren der DNA wurde ein Verfahren benutzt, das auf der kontrollierten Unterbrechung der DNA-Synthese beruht (Sanger *et al.*, 1977; Tabor und Richardson, 1987). Einzelsträngige DNA dient dabei als Matrize für die Synthese eines neuen Stranges. Es wurde ein Primer zugegeben, der mit der DNA hybridisieren kann. Zusätzlich zu den Desoxyribonukleotiden wurden auch fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) in den Reaktionsansatz gegeben. Diesen fehlt die Hydroxylgruppe am 3'-C-Atom des Zuckers. Werden die

ddNTPs in den neuen DNA-Strang eingebaut, so stoppt das Kettenwachstum, da keine weitere Phosphodiesterbindung geknüpft werden kann. Über die unterschiedliche Länge der neu entstandenen DNA-Stränge lässt sich die Basenabfolge nach einer Gelelektrophoretischen Auftrennung ermitteln. Längenunterschiede von einem Basenpaar können aufgelöst werden. Durch die Fluoreszenzmarkierung der ddNTPs kann während einer Gelelektrophorese jedes DNA-Fragment mit einer Laserapparatur detektiert werden.

Im Reaktionsansatz wurden 800-1000 ng DNA, 10 pmol Primer und 4,5 µl Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit-Lösung (Amersham) zugegeben. Die Reaktion fand in einem Gesamtvolumen von 10 µl statt. Das Cycle Sequencing-Programm (15 Sek. 95°C, 15 Sek. 50°C, 20 Sek. 60°C, 40 Zyklen) wurde in einer PCR-Maschine durchgeführt und die Reaktion im Anschluss über G50 Säulen (Pharmacia) aufgereinigt. Die Bestimmung der Nukleotidsequenzen wurde auf einem ABI PRISM-377 DNA Sequencer durchgeführt. Die Elektropherogramme wurden mit der Computersoftware EditView 1.0 (Abiprism) ausgewertet.

2.3.3.15 Transfer von DNA auf Nylon-Membranen („Southern Blot“)

Der Southern Blot ist ein Verfahren, bei dem DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend aus der Gelmatrix auf eine geeignete Trägermembran übertragen und immobilisiert werden (Southern, 1975).

Zur Analyse wurde die DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten.

40 µl DNA
+ 5 µl 10x Restriktionsverdaupuffer
+ 5 µl Restriktionsenzym (50 U/µl)

Es wurde ü. N. inkubiert. Anschließend wurde eine Agarosegelelektrophorese (0,8 % Agarose) mit 30-40 mV durchgeführt. Das Gel wurde mit einem Fluoreszenzlineal fotografiert, damit eine Größenbestimmung der DNA-Banden nach der radioaktiven Bandendetektion möglich ist. Das Gel wurde 30 Min. in Denaturierungslösung geschwenkt, um die DNA zu depurinieren, und anschließend 30 Min. in Neutralisierungslösung geschüttelt.

Der Transfer der DNA auf ungeladenen Nylonmembranen Hybond-N+ (Amersham) wurde wie folgt durchgeführt: Das Gel wurde auf einem umgedrehten Gelschlitten auf Whatmanpapier, das in eine Schale mit Transferlösung hineinragte, gelegt. Auf das Gel wurde luftblasenfrei eine Nylonmembran gelegt, auf die zwei in Transferlösung getränkte und zwei trockene Whatmanpapiere folgten. Den Abschluss bildete ein Stapel Papierhandtücher, die durch ein Gewicht von ca. 500 g beschwert wurden.

Der Transfer wurde ü. N. durchgeführt. Der Filter wurde mit UV-Licht ($0,3 \text{ J/cm}^2$) behandelt, um die DNA mit dem Filter kovalent zu verknüpfen.

Die Prähybridisierung erfolgte 1-2 Std. bei 65°C in Hybridisierungslösung. In der Zwischenzeit wurde die radioaktive Sonde vorbereitet und mit einer entsprechenden Menge der vorgewärmten Hybridisierungslösung vermischt. Die Lösung auf dem Filter wird durch die Hybridisierungslösung mit der Sonde ausgetauscht und ü. N. bei 65°C auf dem Roller inkubiert. Am folgenden Tag wurde zunächst mit der Waschlösung 1 zweimal jeweils 30 Min. bei 65°C gewaschen. Anschließend wurde analog mit dem Waschpuffer 2 verfahren. Die Detektion dieser radioaktiven Southern Blots erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms auf die in Klarsichtfolie verpackten Blots. Die Exposition der Filme erfolgte für 1-3 Tage bei -80°C in einer Filmkassette (Dupont). Diese Kassetten enthielten einen Intensifer Screen (Dupont).

Denaturierungspuffer

0,25 N HCl
1,5 M NaCl

Neutralisierungspuffer

0,5 N NaOH
1,5 M NaCl

50x Denhardt's (100 ml)

1 g BSA
1 g PVP
1 g Ficoll
bei -20°C lagern

20x SSPE (1L)

174 g NaCl
27,6 g NaH_2PO_4
7,4 g EDTA
pH 7.4 (mit 10 N NaOH)

Hybridisierungspuffer:

300 ml dH_2O
50 ml 50x Denhardt's
125 ml 20x SSPE
25 ml 10% (w/v) SDS
mischen und filtern, 5 ml 10 mg/ml
denaturierte Lachs-DNA hinzugeben und
bei -20°C lagern.

Transferlösung:

0,25 N NaOH
1,5 M NaCl

Waschpuffer 1

2x SSC
0,5% (w/v) SDS

Waschpuffer 2

0,2 x SSC
0,5% (w/v) SDS

2.3.3.16 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Das als Sonde gewählte DNA-Fragment wurde durch Agarosegelelektrophorese nach dem Restriktionsverdau isoliert, wobei das Fragment für eine effektive Markierung nicht größer als 1 kb sein sollte. Die radioaktive Markierung findet über

den Einbau von α^{32} -P-dCTP bei der DNA-Synthese durch eine Klenow-Polymerase statt, dabei wird das zu markierende Fragment als Matrize eingesetzt. Die Markierung erfolgte nach Herstellerangaben des Random Primed Labelling Kits (Roche, #1004760). Die Sonde wurde über eine G50-Säule (Pharmacia) aufgereinigt. Der Durchlauf wurde unmittelbar vor der Hybridisierung 5 Min. bei 95°C denaturiert und direkt zur auf 65°C vorgewärmten Hybridisierungslösung gegeben.

2.3.3.17 Transfer von Bakterienkolonien auf Nylonmembranen

Um alle Bakterien einer Agarplatte auf positiven Kolonien zu untersuchen, wurde ein sog. „colony screen“ durchgeführt. Hierzu erfolgte zunächst ein Abdruck der Platte auf eine Nylonmembran. Diese Membran wurde anschließend mit einer radioaktiven Probe hybridisiert und die Filter auf einen Film exponiert. Positive Kolonien wurden identifiziert und ein Miniprep dieser Kolonien angefertigt (siehe 2.3.1.2).

Trockene ungeladene Nylonmembranen in passender Größe wurden beschriftet und mit der unbeschrifteten Seite auf die Bakterienplatte gelegt. Die Bakterienplatte wurde zuvor mindestens 30 Min. bei 4°C gelagert. Damit später die exakte Orientierung der Membran nachvollzogen werden konnte, wurden diese mit Nadelstichen markiert und die Markierungen auf den äußeren Plattenboden übertragen. Die Membran wurde 30 Sek. auf der Platte belassen. Um die Bakterien-DNA kovalent an die Membran zu binden, mussten folgende Schritte vollzogen werden: Die Filter wurden mit der Bakterienseite nach oben 4 Min. auf ein mit Denaturierungslösung getränktes Whatmanpapier gelegt. Danach wurden sie zweimal für 4 Min. mit Neutralisierungslösung behandelt, getrocknet und schließlich in 2x SSC äquilibriert. Anschließend wurden sie 30 Min. bei RT luftgetrocknet. Zuletzt wurde die DNA mit UV-Licht (0,3 J/cm²) auf der Nylonmembran immobilisiert. Die Analyse der Bakterien-DNA mit sequenzspezifischen Sonden wurde analog zum Abschnitt 2.3.3.15 durchgeführt.

Denaturierungspuffer:

0,5 N NaOH

1,5 M NaCl

Neutralisierungspuffer:

1,5 M NaCl

0,5 M Tris/HCl pH 7.4

2.3.4 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

Die Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre unter 5% CO₂ bei 37°C kultiviert. Medien und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, auf 37°C vorgewärmt. Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilbank mit sterilem, für die Zellkultur ausgelegtem Material durchgeführt.

2.3.4.1 Passagieren von Zellen

Zellen wurden i. d. R. zweimal pro Woche geteilt und für maximal 30 Passagen in Kultur gehalten. Zum Passagieren wurde das Medium abgesaugt und die Platte mit 1x PBS gewaschen. Dann wurde 1 ml 0,25% Trypsin-EDTA (Gibco) hinzugegeben und die Kulturschale bei 37°C/5% CO₂ inkubiert bis sich die Zellen ablösten und vereinzeln ließen (normalerweise 2-5 Min.). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von serumhaltigem Medium abgestoppt, die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen in die Pipette vereinzelt und die Zellzahl pro ml ggf. in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in der gewünschten Dichte ausgesät.

Medium +++ (500 ml)

500 ml DMEM (Gibco)

50 ml Fötale Kälberserum (FCS) (Gibco)

5 ml Penicillin/Streptomycin (5000 U/ μ g/ml)

5 ml 200 mM Glutamin

2.3.4.2 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden trypsinisiert, in Medium +++ aufgenommen und sedimentiert (100 x g, 5 Min., RT). Das Zellpellet wurde in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden möglichst langsam z. B. unter Zuhilfenahme eines mit Isopropanol gefüllten Kryogefäßes oder einer Styroporbox auf -80°C abgekühlt. Für längere Lagerungen wurden die Zellen in einem flüssigen Stickstoffkontainer aufbewahrt.

Einfriermedium

Medium +++

10% (v/v) DMSO

2.3.4.3 Auftauen und Revitalisieren von Zellen

Nach der Entnahme des Kryoröhrchens aus dem Stickstofftank wurde es 1 Min. bei RT gehalten und dann bei 37°C in einem Wasserbad unter Schwenken aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern vorhanden war. Die Zellsuspension wurde entnommen und in 10 ml Medium +++ überführt. Die Zellen wurden pelletiert (100 x g, 5 Min., RT), der Überstand abgesaugt und das Pellet in 10 ml Medium überführt. Die resuspendierten Zellen wurde ausplattiert und am nächsten Tag das Medium gewechselt, um tote Zellen und restliches DMSO zu entfernen.

2.3.4.4 Transfektionen

Die HEKT-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion anhand der folgenden Tabelle ausgesät:

Tabelle 2-7: Pipetierschema für verschiedene Zelllinien.

Platte	Zellzahl HEKT	Zellzahl COS-7	Zellzahl MDCK
24-well	$0,1 \times 10^5$	$0,1 \times 10^5$	$0,1 \times 10^5$
6-well	$0,5 \times 10^6$	$0,5 \times 10^6$	$0,5 \times 10^6$
10 cm	$1,8 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$

2.3.4.4.1 Transfektionen mit HEBS

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen anhand der Tabelle 2-7 ausgesät. Die folgenden Reagenzien wurden für die Transfektion vermischt und für 5 Min. inkubiert und tröpfchenweise zu den Platten gegeben.

Tabelle 2-8: Transfektionsschema mit HEBS-Puffer.

Platte	DNA (μ g)	2.5 M CaCl ₂ (μ l)	H ₂ O (μ l)	2x HEBS (μ l)
24-well	2	5	auf 50	50
6-well	5-10	12,5	auf 125	125
10 cm	20	50	auf 500	500

Die Zellen wurden für 4-8 Std. bei 37°C/5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Platten zweimal mit 1x PBS gewaschen und weitere 48 Std. bei 37°C/5% CO₂ inkubiert, bevor sie geerntet wurden.

2x HEBS Puffer

50 mM HEPES

280 mM NaCl

1,5 M Na₂HPO₄

pH 7.08 - 7.12

2.3.4.4.2 Transfektionen mit Polyfect

Diese Methode wurde nur für die Konstrukte verwendet, für die mit HEBS-Puffer keine ausreichenden Transfektionsrate erzielt werden konnte. Zellen wurden anhand der Tabelle 2-7 ausgesät und am folgenden Tag nach den Herstellerangaben transfiziert (Qiagen, 2000).

Nach der Zugabe des Polyfects wurden die Zellen 10 Min. bei RT inkubiert und anschließend die angegebene Menge Medium +++ hinzugegeben. Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Zellen für weitere 48 Std. bei 37°C/5% CO₂ inkubiert.

Tabelle 2-9: Pipettierschema für Polyfect-Transfektionen

Platte	DNA (µg)	DMEM (µl)	Polyfect (µl)	Medium +++ (ml)
24-well	0,5	auf 20	7	0,15
6-well	2-4	auf 100	15	1,5
10 cm	4-6	auf 300	60	7

2.3.4.5 Herstellung von Zelllysaten nach der Transfektion

Die Zellen wurden 5 Min. auf Eis gestellt und in den weiteren Schritten ebenfalls auf Eis gehalten. Von den transfizierten Zellen wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit 1x eiskaltem PBS gewaschen. 100 µl Zelllysepuffer/6-well Schale wurde auf die Zellen gegeben, mit einem Schaber abgekratzt und in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach mehrfachem Auf- und Abpipettieren wurden größere Zelltrümmer bei 4°C und 17900 x g für 15 Min. abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese Zelllysate wurden für die Proteinbestimmung (siehe 2.3.4.6) eingesetzt und bei -20°C gelagert.

2.3.4.6 Proteinbestimmungen

Der quantitative Nachweis der Proteine erfolgt nach Bradford (Bradford, 1976) mit dem Bio-Rad DC Protein Assay Kit (Bio-Rad). In Gegenwart von Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum aufgrund der Komplexbildung zwischen dem Farbstoff und kationischen, unpolaren sowie hydrophoben Seitenketten der Proteine von 465 zu 595 nm. In einer 1 ml Plastikkuvette wurden jeweils 1 µl der Probe mit 49 µl 0,2 M NaOH versetzt. Dazu wurden 750 µl H₂O und 200 µl Bio Rad-Reagenz gegeben und die Probe sorgfältig durchmischt. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration konnte anhand einer Referenzkurve bestimmt werden. Als Referenz dienten unterschiedliche in 0,2 M NaOH verdünnte Rinderserumalbumin (BSA)-Lösungen.

2.3.4.7 Deglykosylierungen

Transfizierte HEKT-Zellen wurden 48 Std. nach der Transfektion geerntet und bis zur Proteinbestimmung wie in Abschnitt 2.3.4.5 beschrieben verarbeitet. Je 30 µg Protein wurden in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und die Reaktion nach folgendem Pipettierschema angesetzt:

30 µg Protein
 2 µl 10x Denaturierungspuffer
 ad 20 µl Lysepuffer

Es wurde kurz zentrifugiert und anschließend folgende Lösungen hinzugegeben:

a) für Deglykosylierungen mit PGNaseF:

- + 3 μ l 10x G7-Reaktionspuffer
- + 3 μ l NP40
- + 1 μ l PGNaseF (NEB, #P0704S)

b) für Deglykosylierungen mit EndoH:

- + 2,5 μ l 10x G5-Reaktionspuffer
- + 1 μ l EndoH (NEB, #P0702S)

Die Proben wurden jeweils 90 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz auf Eis abgekühlt und mit 7 μ l 4x Lämmli-Puffer versetzt. Die Proben wurden wie in Abschnitt 2.3.4.9 beschrieben einer Western Blot-Analyse unterzogen.

2.3.4.8 Oberflächenbiotinylierungen

Die Biotin-Markierung von Biomolekülen ist eine nichtradioaktive Markierung von Makromolekülen. Das Biotin wird dabei über eine reaktive Gruppe kovalent an die Aminogruppe von z. B. Lysinresten gebunden. Die Verwendung von Sulfo-NHS-Biotinestern hat den Vorteil, dass sie die Plasmamembran nicht penetrieren. Das verwendete EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin (Pierce, #21331) kann zudem durch reduzierende Chemikalien, wie z. B. DTT gespalten werden. Proteine wie Streptavidin oder Avidin besitzen multiple Bindungsstellen für Biotin. Diese nahezu irreversible Bindung wird zur Isolation bzw. Detektion biotinylierter Makromoleküle genutzt. So ist beispielsweise in der Oberflächenbiotinylierung das Streptavidin an Agarosekügelchen gekoppelt.

In der Vorbereitung wurden 6-well Platten mit Poly-D-Lysin beschichtet und die Zellen für die Transfektion auf diesen Platten ausgesät. Die HEKT-Zellen wurden 48 Std. nach der Transfektion geerntet, 5 Min. auf Eis gekühlt und zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen. Dann wurde das PBS entfernt und 600 μ l 0,2 mg/ml EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin auf die Zellen gegeben. Es wurde 30 Min. bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde mit 2 ml eiskaltem 100 mM Glycin/PBS für 10 Min. gewaschen, um überschüssiges Biotinreagenz zu blockieren. Es folgten drei Waschschrte mit 1x PBS. Das PBS wurde vollständig entfernt und 100 μ l Lysepuffer auf die Zellen gegeben. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von der Plastikoberfläche gelöst und in ein Eppendorfgefäß pipetiert. Dort wurden sie 15 Min. inkubiert und dann für 15 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß gegeben und der Proteingehalt bestimmt. Alle Proteinproben wurden auf 2 mg/ml verdünnt und jeweils 15 μ l (30 μ g) dieser Lösung in ein Eppendorfgefäß pipetiert. Diese Probe (Auftrag) wurde mit 15 μ l Lysepuffer und 10 μ l

4x Lämmli-Puffer versetzt und eingefroren. Weitere 50 μl (100 μg) des Proteinlysats wurden mit 50 μl Streptavidin-Agarosebeads (Pierce, #20349) vermischt. Die Agarosebeads wurden zuvor mit 1000 x g für eine Min. zentrifugiert, zweimal mit 1x PBS gewaschen und zwischen den Waschschrritten erneut pelletiert. Die Beads wurden in 50 μl PBS aufgenommen und dann zu der Proteinlösung gegeben. Diese Suspension aus Proteinlysats und Agarosebeads wurde für drei Std. bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Proben 1 Min. bei 1000 x g bei 4°C zentrifugiert und 30 μl (30 μg) des Überstandes in ein Reaktionsgefäß gegeben. Dieses entspricht der ungebundenen Fraktion (Ü1) und wurde bis zur Analyse eingefroren, nachdem es mit 10 μl 4x Lämmli-Puffer versetzt wurde (siehe Abbildung 2-1). Der restliche Überstand wurde von dem Pellet abgenommen und die

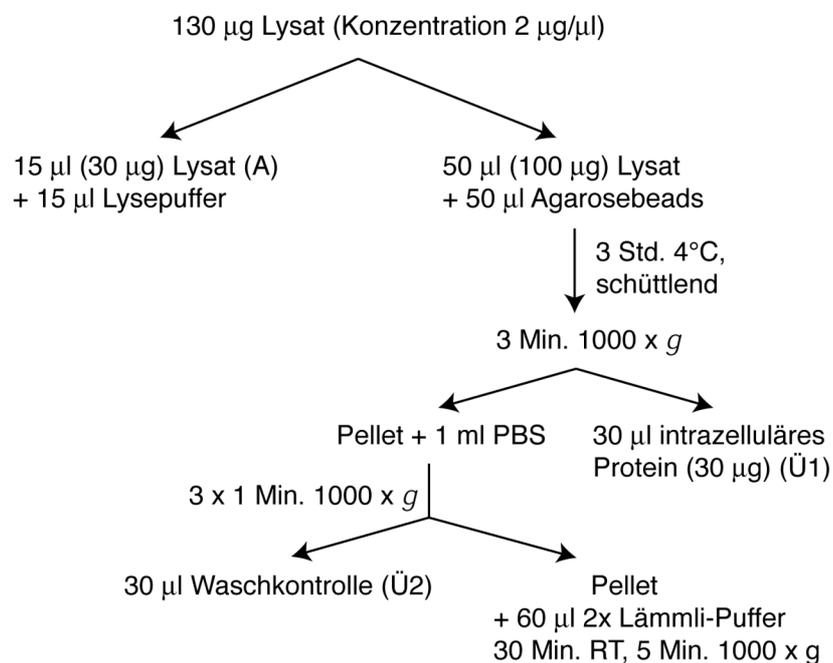


Abbildung 2-1: Arbeitsschritte der Biotinylierung. Jeweils vier Proteinproben wurden gesammelt: A, das Gesamtlysats; Ü1, die intrazelluläre Fraktion; Ü2, Kontrolle der Wascheffizienz in der kein Protein detektierbar sein sollte; P, die an die Pellets gebundenen Oberflächenproteine.

Pellets in 1 ml kaltem PBS resuspendiert, 1 Min. bei 1000 x g zentrifugiert und dieser Schritt wiederholt. In einem dritten Waschschrtritt wurde 30 μl des Überstandes (Überstand 2) zur Kontrolle der Waschschrtritte aufbewahrt und 10 μl 4x Lämmli-Puffer hinzupipetiert und eingefroren. Der restliche Überstand wurde entfernt und das Pellet in 60 μl 2x Lämmli-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden 30 Min. bei RT inkubiert und anschließend 5 Min. bei 1000 x g zentrifugiert und eingefroren. Zur Analyse wurden die Proben einer Western Blot-Analyse unterzogen.

2.3.4.9 SDS-PAGE und Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, bei der elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf einen geeigneten Trägerfilter übertragen werden. Unter geeigneten Bedingungen können einzelne Proteine durch spezifische Antikörper markiert und mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper nach Substratzugabe nachgewiesen werden (Laemmli, 1970).

Zunächst wurde das Gel nach dem folgenden Pipetierschema in einem 100 ml Becherglas vorbereitet:

<u>8% Trenngel</u>	<u>4% Sammelgel</u>
3,75 ml 1,5 M Tris/Cl pH 8.8	1,5 ml 0,5 M Tris/Cl pH 6.8
3 ml 40% (v/v) Acrylamid	0,375 ml 40% (v/v) Acrylamid
150 µl 10% (w/v) SDS	60 µl 10% (w/v) SDS
100 µl 10% (v/v) APS	60 µl 10% (v/v) APS
10 µl TEMED	10 µl TEMED
ad 15 ml H ₂ O	ad 6 ml H ₂ O

Das Gel wurde gut gemischt, in die Bio Rad Gelapparatur für Mini-Gele (Mini-Protean 3) gegeben und mit 80% (v/v) EtOH überschichtet. Während das Trenngel polymerisierte, wurde das Sammelgel vorbereitet. Das EtOH wurde mit einem Whatmanpapier entfernt und das Trenngel vorsichtig mit dem Sammelgel überschichtet. Ein Kamm wurde luftblasenfrei in die Apparatur eingeführt. Das Gel wurde mindestens 30 Min. polymerisiert und anschließend die Apparatur aufgebaut.

Die Proteinproben wurden auf Eis aufgetaut. Für die GlyTs ist es essentiell, dass die Proben nicht bei 95°C denaturiert wurden, da sonst eine starke Aggregatbildung zu beobachten war. Die Proben und der Proteinmarker wurden kurz zentrifugiert und dann in die Geltaschen eingefüllt. Das Gel lief 2-3 Std. bei 100 V. Das Gel und die Nitrozellulosemembran wurden in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer wurde wie folgt aufgebaut:

Schaumstoff
2-mal Whatmanpapier
Gel
Nitrozellulosemembran
2-mal Whatmanpapier
Schaumstoffmembran

Es wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten waren. Diese „Sandwichs“ wurden nach Herstellerangaben zusammengebaut und die Apparatur mit eiskaltem Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer erfolgte auf Eis für 2 Std. bei 100 V. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran in einer Ponceau

S-Lösung geschwenkt. Anschließend wurde die Membran mit Wasser solange ausgewaschen, bis die Ponceau S-Lösung nur noch die Proteine anfärbte. Von den erscheinenden Proteinbanden wurde eine Fotokopie zur Dokumentation des Transfers gemacht. Die Membran wurde mit PBST entfärbt.

Anschließend erfolgte die Immundetektion der Proteine. Hierfür wurde der Blot in 2-5% (w/v) Milchpulver/PBST ü. N. bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Es folgte die Applikation des Erstantikörpers in 0-5% (w/v) Milchpulver/PBST für 1h bei RT oder bei einigen Antikörpern ü. N. bei 4°C. Anschließend wurde dreimal für 7 Min. mit 1x PBST gewaschen und schließlich mit dem Zweitantikörper für eine Std. inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschstschritte. Die Chemilumineszenz wurde mit dem SuperSignal West Pico Chemiluminescent Kit (Pierce, #34080) auf einem Kodak-Film nachgewiesen.

Trenngelpuffer

1,5 M Tris/Cl, pH 8.8

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris/Cl, pH 6.8

10x TG

1,92 M Glycin
0,25 M Tris/Cl, pH 8.8.

Laufpuffer

0,1 % (w/v) SDS
1x TG, pH 8.8

Transferpuffer

20% (v/v) Methanol
0,01% (w/v) SDS
1x TG, pH 8.8

PBST

1x PBS pH 7.3
0,05% (v/v) Tween

Ponceau S-Lösung

0,5 g Ponceau S
1 ml Eisessig
ad 100 ml H₂O

2.3.4.10 Glycinaufnahme-Experiment

Aufnahme-Experimente mit radioaktiven Tracern dienen als quantitativer Nachweis für den Transport von Substraten durch ein bestimmtes Transportprotein. Im Falle von GlyTs handelt es sich um das Substrat Glycin, das radioaktiv mit Tritium markiert wurde. Dieses wird in einer vorgegebenen Konzentration für einen definierten Zeitpunkt auf mit GlyTs transfizierte Zellen gegeben (Scholze *et al.*, 2000). Auf diese Weise kann der K_M und v_{max} des Transporters bestimmt werden.

Die HEKT-Zellen wurden am ersten Tag vor der Transfektion mit einer Dichte von $1,8 \times 10^6$ in einer 10 cm Kulturschale ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen transfiziert (siehe 2.3.4.4). 48-well und 24-well Platten wurden mit 100-500 μ l Poly-D-

Lysin (Sigma) beschichtet und anschließend für 2 Std. bei 37°C inkubiert und zweimal mit je 500 µl H₂O gewaschen. Am dritten Tag wurden die transfizierten Zellen mit 1x PBS gewaschen und passagiert. Die Zellen wurden in 10 ml Medium +++ aufgenommen und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wurde nach folgendem Schema ausplattiert (Abbildung 2-2):

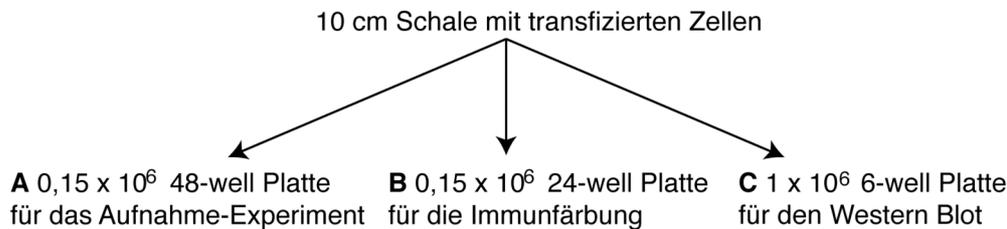


Abbildung 2-2: Ausplattierungsschema für das Aufnahme-Experiment. Es ist zu beachten, dass die Zellen in A-C aus derselben transfizierten Ursprungsplatte kamen.

Am vierten Tag erfolgte das eigentliche Aufnahme-Experiment. Hierzu wurden Glycinlösungen unterschiedlicher Konzentration (zwischen 10 µM – 300 µM Glycin) hergestellt und in KHP+Glukose verdünnt. Eine konstante Menge an radioaktiv markiertem [³H]Glycin wurde hinzugefügt, so dass die Endkonzentration an radioaktiv markiertem Glycin konstant bei 0,09 µM lag. Die 48-well Platten wurden zunächst mit 500 µl KHP+Glukose gewaschen und anschließend jeweils 100 µl der entsprechenden Aufnahmelösung hinzugefügt. Diese wurde dann je Well für 4 Min. auf den Zellen inkubiert, bevor die Aufnahme von Glycin mit eiskaltem KHP+Glukose gestoppt wurde. Hierzu wurde zunächst die radioaktive Lösung abgesaugt und zweimal mit 250 µl kalten KHP+Glukose gewaschen. Restliches KHP wurde entfernt und 250 µl 1% (w/v) SDS-Lösung zum Lysieren der Zellen in jedes Well gegeben. Die Lysate wurden einzeln in ein Szintillationsröhrchen mit 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit (Roth) gegeben und in einem β-Szintillationszähler (Beckmann) für jeweils 5 Min. gezählt. Zusätzlich wurde die tatsächlich eingesetzte Menge an [³H]Glycin bestimmt, indem 10 µl der 0,9 µM [³H]Glycin-Stammlösung gezählt wurden.

Beispielrechnung

Ansetzen der [³H]Glycin-Stammlösung (0,9 µM):

$$x = \frac{\text{gesuchte } [^3\text{H}]\text{Glycin Aktivität} * 310 \mu\text{l/Triplett}}{\text{spezifische Aktivität der Ausgangslsg.}} = \frac{0,9 \mu\text{M} * 310 \mu\text{l}}{33 \mu\text{M}} = 8,3 \mu\text{l/ Triplett}$$

Berechnung der Glycin-Endkonzentration mit dem Multiplikationsfaktor f:

$$\text{Multiplikationsfaktor } f = \frac{[\text{Gesamt Glycin}]}{[^3\text{H}]\text{Glycin}}$$

Um nun die Gesamtglycinaufnahme zu berechnen, muss der cpm-Wert mit dem Faktor f multipliziert werden:

$$\text{cpm}/[\text{Gesamt-Glycin}] = \text{cpm} * f$$

Die Glycinaufnahme wird im Folgenden auf die Aufnahmezeit sowie die Proteinkonzentration bezogen:

$$\text{uptake} = \frac{\text{cpm}/[\text{Gesamtglycin}] \text{ (pmol)}}{\text{Gesamtprotein (mg)} * \text{Zeiteinheit (Min.)}}$$

20x Krebs-HEPES-Puffer (KHP)

2,4 M NaCl

60 mM KCl

40 mM CaCl₂

40 mM MgCl₂

200 M HEPES, pH 7.3

1x KHP+Glukose (1L)

50 ml 20x KHP

3.96 g D(+)Glukosemonohydrat

mit Wasser auf 1 L auffüllen

pH 7.3

2.3.5 Gewebekulturen

Die Gewebekulturen wurden aus Mäusen oder Ratten gewonnen. Die Tiere wurden zunächst mit Halothan betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden die Embryonen bzw. das Gewebe entnommen.

2.3.5.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

Nach der Präparation wurde das Gewebe in Tissue-Tak (Sakura) eingebettet. Transversale und/oder sagitale Schnitte erfolgten im Kryostaten (Leica, Jung Frigocut 2800E) mit einer Schnittdichte von 10-12 µm. Die Schneidetemperatur betrug -18°C und die des Präparats -14°C. Jeweils 4-8 Schnitte wurden auf einen Objektträger übertragen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.3.5.2 Rückenmarkskulturen

Die Kulturen wurden nach dem Protokoll von Kirsch und Betz (1995) angefertigt. Die spinalen Neuronen wurden von Mausembryonen des Embryonalstadiums (E) 13,5 gewonnen. Hierfür wurden Mäuse verpaart und der Tag des Vaginalpropfens als E0,5 definiert.

Zunächst wurden die 24-well Platten zur Kultivierung der Neuronen vorbereitet. EtOH-gewaschene, sterile Glasplättchen wurden in 24-well Platten gegeben und mit 500 µl Polyornithin (1,5 µg/ml) beschichtet. Die Platten wurden erst 15 Min. bei RT inkubiert und dann 45 Min. bei 37°C/5% CO₂. Sie wurden zweimal mit 1 ml H₂O gewaschen und dann 500 µl Medium/10% (v/v) FCS hinzugegeben. Die Platten wurden bis zur weiteren Verarbeitung im Inkubator aufbewahrt. Die Embryonen

wurden aus dem Embryonalsack entnommen und in eine mit 1x PBS gefüllte 3 cm Kulturschale überführt. Von der Nackenfalte aus wurde mit einem Schnitt bis zur Mundöffnung der Kopf abgetrennt. Anschließend wurde die Haut über dem Rückenmark entfernt. Das Rückenmark wurde mittels feiner Pinzetten (FST, No 5) vorsichtig herausgelöst und in eine neue Kulturschale mit 1x PBS/33 mM Glukose überführt. Das Rückenmark wurde von restlichen Häutchen befreit und in ca. 1 mm große Stücke zerteilt. Die Rückenmarkstücke wurden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und dreimal stark trituiert. Es wurde bis zum Absinken größerer Stücke gewartet und der Überstand in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Zu den Rückenmarksstücken wurde erneut 1 ml PBS/33 mM Glukose gegeben und erneut dreimal trituiert. Die Suspensionen wurden vereint und 10 Min. bei 100 x *g* zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1-2 ml Medium ohne FCS aufgenommen und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. $1,2 \times 10^5$ Zellen/24-well wurden ausgesät. Die Kulturen wurden bei 37°C/5% CO₂ für 2-3 Wochen vor der Verarbeitung kultiviert.

Medium (50 ml):

50 ml Neurobasalmedium (Gibco No 21103-031)
1 ml 5000 U/ μ g/ml Penicillin/Streptomycin-Lösung
0,125 ml 200 mM Glutamin
1 ml B27 (Gibco)

2.3.5.3 Präparation von hippocampalen Neuronen

In der Vorbereitungsphase wurden in 24-well Schalen Deckgläschen mit 500 μ l Polyornithin beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten zweimal mit H₂O gewaschen und 500 μ l Ausplattiermedium hinzugegeben.

Die Kulturen wurden aus Wistar Rattenembryonen des Stadiums E18,5 gewonnen (Fuhrmann *et al.*, 2002). Die Embryonen wurden in eine Petrischale mit PBS+Glukose gegeben. Die Köpfe wurden mit einer Schere vorsichtig vom Körper getrennt und in eine neue Petrischale mit PBS+Glukose transferiert. Dort wurden sie bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Die Köpfe wurden einzeln mit der dorsalen Seite nach oben auf ein Küchentuch gelegt. Mit zwei spitzen Pinzetten (FST, No 5) wurden die Kopfhaut und das Knorpelgewebe entfernt. Mit einer runden Pinzette (FST, No 7) wurde das Hirn vorsichtig aus dem Schädel entfernt und in eine neue Schale mit PBS+Glukose transferiert. Unter dem Binokular wurden die beiden Hemisphären abgetrennt und das Cerebellum entfernt. Die Hirnhaut, die das Hirn umgibt, wurde abgelöst und die Hemisphären mit der Innenseite nach oben gedreht. Der Hippocampus wurde mit zwei spitzen Pinzetten entnommen und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen mit PBS+Glukose transferiert. Die Hippocampi wurden dort gesammelt und setzten sich am Boden ab. Das PBS wurde entfernt und durch 5 ml

Verdauulösung ersetzt. Diese wurden für 15 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Hippocampi mit 10 ml Ausplattiermedium gewaschen und das Medium anschließend durch 1 ml Ausplattiermedium ersetzt. Nun wurde 10-15-mal trituiert, die Zellen gezählt und mit einer Dichte von 6×10^4 Zellen/24-well Plättchen ausplattiert. Nach drei Std. wurde das Ausplattiermedium abgesaugt und durch 750 μ l Neuronenmedium ersetzt. Nach drei Tagen wurde in jedes Well 3,75 μ l 200x AraC-Lösung hinzugefügt.

Polyornithin-Lösung

150 μ g/ml Polyornithin (MW=40000)
mit H₂O auffüllen, 1,5 μ l/well

PBS+Glukose

33 mM Glukose
in PBS, pH 7.3

Ausplattiermedium (100 ml)

10 ml FCS
0,23 ml 100 mM Natriumpyruvat
1 ml 200 mM Glutamin
1 ml 5000 U/ μ g/ml Penicillin/Streptomycin
in DMEM

Verdauulösung (5 ml)

5 μ l 10 mg/ml DNase I
2,5 mg Papain
in PBS+Glukose

Neuronenmedium (100 ml)

0,23 ml 100 mM Natriumpyruvat
1 ml 200 mM Glutamin
1 ml 5000 U/ μ g/ml Penicillin/Streptomycin
2 ml B27
in Neurobasalmedium

200x AraC-Lösung

60 mM 1[β -D-Arabino-
furansyl]cytosine

2.3.5.4 Transfektion von hippocampalen Neuronen

Für die Neuronen wurde ein modifiziertes Protokoll nach Jaskolski *et al.* (2005) verwendet. Hierfür wurden hippocampale Neuronen DIV 10-12 transfiziert. Zunächst wurde T₀-Medium für mindestens eine Std. bei 5% CO₂ im Inkubator äquilibriert. In ein Eppendorfgefäß wurden 125 μ l T₀-Medium vorgelegt und 2,5 μ l Lipofectamin 2000 (Invitrogen, La Jolla, USA) hinzupipetiert. Die Lösung wurde vermischt und 2 Min. gevortext. In der Zwischenzeit wurden 125 μ l T₀-Medium zu 1,25 μ g DNA gegeben. Auch diese Probe wurde unter identischen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden alle Proben kurz bei 1200 x *g* zentrifugiert, 10 Min. bei RT inkubiert und tröpfchenweise die Lipofectamin- in die DNA-haltige Lösung pipetiert. Es wurde weitere 10 Min. inkubiert. In dieser Inkubationszeit wurde das Medium auf den Neuronen durch 450 μ l T₀-Medium ausgetauscht. Das Neuronenmedium wurde aufbewahrt. 100 μ l der Transfektionslösung wurden in jedes Well gegeben. Es wurde für 45 Min. bei 5% CO₂/37°C inkubiert. Anschließend wurde mit 750 μ l T₀-Medium

gewaschen und das Neuronenmedium wieder auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden drei Tage nach der Transfektion fixiert.

T₀-Medium

33 mM Glukose

in Neurobasalmedium

2.3.6 Immunfärbungen auf Glasplättchen

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen/Glasplättchen auf einer 24-well Platte ausgesät, die zuvor mit Poly-D-Lysin beschichtet wurde. Am folgenden Tag wurden die Zellen transfiziert und anschließend, soweit nicht anders vermerkt, für 48 Std. inkubiert. Beim Ernten der Zellen wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend für 5-10 Min. mit 4% (w/v) PFA/4% (w/v) Sukrose/PBS fixiert. Um überschüssiges PFA zu entfernen, wurden die Zellen 7 Min. mit 0,1% (w/v) Glycin/PBS gewaschen, zweimal mit 1x PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit Blocklösung für 30 Min. inkubiert. Es wurde weitere 15 Min. in Blocklösung mit 0,1% (v/v) Triton X100 inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (siehe Tabelle 2-5). 25 μ l Antikörper in Blocklösung wurden auf ein Stück Parafilm (Pechiney) pipetiert und das Glasplättchen mit den Zellen nach unten auf den Tropfen gelegt. Dieses wurde dann 90 Min. bei RT in einer feuchten Kammer im Dunkel inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgten drei Waschschrte für jeweils 7 Min. mit 1x PBS. Anschließend wurde der Zweitantikörper in PBS (siehe Tabelle 2-6) analog zum Erstantikörper hinzugegeben und für 30 Min. bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Glasplättchen wurden zweimal 7 Min. mit 1x PBS gewaschen und zuletzt in H₂O gedippt, kurz getrocknet und mit Aquamount (Polyscience Inc, Warrington, USA) auf einem Objektträger eingedeckelt. Die Objektträger wurden im Dunkeln ü. N. bei RT getrocknet und bei 4°C aufbewahrt.

Blocklösung

1% (w/v) BSA

2% (v/v) NGS

in PBS

2.3.7 Immunfärbungen auf Gewebsschnitten

Für die Immunfärbung wurden die Gewebeschnitte kurz bei RT getrocknet, für 2 Min. mit eiskaltem 4% (w/v) PFA/PBS fixiert. Danach wurden die Schnitte dreimal 5 Min. in PBS gewaschen, anschließend 1 Std. in Blocklösung A inkubiert. Die Blocklösung wurde gegen Antikörperlösung ausgetauscht, mit Parafilm (Pechiney) bedeckt und ü. N. bei 4°C in einer feuchten Kammer unter sanftem Schütteln inkubiert. Am

nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal 5 Min. mit 1x PBS gewaschen, 1 Std. in Blocklösung B inkubiert und mit dem sekundären Antikörper im Dunkeln in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Nach dem Waschen (3x 5 Min.) mit 1x PBS wurden die Objektträger in Wasser getaucht, getrocknet und in Aquamount eingebettet.

Blocklösung A:

1% (v/v) NGS

1% (w/v) BSA

0,3% (v/v) Triton

in PBS

Blocklösung B:

1% (v/v) NGS

1% (w/v) BSA

in PBS

2.3.8 Generierung von BAC-transgenen Mäusen

Transgene Mäuse tragen ein zusätzliches Gen stabil in ihrem Erbmateriale. Als Transgen können Gene mit bekannter Funktion, Gene unbekannter Funktion oder mutierte Allele eines bekannten Gens verwendet werden. Hierzu wird u. a. eine Technik verwendet, bei der ein großes, bakterielles, zirkuläres Plasmid (BAC), das sehr große Stücke (100-700 kb) exogener genomischer DNA enthält, in den Pronucleus von Einzellzygoten injiziert wird (Ioannou *et al.*, 1994; Shizuya *et al.*, 1992; Zimmer und Verrinder Gibbins, 1997). Linearisierte BACs integrieren sich in der Zygote an einer zufälligen Stelle, meistens an Doppelstrangbrüchen, und führen dann zur Expression des Transgens. Ein BAC-Transgen hat zum einen den Vorteil, dass mit großer Wahrscheinlichkeit alle endogenen regulatorischen Sequenzen des Gens vorhanden sind und führen so zu einer gewebsspezifischen Expression, die dem des wt-Gens entspricht. Zum anderen wird ein BAC-Transgen weniger stark überexprimiert als dies von anderen transgenen Methoden bekannt ist. Dieses stellt einen Vorteil bei der Untersuchung der Lokalisation von Proteinen dar, da es bei hoher Überexpression zu einer ektopen Lokalisation des Transgens kommen kann. Voraussetzung für eine erfolgreiche Insertion der gewünschten cDNA in den BAC-Klon ist die homologe Rekombination. Hierfür wurden etwa 500 bp lange Homologiearme an den Anfang und das Ende der zu insertierenden cDNA eingefügt.

