

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologe Jan Christoph Peter
aus Heidelberg

Tag der mündlichen Prüfung:.....

**Modulation der Aktivität
des nikotinischen Acetylcholinrezeptors
in transgenen Tiermodellen**

Gutachter: Prof. Dr. G. Elisabeth Pollerberg
PD Dr. Veit Witzemann

**Für meinen Großvater,
Ludwig Merz**

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn PD Dr. Veit Witzemann für die Überlassung des herausfordernden Themas, für seine konstruktive Diskussionsbereitschaft und für sein immer offenes Ohr für nicht nur wissenschaftliche Probleme.

Herrn Professor Bert Sakmann danke ich für sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Bei Frau Professor Elisabeth Pollerberg möchte ich mich für das Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Michael Koenen für manche fruchtbare Diskussion und für die Überlassung des γ -Targetingvektors.

Besonderer Dank gilt Karina Barenhoff, die mir viel Arbeit bei der Präparation und Analyse der genomischen Maus-DNA und der mRNA abgenommen hat.

Genauso danke ich Ursel Warncke für ihre hervorragende Arbeit in der Zellkultur.

Desweiteren danke ich Michaela Bauer, Jongi Chun, Sven Gensler, Dagmar Gross, Boris Hesser, Tae Eun Jin, Ulrike Mersdorf, Mahmud Monem, Sandra Nickel, Patrick Opherk, Anna Pekala, Jan Rathenberg, Andreas Sander, Wolfram Schleich, Holger Schwarz, Tatjana Schweizer, Verena Wimmer, Peter Yampolsky und Jörg Zehelein für die Zusammenarbeit, Unterstützung, Diskussionen, das sehr angenehme Arbeitsklima und die angenehme Zeit. Besonderer Dank gilt Oliver Henschel, der mir sehr bei der Fertigstellung dieser Arbeit geholfen hat.

Dr. Alon Korngreen danke ich für die zuverlässige Durchführung der Einzelkanalmessungen an Oocyten.

Alfredo Villarroel danke ich für die Durchführung der Einzelkanalmessungen an Mausmuskeln.

Frank Zimmermann danke ich für die erfolgreiche Injektion der ES-Zellen in die Maus-Blastocysten.

Heinz Horstmann danke ich für die Einführung in die Elektronenmikroskopie.

Außerdem danke ich allen Kollegen der Abteilung Zellphysiologie für das freundliche Arbeitsumfeld. Desweiteren danke ich sämtlichen helfenden Händen des MPI für medizinische Forschung, die unsere Arbeit ermöglichen und erleichtern.

Sylvia gilt besonderer Dank, dafür dass sie an mich glaubt und mich immer wieder aufbaut, „wenn’s mal nicht so läuft“. Außerdem danke ich ihr für die Arbeit, die sie in die Anfertigung dieser Arbeit investiert hat.

Für ihre fortwährende Unterstützung und ihr Vertrauen in mich möchte ich mich besonders bei meinen Eltern und meinen Geschwistern bedanken.

I. Zusammenfassung und Abstract

I.1. Zusammenfassung

Mutationen in den Untereinheiten des nikotinischen Acetylcholinrezeptors (AChR) der neuromuskulären Synapse (NMJ) können zu Veränderungen der Rezeptoreigenschaften, wie der Ligandenbindung und/oder der Kanalöffnung führen. Die daraus resultierenden Veränderungen des Endplattenpotentials können zu congenitalen myasthenischen Syndromen (CMS) führen, die als Slow-Channel bzw. Fast-Channel Congenital Myasthenic Syndrome (SCCMS bzw. FCCMS) bezeichnet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei transgene Knock-In-Mauslinien etabliert. An der ersten Mauslinie (γ/ϵ FC) wurde der Einfluss untersucht, den die Aktivität des AChR auf die Etablierung der NMJ während der Embryonalentwicklung hat. In diesen Tieren trägt eine nur embryonal exprimierte Untereinheit des AChR eine Punktmutation, die den Austausch einer Aminosäure (P121L) bewirkt. Diese Mutation wurde in myasthenischen Patienten gefunden in denen sie das FCCMS auslöst. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten, dass die Aktivität des AChR durch Einbau dieser mutierten Untereinheit drastisch reduziert wurde. Homozygote γ/ϵ FC-Tiere sterben bei der Geburt, die Etablierung und Lokalisierung der NMJ in der Muskelfaser sind gestört und das gerichtete Wachstum der Motorneurone ist nicht vorhanden. Diese Feststellungen belegen, dass die Aktivität des AChR für die korrekte Etablierung der postsynaptischen Seite der NMJ und das gerichtete Wachstum der Motoraxone verantwortlich ist.

In einer zweiten Knock-In-Mauslinie (ϵ SC) wurde eine Punktmutation in die postnatal exprimierte ϵ -Untereinheit eingeführt, die ebenfalls den Austausch einer Aminosäure (L269F) bewirkt und im Menschen zum SCCMS führt. Homozygote ϵ SC-Mäuse zeigen ab der zweiten Lebenswoche progressive myasthenische Symptome, wie reduzierte Kraft, reduziertes Körpergewicht und Veränderungen der Körperhaltung und Lautgebung. In diesen Tieren konnten massive degenerative Veränderungen der postsynaptischen Seite der NMJ und Muskelfaser festgestellt werden. Dazu gehören das Verschwinden postsynaptischer Einfaltungen, die Vergrößerung der Mitochondrien, subsynaptische Ansammlungen von Vesikeln und Vakuolen und Anzeichen degenerativer Prozesse der subsynaptischen Nuklei. Diese Veränderungen werden zusammengenommen als Endplattenmyopathie bezeichnet und konnten auch in Gewebe von SCCMS-Patienten festgestellt werden. Vermutlich werden sie durch massiv erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen in der Muskelfaser ausgelöst. Neben der Endplattenmyopathie zeigten homozygote ϵ SC-Mäusen, wie SCCMS-Patienten, eine Reduktion der AChR in der NMJ.

Das SCCMS ist im Menschen eine dominant vererbte Krankheit, konnte dagegen aber nur in homozygoten ϵ SC-Mäusen festgestellt werden. Die Gründe für die Unterschiede in der Vererbung konnten durch Kreuzungsexperimente geklärt werden. Dabei wurden ϵ SC-Tiere mit Tieren einer anderen transgenen Mauslinie (ϵ Tet-Linie) gekreuzt, die nur eine reduzierte Expression der ϵ -Untereinheit besitzt. Die Nachkommen aus diesen Kreuzungen zeigten myasthenische Symptome. Daraus folgt, dass die Unterschiede in der Vererbung mit der Expression des ϵ SC-Allels zusammenhängt, das in heterozygoten ϵ SC-Tieren schwächer exprimiert wird als das WT-Allel.

Die Tiere der ϵ SC-Linie können als Modellorganismus für SCCMS dienen. Mit ihrer Hilfe wird es möglich sein, *in vivo* neue Erkenntnisse über die physiologischen und genetischen Vorgänge, die bei der Entstehung von SCCMS eine Rolle spielen, zu sammeln. Möglicherweise ist auch eine Übertragung der Erkenntnisse auf neurodegenerative Krankheiten wie Epilepsie oder Schlaganfall möglich. Außerdem können sie durch genetische und morphologische Vergleiche mit anderen Mauslinien, in denen die Kanaleigenschaften des AChR verändert wurden, Aufschlüsse darüber geben, welchen Einfluss die Rezeptoraktivität auf die strukturelle und funktionelle Aufrechterhaltung der NMJ hat.

I.2. Abstract

Mutations in the subunits of the nicotinic acetylcholine receptor (AChR) of the neuromuscular junction (NMJ) can lead to changes of receptor properties, like effects on ligand binding and/or channel opening. The resulting changes of the endplate potentials can lead to congenital myasthenic syndromes (CMS), referred to as Slow-Channel or Fast-Channel Congenital Myasthenic Syndrome (SCCMS or FCCMS) respectively.

In this work two lines of transgenic knock-in mice were established. In the first mouse line (γ/ϵ FC) the influence of the activity of the AChR on the establishment of the NMJ was examined. In these animals the γ -subunit, that is expressed during embryogenesis, carries a point mutation, which provokes an amino acid exchange (P121L) and leads to FCCMS in myasthenic-patients. Electrophysiological examinations showed that the activity of the AChR was dramatically reduced by incorporation of this mutated subunit. Homozygous γ/ϵ FC-animals die during birth, the establishment and localisation of the NMJ are disturbed and the directed outgrowth of the motor-axon is absent. These results show that the activity of the AChR is needed for the correct establishment of the postsynaptic part of the NMJ and the directed outgrowth of the motor-axon.

Another point mutation leading to an amino acid exchange (L269F) and provoking SCCMS in humans was introduced in the postnatally expressed ϵ -subunit of a second line of knock-in mice (ϵ SC). At two weeks of age homozygous ϵ SC-mice show progressive myasthenic syndromes, like reduced strength, reduced body-weight and changes in posture and vocalisation. Massive degenerative changes were observed in the postsynaptic part of the NMJ and muscle-fibers of these animals. Among these is the loss of postsynaptic folds, the enlargement of mitochondria, subsynaptic accumulation of vesicles and vacuoles and signs of degeneration of subsynaptic nuclei. All together these changes are referred to as endplate-myopathy and are also observed in tissue from SCCMS-patients. Besides the endplate-myopathy, both homozygous ϵ SC-mice and SCCMS-patients showed a reduction of AChR in the NMJ.

In humans SCCMS is a dominantly inherited disease but could only be observed in homozygous ϵ SC-mice. The reasons for this difference were clarified by breeding-experiments. ϵ SC-animals were interbred with another transgenic mouse line (ϵ Tet), which shows a reduced expression of the ϵ -subunit. The offspring showed myasthenic symptoms. This shows that the differences of the inheritance are due to the expression of the ϵ SC-allele, which has a reduced expression in heterozygous ϵ SC-animals compared to the WT-allele.

Animals of the ϵ SC-line can serve as a model organism for SCCMS. With their help it will be possible to gain new *in vivo* insights about physiological and genetic processes which play a role in the establishment of SCCMS. A transfer of these findings to neurodegenerative diseases like stroke or epilepsy may be possible. In addition genetic and morphological comparisons to other mouse-lines, in which the channel properties of the AChR have been changed, can give useful information about the influence of channel activity on structural and functional maintenance of the NMJ.

II. Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung und Abstract	5
I.1.	Zusammenfassung	5
I.2.	Abstract	6
II.	Inhaltsverzeichnis	7
III.	Abkürzungen	11
IV.	Einleitung	13
IV.1.	Die Entwicklung des Muskels	13
IV.2.	Die neuromuskuläre Synapse	14
IV.3.	Die neuromuskuläre Signalübertragung	15
IV.3.1.	Das Endplattenpotential und das Aktionspotential	15
IV.3.2.	Die Muskelkontraktion	15
IV.3.3.	Das Miniaturendplattenpotential	15
IV.4.	Struktur des nikotinischen Acetylcholinrezeptors	16
IV.5.	Die Etablierung und Differenzierung der NMJ während der Entwicklung	17
IV.5.1.	Der γ/ε -Untereinheiten Austausch	18
IV.5.2.	Das Prepatterning der NMJ	19
IV.5.3.	Die Agrin-MuSK-Signalkaskade	19
IV.5.4.	Die Regulation der Transkription der AChR-Untereinheiten	21
IV.5.5.	Die Bildung postsynaptischer Membraneinfaltungen	22
IV.5.6.	Die Differenzierung des Motoraxons	23
IV.6.	Myasthenische Syndrome	23
IV.6.1.	Das Slow-Channel Congenital Myasthenic Syndrome (SCCMS)	24
IV.6.2.	Das Fast-Channel Congenital Myasthenic Syndrome (FCCMS)	25
IV.7.	Transgene Mauslinien	26
IV.7.1.	Ein transgenes Mausmodell für das L269F SCCMS	27
IV.7.2.	Knock-Out-Mauslinien einiger Proteine der NMJ	27
IV.7.3.	Knock-In-Mausmodelle der γ - und ε -Untereinheiten	28
IV.8.	Zielsetzung	29
V.	Ergebnisse	32
V.1.	Generierung einer Mauslinie, die einen fötalen AChR mit stark reduzierter Aktivität exprimieren	32
V.1.1.	Einführung der P121L-Mutation in die cDNA der γ - und ε -Untereinheit der Maus	33
V.1.2.	Elektrophysiologische Analysen der AChR-Untereinheiten	34
V.1.2.1.	Bestimmung der halbmaximalen Bindungskonstanten (IC_{50}) mit Hilfe der Zwei-Elektroden Spannungsklemme	34
V.1.2.2.	Einzelkanalmessungen der AChR γ P121L und AChR ε P121L	37
V.1.3.	Kontrolle des Einbaus von AChR-Komplexen in die Zellmembran	38
V.1.4.	Generierung der γ/ε FC-Mauslinie	39
V.1.4.1.	Klonierungsstrategie und Konstruktion des Targetingvektors γ/ε P121L-GFP-p1002	40
V.1.4.2.	Transfektion von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus mit dem Targetingvektor γ/ε P121L-GFP-p1002	41
V.1.4.3.	Analyse der homologen Rekombination durch PCR	41
V.1.4.4.	Southern-Blot Analyse der ES-Zell-Klone mit der putativ richtigen homologen Rekombination	43
V.1.4.5.	Sequenzierung des homolog rekombinierten genomischen DNA-Abschnitts	43
V.1.4.6.	Zucht der γ/ε FC-Mauslinie	43
V.1.5.	Phänotypische Veränderungen von Tieren der γ/ε FC-Linie	45