2.3.8.1 Subklonierung in die Konstruktionsvektoren

In diesem Schritt wurde die cDNA inklusive aller Komponenten des Transgens in einem pBS-Klonierungsvektor zusammengefügt. Folgende Komponenten wurden in diesen Konstruktionsvektor eingefügt: die cDNA, die durch das Transgen exprimiert werden soll, mit anschließender pA-Kassette und einer FRT-Bindungsstelle, flankiert von den Homologiearmen A und B. Diese FRT-Bindungsstelle ist eine 40 Basenpaar lange Erkennungssequenz für die Flp-Rekombinase, ein Protein, dass zwischen zwei FRT-Seiten liegende Sequenzen bei gleicher Orientierung der FRT-Seiten deletiert

bzw. bei unterschiedlicher Orientierung invertiert. Da bei der zufälligen Insertion eines Transgens in die DNA der Zygote häufig mehrere Transgene hintereinander eingefügt werden, sog. Konkamere, können diese später durch die Behandlung mit der Flp-Rekombinase zu einem einzelnen Transgen je insertierter Stelle reduziert werden. Dieses kann beispielsweise durch die Kreuzung mit einer transgenen Mauslinie passieren, die die Flp-Rekombinase unter Kontrolle eines ubiquitären Promotors exprimiert.

Zuerst wurden die Homologiearme, die eine Länge von ca. 500 bp haben, mittels PCR amplifiziert und an deren Enden gewünschte Restriktionsendonuklease-Schnittstellen eingefügt (siehe 2.3.3.2). Die Primersequenzen sind der Tabelle 2-2 und Tabelle 2-3 zu entnehmen und wurden anhand der genomischen Sequenz des GlyT2-Gens in der ensembl-Datenbank (www.ensembl.org) erstellt. Diese DNA-Fragmente wurden anschließend durch Sequenzierungen auf Mutationen überprüft. Die Homologiearme wurden in einen pBS-Vektor subkloniert. Anschließend wurde die cDNA des zu exprimierenden Transgens, die FRT-Seite und zuletzt die pA-Kassette in den pBS eingefügt. Zusätzlich wurde noch am Ende des Homologiearms B eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym PmeI eingefügt, die später zur Identifikation von positiven Klonen genutzt wurde. Außerdem wurde eine weitere diagnostische Afel-Restriktionsschnittstelle in die cDNA des GlyT2 durch Mutagenese eingeführt.

2.3.8.2 Subklonierung in den Shuttle Vektor

Anschließend wurde die Kassette über zwei Sall-Restriktionsseiten in den Shuttle Vektor pSV1.recA kloniert. Dieser Vektor kodiert für das RecA (recombination A) Protein, das eine homologe Rekombination erlaubt. Durch Mutationen im Replikationsursprung wird der Vektor bei Temperaturen über 30°C replikationsinkompetent. Dieses ermöglicht die Expression des RecA-Protein in einem definierten Zeitraum.

2.3.8.2.1 Präparation des pSV1.recA-Vektors

Der Tetracyclin-resistente pSV1.recA wurde in chemisch kompetente DH5 α -Zellen transformiert und bei 30°C auf einer Tetracyclin-Agarplatte wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde zunächst eine Präkultur angeimpft und dann ü. N. in einer 500 ml Kultur bei 30°C inkubiert. Das große Kulturvolumen wurde benötigt, da der pSV1.recA nur eine geringe Anzahl an Plasmiden pro Bakterienzelle produziert (6-8 Kopien/Zelle). Das Plasmid wurde mit alkalischer Lyse (siehe 2.3.1.4) aus der Bakterienkultur aufgereinigt. Normalerweise wurden zwischen 2-10 μ g DNA aus dieser Kultur erhalten.

2.3.8.2 Subklonierung in den pSV1.recA

Der pSV1.recA-Vektor und die Konstruktionsvektoren wurden mit Sall linearisiert:

- 1-2 μg pSV1.recA
- 5 μl 10x Puffer H (Boehringer)
- 5 μl Sall (Boehringer)
- x μl H₂O (bis zu einem Volumen von 50 μl)

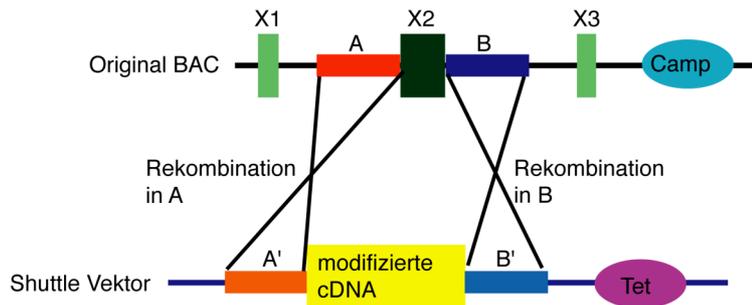
Der Verdau wurde ü. N. bei 37°C ausgeführt, am nächsten Morgen nochmals 2 μl Sall hinzugefügt und für weitere 2 Std. inkubiert. Dann wurde der Vektor mit 2 μl CIP (1U/ μl) für weitere 30 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die CIP durch 5 μl 50 mM EDTA und 10 Min. bei 70°C inaktiviert. Der geschnittene Vektor und die Konstruktionsvektoren wurden auf einem 1%igen Low-melting Agarosegel (Invitrogen) bei 75 V für 8 Std. aufgetrennt. Die entsprechenden Banden wurden isoliert und über das Qiagen Gelpurification Kit aufgereinigt (siehe 2.3.3.13). Für die anschließende Ligation wurden 50 ng Vektor und 100-200 ng Insert eingesetzt und nach dem Standardprotokoll ü. N. bei 16°C legiert (siehe 2.3.3.9). Die Ligase wurde 10 Min. bei 70°C deaktiviert und 10 μl des Ansatzes in DH5 α -chemokompetente Zellen transformiert (siehe 2.3.3.11.2). Die Platten wurden ü. N. bei 30°C inkubiert. Positive Kolonien wurden zunächst durch eine Kolonie-PCR (siehe 2.3.3.3) überprüft und anschließend ein Miniprep mittels alkalischer Lyse für Low-copy-Plasmide (siehe 2.3.1.2) aufgereinigt. Die DNA wurde in 35 μl H₂O aufgenommen, mit einem geeigneten Restriktionsenzym verdaut und einer Southern Blot-Analyse unterzogen (siehe 2.3.3.15).

2.3.8.3 Modifizierung des BAC-Klons durch zweifache homologe Rekombination

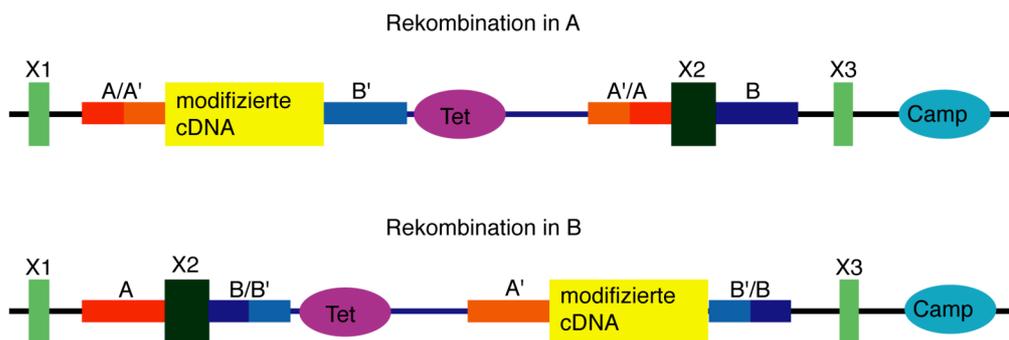
Die Modifikation des BAC-Klons wurde in zwei Schritten ausgeführt. Zuerst wurden der BAC-Klon und der Shuttle Vektor, der die modifizierte GlyT-cDNA enthielt, kotransformiert. Teilweise kam es durch homologe Rekombinationsereignisse zu einer Integration des Shuttle Vektors in die BAC-DNA. Anschließend erfolgte unter Bedingungen, die eine zweites homologes Rekombinationsereignis zulassen, teilweise zu einer Deintegration des Shuttle Vektors ohne die modifizierte cDNA (Abbildung 2-3). Der Shuttle Vektor exprimiert das RecA-Protein. Durch die Präsenz des RecA-Proteins kann es zwischen dem wt BAC-Klon und der Shuttle Vektor zu homologen Rekombinationsereignissen kommen, die zu gleichen Wahrscheinlichkeiten in einem der beiden Homologiearmen stattfinden. Es wurde auf den Verlust der Temperatur-Sensitivität durch den Shuttle Vektor selektiert. Nur im Falle eines Integrations-ereignisses liegen die Resistenzgene auf dem BAC-Klon. Anschließend

wurden Bedingungen gewählt, die ein zweites Rekombinationsereignis zulassen. Es gibt erneut zwei Möglichkeiten: findet die Rekombination in derselben Homologieregion statt, wie in der ersten, so revertiert der BAC wieder zum Original BAC-Klon. Nur wenn sich die Rekombination in der jeweils anderen Homologieregion innerhalb eines BAC-Klons ereignet, wird das gewünschte Produkt, der modifizierte BAC-Klon erhalten. Dieses Produkt kann durch den Verlust der Tetracyclin-Resistenz identifiziert werden (Abbildung 2-3).

A Kotransfektion



B Integrat



C modifizierter BAC

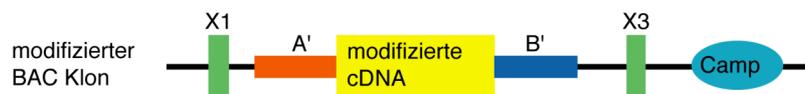


Abbildung 2-3: Strategie der zweifachen Rekombination. **A**, durch die Präsenz des RecA-Proteins, kann es zwischen dem Original BAC-Klon und dem Shuttle Vektor zu homologen Rekombinationsereignissen in den beiden Homologieregionen (schmale Boxen: A oder B) kommen. **B**, die beiden möglichen Rekombinationsereignisse sind dargestellt. **C**, es werden Bedingungen gewählt, die ein zweites Rekombinationsereignis zulassen, und es wird auf die Desintegration des Shuttle Vektors selektiert, so dass der modifizierte BAC entsteht. Camp, Chloramphenicol-Resistenz; Tet, Tetracyclin-Resistenz; X, Exon.

2.3.8.3.1 Darstellung BAC-kompetenter Zellen

Die chemokompetenten BAC-Zellen wurden nach Inoue *et al.* (1990) hergestellt. Eine 3 ml Kultur einer BAC-Kolonie wurde in LB-Chloramphenicol angeimpft und ü. N. bei 37°C unter starkem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden 0,5 ml dieser

Kultur zu 50 ml LB-Chloramphenicol gegeben und bis zu einer OD_{600} von 0,6 bei 37°C geschüttelt. Die Kultur wurde 10 Min. auf Eis gekühlt, in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 10 Min. bei 1000 x *g* und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde anschließend in 16 ml vorgekühltem TB resuspendiert und 10 Min. auf Eis gestellt. Es erfolgte eine Zentrifugation unter den oben genannten Bedingungen. Das Pellet wurde in 4 ml TB + 7% (v/v) DMSO resuspendiert und weitere 10 Min. auf Eis inkubiert. Jeweils 500 µl wurden in Eppendorfreaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -80°C gelagert.

TB:

10 mM PIPES

55 mM $MnCl_2$

15 mM $CaCl_2$

250 mM KCl

Alle Komponenten bis auf das $MnCl_2$ wurden gemischt und der pH-Wert mit KOH auf einen pH-Wert von 6.7 eingestellt. Anschließend wurde das $MnCl_2$ hinzugefügt und die Lösung sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

2.3.8.3.2 Kotransformation und Identifikation des Integrats

Die in Abschnitt 2.3.8.2 hergestellten Shuttle Vektoren mit den jeweiligen insertierten Sequenzen wurden im Folgenden in BAC-chemokompetente Zellen kotransformiert. Die Präsenz des RecA-Proteins des Shuttle Vektors erhöht die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination, die zwischen 10-50 Prozent liegt (siehe Abbildung 2-3 A und B).

Für die Kotransformation wurden 7 µl des Minipreps (siehe 2.3.8.2.2) in 200 µl BAC-chemokompetente Zellen pipetiert und 30 Min. auf Eis und 45 Sek. bei 42°C inkubiert. Es wurden 750 µl LB-Medium hinzugegeben und 1 Std. bei 30°C geschüttelt. Der Ansatz wurde auf einer LB-Tetracyclin/Chloramphenicol-Platte ausplattiert und bei 30°C ü. N. inkubiert. Zwischen 6 bis 12 Einzelkolonien wurden in 800 µl LB resuspendiert und jeweils 100 µl auf zwei unterschiedliche LB-Tetracyclin/Chloramphenicol-Platten ausgestrichen. Eine dieser Platten wurde bei 43°C inkubiert, die andere bei 30°C, die als Wachstumskontrolle diente. Auf der 43°C Platte können nur Kolonien wachsen, die sowohl den BAC-Klon als auch den Shuttle Vektor integriert haben, da der temperaturempfindlich Shuttle Vektor bei Temperaturen über 30°C replikationsinkompetent ist. Die Kolonien der 43°C-Platte wurden zunächst über PCR und anschließend über Southern Blot-Analyse auf homologe Rekombinationsereignisse überprüft. Hierfür wurden 20-40 Einzelkolonien der 43°C Platte auf eine LB-Tetracyclin/Chloramphenicol-Platte umgepickt und die Klone einer Kolonie-PCR-Analyse (siehe 2.3.3.3) unterzogen. Hierfür wurden Primer

verwendet, die einerseits in der BAC- andererseits in der Konstruktsequenz lagen. Von PCR positiven Klonen wurde eine 3 ml Minikultur angeimpft und bei 43°C ü. N. inkubiert. 2 ml dieser Kultur wurden durch alkalische Lyse mit anschließender Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt und in 40 µl TE aufgenommen, aus dem verbleibenden Rest wurde ein Glycerolstock angefertigt. 13 µl der aufgereinigten DNA (zwischen 50-150 pmol DNA) wurden mit einem geeigneten Enzym (50 U/µl) ü. N. bei geeigneter Temperatur verdaut und anschließend auf einem 1%igen Agarosegel bei 80 V für 4-6 Std. aufgetrennt. Das Gel wurde geblottet und einer Southern Blot-Analyse unterzogen (siehe 2.3.3.15).

2.3.8.4 Deintegration des Shuttle Vektors durch homologe Rekombination

Positive Klone wurden auf einer Chloramphenicol-Platte ausgestrichen und bei 43°C inkubiert. In diesem Selektionsschritt verlieren einige Kolonien die Tetracyclin-Resistenz, entweder durch eine homologe Rekombination in der gleichen Homologieregion wie in Abschnitt 2.3.8.3.2, was zu einem Original BAC führt, oder durch eine homologe Rekombination in der anderen Homologieregion, was zu der gewünschten Insertion des Transgens führt (siehe Abbildung 2-3 C). Um auf den Verlust der Tetracyclin-Resistenz zu selektieren, wurden 16-32 Einzelkolonien auf TB-Platten, die Fusarin-Säure enthielten, ausgestrichen und 2-3 Tage auf diesen Platten bei 37°C inkubiert. Tetracyclin-resistente Kolonien können in der Anwesenheit von Fusarin-Säure nicht wachsen, da sie auf lipophile Agenzien hypersensitiv reagieren. Anschließend wurden bis zu 60 Klone mit einer Kolonie-PCR analysiert. Zusätzlich wurden die Klone jeweils auf einer Chloramphenicol-Platte und auf einer Tetracyclin-Platte ausgestrichen. Von Klonen, die ausschließlich auf der Chloramphenicol-Platte wuchsen und PCR-positiv waren, wurde eine 3 ml Kultur angeimpft, die bei 37°C ü. N. inkubiert wurde. Von den Kulturen wurde ein Glycerol-Stock angelegt und 2 ml mit alkalischer Lyse und anschließender Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Korrekte Integrationsereignisse wurden mittels Southern Blot-Analyse ermittelt.

TB-Agar (1L)

1 L Leitungswasser (nicht destilliert)

5 g Trypton

0,5 g Hefeextrakt

0,5 g Glukose

4 g NaCl

0,25 ml 0,1 M ZnCl₂

25,2 mg Chlorotetracyclin

7,5 g Agar

Die Lösung wurde autoklaviert und auf 60°C abgekühlt. Dann wurden folgende Substanzen hinzugefügt.

36 ml 1 M NaH₂PO₄
3 ml 2g/ml Fusarin-Säure
0,5 ml 12,5 mg/ml Chloramphenicol

2.3.8.5 Aufreinigung der DNA und Pronukleusinjektion

BAC-Klone mit korrektem Transgen wurden über einen CsCl-Gradienten aufgereinigt (siehe 2.3.1.5). 10-50 µg BAC-DNA wurden unter folgenden Bedingungen linearisiert:

10-50 µg BAC-DNA
50 µl 10 x Restriktionspuffer H
12,5 µl 100 mM Spermidine
20 µl NotI (10 U/µl)
ad 500 µl H₂O

Der Restriktionsverdau erfolgte ü. N. bei 37°C. Am nächsten Tag wurden Sepharosesäulen mit 5 ml Sepharose CL 4b (Sigma) vorbereitet. Es wurden 10 ml Injektionspuffer auf die Säule hinzugefügt. Es wurde darauf geachtet, dass eine gleichmäßige Schichtung der Säule erfolgte. Anschließend wurde die Säule mit 20 ml Injektionspuffer gewaschen. Zwischenzeitlich wurde zu dem Restriktionsverdau 5 µl 10x DNA-Ladepuffer gegeben. Nachdem der Injektionspuffer des Waschschriffes fast vollständig durch die Säule gelaufen war, wurde der Restriktionsverdau auf die Säule gegeben. Es folgte eine weitere Zugabe von 500 µl Injektionspuffer, sobald die DNA-Lösung in das Säulenmaterial eingewandert war. Anschließend wurden weitere 10 ml Injektionspuffer hinzugegeben. Nun wurde mit der Kollektion von 12 etwa 500 µl Fraktionen begonnen. Der DNA-Gehalt dieser Fraktionen wurde photometrisch bestimmt und anschließend 25 µl der DNA-Fraktionen mit hohem DNA-Gehalt auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Fraktion, die hier die höchste DNA-Qualität aufwies, d. h. insbesondere wenig Degradation zeigte, wurde für die Pronukleus-injektion in die Einzellzygote verwendet. Die Injektionen wurden von F. Zimmermann am ZMBH in Heidelberg ausgeführt. Die Zygoten wurden in scheinchwangere Mausweibchen eingesetzt. Die Nachkommen wurden sowohl durch Genotypisierungs-PCRs als auch durch Southern Blot-Analyse auf die Insertion des Transgens untersucht.

Injektionspuffer

0,1 mM EDTA
100 mM NaCl
10 mM Tris/Cl, pH 7.4

3 ERGEBNISSE

In dieser Dissertation sollte untersucht werden, ob das PDZ-Domänenbindungsmotiv (PDZ-DBM) bzw. die lange N-terminale Domäne für die Lokalisation und/oder die Regulationsmechanismen des GlyT2 eine Rolle spielen. Zu diesem Zweck wurden Deletionsmutanten sowohl des PDZ-DBMs als auch der N-terminalen Domäne generiert. Die Folgen der Mutationen wurden sowohl biochemisch als auch zellbiologisch untersucht. Schließlich wurden zur weiteren Analyse des GlyT2-N-Terminus zusätzlich BAC-transgene GlyT2-enthaltende Expressionsvektoren hergestellt, die Deletionen in der N-terminalen Domäne der GlyT2 cDNA-Sequenz trugen bzw. die Cre-Rekombinase exprimierten.

In einem Teilprojekt dieser Dissertation wurde zusätzlich der Einfluss der α -UE des GlyRs auf den Phänotyp in GlyT2-defizienten Mäusen untersucht.

3.1 C-terminale Mutanten

Am C-terminalen Ende des GlyT2 befindet sich ein PDZ-DBM, das mit Proteinen, die eine PDZ-Domäne enthalten, interagieren kann. Diese Bindung wird von den letzten drei Aminosäuren eines Proteins vermittelt (Doyle *et al.*, 1996). Es hat sich gezeigt, dass PDZ-Domänen vermittelte Interaktionen in diverse zelluläre Prozesse involviert sein können, zu denen u. a. die Lokalisation von Zielproteinen in der Plasmamembran oder in subzellulären Kompartimenten, sowie Assemblierungsprozesse, gehören können (Kim und Sheng, 2004). Das PDZ-DBM des GlyT2 „TQC“ hat ein Cystein am C-terminalen Ende, während in den meisten PDZ-DBMs ein Serin oder Threonin an dieser Stelle vorkommt (Bezprozvanny und Maximov, 2001). In der Literatur sind jedoch weitere PDZ-DBM mit einem Cystein an der Position 0 beschrieben (Borrell-Pages *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss eine Inaktivierung des PDZ-DBMs auf die Proteinexpression, Lokalisation oder Funktion des GlyT2 hat. Hierfür wurden zwei PDZ-DBM-Mutanten durch Klonierung hergestellt; zum einen wurde das Motiv deletiert (mGlyT2 Δ TQC), zum anderen wurde es durch Anhängen eines Alanins am C-terminalen Ende (mGlyT2 +A) inaktiviert. Das Anhängen einer zusätzlichen Aminosäure am C-terminalen Ende verändert die Position des PDZ-DBMs von 0 auf -1 und verhindert so die Interaktion mit PDZ-Domänen Proteinen (Bjerggaard *et al.*, 2004), während die Aminosäuresequenz nicht verändert wird. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass mögliche weitere Funktionen der C-terminalen Sequenz, die nicht mit dem PDZ-DBM in Verbindung stehen, nicht beeinträchtigt werden, beispielsweise die Fähigkeit von Proteinen, mit weiter N-terminal gelegenen Motiven zu interagieren (Bauman und Blakely, 2002; Bjerggaard *et al.*, 2004).

3.1.1 Klonierung von Maus-GlyT2 wt cDNA

Es wurde Gesamt-RNA vom Rückenmark einer Maus gewonnen und diese mit Hilfe von spezifischen Primern in cDNA transkribiert. Die mGlyT2 cDNA wurde dann mit Hilfe der sequenzspezifischen Primer WA-423 und WA-503 in einer PCR-Reaktion amplifiziert, isoliert und über Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) kloniert (Abbildung 3-1 A). Mittels PCR wurden aus dem mGlyT2 wt zwei weitere Konstrukte kloniert. In einem wurde durch Primermutagenese ein zusätzliches Alanin „+A“ am C-terminalen Ende eingeführt, im anderen die letzten drei Aminosäuren „TQC“ deletiert. Alle klonierten mGlyT2 cDNAs wurden mittels Sequenzanalyse auf ihre Richtigkeit und Vollständigkeit überprüft.

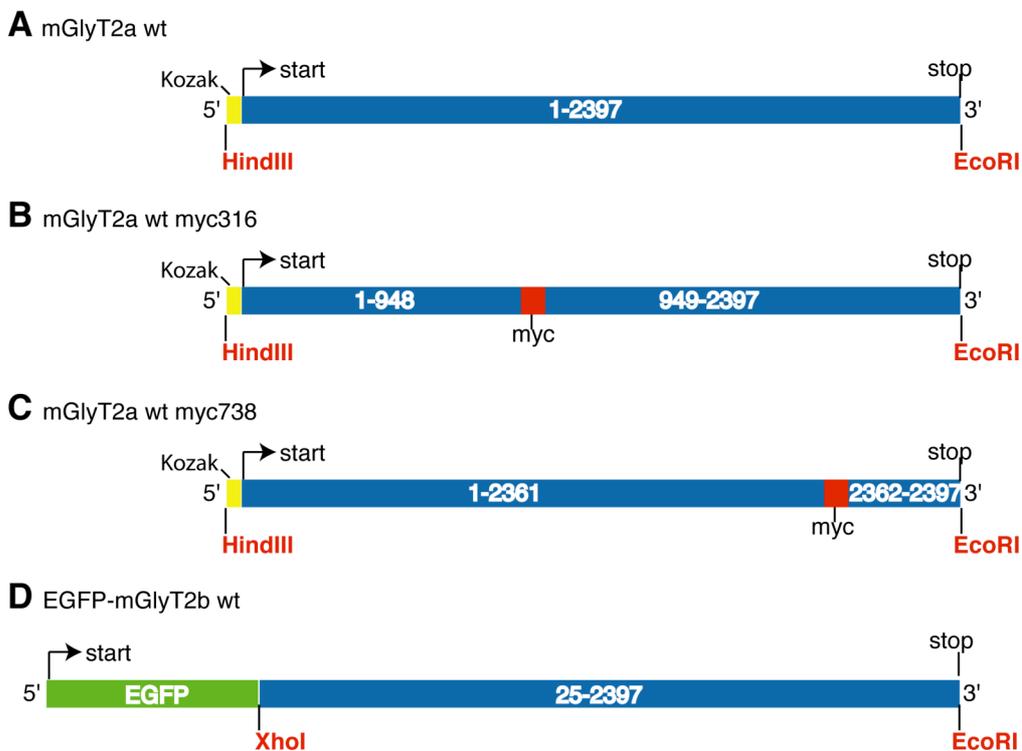


Abbildung 3-1: Klonierungsstrategie des mGlyT2 wt. **A**, Klonierungsstrategie der mGlyT2-Mutanten mit den verwendeten Restriktionsschnittstellen (rot). Zur verbesserten Expression wurde eine Kozak-Sequenz (gelb) am 3'-Ende eingefügt. Als Expressionsvektor wurde der pcDNA3.1(+) verwendet. **B** und **C**, analoge Klonierung der myc316 und myc738-Mutanten in den pcDNA3.1(+). **D**, Klonierung der EGFP-markierten GlyT2-Konstrukte. Die cDNA wurde in den Expressionsvektor pEGFP-C3 kloniert.

Analog zu den unmarkierten wurden Epitop-tragende Konstrukte kloniert, bestehend aus GlyT2 wt, GlyT2 +A und GlyT2 Δ TQC, die myc-Markierungen entweder in den EL2 oder in der C-terminale Domäne trugen (Abbildung 3-1 B und C). Diese myc-Insertionen wurden mittels Primermutagenese an den entsprechenden Stellen der cDNAs eingefügt. Als weitere Markierungsmöglichkeit wurde am 5'-Ende eine EGFP-Markierung angehängt. Für diese Konstrukte wurde das Start-ATG der GlyT2-Sequenz deletiert (Abbildung 3-1 D), so dass der GlyT2 nur als Fusionsprotein exprimiert wurde. Die Tabelle 3-1 gibt eine Übersicht über die unterschiedlichen

GlyT2-cDNAs, die Vektoren, in die sie kloniert wurden, sowie über die verwendeten Schnittstellen. Die Funktionalität dieser Konstrukte wurde im Folgenden mit biochemischen und pharmakologischen Methoden untersucht. Da für den GlyT2 drei verschiedene Isoformen beschrieben worden sind, von denen sich der GlyT2a in acht zusätzlichen Aminosäuren am extremen N-Terminus von den GlyT2b- und c-Isoformen unterscheidet (Ebihara *et al.*, 2004), wurden ebenfalls die mGlyT2a-Isoformen kloniert. Die zusätzlichen acht Aminosäuren hatten in allen durchgeführten Experimenten keinen Einfluss auf die Ergebnisse. Die mGlyT2a-Proteine konnten somit äquivalent zu den mGlyT2b-Konstrukten verwendet werden. Im Folgenden wird deshalb auf die Isoformbezeichnung verzichtet.

Tabelle 3-1: Übersicht über alle hergestellten C-terminalen Konstrukte.

Name	Vektor	3'-Schnittstelle	5'-Schnittstelle
mGlyT2a wt mGlyT2a +A mGlyT2a Δ TQC	pcDNA3.1 (+)	HindIII	EcoRI
mGlyT2b wt mGlyT2b +A mGlyT2b Δ TQC	pcDNA3.1 (+)	HindIII	EcoRI
mGlyT2b wt myc316 (myc in EL2) mGlyT2b +A myc316 mGlyT2b Δ TQC myc316	pcDNA3.1 (+)	HindIII	EcoRI
mGlyT2b wt myc738 (myc in C-term.) mGlyT2b +A myc738 mGlyT2b Δ TQC myc738	pcDNA3.1 (+)	HindIII	EcoRI
EGFP-mGlyT2b wt EGFP-mGlyT2b +A EGFP-mGlyT2b Δ TQC	pEGFP-C3	XhoI	EcoRI

3.1.2 Analyse der unmarkierten und EGFP-markierten Mutanten

3.1.2.1 Proteinexpression und Glykosylierung der GlyT2 PDZ-DBM-Mutanten

Die einzelnen C-terminalen Mutanten wurden im Western Blot analysiert, um festzustellen, ob die cDNAs in ein vollständiges Protein translatiert wurden. In der Literatur ist für den Ratten-GlyT2a ein Molekulargewicht von etwa 100 kDa beschrieben (Lopez-Corcuera *et al.*, 1991). Zur Analyse des endogenen mGlyT2-Proteins wurde eine Gesamtmembranpräparation (P2-Pellet) aus dem Rückenmark herangezogen (zur Verfügung gestellt von Dr. Petra Scholze) (Abbildung 3-2 A). Zwei spezifische Banden bei 100 und 70 kDa wurden nachgewiesen. Anschließend wurden mit GlyT2-Konstrukten transfizierte HEKT-Zelllysate analysiert (Abbildung 3-2 A). In allen mGlyT2-Lysaten, sowohl mit wt als auch den PDZ-DBM-Mutanten, war neben einer 100 kDa Bande auch eine 70 kDa Bande, sowie bei Überexpression eine zusätzliche 64 kDa Bande, vorhanden (Abbildung 3-2 B). Eine Bande bei 128 kDa trat bei hoher Überexpression auf. Hierbei handelte es sich möglicherweise um

Aggregate, z. B. ein Dimer aus den 64 oder 70 kDa Banden. Die Analyse der EGFP-markierten Proteine ergab ein entsprechendes Bild (Daten nicht gezeigt).

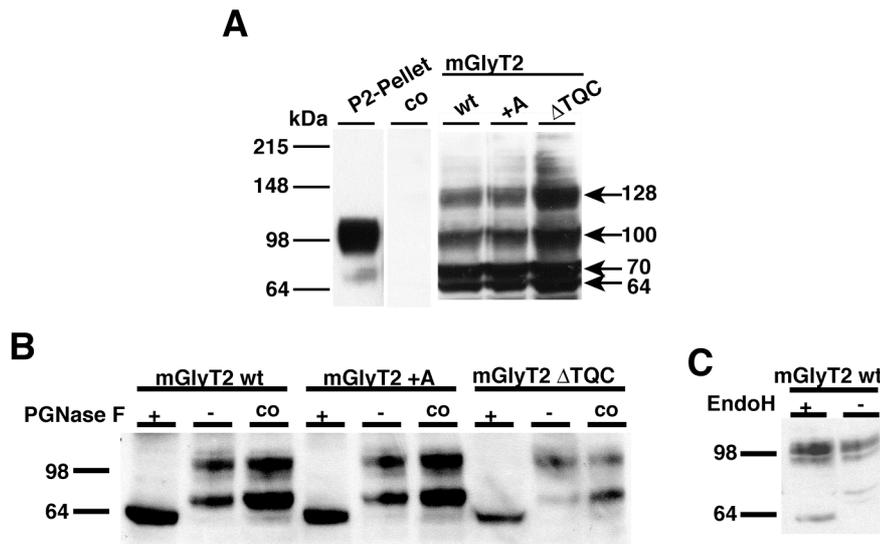


Abbildung 3-2: Western Blot-Analyse der C-terminalen PDZ-DBM-Mutanten. **A**, Rückenmarks-Membranpräparation (P2-Pellet, 20 μ g), untransfizierte (co) und mit mGlyT2 wt, +A oder Δ TQC transfizierte HEKT-Zellen (30 μ g Gesamtproteinlysat). Die Zellen wurden 48 Std. nach der Transfektion lysiert und mittels SDS-PAGE analysiert. 25 μ g der transfizierten Gesamtzelllysate (+) wurden für 90 Min. entweder mit PGNaseF (**B**) oder mit EndoH (**C**) behandelt. Die (+)-Probe und die (-)-Probe wurden 90 Min. bei 37°C inkubiert, während die Kontrolle (co) bei 4°C ohne Enzym aufbewahrt wurde. Alle Western Blots wurden mit einem N-terminalen GlyT2-Erst- und einem Kaninchen-HRP-Zweitantikörper nachgewiesen.

Die Banden, die in den Zelllysaten ermittelt werden konnten, wurden in einer Deglykosylierungsanalyse näher charakterisiert. Hierfür wurden Lysate transfizierter HEKT-Zellen mit PGNaseF inkubiert und anschließend einer Western Blot-Analyse unterzogen. PGNaseF entfernt alle N- und O-gebundenen Glykosylreste, die in Proteinen an Asparagin- oder Lysinreste gekoppelt werden. Der GlyT2 enthält vier solcher Reste im EL2 (Nunez und Aragon, 1994). Falls es sich bei den höher molekularen Banden von 70 und 100 kDa um glykosylierte Banden handelt, sollten diese durch die Behandlung mit PGNaseF zu einer Bande geringerer Masse reduziert werden. In Abbildung 3-2 B sind jeweils drei Spalten für jedes Konstrukt zu sehen. In den ersten beiden, wurde das Lysat mit (+) bzw. ohne (-) Zusatz von PGNaseF für 90 Min. bei 37°C inkubiert. In der dritten Spalte wurde dem Ansatz kein Enzym zugesetzt und die Probe bei 4°C aufbewahrt (co), um den ursprünglichen Zustand des Lysates zu dokumentieren. Das Experiment wurde analog für die beiden PDZ-DBM-Mutanten durchgeführt. Nach PGNaseF-Behandlung (+) war eine Reduktion der 100 und 70 kDa Bande zur einer 64 kDa Banden bei allen Konstrukten zu beobachten. Die Banden mit Molmassen größer als 64 kDa entsprachen demnach glykosylierten Formen des Transporters, die sich im Glykosylierungsgrad zwischen den Mutanten und dem mGlyT2 wt nicht unterschieden.

Die Glykosylierungen des mGlyT2 wt wurden in Abbildung 3-2 C weiter untersucht, indem das Lysat mit EndoH inkubiert wurde. Dieses Enzym entfernt ausschließlich

hochmolekulare N-gekoppelte Mannosereste, die sog. *core*-Glykosylierung (Maley *et al.*, 1989). Komplex glykosylierte Reste werden hingegen durch EndoH nicht entfernt. Nur die 70 kDa Bande des mGlyT2 wt wurde durch EndoH zur 64 kDa Bande reduziert, während die 100 kDa Bande unverändert blieb. Somit trägt die 70 kDa Bande nur eine *core*-Glykosylierung.

3.1.2.2 Analyse des Oberflächenproteins

Das Auftreten der 100 kDa Bande (der komplex glykosylierten Form) bei allen verwendeten GlyT2-Konstrukten weist darauf hin, dass der Transporter im Golgi-Apparat korrekt prozessiert wird, stellt aber keinen Beleg für die Plasmamembranlokalisierung dieser Proteine dar. Um den Plasmamembrananteil der einzelnen Konstrukte quantitativ zu bestimmen, wurde eine Oberflächenbiotinylierung durchgeführt. Die einzelnen mGlyT2-Lysate wurden einer Western Blot-Analyse unterzogen (Abbildung 3-3). Hierzu wurden HEKT-Zellen transfiziert und nach 48 Std. vor der Zellyse mit einem spaltbaren Biotin biotinyliert, so dass nur Proteine an der Zelloberfläche für das nicht-membrangängige Biotin zur Verfügung standen. Nach der Aufreinigung wurde ein Lysat-Aliquot mit an Agarose-konjugiertem Streptavidin inkubiert, an das nur die biotinylierten Plasmamembranproteine binden konnten. Der Überstand, in dem nur die intrazellulären nicht-biotinylierten Proteine vorkommen, wurde durch Zentrifugation von den Agarosekügelchen getrennt. Die biotinylierten Plasmamembranproteine im Pellet wurden von den Streptavidin-Agarosekügelchen unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen eluiert und der Überstand ebenfalls auf ein Gel aufgetragen.

Gezeigt wird hier eine Oberflächenbiotinylierung des EGFP-markierten GlyT2-Proteins. Es ist zu erwähnen, dass die unmarkierten GlyT2-Konstrukte ebenfalls analysiert wurden und weder qualitativ noch quantitativ einen Unterschied zu den EGFP-markierten Proteinen aufwiesen. Als Kontrolle für die eingesetzte GlyT2-Menge wurde ein Aliquot Gesamtlisat verwendet, in dem die biotinylierten Oberflächenproteine nicht von den intrazellulären getrennt wurden (Abbildung 3-3 A). In den Lysaten A waren sowohl *core*-glykosylierte mGlyT2 bei ca. 100 kDa als auch die komplex glykosylierten Proteine bei 130 kDa vorhanden. Die höheren Molekulargewichte ergaben sich aus der zusätzlichen EGFP-Markierung von 30 kDa (30 kDa EGFP + 70 kDa GlyT2 bzw. 30 kDa EGFP + 100 kDa GlyT2) am N-Terminus des GlyT2. Nach der Aufreinigung von den Agarosebeads ist die 130 kDa Bande des wt-Konstrukts sowie der Mutanten +A und Δ TQC nur noch schwach detektierbar, während die Intensität der 100 kDa Bande unverändert blieb (Abbildung 3-3 B). In der Plasmamembranfraktion konnte ausschließlich der komplex glykosylierte EGFP-mGlyT2 (130 kDa) detektiert werden (Abbildung 3-3 C). Der Anteil an Plasmamembran-GlyT2 war im Vergleich zur Gesamtexpression beim wt und den beiden Mutanten vergleichbar. Folglich wird nur der komplex glykosylierte GlyT2 in

die Plasmamembran lokalisiert, während die *core*-glykosylierten GlyT2s intrazellulär verbleibt. Das PDZ-DBM ist in diese Sortierungsprozesse nicht involviert.

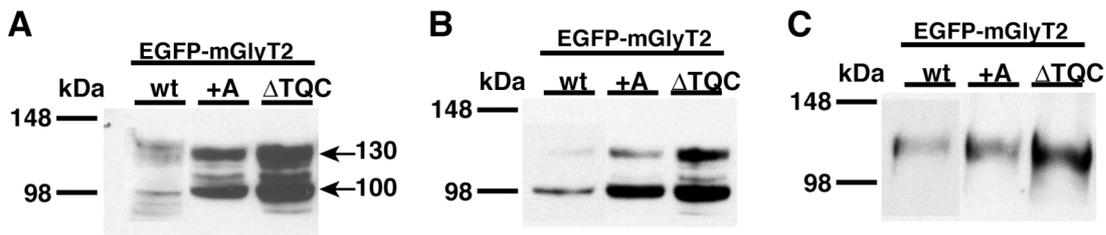


Abbildung 3-3: Oberflächenbiotinylierung des EGFP-mGlyT2. HEKT-Zellen wurden mit EGFP-mGlyT2 wt transfiziert und nach 48 Std. für 30 Min. bei 4°C biotinyliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert. 30 µg Protein wurden entnommen und als Gesamtlysate aufgetragen (A). Weitere 100 µg Protein wurden 3 Std. bei 4°C mit Streptavidin-Agarosekügelchen inkubiert und anschließend 30 µg des ungebundenen Überstandes (B) vom Pellet (C) getrennt. Die gebundenen Oberflächenproteine wurden von den Agarosekügelchen eluiert. Alle Fraktionen wurden einer SDS-PAGE und Western Blot-Analyse mit einem EGFP-Erstantikörper (Chemicon) und einem Maus-HRP-Zweitantikörper nachgewiesen.

3.1.2.3 Lokalisationsanalyse der mGlyT2-PDZ-DBM-Mutanten

Um eine qualitative Analyse der subzellulären Lokalisation der verwendeten GlyT2-Proteine durchzuführen, wurden Immunfärbungen von transfizierten Zellen angefertigt. Hierfür wurden verschiedene Zelllinien, HEKT, MDCK oder COS-7, mit den entsprechenden cDNAs transfiziert. Da PDZ-DBM anderer Proteine eine Rolle für deren Lokalisation spielen, wurde die subzelluläre Lokalisation insbesondere nach der Inaktivierung des Motivs in Immunfärbungen untersucht. Die Abbildung 3-4 zeigt die Immunfärbungen von mGlyT2 wt, +A und ΔTQC in HEKT-Zellen. Das jeweils größere Bild zeigt die Aufsicht (xyz-Achse) der Zelle, während im unteren, kleineren Bild die Seitenansicht (xzy-Achse) derselben Zelle dargestellt ist. Der mGlyT2 wt wies nur wenig intrazelluläre Färbung auf, während der Hauptteil des immunreaktiven Proteins an der Zellmembran lokalisiert war. Das endoplasmatische Retikulum (ER) wurde durch den pdsRed2-ER Vektor markiert. In diesem Vektor ist an das 5'-Ende vom dsRed das ER-Retentionssignal des Calretinins und am 3'-Ende die ER-Zielsequenz „KDEL“ fusioniert. Der ER-Marker kolokalisierte nicht mit dem mGlyT2 wt-Protein. Ebenso waren die Mutanten +A und ΔTQC in der Plasmamembran zu finden und zeigten keine Kolokalisation mit dem ER-Marker. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der mGlyT2 wt, und die beiden PDZ-DBM-Mutanten effizient in die Zellmembran eingebaut werden.

Die subzelluläre Verteilung der EGFP-markierten mGlyT2s (siehe Abbildung 3-5) unterschied sich nicht von der unmarkierten GlyTs. EGFP allein war diffus im Zytoplasma verteilt und akkumulierte im Zellkern. Durch die diffuse Verteilung im

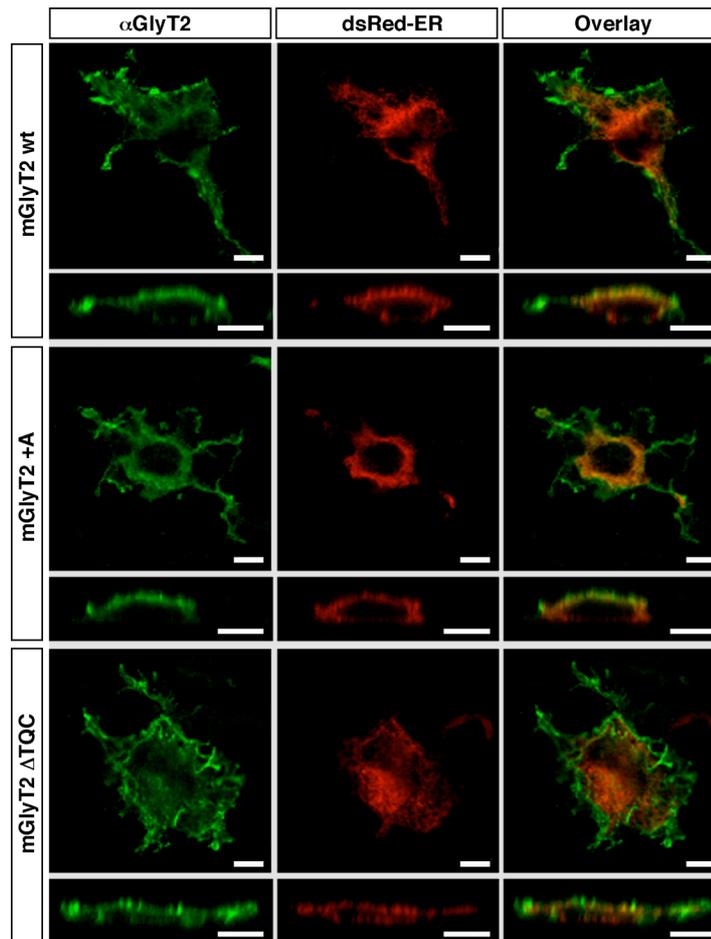


Abbildung 3-4: Lokalisation vom mGlyT2 wt, +A und Δ TQC in HEKT-Zellen. Die Zellen wurden 48 Std. vor der Färbung mit dem jeweiligen mGlyT2 und einem dsRedER-Marker kotransfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit einem N-terminalen GlyT2-Antikörper und einem Kaninchen-Alexa488-Zweitantikörper angefärbt. Längenstandard, 8 μ m.

Zytoplasma kam es zu einer apparenten Kolokalisation mit dem ER-Marker (Abbildung 3-5 A). Die mGlyT2-Konstrukte hingegen befanden sich fast ausschließlich an der Plasmamembran. Eine schwache Kolokalisation mit dem ER-Marker war ausschließlich bei hoher Überexpression des GlyT2 zu beobachten. Dieses Phänomen tritt bei der temporären Überexpression von Proteinen häufig auf und repräsentiert Proteine, die aufgrund der starken Expression nicht oder noch nicht die Zelloberfläche erreicht haben. Auch hier ließ sich weder ein Unterschied der +A- noch der Δ TQC-Mutante zum wt-Fusionsprotein erkennen. In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die nachgewiesene EGFP-Färbung ausschließlich von GlyT2-Fusionsproteinen stammte und nicht von proteolytisch generiertem EGFP. Hierfür wurden die transfizierten HEKT-Zellen mit einem GlyT2-spezifischen Antikörper gefärbt (Abbildung 3-5 B). Kontrollzellen, die ausschließlich mit EGFP transfiziert wurden, konnten mit dem GlyT2-Antikörper nicht gefärbt werden, während der mGlyT2 wt und die beiden Mutanten eine perfekte Kolokalisation der EGFP-Färbung mit der GlyT2-Immunfluoreszenz zeigten. Folglich kann die EGFP-

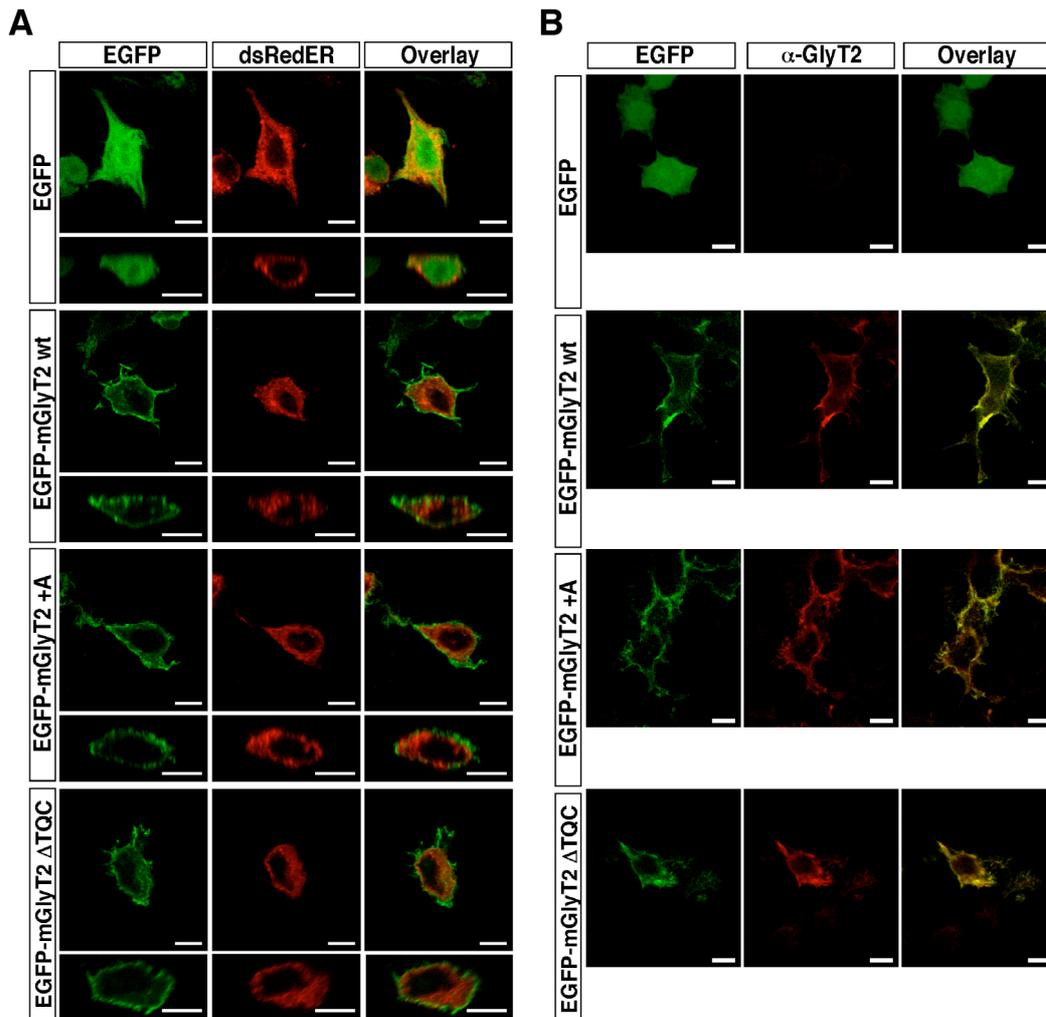


Abbildung 3-5: Lokalisation von EGFP-mGlyT2 wt, +A und Δ TQC in HEKT-Zellen. **A**, die Zellen wurden 48 Std. vor der Färbung mit dem jeweiligen mGlyT2 und einem dsRedER-Marker kotransfiziert. **B**, die transfizierten HEKT-Zellen wurden mit einem N-terminalen GlyT2-spezifischen Antikörper und mit einem Kaninchen-Alexa546-Zweitantikörper detektiert. Längenstandard, 8 μ m.

Fluoreszenz in mit EGFP-GlyT2-Konstrukten transfizierten Zellen ausschließlich dem Fusionsprotein zugeordnet werden.

Die Lokalisation der einzelnen Mutanten und des GlyT2 wt wurde zusätzlich in MDCK-Zellen getestet. MDCK-Zellen sind eine aus Epithelzellen generierte Zelllinie, welche die für diese Zellen typische Eigenschaften z. T. behalten hat. In konfluenter Kultur bilden MDCK-Zellen zwei unterschiedliche Membrankompartimente aus: ein oberes (apikales) und eine unteres und seitliches (basolaterales) Kompartiment (Klebe *et al.*, 1995). Es hat sich gezeigt, dass Proteine, die an der basolateralen Oberfläche dieser Zellen lokalisiert sind, in Neuronen meistens in Dendriten zu finden sind, während Proteine, die an die apikale Oberfläche transportiert werden, meistens im Axon vorkommen (Dotti und Simons, 1990). Daher können diese Zellen als Modell für die Lokalisierung von Proteinen in Neuronen dienen. In der Literatur ist für den Ratten-GlyT2 in stabil transfizierten MDCK-Zellen eine apikale Plasmamembran-

lokalisierung beschrieben worden (Poyatos *et al.*, 2000). Hier wurden die MDCK-Zellen eine Woche vor der Transfektion mit den Transporterkonstrukten und dem ER-Markerprotein ausplattiert. Es stellte sich heraus, dass sich nur die Zellen transfizieren ließen, die in nicht konfluenten Regionen der Kultur lagen und demnach nicht vollständig polarisiert waren. Diese Zellen waren noch leicht abgerundet und hatten nur eine Höhe von 3-4 μm , statt ein kastenförmiges Aussehen mit 5-6 μm Höhe, wie es für konfluente MDCK-Kulturen typisch ist. Ein Abgrenzen der lateralen zur apikalen Oberfläche war somit nicht möglich. In Abbildung 3-6 wird die Analyse der EGFP-markierten Transporter gezeigt, die keinen Unterschied zu den unmarkierten mGlyT2-Transporter zeigten (Daten nicht gezeigt). Der GlyT2 war in Bereichen zu finden, die später die laterale und apikale Plasmamembran bilden, während die basale Membran eine stark reduzierte GlyT2-Färbung zeigte. Dieses impliziert, dass in den MDCK-Zellen schon eine teilweise (basale vs. apikale) Abgrenzung der Membranen stattgefunden hatte. Es fand sich, wie bereits in den HEKT-Zellen, keine Kolo-kalisation mit dem ER-Marker. Die Analyse der +A- und der ΔTQC -Mutanten ergab, dass auch diese, vergleichbar zum wt, präferentiell an der apikalen und lateralen Plasmamembran der MDCK-Zelle lokalisiert waren.

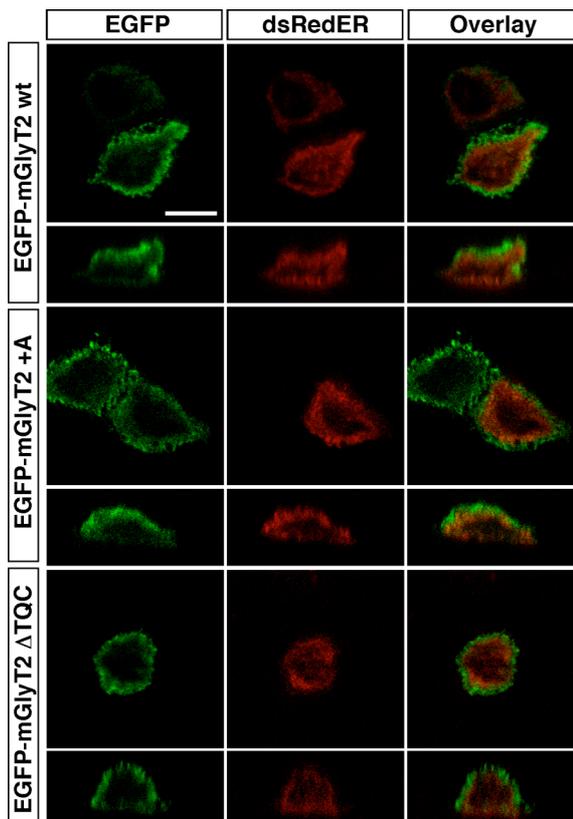


Abbildung 3-6: Lokalisation von EGFP-markierten mGlyT2 wt, +A und ΔTQC in transient transfizierten MDCK-Zellen. Die Zellen wurden 48 Std. vor der Färbung mit dem jeweiligen mGlyT2 und einem dsRedER-Marker kotransfiziert. Längenstandard, 8 μm .

3.1.2.4 Glycinaufnahme der PDZ-DBM-Mutanten

In den vorangegangenen Experimenten war sowohl die Expression als auch die Lokalisation der mGlyT2s untersucht worden, nicht aber ihre Funktionalität. Aus früheren Experimenten war bekannt, dass GlyT2s mit nicht funktionaler PDZ-DBM noch Glycin transportieren können (Ohno *et al.*, 2004). Ob die Transportaktivität jedoch durch die PDZ-Domänenbindung moduliert werden kann, war weitgehend unklar. Aus diesem Grund wurden [³H]Glycinaufnahme-Experimente durchgeführt. Hierfür wurden HEKT-Zellen transfiziert und am nächsten Tag auf drei verschiedene Platten ausplattiert: eine 48-well Platte für das eigentliche Aufnahme-Experiment, eine 24-well Platte für Immunfärbungen, um die Transfektionseffizienz beurteilen zu können, und eine 6-well Platte für eine Western Blot-Analyse, um die GlyT2-Proteinexpression zu analysieren. Die Evaluierung dieser Daten ist wichtig, da eine geringe GlyT2-Expression entsprechend weniger Transporter zur Verfügung stellt, die Glycin importieren können. In Abbildung 3-7 A ist die Glycinaufnahme der

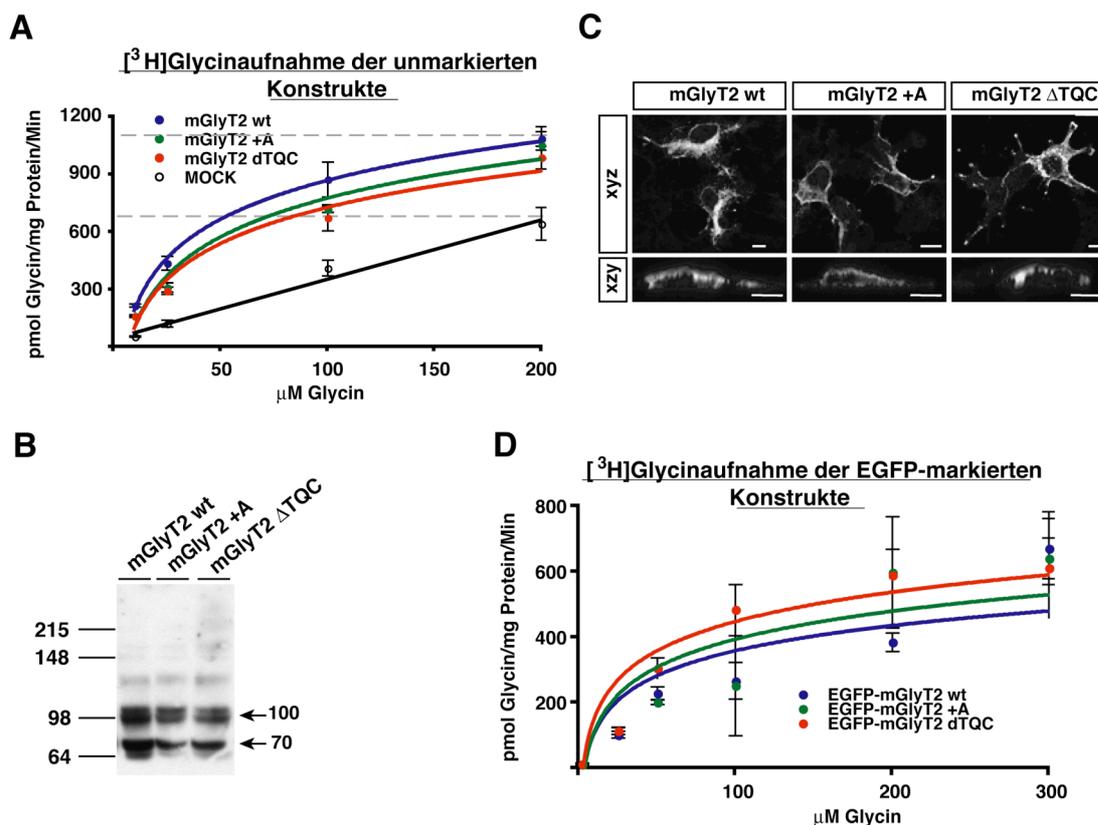


Abbildung 3-7: [³H]Glycinaufnahme von GlyT2-transfizierten HEKT-Zellen. Die Zellen wurden transient mit den einzelnen GlyT2s transfiziert und nach 24 Std. auf unterschiedliche Platten verteilt. Von derselben Ursprungsplatte wurde ein [³H]Glycinaufnahme-Experiment (A), eine Western Blot-Analyse (B) und eine Immunfärbung (C) durchgeführt. In B und C wurde jeweils mit einem N-terminalen GlyT2-Erstantikörper und einem Kaninchen-HRP- bzw. einem Alexa488-Zweitantikörper detektiert. D, [³H]Glycinaufnahme von mit EGFP-markierten Konstrukten transfizierten Zellen. Längenstandard, 8 μ m.

mGlyT2 wt (blau), der +A- (grün), der Δ TQC-Mutante (rot) sowie der MOCK-transfizierten Zellen (offene Kreise) bei unterschiedlichen Glycinkonzentrationen dargestellt. Die Glycinaufnahme der MOCK-transfizierten HEKT-Zellen ist dabei noch nicht subtrahiert worden. Die unspezifische Aufnahme von Glycin durch andere zelluläre Transportsysteme liegt bei etwa 50%. Es konnte für den GlyT2 ein K_M -Wert, der ein Maß für die Substrataffinität der Transporter ist, für Glycin von $52 \pm 9,1 \mu\text{M}$ ermittelt werden. Hierbei bestand kein signifikanter Unterschied zwischen dem wt und den zwei PDZ-DBM-Mutanten (Tabelle 3-2). Die Western Blot-Analyse (Abbildung 3-7 B) bestätigte ein sehr ähnliches Expressionsniveau der einzelnen Konstrukte, und die Immunfärbung zeigte eine vergleichbare Plasmamembranlokalisierung aller Konstrukte (Abbildung 3-7 C). Die maximale Geschwindigkeit v_{max} kann zwischen den Konstrukten nur innerhalb eines Einzelerperiments verglichen werden, da sie u. a. stark von der Transfektionsrate abhängt. Aus diesem Grund wurde auf den v_{max} -Wert des mGlyT2 wt normalisiert, der 100% entspricht. In vier unabhängigen Experimenten ergab sich eine vergleichbare Glycinaufnahme zwischen dem wt und den PDZ-DBM-Mutanten (Tabelle 3-2). In Abbildung 3-7 D ist die [^3H]Glycinaufnahme für die EGFP-markierten Konstrukte gezeigt. Von diesen Werten wurde der unspezifische Transport wie in allen folgenden Aufnahme-Experimenten bereits subtrahiert. Eine Bestimmung des v_{max} -Wertes zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen dem wt und den beiden PDZ-DBM

Tabelle 3-2: Vergleich der K_M - und v_{max} -Werte zwischen den GlyT2-Konstrukten. Für die K_M -Werte wurde zusätzlich durch einen Students-t-Test ermittelt, ob sich die Glycinaffinität der einzelnen Mutanten vom wt-Protein signifikant unterschieden. Dieses war nicht der Fall. n=4.

	Konstruktname	K_M -Wert (μM Glycin)	Students-t- Test	v_{max} (% vom wt)
1	mGlyT2 wt	$52,0 \pm 9,1$		100
2	mGlyT2 +A	$53,3 \pm 4,0$	0,39	110 ± 14
3	mGlyT2 Δ TQC	$57,3 \pm 9,1$	0,16	84 ± 35
4	EGFP-mGlyT2 wt	$55,0 \pm 3,1$	0,29 (zu 1)	100
5	EGFP-mGlyT2 +A	$58,8 \pm 6,3$	0,19	83 ± 30
6	EGFP-mGlyT2 Δ TQC	$60,3 \pm 11,3$	0,27	109 ± 38

Mutanten. Der K_M -Wert lag vergleichbar zu den unmarkierten Konstrukten bei $55 \pm 3,1 \mu\text{M}$ (Tabelle 3-2). Auch hier ist kein signifikanter Unterschied zwischen dem mGlyT2 wt und den beiden PDZ-DBM-Mutanten ersichtlich, die eine ähnliche Expression im Western Blot und Lokalisation in Immunfärbungen zeigten (Daten nicht gezeigt).

3.1.3 Analyse der myc-markierten PDZ-DBM-Mutanten

Neben den in 3.1.2 charakterisierten GlyT2s wurden auch myc-markierte GlyT2-Proteine kloniert. Die myc-Markierungen bieten die Möglichkeit, transfizierte GlyT2-Proteine von endogenen GlyT2 zu unterscheiden, beispielsweise in neuronalen Kulturen. Hierfür wurde ein myc-Epitop in die C-terminale Domäne (myc738) eingefügt. In einem weiteren Konstrukt wurde eine myc-Markierung in den EL2 (myc316) inseriert. Diese Strategie hat den Vorteil, dass das myc-Epitop extrazellulär liegt. Diese extrazelluläre myc-Markierung sollte erlauben, extra- von intrazellulären GlyT2-Proteinen direkt in Immunfärbungen zu unterscheiden. Dies ist interessant, weil für die spezifische Detektion des GlyT2 bisher nur Antikörper zur Verfügung stehen, die intrazelluläre Motive entweder in der N- oder in der C-terminalen Domäne erkennen.

3.1.3.1 Analyse der myc316-markierten GlyT2

Zunächst wurde die Expression der im EL2-markierten GlyT2s (mGlyT2 myc316) in einer Western Blot-Analyse untersucht. In transfizierten HEKT-Zellen konnten von den mGlyT2 wt myc316 und den beiden PDZ-DBM-Mutanten sowohl eine 70 als auch eine 100 kDa Bande detektiert werden (Abbildung 3-8 A). Die Mutanten +A und Δ TQC wurden analog zum wt-Protein in allen weiteren Experimenten untersucht. Da sie sich aber nicht vom mGlyT2 wt myc316 unterschieden, wird für eine bessere Übersichtlichkeit der Daten auf die Darstellung der Ergebnisse für diese Mutanten verzichtet. Eine Analyse der Glykosylierungen durch Behandlung mit PGNaseF ergab wie für den GlyT2 wt-Banden bei 100 und 70 kDa, die nach PGNaseF-Behandlung zu einer 64 kDa Bande reduziert wurden (Abbildung 3-8 B). Demzufolge wirkt sich die Insertion der myc-Markierung im EL2 (myc316) nicht auf die Expression

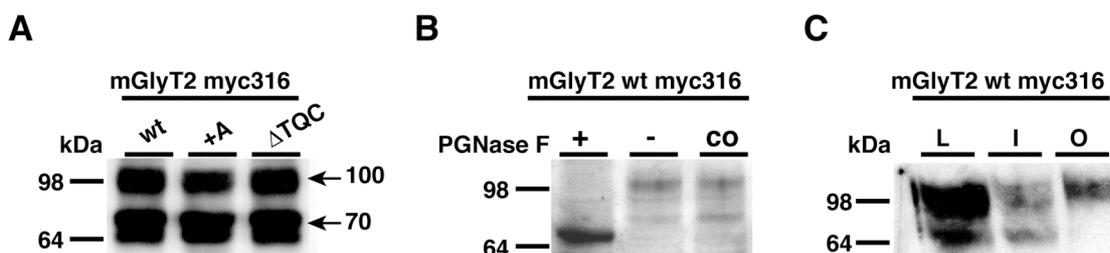


Abbildung 3-8: Untersuchung der myc316-markierten GlyT2-Konstrukte. HEKT-Zellen wurden mit den entsprechenden myc316-markierten Konstrukten transfiziert und 48 Std. nach der Transfektion lysiert. **A**, 30 μ g der Gesamtzelllysate wurden in einem Western Blot analysiert. **B**, 25 μ g der myc316-GlyT2-Zelllysate (+) wurden für 90 Min. mit PGNaseF behandelt. Die (+)-Probe und die (-)-Probe wurden 90 Min. bei 37°C inkubiert, während die zweite Kontrolle (co) bei 4°C ohne Enzym aufbewahrt wurde. **C**, Oberflächenbiotinylierung des myc316-markierten mGlyT2 wt (30 μ g). Alle Western Blots wurden mit einem N-terminalen GlyT2-Erstantikörper und einem Kaninchen-HRP-Zweitantikörper detektiert. L, Gesamtzelllysate; I, Intrazelluläre Proteine; O, Oberflächenproteine.

und die Glykosylierung des GlyT2 aus. Zur Analyse der Plasmamembranständigkeit vom mGlyT2 wt myc316 wurde zusätzlich eine Oberflächenbiotinylierung durchgeführt (Abbildung 3-8 C). Vergleichbar mit den unmarkierten Proteinen waren im Lysat (L) zwei Banden bei 100 und 70 kDa vorhanden. Intrazellulär verblieb hauptsächlich die *core*-glykosylierte Bande bei 70 kDa, während die Intensität der komplex glykosylierten 100 kDa Bande reduziert war (I). In der Plasmamembran trat dagegen nur die komplex glykosylierte Bande bei 100 kDa auf. Die myc-Markierung in den EL2 (myc316) verhinderte die Insertion in die Plasmamembran nicht.

Die Lokalisation des mGlyT2 wt myc316 wurde in transfizierten HEKT-Zellen untersucht, die mit einem ER-Marker kotransfiziert wurden. In den mit mGlyT2 wt myc316 transfizierten HEKT-Zellen ließ sich eine partielle Kolokalisation mit dem ER-Marker sowie eine schwache Plasmamembranfärbung nachweisen (Abbildung 3-9 A).

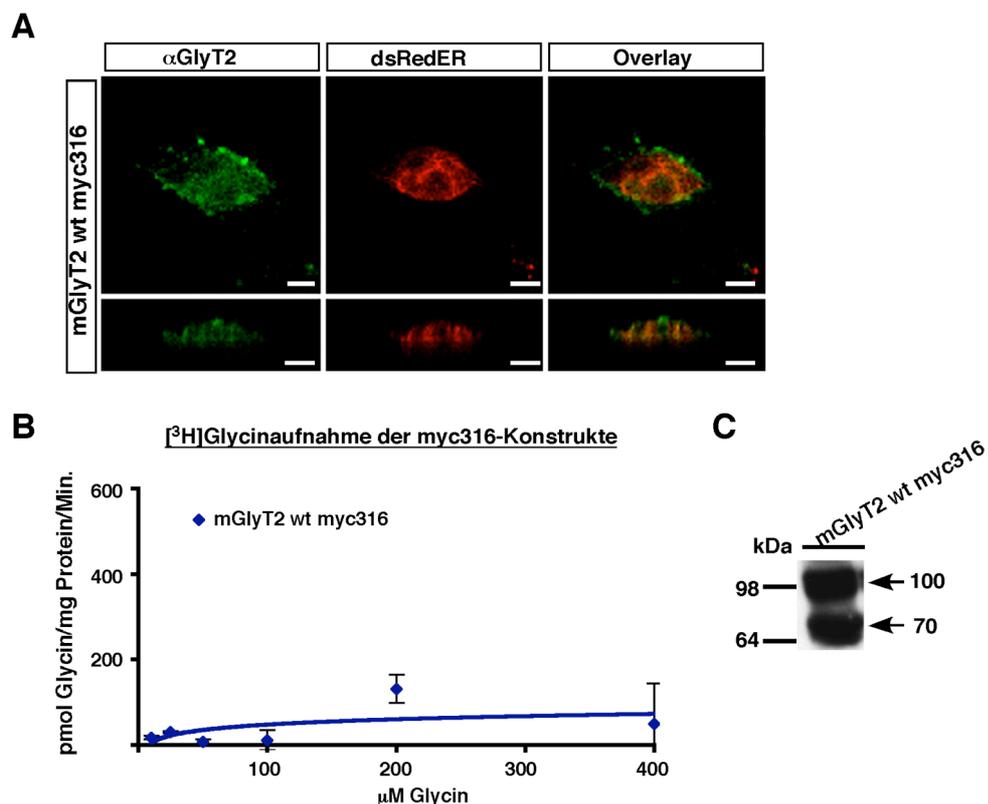


Abbildung 3-9: Lokalisations- und Funktionsanalyse des mGlyT2 wt myc316. **A**, der mGlyT2 wt myc316 wurde mit einem dsRedER-Marker kotransfiziert und nach 48 Std. fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem GlyT2-Erstantikörper und einem Meerschweinchen-Alexa488-Zweitantikörper angefärbt. **B**, $[^3\text{H}]$ Glycinaufnahme-Experiment des mGlyT2 wt myc316. Der unspezifische Transport wurde bereits subtrahiert. **C**, Western Blot-Analyse des Aufnahme-Experiments. 30 μg Protein wurden aufgetragen. Die Detektion der Western Blots erfolgte über einen N-terminalen GlyT2-Erstantikörper und einen Kaninchen-HRP-Zweitantikörper. Längenstandard, 8 μm .

Zusätzlich wurde die Fähigkeit des mGlyT2 wt myc316 untersucht, Glycin zu transportieren. Hierfür wurde ein [³H]Glycinaufnahme-Experiment durchgeführt. Obwohl der mGlyT2 wt myc316 zumindest z. T. in der Plasmamembran vorkam, war praktisch keine Glycinaufnahme messbar (Abbildung 3-9 B). Der Western Blot zeigte, dass das Konstrukt exprimiert wurde (Abbildung 3-9 C). Die Immunfärbung wies ebenfalls eine partielle Membranständigkeit der myc316-Transporter auf (Daten nicht gezeigt). Die Insertion des myc-Epitops in den EL2 unterbindet somit die Transporterfunktion. Hierbei spielen möglicherweise eine veränderte Flexibilität des EL2 eine Rolle.

3.1.3.2 Analyse der C-terminal markierten Konstrukte

Die C-terminal myc-markierten (myc738) Konstrukte wurden zunächst auf ihre Expression im Western Blot untersucht. Interessanterweise generierten die myc738-Mutanten mit dem C-terminalen myc-tag keine 100 kDa Bande, während die Intensität der Banden bei 64 und 70 kDa vergleichbar war mit der unmarkierten GlyT2s (Abbildung 3-10 A). In den weiteren Analysen wird nur das mGlyT2 wt myc738 Protein gezeigt, da die Mutanten sich nicht von dem wt-Protein unterscheiden. Eine Behandlung mit PGNaseF führte zu einer Deglykosylierung des Transporters, wobei die 70 kDa vollständig zu der 64 kDa Bande reduziert werden konnte (Abbildung 3-10 B). Eine Behandlung des mGlyT2 wt myc738 mit EndoH konnte den mGlyT2 wt myc738 ebenfalls vollständig deglykosylieren (Daten nicht gezeigt). Der myc738-markierte Transporter verfügte über keine Bande, die dem komplex glykosylierten Transporter entsprach, wurde aber in ein vollständiges GlyT2-Protein translatiert, da das unglykosylierte Protein auf der gleichen Höhe wie die unmarkierten deglykosylierten GlyT2 lief. Eine Lokalisationsanalyse von COS-7 Zellen, die mit mGlyT2 wt myc738 und einem ER-Marker kotransfiziert wurden, zeigte eine nahezu vollständige Kollokalisierung des Transporterproteins mit dem ER-Marker bei fehlender Plasmamembranfärbung (Abbildung 3-10 C). Ein Analyse der [³H]Glycinaufnahme bestätigte, dass der GlyT2 wt myc738 keinen Glycintransport katalysierte (Abbildung 3-10 D und E).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Einfügen des myc-Epitops in die C-terminale Domäne die Prozessierung des GlyT2 beeinträchtigt. Solche Effekte treten häufig auf, wenn Plasmamembranproteine intrazellulär reteniert werden. Da durch die Insertion der myc-Markierung im C-Terminus die Funktionalität des GlyT2 unterbunden wird, wurden diese Mutanten nicht weiter analysiert. Die Folgen für einen nicht-funktionellen Transporter sind in GlyT2-defizienten Mäusen hinreichend beschrieben worden (Gomez *et al.*, 2003b).

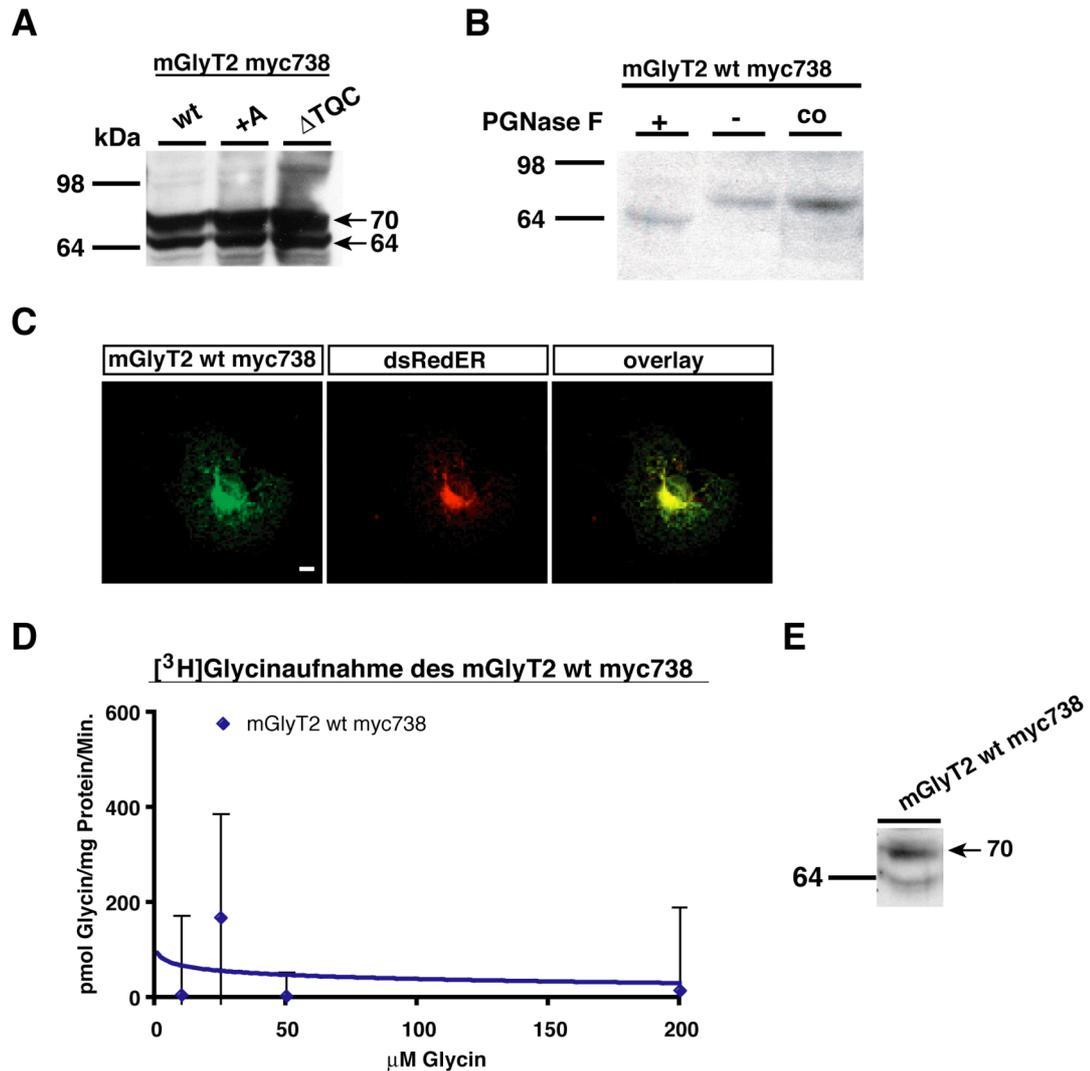


Abbildung 3-10: Analyse der myc738-markierten GlyT2-Konstrukte. **A**, HEKT-Zellen wurden mit den entsprechenden myc-markierten Konstrukten transfiziert und 48 Std. nach der Transfektion lysiert. 30 μg der Gesamtzelllysate wurden in einem Western Blot analysiert. **B**, 25 μg des GlyT2 myc738-Zelllysats (+) wurden für 90 Min. mit PGNaseF behandelt. Die (+)-Probe und die (-) Probe wurden 90 Min. bei 37°C inkubiert, während die Kontrolle (co) bei 4°C ohne Enzym aufbewahrt wurde. **C**, Kolokalisation des mGlyT2 wt myc738 mit dem dsRedER-Marker. Die COS-7-Zellen wurden mit dem mGlyT2 wt myc738 und einem dsRedER-Marker kotransfiziert und nach 48 Std. mit einem GlyT2-Erst- und einem Kaninchen-Alexa488-Zweitantikörper angefärbt. **D**, $[^3\text{H}]$ Glycinaufnahme des mGlyT2 wt myc738 bei unterschiedlichen Glycinkonzentrationen. **E**, Western Blot des $[^3\text{H}]$ Glycinaufnahme-Experiments. Die Western Blots wurden mit einem N-terminalen GlyT2-Erstantikörper und einem Kaninchen-HRP-Zweitantikörper detektiert. Längenstandard, 8 μm .

3.1.4 Lokalisationsanalyse der GlyT2-PDZ-DBM Mutanten in hippocampalen Neuronen

In HEKT-, COS-7- und MDCK-Zellen wurde gezeigt, dass das PDZ-DBM für die Plasmamembraninsertion nicht essentiell ist. Hieraus können jedoch keine Rückschlüsse auf die mögliche Funktion dieses Motivs für die synaptische Lokalisation in Neuronen gezogen werden. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob die Inaktivierung dieses Motivs die Lokalisation in neuronalen Systemen beeinflusst. Idealerweise sollten hier spinale Neurone verwendet werden, die den GlyT2 endogen in hohem Maße exprimieren. Diese Neurone ließen sich jedoch auch mit diversen Transfektionsmethoden, wie Calciumphosphat, Elektroporation, Transfektion mit lipophilen Agenzien, nicht ausreichend transfizieren. Aus diesem Grund wurden hippocampale Neurone (HCN) zur Analyse verwendet. Zunächst wurde überprüft, ob GlyT2 endogen in diesen Zellen auftritt. Hierfür wurden hippocampale Kulturen sowohl mit einem C-terminalen wie auch einem N-terminalen GlyT2-Antikörper angefärbt. Unter den verwendeten Bedingungen konnte kein spezifisches GlyT2-Signal detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Unter anderen Quenchen und Blockbedingungen, die u. a. Ammoniumchlorid und Gelatine verwenden, ist ein schwaches Signal für den GlyT2 in HCN beschrieben worden (Danglot *et al.*, 2003), die in unseren Experimenten höchst wahrscheinlich aufgrund der unterschiedlichen Fixierung unter dem Detektionsniveau lag. Diese fehlende Expression stellte in unseren Transfektionsexperimenten von HCN einen entscheidenden Vorteil dar, da keine endogene Hintergrundfärbung zu erwarten war und so auch GlyT2-spezifische Antikörper verwendet werden konnten.

Nach zehn Tagen in Kultur (DIV10) wurden die HCN mit den entsprechenden EGFP-markierten Konstrukten transfiziert, an DIV13 fixiert und immunzytochemisch analysiert (Abbildung 3-11). Zur Verstärkung des GlyT2-Signals wurden die Neurone zusätzlich mit einem GlyT2-spezifischen Antikörper angefärbt, da die EGFP-Fluoreszenz in den transfizierten Neuronen, die das Fusionsprotein nur schwach exprimierten, ansonsten nur schwer nachzuweisen war. Die mit EGFP-mGlyT2 wt transfizierten Neuronen wiesen an mehreren Stellen Anreicherungen des EGFP-mGlyT2 wt auf, die in Kontrollneuronen, die mit EGFP transfiziert wurden, nicht auftraten. Neben den Neuriten, an potentiellen Synapsen, wurde intensivere GlyT2-Immunreaktivität nachgewiesen (Abbildung 3-11, weiße Pfeilspitzen), die teilweise mit dem postsynaptischen Protein PSD95 und dem präsynaptischen Protein Synaptophysin kolokalisierte. In den beiden Mutanten EGFP-mGlyT2 +A und Δ TQC waren diese Anreicherungen neben dem Neurit in einem stark reduziertem Maße zu finden. Die Gesamtanzahl der GlyT2-Puncta änderte sich jedoch nicht. Stattdessen war GlyT2 Protein in den Mutanten in Anreicherungen im Neurit zu finden, die selten positiv für PSD95 oder das synaptische Vesikelprotein Synaptophysin waren

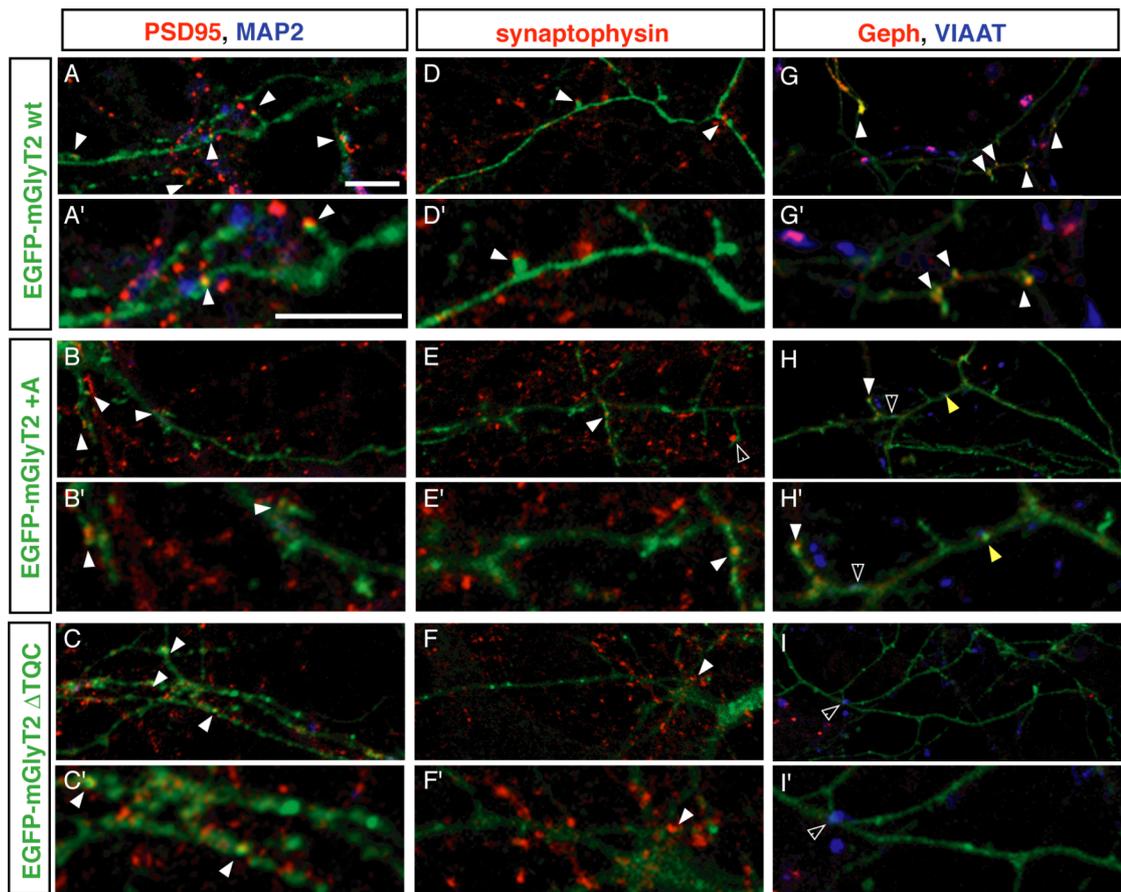


Abbildung 3-11: Immunfärbung der PDZ-DBM-Konstrukte in transfizierten HCN. Die Zellen wurden aus E18-Rattenembryonen gewonnen und an DIV10 mit EGFP-mGlyT2 wt, +A oder Δ TQC transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen fixiert und mit einem GlyT2-spezifischen Antikörper und den angegebenen synaptischen Protein-Antikörpern sowie entsprechenden Alexa-Zweitantikörpern angefärbt (rot). Die Pfeilspitzen zeigen eine Kolokalisation der synaptischen Marker und der GlyT2-Proteine. A-C, Kolokalisation mit PSD95, D-F, Kolokalisation mit Synaptophysin, G-I, Kolokalisation mit Gephyrin (weiße Pfeilspitzen), mit VIAAT (offene Pfeilspitzen) oder beiden (gelbe Pfeilspitzen). Geph, Gephyrin. Längenstandard, 8 μ m.

(Abbildung 3-11, weiße Pfeilspitzen). Zusätzlich wurden auch Marker für inhibitorische Synapsen verwendet. Der mGlyT2 wt kolokalisiert ebenfalls häufiger mit Gephyrin und VIAAT (Abbildung 3-11, Pfeilspitzen).