Inhaltsverzeichnis

V.1.5.1.	Phänotypische Veränderungen heterozygoter γ/ϵ FC-Tiere	45
V.1.5.2.	Phänotypische Veränderungen homozygoter γ/ϵ FC-Tiere	45
V.1.6.	Morphologische Untersuchungen der γ/ϵ FC-Tiere	45
V.1.6.1.	Nachweis der Expression der γ/ϵ P121LGF-Untereinheit	45
V.1.6.2.	Das Clustering der AChR in homozygoten γ/ϵ FC-Tieren	46
V.1.6.3.	Nervenwachstum im Diaphragma homozygoter γ/ϵ FC-Tiere	47
V.1.6.4.	Lokalisierung der AChR im Diaphragma	49
V.1.7.	Transkriptionsanalysen	50
V.1.7.1.	Transkription der mRNA der γ - und γ/ϵ -Untereinheit in Muskeln von WT- und homozygoten γ/ϵ FC-Tieren	50
V.1.7.2.	Semiquantitative Analyse verschiedener mRNA-Mengen in Muskeln von homozygoten γ/ϵ FC-Tieren	51
V.1.7.3.	Untersuchung der ϵ -mRNA-Menge in Muskeln homozygoter γ/ϵ FC-Tiere	52
V.2.	Generierung einer Mauslinie als Modell für eine Form des Slow-Channel Congenital Myasthenic Syndrome (SCCMS)	53
V.2.1.	Einführung der L269F-Mutation in die ϵ -Untereinheit der Maus	53
V.2.2.	Einzelkanalmessungen von AChR ϵ L269F	53
V.2.3.	Generierung der ϵ SC-Mauslinie	55
V.2.3.1.	Strategie und Klonierung des ϵ L269F-p ϵ GTHS1 Targetingvektors	55
V.2.3.2.	Transfektion von ES-Zellen mit dem ϵ L269F-p ϵ GTHS1 Targetingvektor	56
V.2.3.3.	PCR-Analyse der genomischen Maus-DNA auf korrekte homologe Rekombination	57
V.2.3.4.	Southern-Blot Analyse der PCR-positiv getesteten ES-Zell-Klone	58
V.2.3.5.	Sequenzierung des homolog rekombinierten genomischen DNA-Abschnitts	59
V.2.3.6.	Zucht der ϵ SC-Mäuse	59
V.2.4.	Einzelkanalmessungen an Mausmuskeln von homozygoten ϵ SC-Tieren	61
V.2.5.	Phänotypische Untersuchungen von Tieren der ϵ SC-Linie	61
V.2.5.1.	Phänotypische Merkmale heterozygoter ϵ SC-Tiere	61
V.2.5.2.	Phänotypische Merkmale homozygoter ϵ SC-Tiere	62
V.2.5.3.	Körperliche Veränderungen homozygoter ϵ SC-Tiere	62
V.2.5.3.1.	Körpergewichtsmessung der Mäuse während der postnatalen Entwicklung	63
V.2.5.3.2.	Kraftmessung der Vorderextremitäten im Verlauf der postnatalen Entwicklung	64
V.2.5.3.3.	Messung der Geschicklichkeit und Kraft mit Hilfe des Dowel-Perch Tests	65
V.2.6.	Morphologische Untersuchung der ϵ SC-Tiere	66
V.2.6.1.	Untersuchung der Dichte der NMJ durch Nachweis der Acetylcholinesterase	66
V.2.6.2.	Analyse der AChR-Dichte in WT-, heterozygoten und homozygoten ϵ SC-Tieren	68
V.2.6.3.	Untersuchung der AChR-Dichte und Verteilung in der NMJ	69
V.2.6.4.	Vergleich der AChR-Dichte von Tieren verschiedenen Alters	70
V.2.6.5.	Untersuchung der Innervierung der NMJ	75
V.2.6.6.	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	77
V.2.7.	Transkriptionsanalysen	80
V.2.7.1.	Semiquantitative Analyse der Expression verschiedener mRNAs in Muskeln von adulten ϵ SC-Mäusen	80
V.2.7.2.	Untersuchung der γ -mRNA Mengen im adulten Muskel	82
V.2.8.	Verpaarung von ϵ SC-Tieren mit ϵ Tet-Tieren	82
V.2.8.1.	Zucht der ϵ SC/ ϵ Tet-Tiere	83
V.2.8.2.	Phänotypische Veränderungen der ϵ SC/ ϵ Tet-Tiere	84
V.2.8.2.1.	Untersuchung des Körpergewichts von ϵ SC/ ϵ Tet-Tieren	84

Inhaltsverzeichnis

V.2.8.2.2.	Untersuchungen der Griffstärke von ϵ SC/ ϵ Tet-Tieren	85
V.2.8.3.	Morphologische Untersuchung der NMJ von ϵ SC/ ϵ Tet-Tieren	86
VI.	Diskussion.....	87
VI.1.	Die transgene Knock-In γ / ϵ FC-Mauslinie	87
VI.1.1.	Die P121L-Mutation führt zu unterschiedlich ausgeprägten Veränderungen in dem fötalen und adulten AChR.....	87
VI.1.2.	Generierung der γ / ϵ FC-Mauslinie.....	89
VI.1.3.	Homozygote γ / ϵ FC-Tiere sterben bei der Geburt.....	89
VI.1.4.	Die Rolle der synaptischen Aktivität bei der Entwicklung der NMJ während der Embryonalphase.....	90
VI.1.5.	Die Menge von Rapsyn- und MuSK-mRNA ist in Muskeln von γ / ϵ FC-Tieren reduziert	91
VI.1.6.	Zukünftige Projekte mit der γ / ϵ FC-Linie.....	92
VI.2.	Die transgene Knock-In ϵ SC-Mauslinie	92
VI.2.1.	Die Generierung der ϵ SC-Mauslinie.....	93
VI.2.2.	Homozygote ϵ SC-Tiere entwickeln myasthenische Symptome	93
VI.2.3.	Die L269F-Mutation in der ϵ -Untereinheit führt in homozygoten ϵ SC-Tieren, wie in SCCMS-Patienten, zu morphologischen Veränderungen auf der muskulären Seite der NMJ	94
VI.2.4.	Die L269F-Mutation führt zur Reduktion der Fläche der Kontaktstellen zwischen Nerv und Muskel, aber nicht zu einer Veränderung der Innervierung	97
VI.2.5.	Die Anzahl der NMJ und ihre Position im Muskel ist in homozygoten ϵ SC-Tieren nicht verändert	98
VI.2.6.	Der Verlauf des SCCMS ist in homozygoten ϵ SC-Tieren, wie im Menschen, progressiv	98
VI.2.7.	Die Reduktion der MuSK- und Rapsyn-mRNAs in Muskeln adulter homozygoter ϵ SC-Tiere könnte zu der Veränderung des AChR-Clusterings führen	100
VI.2.8.	Die ϵ -mRNA in ϵ SC-Tieren: im Gegensatz zum Menschen zeigen heterozygote ϵ SC-Tiere weder phänotypisch noch morphologisch myasthenische Symptome.....	101
VI.2.9.	ϵ SC/ ϵ Tet-Tiere zeigen myasthenische Symptome und Veränderungen auf der postsynaptischen Seite der NMJ	102
VI.2.10.	Die ϵ SC-Mauslinie im Vergleich mit einer transgenen Mauslinie	103
VI.2.11.	Die Ausprägung myasthenischer Symptome nimmt mit der Steigerung der Aktivität des adulten AChR zu	104
VI.2.12.	Zukünftige Projekte mit der ϵ SC-Mauslinie	105
VI.3.	Die Aufklärung der Ursachen und Mechanismen von Erbkrankheiten wie den congenitalen myasthenischen Syndromen	106
VII.	Methoden	108
VII.1.	Molekularbiologische Methoden	108
VII.1.1.	Molekularbiologische Standardmethoden.....	108
VII.1.2.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	108
VII.1.3.	Isolierung von DNA aus Agarosegelen und Aufreinigung von PCR Produkten	108
VII.1.4.	Ligation von PCR-Fragmenten in TOPO-Vektoren	108
VII.1.5.	Isolierung von genomischer embryonaler Stammzell-(ES-Zell) DNA und genomischer DNA aus Schwanz-Biopsien von Mäusen.....	109
VII.1.6.	Isolierung von genomischer Maus-DNA aus Gewebe.....	109
VII.1.7.	DNA-Sequenzierung.....	109

Inhaltsverzeichnis

VII.1.8.	Erzeugung gerichteter Mutationen.....	110
VII.1.9.	In vitro cRNA-Synthese.....	110
VII.1.10.	PCR-Analyse genomischer Maus-DNA	110
VII.1.11.	Southern-Blot.....	111
VII.1.12.	Hybridisierung des Southern-Blots mit radioaktiv markierten DNA-Sonden... ..	112
VII.1.13.	Hybridisierung des Southern-Blots mit fluoresceinmarkierten DNA-Sonden ..	113
VII.1.14.	RNA-Isolierung aus Gewebe	114
VII.1.15.	Reverse Transkription (RT) PCR.....	114
VII.1.15.1.	Reverse Transkription	114
VII.1.15.2.	Quantitative PCR	115
VII.2.	Zellbiologische Methoden	117
VII.2.1.	Injektion von cRNA in <i>X.laevis</i> Oocyten.....	117
VII.2.2.	Immunhistochemische Färbung von Mausdiaphragmen	118
VII.2.3.	Nachweis von Acetylcholinesterase (AChE) in Muskeln nach Koelle (Koelle and Friedenwald, 1949).....	119
VII.2.4.	¹²⁵ I- α -Bungarotoxin-Bindungsstudien.....	119
VII.2.4.1	¹²⁵ I- α -Bungarotoxin-Bindungsstudien an <i>X.laevis</i> Oocyten.....	119
VII.2.4.2	¹²⁵ I- α -Bungarotoxin-Bindungsstudie an Maus-Diaphragmen	120
VII.2.4.2.1.	Bindung von ¹²⁵ I- α -Bungarotoxin an die AChR der Diaphragmen.....	120
VII.2.4.2.2.	Quantifizierung der AChR-Dichte.....	120
VII.2.5.	Arbeiten mit embryonalen Stammzellen (ES-Zellen).....	121
VII.2.5.1.	Herstellung von Feederzellen.....	121
VII.2.5.2.	Transfektion von ES-Zellen	122
VII.3.	Elektrophysiologische Methoden.....	123
VII.3.1.	Zwei-Elektroden Spannungsklemme	123
VII.3.2.	Einzelkanalmessungen an <i>X.laevis</i> Oocyten.....	123
VII.3.3.	Einzelkanalmessungen an Mausmuskeln.....	124
VII.4.	Arbeiten mit Mäusen.....	125
VII.4.1.	Kraftmessung der Vorderextremitäten von Mäusen <i>in vivo</i>	125
VII.4.2.	Präparation von Gewebe aus der Maus.....	126
VII.5.	Mikroskopische Methoden.....	127
VII.5.1.	Konfokale Mikroskopie	127
VII.5.2.	Elektronenmikroskopie	127
VII.5.2.1.	Fixieren und Einbetten des Gewebes.....	127
VII.5.2.2.	Schneiden und Kontrastieren des eingebetteten Gewebes.....	128
VIII.	Material	129
VIII.1.	Chemikalien	129
VIII.2.	Enzyme.....	129
VIII.2.1.	Restriktionsenzyme.....	129
VIII.2.2.	Polymerasen	129
VIII.3.	Primer, Oligonukleotide und synthetisierte Sonden	129
VIII.4.	Kit-Systeme.....	130
VIII.5.	Größenmarker	131
VIII.6.	Radioaktive Isotope.....	131
VIII.7.	Puffer, Lösungen und Medien.....	131
VIII.8.	Antikörper und Toxine.....	132
VIII.9.	Geräte	132
VIII.10.	Software	132
VIII.11.	Sonstiges	133
IX.	Referenzen	134

III. Abkürzungen

A		GFP	Grün fluoreszierendes Protein (green fluorescence protein)
abs.	absolut	H	
ACh	Acetylcholin	h	Stunde
AChBP	Acetylcholin bindendes Protein	HRP	Horseradish-Peroxidase
AChE	Acetylcholinesterase	I	
AChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor	I	Iod
AChR ϵ	adulte Acetylcholinrezeptor	K	
AChR γ	fötaler Acetylcholinrezeptor	kb	Kilobasenpaare
AP	Aktionspotential	KD	halbmaximale Bindungskonstante
B		L	
Bgtx.	Bungarotoxin	l	Liter
bp	Basenpaar	M	
BSA	Bovines Serum Albumin	M	Transmembrandomäne
C		M	molar
C57 Bl/6	Mausstamm C57 Black/6	MCK	Muskelkreatinkinase
Ca	Calcium	MEPC	Miniaturendplattenstrom
ChAT	Cholin-Acetyltransferase	Mg	Magnesium
Ci	Curie	mg	Milligramm
Cl	Chlorid	min	Minute
CMAP	muskuläres Aktionspotential (compound muscular action potential)	ml	Milliliter
CMS	congenitales myasthenisches Syndrom	mM	Millimol
cpm	Counts per minute	Mol	Mol
D		ms	Millisekunde
d	Tag	MuSK	muskelspezifische Kinase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	mV	Millivolt
dNTP	desoxy-Nukelotidtriphosphate	N	
DTT	Dithiotreitol	N	Newton
E		Na	Natrium
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	Neo	Neomycinphosphotransferase, Neomycinresistenz
EDTA	Ethylendiamin-tetra-Essigsäure	nl	Nanoliter
EM	Elektronenmikroskop	NMJ	neuromuskuläre Synapse (neuromuscular junction)
EPP	Endplattenpotential	P	
ES- Zellen	embryonale Stammzellen	P	postnataler Tag Phosphor
EtBr	Ethidiumbromid	PBS	phosphate buffered saline
F		PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
FCCMS	Fast-Channel-Congenitales myasthenisches Syndrom	PGK	3-Phosphoglycerat Kinase
FCS	fötales Kälberserum	R	
G		Rh-Bgtx.	mit Rhodamin gekoppeltes Bungarotoxin
g	Gramm	RT	Raumtemperatur
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase	RT- Reaktion	reverse Transkription Reaktion

Abkürzungen

S		ϵ -Unter-	Acetylcholinrezeptor
s	Sekunde	einheit	ϵ -Untereinheit
SCCMS	Slow-Channel congenitales Syndrom	γ -Unter-	Acetylcholinrezeptor
T		einheit	γ -Untereinheit
Tris	N-Tris-	μ g	Mikrogramm
	hydroxymethylaminomethan	μ l	Mikroliter
U		γ/ϵ FC-	transgene Mauslinie in der die γ -
U	Unit	Linie	Untereinheit durch die ϵ -
ÜN	über Nacht		Untereinheit mit der P121L-
W			Mutation ersetzt wurde
WT	Wildtyp	ϵ SC-	transgene Mauslinie in deren in
X		Linie	ϵ -Untereinheit die L269F-
<i>X.laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>		Mutation eingeführt wurde

IV. Einleitung

Synapsen stellen die Kontaktstellen zwischen Neuronen und Zielzellen dar. Sie dienen der Reizweiterleitung zwischen dem Neuron und der entsprechenden Zielzelle. Zielzellen können entweder andere Neuronen oder wie im Fall der Motoneuronen Skelettmuskelfasern sein. Die Synapse zwischen Motoneuron und Muskelfaser, die als neuromuskuläre Synapse (neuromuscular junction, NMJ) bezeichnet wird, ist das am besten untersuchte Beispiel einer chemischen Synapse bei Wirbeltieren. Sie ist durch ihre periphere Lage leicht zugänglich und mit etwa 50 µm Durchmesser etwa 100 mal größer als neuronale Synapsen. Ein weiterer Grund, der die NMJ zu einem idealen Modellsystem für neuronale Verschaltungen macht, ist dass in adulten Wirbeltieren jede Muskelfaser nur von einem motorischen Axon innerviert wird und dadurch, im Gegensatz zu den Nervenzellen des zentralen Nervensystems, sehr einfach vernetzt ist.