Für eine quantitative Auswertung wurde die Anzahl an PSD95-GlyT2-positiven Clustern gezählt. Hierfür wurden die PSD95-Puncta von jeweils 50 μ m eines Neurits, die Anzahl an GlyT2-Puncta sowie die Puncta, die beide Immunreaktivitäten zeigten, bestimmt. Die Gesamtzahl an PSD95- sowie der GlyT2-Puncta war in den einzelnen Konstrukten EGFP-mGlyT2 wt, +A und Δ TQC unverändert. 26% der PSD95-Puncta waren im wt ebenfalls GlyT2-positiv (Abbildung 3-12). In den beiden Mutanten traten diese Kolokalisationen mit 10-13% deutlich seltener auf. Die Inaktivierung bzw. Deletion des PDZ-DBM führte also zu einer 50%igen Reduktion an GlyT2/PSD95-Clustern. Zusätzlich zeigten alle Konstrukte eine Anreicherung von GlyT2 in Wachstumskegeln (Daten nicht gezeigt).

A

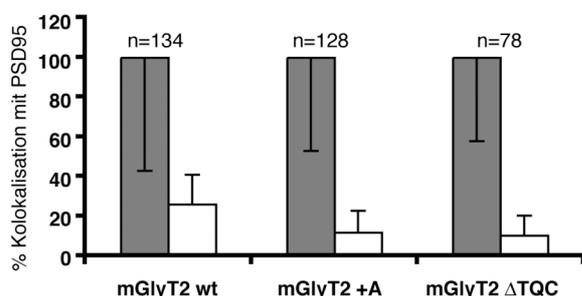


Abbildung 3-12: Kolokalisation der EGFP-mGlyT2-Konstrukte mit dem PSD95. Hierfür wurden die PSD95-positiven Puncta (graue Balken) je 50 μm ermittelt, sowie die Anzahl der Puncta, die mit GlyT2 kolokalisierten (weiße Balken).

B

	mGlyT2 wt	mGlyT2 +A	mGlyT2 ΔTQC
kol. GlyT2 (%)	26	13	10

3.1.5 Zusammenfassung C-terminale Mutanten

Es wurde gezeigt, dass das PDZ-DBM weder die Insertion des GlyT2s in die Plasmamembran noch die Glykosylierung beeinflusst. Ebenso konnte keine Auswirkung auf den Glycintransport festgestellt werden (Tabelle 3-3.).

Tabelle 3-3: Zusammenfassung der Eigenschaften der C-terminalen Mutanten in HEKT-Zellen. PM, Plasmamembran.

Konstrukt	Lokalisation	Glycin-Aufnahme	Western Blot	Oberflächen-biotinylierung	Deglykosylierungen	
					PGNaseF	EndoH
mGlyT2 wt	PM	funktional (K_M 52 μM)	100 + 70 kDa	100 kDa	64 kDa	100 + 64 kDa
mGlyT2 +A	PM	vergleichbar zum wt	100 + 70 kDa	100 kDa	64 kDa	100 + 64 kDa
mGlyT2 ΔTQC	PM	vergleichbar zum wt	100 + 70 kDa	100 kDa	64 kDa	100 + 64 kDa

Die immunzytochemischen Färbungen von transfizierten HCN zeigten, dass das PDZ-DBM eine wichtige Rolle für die Lokalisation von GlyT2 in Neuronen spielt. So führt eine Inaktivierung des PDZ-DBM zu einer Reduktion von GlyT2 an Synapsen, wie durch die Kolokalisation mit synaptischen Markern gezeigt werden konnte (Tabelle 3-4). Die transfizierten HCN zeigten GlyT2-Immunreaktivität sowohl in Axonen als auch in Dendriten. Die beiden PDZ-DBM-Mutanten kolokalisierten häufiger mit PSD95 in Dendriten, während im wt die Kolokalisation hauptsächlich im Axon zu finden war, wie Kofärbungen mit MAP2, einem dendritischen Marker, zeigten. Somit kann gefolgert werden, dass das PDZ-DBM eine Rolle für die Lokalisation des GlyTs in präsynaptischen Terminalien spielt.

Tabelle 3-4: Zusammenfassung der Eigenschaften der C-terminalen Mutanten in HCN.

Konstrukt	Kokalisation mit				Wachstumskegel
	PSD95	Synaptophysin	VIAAT	Gephyrin	
EGFP-mGlyT2 wt	26 %	synaptische Cluster	synaptische Cluster	synaptische Cluster	Anreicherungen
EGFP-mGlyT2 +A	13 %	weniger als mit dem wt	weniger als mit dem wt	weniger als mit dem wt	Anreicherungen
EGFP-mGlyT2 Δ TQC	10 %	weniger als mit dem wt	weniger als mit dem wt	weniger als mit dem wt	Anreicherungen

N-terminale Mutanten

Innerhalb der Familie der Na⁺/Cl⁻-abhängigen Neurotransmitter Transporter nimmt die N-terminale Domäne des GlyT2 eine besondere Stellung ein, da sie mit ihren 200 Aminosäuren außergewöhnlich lang ist und keine bekannten Proteindomänen aufweist. Die hohe Konservierung der N-terminalen Domäne des GlyT2 in unterschiedlichen Spezies impliziert jedoch eine wichtige Funktion. Zudem stellt diese Domäne potentielle Bindungsstellen für Interaktionspartner bereit. Bereits bekannte Proteine, die mit dem N-Terminus interagieren, wie Ulip6 und ein Dynein-Familienmitglied, lassen eine regulatorische Funktion dieser Domäne vermuten.

Um die Funktion des N-Terminus zu analysieren, wurden zwei verschiedene Deletionsmutanten erzeugt, mGlyT2 Δ AA1-174 und mGlyT2 Δ AA1-184. Diese zwei Mutationen wurden ausgewählt, da die in der mGlyT2 Δ AA1-174-Mutante deletierten Aminosäuren in der Region liegen, die einzigartig für den GlyT2 ist, und in anderen Familienmitgliedern der *SLC6*-Familie nicht vorkommt. In der mGlyT2 Δ AA1-184-Mutante wurden zehn weitere Aminosäuren deletiert, deren Sequenz teilweise homolog zum GlyT1 ist. Diese Sequenz entspricht jedoch keinem bekannten Motiv. Die Analyse der N-terminalen Mutanten erfolgte analog zu den C-terminalen Konstrukten.

3.1.6 Klonierung der N-terminalen Mutanten

Die N-terminalen Mutanten wurden durch PCR-basierte Mutagenese aus dem mGlyT2 wt hergestellt (siehe 3.1.1). Die Primer WA-424 (Δ AA1-174) und WA-425 (Δ AA1-184), die am 5'-Ende eine HindIII-Restriktionsschnittstelle haben, und der Primer WA-513 wurden in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Die PCR-Fragmente wurden über die HindIII- und eine GlyT2-interne HpaI-Schnittstelle gegen die wt-Sequenz im pcDNA3.1(+) ausgetauscht. Ebenso wurde mit den myc-markierten Mutanten verfahren. In diesen Konstrukten wurde nach dem Nukleotid 39 ein myc-Epitop insertiert (siehe Abbildung 3-13). Alle Mutanten wurden durch eine Sequenzanalyse verifiziert.

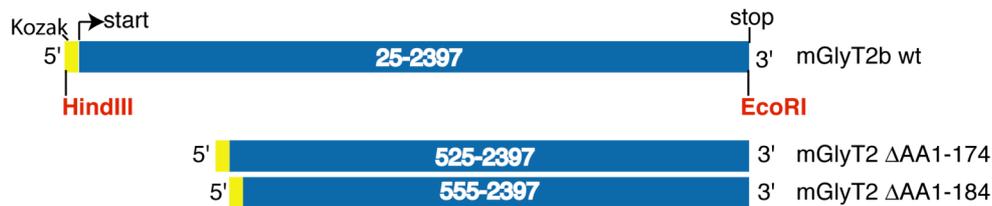
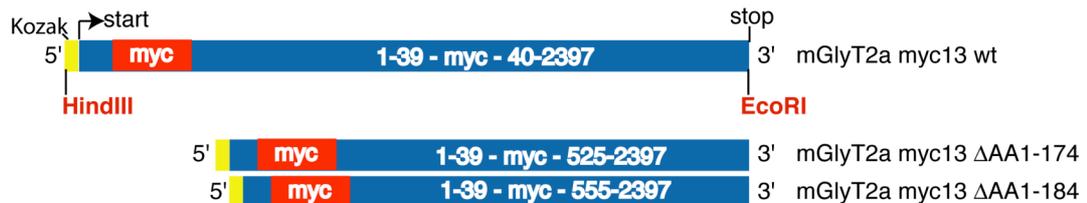
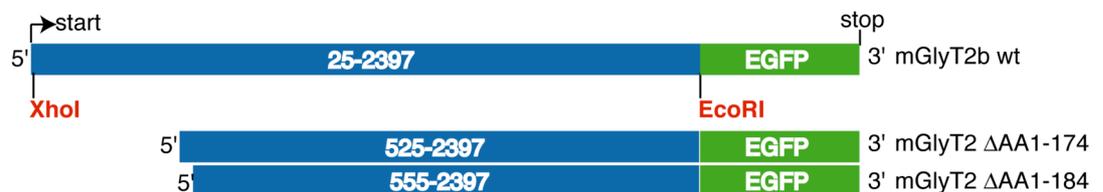
A unmarkierte Mutanten**B** myc-markierte Mutanten**C** EGFP-markierte Mutanten

Abbildung 3-13: Klonierungsstrategie für die N-terminalen Deletionsmutanten. Es wurden jeweils dieselben Restriktionsseiten wie im mGlyT2b wt verwendet (HindIII und EcoRI in A und B bzw. XhoI und EcoRI in C). In **A** wurden die unmarkierten Konstrukte in den pcDNA3.1(+) kloniert, in **B** wurde in die N-terminale Domäne nach 39 Nukleotiden (AA13) ein myc-Epitop nach dem Start-ATG insertiert, und in **C** wurde an das C-terminale Ende EGFP fusioniert.

3.1.7 Analyse der N-terminalen Mutanten**3.1.7.1 Expressions- und Glykosylierungsanalyse der N-terminalen Deletionsmutanten**

Die N-terminalen Deletionsmutanten wurden in HEKT-Zellen exprimiert und in einer Western Blot-Analyse charakterisiert. Zwei spezifische Banden in der Höhe von 100 und 70 kDa traten bei dem mGlyT2 wt-Protein auf (Abbildung 3-14 A, Spalte 1). Die höheren Banden bei >120 kDa repräsentierten vermutlich Aggregate und waren nicht in allen Western Blots zu sehen. Für die beiden Deletionsmutanten mGlyT2 ΔAA1-174 und mGlyT2 ΔAA1-184 wurden ebenfalls zwei Banden identifiziert. Diese waren aufgrund der langen Deletion deutlich kürzer als das wt-Protein und wiesen Bandengrößen von etwa 85 und 53 kDa auf (Abbildung 3-14 A, Spalten 2-3). Der Ursprung der einzelnen Banden wurde in einer anschließenden Deglykosylierungsanalyse näher untersucht. Hierfür wurden die Zelllysate der mit den N-terminalen Transporterkonstrukten transfizierten Zellen mit PGNaseF

inkubiert. Für den wt und die beiden Deletionskonstrukte sind jeweils drei Spalten gezeigt (Abbildung 3-14 B). In der ersten Spalte wurde das Zelllysats mit PGNaseF, in der zweiten ohne Zugabe von Enzym, für 90 Min. bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde eine dritte Probe des Zelllysats bei 4°C aufbewahrt. In der Kontrolle (co) und der bei 37°C inkubierten Probe ohne PGNaseF-Zugabe (-) traten zwei Banden bei 100 und 70 kDa bzw. bei etwa 85 und 53 kDa auf. In der ersten Spalte (+) eines jeden Deletionskonstrukts war nur noch eine Bande bei 64 kDa für den wt bzw. bei

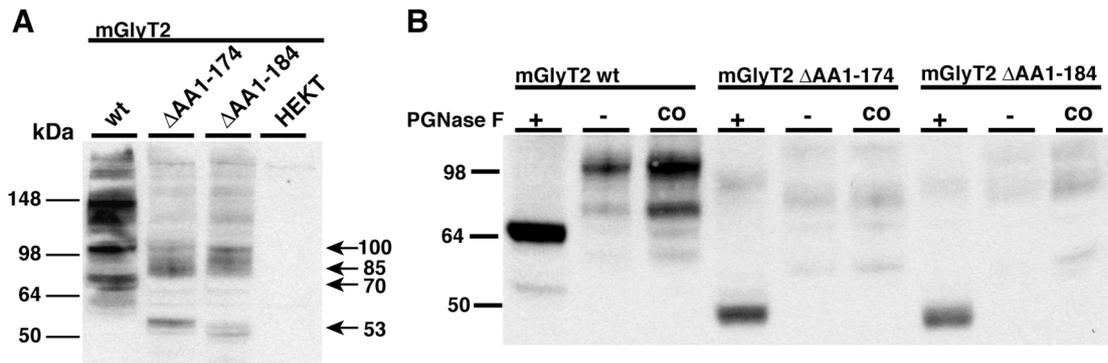


Abbildung 3-14: Expressions- und Glykosylierungsanalyse der N-terminalen Deletionsmutanten. HEKT-Zellen wurden entweder mit mGlyT2 wt, ΔAA1-174 oder ΔAA1-184 transfiziert. Nach 48 Std. wurden die Zellen lysiert. **A**, jeweils 30 µg des Gesamtlysats wurden auf das Gel aufgetragen. **B**, für die Analyse der Glykosylierungen wurde die ersten beiden Spalten eines Konstrukts mit (+) bzw. ohne (-) Zugabe von PGNaseF für 90 Min. bei 37°C inkubiert. Das Kontrolllysats (co) wurde bei 4°C aufbewahrt. Jeweils 30 µg Protein wurden aufgetragen. Beide Western Blots wurden mit einem C-terminalen GlyT2-Erst- (Chemicon) und einem Meerschweinchen-HRP-Zweitantikörper detektiert.

45 kDa für die beiden Mutanten vorhanden, die den deglykosylierten Transportern entsprechen. Folglich handelte es sich bei den höhermolekularen Banden, die in unbehandelten Zelllysaten auftraten, um GlyT2-Proteine mit unterschiedlichem Glykosylierungsstatus. Die höhermolekulare Bande ist komplex glykosyliert, während die untere Bande nur *core*-Glykosylierungen trägt, wie bereits für das wt-Protein durch die Behandlung mit EndoH gezeigt wurde (Abbildung 3-2 D). Die N-terminalen Deletionsmutanten wiesen ein vergleichbares Glykosylierungsmuster auf wie der wt-Transporter.

3.1.7.2 Analyse der Oberflächenexpression und Lokalisation der N-terminalen GlyT2-Mutanten

Die N-terminalen Deletionsmutanten wurden im Anschluss auf ihre Plasmamembranlokalisation untersucht. Hierfür wurde eine Oberflächenbiotinylierung durchgeführt. HEKT-Zellen wurden 48 Std. nach der Transfektion biotinyliert und anschließend lysiert. Die Behandlung der Proben erfolgte analog zu den PDZ-DBM-Konstrukten (siehe 3.1.2.2). In den Gesamtzelllysaten waren sowohl die intrazellulären als auch die biotinylierten Oberflächen-GlyT2s enthalten (Abbildung

3-15 Spalten 1-3, Lysat). Für das wt-Protein wurden Banden bei 100 und 70 kDa detektiert. Niedermolekulare Banden entsprachen Degradationsprodukten. Die beiden Deletionsmutanten waren entsprechend kürzer und wurden bei etwa 85 und 53 kDa gefunden. Die biotinylierten Oberflächenproteine wurden über Agarosegekoppeltes Streptavidin von den intrazellulären getrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen (Abbildung 3-15 Spalten 4-6, intrazellulär). Hier konnte für das wt-Protein nur die *core*-glykosylierte Bande bei 70 kDa detektiert werden, während für die N-terminalen Mutanten sowohl die *core*- als auch komplex glykosylierte Banden auftraten. Die Intensität der höhermolekularen, komplex glykosylierten Bande war verglichen zu der in den Lysaten jedoch stark reduziert. In der plasmamembranständigen Fraktion konnten ausschließlich die komplex glykosylierte Bande des GlyT2 wt bei 70 kDa bzw. bei den beiden Mutanten bei 85 kDa detektiert werden (Abbildung 3-15, Spalten 7-9, Oberfläche). Folglich erfolgte eine Insertion des GlyT2 in die Plasmamembran auch nach Deletion der N-terminalen Domäne.

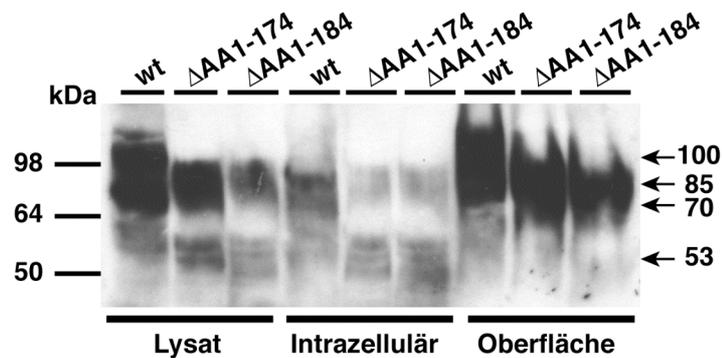


Abbildung 3-15: Oberflächenbiotinylierung der N-terminalen Deletionsmutanten. Die HEKT-Zellen wurden mit mGlyT2 wt, Δ AA1-174 oder Δ AA1-184 transfiziert und nach 48 Std. für 30 Min. bei 4°C biotinyliert. Die HEKT-Zellen wurden lysiert und jeweils 30 μ g in einer SDS-PAGE analysiert. Der Western Blot wurde mit einem GlyT2-Erst- (Chemicon) und einem Meerschweinchen-HRP-Zweitantikörper entwickelt.

Die subzelluläre Lokalisation des mGlyT2 wt, Δ AA1-174 und Δ AA1-184 wurde in Immunfärbungen von transfizierten HEKT-Zellen untersucht. Sowohl beim GlyT2 wt-Protein wie auch den beiden Deletionsmutanten kam eine Plasmamembranfärbung vor (Abbildung 3-16). Das wt-Protein und die Mutante Δ AA1-184 waren zusätzlich schwach zytoplasmatisch im kernnahen Bereich nachweisbar.

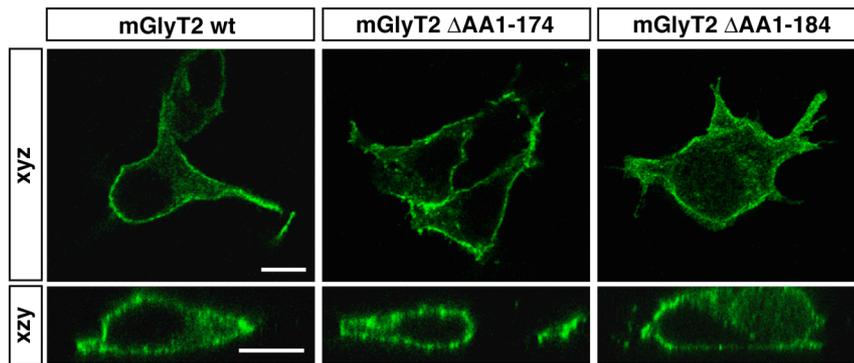


Abbildung 3-16: Immunfärbung der N-terminalen Deletionsmutanten. Die Zellen wurden 24 Std. vor der Fixierung mit mGlyT2 wt, Δ AA1-174 oder Δ AA1-184 transfiziert und mit einem GlyT2-Erst- (Chemicon) und einem Meerschweinchen-Alexa488-Zweitantikörper angefärbt. Längsstandard, 8 μ m.

3.1.7.3 Glycintransportaktivität der N-terminalen Deletionskonstrukte

Ob die Deletion der N-terminalen Domäne einen Einfluss auf die Fähigkeit des GlyT2s hat, Glycin zu transportieren, sollte in radioaktiven [3 H]Glycinaufnahme-Experimenten analysiert werden. Hierfür wurde der Plasmamembrantransport bei unterschiedlichen Glycinkonzentrationen in transfizierten HEKT-Zellen gemessen (Abbildung 3-17). Parallel wurde zu jedem Einzelexperiment sowohl eine Western Blot-Analyse wie auch eine Immunfärbung durchgeführt (Abbildung 3-17 B und Daten nicht gezeigt).

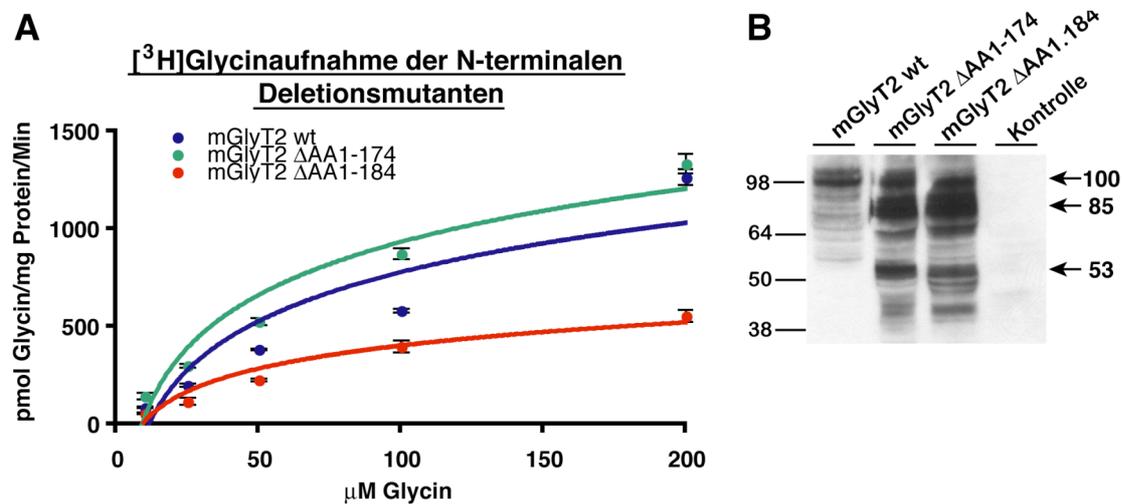
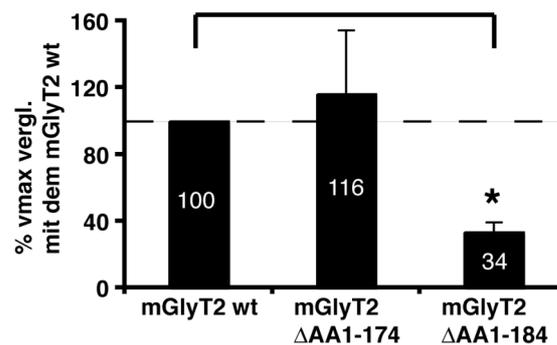


Abbildung 3-17: [3 H]Glycinaufnahme der N-terminalen Deletionsmutanten in HEKT-Zellen. Die HEKT-Zellen wurden entweder mit dem mGlyT2 wt (blau), Δ AA1-174 (grün) oder Δ AA1-184 (rot) transient transfiziert. **A**, die Glycinaufnahme-Analyse erfolgte 48 Std. nach der Transfektion. **B**, Der Western Blot wurde mit einem GlyT2-Erstantikörper (Chemicon) und einem Meerschweinchen-HRP-Zweitantikörper nachgewiesen.

Der GlyT2 wt und die Mutante Δ AA1-174 zeigten eine vergleichbare Glycinaufnahme (Abbildung 3-17 A). Interessanterweise führte die Deletion von zehn weiteren Aminosäuren in der Mutante Δ AA1-184 zu einer über 60%igen Reduktion der

Glycinaufnahme (Abbildung 3-17 A und Abbildung 3-18 B), obwohl die Proteinexpression für alle drei Konstrukte vergleichbar war. Der K_M -Wert wurde für die einzelnen Konstrukte ermittelt und es konnte kein signifikanter Unterschied zum wt-Protein ermittelt werden (Abbildung 3-18 B). Die v_{max} ist ein Maß für die Anzahl an Transportmolekülen an der Plasmamembran. Die Reduktion der v_{max} in der Mutante $\Delta AA1-184$ resultiert aus einer geringeren Anzahl an funktionsfähigen GlyT2-Molekülen in der Plasmamembran.

A



B

Konstrukt	K_M -Wert (μM Glycin)	v_{max} (% vgl. mit wt)
mGlyT2 wt	52,0 \pm 9,1	100
mGlyT2 $\Delta AA1-174$	55,3 \pm 11,2	116 \pm 38
mGlyT2 $\Delta AA1-184$	48,3 \pm 5,8	34 \pm 6

Abbildung 3-18: Analyse der Größen der K_M - und v_{max} -Werte der N-terminalen Deletionsmutanten. **A**, aus drei unabhängigen Experimenten wurde die entsprechenden Werte ermittelt. Die prozentualen Angaben wurden auf den v_{max} -Wert des mGlyT2 wt normiert. **B**, tabellarische Darstellung der K_M - und v_{max} -Werte der N-terminalen Deletionsmutanten. *, $p \leq 0,01$.

3.1.7.4 [3H]Glycinaufnahme-Experimente der N-terminalen GlyT2-Deletionsmutanten zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Da die prozentuale Reduktion der Glycinaufnahme der Deletionsmutante $\Delta AA1-184$ in den Aufnahme-Experimenten nach zwei Tagen variierte, je nachdem ob die Zellen morgens oder nachmittags analysiert worden waren, wurde die Glycinaufnahme der N-terminalen Deletionskonstrukte zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transfektion gemessen (24, 48 und 72 Std.). Hierfür wurden transfizierte HEKT-Zellen derselben Ursprungsplatte auf jeweils drei 48-well, 24-well und 6-well Platten ausgesät, um später die Glycinaufnahme eines Konstrukts zu den unterschiedlichen Zeitpunkten vergleichen zu können. Für den mGlyT2 wt war die ermittelte Glycinaufnahme nach 24 Std. und 48 Std. vergleichbar und erst nach 72 Std. um etwa 40 Prozent reduziert (Abbildung 3-19 A). Vergleich man hiermit die Western Blot-

Analyse des wt-Konstrukts, so fiel auf, dass die Expression nach 48 Std. stark zugenommen hatte. Das Glycinaufnahmeprofil ließ jedoch vermuten, dass sich nicht mehr GlyT2-Proteine an der Plasmamembran befanden (Abbildung 3-19 E-G, jeweils erste Spalte). Nach 72 Std. verringerte sich die Glycinaufnahme parallel mit der Proteinexpression vermutlich dadurch, dass transfizierte Zellen abstarben, wie deutlich in den Immunfärbungen zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). Die

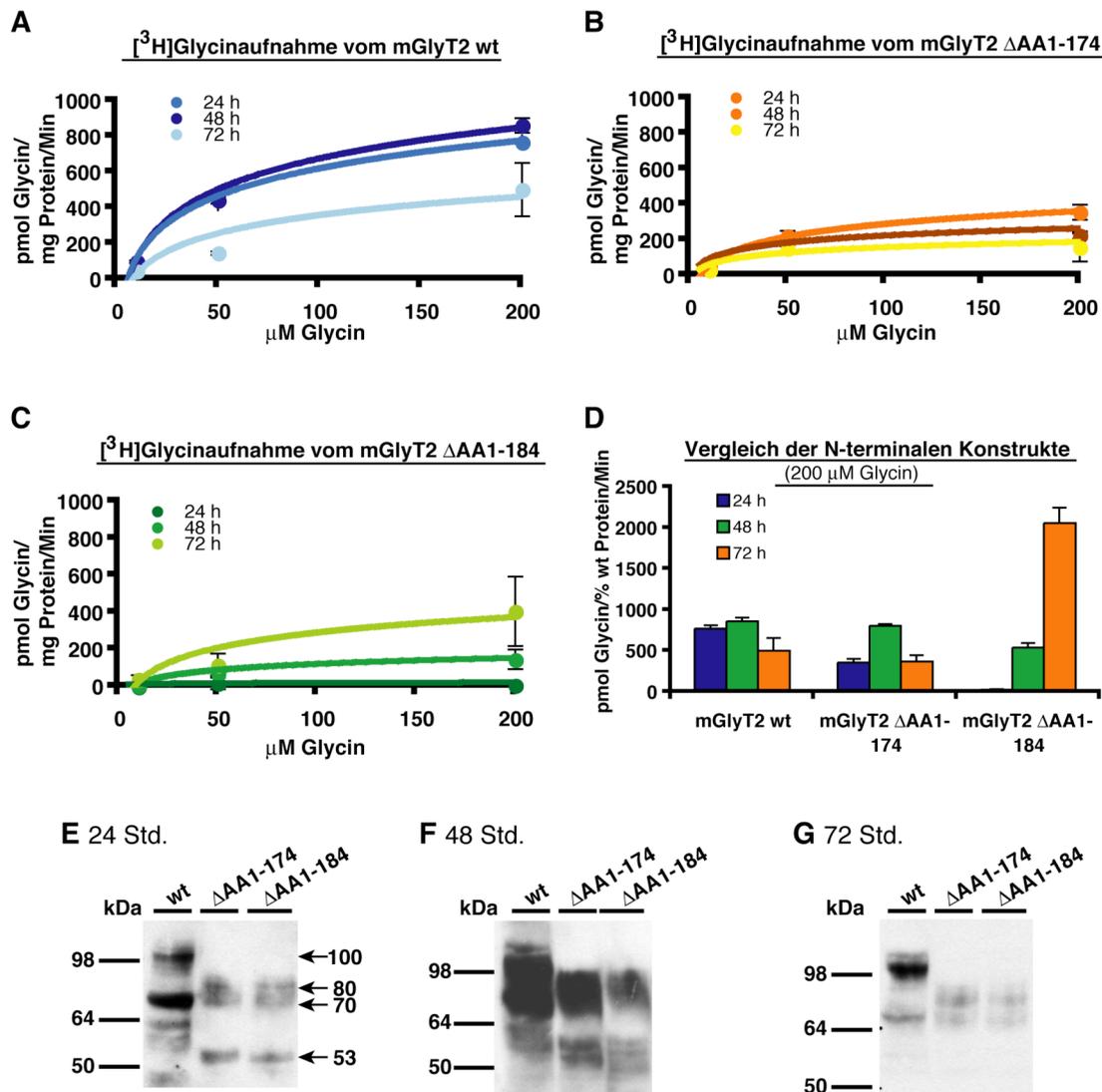


Abbildung 3-19: $[^3\text{H}]$ Glycinaufnahme der N-terminalen Konstrukte zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transfektion. HEKT-Zellen wurden transfiziert und nach 8 Std. auf jeweils drei Platten verteilt, die dann nach 24 Std., 48 Std. oder 72 Std. im Glycinaufnahme-Experiment oder im Western Blot (E-G) analysiert wurden. Die Glycinaufnahme-Experimente für die jeweiligen Zeitpunkte sind in **A** für den mGlyT2 wt, in **B** für die Mutante $\Delta\text{AA1-174}$ und in **C** für $\Delta\text{AA1-184}$ dargestellt. In **D** werden die Einzelaufnahme-Experimente miteinander verglichen. Hierfür wurden die Western Blot-Banden auf den 48h-Wert vom GlyT2 wt normiert. **E-G**, für jeden Zeitpunkt wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Jeweils 35 μg Gesamtprotein wurden aufgetragen und mit einem GlyT2-Erst- (Chemicon) und einem Meerschweinchen-HRP-Zweitantikörper detektiert.

Glycinaufnahme durch die Deletionsmutante Δ AA1-174 erreichte nach 24 Std. etwa 80 Prozent des nach 48 Std. gemessenen Wertes. Nach 72 Std. sank die Glycinaufnahme vergleichbar mit dem wt um ca. 40 Prozent ab (Abbildung 3-19 B). Die insgesamt etwas geringere Glycinaufnahme für diese Mutante ist wahrscheinlich durch die geringere Proteinexpression zu erklären (siehe Abbildung 3-19 E-G, jeweils zweite Spalte). Nach 48 Std. könnte die noch nicht überladene Transportmaschinerie noch mehr GlyT2 an die Zelloberfläche transportiert haben. In der längeren Deletionsmutante Δ AA1-184 nahm die Glycinaufnahme hingegen über den gesamten analysierten Zeitraum kontinuierlich zu (Abbildung 3-19 C und D). Während nach 24 Std. nur eine minimale Glycinaufnahme messbar war, stieg sie nach 48 Std. deutlich an und verdoppelte sich nach 72 Std. erneut. Die Analyse der Western Blots zeigte aber, vergleichbar zu den beiden vorherigen Konstrukten, die stärkste Proteinexpression nach 48 Std. und nicht nach 72 Std. (Abbildung 3-19 E-G, jeweils dritte Spalte). Da sich auf Proteinebene das Expressionsniveau nicht wesentlich unterschied, können diesen Unterschieden keine veränderte Membraninsertion oder der Internalisierung zugrunde liegen. Die Zunahme der Glycinaufnahme kann unterschiedliche Ursachen haben: zum einen könnte sich der Plasmamembrananteil des mGlyT2 Δ AA1-184 durch eine langsamere Insertion in die Plasmamembran auch noch nach 48 Std. erhöhen. Dieser Annahme widerspricht jedoch, dass in einer parallel durchgeführten Oberflächenbiotinylierung von diesem Aufnahme-Experiment nicht mehr GlyT2-Protein in der Plasmamembran nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Zum anderen erscheint möglich, dass die N-terminale Domäne, insbesondere die 10 Aminosäuren, die in dieser Mutante zusätzlich deletiert wurden, eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des GlyT2 in seiner nativen Konformation spielen. Das Fehlen dieser Reste verlangsamt die konformationelle Reifung des Transporters.

3.1.8 Analyse der EGFP-markierten N-terminalen Deletionsmutanten

Die Expression der GlyT2-Konstrukte, die am C-terminalen Ende eine EGFP-Markierung trugen, wurde in einer Western Blot-Analyse untersucht (Abbildung 3-20). Der mGlyT2 wt-EGFP zeigte bei 130, 100 sowie bei 90 kDa Proteinbanden, wobei letztere nur bei starker Überexpression auftrat und dem unglykosylierten GlyT2 entsprach. Bei den EGFP-markierten Mutanten Δ AA1-174 und Δ AA1-184 wurden drei Banden bei 110, 90 und 70 kDa identifiziert. Die oberen beiden Banden stellten vermutlich wie beim wt unterschiedliche Glykosylierungsstufen des GlyT2 dar.

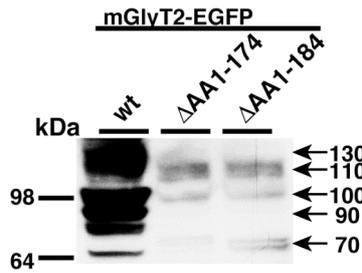


Abbildung 3-20: Western Blot-Analyse des mGlyT2-EGFP. HEKT-Zellen wurden mit mGlyT2 wt-EGFP, Δ AA1-174-EGFP oder Δ AA1-184-EGFP transfiziert. Nach 48 Std. wurden die Zellen lysiert, 30 μ g des Gesamtlysats in einer SDS-PAGE analysiert und mit einem EGFP-Erst- (JL-8) und einem Maus-HRP-Zweitantikörper detektiert.

Anschließend erfolgte eine Lokalisationsanalyse der EGFP-markierten GlyT2-Konstrukte in HEKT-Zellen. Interessanterweise konnte nur der mGlyT2 wt-EGFP an der Plasmamembran detektiert werden, der zudem keine Kofärbung mit dem dsRed-ER2-Marker aufwies (Abbildung 3-21). Im Gegensatz dazu führte die C-terminale Fusion von EGFP in den Mutanten Δ AA1-174-EGFP und Δ AA1-184-EGFP zu einer vollständigen Kolokalisation mit dem ER-Marker. Beide Mutanten wurden nicht an der Plasmamembran gefunden, obwohl im Western Blot komplex

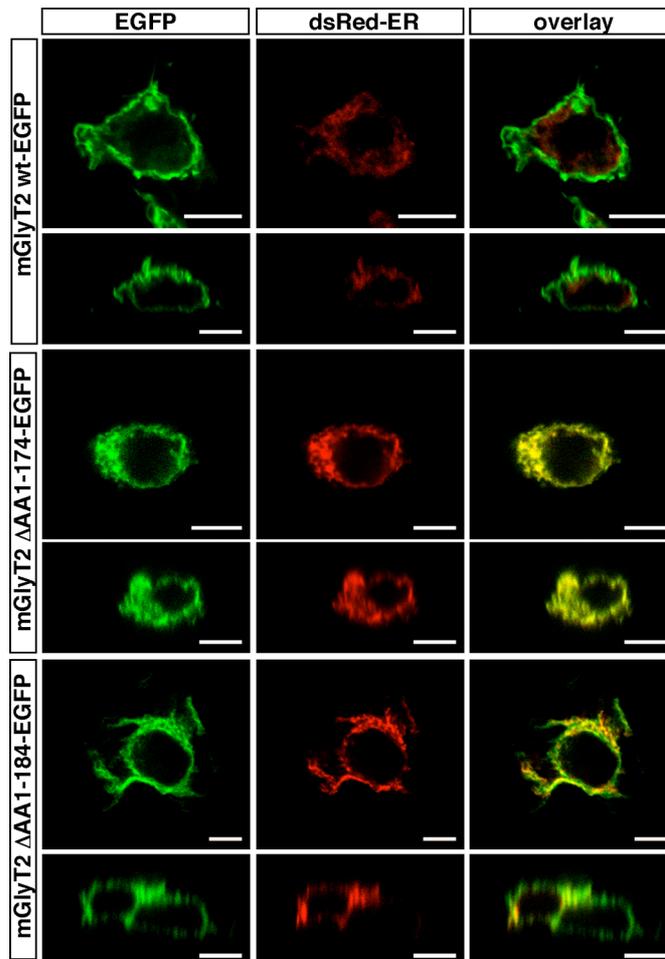


Abbildung 3-21: Lokalisation von EGFP-markierten mGlyT2 wt, Δ AA1-174 und Δ AA1-184 in transient transfizierten HEKT-Zellen. Die Zellen wurden 48 Std. vor der Färbung mit dem jeweiligen mGlyT2 und einem dsRedER-Marker kotransfiziert. Längenstandard, 8 μ m.

glykosylierte Formen nachgewiesen wurden (Abbildung 3-20). Dieses Ergebnis ließ sich in anderen Zelllinien, wie COS-7-Zellen, reproduzieren (Daten nicht gezeigt). Die GlyT2 wt-EGFP, Δ AA1-174-EGFP und Δ AA1-184-EGFP Konstrukte wurden analog zu den unmarkierten Konstrukten im [3 H]Glycinaufnahme-Experiment getestet. Interessanterweise zeigte neben den Deletionsmutanten Δ AA1-174 und Δ AA1-184 auch der mGlyT2 wt-EGFP keine Glycinaufnahme, obwohl in der Lokalisationsanalyse eine Plasmamembranfärbung nachzuweisen war (Abbildung 3-22). Folglich beeinträchtigt die C-terminale Fusion des GlyT2s mit EGFP die Funktionalität des GlyT2s, beispielsweise durch das Maskieren von C-terminalen Erkennungssequenzen oder durch die Ausbildung einer falschen Sekundärstruktur der C-terminalen Domäne.

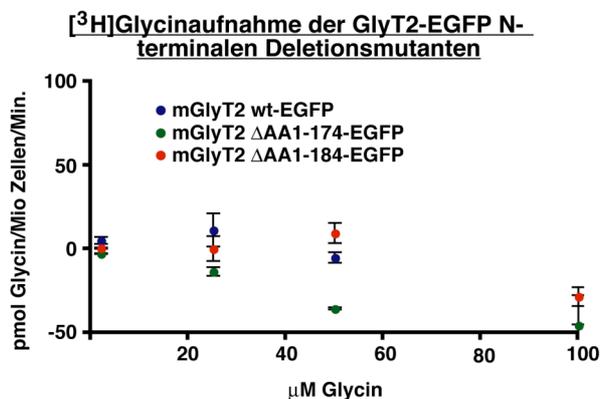
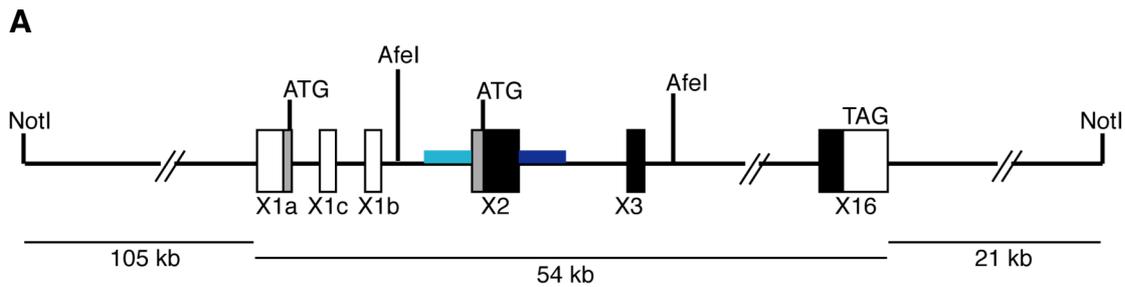


Abbildung 3-22: [3 H]Glycinaufnahme-Experiment der EGFP-markierten N-terminalen Deletionsmutanten in HEKT-Zellen. Die HEKT-Zellen wurden transient mit mGlyT2 wt-EGFP (blau), Δ AA1-174-EGFP (grün) oder Δ AA1-184-EGFP (rot) transfiziert und nach 48 Std. gemessen.

3.1.8.1 Herstellung der myc-markierten Konstrukte und Überprüfung der Funktionalität

Für die N-terminalen Deletionsmutanten sollten Epitop-markierte GlyT2s generiert werden, die ihre Funktionalität behalten aber eine Unterscheidung zum endogenen GlyT2 ermöglichen. Hierfür wurde eine myc-Markierung in die cDNA-Sequenz inseriert. Diese myc-markierten GlyT2s wurden für die Generierung von transgenen Mäusen verwendet. Der Insertionsort wurde innerhalb der GlyT2-Sequenz so gewählt, dass das Transgen die myc-Markierung in allen drei Isoformen exprimiert. Das Start-ATG für die GlyT2a-Isoform liegt im Exon 1a, während für die beiden anderen Isoformen b und c das Start-ATG im Exon 2 liegt (Abbildung 3-23 A). Das myc-Epitop wurde fünf Aminosäuren hinter dem ATG in Exon 2 eingefügt und wird folglich von allen drei Isoformen transkribiert (Abbildung 3-23 B). Zur Erleichterung der Identifizierung des Transgens wurde eine zusätzliche AfeI-Restriktionsstelle durch Primermutagenese generiert, indem ein einzelnes Nukleotid an der Position 12 von einem Thymin zu einem Cytosin mutiert wurde, das zu einer sog. stillen Mutation führt. Alle Konstrukte wurden sequenziert.



B mGlyT2a wt myc13:

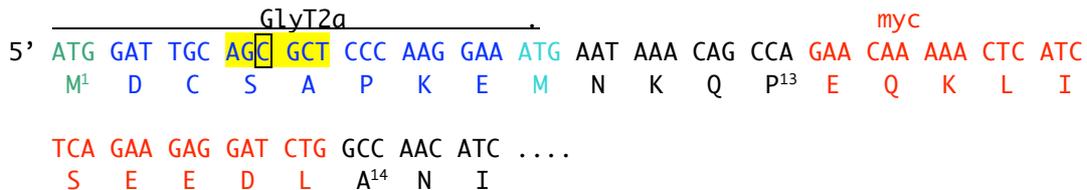


Abbildung 3-23: Schematische Darstellung der myc-Insertion in den mGlyT2. A, genomischer GlyT2-Lokus. Das Start-ATG des mGlyT2a liegt in Exon 1a (X1a). Das zweite Start-ATG, das von den mGlyT2b- und c-Isoform verwendet wird, liegt in Exon 2 (X2). **B,** Insertion der myc-Markierung im GlyT2 wt. Das myc-Epitop (rot) wurde 13 Aminosäuren nach dem Start ATG der mGlyT2a-Isoform (grün) eingefügt. Das Start-ATG für die mGlyT2b und c-Isoformen ist in hellblau dargestellt. Die durch Primermutagenese entstandene Afel-Restriktionsseite wurde farblich (gelb) unterlegt.

Als eukaryotischer Expressionsvektor für die Initialexperimente, in denen die Funktionalität der Konstrukte überprüft wurde, diente der pcDNA3.1(+). Die myc-markierten GlyT2-Konstrukte wurden im Western Blot, in Immunfärbungen und in Glycinaufnahme-Experimenten charakterisiert, um festzustellen, ob die Insertion des myc-Epitops sich auf die Eigenschaften des mGlyT2 wt und der beiden Deletionsmutanten auswirkt (Abbildung 3-24). Die transfizierten HEKT-Zellen wurden nach 48 Std. in einem Western Blot analysiert und mit einem GlyT2- (Abbildung 3-24 A) bzw. mit einem myc-spezifischen Antikörper detektiert (Abbildung 3-24 B). Mit beiden Antikörpern konnte der mGlyT2 wt bei ca. 100 und 70 kDa detektiert werden, während die beiden Mutanten Banden bei 85 und 53 kDa aufwiesen. In den Mutanten war die Transfektionseffizienz in den HEKT-Zellen geringer. Der myc-Antikörper wies bei ungefähr 50 kDa eine Bande auf, die die *core*-glykosylierte Bande der Deletionsmutanten teilweise überlagerte. Diese Bande trat ebenfalls in untransfizierten HEKT-Zellen (co) auf und repräsentierte eine unspezifische Hintergrundbande. Die Lokalisation wurde in Immunfärbungen von HEKT-Zellen überprüft (Abbildung 3-24 C). Alle Konstrukte waren an der Plasmamembran zu finden und unterschieden sich nicht von den unmarkierten GlyT2-Konstrukten. Ob die Insertion der myc-Markierung die Funktionalität des GlyT2 an der Plasmamembran beeinflusst, wurde in Glycinaufnahme-Experimenten untersucht (Abbildung 3-24 D). Der wt zeigte die höchste Glycinaufnahme, die Mutante Δ AA14-174 myc13,

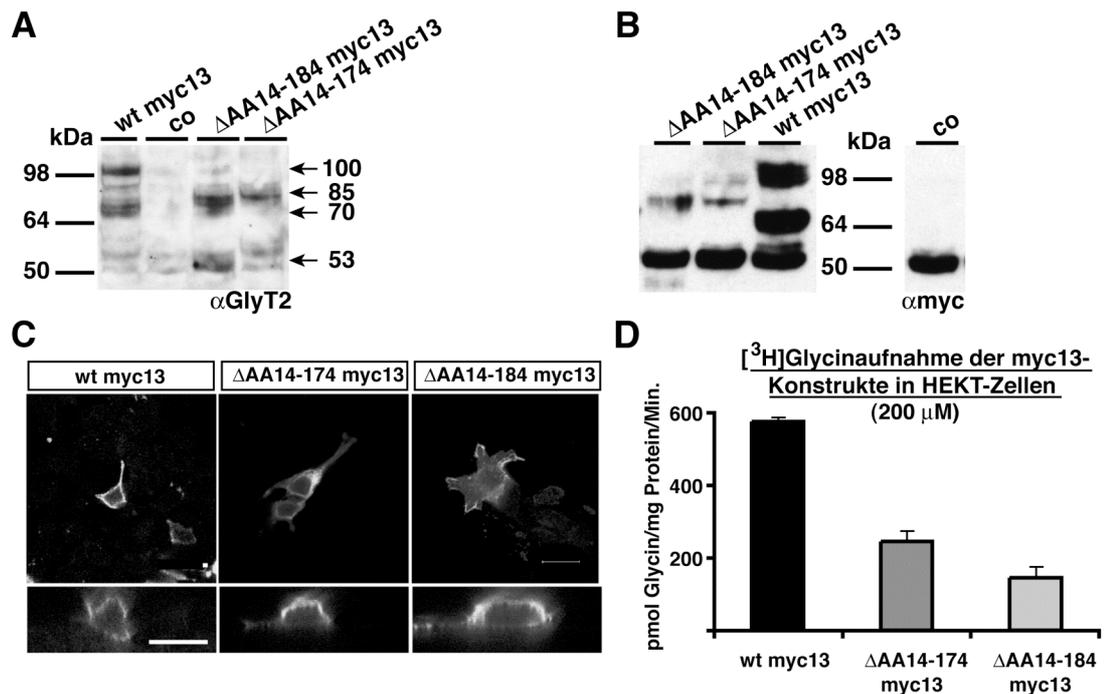


Abbildung 3-24: Analyse der mGlyT2a myc13-Konstrukte in HEK2-Zellen. Die Zellen wurden transient mit mGlyT2a wt myc13, ΔAA14-174 myc13 und ΔAA14-184 myc13 transfiziert und nach 48 Std. analysiert. 30 μg der Zelllysate wurden einer Western Blot-Analyse unterzogen und in **A** mit einem GlyT2-Erst- und einem Meerschweinchen-HRP-Zweitantikörper angefärbt. In **B** erfolgte die Detektion mit einem myc- (9E10) und einem Maus-Hup-Antikörper. **C**, Immunfärbung mit einem myc-Erst- und einem Maus-Alexa488-Zweitantikörper. **D**, [³H]Glycinaufnahme-Experiment mit GlyT2 myc13-transfizierten Zellen. Längenstandard, 8 μm.

die weniger stark exprimiert wurde (Abbildung 3-24 B), zeigte eine ca. 50% reduzierte Glycinaufnahme. Die Mutante ΔAA14-184 myc13 zeigte eine etwa 50%ige Reduktion der Glycinaufnahme verglichen mit der längeren Mutante, obwohl beide etwa gleich stark exprimiert wurden (vgl. Abbildung 3-24 B). Somit behielten der myc-markierte GlyT2 wt und die beiden Deletionsmutanten die Eigenschaften bei, die bereits mit den unmarkierten Konstrukten zu beobachten waren. Aus diesen Ergebnissen konnte zudem geschlossen werden, dass die ersten 13 Aminosäuren am N-terminalen Ende des GlyT2 für die Plasmamembranlokalisation und den Substrattransport nicht wichtig sind.

3.1.9 Lokalisation in hippocampalen Neuronen

Die Lokalisation der N-terminalen Deletionsmutanten wurde auch in Neuronen analysiert. Analog zu den C-terminalen Mutanten wurden HCN DIV10 mit den entsprechenden myc13-markierten Konstrukten transfiziert und nach drei Tagen evaluiert.

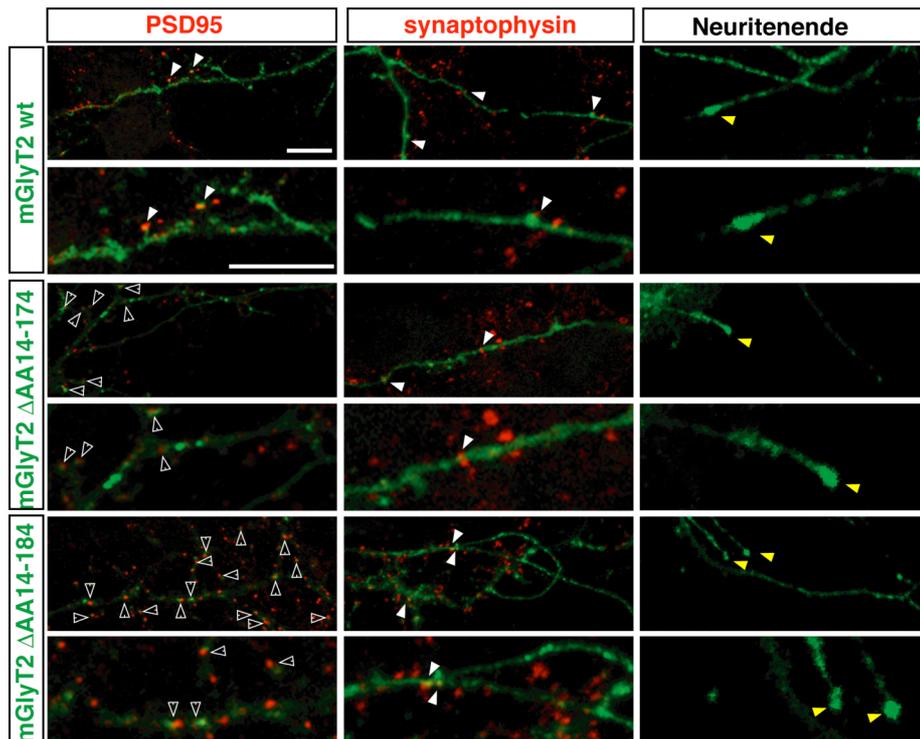


Abbildung 3-25: Transfektion von N-terminalen Deletionsmutanten in HCN. Die HCN wurden am E18,5 präpariert und an DIV10 mit mGlyT2a wt myc13, Δ AA14-174 myc13 oder Δ AA14-184 myc13 transfiziert und an DIV13 fixiert. Es erfolgte eine Kofärbung mit endogenen Marker wie PSD95 und Synaptophysin. Am distalen Ende von Neuriten traten zudem ebenfalls Anreicherungen der GlyT2-Immunreaktivität auf (gelbe Pfeilspitzen). Längenstandard, 8 μ m.

Die transfizierten GlyT2-Konstrukte waren in allen Neuriten, Axonen und Dendriten, zu finden. In den mit mGlyT2a wt myc13-transfizierten Neuronen konnte im Axon eine teilweise Kolokalisation mit dem postsynaptischen Marker PSD95 beobachtet werden, die in den Mutanten nicht oder nur selten auftrat (Abbildung 3-25, weiße Pfeile). Hier konnte hingegen in den Dendriten eine Kolokalisation mit PSD95 gezeigt werden (Abbildung 3-25, offene Pfeilspitzen). Zusätzlich erfolgte eine Kofärbung der GlyT2s mit dem präsynaptischen Vesikelprotein Synaptophysin, die ebenfalls eine häufigere Kolokalisation des mGlyT2 wt mit Synaptophysin zeigte als die Deletionsmutanten. Die Kofärbung mit MAP2, einem dendritischen Protein, ergab, dass im mGlyT2 wt myc13 die langen Spines mit hoher GlyT2-Immunreaktivität nicht mit dem dendritischen Marker MAP2 kolokalisieren. Hingegen sind die Anreicherungen an GlyT2-Immunreaktivität in den Mutanten meistens in MAP2-positiven Neuriten zu finden. Zudem traten insbesondere in den distalen Enden der transfizierten Neuronen GlyT2-Anreicherungen auf (Abbildung 3-25, gelbe Pfeilspitzen).

Somit bewirkt die Deletion der N-terminalen Domäne eine Veränderung der GlyT2-Lokalisation in HCN. Idealerweise sollte eine solche Analyse allerdings in Zellen durchgeführt werden, die hohe endogene GlyT2-Expression haben, um sicherzustellen, dass eine effiziente Transportmaschinerie für dieses Genprodukt

vorhanden ist, wie beispielsweise in Rückenmarksneuronen. Diese lassen sich allerdings nur schlecht transfizieren. Aus diesem Grund wurden zusätzlich transgene Methoden zur Analyse dieser Domäne hinzugezogen.

3.1.10 Zusammenfassung der Ergebnisse der N-terminalen GlyT2-Mutanten

Die Analyse der N-terminalen Domäne hat gezeigt, dass die Deletion von 174 Aminosäuren die Plasmamembraninsertion, die Glycinaufnahme oder die Glykosylierung in Zelllinien nicht beeinträchtigt (unmarkierte und myc13-markierte GlyT2-Konstrukte). Die Deletion von weiteren zehn Aminosäuren (mGlyT2 Δ AA1-184) bewirkte hingegen eine über 60%ige Reduzierung der Glycinaufnahme, bei unveränderter qualitativer und quantitativer Oberflächenlokalisierung (Tabelle 3-5). Eine Analyse der Transportaktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten zeigte, dass diese im beobachteten Zeitraum stetig anstieg, mit einer sehr geringen Glycinaufnahme 24 Std. und der höchsten 72 Std. nach der Transfektion. Die Ursache hierfür könnte in einem verlangsamten intrazellulären Transport oder einer geringeren Stabilität des mGlyT2 Δ AA1-184 liegen.

Tabelle 3-5: Zusammenfassung der N-terminalen Deletionsmutanten. PM, Plasmamembran.

Konstrukt	Lokalisation	Glycin-aufnahme	Western Blot	Biotinylierung	PGNaseF
mGlyT2b wt	PM	funktional	100 + 70 kDa	100 kDa	64 kDa
mGlyT2 Δ AA 1-174	PM	vergleichbar zum wt	85 + 53 kDa	85 kDa	45 kDa
mGlyT2 Δ AA 1-184	PM	< 60% vom wt	85 + 53 kDa	85 kDa	40 kDa
mGlyT2a wt myc13	PM	wie mGlyT2b wt	100 + 70 kDa	100 kDa	60 kDa
mGlyT2 Δ AA 14-174 myc13	PM	vergleichbar zum wt	85 + 53 kDa	85 kDa	45 kDa
mGlyT2 Δ AA 14-184 myc13	PM	\leq 60% vom wt	85 + 53 kDa	85 kDa	40 kDa

Die Bedeutung der N-terminalen Domäne für die Lokalisation des GlyT2 wurde in HCN untersucht. Der wt wie auch die Deletionsmutanten konnten in distalen Neuritenenden nachgewiesen werden. Zudem zeigte das wt-Protein eine partielle axonale Anreicherung des GlyT2 in Puncta, die mit synaptischen Markern kolokalisierten, während die Deletionsmutanten zur Bildung von immunreaktiven Clustern in MAP2-positiven Neuriten neigten. Die N-terminale Domäne könnte somit wichtig für die Sortierung des GlyT2 in Neuronen sein. Die Deletion dieser Domäne führt zu einer bevorzugt dendritischen Lokalisation.

3.1.11 Generierung BAC-transgener Mauslinien

3.1.11.1 Generierung von GlyT2-BAC-transgenen Mäusen

Die Analyse der N-terminalen Deletionsmutanten in Zellkultursystemen wies darauf hin, dass die N-terminale Domäne wichtig für die Lokalisation in HCN ist. Der mGlyT2 Δ AA1-184 zeigte zudem eine reduzierte Glycinaufnahme-Aktivität in HEKT-Zellen, die für eine Protein-stabilisierende Funktion spricht. Insbesondere die Überexpression der einzelnen Konstrukte in Zellkulturen ermöglicht jedoch nur begrenzt eine Lokalisationsanalyse. So kann die Überexpression von Proteinen in Neuronen zu Sekundäreffekten führen, wie einer Fehllokalisierung von axonalen Proteinen in den Dendriten, die *in vivo* keine Rolle spielen. Aber auch in HEKT-Zellen wurde mit anderen Familienmitgliedern der *SLC6*-Familie beobachtet, dass eine starke Überexpression von beispielsweise Dopamintransporter (DAT)-Mutanten zu einer Oberflächenlokalisierung führt, während in schwach exprimierenden stabil transfizierten Zellen die Transporter intrazellulär verbleiben (U. Gether, persönliche Kommunikation). Eine zusätzliche Schwierigkeit stellt die Entwicklung von Neuronen in Kultur dar, die nicht mit postnatalen oder adulten Stadien verglichen werden kann. Insbesondere für den GlyT2 spielt dies eine wichtige Rolle, da das GlyT2-Gen *in vivo* erst in späten pränatalen Stadien angeschaltet wird. Zunächst wurde die endogene GlyT2-Immunreaktivität in Rückenmarksneuronen analysiert, um den Zeitpunkt festzustellen, an dem eine nahezu adulte Lokalisation in Neuronen auftritt. Auch nach 21 Tagen in Kultur (DIV21) konnte jedoch keine adulte GlyT2-Färbung beobachtet werden, die in Schnittpräparaten axonale Puncta zeigt (Abbildung 3-26).

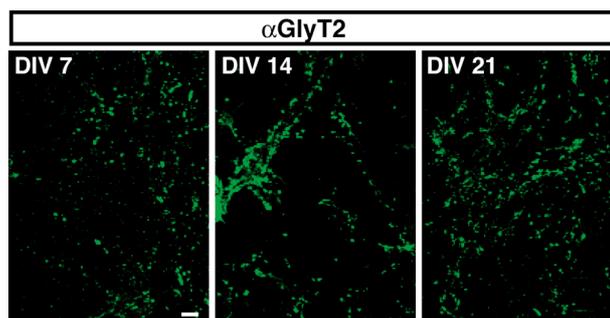


Abbildung 3-26: Immunfärbungen von Rückenmarkskulturen. Der endogene GlyT2 wurde mit einem N-terminalen GlyT2-Antikörper und einem Kaninchen-Alexa488-Zweitantikörper zu unterschiedlichen Zeitpunkten angefärbt (DIV7, DIV14, DIV21). Längsstandard, 8 μ m.

Zudem stellte sich eine Transfektion dieser Zellen als sehr schwierig heraus. Die charakteristische punktierte GlyT2-Immunreaktivität trat nicht nur im Axon auf, sondern in allen Neuriten. Phänotypische Ausprägungen und Effekte auf die Nervenweiterleitung im Organismus bleiben zudem in Zellkultursystemen verborgen. Um die *in vivo* Funktion der N-terminalen Domäne zu entschlüsseln, wurden in dieser

Arbeit transgene Mäuse generiert, die ein myc-markiertes GlyT2-Protein unter der Kontrolle des endogenen GlyT2-Promotors exprimieren. Zu diesem Zweck wurden BAC-transgene Konstrukte mittels eines homologen Rekombinationssystems erstellt, das von N. Heintz entwickelt wurde (Gong *et al.*, 2002). Dieses System hat gegenüber klassischen transgenen Techniken den Vorteil, dass ein BAC-Transgen, im Gegensatz zur Verwendung von starken Promotoren wie dem β -Aktinpromotor, normalerweise nur schwach überexprimiert und aufgrund des GlyT2-Promotors nur in endogenen GlyT2-Regionen transkribiert wird. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, diese BAC-transgenen GlyT2-Mäuse mit den GlyT2-defizienten Mäusen zu verpaaren, um festzustellen, ob der Phänotyp der GlyT2 $-/-$ Mäuse durch Expression der jeweiligen Mutanten kompensiert werden kann. Es sollten zunächst Konstrukte für die transgene Expression von GlyT2 wt, Δ AA14-174 und Δ AA14-184 generiert werden.

3.1.11.2 Strategie der Insertion der veränderten cDNAs in den BAC

Nachdem überprüft wurde, dass die Insertion des myc-Epitops im N-Terminus die Eigenschaften der unmarkierten Transporter nicht veränderte (Abbildung 3-24), wurde mit der Klonierung der BAC-transgenen Konstrukte begonnen. Es wurde eine Strategie gewählt, in der das Exon 2 des BAC-Klons, der von U. Zeilhofer zur Verfügung gestellt wurde (Zeilhofer *et al.*, 2005), durch die myc-markierte wt cDNA bzw. durch die N-terminalen Deletionsmutanten ausgetauscht wurde. Zusätzlich zu der GlyT2-cDNA wurde eine pA-Kassette und eine FRT-Erkennungssequenz, die von der Flp-Rekombinase erkannt wird, inseriert. Zunächst wurden die Homologiearme subkloniert; dieses sind Regionen von etwa 500 bp, die homolog zur den flankierenden Intronsequenzen des Exons 2 sind. Anschließend erfolgte eine zweite PCR mit dem Homologiearm A und dem GlyT2a wt myc13-Protein. Das amplifizierte Fragment wurde über eine 5'-gelegende Sall- und eine 3'-gelegende HpaI-Schnittstelle in den mGlyT2/pBS eingesetzt. Aus diesem Vektor wurde der Homologiearm A inklusive der mGlyT2 cDNA mittels der Sall- am 5'-Ende und der EcoRI-Schnittstelle am 3'-Ende herausgeschnitten und in den FRT/pBS ligiert (Abbildung 3-27 A und B). Anschließend erfolgte die Insertion des Homologiearms B über eine interne XbaI-Restriktionsseite in der FRT-Erkennungssequenz und der NotI-Schnittstelle im pBS-Vektor (Abbildung 3-27 C). Über eine „Blunt-end“-Ligation wurde eine pA-Kassette in den mit EcoRI geschnittenen Vektor eingefügt (Abbildung 3-27 D). Die fertige Targetingkassette wurde über die beiden flankierenden Sall-Restriktionsstellen in den Shuttle Vektor pSV1.recA kloniert (Abbildung 3-27 E). Dieser Vektor hat zwei entscheidende Vorteile, zum einen exprimiert er das RecA-Protein, das eine homologe Rekombination ermöglicht, zum anderen hat er einen temperatursensitiven Replikationsursprung (ORI) und ist bei Temperaturen über 30°C replikationsinkompetent.

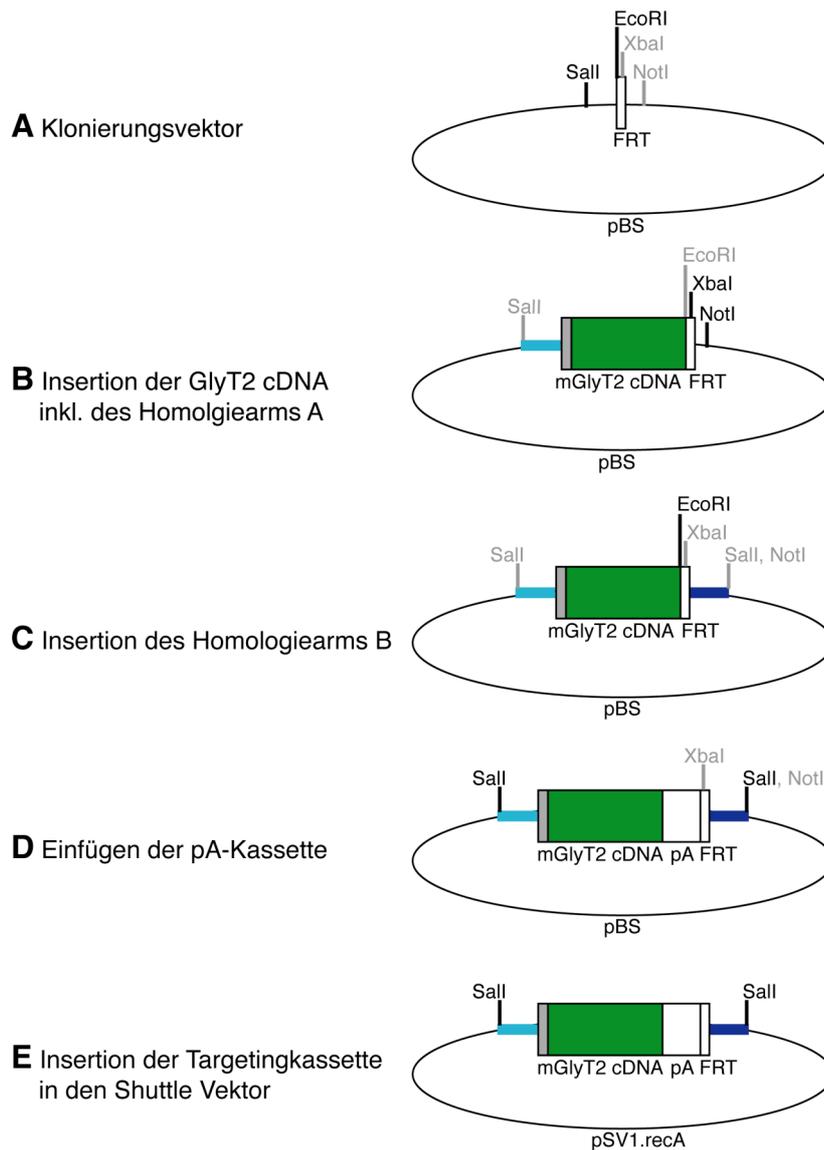
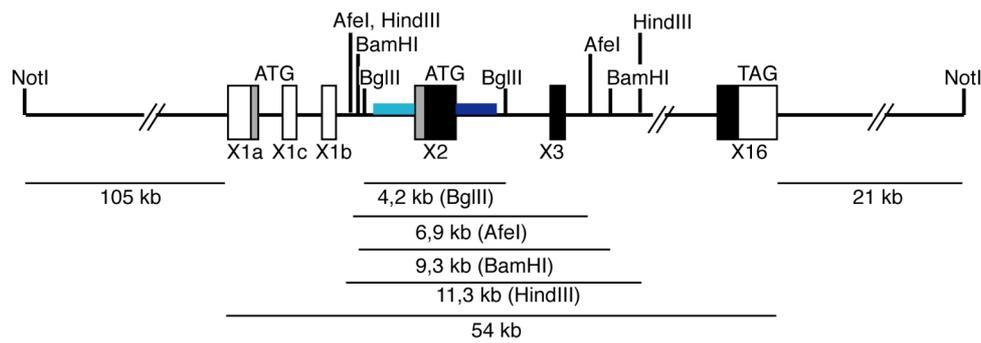
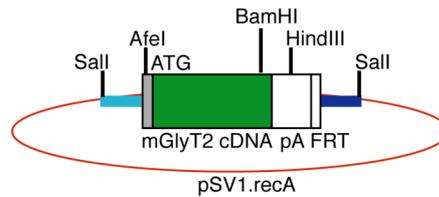
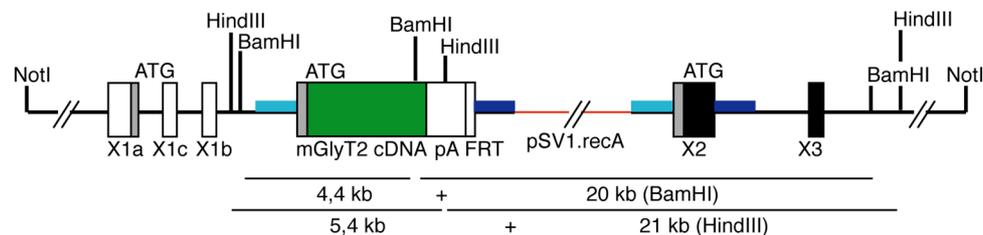
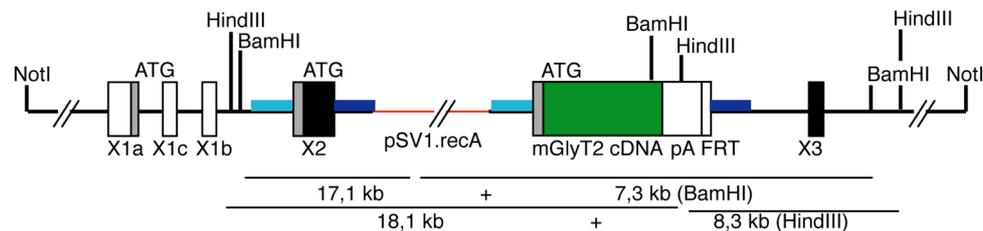
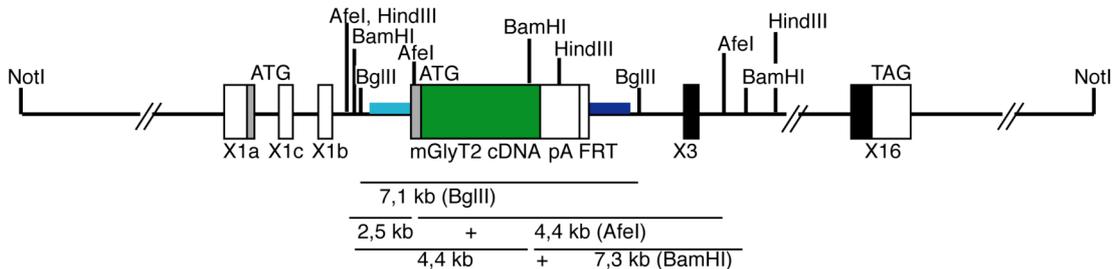


Abbildung 3-27: Generierung des Targetingvektors. Ausgangsvektor war ein pBS-Vektor mit einer FRT-Erkennungssequenz (A). In diesen Vektor wurde über die Sall- und die EcoRI-Schnittstellen der Homologiearm A mit der mGlyT2 cDNA (hellblau-grau/grün) kloniert (B). Anschließend folgte die Insertion des Homologiearms B (blau) über die XbaI- und die NotI-Schnittstelle (C). Zuletzt wurde die pA-Kassette (weiß) über eine „Bluntend“-Ligation in die EcoRI-Schnittstelle inseriert (D). Die fertige Targetingkassette wurde über die flankierenden Sall-Restriktionsseiten in den Shuttlevektor pSV1.recA kloniert (E). Die im folgenden Schritt verwendeten Schnittstellen sind jeweils in schwarz dargestellt. Zur Orientierung sind weitere wichtige Restriktionsschnittstellen in grau angegeben.

Der Targetingvektor wurde in BAC-kompetente *E. coli*-Zellen kotransfiziert und auf Tetracyclin/Chloramphenicol Platten bei 30°C ü. N. inkubiert. Anschließend wurden bis zu zwölf Einzelkolonien von dieser Platte auf jeweils zwei Tetracyclin/Chloramphenicol-Platten ausgestrichen und eine Platte bei 30°C und die andere bei 43°C ü. N. inkubiert. Während auf der 30°C-Platte ein Bakterienrasen wuchs, waren auf der 43°C-Platte ausschließlich Einzelkolonien vorhanden. Diese Einzelkolonien hatten den temperatursensitiven Targetingvektor entweder in den Original BAC oder

A Original BAC**B** Targetingvektor**C** Integration in Homologiearm A**D** Integration in Homologiearm B**E** modifizierter BAC**Abbildung 3-28: Klonierungsstrategie zur Herstellung der BAC-transgenen Mäuse.**

Schematische Darstellung der Struktur des BAC RPC123 365E4 (A), des Targetingvektors (B), der beiden möglichen homologen Integrate (C und D) sowie des modifizierten BAC-Klons (E). Die Exons (X) sind als Rechtecke dargestellt. Die GlyT2a-Isoform spezifische Sequenz wurde hellgrau markiert und wurde im modifizierten BAC-Klon nicht verändert. Die Homologiearme (blau) und die mGlyT2 cDNA (grün) sind farblich markiert. Als mGlyT2 cDNA wurde entweder die wt- oder die cDNA der N-terminalen Deletionsmutanten inseriert. Die wichtigsten Restriktionsschnittstellen und ihre Bandengrößen im Southern Blot (für den wt) sind ebenfalls dargestellt.

in das Bakteriengenom integriert. Mittels Kolonie-PCR und Southern Blot-Analyse wurde überprüft, ob die Integration an einer zufälligen Stelle oder über ein homologes Rekombinationsereignis erfolgt war (Abbildung 3-28).

Als Southern Blot-Sonde wurde entweder der Homologiearm A oder B verwendet. Auf diesem Weg konnte sowohl für den Original BAC als auch für das Targetingvektor-Integrat eine Bande detektiert werden, die sich in ihrer Bandengröße unterschieden.

3.1.11.3 Überprüfung der Konstrukte durch Southern Blot-Analyse

Wie bereits in 3.1.11.2 erwähnt, wurden die Targetingvektor-Integrate wie auch die modifizierten BAC-Klone zunächst über eine PCR-Analyse identifiziert und die PCR-positiven Klone anschließend mittels Southern Blot-Analyse bestätigt. Dieses hat den Vorteil, dass in kürzerer Zeit mit weniger Aufwand mehr Bakterienkolonien auf ein mögliches Integrationsereignis überprüft werden konnten. Für die Kolonie-PCRs mussten die Homologiearme A und B unabhängig voneinander auf ein Integrationsereignis analysiert werden. Hierfür wurden für den Homologiearm A ein Primer 5' vom Homologiearm in der BAC-Sequenz gewählt (WA-463) und ein 3' vom Homologiearm A liegender Primer, der innerhalb der myc-Markierung lag (WA-558). Für den Homologiearm B wurde eine vergleichbare Strategie gewählt; hier wurde ein Primer in der FRT-Erkennungssequenz (WA-462, 5' vom Homologiearm B) und ein Primer in der BAC-Sequenz (WA-555, 3' vom Homologiearm B) verwendet. So konnten für den wt myc13/BAC insgesamt acht Klone identifiziert werden, in denen eine Integration stattgefunden hatte, die zu gleichen Anteilen in den Homologieregionen A oder B eintreten konnte. Für die Mutante Δ AA14-174 myc13/BAC traten 20 PCR-positive Integrate auf. In zwölf von diesen hatte die homologe Rekombination im Homologiearm A und in acht im Homologiearm B stattgefunden. Für die Mutante Δ AA14-184 myc13/BAC ergaben sich geringere Integrationsereignisse mit jeweils drei positiven Klonen im Homologiearm A bzw. B (Tabelle 3-6).

Anschließend erfolgte von den PCR-positiven Klonen eine Southern Blot-Analyse mit einer radioaktiv markierten Sonde des Homologiearms A (Abbildung 3-29). Für die Integrate waren jeweils zwei Banden zu erwarten, da der Homologiearm A in den Integraten doppelt vorkommt (vergleiche Abbildung 3-28). Die Integration ereignete sich nicht immer mit gleicher Wahrscheinlichkeit in beiden Homologiearmen (vergleiche Tabelle 3-6, Δ AA14-174 myc13, Integrat). Es traten ebenfalls Mischklone auf, die sowohl die Original BAC wie auch die Integrat-Bande aufwiesen. Diese Klone sind in der Tabelle 3-6 unter den negativen Klonen aufgeführt. Es handelt sich daher nicht um falsch-positive Klone in der PCR-Reaktion, die sich als zuverlässiges Werkzeug für die Analyse erwies. Insgesamt war der Anteil an im Southern Blot bestätigten, korrekten Integraten mit 50-100% sehr hoch.

Tabelle 3-6: Statistik zur Wahrscheinlichkeit der In- bzw. Deintegrationereignisse in den N-terminal veränderten BAC-Klonen RPC123 365E4. Es wurde mit Ausnahme des modifizierten BACs Δ AA14-184 myc13, zunächst stets eine PCR-Analyse durchgeführt. PCR-positive Klone wurden anschließend einer Southern Blot-Analyse unterzogen.

Integration wt myc13	analysierte Klone	negativ	positiv (Hom. A oder B)	Effizienz (%)
PCR	35	27	8 (4+4)	23
Southern	8	0	8 (4+4)	100
modifizierter BAC wt myc13				
	analysierte Klone	negativ	positiv	Effizienz (%)
PCR	19	13	6 (6+0)	31
Southern	6	3	3	50

Integration ΔAA14-174 myc13	analysierte Klone	negativ	positiv (Hom. A oder B)	Effizienz (%)
PCR	40	20	20 (12+8)	50
Southern	20	7	13 (1+12)	65
Modifizierter BAC ΔAA14-174 myc13				
	analysierte Klone	negativ	positiv	Effizienz (%)
PCR	10	8	2 (0+2)	20
Southern	2	1	1	50

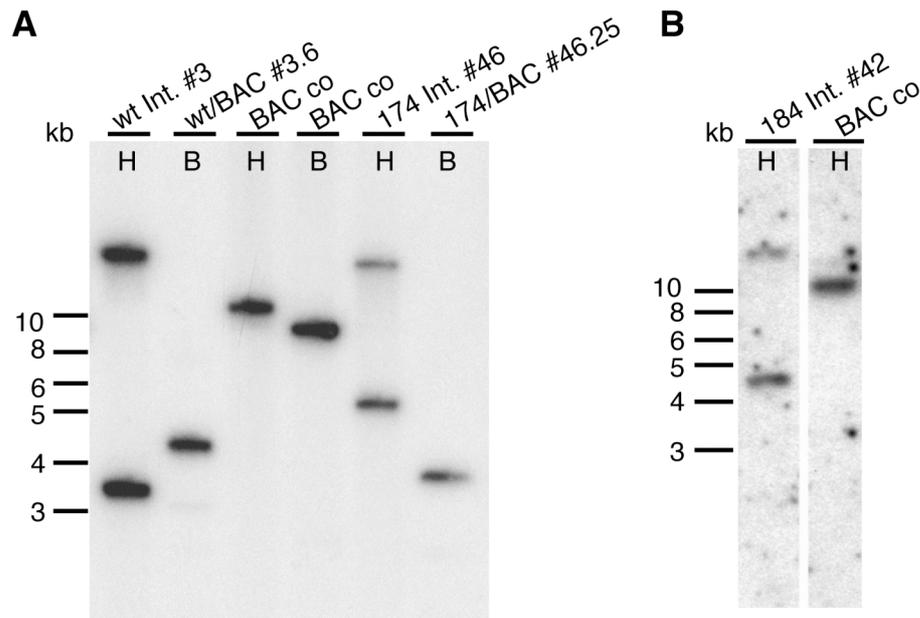
Integration ΔAA14-184 myc13	analysierte Klone	negativ	positiv (Hom. A oder B)	Effizienz (%)
PCR	48	42	6 (3+3)	17
Southern	6	3	1 (1+0)	17
modifizierter BAC ΔAA14-184 myc13				
	analysierte Klone	negativ	positiv	Effizienz (%)
PCR	-----	-----	-----	-----
Southern	11	8	3	27

Der Nachweis der modifizierten BAC-Klone, in denen eine Deintegration des pSV1.recA stattgefunden hatte, wurde auf vergleichbare Weise durchgeführt wie für die Integrate. Zunächst wurden, soweit vorhanden, für jedes Konstrukt ein Homologiearm A- und ein Homologiearm B-Integrat auf einer Chloramphenicol-Platte ausgestrichen, die die Deintegration des Shuttle Vektors pSV1.recA ermöglichen sollte. Es wurden zwischen 8 und 16 Klone auf zwei TB-Platten ausgestrichen. Auf diesem Weg wird auf das Deintegrationereignis selektiert, da Tetracyclin-resistente Kolonien auf diesen Platten nicht wachsen können, die auf lipophile, chelatbildende Agenzien hypersensitiv reagieren. Die zweite homologe Rekombination wurde erneut

über PCR- und Southern Blot-Analyse charakterisiert. Hierbei beschränkte sich die PCR auf den jeweils anderen Homologiearm der ersten PCR, d. h. Homologiearm A-Integrate wurden nur in der Homologiearm B-PCR getestet und umgekehrt. Eine endgültige Identifizierung der modifizierten BAC-Klone erfolgte über Southern Blot-Analyse. Auch hier traten u. a. Mischklone auf. Für den wt myc13 konnten insgesamt drei, für die beiden Mutanten Δ AA14-174 myc13 und Δ AA14-184 myc13 jeweils ein modifizierte BAC-Klon identifiziert werden. Die Ergebnisse der Southern Blot-Analyse sind in Abbildung 3-29 gezeigt. Repräsentativ ist für die Integration hier jeweils nur der BAC-Klon, der für die Pronukleus-Injektion verwendet wurde, dargestellt.

In dem mGlyT2a wt myc13-Integrat waren zwei Banden nach einem HindIII-Verdau und Hybridisierung mit einer radioaktiv-markierten Homologiearm A-Sonde bei 3,8 und 18 kb zu detektieren. Die Integration hatte folglich im Homologiearm B stattgefunden (Abbildung 3-28 und Abbildung 3-29 A, Spalte 1). Es ist hierbei zu beachten, dass HindIII ebenfalls im Shuttle Vektor schneidet und die Bande deswegen kleiner war als zunächst erwartet. Als Kontrolle wurde der Shuttle Vektor mit HindIII verdaut und im Southern Blot detektiert (Daten nicht gezeigt). Der modifizierte BAC für den wt/BAC ist in Spalte 2 der Abbildung dargestellt. Der Klon wurde einem BamHI-Verdau unterzogen; nach der erfolgreichen Deintegration des pSV1.recA konnte nur noch eine Bande mit einer Homologiearm A-Sonde in der Höhe von 4,4 kb detektiert werden. In den Spalten 3 und 4 sind die jeweiligen Verdau mit HindIII und BamHI für den Original BAC dargestellt. Diese zeigten jeweils nur eine Bande in der Höhe von 11 bzw. 9 kb, die sich damit deutlich von den modifizierten BAC-Klonen unterschieden. Für die Mutante Δ AA14-174 myc13 wurden im Integrat zwei Banden bei 4,9 und 21 kb detektiert. Dieses entspricht einer Integration in den Homologiearm A (Spalte 5). Nach der erfolgreichen Deintegration des pSV1.recA war nur noch eine einzelne Bande bei 3,9 kb nachzuweisen. Die Integration der Deletionsmutante Δ AA14-184 myc13 fand im Homologiearm A statt. Es waren zwei Banden nach einem HindIII-Verdau bei 4,9 und 21 kb zu sehen (Abbildung 3-29 B, Spalte 1). Nach der erfolgreichen Deintegration des pSV1.recA durch eine homologe Rekombination im Homologiearm B konnte mit HindIII nur noch eine einzelne Bande bei 4,9 kb identifiziert werden. Zusammenfassend deuteten diese Ergebnisse daraufhin, dass über die homologe Rekombination jeweils ein modifizierter BAC-Klon (mGlyT2 wt myc13, Δ AA14-174 myc13 und Δ AA14-184 myc13) erfolgreich isoliert werden konnte.