IV.1. Die Entwicklung des Muskels

Die Skelettmuskulatur entwickelt sich aus den Somiten, embryonalen Zellen des Mesoderms, die am embryonalen Neuralrohr lokalisiert sind. Sie werden zu Myoblasten determiniert, den Vorläuferzellen der Skelettmuskelzellen. Myoblasten bewegen sich durch Zellmigration zu ihren Bestimmungsorten. Dort hören sie auf sich zu teilen und bilden Synzytien, die Myotuben, die sich im weiteren Verlauf der Entwicklung zu Muskelfasern differenzieren.

IV.2. Die neuromuskuläre Synapse

Die NMJ besteht aus der präsynaptischen Nervenendigung, der postsynaptischen Muskelfaser und der terminalen Schwann'schen Zelle (siehe Abb. IV-1).

Die Prä- und Postsynapse sind durch den synaptischen Spalt getrennt, der von einer extrazellulären Matrix, der Basallamina, ausgekleidet ist. In der Basallamina ist Acetylcholinesterase (AChE) lokalisiert, die den vom Motorneuron sezernierten Neurotransmitter Acetylcholin spaltet, und so für dessen Inaktivierung sorgt. Die postsynaptische Membran ist in subsynaptische Falten gegliedert, an deren oberen Ende die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (AChR) lokalisiert sind. Tiefer in den Einfaltungen liegen die spannungsgesteuerten $\text{Na}_v1.4$ -Kanäle. In der präsynaptischen aktiven Zone des Motorneurons akkumulieren synaptische Vesikel, die ACh, den einzigen Neurotransmitter der NMJ, beinhalten.

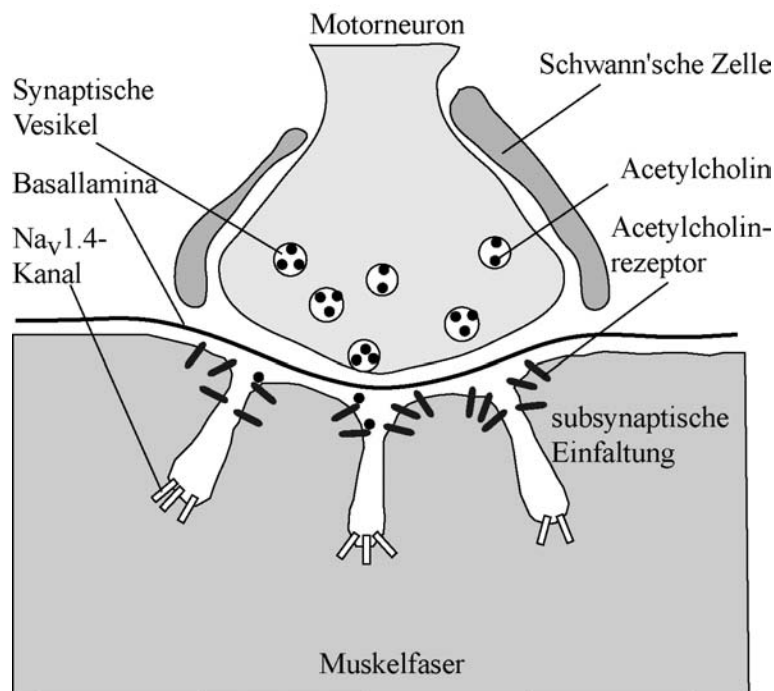


Abb. IV-1 Schematische Übersicht über die Struktur der NMJ.

Die NMJ besteht aus der Nervenendigung des Motorneurons, der Schwann'schen Zelle und der Muskelfaser und ist von der Basallamina ausgekleidet. In der Nervenendigung befinden sich synaptische Vesikel, die mit Acetylcholin gefüllt sind. Die postsynaptische Membran besitzt subsynaptische Einfaltungen, an denen die Acetylcholinrezeptoren räumlich getrennt von den $\text{Na}_v1.4$ -Kanälen liegen.

IV.3. Die neuromuskuläre Signalübertragung

IV.3.1. Das Endplattenpotential und das Aktionspotential

Die Signalübertragung des Neurons zum Muskel erfolgt über ACh, das aus präsynaptischen Vesikeln sezerniert wird. Ein ankommendes Aktionspotential (AP) führt zur Depolarisation des Neurons und bewirkt einen Ca^{2+} -Einstrom, der wiederum die Fusion der Vesikel mit der präsynaptischen Membran der NMJ verursacht. Das aus den Vesikeln freigesetzte ACh diffundiert durch den synaptischen Spalt und bindet an der postsynaptischen Membran an die AChR. Diese Bindung bewirkt die zeitlich begrenzte Öffnung der Rezeptoren und ermöglicht so den Durchfluss von Kationen durch den Ionenkanal der Rezeptoren. Dies bewirkt zunächst eine begrenzte Depolarisation der postsynaptischen Membran, das Endplattenpotential (end-plate currents, EPC) (Fatt and Katz, 1951). Sobald das EPC einen bestimmten Schwellenwert überschreitet, führt es zur Öffnung von spannungsgesteuerten $\text{Na}_v1.4$ -Kanälen, die zu einer Verstärkung der Depolarisation führen, so dass ein Aktionspotential (compound muscle action potential, CMAP) ausgelöst wird.

IV.3.2. Die Muskelkontraktion

Das AP pflanzt sich über die Muskelfaser bis zu Einstülpungen in der Membran, den transversen Tubuli, fort. Hier sind spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (Dihydropyridinrezeptoren) in der Zellmembran konzentriert, die mit Ca^{2+} -Kanälen (Ryanodinrezeptoren) des sarkoplasmatischen Retikulums assoziiert sind. Das ankommende CMAP führt zur Öffnung dieser beiden Ca^{2+} -Kanäle und somit zu einer rapiden intrazellulären Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration. Das einströmende Ca^{2+} bindet an Troponin C. Im Ruhezustand ist Troponin C zusammen mit Tropomyosin an Aktin gebunden und verdeckt so die Bindestelle für Myosin. Sobald Troponin C allerdings Ca^{2+} bindet, gibt es die Myosin-Bindestelle frei, Myosin kann an Aktin binden und unter ATP-Verbrauch an den Aktinfilamenten entlang wandern. Der Muskel kontrahiert sich.

IV.3.3. Das Miniaturendplattenpotential

Miniaturendplattenpotentiale (miniature end-plate currents, MEPC) wurden auf der postsynaptischen Seite der NMJ entdeckt (Fatt and Katz, 1952). Dabei handelt es sich um

kleine Potentialänderungen (0,5 bis 1 mV), die spontan, d.h. ohne Stimulation der Präsynapse entstehen. Später konnte gezeigt werden, dass MEPCs dadurch entstehen, dass präsynaptische Vesikel zufällig mit der Membran fusionieren und dabei das in ihnen gespeicherte ACh (etwa 5000 Moleküle) freigesetzt wird (Katz and Miledi, 1967). Man spricht hierbei von einem Transmitterquant. Im Ruhezustand wird an der Endplatte nur etwa einmal pro Sekunde ein solches Quant freigesetzt. Durch den Ca^{2+} -Einstrom erhöht sich die Wahrscheinlichkeit der Vesikelfusion, so dass bei einem ankommenden AP etwa 150 Quanten auf einmal freigesetzt werden. Die freigesetzte ACh-Menge reicht aus, um an der Postsynapse ein EPC und CMAP auszulösen (Del Castillo and Katz, 1954; Colquhoun and Sakmann, 1998).

IV.4. Struktur des nikotinischen Acetylcholinrezeptors

Der AChR ist ein pentameres Glykoprotein, das aus zwei α - und je einer β -, δ -, γ - bzw. ϵ -Untereinheit besteht (siehe Abb. IV-2 B). Jede Untereinheit besteht aus 450 bis 520 Aminosäuren und besitzt einen langen N-terminalen Bereich, vier putative Transmembrandomänen (M1 bis M4) und einen ausgedehnten cytoplasmatischen Bereich zwischen M3 und M4 ((Karlin and Akabas, 1995) und Abb. IV-2 A).

Die N-terminalen Bereiche der beiden α -Untereinheiten bilden zusammen mit den N-terminalen Bereichen der γ - bzw. ϵ -Untereinheit und δ -Untereinheiten die Bindestelle für ACh (siehe Abb. IV-2 B). Die Öffnung des Kanals erfolgt, wenn je ein Molekül ACh an die beiden ACh-Bindestellen gebunden hat. Mit dem löslichen Acetylcholin-bindenden Protein (AChBP) der Süßwasserschnecke *Limnaea stagnalis* war es möglich, die dreidimensionale Struktur der ACh-Bindestelle genauer zu beschreiben (Smit et al., 2001; Brejc et al., 2001). Desweiteren greift am N-Terminus der α -Untereinheit das α -Bungarotoxin an, das Gift der Schlange *Bungarus multicinctus* (Barchan et al., 1992; Balass et al., 1997). Dieses Gift eignet sich durch seine hohe Affinität zum AChR hervorragend zu dessen Markierung.

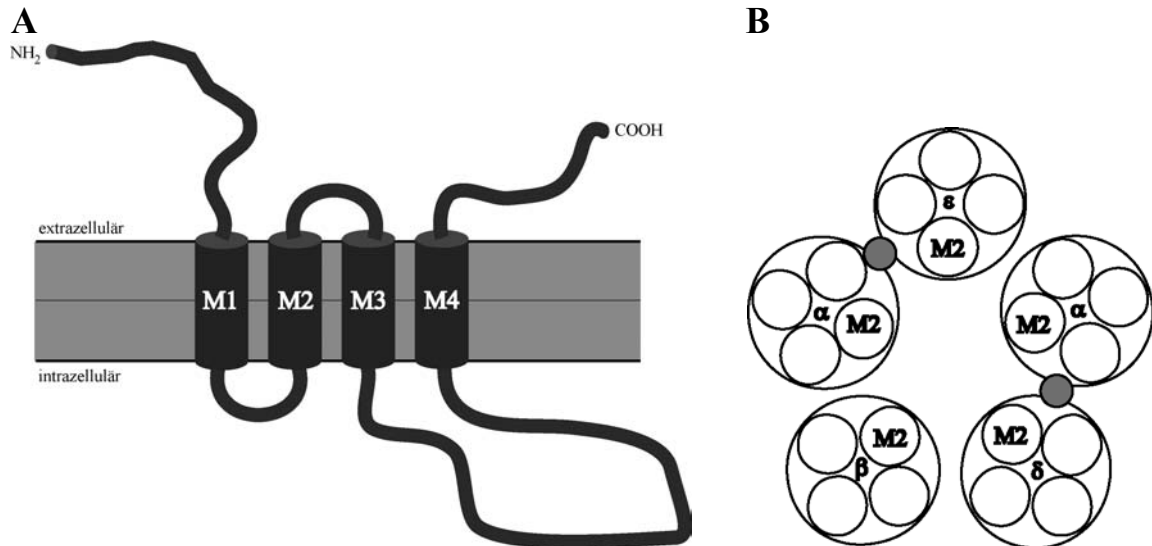


Abb. IV-2 Schematische Darstellung der Struktur der AChR-Untereinheiten und des kompletten Rezeptors.

In **A** ist eine einzelne Rezeptoruntereinheit schematisch dargestellt. Jede Untereinheit besitzt 4 Transmembrandomänen (M1 bis M4), einen ausgedehnten N-terminalen Abschnitt und einen intrazellulären Bereich, der bei der Aggregation der Untereinheiten eine Rolle spielt. Der komplett aggregierte Rezeptor ist in **B** schematisch dargestellt. Große Kreise repräsentieren die Untereinheiten, kleine, weiße Kreise die Transmembrandomänen und kleine graue Kreise die Position der beiden ACh-Bindestellen, die je von einer der beiden α -Untereinheiten und der ϵ - bzw. δ -Untereinheit gebildet werden. Die Transmembrandomänen 2 (M2) der Untereinheiten bilden zusammen den Ionenkanal des Rezeptors.

Die Transmembrandomänen M2 der jeweiligen Untereinheiten bilden den Ionenkanal des Rezeptors, der auch die Kationen-Selektivität des Kanals ausmacht (Miyazawa et al., 1999; Miyazawa et al., 2003).