Zur weiteren Analyse der modifizierten BAC-Klone wurde eine detaillierte Restriktionsanalyse durchgeführt. Hierfür wurden vier Enzyme ausgewählt: AfeI, BamHI, BglIII und NotI. AfeI schneidet zusätzlich in der modifizierten Sequenz, in der diese Schnittstelle durch Primermutagenese eingefügt wurde. Eine BamHI-Schnittstelle kommt nur im 3'-Ende des Transgens vor, nicht jedoch im Exon 2. NotI

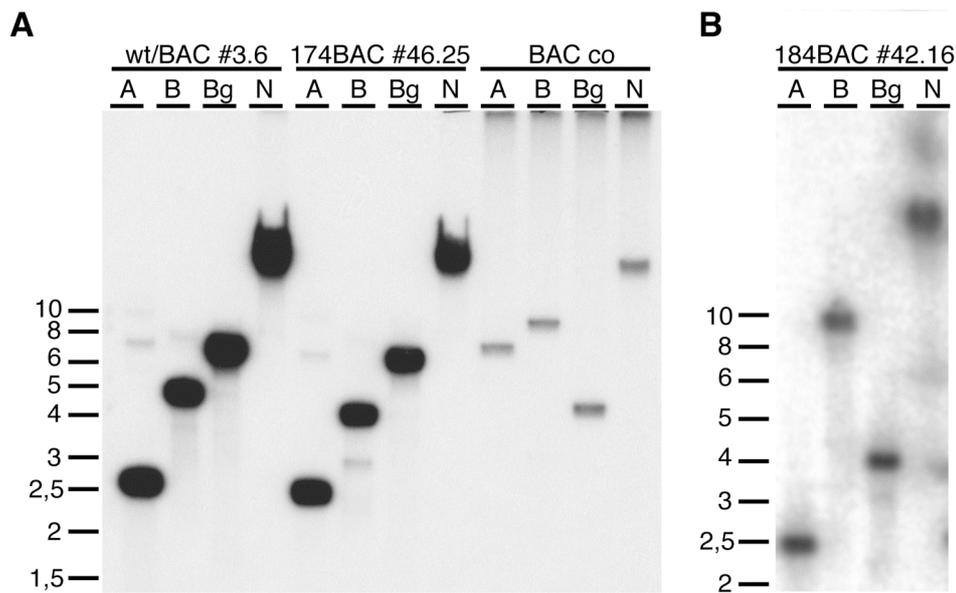


C zu erwartende Bandengrößen mit der Homologiearm A-Sonde

BAC-Klon	Integration	BamHI (B)	HindIII (H)
wt	in HomA	4,4 + 20	5,4 + 21
	in HomB	17,1 + 7,3	3,8 + 18,1
	modifizierter BAC	4,4	5,4
Mutanten	in HomA	16,6 + 7,3	4,9 + 21
	in HomB	3,9 + 20	8,3 + 17,6
	modifizierter BAC	3,9	4,9
Original BAC	Kontrolle	9,3	11,3

Abbildung 3-29: Southern Blot-Analyse der Integrate und der modifizierten BAC-Klone. **A**, für den mGlyT2a wt myc13 (wt) und die Mutante Δ AA14-174 myc13 (174) sind die jeweiligen Integrate und der modifizierte BAC-Klon des RPCI23 365E4 gezeigt. Die DNA wurde zunächst mit HindIII (H) bzw. BamHI (B) geschnitten und anschließend mit einer Homologiearm A-Sonde im Southern Blot nachgewiesen. **B**, Integrate für den BAC Δ AA14-184 myc13 (184). Die DNA wurde mit HindIII verdaut. Als Sonde wurde der Homologiearm A in der Southern Blot-Analyse verwendet. Als Kontrolle diente der unmodifizierte Original BAC (BAC co). **C**, die zu erwartenden Banden für die Integrate und modifizierten BAC-Klone. Die detektierten Banden sind fett hervorgehoben. Für die Integrate konnten je zwei Banden mit der Homologiearm A-Sonde nachgewiesen werden, während in den modifizierten BAC-Klonen der Homologiearm A nur einmal vorkommt. B, BamHI; H, HindIII. Bandengrößen in kb.

wurde verwendet, da es zum Linearisieren des BACs für die Injektion diente und nachgewiesen werden sollte, dass keine weiteren Schnittstellen im BAC vorhanden waren. BglIII schneidet nicht in der insertierten cDNA-Sequenz, und es konnte somit festgestellt werden, ob die GlyT2 cDNA mehrfach in den Original BAC integriert war. Eine Analyse der zu erwartenden Banden mit den entsprechenden Konstrukten zeigte, dass die Modifizierung für alle drei BAC-Konstrukte erfolgreich war und die jeweilige cDNA nur einmal in der BAC-Sequenz vorkam. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung der modifizierten BAC-Klone über einen CsCl-Gradienten. Die DNA wurde mit NotI linearisiert und über eine Sepharose CL4b-Säule aufgereinigt. Anschließend wurden die GlyT2/BAC-Klone in den Pronukleus einer Zygote injiziert.



C erwartete Bandengrößen

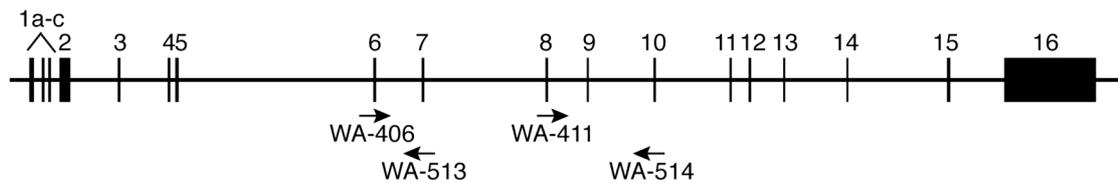
BAC-Klone	AfeI (A)	BamHI (B)	BglII (Bg)	NotI (N)
modifizierter BAC wt	2,5	4,4	7,1	ca. 180
modifizierter BAC Mutanten	2,5	3,9	6,6	ca. 180
BAC Kontrolle	6,9	9,3	4,2	ca. 180

Abbildung 3-30: Detaillierte Restriktionsanalyse der modifizierten BAC-Klone. **A**, jeweils 20 ng der CsCl-aufgereinigten modifizierten mGlyT2a wt myc13- (wt), Δ AA14-174 myc13 (174), bzw. Original BAC RPC123 365E4-DNA (BAC co) wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. **B**, analoges Experimente für die Δ AA14-184 myc13 (184) BAC-DNA. Als Sonde wurde der Homologiearm A verwendet. **C**, Übersicht der erwarteten Bandengrößen. A, AfeI; B, BamHI; Bg, BglII; H, HindIII; NotI. Bandengrößen in kb.

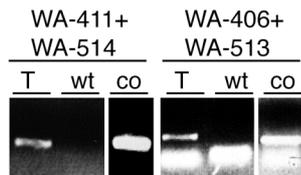
3.1.11.4 Identifizierung der „Founder“

Drei Wochen nach der Pronucleusinjektion, die anschließend in scheinsschwangere Weibchen eingesetzt wurden, wurden die Nachkommen geboren. In einigen dieser Nachkommen ist das Transgen stabil in ihr Genom integriert worden. Statistisch erfolgt diese Integration mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 20% (Rülicke, 2001). Die transgenen Tiere wurden zunächst durch PCR-Genotypisierungen identifiziert. Die aus Mausschwänzen aufgereinigte DNA wurde in mindestens zwei unterschiedlichen PCR-Reaktionen eingesetzt. Auf diesem Weg sollte sichergestellt werden, dass alle „Founder“ identifiziert werden. Hierfür wurden zwei Primerpaare (Primerpaar 1: WA-411 + WA-514, Primerpaar 2: WA-406 + WA-513) verwendet, die nur im Falle der Transgenintegration eine Bande in der PCR-Reaktion ergaben, weil die Primer auf zwei verschiedenen Exons in der genomischen DNA liegen und das generierte Fragment zwischen 2-6 kb wäre (Abbildung 3-31). Aus den Nachkommen konnten für die BAC-Mauslinie mGlyT2 wt/BAC, Δ AA174/BAC und Δ AA1-184/BAC aus den entsprechenden Würfen jeweils etwa 20-25% an transgenen Nachkommen identifiziert werden (Tabelle 3-7).

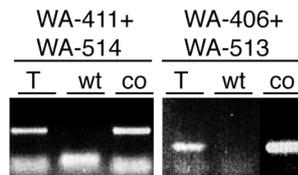
A



B wt/BAC



C 174/BAC



D 184/BAC

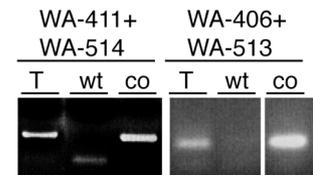


Abbildung 3-31: Genotypisierungs-PCRs für die transgenen Mauslinien. A, es wurden zwei Exon-übergreifende PCR-Reaktionen verwendet. Die Kombination aus WA-406 und WA-513 führte für das Transgen zu einer Bande von 130 bp, während die Bande von 2,3 kb für den genomischen Locus unter den verwandten Bedingungen nicht amplifiziert werden konnte. Vergleichbar verhielt es bei dem Primerpaar WA-411 und WA-514, das für das Transgen eine Bande von 310 bp amplifizierte, während die Bande von 5,3 kb für den genomischen Locus nicht nachgewiesen werden konnte. PCR für die wt/BAC- (B), Δ AA1-174/BAC- (C) und Δ AA1-184/BAC-Mauslinie (D). T, transgene Maus-DNA; + wt Maus-DNA; co, modifizierte BAC-DNA.

Alle Tiere die mindestens in einer PCR-Reaktion positiv waren, sollen in einer anschließenden Southern Blot-Analyse untersucht werden, um das PCR-Ergebnis zu bestätigen. Die transgenen Founder-Tiere werden mit C57BL/6J Mäusen verpaart, um neue transgene Mauslinie zu etablieren. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass der Founder das Transgen in seiner Keimbahn integriert hat und somit die Fähigkeit besitzt, dass Transgen an seine Nachkommen weiterzugeben.

Tabelle 3-7: Nachkommen aus der Pronukleusinjektion. Es wurden zwischen 64 und 132 Tiere pro BAC-transgene Mauslinie geboren, von denen zwischen 20 und 26,5% das Transgen integriert haben.

BAC-transgene Linie	Anzahl an Nachkommen	Anzahl an Foundern	% transgene Tiere
mGlyT2 wt/BAC	64	16	25
mGlyT2 Δ AA1-174/BAC	132	35	26,5
mGlyT2 Δ AA1-184/BAC	96	20	20,8

3.1.12 Darstellung einer GlyT2-Cre-Mauslinie

Neben den in 3.1.11.1 beschriebenen BAC-transgenen Mäusen wurde auch ein Targetingkonstrukt zur Herstellung einer Mauslinie generiert, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des GlyT2-Promotors exprimiert. Die Cre-Rekombinase erkennt sog. loxP-Erkennungssequenzen in der DNA und führt zu einer Deletion der DNA-Sequenz zwischen zwei loxP-Seiten gleicher Orientierung bzw. zu einer Inversion zwischen zwei loxP-Seiten unterschiedlicher Orientierung (Kilby *et al.*,

1993). Diese Technik kommt bei konditionalen Deletionsmutanten zum Einsatz, d. h. bei Mauslinien, in denen Gene bzw. Teile von Genen von loxP-Seiten flankiert werden. So kann ein „gefloxtes“ Gen zeitlich, wenn die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines induzierbaren Systems gesteuert wird, oder zell- und gewebsspezifisch, wenn die Cre-Rekombinase nur in einigen Zellen des Organismus exprimiert wird, ausgeschaltet werden (Branda und Dymecki, 2004). Diese Technik kommt insbesondere dann zum Einsatz, wenn es gilt die Funktion eines Gens in bestimmten Geweben oder zu einem bestimmten Zeitpunkt des Lebens zu untersuchen bzw. wenn der konventionelle Knock-out letal ist. Der GlyT2-Promotor ist in glycinergen inhibitorischen Interneuronen, vor allem im Hirnstamm und Rückenmark, aktiv. Andere Proteine, die in diesen Zellen exprimiert werden, und durch Mutagenesetechniken von loxP-Erkennungssequenzen flankiert werden, können in diesen Zellen inaktiviert werden. So ist es möglich die Funktion dieser Gene in glycinergen Neuronen zu untersuchen.

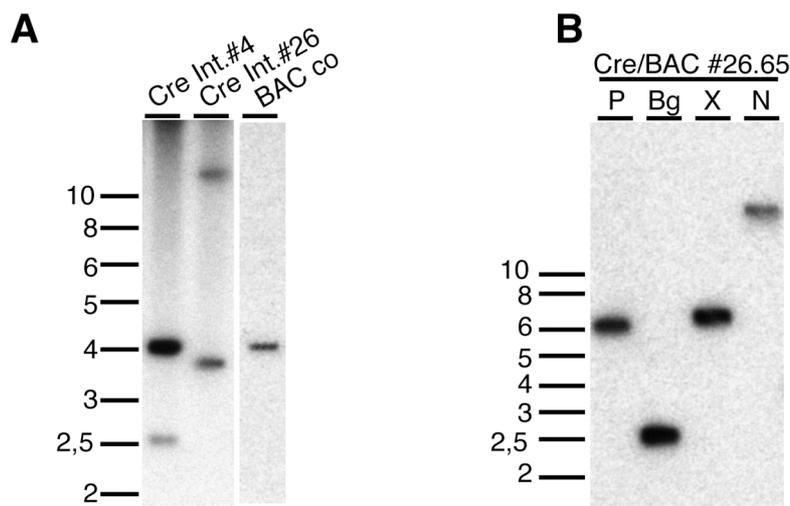
Zur Generierung der GlyT2-Cre-Linie wurde eine optimierte Cre-Sequenz verwendet, in der die bakterielle Kodonsequenz durch die eukaryotische ausgetauscht wurde. Ein entsprechendes Plasmid wurde von R. Sprengel zur Verfügung gestellt. Die Strategie der Klonierung erfolgte analog zur Abbildung 3-27 und Abbildung 3-28 aber statt einer GlyT2-cDNA wurde das Exon 2 des BAC-Klons RPCI23 365E4 durch die Cre-cDNA ersetzt, gefolgt von der pA-Kassette und der FRT-Erkennungssequenz. Flankiert wurde dieses Konstrukt von den Homologiearmen A und B. Zunächst wurde die Targetingkassette in einer Ligation in den Shuttle Vektor pSV1.recA inseriert. Zwei aufgereinigte Klone wurden mit BAC-chemokompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Der Transformationsansatz wurde bei 30°C ü. N. inkubiert. Von diesen Platten wurden jeweils drei Klone auf zwei LB-Platten mit Chloramphenicol/Tetracyclin ausgestrichen. Eine davon wurde zur Kontrolle bei 30°C und die andere bei 43°C inkubiert. Auf der 43°C-Platte können nur Kolonien wachsen, die den temperatursensitiven pSV1.recA integriert haben. Insgesamt 36 Klone wurden in einer Kolonie-PCR auf ein homologes Rekombinationsereignis im Homologiearm A oder B untersucht.

Insgesamt 22 Kolonien waren in der PCR positiv und wurden anschließend in einer Southern Blot-Analyse auf ein Integrationsereignis überprüft. Zehn dieser Klone zeigten eine homologe Rekombination, davon sechs in der Homologieregion A und vier im Homologiearm B (Tabelle 3-8). In den restlichen zwölf war neben der Integratbande auch die Original BAC-Bande im Southern Blot nachzuweisen. Diese Mischklone wurden nicht weiter analysiert. Jeweils ein Integrat für den Homologiearm A und eines für den Homologiearm B sind in der Abbildung 3-32 A dargestellt. Fand die homologe Rekombination im Homologiearm A statt, konnten zwei Banden bei 2,5 und 4,1 kb mit einer Homologiearm A-Sonde nachgewiesen werden, da BglII auch im

Tabelle 3-8: Statistik zur Zahl der In- bzw. Deintegrationereignisse in den BAC-Klon RPCI23 365E4. Zum Nachweis der Integration wurde zunächst eine PCR-Analyse durchgeführt. PCR-positive Klone wurden anschließend einer Southern Blot-Analyse mit einer Homologiearm A-Sonde bestätigt.

Integration Cre	analysierte Klone	negativ	positiv (Hom. A oder B)	Effizienz (%)
PCR	36	14	22 (9+13)	61
Southern	22	12	10 (6+4)	45
<hr/>				
modifizierter BAC Cre	analysierte Klone	negativ	positiv	Effizienz (%)
Klone der TB-Platte	93	64	29	45
Southern	29	9	20	69

Shuttle Vektor pSV1.recA schneidet. Für ein homologes Rekombinationsereignis im Homologiearm B konnten ebenfalls zwei Banden mit einer Homologiearm A-Sonde bei 3,8 und 13,7 kb nachgewiesen werden (Abbildung 3-32 A). Der Original BAC zeigte nur eine einzelne Bande bei 4 kb (Abbildung 3-32 A). Ein positiver Klon in dem die Rekombination im Homologiearm A stattgefunden hatte, sowie ein weiterer, in dem sich die Integration im Homologiearm B ereignet hatte, wurden auf einer Chloramphenicolplatte ausgestrichen und bei 43°C ü. N. inkubiert. In diesem Schritt ereignete sich in einigen Klonen ein zweites Rekombinationsereignis, bei dem der Shuttle Vektor deintegrierte. Zur Identifikation dieser Klone wurden insgesamt 32 Klone auf eine TB-Platte ausgestrichen und zwei Tage bei 37°C inkubiert. Auf diesen Platten können Tetracyclin-resistente Kolonien aufgrund der Fusarin-Säure im Agar nicht wachsen. Von den gewachsenen Kolonien wurden insgesamt 93 Klone auf eine Chloramphenicolplatte und eine Chloramphenicol/Tetracyclinplatte ausgestrichen. Nur aus Klonen, die ausschließlich auf der Chloramphenicolplatte wuchsen, wurde DNA aufgereinigt, mit BglII verdaut und im Southern Blot analysiert. Von den 29 Klonen waren 20 korrekt modifiziert (Tabelle 3-8). Der Klon #26.65 wurde einer detaillierten Restriktionsanalyse unterzogen (Abbildung 3-32 B). Hierfür wurden vier verschiedene Restriktionsenzyme ausgewählt: PstI, BglII, XbaI und NotI. Zwei dieser Enzyme schneiden in der insertierten Sequenz (BglII in der Cre-cDNA, XbaI in der FRT-Erkennungssequenz), während PstI in diesem Bereich nicht schneidet und zur Kontrolle von möglichen Mehrfachintegrationen diente, die jedoch nicht auftraten. NotI linearisiert den BAC-Klon. Mit einer Homologiearm A-Sonde konnten die kalkulierten Bandengrößen im modifizierten Cre/BAC nachgewiesen werden. Der Klon wurde mit NotI linearisiert, aufgereinigt und für die Pronukleusinjektion in Zygoten verwendet.



C erwartete Bandengrößen

BAC-Klone	PstI (P)	BglII (Bg)	XbaI (X)	NotI (N)
Integration in homA Cre	-----	2,5 + 4,1	-----	-----
Integration in HomB Cre	-----	3,8 + 13,7	-----	-----
modifizierter BAC Cre	6,2	2,5	6,4	ca. 180
BAC Kontrolle	5	4,2	6,6	ca. 180

Abbildung 3-32: Southern Blot-Analyse der Integrate und der modifizierten Cre/BACs.
A, Integrate für den BAC/Cre, die mit BglII verdaut wurden. Die Integration hat in den Homologiearmen A (#4) oder B (#26) stattgefunden. **B**, detaillierte Restriktionsanalyse des modifizierten BAC Klons, der mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten wurde. Zur Detektion wurde eine Homologiearm A-Sonde verwendet. Bg, BglII; P, PstI; N, NotI; X, XbaI.
C, Übersicht der zu erwartenden Bandengrößen in kb.

3.2 Untersuchung des Glycinrezeptors in GlyT2-defizienten Mäusen

In einem Teilprojekt zur Charakterisierung der GlyT2-defizienten Mäuse, die von Jesús Gomeza generiert wurden, wurde eine Analyse der GlyR α -UE vorgenommen. Der GlyR ist ein pentamerer Membranprotein, das aus zwei α -UE und drei β -UE zusammengesetzt ist (Grudzinska *et al.*, 2005). Von der α -UE sind vier verschiedene Subtypen beschrieben worden (α 1-4). Im Laufe der ersten zwei Wochen der postnatalen Entwicklung wird die embryonale α 2-UE gegen die adulte α 1-UE ausgetauscht, während die Gesamtanzahl an GlyRs mehr oder weniger konstant bleibt (Becker *et al.*, 1992; Singer *et al.*, 1998). Da dieser α -UE-Austausch mit dem Auftreten des Phänotyps korreliert, der durch starken Tremor sowie durch neuromotorische Defizite gekennzeichnet ist, sollte untersucht werden, ob der α -UE-Austausch hierbei eine Rolle spielt. Zudem ähnelt der Phänotyp der GlyT2 $-/-$ Mäuse denen der spontan auftretenden GlyR-Mutanten *spastic*, *spasmodic* und *oszillator*. Für die *spastic*-Mauslinie wurde gezeigt, dass sie eine Mutation in der GlyR α 1-UE aufweist. Der Phänotyp tritt während des UE-Austausches von der embryonalen α 2 zur adulten α 1 auf. Vorangegangene Analysen der GlyT2-defizienten Mäuse haben gezeigt, dass die Proteinexpression von prä- und postsynaptischen Proteinen wie PSD95, Gephyrin, GlyR, NMDAR-UE1 (NR1), VIAAT und Synaptophysin nicht verändert ist. Auch eine Kompensation der GlyT2-Defizienz durch den glialen Transporter GlyT1 erfolgte nicht (Gomeza *et al.*, 2003b).

Zur Analyse der GlyR α -UE wurden Rückenmarksschnitte aus GlyT2 wt und GlyT2-defizienten Mäusen angefertigt und mit Antikörpern spezifisch für die GlyR α 1-UE (mab2b) bzw. für alle GlyR α -UE (mab4a) immunhistochemisch untersucht. Zur Analyse der postsynaptischen GlyR-Cluster wurden vier postnatale Stadien ausgewählt, P0, P3, P7 und P10, so dass die Entwicklung der GlyR α -UE verfolgt werden konnte. Im letzten untersuchten Stadium wiesen die Tiere bereits einen starken neuromotorischen Phänotyp auf (Abbildung 3-33 C, gestrichelte Linie). Von Geschwistertieren wurde das Rückenmark präpariert und auf Trockeneis eingefroren. Für jeden Genotyp (+/+ und -/-) wurden jeweils fünf Schnitte von drei Tieren untersucht. Hierfür wurde das Gewebe in Tissue-Tak eingebettet. Anschließend wurden Gewebsschnitte angefertigt und diese mit einem Antikörper gegen die GlyR α 1-UE (mab2b) oder mit einem gegen alle GlyR α -UE (mab4a) angefärbt. Die Clustergröße der GlyRs war in den GlyT2 $-/-$ Mäusen im Vergleich zum wt nicht verändert (Abbildung 3-33, A und B). Die Fluoreszenzintensität der Schnitte, die ein Maß für die Anzahl an Clustern sind, wurden statistisch ausgewertet (Abbildung 3-33). Dies ergab, dass innerhalb des beobachteten Zeitraums die Gesamtzahl an GlyR α -Clustern um etwa 20% zunahm. Dieser Anstieg stimmt mit früheren Analysen überein, die in Ratten durchgeführt wurden (Becker *et al.*, 1992). Für die α 1-UE war

hingegen ein starker Anstieg der Immunreaktivität zu beobachten (Abbildung 3-33 B und C). Dieser Unterschied war in den Immunfärbungen deutlich zu sehen (Abbildung 3-33 B). Zu allen untersuchten Zeitpunkten waren jedoch keine Unterschiede in der Gesamtzahl aller GlyR-Cluster sowie im Anteil der α 1-UE-Immunreaktivität zwischen dem wt und den GlyT2 $-/-$ Tieren zu beobachten (Gomez *et al.*, 2003b). Der Phänotyp der GlyT2 $-/-$ Mäuse kann somit nicht durch eine Fehlregulation des GlyR α -UE-Austausches auf postsynaptischer Seite erklärt werden. Demnach finden in GlyT2-defizienten Tieren keine adaptiven Veränderungen in der Postsynapse statt. Der Wechsel von der α 2- zur α 1-UE erfolgt mit gleicher Effizienz wie in wt Mäusen. Analysen der GlyR α -UE haben gezeigt, dass alle vier α -UE des GlyRs eine vergleichbare Glycinaffinität besitzen. Die α 1- und α 2-UE unterscheiden sich jedoch in ihrer Abklingzeit („decay time“) (Takahashi *et al.*, 1992), die möglicherweise für das Auftreten des Phänotyps verantwortlich ist.

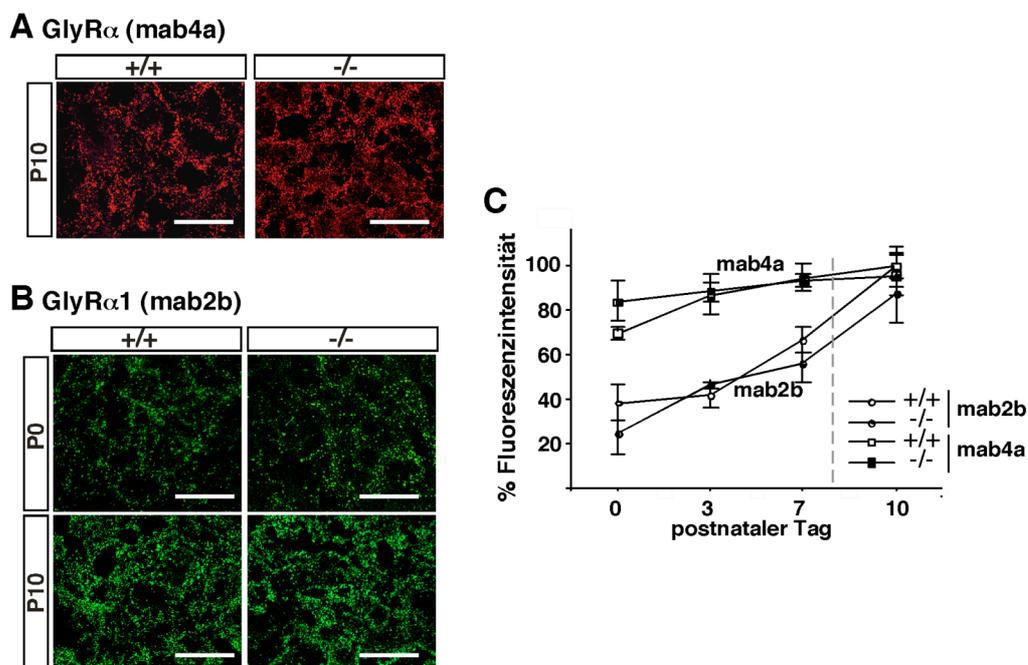


Abbildung 3-33: Analyse der GlyR-UE in GlyT2-defizienten Mäusen. Rückenmarksschnitte von wt und GlyT2 $-/-$ Mäusen wurden an P0, P3, P7 oder P10 mit mab2b (GlyR α 1-UE) oder mab4a (alle GlyR α -UE) angefärbt. **A**, Immunfärbung von wt und GlyT2 $-/-$ P10-Rückenmarksschnitten mit dem Erstantikörper mab4a und dem Maus-Alexa594-Zweitantikörper. **B**, Immunfärbungen von P0 und P10-Rückenmarksschnitten mit dem mab2b-Antikörper und dem Maus-Alexa488-Zweitantikörper in wt und GlyT2-defizienten Mäusen. **C**, Fluoreszenzintensität der GlyR α -UE in wt und GlyT2 $-/-$ Tieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung. Der Zeitpunkt, an dem die ersten Tiere einen Phänotyp zeigen, ist durch die gestrichelte Linie markiert. Längenstandard, 20 μ m.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollten die Mechanismen, die zu einer GlyT2-spezifischen Lokalisation in Axonterminalien führen oder den Anteil an Plasmamembran-GlyT2s regulieren, analysiert werden. In vorherigen Studien war gezeigt worden, dass der GlyT2 in präsynaptischen Terminalien nahe der CAZ lokalisiert ist (Mahendrasingam *et al.*, 2003; Zafra *et al.*, 1995) und dort eine entscheidende Funktion für die Aufnahme von Glycin in die Präsynapse hat (Gomez *et al.*, 2003b). Durch den VIAAT wird Glycin anschließend in Vesikel gefüllt, die dann für die Transmitterausschüttung bereitstehen. Für die Aufnahme von Glycin ist insbesondere die Anzahl der GlyT2-Proteine in der Membran von entscheidender Bedeutung. Interessanterweise ist für Synaptosomenpräparationen von Hirnstamm und Rückenmark gezeigt worden, dass sich nur etwa 5-10% des GlyT2 an der Plasmamembran befinden, während 90-95% intrazellulär verbleiben. Aus diesem intrazellulären Pool können GlyT2s rekrutiert und in die Zellmembran inseriert werden (Geerlings *et al.*, 2001; Geerlings *et al.*, 2002).

Die Mechanismen des GlyT2-Transports in diese spezifischen Kompartimente sowie die involvierten Domänen sind noch weitgehend unbekannt. Um diese Mechanismen und Domänen zu analysieren, sind in dieser Arbeit die langen intrazellulären Domänen, der N- und der C-Terminus, des GlyT2-Proteins auf ihre mögliche Bedeutung hin untersucht worden. Hierfür wurde zum einen das PDZ-DBM am extremen C-Terminus und zum anderen Hauptteile der langen N-terminalen Domäne deletiert. Die so erhaltenen Deletionsmutanten wurden zunächst biochemisch charakterisiert, bevor Lokalisationsstudien in Zelllinien bzw. hippocampalen Neuronenkulturen durchgeführt wurden. Zusätzlich sollte in weiteren Arbeiten die *in vivo* Funktion der N-terminalen Deletionsmutanten durch die Genierung von transgenen Mäusen untersucht werden, die GlyT2 Δ N-Proteine unter Kontrolle des GlyT2-Promotors exprimieren. Dazu wurden transgene Expressionsvektoren hergestellt, die in den Pronukleus von Einzellzygoten injiziert wurden.

4.1 Analyse der PDZ-DBM-Mutanten

PDZ-DBMs sind in vielfältigen zellulären Prozessen involviert, beispielsweise beim Clustering von synaptischen Membranproteinen. In *D. melanogaster* wurde *in vivo* demonstriert, dass Fliegen, die eine Mutation in dem PDZ-Domänen-Protein Dlg haben, keine synaptischen Cluster von Shaker K⁺-Kanälen aufweisen (Gramates und Budnik, 1999). Die Funktion des PDZ-DBM im GlyT2 sollte hier durch Inaktivierung des Motivs untersucht werden. Hierfür wurden im PDZ-DBM die letzten drei Aminosäuren des GlyT2 entweder deletiert (Δ TQC) oder ein Alanin an das C-terminale Ende angefügt (+A).

4.1.1 Biochemische und funktionelle Analyse der GlyT2-PDZ-DBM-Mutanten

Die mGlyT2 wt, +A und Δ TQC, sowie deren EGFP-markierte Fusionsproteine, wurden hinsichtlich ihrer Expression und Glykosylierung in transfizierten HEKT-Zellen untersucht. Für das wt-Protein konnten Banden bei 100 und 70 kDa bzw. für die EGFP-markierten GlyT2s bei 130 und 100 kDa nachgewiesen werden. Diese Banden ließen sich durch die Behandlung mit PGNaseF, einer Deglykosylase, die sowohl komplex als auch *core*-glykosylierte Oligosaccharidreste entfernt, zu einer einzelnen Bande bei 64 kDa (bzw. 100 kDa für die EGFP-markierten) reduzieren. EndoH hingegen, ein Enzym, das nur *core*-Glykosylierungen entfernt, deglykosylierte nur die 70 kDa zur 64 kDa Bande, während die Intensität der Bande bei 100 kDa unverändert blieb. Die immunreaktiven Banden in den unbehandelten Zelllysaten entsprechen demnach unterschiedlichen Glykosylierungsformen des GlyT2. Beträchtliche Glykosylierungen im EL2 weisen auch andere Transporter der *SLC6*-Familie auf, wobei bis zu 40% der apparenten Proteingröße in der SDS-PAGE auf den Kohlenhydratanteil zurückgeführt werden. Die beiden Mutanten, in denen die PDZ-DBM inaktiviert wurde, wiesen ein identisches Expressions- und Glykosylierungsmuster wie der mGlyT2 wt auf. Die Prozessierung des GlyT2 wird dementsprechend nicht durch die Inaktivierung des PDZ-DBM beeinflusst. Dies ist ebenfalls für andere Proteine der *SLC6*-Familie demonstriert worden, in denen die Inaktivierung der PDZ-DBM keinen Einfluss auf die Prozessierung hatte (Bjerggaard *et al.*, 2004).

4.1.2 Analyse des Plasmamembrananteils des GlyT2

Zusätzlich zur Glykosylierungs- und Expressionsanalyse wurde der Plasmamembrananteil durch Oberflächenbiotinylierungen untersucht. Diese Analysen geben Aufschluss darüber, ob die GlyT2-Konstrukte nach der korrekten Prozessierung auch in die Plasmamembran inseriert werden. An der Plasmamembran war nur die komplex glykosylierte Bande bei 100 kDa nachzuweisen, während die niedermolekulare Bande bei 70 kDa ausschließlich in intrazellulären Kompartimenten vorkam. Die Intensität der komplex glykosylierten Bande war in diesen Kompartimenten stark reduziert, was anders als in Synaptosomenpräparationen dafür spricht, dass ein Großteil des prozessierten GlyT2 in die Zellmembran inseriert wurde. In der Oberflächenbiotinylierung war der Anteil an plasmamembranständigem GlyT2 beim wt-Protein und den beiden PDZ-DBM-Mutanten vergleichbar. Die Insertion des GlyT2 in die Plasmamembran hängt in HEKT-Zellen also eindeutig nicht vom PDZ-DBM ab. Ebenso hatte die N-terminale Fusion von EGFP keinen Einfluss auf den Anteil an Plasmamembran-GlyTs.

4.1.3 Funktionsanalyse der GlyT2-PDZ-DBM-Konstrukte

Eine Analyse der Transportaktivität in HEKT-Zellen wurde bei unterschiedlichen Glycinkonzentrationen durchgeführt. Für den mGlyT2 wt ergab sich eine hyperbole Kurve, die bei etwa 200 μM Glycin die Sättigung erreichte. Es konnte ein K_M -Wert von 52 μM für den GlyT2 wt und ein sehr ähnlicher von 55 μM Glycin für den EGFP-GlyT2 wt ermittelt werden. Die PDZ-DBM-Mutanten unterschieden sich weder signifikant in den ermittelten K_M - noch in den v_{max} -Werten vom mGlyT2 wt. Das PDZ-DBM ist somit nicht direkt in die Glycintransportmechanismen involviert. Andere Transporter der *SLC6*-Familie, wie beispielsweise der DAT, weisen bei der Analyse des plasmamembranständigen Substrattransports nach Deletion des PDZ-DBM keine Substrataufnahme mehr auf. Im DAT hängt der Substrattransport jedoch nicht mit PDZ-DBM-vermittelten Interaktionen zusammen, wie durch eine weitere Mutante gezeigt werden konnte, in der das PDZ-DBM durch Anhängen eines Alanins am C-Terminus inaktiviert wurde. Die Dopaminaufnahme ist in dieser DAT +A-Mutante im Vergleich zum wt-Protein unverändert (Bjerggaard *et al.*, 2004).

4.1.4 Lokalisationsanalyse der GlyT2-PDZ-DBM-Mutanten

Die Lokalisation des GlyT2 wurde zunächst in HEKT-Zellen und MDCK-Zellen untersucht. Für das wt-Protein konnte GlyT2-Immunreaktivität an der Plasmamembran nachgewiesen werden, die nicht mit einem kotransfizierten ER-Marker kolokalisierte. Die PDZ-DBM-Mutanten unterschieden sich in ihrer Lokalisation nicht vom wt-Protein. MDCK-Zellen weisen unterschiedliche Membrankompartimente auf, mit einer apikalen und einer basolateralen Plasmamembran, an die u. a. auch transfizierte Proteine unterschiedlich sortiert werden (Dotti und Simons, 1990). Viele Proteine, die in neuronalen Zellen in Dendriten auftreten, sind in MDCK-Zellen an der basolateralen Membran lokalisiert, während axonale Proteine, wie der GABA-Transporter 1 (GAT1), eine apikale Anreicherung zeigen (Pietrini *et al.*, 1994). In partiell polarisierten MDCK-Zellen, in denen noch keine vollständige Abgrenzung der apikalen von der basolateralen Membran stattgefunden hatte, ist für das wt-Protein GlyT2-Immunreaktivität an der lateralen und apikalen Membran nachgewiesen worden. Die basale Membran zeigte eine stark reduzierte GlyT2-Immunreaktivität. In vollständig polarisierten MDCK-Zellen ist der GlyT2 ausschließlich in der apikalen Membran lokalisiert (Martinez-Maza *et al.*, 2001). Für die PDZ-DBM-Mutanten konnte ähnlich wie im wt-Protein eine laterale und apikale Färbung nachgewiesen werden. Die Inaktivierung des PDZ-DBM führt also nicht zu einer veränderten Lokalisation des GlyT2 in HEKT- und MDCK-Zellen.

HEKT- und MDCK-Zellen können aber nur begrenzt als Modellsysteme für die neuronale Lokalisation des GlyT2 dienen. Die Ergebnisse mit MDCK-Zellen lassen

vermuten, dass neben dem mGlyT2 wt auch die beiden PDZ-DBM-Mutanten im Axon lokalisiert werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden zunächst spinale Kulturen verwendet, da diese auch endogen über eine hohe GlyT2-Expression verfügen. Die Transfektionsraten, die mit diesen Neuronen erhalten wurden, erwiesen sich als zu gering, um verlässliche Aussagen zu treffen. Zudem überexprimierten die transfizierten Zellen den GlyT2 stark. Auch konnte in den Rückenmarkskulturen selbst nach dreiwöchiger Kultivierung keine ausschließlich synaptische Verteilung des endogenen GlyT2 nachgewiesen werden, die in Schnittpräparaten als punktierte Strukturen mit synaptischen Markern wie VIAAT kolokalisieren. Stattdessen wiesen die spinalen Kulturen, neben einer allgemein diffusen Verteilung, GlyT2-Puncta in allen Neuriten (Dendriten und Axonen) auf. Aus diesen Gründen wurden HCN für weitere Transfektionsversuche vorgezogen, da sie sich leichter transfizieren lassen und zumindest in einer Neuronensubpopulation eine endogene GlyT2-Expression aufweisen (Danglot *et al.*, 2004). Unter den hier verwendeten Fixierungs- und Färbebedingungen konnte eine endogene GlyT2-Immunreaktivität in diesen Kulturen jedoch nicht nachgewiesen werden.

Immunfärbungen von transfizierten HCN zeigten eine axonale sowie dendritische Verteilung des mGlyT2 wt, die vermutlich aufgrund der Überexpression auftrat. Anders als in vorangegangenen Studien, die eine uniforme Verteilung des GlyT2 nach viraler Überexpression in HCN zeigten (Poyatos *et al.*, 2000), konnte hier eine teilweise punktierte Verteilung des GlyT2 nachgewiesen werden. Diese Unterschiede lassen sich möglicherweise durch die starke Überexpression und die kürzere Expressionszeit (3-6 Std.) erklären, die in dieser Studie verwendet wurden (Poyatos *et al.*, 2000). In meinen Experimenten ließ sich nach 24 Std. ebenfalls keine punktierte GlyT2-Immunreaktivität nachweisen. Demnach scheint der Transport des GlyT2 in unterschiedliche Kompartimente ein vergleichsweise langsamer Prozess zu sein, wie er auch bei anderen präsynaptischen Proteinen auftritt (Mercken *et al.*, 1995; Utton *et al.*, 2002).

Nach Expression des wt-Proteins in HCN konnte im Vergleich zu den PDZ-DBM-Mutanten in den Neuriten mehr GlyT2-Immunreaktivität nachgewiesen werden, die mit synaptischen Markern kolokalisierte. Eine Quantifizierung ergab, dass 26% der PSD95-Cluster mit mGlyT2 wt-Puncta kolokalisierten, während dies in den Mutanten mit 10-13% nur halb so oft zutraf. Marker inhibitorischer Synapsen, wie VIAAT und Gephyrin, zeigten qualitativ ein ähnliches Bild. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass das PDZ-DBM für die Lokalisation in die synaptischen Terminalien wichtig ist. PDZ-DBM sind Motive, die häufig in synaptischen Proteinen auftreten (Kim und Sheng, 2004). Das PDZ-DBM des GlyT2 könnte somit für die primäre Insertion in die präsynaptische Terminalie eine Rolle spielen, ein Prozess, in dem möglicherweise auch Syntaxin 1A und Syntentin involviert sind. Die PDZ-Domänen

des Syntenin 1 binden an das PDZ-DBM des GlyT2 (Ohno *et al.*, 2004). Syntaxin 1A scheint für die Regulation der synaptischen Proteine eine duale Rolle zu spielen: So hat sich beispielsweise für den NET gezeigt, dass die Oberflächenexpression durch die Koexpression von Syntaxin 1A zunimmt, während Kontroverserweise die Transportaktivität abnimmt (Sung *et al.*, 2003). Ähnliche Resultate ergaben sich auch für den GlyT2. Die Koexpression von GlyT2 und Syntaxin 1A führte in COS-7-Zellen zu einer Reduktion der Transportaktivität (Geerlings *et al.*, 2000). In Synaptosomenpräparationen hingegen bewirkt ein moderater Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eine Syntaxin 1A-vermittelte Erhöhung des GlyT2-Plasmamembrananteils (Geerlings *et al.*, 2001). Langanhaltender Ca^{2+} -Einstrom hingegen induziert die Internalisierung des GlyT2 (Geerlings *et al.*, 2001).

Das PDZ-DBM könnte folglich in die Regulation des GlyT2 involviert sein, indem beispielsweise die Inaktivierung des PDZ-DBM die Stabilität des GlyT2 in der Membran reduziert. In der Präsynapse wäre somit die Anzahl der Plasmamembran-GlyT2s reduziert, und folglich wäre die Aufnahme von Glycin aus dem synaptischen Spalt vermindert. Ein ähnliches Phänomen ist für Proteine in der postsynaptischen Membran beobachtet worden. Hier führt die Deletion des PDZ-DBM der NR2B-UE des NMDAR zu einer erhöhten Internalisierung des Rezeptors in Neuronenkulturen (Roche *et al.*, 2001). Die Autoren vermuten, dass die Bindung von PSD95 an das PDZ-DBM des NMDAR ein endozytotisches Signal maskiert und so zu einer erhöhten Stabilität des NMDAR in der postsynaptischen Terminalie führt. Nicht nur für die Postsynapse sondern auch für die Präsynapse spielen derartige Mechanismen eine Rolle. So wurde für den Glutamattransporter GLT1b gezeigt, dass die PDZ-DBM-Interaktion mit dem Proteinkinase C-interagierenden Protein 1 (PICK1) die PMA-induzierte Reduktion von GLT1b in der Plasmamembran verhindert (Liu *et al.*, 2005).

Ein ähnliches Phänomen könnte auch beim GlyT2 auftreten und würde die reduzierte Kolokalisation mit synaptischen Markern wie PSD95 mit den PDZ-DBM-Mutanten in HCN erklären. Da das PDZ-DBM des GlyT2 mit Syntenin 1 interagiert (Ohno *et al.*, 2004), wäre es interessant, in weiteren Experimenten zu untersuchen, ob die Überexpression von Syntenin 1 die Stabilität des GlyT2 in der präsynaptischen Membran erhöht und dadurch die Kolokalisation mit synaptischen Markern häufiger auftritt. In komplementären Experimenten mit RNAi (RNA interference)-Knock-down-Techniken für Syntenin 1 könnte umgekehrt analysiert werden, ob die synaptische Lokalisation von GlyT2 reduziert wird.

4.2 Analyse der Epitop-markierten GlyT2-Proteine

Neben dem unmarkierten GlyT2 wurden zusätzlich Konstrukte kloniert, die die Expression von Epitop-markierten GlyT2s erlauben, um eine Unterscheidung zwischen endogenen und transfizierten GlyT2s zu ermöglichen. Es wurden zwei

verschiedene Epitope verwendet, EGFP und myc, die an unterschiedlichen Stellen im mGlyT2 eingefügt wurden. Die EGFP-Markierung wurde an den N-Terminus oder an den C-Terminus fusioniert. Myc-Epitope wurden an drei verschiedene Stellen eingefügt: nach der Aminosäure 13 in der N-terminalen Domäne, nach der Aminosäure 316 im EL2 oder nach der Aminosäure 738 in der C-terminalen Domäne (Abbildung 4-1).

Die N-terminale EGFP-Fusion sowie die myc-Insertion hinter der Aminosäure 13 führten zu keiner Veränderung des mGlyT2 wt in den unterschiedlichen Experimenten und werden deswegen zusammen mit den nicht epitop-markierten GlyT2s behandelt. Die myc-markierten Konstrukte mGlyT2 wt myc13, mGlyT2 Δ AA14-174 myc13 und mGlyT2 Δ AA14-184 myc13 wurden zusätzlich für die Generierung der BAC-transgenen Mäuse verwendet.

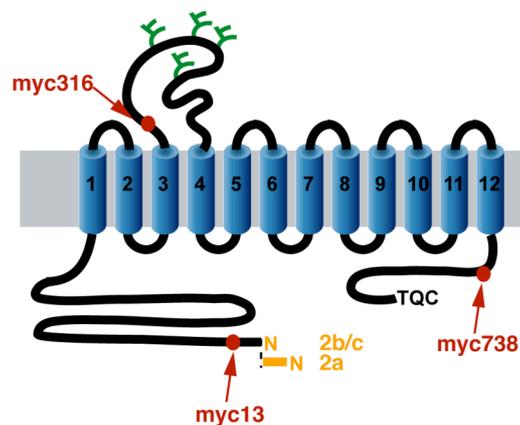


Abbildung 4-1: Insertionen der myc-Epitope im mGlyT2. Die Abbildung zeigt schematisch die Struktur des GlyT2. Die unterschiedlichen Isoformen a-c sind in orange dargestellt. Die myc-Epitope (rot) wurden an drei unterschiedlichen Stellen eingefügt, entweder im N-Terminus (myc13), im EL2 (myc316) oder im C-Terminus (myc738). Die Glykosylierungsstellen (grün) liegen im EL2, werden aber durch die Insertion der myc-Markierung nicht beeinträchtigt.

4.2.1 Charakterisierung des im EL2 myc-markierten GlyT2

Die myc-Markierung hinter der Aminosäure 316 sollte erlauben den GlyT2 durch einen extrazellulären Antikörper zu detektieren, da dieser Bereich im EL2 des Transporters liegt. Analysen der Proteinexpression und der Glykosylierungen ergaben keine Unterschiede zu den wt GlyT2-Proteinen. In Oberflächenbiotinylierungen wurde nur der komplex glykosylierte GlyT2 wt myc316 an der Zelloberfläche nachgewiesen, während die *core*-glykosylierte Bande ausschließlich in intrazellulären Kompartimenten vorkam. Interessanterweise war die Intensität der komplex glykosylierten Bande in der intrazellulären Fraktion jedoch stärker als bei den unmarkierten GlyT2s. Eine stärkere intrazelluläre Immunreaktivität des GlyT2 wt myc316 ließ sich ebenfalls in Färbungen von transfizierten HEKT-Zellen zeigen. Das

myc-Epitop nach der Aminosäure 316 verhindert also nicht die Plasmamembraninsertion des GlyT2, setzt aber deren Effizienz herab.

In [³H]Glycinaufnahme-Experimenten, in denen die Transportfunktion des GlyT2 wt myc316 untersucht wurde, konnte keine spezifische Glycinaufnahme nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass der EL2 für die Bindung und/oder die Translokation des Substrats essentiell ist. Die Kristallstruktur des LeuT, ein Bakterienhomolog der *SLC6*-Familie, weist in der EL2 teilweise eine α -helikale Struktur auf: Möglicherweise wird durch die Insertion der myc-Markierung in diesen Bereich des GlyT2s die Ausbildung einer solchen Sekundärstruktur beeinträchtigt. Im LeuT liegt die α -helikale Struktur des EL2 gegenüber einem α -helikalen Segment des EL4, die so zusammen einen schmalen Spalt über der Membrandoppelschicht bilden. Durch die Insertion der zehn zusätzlichen Aminosäuren des myc-Epitops in den EL2 könnte dieser Spalt blockiert oder seine Struktur verändert sein, und so die Substrat- oder Ionenbindung behindert bzw. verlangsamt sein. Es ist jedoch zu beachten, dass der EL2 im LeuT deutlich kürzer ist als bei seinen eukaryotischen Homologen.

Stephan *et al.* haben den EL2 des Serotonintransporters (SERT) biochemisch analysiert (Stephan *et al.*, 1997). Hier wurden Mutanten kloniert, in denen ein Großteil des EL2 des SERTs durch die entsprechende Sequenz des Norepinephrintransporters (NET) ausgetauscht wurde. Ein Teil dieses Bereichs entspricht der Position des myc-Epitops im EL2 des GlyT2. Für diese SERT-NET-Chimären konnte gezeigt werden, dass sie zwar gut exprimiert werden und die Plasmamembraninsertion nahezu dem wt-Protein entspricht, sie aber eine stark reduzierte und kinetisch langsamere Serotoninaufnahme aufweisen (Stephan *et al.*, 1997). Die Substrat- sowie Na⁺- und Cl⁻-Ionenbindung war jedoch unverändert. Es ist somit unwahrscheinlich, dass eine abnormale Faltung der Chimäre für die Transportdefizienz verantwortlich ist, wie es aufgrund der LeuT-Struktur zunächst vermutet wurde. Die biochemischen Daten von der SERT-NET-Chimäre legen vielmehr nahe, dass der EL2 wichtig für die Substrat-Translokation ist (Stephan *et al.*, 1997). Interessanterweise ähnelt der Phänotyp der SERT-NET-Chimäre der des mGlyT2 wt myc316. Sequenzvergleiche der entsprechenden Transporter weisen eine starke Homologie in diesem Bereich des EL2 auf, der die Aminosäuren 306-318 im GlyT2 umfasst (Abbildung 4-2), während vor und nach den Aminosäuren 306-318 die Sequenzhomologie deutlich geringer ist. Das myc-Epitop wurde vor dem Cystein (C317) eingefügt und unterbricht somit die Aminosäuresequenz in diesem stark konservierten Bereich (Abbildung 4-2). Da eine falsche Faltung des GlyT2 aufgrund der Erkenntnisse aus den SERT-NET-Chimären eher unwahrscheinlich ist, könnte es sein, dass Interaktionen innerhalb des Proteins durch die Insertion des myc-Epitops

nicht mehr möglich sind oder generelle Eigenschaften wie die Länge des Loops, die Flexibilität oder die Nettoladung beeinträchtigt werden.

```

mGlyT2      ...306SCNNPWNTPECK318...
mGlyT1      ...146YCNNPWNTPDCA158...
mSERT       ...198SKNSWNTGNCT210...
mNET        ...175NCGHSWNSPNCT186...

                                myc
mGlyT2 myc316 ...306SCNNPWNTPEEQKLISEEDLCK328...

```

Abbildung 4-2: Sequenzvergleich der EL2-Regionen vom GlyT2, GlyT1, NET und SERT. In diesem Bereich besteht eine hohe Sequenzhomologie zwischen den Transportern; die myc-Markierung im mGlyT2 wt myc316 trennt das konservierte Cystein von den restlichen Aminosäuren ab. Rot, identische Aminosäuren in allen drei Proteinen, Sequenzübereinstimmung zwischen GlyT2 und GlyT1 (blau), und zwischen GlyT2 und SERT (grün). Gelb, myc-Epitop.

4.2.2 Analyse des C-terminal myc-markierten GlyT2

Die C-terminal myc-markierten GlyT2 (myc738)-Konstrukte wurden analog zu den vorherigen Mutanten biochemisch analysiert. Der mGlyT2 myc738 wurde in transfizierten HEKT-Zellen vollständig translatiert, es wurden jedoch keine komplex glykosylierten Transporter sondern nur *core*-glykosylierte GlyT2 gefunden, wie Analysen mit Deglykosylasen bestätigten. In Immunfärbungen war eine Kolokalisation des mGlyT2 wt myc738 mit einem ER-Marker festzustellen. Übereinstimmend mit diesen Immunfärbungen konnte keine [³H]Glycinaufnahme an der Plasmamembran gemessen werden. Die Insertion des myc-Epitops führt zu einer Retention des mGlyT2 wt myc738 im ER. Ein ähnliches Phänomen wurde inzwischen auch für andere Transporter der *SLC6*-Familie gezeigt; z. B. führt eine Deletion einer homologen Sequenz im GAT1 zu einer ER-Retention (Farhan *et al.*, 2004). Weitere Untersuchungen ergaben, dass dieses Motiv eine Sec24D-Bindungsstelle bildet.

```

mGAT1       555MFLTLKG-SLKQRLQVMIQP573
hSERT       596RLIITPG-TFKERIIKSITP614
hGlyT1      617RLCRTDGDTLLQRLKNATKP636
rGAT2       552KLRTLKG-PLRERLRQLVCP560
Konsensus   -L-----G-TL-ERL-----P

mGlyT2      730KMYLAPG-RFIERLKLVCSP745
                                myc
GlyT2 myc738 730KMYLAPEQKLISEEDLG-RFIERLKLVCSP755

```

Abbildung 4-3: Konsensussequenz des Sec24D-Bindungsmotivs. Die Sequenzvergleiche wurden nach Farhan *et al.* (2004) modifiziert. Analog wurden die GlyT2- und die GlyT2 myc738-Sequenzen aufgeführt. Rot, konservierte Aminosäuren des Motivs; blau, homologe Aminosäuren; gelb, myc-Epitop.

Sec24D ist ein Hüllprotein für Vesikel des ERs im sog. COPII-Komplex, der für den Export aus dem ER notwendig ist. Analysen der C-terminalen Region in verschiedenen Transportern der *SLC6*-Familie ergaben eine Konsensussequenz für die Sec24D-Interaktion (Farhan *et al.*, 2004), die in den einzelnen Transportern jedoch stark variiert (Abbildung 4-3). Die entsprechende Aminosäuresequenz im GlyT2 unterscheidet sich in mehreren Resten von der GAT1-Sequenz, scheint aber ebenfalls ein ER-Exportsignal darzustellen, welches durch die myc-Insertion inaktiviert wird.

4.2.3 C-terminal EGFP-markierte GlyT2s

Die EGFP-markierten GlyT2s, in denen das EGFP an den C-Terminus des GlyT2 fusioniert ist, wurden analog zu den myc-markierten GlyT2 hinsichtlich ihrer Expression, Lokalisation und Glycinaufnahme in HEKT-Zellen untersucht. Neben dem GlyT2 wt-EGFP wurden auch die entsprechenden N-terminalen Deletionsmutanten kloniert (Δ AA1-174-EGFP und Δ AA1-184-EGFP). In der Expressionsanalyse wiesen die einzelnen GlyT2s jeweils zwei Banden auf, eine komplex und eine *core*-glykosylierte, für den GlyT2 wt-EGFP bei 130 und 100 kDa, und für die beiden Mutanten Δ AA1-174-EGFP und Δ AA1-184-EGFP bei 110 und 70 kDa. In transfizierten HEKT-Zellen war der GlyT2 wt gleichmäßig über die Plasmamembran verteilt und kolokalisierte nicht mit dem ER-Marker. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die EGFP-Fusion an den extremen C-Terminus von GlyT2 die Insertion in die Plasmamembran nicht stört. Wird hingegen zusätzlich die N-terminale Domäne deletiert, kommt es zu einer vollständigen Kolokalisation mit dem ER-Marker. Die Ursachen für diese ER-Retention sind noch nicht bekannt. Eine weitere Klärung sollten Mutanten bringen, in denen der N-Terminus und das PDZ-DBM inaktiviert wurden (Δ AA1-174/+A). Da Mutanten, in denen entweder den PDZ-DBM oder der N-Terminus deletiert ist, in die Plasmamembran inseriert werden, sollte festgestellt werden, ob die Veränderung beider Enden zu einer Misslokation ausreicht, oder ob diese ausschließlich durch die Fusion mit EGFP hervorgerufen wird.

Eine Analyse der [³H]Glycinaufnahme wies für die Deletionsmutanten keinerlei Glycintransport auf. Interessanterweise importierte aber auch das wt-Protein kein Glycin, obwohl es in Immunfärbungen an der Plasmamembran lokalisiert war. Es ist möglich, dass durch die Fusion mit dem sperrigen EGFP, das immerhin eine Größe von 30 kDa hat, eine korrekte Faltung der C-terminalen Domäne unterbunden wird und so Bindungsstellen für Interaktionspartner zerstört werden oder die Flexibilität dieser Domäne verloren geht.

4.3 N-terminale GlyT2-Mutanten

Zur Analyse der N-terminalen Domäne des GlyT2 wurden Deletionsmutanten kloniert, in denen ein Großteil dieser Domäne entfernt wurde. Die Deletionen wurden so gewählt, dass die Transmembranstruktur des GlyT2 nicht beeinträchtigt wird. Deswegen verbleiben in den Deletionskonstrukten bis zur ersten TMD noch 20-30 Aminosäuren. Die Analyse erfolgte analog zu den PDZ-DBM-Mutanten zunächst in HEKT-Zellen und anschließend in HCN.

4.3.1 N-terminale Deletionen des GlyT2

4.3.1.1 Expression und Lokalisation der N-terminalen Deletionsmutanten

Die Konstrukte mGlyT2 wt, Δ AA1-174 und Δ AA1-184 wurden in HEKT-Zellen exprimiert und in einer Western Blot-Analyse hinsichtlich ihrer Expression und Glykosylierung untersucht. Die Deletion der N-terminalen Domäne behinderte die Translation des GlyT2 nicht, wenngleich das Expressionsniveau in den Deletionskonstrukten in den meisten Experimenten niedriger war als für das wt-Protein. Die Banden der Deletionsmutanten waren aufgrund der langen Deletionen kürzer als beim wt-Protein (80 und 53 kDa). Die Glykosylierung wurde durch die Behandlung mit PGNaseF und EndoH untersucht. Es wurden sowohl komplex als auch *core*-glykosylierte Formen nachgewiesen.

Eine mögliche Funktion der N-terminalen Domäne für die Insertion in die Plasmamembran wurde mittels Oberflächenbiotinylierung analysiert. Die mGlyT2 Δ AA1-174 und Δ AA1-184 wurden mit einer vergleichbaren Effizienz wie der GlyT2 wt in die Plasmamembran inseriert. Immunfärbungen von HEKT-Zellen zeigten, dass der GlyT2 wt wie auch die beiden Deletionsmutanten an der Plasmamembran lokalisiert waren. Die N-terminale Domäne ist folglich weder für die Prozessierung noch für die Insertion in die Plasmamembran essentiell.

4.3.1.2 Glycintransport in den Mutanten Δ AA1-174 und Δ AA1-184

Die Fähigkeit der Transporter, an der Plasmamembran Glycin zu importieren, wurde in [3 H]Glycinaufnahme-Experimenten analysiert. Hierbei wurde neben der Glycinaufnahme zusätzlich der zeitliche Verlauf der Transportaktivität (24, 48 und 72 Std.) betrachtet. Die Aufnahme von Glycin durch mGlyT2 wt und die Mutante Δ AA1-174 war nach 48 und 72 Std. vergleichbar, und beide Proteine wiesen einen ähnlichen K_M -Wert für Glycin von 52 μ M auf. Nach 72 Std. nahm die Glycinaufnahme um etwa 20% ab. Zugleich war eine Reduktion der GlyT2-Expression im Western Blot zu beobachten. Die transfizierten Zellen sterben nach dieser „langen“ Transfektionszeit ab, wie auch durch die Reduktion der Anzahl transfizierter Zellen in Immunfärbungen gezeigt werden konnte. Lediglich nach 24 Std. war der v_{max} -Wert

der Mutante Δ AA1-174 um etwa 20% geringer als im wt. Eine Oberflächenbiotinylierung von diesem Glycinaufnahme-Experiment zeigte eine geringere Proteinexpression der Mutante. Nach einer Normalisierung der Bandenintensität aus den Western Blots zeigten der mGlyT2 wt und die Mutante Δ AA1-174 einen vergleichbaren Glycinimport im Aufnahme-Experiment nach 24 Std. Die Glycinaufnahme der Mutante Δ AA1-184 unterschied sich hingegen grundlegend von der durch die beiden anderen Konstrukte. So konnte nach 24 Std. nur eine sehr geringe Glycinaufnahme gemessen werden. Mit zunehmender Expressionszeit nahm diese kontinuierlich zu und betrug nach 48 Std. etwa 40% der des wt-Proteins. Nach 72 Std. war sie vergleichbar mit dem wt-Protein und der Mutante Δ AA1-174 und wies keinen signifikant vom wt-Protein abweichenden K_M -Wert auf. Beim mGlyT2 Δ AA1-184 wurden Oberflächenbiotinylierungen von den entsprechenden Glycinaufnahme-Experimenten durchgeführt; es war zunächst erwartet worden, dass der Plasmamembrananteil des Δ AA1-184 über den Zeitraum von 24-72 Std. kontinuierlich zunimmt. Dieses war jedoch nicht der Fall, vielmehr erreichte die Intensität der Bande nach 48 Std. ein Maximum und nahm nach 72 Std. ähnlich wie beim GlyT2 wt ab. Die Zunahme des Glycintransports kann also nicht durch einen langsameren Transport des mGlyT2 Δ AA1-184 zur Plasmamembran erklärt werden. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass die N-terminale Domäne, insbesondere die Aminosäuren 175-184, für die Stabilisierung des Transporters in einer aktiven Konformation notwendig ist. Fehlt diese Domäne ist die konformationelle Reifung des Transporters stark verlangsamt.

4.3.1.3 Lokalisation der N-terminalen Deletionsmutanten

Anschließend an die detaillierte Analyse in HEKT-Zellen wurde die Lokalisation, analog zu den PDZ-DBM-Mutanten, in neuronalen Zellen analysiert. Hierfür wurden HCN mit den myc13-markierten N-terminalen Deletionskonstrukten transfiziert. Die transfizierten GlyT2 wurden sowohl in Axonen als auch in Dendriten nachgewiesen. In HCN bildete der mGlyT2 wt Puncta an den Neuriten aus. Immunfärbungen mit den synaptischen Markerproteinen PSD95 und Synaptophysin demonstrierten, dass diese Anreicherungen teilweise mit den synaptischen Markern kolokalisierten. Die N-terminalen Deletionsmutanten zeigten deutlich weniger dieser Anreicherungen sowie eine gleichmäßigere Verteilung in den Neuriten, die meistens an Verdickungen derselben auftraten. Eine Kofärbung mit synaptischen Markern in MAP2-negativen Neuriten konnte nur selten nachgewiesen werden. MAP2 ist ein Zytomatrixprotein (microtubuli associated protein 2), das ausschließlich in Dendriten auftritt und aus diesem Grund als Marker für diese dient. Interessanterweise lokalisierten die N-terminalen Deletionsmutanten mit kleinen PSD95-positiven Strukturen in MAP2-positiven Neuriten (insbesondere Δ AA1-184). Die kleinen PSD95-Cluster könnten entweder Transportvesikel oder kleinere Synapsen darstellen, die sich gerade bilden

oder abgebaut werden. Somit beeinflusst die Deletion der N-terminalen Domäne die Verteilung des GlyT2 in HCN.

Homologieanalysen der N-terminalen Domäne zeigen eine moderate Homologie mit der basischen Domäne des Adenomatous polyposis coli Protein (APCbD). Eine Analyse in dem Programm ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) ermittelt eine Homologie zwischen diesen Domänen von 22,3% an identischen und 37,5% an homologen Aminosäuren (Abbildung 4-4). Die APCbD ist eine Region, die in den APC-Familienmitgliedern auftritt und einen hohen Anteil an positiv-geladenen Aminosäuren enthält. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die APCbD mit Mikrotubuli interagiert (Deka *et al.*, 1998). Insbesondere ein Bereich im APC-Protein, der die Aminosäuren 2244-2312 umfasst und einen Teil der APCbD einschließt, hat sich als essentiell für die hochaffine Bindung an nicht-assembliertes Tubulin erwiesen. Dieser Bereich ist der tubulinbindenden Domäne des Tau1-Proteins ähnlich, einem Mitglied der Mikrotubuli-assoziierten Proteinfamilie, und weist gleiche biochemische Eigenschaften der Tubulinbindung auf (Deka *et al.*, 1998). Auch in diesen beiden Proteinen ist die Aminosäurehomologie mit 37% relativ gering. Tau1 seinerseits wird in Neuronen in Axonen lokalisiert (Binder *et al.*, 1985). Die C-terminale Region von APC bindet *in vitro* an Mikrotubuli und begünstigt ebenfalls die Tubulinassemblierung. Dieser Prozess ist jedoch nicht abhängig von den Aktin-Filamenten (Shimomura *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 1994). Die N-terminale Domäne des GlyT2 könnte somit eine ähnliche Rolle für den Axon-spezifischen Transport der GlyT2 haben. Die axonale Verteilung lässt sich in überexprimierenden Systemen, wie transfizierten Neuronen, jedoch nur begrenzt analysieren. Umso interessanter wird es sein, die transgenen Mäuse mit den Deletionen in der N-terminalen Domäne hinsichtlich der Transgenlokalisierung zu untersuchen.

GlyT2	4	Q	P	A	N	I	L	E	A	A	V	P	G	H	R	D	S	P	R	A	P	R	T	S	P	E	Q	D	L	P	A	E	A	P	T	-	A	T	V	Q	P	P	R	V	P	R	S	A	T	G	-	-	-	A	Q	T	F	Q	S	A	59					
APCbD	37	K	P	A	G	K	S	Q	P	S	P	I	T	K	D	P	S	P	S	Q	R	S	R	S	L	H	R	-	P	M	K	S	S	E	L	A	S	L	S	P	P	-	-	P	R	S	A	T	P	P	A	R	L	A	K	T	P	S	S	93						
GlyT2	60	D	A	R	A	C	E	A	Q	Q	S	G	V	G	F	C	N	L	S	S	P	R	A	Q	A	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	A	A	L	R	D	L	S	E	G	H	S	A	Q	A	N	P	P	S	G	P	A	G	A	G	109
APCbD	94	S	S	Q	T	S	P	A	S	Q	P	L	P	R	K	M	P	Y	T	T	P	G	A	G	A	L	P	G	P	G	A	S	P	V	P	K	Q	P	A	R	Q	L	L	A	K	Q	H	K	T	Q	K	S	P	V	R	I	P	F	M	Q	R	153				
GlyT2	110	N	A	L	H	C	K	I	P	A	L	R	G	P	E	D	A	N	V	S	V	G	K	G	L	E	H	N	N	T	P	A	V	G	W	V	N	M	S	Q	S	T	V	V	L	G	T	D	G	I	A	S	V	L	P	G	S	V	A	169						
APCbD	154	P	A	R	R	G	P	P	L	A	R	A	R	P	E	P	G	-	-	S	R	G	R	A	G	M	E	N	G	P	G	A	R	G	K	R	L	G	L	V	R	M	A	S	A	K	S	S	G	S	E	S	S	D	R	S	G	F	R	211						
GlyT2	170	T	T	I	P	E	D	E	Q	G	D	E	N	K	A	R	G	N	W	S	190																																													
APCbD	212	Q	L	T	F	I	K	E	S	P	G	P	L	R	R	R	S	E	L	S	232																																													

Abbildung 4-4: Sequenzhomologie mit der APC-basischen Domäne. Die APCbD (pfam05959) und die N-terminale Domäne des GlyT2 weisen eine identische Sequenz von 22,3 % und eine Sequenzähnlichkeit von 37,5 % auf. Rot, identische Aminosäure; blau, homologe Aminosäure.

4.4 Generierung transgener Mäuse mit N-terminalen GlyT2-Deletionen

Experimente in HEKT-Zellen und HCN deuteten daraufhin, dass die N-terminale Domäne für die Lokalisation und Stabilität des GlyT2 eine wichtige Rolle spielt. Eine Aussage über die Lokalisation von Proteinen unter überexprimierenden Bedingungen, wie in transfizierten HCN, ist nur eingeschränkt möglich. Zusätzlich implizieren bereits identifizierte Interaktionspartner, wie Ulip6 und Calpain, eine regulatorische Funktion dieser Domäne (Baliova *et al.*, 2004; Horiuchi *et al.*, 2005). Die Relevanz dieser Interaktionen und daraus folgende Effekte sind allerdings bisher nicht *in vivo* untersucht worden. Um einen Einblick in die *in vivo* Funktion der N-terminalen Domäne des GlyT2 zu erlangen, sind der myc13-markierte GlyT2 wt sowie die entsprechenden N-terminalen Deletionsmutanten durch homologe Rekombinationstechniken in den BAC-Klon RPCI23 365E4 eingefügt worden, der den GlyT2-Lokus enthält (Gong *et al.*, 2002; Zeilhofer *et al.*, 2005). In diesem BAC wurde das Exon 2 durch die jeweilige GlyT2-cDNA ausgetauscht. Drei verschiedene BAC-transgene Linien wurden generiert: GlyT2-wt/BAC, GlyT2- Δ AA12-174/BAC und GlyT2- Δ AA12-184/BAC. Die modifizierten BAC-Konstrukte wurden durch Restriktionsverdau mit unterschiedlichen Enzymen detailliert analysiert, bevor sie in den Pronukleus einer Zygote injiziert wurden. Mäuse, die diesen so modifizierten BAC als Transgen tragen, exprimieren entweder den GlyT2 wt oder eine der beiden Deletionsmutanten unter der Kontrolle des GlyT2-Promotors. Die Existenz des GlyT2-Promotors sowie der notwendigen regulatorischen Elemente in dem BAC-Klon RPCI23 365E4 sind bereits in einer GlyT2-EGFP-Mauslinie überprüft worden (Zeilhofer *et al.*, 2005). In diesen Mäusen ist das GlyT2-Exon 2 des BAC-Klons durch eine EGFP-Sequenz mit sich anschließender pA-Kassette ausgetauscht worden. Analysen dieser GlyT2-EGFP Mäuse zeigten nur wenig ektope EGFP-Expression, d. h. EGFP-Protein in Zellen die normalerweise keine GlyT2-Transkripte aufweisen. Die Verwendung des BAC-Klons erschien deshalb sinnvoll.

Von allen generierten GlyT2 Δ N-Mauslinien konnten über Genotypisierungs-PCRs positive „Founder“, d. h. Mäuse, die den BAC an einer zufälligen Stelle in ihrem Genom insertiert haben, identifiziert werden. Diese sollen durch Southern Blot-Analyse bestätigt werden. Da die Integration in den Founder-Tieren mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit an unterschiedlichen Stellen im Genom stattgefunden hat, stellt jeder Founder aus der Vorkerninjektion den Beginn einer genetisch eigenständigen, nicht wiederholbaren Linie dar. Die Integrationsorte treten häufig an Doppelstrangbrüchen der zygotischen DNA auf, die schließlich miteinander ligiert werden und so zu einer stabilen Integration führen (Folger *et al.*, 1982). Die BAC-transgenen Founder werden im Anschluss mit einer C57BL/6J-Mauslinie verpaart, um zu überprüfen, ob der Founder das BAC-Transgen an seine Nachkommen weitergibt. Nur so können letztendlich verschiedene BAC-transgene Mauslinien

etabliert werden, die unterschiedliche Expressionsstärken und Verteilungen des Transgens aufweisen.

Anschließend kann ggf. überprüft werden, ob die BAC-DNA nur einmal integriert wurde, oder ob sich sog. Konkatomere gebildet haben. Da bei der Injektion viele freie Enden der BAC-DNA zur Verfügung stehen, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die injizierte DNA mehrmals miteinander ligiert wurde und so Wiederholungen der BAC-DNA hintereinander auftreten. Normalerweise liegen diese in einer „Head-to-tail“-Formation vor (Folger *et al.*, 1982). Es hat sich gezeigt, dass viele Wiederholungen einer Sequenz zu einer Stilllegung des betreffenden Genbereichs und somit nicht zur Transkription des Transgens führen können (Bingham, 1997; Matzke und Matzke, 1995). In den von mir generierten Mauslinien ist diese Möglichkeit berücksichtigt und deshalb hinter der pA-Kassette eine FRT-Erkennungssequenz eingefügt worden. Sequenzen, die zwischen zwei FRT-Erkennungssequenzen mit gleicher Orientierung liegen, werden bei Expression der Flp-Rekombinase effizient deletiert (Dymecki, 1996). Da in dem BAC-Konstrukt aber nur jeweils eine FRT-Erkennungssequenz vorkommt, kann es nur zu Deletion der dazwischenliegenden Bereiche kommen, wenn die BAC-DNA mehrmals hintereinander integriert wurde (Abbildung 4-5). Durch die Verpaarung der BAC-transgenen Mäuse mit einer Mauslinie, die die Flp-Rekombinase unter einem ubiquitären Promotor exprimiert (Farley *et al.*, 2000), kann so ggf. die Anzahl an Konkatomeren bis auf eine einzelne integrierte BAC-DNA reduziert werden. Sollte die Integration auf verschiedenen Chromosomen vorliegen, können diese nicht durch die Behandlung mit der Flp-Rekombinase reduziert werden. Sehr wahrscheinlich werden diese durch das Auskreuzen der Founder über mehrere Generationen aber voneinander getrennt.

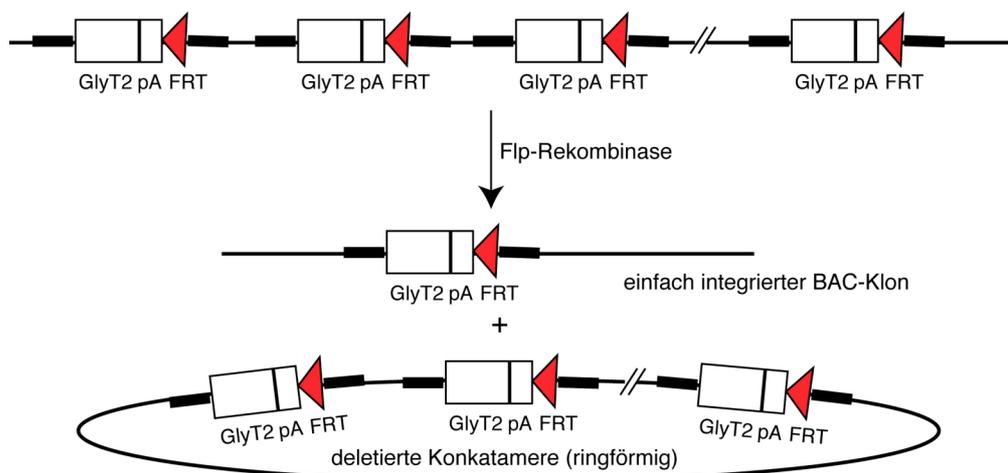


Abbildung 4-5: Reduktion von Konkatomeren durch die Behandlung mit Flp-Rekombinase. Konkatomere können während der Pronucleusinjektion entstehen. Sind die FRT-Erkennungssequenzen in der gleichen Orientierung kommt es nach der Expression der Flp-Rekombinase zu einer Reduktion der Konkatomere. Die übrigen BAC-DNAs werden in einem ringförmigen DNA-Stück deletiert.

Die Founder sind zurzeit der Abgabe der Arbeit geboren und genotypisiert worden. Sobald eine transgene Linie etabliert ist, sollen folgende Fragen adressiert werden:

Wie wirkt sich die N-terminale Deletion des GlyT2 auf die Lokalisation in Neuronen aus?

Der GlyT2 tritt normalerweise nur in der präsynaptischen Terminalie nahe der CAZ auf. Falls die Deletion der N-terminalen Domäne einen Einfluss auf die Lokalisation hat, sollte dies in Schnittpräparaten einzelner Hirnregionen, wie beispielsweise des Rückenmarks und des Hirnstamms, die eine hohe endogene GlyT2-Expression zeigen, zu beobachten sein. Der endogene GlyT2 kann vom transgenen GlyT2 mittels des eingefügten myc-Epitops unterschieden werden. Im Falle der N-terminalen Deletionsmutanten besteht sogar die Möglichkeit, den endogenen GlyT2 über einen N-terminalen spezifischen GlyT2-Antikörper, und die Deletionsmutanten über einen myc-spezifischen Antikörper, unabhängig voneinander anzufärben. Eine Deletion der N-terminalen Domäne könnte, wie die Ergebnisse in HCN andeuteten, die Verteilung des GlyT2 innerhalb glycinerner Neuronen verändern. Die gleichmäßigere Verteilung in HCN könnte ein Hinweis dafür sein, dass die Akkumulation von GlyT2 in der präsynaptischen Terminalie nicht richtig erfolgt und daher auch extrasynaptische Transporter auftreten.

Kann eine Verpaarung der GlyT2-defizienten Mäuse mit den BAC-transgenen Mäusen den neuromotorischen Phänotyp verhindern?

Eine Kreuzung zwischen den GlyT2 $-/-$ und den BAC-transgenen Tieren könnte zu einer Normalisierung des GlyT2-Phänotyps führen, da in den Regionen, in denen GlyT2 normalerweise auftritt, das BAC-Transgen transkribiert wird. Die Verpaarung der GlyT2 $-/-$ mit GlyT2 wt/BAC Tieren sollte so bei ausreichender Expression des Transgens zum Phänotyp einer wt Maus führen. Aus der Analyse GlyT2-defizienter Mäuse ist bekannt, dass der GlyT2 die effiziente Aufnahme in die präsynaptische Terminalie vermittelt, in der Glycin dann durch den VIAAT in synaptische Vesikel befüllt werden kann (Gomez *et al.*, 2003b). Sollten die GlyT2 Δ N-Mauslinien eine veränderte Lokalisation des GlyT2 aufweisen, wäre es interessant zu analysieren, ob die extrasynaptische Lokalisation des GlyT2 zur Befüllung von synaptischen Vesikeln ausreicht.

4.5 Generierung einer GlyT2-Cre transgenen Mauslinie

Neben den BAC-transgenen Mäusen, die eine Deletion im N-Terminus des GlyT2 tragen, wurde auch eine Mauslinie generiert, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des GlyT2-Promotors exprimiert. Hierfür wurde ein Targetingvektor kloniert, der die cDNA der Cre-Rekombinase enthält, flankiert von zwei 500 bp langen Sequenzen, die den Regionen vor bzw. hinter dem Exons 2 im GlyT2-Lokus

entsprechen. Die Integration in den BAC wurde mittels PCR- und Southern Blot-Analyse überprüft. Die korrekte Cre/BAC-DNA wurde schließlich in den Vorkern von Zygoten injiziert. Im Anschluss soll durch Genotypisierung und Southern Blot-Analyse eine Mauslinie identifiziert werden, die die Cre-Rekombinase in GlyT2-positiven Zellen exprimiert. Diese Linie sollte dann zur Analyse des glycinergen Systems verwendet werden, da der GlyT2 der bisher einzige bekannte Marker von glycinergen Neuronen ist (Poyatos *et al.*, 1997). Glycinerge Neurotransmission tritt in hoher Konzentration in Interneuronen des Rückenmarks und Hirnstamms auf. Durch die Expression der Cre-Rekombinase in ausschließlich glycinergen Neuronen kann z. B. die Funktion bekannter Genprodukte in diesen Zellen ermittelt werden. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass die zu analysierenden Gene von loxP-Seiten flankiert werden, sog. konditionale Deletionsmutanten (Abbildung 4-6). So kann in GlyT2-positiven Zellen dieses Gen inaktiviert werden, während es in anderen Zellen aktiv bleibt. Diese Technik hat sich besonders für Gene mit einem letalen Phänotyp als nützlich erwiesen (Gu *et al.*, 1994).

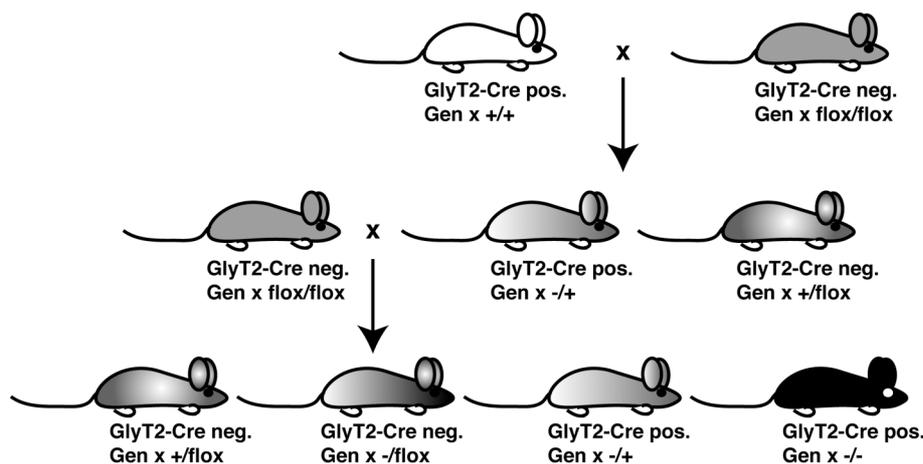


Abbildung 4-6: Schema über die Inaktivierung von einem „geflochten“ Gen x durch die Kreuzung mit einer Cre-Maus. Ein durch loxP-Seiten flankiertes Gen x (flox/flox) wird durch die Kreuzung mit einer Cre-Rekombinase exprimierenden Mauslinie deletiert. Das Gen x wird inaktiviert. Die Cre-Mauslinie kann die Cre-Rekombinase unter Kontrolle eines ubiquitären Promotors exprimieren, die zur Deletion des Gens x in allen Geweben führt, oder unter Kontrolle eines gewebsspezifischen Promotors, der dann nur in einigen Geweben zur Inaktivierung des Gens x führt.

Die Cre-Mauslinie kann aber auch zur Expression von transgenen Genprodukten in glycinergen Neuronen verwendet werden, die normalerweise in diesen Zellen nicht exprimiert werden. Die Verpaarung mit transgenen Mäusen, die vor dem Transgen eine von loxP-Seiten flankierte pA-Kassette enthalten, führt so zu einer Expression des Transgens in glycinergen, Cre-Rekombinase-positiven Neuronen (Abbildung 4-7). Die Transkription des Transgens wird über die zellspezifische und temporäre Expression der Cre-Rekombinase induziert. In dieser Hinsicht wäre beispielsweise die transgene Expression von GlyT1 in GlyT2 -/- Mäusen interessant, um zu

untersuchen, ob die Präsenz eines GlyT-Proteins mit einem geringeren elektrochemischen Potential für die Normalisierung des Phänotyps ausreicht.

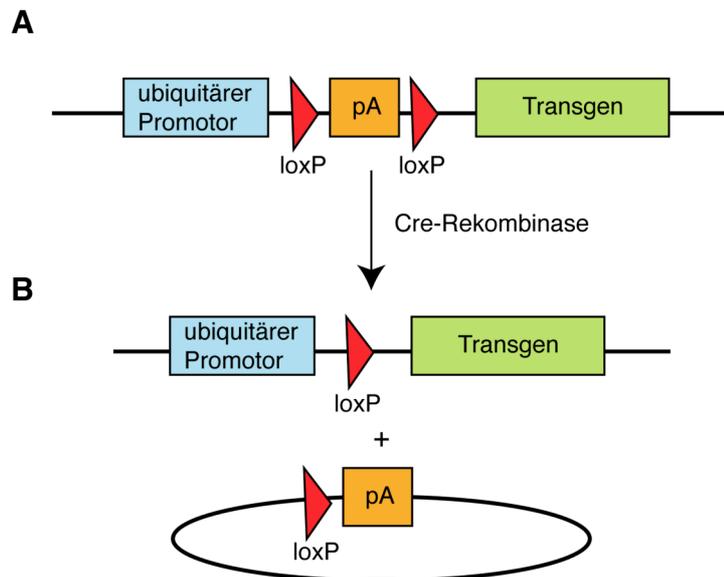


Abbildung 4-7: Aktivierung eines Transgens durch die Cre-Rekombinase. **A**, eine von loxP-Seiten flankierte pA-Kassette unterbindet die Transkription des Transgens. **B**, erst nach Expression der Cre-Rekombinase wird der Bereich zwischen den loxP-Seiten deletiert und die pA-Kassette so entfernt. Das Transgen kann anschließend transkribiert werden.

4.6 GlyR-Cluster in GlyT2-defizienten Mäusen

In der zweiten postnatalen Woche entwickeln GlyT2 $-/-$ Mäuse einen starken neuromotorischen Phänotyp, der durch einen starken Tremor charakterisiert ist. Zusätzlich sind diese Mäuse unfähig, sich umzudrehen, wenn sie auf den Rücken gelegt werden („impaired righting response“) und klammern die hinteren Extremitäten zusammen, wenn sie am Schwanz hochgehoben werden („hind feet clasping“), während eine wt Maus die Extremitäten von sich spreizt. Ein ähnlicher Phänotyp ist für Mäuse mit natürlich auftretenden Mutationen in der GlyR α -UE beschrieben worden (Becker *et al.*, 1992). Aus diesem Grund wurden hier die GlyR α -UE in GlyT2-defizienten Mäusen untersucht. Hierfür wurden Kryostatschnitte vom Rückenmark verschiedener Entwicklungsstadien (P0 bis P10) von wt und $-/-$ Tieren analysiert. In einer Western Blot-Analyse konnte bereits im Vorfeld gezeigt werden, dass die Immunreaktivität der GlyR α -UE insgesamt unverändert ist (Gomez *et al.*, 2003b). Zunächst wurde die Clustergröße und -anzahl in den Rückenmarkschnitten analysiert. In den Stadien von P0 bis P10 war im wt und GlyT2 $-/-$ Tieren eine ca. 20%ige Zunahme an GlyR-Clustern zu beobachten, wie sie ähnlich auch in Ratten auftritt (Becker *et al.*, 1992). Zusätzlich erfolgte eine immunzytochemische Analyse mit einem GlyR α 1-spezifischen Antikörper (mab2b), da in dem Zeitraum, in dem der GlyT2-Phänotyp auftritt, ein Austausch der primär embryonalen α 2-UE durch die adulte α 1-UE erfolgt (Becker *et al.*, 1992; Singer *et al.*, 1998). In Ratten ist dieser

Vorgang bis zum Entwicklungsstadium P20 abgeschlossen. In den wt und GlyT2 $-/-$ Mäusen konnte kein Unterschied in der Clusteranzahl oder -größe festgestellt werden. Der α -UE-Austausch ist folglich in den GlyT2 $-/-$ Tieren im Vergleich zu wt Mäusen nicht verändert. Dennoch spielt möglicherweise der Austausch der α -UE eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Phänotyps der GlyT2 $-/-$ Mäuse. So weisen die α 1- und α 2-UE unterschiedliche Öffnungskinetiken des intrinsischen Cl⁻-Kanals auf. Zwar binden sie Glycin mit ähnlicher Affinität, aber die Dauer der Cl⁻-Ionen-Permeabilität pro Öffnungsereignis ist bei der α 1-UE kürzer als bei der α 2-UE (Takahashi *et al.*, 1992). Somit ist die resultierende Hyperpolarisation der postsynaptischen Zelle in adulten Tieren geringer als in früheren Stadien. In den GlyT2 $-/-$ Tieren wird weniger Glycin von der Präsynapse freigesetzt, wie durch elektrophysiologische Messungen festgestellt werden konnte (Gomez *et al.*, 2003b). Die Menge an ausgeschüttetem Glycin kann dann einerseits durch die schnelle Kinetik der α 1-UE nicht mehr zu einer effizienten Hyperpolarisation der postsynaptischen Zelle führen. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass die Inhibierung des glycinergen Systems in früheren Stadien nicht in dem gleichen Ausmaße notwendig ist wie zu späteren. In der frühen postnatalen Entwicklung sind die meisten inhibitorischen Synapsen GABAerg, während innerhalb der ersten zwei Wochen der postnatalen Entwicklung das glycinerge System zunehmend an Bedeutung gewinnt (Awatramani *et al.*, 2005; Kotak *et al.*, 1998). Veränderungen im GABAergen System konnten in GlyT2 $-/-$ Tieren jedoch nicht beobachtet werden (Kremer, 2004).