Der ausgedehnte cytoplasmatische Bereich zwischen den Transmembrandomänen M3 und M4 spielt beim Clustering der Rezeptoren in der NMJ eine Rolle (Maimone and Enigk, 1999).

IV.5. Die Etablierung und Differenzierung der NMJ während der Entwicklung

Während der Entwicklung vom pränatalen zum adulten Organismus finden an der NMJ weitreichende Veränderungen statt. Die Zusammensetzung der Rezeptoruntereinheiten ändert sich und es bilden sich in zentralen Muskelbereichen primäre Aggregate von Rezeptoren, die sich im späteren Verlauf zu funktionellen NMJ ausdifferenzieren. Subsynaptische Zellkerne steigern die Transkription der AChR-Untereinheiten und die postsynaptische Membran faltet sich ein. Die synaptischen Kontakte zwischen Nerv und Muskel entstehen und werden später teilweise wieder eliminiert.

Die Veränderungen, die während der Entwicklung an der NMJ stattfinden, können z.B. mittels konfokaler Mikroskopie beobachtet werden. Die undifferenzierten NMJs stellen sich

zunächst als kompakte, geschlossene Strukturen dar. Im Laufe der Differenzierung nimmt die Ausdehnung der NMJ zu und in ihr bilden sich Bereiche ohne Rezeptoren, so dass man dann von der Bretzel-Struktur spricht (siehe Abb. IV-3).

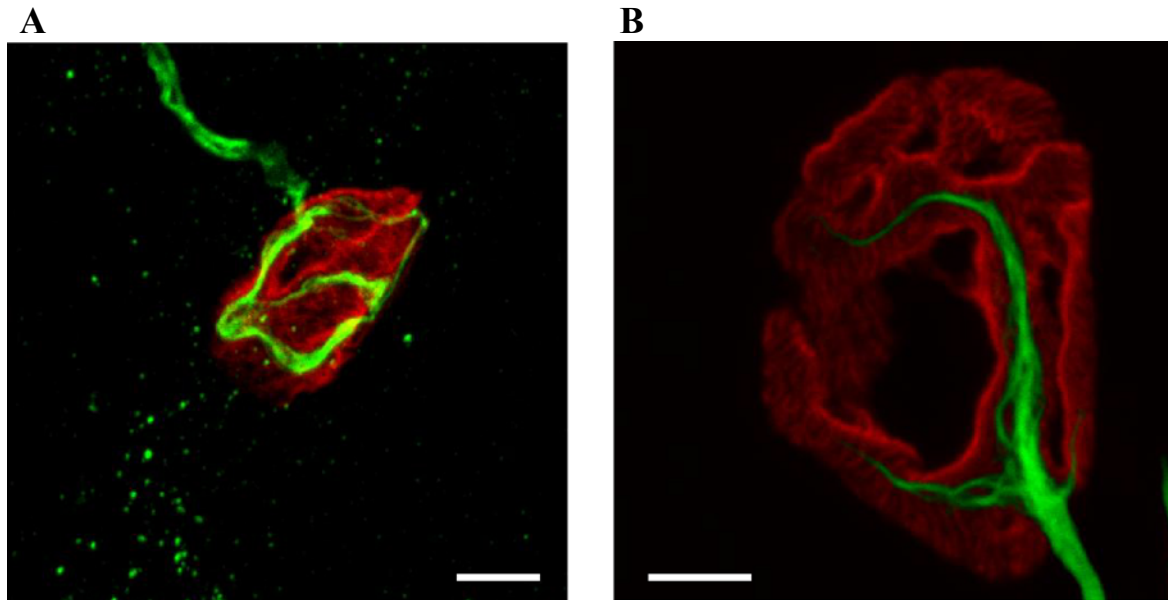


Abb. IV-3: Konfokale Aufnahmen der NMJ.

Die konfokalen Aufnahmen zeigen NMJ des Diaphragmas aus unterschiedlich alten Mäusen (**A**: postnataler Tag 5 und **B**: postnataler Tag 25). AChR sind mit Rhodamin-Bungarotoxin (rot) und die Neuronen mit einem Antikörper gegen Neurofilament (grün) dargestellt. Die undifferenzierte NMJ in **A** zeigt eine geschlossene Struktur und ist etwa um ein Drittel kleiner als die differenzierte NMJ in **B**, die die typische Bretzel-Struktur aufweist. Die Maßstäbe entsprechen 5 μm .

IV.5.1. Der γ/ϵ -Untereinheiten Austausch

Nachdem im fötalen Organismus die Myoblasten zu Myotuben fusioniert sind, wird der AChR, bestehend aus zwei α -, und je einer β -, δ - und γ -Untereinheit exprimiert, und assembliert. Die Zusammensetzung des Rezeptors ändert sich allerdings während der perinatalen Entwicklung, in der die fötale γ -Untereinheit durch die adulte ϵ -Untereinheit ersetzt wird (Sakmann and Brenner, 1978; Witzemann et al., 1987; Witzemann et al., 1989; Witzemann et al., 1991; Kues et al., 1995a; Kues et al., 1995b).

Der Austausch der Untereinheiten verändert die elektrophysiologischen Eigenschaften des Rezeptors grundlegend (Mishina et al., 1986). So nimmt sowohl die Leitfähigkeit als auch die Permeabilität für Ca^{2+} -Ionen zu (Villarroel and Sakmann, 1996). Im Gegensatz dazu nimmt die mittlere Kanaloffenzeit ab. Bei Mäusen ist der γ/ϵ -Austausch etwa 2 Wochen nach der Geburt abgeschlossen.

IV.5.2. Das Prepatterning der NMJ

NMJ's sind in Muskelfasern des Diaphragmas oder des Soleus ungefähr in der Mitte lokalisiert. Dieser zentrale Muskelbereich wird als synaptisches Band bezeichnet. Die Organisation der NMJ im synaptischen Band geschieht durch das sogenannte Prepatterning, das während der Embryogenese stattfindet, wenn sich kleinere AChR-Aggregationen in der Muskelmembran bilden. Dieser Prozess findet anscheinend unabhängig vom Nerv oder neuronalen Faktoren statt (Yang et al., 2001) und wird wahrscheinlich durch die Funktion des fötalen AChR gesteuert. Hinweise darauf lieferte unter anderem ein Knock-In-Mausmodell von Michael Koenen, bei dem die γ - durch die ε -Untereinheit ersetzt wurde, mit der Folge, dass das Prepatterning gestört war (persönliche Mitteilung). Wie dieses Mausmodell zeigen konnte, ist das Prepatterning im Zusammenspiel mit der Aktivität der AChR wichtig für die Leitung (Guidance) der Motoraxone.

Die molekularen Mechanismen der Bildung und Positionierung des synaptischen Bandes und der primären Aggregation der AChR sind zur Zeit noch nicht bekannt.

IV.5.3. Die Agrin-MuSK-Signalkaskade

Im Gegensatz zum Prepatterning wird für die endgültige Konzentration der AChR (Clustering) innerhalb einer funktionellen NMJ der neurotrophe Faktor z^+ Agrin benötigt. Dies konnte durch eine Agrin-Knock-Out-Mauslinie gezeigt werden (Gautam et al., 1996). z^+ Agrin ist ein Proteoglykan, das sich in die Basallamina des synaptischen Spaltes einlagert. Myotuben und Schwann'sche Zellen exprimieren eine andere Spleißvariante, das z^- Agrin, das jedoch im Bezug auf die Fähigkeit, eine funktionelle NMJ zu etablieren, etwa 1000fach schwächer ist als das axonal sezernierte z^+ Agrin.

Während der embryonalen Entwicklung wachsen Motoraxone am Muskel entlang. Kommt ein erster Kontakt zwischen Axon und Muskel zustande, sezerniert das Axon z^+ Agrin, das wiederum die muskelspezifische Kinase MuSK aktiviert (Abb. IV-4). Experimentell konnte bisher keine direkte Bindung von z^+ Agrin an MuSK gezeigt werden. Deshalb wird momentan das hypothetische Verbindungsprotein MASC postuliert. Durch die Aktivierung dimerisiert MuSK und phosphoryliert sich selbst. In Zellkulturexperimenten mit C2C12-Muskelzellen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass z^+ Agrin zusammen mit MuSK sowohl die Tyrosinkinasen der Src-Familie, als auch RAC, Cdc42 und PAK aktivieren kann (Weston et al., 2000; Luo et al., 2002). Die Aktivierung der Src-Kinasen führt zur Phosphorylierung der β -Untereinheit des AChR, und könnte für das Clustering des Rezeptors notwendig sein

(Mohamed et al., 2001). In C2C12-Zellen, die dominant-negativ für RAC oder Cdc42 waren, blieb das Clustering der AChR aus. Im Gegensatz dazu führte konstitutiv aktives RAC auch ohne Induktion über z^+ Agrin zum Clustering der Rezeptoren (Weston et al., 2000).

Für das Clustering der AChR ist Rapsyn essentiell, das im Muskel äquimolar mit dem AChR

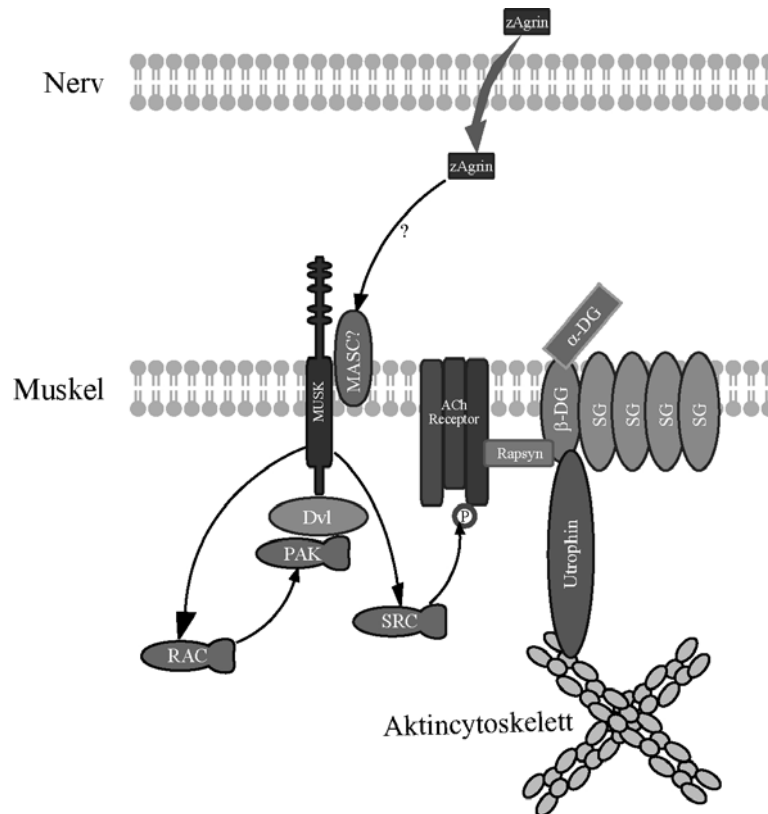


Abb. IV-4: Skizze der möglichen Signalkaskade des AChR-Clustering (verändert nach (Lai and Ip, 2003)).

Das Motoraxon sezerniert z^+ Agrin, das MuSK aktiviert. Da z^+ Agrin nicht direkt an MuSK bindet, wird das hypothetische Protein MASC als Vermittlungsprotein angenommen. MuSK aktiviert RAC und die SRC-Kinasen, die die β -Untereinheit des AChR phosphorylieren. Die Fixierung der Rezeptoren am Dystroglykankomplex, der β -Dystroglykan (β -DG), α -Dystroglykan (α -DG) und Sarkoglykan (SG) beinhaltet, erfolgt über Rapsyn. Der Dystroglykankomplex ist über Utrophin am Cytoskelett verankert.

vorliegt. Rapsyn-defiziente Mäuse zeigten keinerlei Rezeptoraggregation (Gautam et al., 1995). Es verbindet vermutlich den AChR über den Dystroglykankomplex mit dem Aktincytoskelett und spielt so eine wichtige Rolle beim Clustering der Rezeptoren.

Sowohl die Agrin-MuSK-Signalkaskade als auch Rapsyn sind mit Sicherheit am Clustering der AChR und damit an der Etablierung der intakten NMJ beteiligt, wie verschiedene Knock-Out-Mausmodelle zeigen konnten (DeChiara et al., 1996; Hesser, B. A. Dissertation

2000;Gautam et al., 1995;Gautam et al., 1996). Der genaue Ablauf der Signalkaskade, von dem Teile in Zellkulturexperimenten aufgeklärt werden konnten, ist noch nicht geklärt.

IV.5.4. Die Regulation der Transkription der AChR-Untereinheiten

Nachdem die Kontaktaufnahme zwischen Nerv und Muskel stattgefunden hat, konzentrieren sich Rezeptoren an der Synapse. Die AChR-Konzentration steigt von etwa 1000 Rezeptoren pro μm^2 in undifferenzierten Myotuben auf über 10.000 pro μm^2 im subsynaptischen Bereich des adulten Muskels an (Fertuck and Salpeter, 1976). Im extrasynaptischen Bereich des Muskels beträgt die Rezeptorkonzentration dagegen weniger als 10 pro μm^2 .