5 FAZIT

Die N-terminale Domäne und das PDZ-DBM des GlyT2 spielen für die Lokalisation und möglicherweise auch für die Regulation dieses Transporters in Neuronen eine wichtige Rolle. So sind sie zwar nicht für die Insertion in die Plasmamembran wichtig, noch beeinflussen sie die Fähigkeit des GlyT2s, Glycin zu importieren. Hingegen sind die Aminosäuren 306-318 im EL2 des GlyT2s für die Funktionalität essentiell. In der C-terminalen Domäne des GlyT2 befindet sich ähnlich wie in anderen Transportern der *SLC6*-Familie ein ER-Retentionssignal. Die C-terminale Fusion mit EGFP unterbindet die Transportaktivität des GlyT2, während die zusätzliche Deletion der N-terminalen Domäne einen Export aus dem ER verhindert. Die Deletion der N-terminalen Domäne alleine beeinflusst hingegen die Insertion in die Plasmamembran nicht.

In der Präsynapse besteht die Aufgabe des GlyT2 in der Bereitstellung von Glycin für den VIAAT, der die synaptischen Vesikel mit Glycin für die Ausschüttung in den synaptischen Spalt bereitstellt. Die Deletion der N-terminalen Domäne oder die

Inaktivierung des PDZ-DBM führt zu einer Reduktion von GlyT2 in Synapsen, wie durch Kofärbungen mit synaptischen Markern in hippocampalen Neuronen gezeigt werden konnte. Welche Auswirkungen die reduzierte Zahl an synaptischen GlyT2s auf den Organismus hat, bleibt in transgenen Mäusen zu evaluieren (Abbildung 5-1).

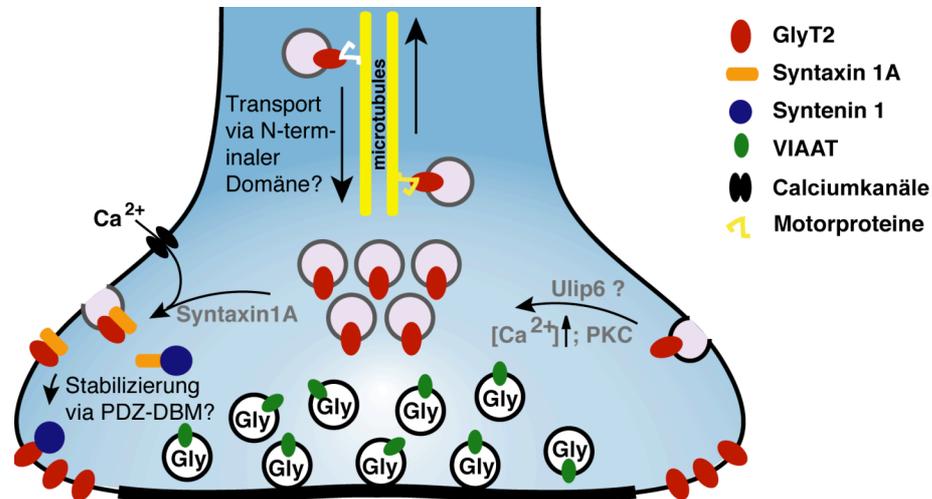


Abbildung 5-1: Die Rolle der N-terminalen Domäne und des PDZ-DBM in der Präsynapse. GlyT2s werden wahrscheinlich über Motorproteine entlang von Mikrotubuli in die synaptische Terminalie transportiert. Dort führt eine geringe Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zusammen mit Syntaxin 1A zu einer Insertion des GlyT2 in die Plasmamembran durch Fusion intrazellulärer Transportvesikel (Reservepool, lila Vesikel). Die über die PDZ-DBM vermittelte Interaktion mit Syntenin 1 könnte dann zu einer Stabilisierung des GlyT2 in der präsynaptischen Plasmamembran führen. Ulp6, langanhaltender Ca^{2+} -Influx und PKC spielen hingegen möglicherweise in der Endozytose des GlyT2 eine Rolle. Gly, Glycin; PKC, Proteinkinase C.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* *215*, 403-410.

Awatramani, G. B., Turecek, R., and Trussell, L. O. (2005). Staggered development of GABAergic and glycinergic transmission in the MNTB. *J Neurophysiol* *93*, 819-828.

Baliova, M., Betz, H., and Jursky, F. (2004). Calpain-mediated proteolytic cleavage of the neuronal glycine transporter, GlyT2. *J Neurochem* *88*, 227-232.

Bauman, P. A., and Blakely, R. D. (2002). Determinants within the C-terminus of the human norepinephrine transporter dictate transporter trafficking, stability, and activity. *Arch Biochem Biophys* *404*, 80-91.

Becker, C. M., Schmieden, V., Tarroni, P., Strasser, U., and Betz, H. (1992). Isoform-selective deficit of glycine receptors in the mouse mutant spastic. *Neuron* *8*, 283-289.

Berger, A. J., Dieudonne, S., and Ascher, P. (1998). Glycine uptake governs glycine site occupancy at NMDA receptors of excitatory synapses. *J Neurophysiol* *80*, 3336-3340.

Betz, H., Harvey, R. J., and Schloss, P. (2000). *Structure, Diversity and Pharmacology of Glycine Receptors and Transporters*, Möhler, H. edn, Springer Verlag, Berlin.

Bezprozvanny, I., and Maximov, A. (2001). PDZ domains: More than just a glue. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 787-789.

Binder, L. I., Frankfurter, A., and Rebhun, L. I. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* *101*, 1371-1378.

Bingham, P. M. (1997). Cosuppression comes to the animals. *Cell* *90*, 385-387.

Bjerggaard, C., Fog, J. U., Hastrup, H., Madsen, K., Loland, C. J., Javitch, J. A., and Gether, U. (2004). Surface targeting of the dopamine transporter involves discrete epitopes in the distal C terminus but does not require canonical PDZ domain interactions. *J Neurosci* *24*, 7024-7036.

Borrell-Pages, M., Fernandez-Larrea, J., Borroto, A., Rojo, F., Baselga, J., and Arribas, J. (2000). The carboxy-terminal cysteine of the tetraspanin L6 antigen is required for its interaction with SITAC, a novel PDZ protein. *Mol Biol Cell* *11*, 4217-4225.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* *72*, 248-254.

Branda, C. S., and Dymecki, S. M. (2004). Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell* *6*, 7-28.

Brenner, R. P. (2004). EEG in convulsive and nonconvulsive status epilepticus. *J Clin Neurophysiol* *21*, 319-331.

Clements, J. D., Lester, R. A., Tong, G., Jahr, C. E., and Westbrook, G. L. (1992). The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* *258*, 1498-1501.

Cubelos, B., Gimenez, C., and Zafra, F. (2005). Localization of the GLYT1 glycine transporter at glutamatergic synapses in the rat brain. *Cereb Cortex* *15*, 448-459.

Danglot, L., Rostaing, P., Triller, A., and Bessis, A. (2004). Morphologically identified glycinergic synapses in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 27, 394-403.

Danglot, L., Triller, A., and Bessis, A. (2003). Association of gephyrin with synaptic and extrasynaptic GABAA receptors varies during development in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 23, 264-278.

Deka, J., Kuhlmann, J., and Muller, O. (1998). A domain within the tumor suppressor protein APC shows very similar biochemical properties as the microtubule-associated protein tau. *Eur J Biochem* 253, 591-597.

Dotti, C. G., and Simons, K. (1990). Polarized sorting of viral glycoproteins to the axon and dendrites of hippocampal neurons in culture. *Cell* 62, 63-72.

Doyle, D. A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M., and MacKinnon, R. (1996). Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 85, 1067-1076.

Dymecki, S. M. (1996). Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6191-6196.

Ebihara, S., Yamamoto, T., Obata, K., and Yanagawa, Y. (2004). Gene structure and alternative splicing of the mouse glycine transporter type-2. *Biochem Biophys Res Commun* 317, 857-864.

Ellory, J. C., Jones, S. E., and Young, J. D. (1981). Glycine transport in human erythrocytes. *J Physiol* 320, 403-422.

Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G., and Bishop, J. M. (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 5, 3610-3616.

Farhan, H., Korkhov, V. M., Paulitschke, V., Dorostkar, M. M., Scholze, P., Kudlacek, O., Freissmuth, M., and Sitte, H. H. (2004). Two discontinuous segments in the carboxyl terminus are required for membrane targeting of the rat gamma-aminobutyric acid transporter-1 (GAT1). *J Biol Chem* 279, 28553-28563.

Farley, F. W., Soriano, P., Steffen, L. S., and Dymecki, S. M. (2000). Widespread recombinase expression using FLPeR (flipper) mice. *Genesis* 28, 106-110.

Folger, K. R., Wong, E. A., Wahl, G., and Capecchi, M. R. (1982). Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. *Mol Cell Biol* 2, 1372-1387.

Fornes, A., Nunez, E., Aragon, C., and Lopez-Corcuera, B. (2004). The second intracellular loop of the glycine transporter 2 contains crucial residues for glycine transport and phorbol ester-induced regulation. *J Biol Chem* 279, 22934-22943.

Fuhrmann, J. C., Kins, S., Rostaing, P., El Far, O., Kirsch, J., Sheng, M., Triller, A., Betz, H., and Kneussel, M. (2002). Gephyrin interacts with Dynein light chains 1 and 2, components of motor protein complexes. *J Neurosci* 22, 5393-5402.

Gammelsaeter, R., Froyland, M., Aragon, C., Danbolt, N. C., Fortin, D., Storm-Mathisen, J., Davanger, S., and Gundersen, V. (2004). Glycine, GABA and their transporters in pancreatic islets of Langerhans: evidence for a paracrine transmitter interplay. *J Cell Sci* 117, 3749-3758.

Geerlings, A., Lopez-Corcuera, B., and Aragon, C. (2000). Characterization of the interactions between the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 and the SNARE protein syntaxin 1A. *FEBS Lett* 470, 51-54.

- Geerlings, A., Nunez, E., Lopez-Corcuera, B., and Aragon, C. (2001). Calcium- and syntaxin 1-mediated trafficking of the neuronal glycine transporter GLYT2. *J Biol Chem* 276, 17584-17590.
- Geerlings, A., Nunez, E., Rodenstein, L., Lopez-Corcuera, B., and Aragon, C. (2002). Glycine transporter isoforms show differential subcellular localization in PC12 cells. *J Neurochem* 82, 58-65.
- Gomez, J., Hulsmann, S., Ohno, K., Eulenburg, V., Szoke, K., Richter, D., and Betz, H. (2003a). Inactivation of the glycine transporter 1 gene discloses vital role of glial glycine uptake in glycinergic inhibition. *Neuron* 40, 785-796.
- Gomez, J., Ohno, K., Hulsmann, S., Armsen, W., Eulenburg, V., Richter, D. W., Laube, B., and Betz, H. (2003b). Deletion of the mouse glycine transporter 2 results in a hyperekplexia phenotype and postnatal lethality. *Neuron* 40, 797-806.
- Gomez, J., Zafra, F., Olivares, L., Gimenez, C., and Aragon, C. (1995). Regulation by phorbol esters of the glycine transporter (GLYT1) in glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1233, 41-46.
- Gong, S., Yang, X. W., Li, C., and Heintz, N. (2002). Highly efficient modification of bacterial artificial chromosomes (BACs) using novel shuttle vectors containing the R6Kgamma origin of replication. *Genome Res* 12, 1992-1998.
- Gramates, L. S., and Budnik, V. (1999). Assembly and maturation of the Drosophila larval neuromuscular junction. *Int Rev Neurobiol* 43, 93-117.
- Gray, E. G. (1959). Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J Anat* 93, 420-433.
- Grenningloh, G., Rienitz, A., Schmitt, B., Methfessel, C., Zensen, M., Beyreuther, K., Gundelfinger, E. D., and Betz, H. (1987). The strychnine-binding subunit of the glycine receptor shows homology with nicotinic acetylcholine receptors. *Nature* 328, 215-220.
- Grenningloh, G., Schmieden, V., Schofield, P. R., Seeburg, P. H., Siddique, T., Mohandas, T. K., Becker, C. M., and Betz, H. (1990). Alpha subunit variants of the human glycine receptor: primary structures, functional expression and chromosomal localization of the corresponding genes. *Embo J* 9, 771-776.
- Grootjans, J. J., Zimmermann, P., Reekmans, G., Smets, A., Degeest, G., Durr, J., and David, G. (1997). Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13683-13688.
- Grudzinska, J., Schemm, R., Haeger, S., Nicke, A., Schmalzing, G., Betz, H., and Laube, B. (2005). The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron* 45, 727-739.
- Gu, H., Marth, J. D., Orban, P. C., Mossmann, H., and Rajewsky, K. (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265, 103-106.
- Guastella, J., Brecha, N., Weigmann, C., Lester, H. A., and Davidson, N. (1992). Cloning, expression, and localization of a rat brain high-affinity glycine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7189-7193.
- Harvey, R. J., Depner, U. B., Wassle, H., Ahmadi, S., Heindl, C., Reinold, H., Smart, T. G., Harvey, K., Schutz, B., Abo-Salem, O. M., *et al.* (2004). GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304, 884-887.

- Hirbec, H., Perestenko, O., Nishimune, A., Meyer, G., Nakanishi, S., Henley, J. M., and Dev, K. K. (2002). The PDZ proteins PICK1, GRIP, and syntenin bind multiple glutamate receptor subtypes. Analysis of PDZ binding motifs. *J Biol Chem* *277*, 15221-15224.
- Horiuchi, M., Loebrich, S., Brandstaetter, J. H., Kneussel, M., and Betz, H. (2005). Cellular localization and subcellular distribution of Unc-33-like protein 6, a brain-specific protein of the collapsin response mediator protein family that interacts with the neuronal glycine transporter 2. *J Neurochem* *94*, 307-315.
- Hubner, C. A., Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Meyer, T., Ballanyi, K., and Jentsch, T. J. (2001). Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron* *30*, 515-524.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* *96*, 23-28.
- Ioannou, P. A., Amemiya, C. T., Garnes, J., Kroisel, P. M., Shizuya, H., Chen, C., Batzer, M. A., and de Jong, P. J. (1994). A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat Genet* *6*, 84-89.
- Jaskolski, F., Normand, E., Mulle, C., and Coussen, F. (2005). Differential trafficking of GluR7 kainate receptor subunit splice variants. *J Biol Chem* *280*, 22968-22976.
- Johnson, J. W., and Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* *325*, 529-531.
- Jursky, F., and Nelson, N. (1996). Developmental expression of the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 in mouse brain. *J Neurochem* *67*, 336-344.
- Kilby, N. J., Snaith, M. R., and Murray, J. A. (1993). Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet* *9*, 413-421.
- Kim, E., and Sheng, M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* *5*, 771-781.
- Kirsch, J., and Betz, H. (1995). The postsynaptic localization of the glycine receptor-associated protein gephyrin is regulated by the cytoskeleton. *J Neurosci* *15*, 4148-4156.
- Klebe, R. J., Grant, A., Grant, G., and Ghosh, P. (1995). Cyclic-AMP deficient MDCK cells form tubules. *J Cell Biochem* *59*, 453-462.
- Koh, T. W., and Bellen, H. J. (2003). Synaptotagmin I, a Ca²⁺ sensor for neurotransmitter release. *Trends Neurosci* *26*, 413-422.
- Koroll, M., Rathjen, F. G., and Volkmer, H. (2001). The neural cell recognition molecule neurofascin interacts with syntenin-1 but not with syntenin-2, both of which reveal self-associating activity. *J Biol Chem* *276*, 10646-10654.
- Kotak, V. C., Korada, S., Schwartz, I. R., and Sanes, D. H. (1998). A developmental shift from GABAergic to glycinergic transmission in the central auditory system. *J Neurosci* *18*, 4646-4655.
- Kremer, T. (2004). Das GABAerge System in Glycintransporter-2 defizienten Mäusen. Diplomarbeit, Frankfurt am Main.
- Kuhse, J., Schmieden, V., and Betz, H. (1990). A single amino acid exchange alters the pharmacology of neonatal rat glycine receptor subunit. *Neuron* *5*, 867-873.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.

Langosch, D., Thomas, L., and Betz, H. (1988). Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 7394-7398.

Legendre, P. (2001). The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* *58*, 760-793.

Liu, H., Merav, B., Chen, W., Madsen, K., Gether, U., Brasch, M., Zhou, J., Irwin, N., and Rosenberg, P. A. (2005). Functional interaction between the glutamate transporter GLT1B and the synaptic PDZ domain protein PICK1. Society for Neuroscience, Poster presentation, Program No. 38.34.

Liu, Q. R., Lopez-Corcuera, B., Mandiyan, S., Nelson, H., and Nelson, N. (1993). Cloning and expression of a spinal cord- and brain-specific glycine transporter with novel structural features. *J Biol Chem* *268*, 22802-22808.

Liu, Q. R., Nelson, H., Mandiyan, S., Lopez-Corcuera, B., and Nelson, N. (1992). Cloning and expression of a glycine transporter from mouse brain. *FEBS Lett* *305*, 110-114.

Lopez-Corcuera, B., Vazquez, J., and Aragon, C. (1991). Purification of the sodium- and chloride-coupled glycine transporter from central nervous system. *J Biol Chem* *266*, 24809-24814.

Luque, J. M., Nelson, N., and Richards, J. G. (1995). Cellular expression of glycine transporter 2 messenger RNA exclusively in rat hindbrain and spinal cord. *Neuroscience* *64*, 525-535.

Lynch, J. W. (2004). Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev* *84*, 1051-1095.

Mahendrasingam, S., Wallam, C. A., and Hackney, C. M. (2003). Two approaches to double post-embedding immunogold labeling of freeze-substituted tissue embedded in low temperature Lowicryl HM20 resin. *Brain Res Brain Res Protoc* *11*, 134-141.

Maley, F., Trimble, R. B., Tarentino, A. L., and Plummer, T. H., Jr. (1989). Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal Biochem* *180*, 195-204.

Martinez-Maza, R., Poyatos, I., Lopez-Corcuera, B., E. N. u., Gimenez, C., Zafra, F., and Aragon, C. (2001). The role of N-glycosylation in transport to the plasma membrane and sorting of the neuronal glycine transporter GLYT2. *J Biol Chem* *276*, 2168-2173.

Matzenbach, B., Maulet, Y., Sefton, L., Courtier, B., Avner, P., Guenet, J. L., and Betz, H. (1994). Structural analysis of mouse glycine receptor alpha subunit genes. Identification and chromosomal localization of a novel variant. *J Biol Chem* *269*, 2607-2612.

Matzke, M. A., and Matzke, A. (1995). How and Why Do Plants Inactivate Homologous (Trans)genes? *Plant Physiol* *107*, 679-685.

Mercken, M., Fischer, I., Kosik, K. S., and Nixon, R. A. (1995). Three distinct axonal transport rates for tau, tubulin, and other microtubule-associated proteins: evidence for dynamic interactions of tau with microtubules in vivo. *J Neurosci* *15*, 8259-8267.

Miller, S. A., Dykes, D. D., and Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* *16*, 1215.

- Nishimura, T., Fukata, Y., Kato, K., Yamaguchi, T., Matsuura, Y., Kamiguchi, H., and Kaibuchi, K. (2003). CRMP-2 regulates polarized Numb-mediated endocytosis for axon growth. *Nat Cell Biol* 5, 819-826.
- Nong, Y., Huang, Y. Q., Ju, W., Kalia, L. V., Ahmadian, G., Wang, Y. T., and Salter, M. W. (2003). Glycine binding primes NMDA receptor internalization. *Nature* 422, 302-307.
- Nunez, E., and Aragon, C. (1994). Structural analysis and functional role of the carbohydrate component of glycine transporter. *J Biol Chem* 269, 16920-16924.
- Ohno, K., Koroll, M., El Far, O., Scholze, P., Gomeza, J., and Betz, H. (2004). The neuronal glycine transporter 2 interacts with the PDZ domain protein syntenin-1. *Mol Cell Neurosci* 26, 518-529.
- Olivares, L., Aragon, C., Gimenez, C., and Zafra, F. (1997). Analysis of the transmembrane topology of the glycine transporter GLYT1. *J Biol Chem* 272, 1211-1217.
- Pfeiffer, F., Simler, R., Grenningloh, G., and Betz, H. (1984). Monoclonal antibodies and peptide mapping reveal structural similarities between the subunits of the glycine receptor of rat spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 7224-7227.
- Pietrini, G., Suh, Y. J., Edelmann, L., Rudnick, G., and Caplan, M. J. (1994). The axonal gamma-aminobutyric acid transporter GAT-1 is sorted to the apical membranes of polarized epithelial cells. *J Biol Chem* 269, 4668-4674.
- Ponce, J., Biton, B., Benavides, J., Avenet, P., and Aragon, C. (2000). Transmembrane domain III plays an important role in ion binding and permeation in the glycine transporter GLYT2. *J Biol Chem* 275, 13856-13862.
- Pow, D. V., and Hendrickson, A. E. (1999). Distribution of the glycine transporter glyt-1 in mammalian and nonmammalian retinae. *Vis Neurosci* 16, 231-239.
- Poyatos, I., Ponce, J., Aragon, C., Gimenez, C., and Zafra, F. (1997). The glycine transporter GLYT2 is a reliable marker for glycine-immunoreactive neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 49, 63-70.
- Poyatos, I., Ruberti, F., Martinez-Maza, R., Gimenez, C., Dotti, C. G., and Zafra, F. (2000). Polarized distribution of glycine transporter isoforms in epithelial and neuronal cells. *Mol Cell Neurosci* 15, 99-111.
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., and Kaila, K. (1999). The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397, 251-255.
- Roberts, R. J. (1985). Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucleic Acids Res* 13 Suppl, r165-200.
- Roche, K. W., Standley, S., McCallum, J., Dune Ly, C., Ehlers, M. D., and Wenthold, R. J. (2001). Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat Neurosci* 4, 794-802.
- Rosenmund, C., Rettig, J., and Brose, N. (2003). Molecular mechanisms of active zone function. *Curr Opin Neurobiol* 13, 509-519.
- Roux, M. J., and Supplisson, S. (2000). Neuronal and glial glycine transporters have different stoichiometries. *Neuron* 25, 373-383.
- Rubenstein, J. L., and Merzenich, M. M. (2003). Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav* 2, 255-267.

Rülicke, T. (2001). *Transgene, Transgenese, transgene Tiere: Methoden der nichthomologen DNA-Rekombination*. Karger Verlag Basel.

Sagne, C., El Mestikawy, S., Isambert, M. F., Hamon, M., Henry, J. P., Giros, B., and Gasnier, B. (1997). Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases. *FEBS Lett* *417*, 177-183.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* *230*, 1350-1354.

Sakata, K., Sato, K., Schloss, P., Betz, H., Shimada, S., and Tohyama, M. (1997). Characterization of glycine release mediated by glycine transporter 1 stably expressed in HEK-293 cells. *Brain Res Mol Brain Res* *49*, 89-94.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *74*, 5463-5467.

Scholze, P., Zwach, J., Kattinger, A., Pifl, C., Singer, E. A., and Sitte, H. H. (2000). Transporter-mediated release: a superfusion study on human embryonic kidney cells stably expressing the human serotonin transporter. *J Pharmacol Exp Ther* *293*, 870-878.

Schroder, S., Hoch, W., Becker, C. M., Grenningloh, G., and Betz, H. (1991). Mapping of antigenic epitopes on the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor. *Biochemistry* *30*, 42-47.

Shimomura, A., Kohu, K., Akiyama, T., and Senda, T. (2005). Subcellular localization of the tumor suppressor protein APC in developing cultured neurons. *Neurosci Lett* *375*, 81-86.

Shizuya, H., Birren, B., Kim, U. J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y., and Simon, M. (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 8794-8797.

Singer, J. H., Talley, E. M., Bayliss, D. A., and Berger, A. J. (1998). Development of glycinergic synaptic transmission to rat brain stem motoneurons. *J Neurophysiol* *80*, 2608-2620.

Smith, K. E., Borden, L. A., Hartig, P. R., Branchek, T., and Weinshank, R. L. (1992). Cloning and expression of a glycine transporter reveal colocalization with NMDA receptors. *Neuron* *8*, 927-935.

Smith, K. J., Levy, D. B., Maupin, P., Pollard, T. D., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1994). Wild-type but not mutant APC associates with the microtubule cytoskeleton. *Cancer Res* *54*, 3672-3675.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* *98*, 503-517.

Stephan, M. M., Chen, M. A., Penado, K. M., and Rudnick, G. (1997). An extracellular loop region of the serotonin transporter may be involved in the translocation mechanism. *Biochemistry* *36*, 1322-1328.

Sung, U., Apparsundaram, S., Galli, A., Kahlig, K. M., Savchenko, V., Schroeter, S., Quick, M. W., and Blakely, R. D. (2003). A regulated interaction of syntaxin 1A with the antidepressant-sensitive norepinephrine transporter establishes catecholamine clearance capacity. *J Neurosci* *23*, 1697-1709.

- Tabor, S., and Richardson, C. C. (1987). DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 4767-4771.
- Takahashi, T., Momiyama, A., Hirai, K., Hishinuma, F., and Akagi, H. (1992). Functional correlation of fetal and adult forms of glycine receptors with developmental changes in inhibitory synaptic receptor channels. *Neuron* *9*, 1155-1161.
- Torres, R., Firestein, B. L., Dong, H., Staudinger, J., Olson, E. N., Huganir, R. L., Bredt, D. S., Gale, N. W., and Yancopoulos, G. D. (1998). PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands. *Neuron* *21*, 1453-1463.
- Utton, M. A., Connell, J., Asuni, A. A., van Slegtenhorst, M., Hutton, M., de Silva, R., Lees, A. J., Miller, C. C., and Anderton, B. H. (2002). The slow axonal transport of the microtubule-associated protein tau and the transport rates of different isoforms and mutants in cultured neurons. *J Neurosci* *22*, 6394-6400.
- Verdoorn, T. A., Kleckner, N. W., and Dingledine, R. (1987). Rat brain N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* *238*, 1114-1116.
- Wassef, A., Baker, J., and Kochan, L. D. (2003). GABA and schizophrenia: a review of basic science and clinical studies. *J Clin Psychopharmacol* *23*, 601-640.
- Yamashita, A., Singh, S. K., Kawate, T., Jin, Y., and Gouaux, E. (2005). Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature* *437*, 215-223.
- Yang, X. W., Model, P., and Heintz, N. (1997). Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nat Biotechnol* *15*, 859-865.
- Zafra, F., Aragon, C., Olivares, L., Danbolt, N. C., Gimenez, C., and Storm-Mathisen, J. (1995). Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J Neurosci* *15*, 3952-3969.
- Zeilhofer, H. U., Studler, B., Arabadzisz, D., Schweizer, C., Ahmadi, S., Layh, B., Bosl, M. R., and Fritschy, J. M. (2005). Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice. *J Comp Neurol* *482*, 123-141.
- Zimmer, R., and Verrinder Gibbins, A. M. (1997). Construction and characterization of a large-fragment chicken bacterial artificial chromosome library. *Genomics* *42*, 217-226.

7 ANHANG

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematische Darstellung einer glycinergen inhibitorischen Synapse.	3
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des GlyT2.	4
Abbildung 1-3: Genomische Struktur des Maus-GlyT2-Gens.	6
Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der GlyT2-Transportwege im Neuron.	7
Abbildung 1-5: Expressionsmuster der GlyTs.	8
Abbildung 1-6: Schematische Abbildung der glycinergen Neurotransmission.	10
Abbildung 2-1: Arbeitsschritte der Biotinylierung.	37
Abbildung 2-2: Ausplattierungsschema für das Aufnahme-Experiment.	40
Abbildung 2-3: Strategie der zweifachen Rekombination.	48
Abbildung 3-1: Klonierungsstrategie des mGlyT2 wt.	54
Abbildung 3-2: Western Blot-Analyse der C-terminalen PDZ-DBM-Mutanten.	56
Abbildung 3-3: Oberflächenbiotinylierung des EGFP-mGlyT2.	58
Abbildung 3-4: Lokalisation vom mGlyT2 wt, +A und Δ TQC in HEKT-Zellen.	59
Abbildung 3-5: Lokalisation von EGFP-mGlyT2 wt, +A und Δ TQC in HEKT-Zellen.	60
Abbildung 3-6: Lokalisation von EGFP-markierten mGlyT2 wt, +A und Δ TQC in transient transfizierten MDCK-Zellen.	61
Abbildung 3-7: [3 H]Glycinaufnahme von GlyT2-transfizierten HEKT-Zellen.	62
Abbildung 3-8: Untersuchung der myc316-markierten GlyT2-Konstrukte.	64
Abbildung 3-9: Lokalisations- und Funktionsanalyse des mGlyT2 wt myc316.	65
Abbildung 3-10: Analyse der myc738-markierten GlyT2-Konstrukte.	67
Abbildung 3-11: Immunfärbung der PDZ-DBM-Konstrukte in transfizierten HCN.	69
Abbildung 3-12: Kolokalisation der EGFP-mGlyT2-Konstrukte mit dem PSD95.	70
Abbildung 3-13: Klonierungsstrategie für die N-terminalen Deletionsmutanten.	73
Abbildung 3-14: Expressions- und Glykosylierungsanalyse der N-terminalen Deletionsmutanten.	74
Abbildung 3-15: Oberflächenbiotinylierung der N-terminalen Deletionsmutanten.	75
Abbildung 3-16: Immunfärbung von den N-terminalen Deletionsmutanten.	76
Abbildung 3-17: [3 H]Glycinaufnahme der N-terminalen Deletionsmutanten in HEKT-Zellen.	76
Abbildung 3-18: Analyse der K_M - und v_{max} -Werte der N-terminalen Deletionsmutanten.	77
Abbildung 3-19: [3 H]Glycinaufnahme der N-terminalen Konstrukte zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transfektion.	78
Abbildung 3-20: Western Blot-Analyse des mGlyT2-EGFP.	80
Abbildung 3-21: Lokalisation von EGFP-markierten mGlyT2 wt, Δ AA1-174 und Δ AA1-184 in transient transfizierten HEKT-Zellen.	80
Abbildung 3-22: [3 H]Glycinaufnahme-Experiment der EGFP-markierten N-terminalen Dele- tionsmutanten in HEKT-Zellen.	81
Abbildung 3-23: Schematische Darstellung der myc-Insertion in den mGlyT2.	82
Abbildung 3-24: Analyse der mGlyT2a myc13-Konstrukte in HEKT-Zellen.	83

Abbildung 3-25: Transfektion von N-terminalen Deletionsmutanten in HCN.	84
Abbildung 3-26: Immunfärbungen von Rückenmarkskulturen.	86
Abbildung 3-27: Generierung des Targetingvektors.	88
Abbildung 3-28: Klonierungsstrategie zur Herstellung der BAC-transgenen Mäuse.	89
Abbildung 3-29: Southern Blot-Analyse der Integrate und der modifizierten BACs.	93
Abbildung 3-30: Detaillierte Restriktionsanalyse der modifizierten BAC-Klone.	94
Abbildung 3-31: Genotypisierungs-PCRs für die transgenen Mauslinien.	95
Abbildung 3-32: Southern Blot-Analyse der Integrate und der modifizierten Cre/BACs.	98
Abbildung 3-33: Analyse der GlyR-UE in GlyT2-defizienten Mäusen.	100
Abbildung 4-1: Insertionen der myc-Epitope im mGlyT2.	106
Abbildung 4-2: Sequenzvergleich der EL2-Regionen vom GlyT2, GlyT1, NET und SERT.	108
Abbildung 4-3: Konsensussequenz des Sec24D-Bindungsmotivs.	108
Abbildung 4-4: Sequenzhomologie mit der APC-basischen Domäne.	112
Abbildung 4-5: Reduktion von Konkameren durch die Behandlung von Flp-Rekombinase.	114
Abbildung 4-6: Schema über die Inaktivierung von einem „gefloxeten“ Gen x durch die Kreuzung mit einer Cre-Maus.	116
Abbildung 4-7: Aktivierung eines Transgens durch die Cre-Rekombinase.	117
Abbildung 5-1: Die Rolle der N-terminalen Domäne und des PDZ-DBM in der Präsynapse..	119

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Verwendete Zelllinien und ihre Spenderorganismen.	13
Tabelle 2-2: Sinnstrangprimer für Klonierungen und Sequenzierungen.	15
Tabelle 2-3: Gegenstrangprimer für Klonierungen und Sequenzierungen.	16
Tabelle 2-4: Verwendete Genotypisierungsprimer für die GlyT2-Mauslinie.	17
Tabelle 2-5: Verwendete Primärantikörper und ihre Herstellerangaben.	17
Tabelle 2-6: Sekundärantikörper für Western Blots, Immunhisto- und zytochemie.	18
Tabelle 2-7: Pipetierschema für verschiedene Zelllinien.	34
Tabelle 2-8: Transfektionsschema mit HEBS-Puffer.	34
Tabelle 2-9: Pipettierschema für Polyfect-Transfektionen.	35
Tabelle 3-1: Übersicht über alle hergestellten C-terminalen Konstrukte.	55
Tabelle 3-2: Vergleich der K_M - und v_{max} -Werte zwischen den GlyT2-Konstrukten.	62
Tabelle 3-3: Zusammenfassung der Eigenschaften der C-terminalen Mutanten in HEKT und HCN.	70
Tabelle 3-4: Zusammenfassung der N-terminalen Deletionsmutanten.	85
Tabelle 3-5: Statistik zur Wahrscheinlichkeit der In- bzw. Deintegrationsereignisse in den N- terminal veränderten BAC-Klonen RPCI23 365E4.	91
Tabelle 3-6: Nachkommen aus der Pronukleusinjektion.	95
Tabelle 3-7: Statistik zur Zahl der In- bzw. Deintegrationsereignisse in den BAC-Klonen RPCI23 365E4.	97

7.3 Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäure (amino acid)
Ac	Acetat
ad	bis zu
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	bakterielles artifizielles Chromosom
bp	Basenpaar
bs	Hirnstamm (brainstem)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
bzw.	beziehungsweise
c	centi
C	Celsius
Ci	Curie
ca.	circa
Camp	Chloramphenicol
CAZ	presynaptische Dichte (cytomatrix of the presynaptic active zone)
cb	Cerebellum
cDNA	komplementäre DNA (complement DNA)
CIP	Kalbsdarmphosphatase (calf intestine phosphatase)
cpm	Zählereignisse pro Minute (counts per minute)
co	Kontrolle
COPII	Hüllprotein von Vesikeln im ER (coat proteins II)
CTP	Cytosintriphosphat
d	destilliert
Da	Dalton
DAT	Dopamintransporter
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
d. h.	das heisst
DIV	Tage in Kultur (days in vitro)
Dlg-A	Disc large Homolog-A
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonuclein acid)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsRed	rot fluoreszierendes Protein aus <i>Discosoma sp.</i>
DTT	Diethiothreitol
E	Embryonalstadium
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGFP	verbessertes grün fluoreszierendes Protein aus <i>Aequorea</i> -Arten (enhanced green fluorescent protein)
EL	extrazellulärer Loop
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere (<i>et altera</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Farad
fb	Vorderhirn (forebrain)
FCS	Fötale Kälberserum (fetal calf serum)
Flp	Flippase aus <i>S. cerevisiae</i>
FRT	Flp-Rekombinase Zielsequenz (flp recombinase target) aus <i>S. cerevisiae</i>
g	Gramm bzw. maximale Erdbeschleunigung (kursiv)
GABA	γ -Aminobuttersäure (γ -amino butyric acid)
Geph	Gephyrin
ggf.	gegebenenfalls
GLT1b	Glutamattransporter 1b
GlyR	Glycinrezeptor
GlyT	Glycintransporter
GTP	Guanosintriphosphat
HCN	Hippocampale Neuronen
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
hom	Homologiearm
HRP	Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase)
i. d. R.	in der Regel
IL	intrazellulärer Loop
IZ	intrazellulär
J	Joule
KCC2	K ⁺ /Cl ⁻ -Kotransporter 2
k	Kilo
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaar
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
ko	Mausnullmutante (knockout)
L	Liter
LB	<i>Lucia Bertani</i>
LeuT	Leucintransporter
li	Leber (liver)
loxP	Locus für Rekombination (locus of crossing over)

Lsg.	Lösung
m	Meter bzw. Milli
M	Molar
MAP2	Mikrotubuli assoziiertes Protein 2
Min.	Minute
mol	Mol
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
μ	Mikro
n	Nano oder Anzahl
n. a.	nicht analysiert
NET	Norepinephrintransporter
NGS	normales Ziegen Serum (normal goat serum)
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor
NTP	Nukleosidtriphosphat
Ω	Ohm
ob	Bulbus olfactorius
OD	optische Dichte
ORI	Replikationsursprung (origin of replication)
p	Pico
p. a.	zur Analyse (pro analysi)
pA	Polyadenylierungssignal
PBS	phosphatgepufferte Saline (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDZ	PSD95-Dlg-A-ZO1-ähnliche Domäne
PDZ-DBM	PDZ-Domänenbindungsmotiv
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentium Hydrogenii</i>
PICK1	Protein Kinase C-interagierendes Protein 1
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(ethansulfonsäure)
PKC	Protein Kinase C
PM	Plasmamembran
PMA	Phorbolmyristatacetat
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RecA	Rekombinase A
RNase A	Ribonuklease A
PNK	Polynukleotidkinase
PSD	Protein der postsynaptischen Dichte (postsynaptic density protein)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotation per minute)

RT	Raumtemperatur
sc	Rückenmark (spinal cord)
SDS	Natriumduodecylsulfat (sodium duodecyl sulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese
Sek.	Sekunde
SERT	Serotonintransporter
<i>SLC6</i>	Familie der Na ⁺ /Cl ⁻ -abhängigen Neurotransmitter Transporter
SNARE	lösliche N-Ethylmaleimidesensitive Fusionsprotein-Anheftungsprotein-Rezeptoren (soluble N-ethylmaleimide-sensitive component attachment protein receptor)
sog.	sogenannt
Std.	Stunde
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N' Tetramethylethylenediamine
Tet	Tetracylin
TMD	Transmembrandomäne
TTP	Thymidintriphosphat
U	Units
u. a.	unter anderem
UE	Untereinheit
UV	ultraviolettes Licht
ü. N.	über Nacht
V	Volt
vgl.	vergleiche
VIAAT	vesikulärer inhibitorischer Aminosäure Transporter (vesicular inhibitory amino acid transporter)
V_{\max}	maximale Geschwindigkeit
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumeneinheit (weight per volume)
w/w	Gewicht pro Gewicht (weight per weight)
X	Exon
z. B.	zum Beispiel
ZO1	Zonula Occludens Protein 1
ZNS	Zentrales Nervensystem
z. T.	zum Teil

7.4 Lebenslauf

<i>Nachname</i>	Armsen
<i>Vorname</i>	Wencke
<i>Geburtsdatum</i>	05. September 1977
<i>Geburtsort</i>	Buxtehude
<i>Familienstand</i>	ledig
<i>Staatsangehörigkeit</i>	deutsch

Ausbildung

<i>seit 2002</i>	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Prof. Dr. Betz, Frankfurt/M. Glycin Transporter im Säuger-ZNS: eine molekularbiologische und zelluläre Analyse.
<i>seit 2002</i>	Stipendium von der Max-Planck-International Research School für Membranproteine.
<i>2001-2002</i>	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Prof. Dr. Gruss, Göttingen. Identifizierung und Charakterisierung von Genen, die eine Rolle in der Entwicklung des zerebralen Kortex spielen.
<i>1999-2000</i>	EAP Stipendium an der Universität von Kalifornien San Diego (UCSD), USA.
<i>1996-2002</i>	Diplomstudium der Biologie an der Georg-August Universität Göttingen
<i>1989-1996</i>	Halepaghen-Gymnasium in Buxtehude
<i>1987-1989</i>	Orientierungsstufe Nord in Buxtehude
<i>1983-1987</i>	Grundschule in Buxtehude

Praktika

<i>2002</i> 6 Wochen	European Molecular Biology Laboratories (EMBL) für Mausbiologie, Ph.D. Pasparakis, Monterotondo, Italien. NF- κ B Signaltransduktionsweg.
<i>2000</i> 5 Monate	Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Prof. Dr. Gruss, Göttingen. Whole mount in situ-screen einer Maus-E12,5 Telencephalon Bibliothek.
<i>2000</i> 6 Monate	Salk Institute, Prof. Hope, La Jolla, USA. Regulation des Im- und Exports von NF- κ B durch Ikk1, Ikk2 und NEMO.
<i>1998</i> 4 Wochen	Krankenhaus Buxtehude, Prof. Dr. Breitbart, Buxtehude UV-Induzierter Hautkrebs.
<i>1997</i> 6 Wochen	Universitätsklinik Eppendorf, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Richter, Hamburg G-Protein-gekoppelte Rezeptoren des endogenen Opiat-Systems.

7.5 Publikationsliste

Gomez, J., Ohno, K., Hulsmann, S., Armsen, W., Eulenburg, V., Richter, D.W., Laube, B. and Betz, H. (2003). Deletion of the Mouse Glycine Transporter 2 Results in a Hyperekplexia Phenotype and Postnatal Lethality. *Neuron* *40*, 797-806.

Eulenburg, V., Armsen, W., Betz, H., Gomez, J. (2005). Glycine Transporters: Essential regulators of neurotransmission. *Trends Biochem Sci* *30*, 325-333.

Betz, H., Gomez, J., Armsen, W., Scholze, P., Eulenburg, V. (2006). Glycine transporters: essential regulators of synaptic transmission. *Biochem Soc Trans* *35*, 55-58.

Gomez, J., Armsen, W., Betz, H., Eulenburg, V. (2006). Lessons from Knocked-out Glycine Transporters, *Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer Verlag *175*, 457-483.

7.6 Posterpräsentationen

2005 Society for Neuroscience, 35th Annual Meeting in Washington, USA. The termini are not the end. W. Armsen, C. Shimizu-Okabe, H. Betz, V. Eulenburg.

2004 Society for Neuroscience, 36th Annual Meeting in San Diego, USA. Glycine, GABA and GlyR in GlyT2 Deficient Mice. W. Armsen, J. Gomez, T. Krämer, V. Eulenburg, H. Betz.

2004 Benzon Symposium on Neurotransmitter Transporters, Copenhagen Denmark
Histological and Immunological Analysis of GlyT2 Deficient Mice. W. Armsen, J. Gomez, T. Krämer, K. Ohno, V. Eulenburg, H. Betz.

7.7 Präsentationen

2005 Haussymposium des Max-Planck-Instituts für Hirnforschung, Frankfurt/M. The termini are not the end: Analysis of the C- and N-terminal domain.

2005 Harvard Medical School, Boston, USA. Focussing in on Glycine Transporter 2.

2004 Evaluierung der IMReS, Frankfurt/M. Characterization of glycine transporter 2: The role of the N- and C-termini in Targeting, Trafficking and Transport.

2003 Doktorandenworkshop für Neurobiologie, Göttingen. Functional roles of the N- and C-terminal domains of the neuronal glycine transporter 2.

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Doktorarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Frankfurt am Main, den _____

Wencke Armsen