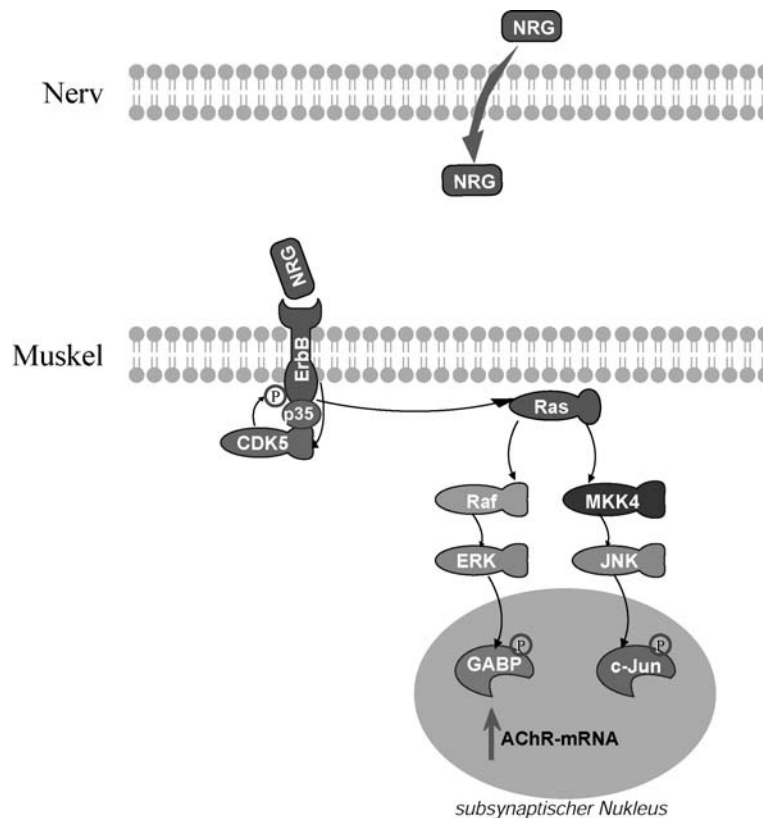


Abb. IV-5: Skizze der möglichen Induktion der subsynaptischen Transkription der AChR-Untereinheiten (verändert nach (Lai and Ip, 2003)).

Neuronales Neuregulin (NRG) bindet an ErbB-Rezeptoren, was zu deren Phosphorylierung durch die assoziierte CDK5 führt. Über eine Signalkaskade, die von der Kinase Ras ausgelöst wird, werden die Transkriptionsfaktoren GABP und c-Jun phosphoryliert und aktiviert. Deren Aktivität steigert vermutlich die subsynaptische Transkription der mRNA der AChR-Untereinheiten.

Neben dem Clustering der Proteine wird die Transkription der mRNA der AChR-Untereinheiten in den subsynaptischen Nuklei gesteigert und in extrasynaptischen Nuklei reduziert. Dadurch erfolgt eine örtlich begrenzte Akkumulation der AChR-Untereinheiten-mRNA in den subsynaptischen Muskelabschnitten (Merlie and Sanes, 1985; Schaeffer et al., 2001).

Die Transkription der mRNA der AChR-Untereinheiten soll über den neurotrophen Faktor Neuregulin (NRG), der an die ErbB-Rezeptoren bindet, induziert werden (Übersichtsartikel: (Lai and Ip, 2003), siehe Abb. IV-5). Eine mögliche Signalkaskade, die in Zellkulturexperimenten untersucht wurde, beinhaltet die Cyclin-abhängige-Kinase 5 (Cdk5). In Rattenmuskeln konnte gezeigt werden, dass Cdk5 über p35 mit ErbB-Rezeptoren assoziiert ist (Fu et al., 2001). Cdk5 aktiviert ErbB mittels Phosphorylierung. ErbB wiederum aktiviert die Kinase Ras, die über Signalkaskaden, die die MAP Kinasen ERK und JNK beinhaltet, schließlich die Transkriptionsfaktoren GABP und c-JUN phosphoryliert. Deren Aktivität könnte zu einer örtlich begrenzten Steigerung der Transkription der mRNA der AChR-Untereinheiten führen (Lai and Ip, 2003).

IV.5.5. Die Bildung postsynaptischer Membraneinfaltungen

Eine weitere Veränderung der Postsynapse betrifft die Membran. Sie stülpt sich im subsynaptischen Bereich zu subsynaptischen Falten ein und vergrößert so ihre Oberfläche (Marques et al., 2000). Dieser Prozess ist in Mäusen in der zweiten postnatalen Woche abgeschlossen. Auf den Spitzen der Falten sind die AChR positioniert (siehe Abb. IV-1). Sie besitzen dadurch den kleinstmöglichen Abstand zu der präsynaptischen Membran. Im Gegensatz dazu liegen die spannungsgesteuerten Na_v1.4-Kanäle in den Tälern der Einfaltungen. Die molekularen Mechanismen, die zur Bildung der Einfaltungen führen, sind bisher unbekannt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Biopsien aus Patienten, die an einem bestimmten myasthenischen Syndromen leiden, zeigten, dass die NMJ dieser Patienten keine oder nur reduzierte Einfaltungen besitzen. Der Verlust der Einfaltungen führt zu einer Herabsetzung des Schwellenwertes, der für das Auslösen eines CMAP benötigt wird. CMAPs werden leichter ausgelöst und so wird die Steuerung der Muskelkontraktion durch das Motorneuron gestört (Engel and Franzini-Armstrong, 1994).

IV.5.6. Die Differenzierung des Motoraxons

Auch auf der präsynaptischen Seite der NMJ kommt es während der Entwicklung zu Veränderungen. Die Axone der Motorneuronen wachsen aus dem Nervenhauptstrang am Muskel entlang. Am synaptischen Band wird der Kontakt zwischen Nerv und Muskel hergestellt und das Wachstum der Axone stoppt. Dieser Wachstumsstopp wird wahrscheinlich durch ein retrogrades Signal des Muskels an das Axon gesteuert. Dies konnte durch einige transgene Tiermodelle, in denen die Bildung der postsynaptischen Seite gestört war, gezeigt werden (Michael Koenen, persönliche Mitteilung (Brandon et al., 2003)). Die molekularen Mechanismen der Regulation des Axonwachstums im Muskel sind bis heute ungeklärt.

In der embryonalen Entwicklungsphase sind die undifferenzierten NMJ zunächst durch mehrere motorische Axone innerviert. Während der perinatalen Phase findet die Synapseneliminierung statt, bei der alle motorischen Axone bis auf eines rückgebildet werden. Von welchen Faktoren die Eliminierung eines bestimmten Axons abhängt, ist zur Zeit noch nicht bekannt.

Wie in der Postsynapse finden auch in der Präsynapse zelluläre Veränderungen statt, die ihre Funktion reflektieren. Im präsynaptischen Abschnitt, der sogenannten aktiven Zone des Axons, werden präsynaptische Vesikel angereichert, die ACh gespeichert haben. Als Reaktion auf ein ankommendes AP fusionieren sie mit der präsynaptischen Membran und sezernieren so den Transmitter in den synaptischen Spalt.

IV.6. Myasthenische Syndrome

Myasthenische Syndrome beruhen auf vererbten oder erworbenen Defekten der neuromuskulären Transmission. Ihre symptomatische Ausprägung ist breit gefächert. So können Patienten, die an dieser Krankheit leiden, schnell ermüden, doppelt sehen, hängende Augenlider haben, kurzatmig sein, Schluckbeschwerden entwickeln und weniger Kraft als gesunde Menschen besitzen. Häufig nimmt die Schwere der Krankheit im Lauf der Zeit zu (Übersichtsartikel: (Engel et al., 2003b)).

Die autoimmune Form der myasthenischen Syndrome wird durch Antikörper ausgelöst, die die Patienten gegen Proteine der NMJ oder der Motorneurone bilden. In 80 bis 90% der Fälle richten sich die Antikörper dabei gegen eine der Untereinheiten des AChR oder, wie im Fall des Lambert-Eaton myasthenischen Syndroms, gegen spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle des Motorneurons. Neben diesen autoimmunen Formen kann Myasthenie auch durch Toxine, wie zum Beispiel Botulinus Toxin ausgelöst werden (Engel et al., 2003b).

Im Gegensatz dazu werden congenitale myasthenische Syndrome (CMS) durch Mutationen in Genen, die für zentrale Proteine der NMJ codieren, hervorgerufen. Bis heute sind in Myasthenie-Patienten eine Vielzahl an Mutationen in Genen gefunden worden, die z.B. für die Cholin-Acetyltransferase (CHAT), die Acetylcholinesterase (AChE), Rapsyn oder die Untereinheiten des AChR codieren (Engel et al., 2003b). Mutationen in den AChR-Untereinheiten können zu verlängerten oder verkürzten Kanaloffenzeiten führen, die entweder durch Veränderungen der Schließ- bzw. Öffnungseigenschaften des AChR oder durch erhöhte oder verminderte Affinität des Rezeptors zu ACh ausgelöst werden.

Obwohl viel Arbeit in die Erforschung der myasthenischen Syndrome gesteckt wurde, sind viele Fragen, die diese Krankheit auf physiologischer, molekularer und genetischer Ebene aufwirft, bis heute ungeklärt.

IV.6.1. Das Slow-Channel Congenital Myasthenic Syndrome (SCCMS)

Das erste mal wurde das Slow-Channel Congenital Myasthenic Syndrome (SCCMS) 1982 beschrieben (Engel et al., 1982). Diese dominant vererbte Krankheit verursacht bei betroffenen Patienten Schwäche in der cervicalen und scapularen Muskulatur und den Extensor-Muskeln der Finger. Außerdem konnte eine leichte Lähmung der Augenmuskulatur festgestellt werden. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden konnte die Krankheit auf den Austausch einer einzelnen Aminosäure in der ϵ -Untereinheit zurückgeführt werden, die zur Verlängerung der Kanaloffenzeit führt.

Die Verlängerung der Kanaloffenzeit hat zur Folge, dass anstatt einem mehrere CMAPs ausgelöst werden. Bei aufeinanderfolgenden neuronalen Stimulationen des Muskels ist außerdem eine abnormale Abnahme der Amplitude der CMAPs zu beobachten. Eine weitere elektrophysiologische Abnormalität ist, dass synaptische Potentiale ungewöhnlich langsam repolarisieren.

Muskuläres Gewebe von SCCMS-Patienten zeigt histologische Veränderungen, die zusammengenommen als Endplattenmyopathie bezeichnet werden. Sie zeichnet sich durch postsynaptische Akkumulation von Calcium, Verlust der Einfaltungen der postsynaptischen Membran, Degeneration muskulärer Organellen, wie den Mitochondrien, die Bildung subsynaptischer Vakuolen, Anreicherung postsynaptischer Vesikel und Degenerierung subsynaptischer Nuklei aus.

Im Laufe der Zeit konnte eine Vielzahl weiterer Mutationen, die zum SCCMS führen, identifiziert werden (Engel et al., 2003b). Sie betreffen alle Untereinheiten des AChR mit

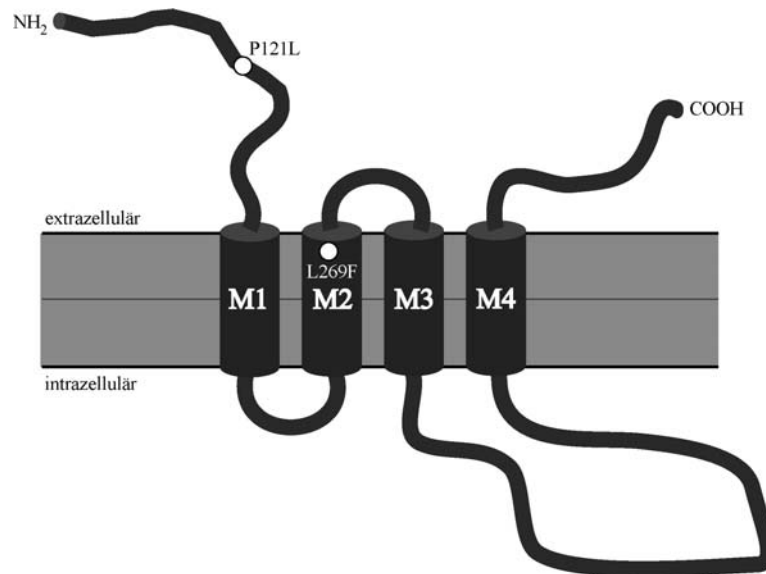


Abb. IV-6: Schematische Übersicht über die Position einiger Aminosäuren, die bei der Entstehung congenitaler Myasthenie eine Rolle spielen.

Die Skizze zeigt die Struktur der ϵ AChR-Untereinheit mit extrazellulären, Transmembran- (M1-M4) und intrazellulären Abschnitten. Die weißen Punkte markieren die ungefähren Positionen von zwei Mutationen, die in der humanen ϵ AChR-Untereinheit gefunden wurden und die zu congenitaler Myasthenie führen. Der P121L-Austausch führt zu dem Fast-Channel Congenital Myasthenic Syndrome. Der L269F-Austausch führt zum Slow-Channel Congenital Myasthenic Syndrome.

Ausnahme der γ -Untereinheit. In den Untereinheiten sind sie entweder in den Transmembrandomänen 1 und 2 oder in der N-terminalen extrazellulären Domäne lokalisiert. 1995 berichteten Gomez und Gammack von SCCMS Patienten, die schnell ermüden und eine progressive Schwäche und Atrophie der Skelettmuskulatur entwickeln (Gomez and Gammack, 1995). Genetische Analysen zeigten, dass in der ϵ -Untereinheit dieser Patienten das Leucin an Position 269 durch Phenylalanin ersetzt ist. Position 269 der ϵ -Untereinheit befindet sich in der Transmembrandomäne 2 (siehe Abb. IV-6). Durch den Aminosäureaustausch kommt es zu Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften des Rezeptors, die zu einer Verlängerung der Kanaloffenzeit führen.

Als Folge der verlängerten Kanaloffenzeit konnte in elektronenmikroskopischen Analysen in den NMJ dieser Patienten Endplattenmyopathie festgestellt werden.

IV.6.2. Das Fast-Channel Congenital Myasthenic Syndrome (FCCMS)

Nicht nur die Verlängerung, sondern auch eine Verkürzung der AChR-Offenzeit kann zu myasthenischen Syndromen führen. So wurde eine Punktmutation im N-terminalen Bereich

der humanen ε -Untereinheit entdeckt, die an Position 121 einen Aminosäureaustausch von Prolin nach Leucin bewirkt (Ohno et al., 1996). Der N-terminale Teil des Rezeptors liegt extrazellulär und spielt bei der Bindung von ACh eine entscheidende Rolle (siehe Abb. IV-6). Der Aminosäureaustausch führt zu einer reduzierten Affinität des Rezeptors für ACh und einer Verkürzung der Kanaloffenzeit. Das damit verbundene, rezessiv vererbte CMS wird deshalb als Fast-Channel Congenital Myasthenic Syndrome (FCCMS) bezeichnet. Anzeichen für Endplattenmyopathie können in NMJ dieser Patienten nicht gefunden werden.

IV.7. Transgene Mauslinien

Prinzipiell bestehen heute zwei Möglichkeiten, transgene Mauslinien zu erzeugen. Bei der Pronukleusinjektion wird DNA in die Pronuklei von einzelligen Mausembryonen injiziert. Die DNA integriert an einer zufälligen Position in das Mausgenom und kann so zu einer Expression des neu eingebrachten Gens führen (Gordon et al., 1980). Die genetische Veränderung kann an den Nachwuchs der transgenen Maus weitergegeben werden. Jedoch bringt diese Methode mehrere Nachteile mit sich. So muss die Genexpression des eingebrachten Plasmids genau untersucht werden, da die zufällige Integration in das Genom zu unvorhersagbaren, ortsabhängigen Expressionseffekten führt und außerdem die Anzahl der integrierten DNA-Kopien erheblich schwanken kann. Desweiteren ist es mit der Pronukleusinjektion nur möglich, zusätzliches genetisches Material in den Organismus einzubringen und nicht endogenes Material zu ersetzen oder zu eliminieren.

Diese Nachteile können dank der Targeting-Technik in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Maus umgangen werden (Evans and Kaufman, 1981; Thompson et al., 1989). Dabei werden ES-Zellen aus frühen Embryonen gewonnen, durch homologe Rekombination *in vitro* genetisch verändert und in Blastocysten injiziert. Aus ihnen entwickeln sich chimäre Tiere, die die eingebrachte genetische Veränderung an ihre Nachkommen weitergeben können. Der große Vorteil der homologen Rekombination ist, dass genomisches Material entweder deletiert (Knock-Out) oder ersetzt (Knock-In) werden kann, wobei das endogene genetische Material auf jeden Fall entfernt wird. Da nur eine Kopie der eingebrachten DNA an einer definierten Stelle integriert wird, bleiben außerdem kopien- oder ortsabhängige Expressionseffekte aus.

IV.7.1. Ein transgenes Mausmodell für das L269F SCCMS

1997 wurde durch Pronukleusinjektion ein transgenes Mausmodell für eine Form des SCCMS generiert (Gomez et al., 1997). In diese transgene Mauslinie wurde cDNA der ϵ -Untereinheit eingeführt, in der das Leucin 269 gegen Phenylalanin ausgetauscht worden war. mRNA-Analysen zeigten, dass das eingeführte, mutierte Gen je nach Linie etwa 8 bis 60 mal überexprimiert wurde. Trotz dieser vielfachen Überexpression können Tiere dieses Modells äußerlich nicht von WT-Tieren unterschieden werden und zeigen nur schwache Anzeichen von Muskelschwäche, wie eine erhöhte Atemfrequenz, einen schwächer ausgeprägten Erkundungstrieb, Probleme bei Anästhesien und leicht reduzierte Muskelkraft. Trotz dieser nur schwach ausgeprägten Muskelschwäche konnte Endplattenmyopathie in den Muskeln dieser Tiere festgestellt werden.

IV.7.2. Knock-Out-Mauslinien einiger Proteine der NMJ

Bis heute wurde eine Reihe Knock-Out-Mauslinien etabliert, in denen die Expression einiger Proteine der NMJ deletiert wurde.

Eine Mauslinie, in der die ϵ -Untereinheit ausgeschaltet wurde, konnte in unserem Labor etabliert werden (Witzemann et al., 1996; Schwarz, H. Dissertation 1999; Schwarz et al., 2000). Mit diesen Tieren konnte gezeigt werden, dass die γ -Untereinheit für bis zu 3 Monate die ϵ -Untereinheit ersetzen kann. In dieser Zeit zeigten sich jedoch fortschreitende phänotypische und morphologische Anzeichen für Myasthenie.

An γ -Knock-Out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Struktur und/oder Funktion des fötalen AChR essentiell für die Entwicklung ist (Takahashi et al., 2002). γ -Untereinheit-defiziente Tiere starben etwa 48 h nach der Geburt und zeigten schwerwiegende morphologische Veränderungen der Muskeln und ihrer Innervierung.

Für die muskelspezifische Kinase MuSK gibt es zwei Knock-Out-Mauslinien. Mäuse, in denen MuSK konstitutiv eliminiert wurde, starben perinatal und bildeten keine funktionellen NMJ (DeChiara et al., 1996). Dieses Mausmodell unterstreicht die essentielle Rolle, die MuSK während der Etablierung der NMJ spielt. Mit einem konditionalen MuSK-Knock-Out-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass MuSK nicht nur zur Etablierung der NMJ essentiell ist, sondern auch bei der Aufrechterhaltung der Struktur der NMJ eine wichtige Rolle spielt (Hesser, B. A. Dissertation 2000).

1995 wurde eine Rapsyn-defiziente Mauslinie generiert, mit der gezeigt werden konnte, dass Rapsyn für die Aggregation der funktionellen NMJ notwendig ist (Gautam et al., 1995). Rapsyn-Knock-Out-Tiere starben wenige Stunden nach der Geburt.

Agrin-Knock-Out-Tiere starben bereits während der späten Embryonalentwicklung und wurden tot geboren (Gautam et al., 1996). Ohne Agrin findet zwar eine primäre Anlage der NMJ statt, funktionelle NMJ entstehen jedoch nicht.

Die neuronale Cholin-Acetyltransferase (ChAT) wurde 2003 in einer Mauslinie eliminiert (Brandon et al., 2003). Tiere, denen dieses essentielle Enzym der ACh-Synthese fehlte, starben bei der Geburt und zeigten prä- und postsynaptische morphologische Veränderungen. Durch diese Knock-Out-Mausmodelle konnte die Notwendigkeit der genannten Proteine für die Etablierung, Differenzierung, Funktion und Aufrechterhaltung der NMJ *in vivo* demonstriert werden.

IV.7.3. Knock-In-Mausmodelle der γ - und ε -Untereinheiten

Die Knock-In-Technik wurde in unserem Labor benutzt, um einige Veränderungen in der γ - und ε AChR-Untereinheit in das Mausgenom einzuführen und die daraus resultierenden physiologischen, genetischen und morphologischen Veränderungen zu untersuchen.

Mit einem Knock-In-Mausmodell, in dem die ε -Untereinheit anstelle der fötalen γ -Untereinheit exprimiert wurde, sollte der Einfluss untersucht werden, den der embryonale Rezeptor und seine spezifische Aktivität auf die Entwicklung der NMJ hat (persönliche Mitteilung von Michael Koenen). Tiere dieser Linie zeigten keine phänotypischen Veränderungen, obwohl die Lokalisierung der NMJ im synaptischen Band und die Innervierung verändert waren.

Zwei weitere Mauslinien sollten zeigen, welche Wirkung eine Verlängerung der Kanaloffenzeit des adulten AChR auf die NMJ hat (Schwarz, Dissertation H.1999). In einer Mauslinie wurde die Transmembrandomäne M2 der ε -Untereinheit durch M2 der γ -Untereinheit ersetzt. Dies verlängert die Kanaloffenzeit um das Sechsfache (Herlitze et al., 1996; Herlitze, S. Dissertation 1994). Tiere dieser Mauslinie zeigen keinen veränderten Phänotyp und nur geringe Veränderungen der Postsynapse. In dem zweiten Mausmodell, in dem alle vier Transmembrandomänen der ε -Untereinheit durch die der γ -Untereinheit ersetzt wurden, konnten weitreichendere morphologische Veränderungen beobachtet werden. Diese Tiere zeigten leichte myasthenische Symptome, die auf die weitere Verlängerung der Kanaloffenzeit zurückzuführen sind.

Das Tet-System wurde benutzt, um eine Mauslinie zu generieren, in der die Transkription der ϵ -Untereinheit reguliert werden konnte (Güth, A. Dissertation 1999). Die Menge der AChR konnte in diesen Tieren auf etwa 60% reduziert werden. Eine Regulation über Doxycyclin war jedoch nicht möglich.

Eine weitere Knock-In-Mauslinie sollte es ermöglichen, die fötalen AChR direkt nachzuweisen. Dazu wurde GFP (green fluorescence protein) in die γ -Untereinheit eingeführt (Gensler et al., 2001; Gensler, S. Dissertation 2001). Es konnte gezeigt werden, dass das eingeführte GFP keine elektrophysiologischen Veränderungen des Rezeptors bewirkt und auch *in vivo* nachgewiesen werden kann.

Mit Hilfe der beschriebenen Knock-In-Mausmodelle konnte der Einfluss untersucht werden, den die elektrophysiologischen Eigenschaften des Rezeptors auf die Entwicklung und die Aufrechterhaltung der NMJ haben. Desweiteren konnte die Regulation der AChR-Expression und die Auswirkungen einer reduzierten Transkription der mRNA der ϵ -Untereinheit untersucht werden.

IV.8. Zielsetzung

Bis heute sind in Patienten, die an CMS leiden, eine Vielzahl an Mutationen in den Untereinheiten des AChR entdeckt worden. Diese Mutationen können unter anderem zu einer verlängerten oder verkürzten Kanaloffenzeit führen und so die neuromuskuläre Transmission negativ beeinflussen (Engel et al., 2003b). Obwohl bisher viele Untersuchungen auf dem Gebiet der congenitalen Myasthenie unternommen wurden, sind die genauen genetischen, molekularen und physiologischen Vorgänge, die zu dieser Krankheit führen, noch nicht komplett aufgeklärt.

Intensive und langjährige Forschungsarbeiten haben die neuromuskuläre Synapse, die muskuläre Struktur, an der myasthenische Syndrome ihren Ursprung haben, zur bestuntersuchten Synapse gemacht (Übersichtsartikel: (Sanes and Lichtman, 2001)). Trotzdem bleiben Fragen, die die Etablierung, Differenzierung, Innervierung und strukturelle Aufrechterhaltung der NMJ betreffen, bis heute unbeantwortet.

Das Ziel dieser Arbeit war es, transgene Mauslinien zu etablieren, die zum einen als Modell für die molekulare Analyse von Muskelkrankheiten, wie dem CMS, verwendet werden können und zum anderen helfen sollen, die Mechanismen aufzuklären, die die Bildung der NMJ regulieren.

1. Das Mausmodell zur Untersuchung des CMS *in vivo*.

Es konnte gezeigt werden, dass Punktmutationen in den AChR zur Entstehung von CMS führen können. Transgene Mauslinien, in denen diese Mutationen eingeführt werden, können dazu dienen, die molekularen und physiologischen Veränderungen im Muskel *in vivo* zu untersuchen und so diese Krankheit auf molekularer Ebene zu analysieren.

In einer transgenen Mauslinie wurde deshalb eine Punktmutation in die ϵ -Untereinheit eingeführt, die zur Verlängerung der Kanaloffenzeit des Rezeptors führt. Diese Mutation wurde in der humanen ϵ -Untereinheit in Zusammenhang mit dem sogenannten Slow-Channel Congenital Myasthenic Syndrome (SCCMS) gefunden. Sie bewirkt durch den Austausch einer Aminosäure (L269F) die Verlängerung der Kanaloffenzeit (Gomez and Gammack, 1995). Dieses Mausmodell soll helfen, grundlegende Vorgänge an der NMJ aufzuklären, die zu dem SCCMS führen. Außerdem könnte es zu pharmazeutischen Versuchen bei der Suche nach Medikamenten gegen die Auswirkungen des SCCMS herangezogen werden. Desweiteren kann durch diese Mauslinie, auch in Verbindung mit bereits in unserem Labor bestehenden Linien, der Einfluss untersucht werden, den die AChR-Aktivität auf die Bildung und Aufrechterhaltung der NMJ hat.

2. Das Mausmodell zur Untersuchung der Entwicklung und Stabilisierung der NMJ.

Im Verlauf der Entwicklung werden zwei verschiedene AChR-Typen exprimiert. Bis heute ist jedoch unklar, welche physiologische Notwendigkeit hinter der Expression dieser beiden AChR-Typen steckt und welchen Einfluss sie auf die Entwicklung der NMJ haben. Als wichtiger regulatorischer Faktor während der Entwicklung der NMJ wird die synaptische Aktivität angesehen.

Mit einer bereits bestehenden Mauslinie konnte gezeigt werden, dass die Eliminierung der fötal exprimierten γ -Untereinheit letal ist (Takahashi et al., 2002). Ein weiteres Mausmodell, in dem während der Embryonalentwicklung die adulte ϵ -Untereinheit anstatt der γ -Untereinheit exprimiert wurde, zeigte dagegen keine phänotypischen und nur geringe morphologische Veränderungen (persönliche Mitteilung von Michael Koenen).

Welche Auswirkung hat eine Reduktion der synaptischen Aktivität während der Embryonalentwicklung auf die Struktur und Funktion der NMJ?

Um diese Frage durch *in vivo* Untersuchungen beantworten zu können, wurde in einer zweiten Mauslinie dieser Arbeit die Funktion der fötalen Form des AChR drastisch reduziert. Dazu musste zunächst eine geeignete Modifikation einer AChR-Untereinheit gefunden werden, die die Funktion des Rezeptors senkt. Gleichzeitig sollte die ursprüngliche Struktur dieser AChR-Untereinheit jedoch möglichst beibehalten werden. Eine Modifikation, die zu

den gewünschten Veränderungen führt, wird durch eine Punktmutation bewirkt, die in Patienten gefunden wurde, die an dem Fast-Channel Congenital Myasthenic Syndrome leiden.

V. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sind zwei transgene Knock-In Mauslinien etabliert worden. Die erste Linie exprimiert einen fötalen nikotinischen Acetylcholinrezeptor (AChR γ), dessen Funktion stark reduziert ist. Um die Expression des Rezeptors kontrollieren zu können und die Lokalisierung in der NMJ zu vereinfachen, wurde der Rezeptor mit dem Green Fluorescence Protein (GFP) gekoppelt. Diese Mauslinie soll *in vivo* Aufschlüsse darüber geben, welchen Einfluss eine reduzierte Funktion des AChR auf die Entwicklung der NMJ während der Embryonalphase hat.

Die zweite Mauslinie soll als Modell für das Slow-Channel Congenital Myasthenic Syndrome (SCCMS) dienen. Dazu wurde eine Punktmutation in die ϵ -Untereinheit des AChR (ϵ -Untereinheit) eingeführt, die in der humanen ϵ -Untereinheit von Patienten entdeckt wurde, die an congenitaler Myasthenie leiden. Als Mausmodell für das SCCMS können an Tieren dieser Linie z.B. pharmazeutische Untersuchungen durchgeführt oder die genetischen, molekularen und physiologischen Vorgänge untersucht werden, die zum SCCMS führen. Daneben kann an dieser Mauslinie auch der Einfluss analysiert werden, den die veränderte synaptische Aktivität des Rezeptors auf die Struktur und Funktion der NMJ hat.

V.1. Generierung einer Mauslinie, die einen fötalen AChR mit stark reduzierter Aktivität exprimieren

1996 wurde eine Punktmutation in der adult exprimierten ϵ -Untereinheit in Patienten entdeckt, die an dem Fast Channel Congenital Myasthenic Syndrome (FCCMS) leiden (Ohno et al., 1996). Diese Mutation, bei der Prolin an Position 121 durch Leucin ersetzt wird (ϵ P121L), soll benutzt werden, um die Aktivität des fötalen Rezeptors in transgenen Mäusen bedeutend zu reduzieren. Mit diesen Tieren soll der Einfluss untersucht werden, den die synaptische Aktivität des AChR auf die Entwicklung der NMJ während der Embryonalphase hat.

V.1.1. Einführung der P121L-Mutation in die cDNA der γ - und ε -Untereinheit der Maus

Die Aminosäuresequenz der AChR-Untereinheiten ist hoch konserviert. Das gilt für die fünf verschiedenen Untereinheiten einer einzelnen Spezies, so wie für die Aminosäuresequenzen einer Untereinheit verschiedener Spezies (siehe Abb. V-1). So ist Prolin 121 in allen AChR-Untereinheiten der Maus und in allen ε -Untereinheiten der aufgeführten Spezies enthalten. Diese Tatsache ermöglichte es, die in der humanen ε -Untereinheit gefundene P121L-Mutation in die γ - und ε -Untereinheit der Maus zu übertragen.

A

ε -Untereinheiten:

<i>Homo sapiens</i>	EGGSVTWLPP <u>PAI</u> YRSVCAV
<i>Mus musculus</i>	EGGYVSWLPP <u>PAI</u> YRSTCAV
<i>Rattus norvegicus</i>	EGGSVSWLPP <u>PAI</u> YRSTCAV
<i>Bos taurus</i>	EGGYLSWLPP <u>PAI</u> YRSTCAV
<i>Torpedo californica</i>	NDGSMYWLPP <u>PAI</u> YRSTCPI

B

Mus musculus:

α	YTGHITWT <u>PPAI</u> FKSYCEI
β	FEGSVRWQ <u>PPGLY</u> RSSCSI
δ	DSGYVTWL <u>PPAI</u> FRSSCPI
γ	PDGCIYWL <u>PPAI</u> FRSSCSI
ε	EGGYVSWLPP <u>PAI</u> YRSTCAV

Abb. V-1: Vergleich eines Aminosäuresequenzabschnittes der AChR-Untereinheiten.

Der Vergleich der ε -Untereinheit (A) zwischen Mensch, Maus, Ratte, Rind und Zitterrochen zeigt die hohe Homologie, die in den Untereinheiten der verschiedenen Spezies zu finden ist. Auch innerhalb der verschiedenen AChR-Untereinheiten in einem Organismus ist eine hohe Sequenzhomologie vorhanden, wie in dem in B gezeigten Sequenzabschnitt der AChR-Untereinheiten der Maus. Prolin 121 (unterstrichen) ist in allen gezeigten Sequenzen konserviert.

Die cDNA, die für die Maus- ε - und γ -Untereinheit codiert, lag bereits im Labor vor. Der Prolin zu Leucin Austausch wurde erzeugt, indem eine Base der cDNA ausgetauscht wurde (C441T in der ε -cDNA bzw. C439T in der γ -cDNA). Dies geschah mittels gerichteter Mutation, wozu die Primer eps P121L for und eps P121L rev bzw. gam P121L for und gam P121L rev benutzt wurden. Die Basensequenz wurde durch Sequenzierung der kompletten cDNA bestätigt.

V.1.2. Elektrophysiologische Analysen der AChR-Untereinheiten

Nachdem die P121L-Mutation in die ϵ - und γ -Untereinheit eingeführt worden war, wurden die hervorgerufenen elektrophysiologischen Veränderungen untersucht. Dies sollte zunächst zeigen, dass die eingeführte Mutation, die ursprünglich als Mutation in der humanen ϵ -Untereinheit in myasthenischen Patienten gefunden worden war, die gleichen funktionellen Veränderungen in den AChR der Maus bewirkt. Außerdem stellte sich die Frage, ob die Mutation in der ϵ - und γ -Untereinheit die gleiche Wirkung hat oder ob die mutierte ϵ - bzw. γ -Untereinheit die Funktion des AChR unterschiedlich beeinflussen. Nach Klärung dieser Fragen sollte dann entschieden werden, welche Untereinheit für die homologe Rekombination in das Mausgenom benutzt werden sollte. Für diese Analysen wurde das *Xenopus laevis* (*X.laevis*) Oocyten-Expressionssystem benutzt.

V.1.2.1. Bestimmung der halbmaximalen Bindungskonstanten (IC_{50}) mit Hilfe der Zwei-Elektroden Spannungsklemme

Die halbmaximale Bindungskonstante IC_{50} gibt an, wie stark die Bindung eines Liganden, in diesem Fall ACh, an ein Protein, in diesem Fall AChR, ist. Eine Reduktion des IC_{50} -Wertes würde automatisch eine Reduktion der AChR-Aktivität mit sich bringen.

Die cDNAs der einzelnen Maus AChR-Untereinheiten wurden *in vitro* in cRNA transkribiert. Nachdem den *X.laevis* Fröschen Oocyten entnommen worden waren, wurden die cRNAs der Maus-AChR-Untereinheiten in diese injiziert. Um sicherzustellen, dass die Untereinheiten im richtigen Verhältnis injiziert wurden (2:1:1:1 für α : β : δ : γ bzw. ϵ), wurden die cRNAs zuvor über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, das Gel digital fotografiert und die Fluoreszenzintensität der mit Ethidiumbromid gefärbten cRNAs mit Hilfe des Programms IPLab Gel quantifiziert.

Der Gesamtzell-Strom, der durch die AChR fließt, wurde mit Hilfe der Zwei-Elektroden Spannungsklemme bestimmt. Die Klemmspannung betrug dabei -70 mV. Eine Oocyte wurde bei einer Messreihe mit steigenden ACh-Konzentrationen für jeweils 1 min umspült. Die höchste Amplitude des Stromflusses wurde als Messwert registriert. Nach jeder Messung wurde die Oocyte für mindestens 1 min mit Puffer ohne ACh umspült, um den Ausgangsstrom wieder herzustellen.

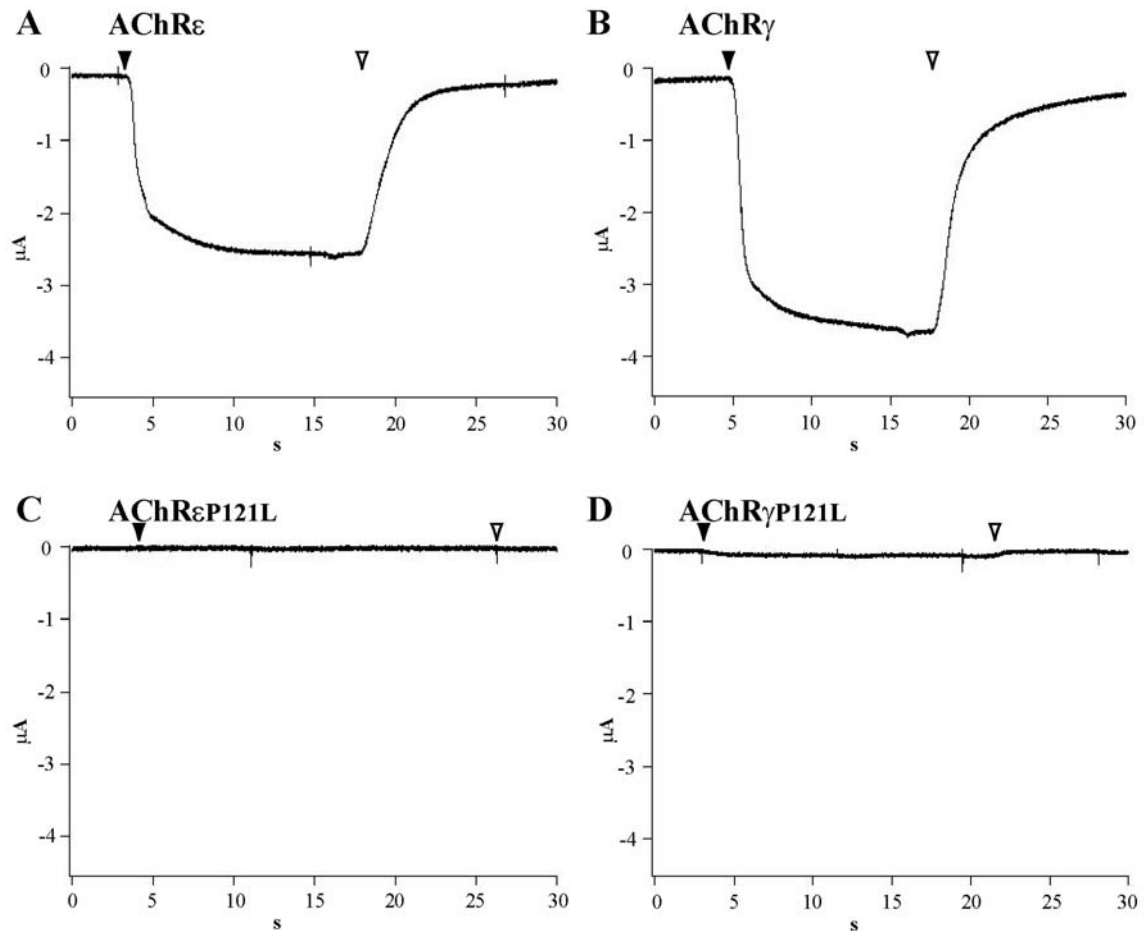


Abb. V-2: Exemplarische Darstellungen von Aufzeichnungen des Gesamtzell-Stroms an Oocyten.

Der Stromfluss durch die Rezeptoren, die in Oocyten exprimiert worden waren, wurde mit Hilfe der Zwei-Elektroden Spannungsklemme bestimmt. Schwarze Pfeilköpfe markieren den Zeitpunkt der Zugabe von ACh und weiße Pfeilköpfe den Zeitpunkt, an dem die ACh-Zufuhr unterbrochen wurde. AChR ϵ (A) und AChR γ (B) öffnen sich in Folge der ACh-Applikation, erkennbar an dem negativen Kompensationsstrom, der nötig ist, um das Klemmpotential von -70 mV aufrechtzuerhalten. Bei AChR ϵ P121L in C ist keine Reaktion auf $1 \mu\text{M}$ ACh zu messen. AChR γ P121L (D) reagieren nur schwach auf die $1 \mu\text{M}$ ACh-Applikation.

In Abb. V-2 sind exemplarische Aufzeichnungen von Gesamtzell-Strömen von Oocyten dargestellt, die AChR ϵ , AChR γ , AChR ϵ P121L oder AChR γ P121L der Maus exprimierten. AChR ϵ und AChR γ öffnen sich in Folge der $1 \mu\text{M}$ ACh-Applikation, wobei AChR γ eine größere Amplitude zeigten als AChR ϵ . Die Insertion der P121L-Mutation in die γ -Untereinheit bewirkt, dass der Rezeptor nur noch sehr schwach auf $1 \mu\text{M}$ ACh reagiert. Bei dieser geringen Konzentration zeigt der AChR ϵ P121L keine messbare Reaktion.

Der IC_{50} -Wert für die verschiedenen Kanäle wurde bestimmt, indem die höchste gemessene Stromstärke jeder Messreihe auf 100% und alle anderen Werte dazu in Relation gesetzt wurden. Diese relativen Werte einer bestimmten ACh-Konzentration aus allen Messungen

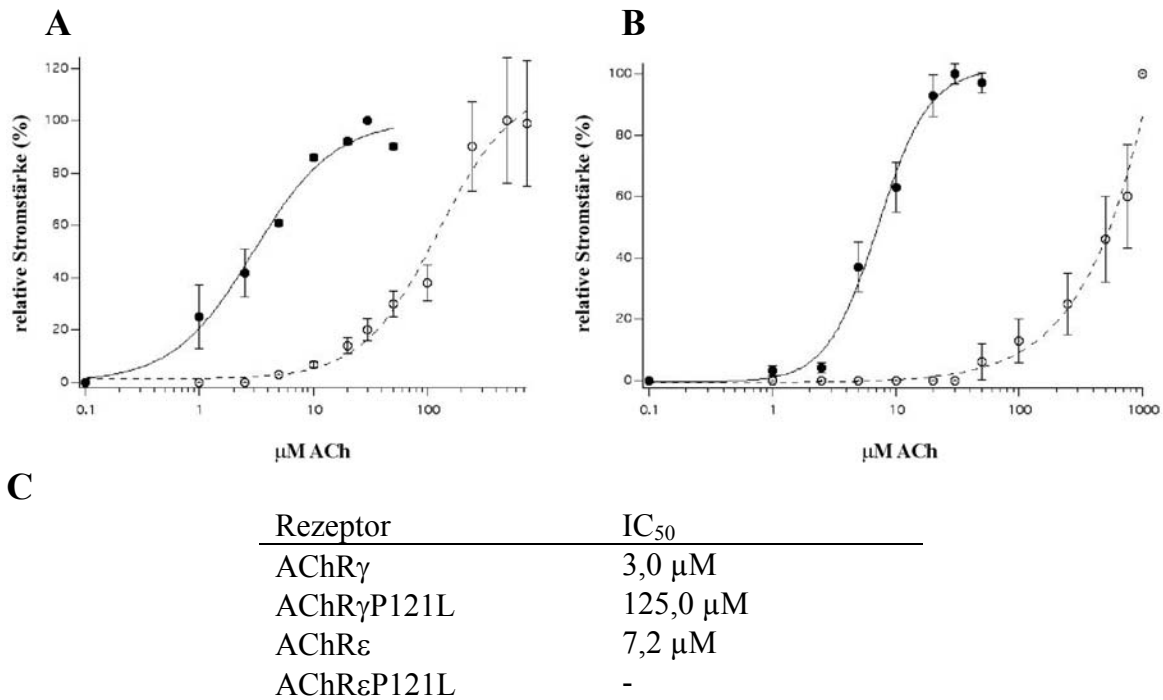


Abb. V-3: IC₅₀-Bestimmung der Maus AChR mit Hilfe der Zwei-Elektroden Spannungsklemme.

Die maximale Stromstärke wurde für jeden Rezeptortyp (AChR ϵ , AChR ϵ P121L, AChR γ und AChR γ P121L) bei steigenden ACh-Konzentrationen von 0,1 μ M bis 1 mM bestimmt. Der Maximalwert jeder Messreihe wurde auf 100% gesetzt. Anschließend wurde der Mittelwert aller Messungen eines Rezeptortyps errechnet und gegen die ACh-Konzentration aufgetragen. Die Ausgleichskurven wurden durch die Hill-Gleichung (AChR ϵ , AChR γ und AChR γ P121L) bzw. durch eine exponentielle Funktion (AChR ϵ P121L) ermittelt. In **A** sind die Ergebnisse für AChR γ (gefüllte Punkte, durchgezogene Linie, n = 11) und AChR γ P121L (leere Punkte, gestrichelte Linie, n = 10) dargestellt. **B** zeigt die Ergebnisse für die AChR ϵ (gefüllte Punkte, durchgezogene Linie, n = 9) und AChR ϵ P121L (leere Punkte, gestrichelte Linie, n = 13). Die Einführung der Mutation bewirkte in beiden Rezeptortypen eine Reduktion der Affinität für ACh, die im adulten AChR ϵ stärker ausgeprägt ist als im fötalen Rezeptor (**C**). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

eines bestimmten Rezeptortyps wurden gemittelt und in einem Diagramm gegen die ACh-Konzentration aufgetragen (Abb. V-3 A und B).

Die Ausgleichskurve wurde, außer für die Werte der AChR ϵ P121L, mit Hilfe der Hill-Gleichung und der Software IgorPro (Wavemetrics) bestimmt. Da für die Messwerte der AChR ϵ P121L bei 1 mM ACh der Maximalabschnitt der Kurve nicht erreicht war, wurde die Ausgleichsgerade durch eine exponentielle Funktion bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Einführung der P121L-Mutation sowohl im fötalen als auch im adulten Rezeptor zu einer Reduktion der Affinität für ACh führt (Abb. V-3 C). Diese Reduktion ist im adulten Rezeptor stärker ausgeprägt, da sogar bei einer ACh-Konzentration von 1 mM ACh der Maximalabschnitt der Kurve nicht erreicht wird. Im fötalen Rezeptor bewirkt die Mutation eine Reduktion der halbmaximalen Bindungskonstante um etwa das 40fache, von 3 μ M auf 125 μ M ACh.

V.1.2.2. Einzelkanalmessungen der AChR γ P121L und AChR ϵ P121L

Die weitere elektrophysiologische Charakterisierung der mutierten Kanäle erfolgte mit Hilfe von Einzelkanalmessungen an mit cRNA injizierten *X.laevis*-Oocyten. Die Ableitungen wurden mit Hilfe der „cell-attached patch-clamp“-Technik aufgezeichnet.

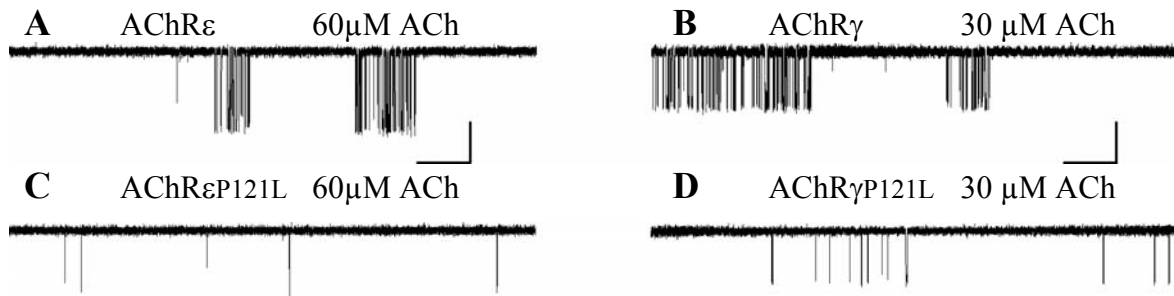


Abb. V-4: Einzelkanalmessungen an mit cRNA injizierten *X.laevis* Oocyten.

Dargestellt sind Aufzeichnungen von Einzelkanalmessungen der verschiedenen AChR. Öffnungsereignisse sind an den nach unten gerichteten, negativen Stromflüssen zu erkennen. **A** zeigt Aufzeichnungen, die von AChR ϵ und **B** die von AChR γ gemacht wurden. Bei beiden Rezeptortypen folgen viele Öffnungsereignisse in kurzen Abständen aufeinander (Opening Bursts). Bei Aufzeichnungen von AChR ϵ P121L (**C**) oder AChR γ P121L (**D**) sind nur einzelne Öffnungsereignisse zu erkennen. In **A** und **C** wurden 60 μ M ACh, in **B** und **D** 30 μ M ACh in der Meßpipette benutzt (Maßstab: horizontal: 200 ms, vertikal: 5 pA).

Abb. V-4 zeigt Ausschnitte der Einzelkanalmessungen mit 30 μ M ACh bei AChR γ und 60 μ M ACh bei AChR ϵ . Unterschiedliche ACh-Konzentrationen wurden gewählt, weil bei 30 μ M ACh keine Reaktion der AChR ϵ P121L aufzeichnenbar waren.

In Einzelkanalaufzeichnungen zeigten adulte und fötale AChR (Abb. V-4 **A** und **B**) das erwartete Verhalten. Zeitabschnitte ohne Aktivität wurden unterbrochen von Abschnitten, in denen viele Öffnungsereignisse aufeinanderfolgen. Dieses Verhalten wird als Opening Bursts bezeichnet. Zu beobachten war weiterhin, dass die Amplitude der Stromstärke der adulten AChR ϵ , wie erwartet, höher war als die der fötalen AChR γ .

In den Aufzeichnungen, die von den AChR ϵ P121L und AChR γ P121L gemacht wurden, konnten keine Opening Bursts, sondern nur einzelne Öffnungsereignisse gemessen werden (Abb. V-4 **C** und **D**). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität der Maus-AChR durch die Einführung der P121L-Mutation reduziert wird. Die Amplitude der Stromstärke der AChR ϵ P121L ist größer als die der AChR γ P121L.

V.1.3. Kontrolle des Einbaus von AChR-Komplexen in die Zellmembran

Diese Analysen sollten sicherstellen, dass durch die eingeführten Mutationen keine Beeinträchtigung bei der Bildung der AChR-Komplexe und bei deren Einbau in die Zellmembran hervorgerufen wird.

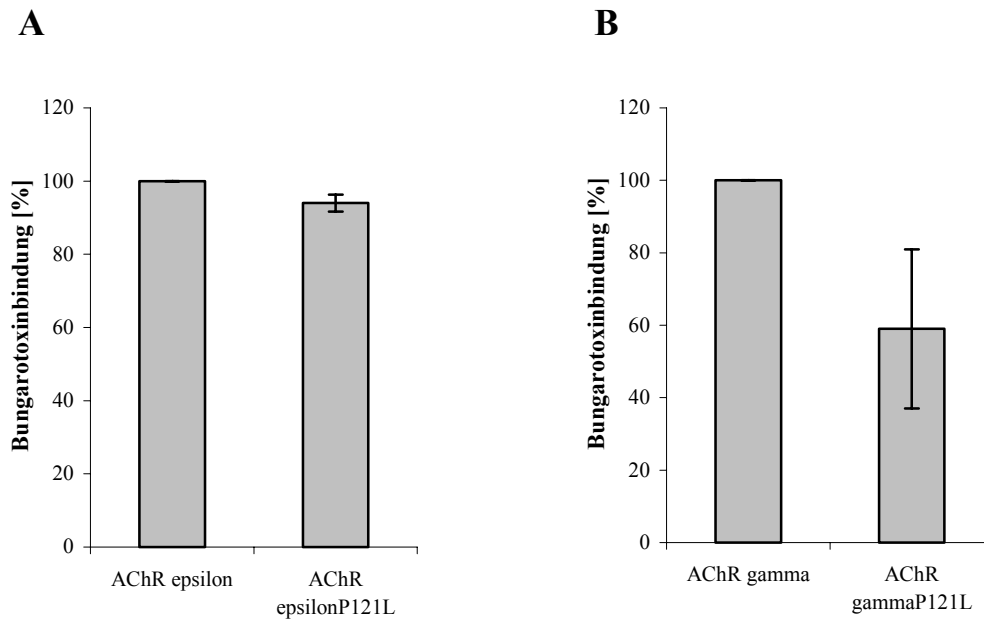


Abb. V-5: Analyse des AChR-Einbaus in die Zellmembran nach Einführung der P121L-Mutation in die ϵ - und γ -Untereinheit.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der relativen gebundenen Menge ^{125}I - α -Bungarotoxin zweier Messreihen mit 10 Oocyten pro Rezeptortyp. Es zeigte sich, dass die Einführung der P121L-Mutation in die ϵ -Untereinheit den Rezeptoreinbau in die Zellmembran nicht bedeutend beeinflusst (A). Die gleiche Mutation in der γ -Untereinheit bewirkt dagegen einen um 40% reduzierten Einbau des AChR (B). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Für diese Experimente wurden die mit cRNA injizierten *X.laavis* Oocyten benutzt, die in Zwei-Elektroden Spannungsklemm-Experimenten gezeigt hatten, dass sie AChR exprimieren. Die Expression der AChR-Komplexe wurde gemessen, indem die membranständigen Rezeptoren von 10 Oocyten mit ^{125}I - α -Bungarotoxin (^{125}I - α -Bgtx.) inkubiert wurden. Anschließend wurde freies ^{125}I - α -Bgtx. durch Waschen der Oocyten entfernt und das gebundene ^{125}I - α -Bgtx. im Szintillationszähler quantifiziert. Von den gemessenen Werten eines Experiments wurde der Mittelwert errechnet. Als Hintergrundwert wurde der Mittelwert von uninjizierten Oocyten benutzt, die mit ^{125}I - α -Bgtx. inkubiert worden waren.

Der Vergleich der Menge an gebundenem ^{125}I - α -Bgtx. in Abb. V-5 zeigt, dass die Einführung der P121L-Mutation in die ϵ -Untereinheit keinen bedeutenden Einfluss auf die

Komplexbildung des Rezeptors und den Transport in die Zellmembran hat ($94 \pm 2,3\%$). Im Gegensatz dazu führt die gleiche Mutation in der γ -Untereinheit zu einer Verschlechterung des Einbaus von AChR auf $59 \pm 21,9\%$ des normalen Wertes.

V.1.4. Generierung der γ/ϵ FC-Mauslinie

Die elektrophysiologischen Voruntersuchungen und Untersuchungen des Einbaus der AChR-Komplexe in die Zellmembran zeigten, dass die P121L-Mutation in der ϵ -Untereinheit zu kürzeren Kanaloffenzeiten und einer geringeren Bindungskonstanten führt, wobei die Expression von membrangebundenen AChR unverändert bleibt. AChR, die anstelle der ϵ P121L-Untereinheit die γ P121L-Untereinheit enthielten, waren in ihren ACh-Bindungs- und Ionenleitfähigkeitseigenschaften nicht so stark reduziert. Zudem war der Einbau der AChR γ P121L in die Zellmembran reduziert.

Deshalb sollte die ϵ P121L-Untereinheit durch homologe Rekombination in das γ -Gen der transgenen Mauslinie integriert werden, damit die mutierte Untereinheit während der Embryonalentwicklung exprimiert wird. Der Targetingvektor für das γ -Gen (γ/ϵ P121L-GFP-p1002) bestand aus γ -spezifischen DNA-Sequenzen und aus einem Teil der ϵ -cDNA. Die Mauslinie, in deren Genom die chimäre γ/ϵ -Untereinheit mit der P121L-Mutation eingeführt wurde, wird im Folgenden als γ/ϵ FC-Linie bezeichnet.

V.1.4.1. Klonierungsstrategie und Konstruktion des Targetingvektors γ/ϵ P121L-GFP-p1002

Der γ/ϵ -p1002 Targetingvektor wurde freundlicherweise von Dr. Michael Koenen zur Verfügung gestellt. Der Ausgangsvektor war der pBKS-Vektor, der mit XhoI linearisiert wurde (Abb. V-6). Ein ca. 7 kb großes Fragment der genomischen Sequenz der γ -Untereinheit (Promotorsequenzen bis Intron 8) wurde in den Vektor eingefügt. In Exon 4 der genomischen γ -DNA wurde eine stille Mutation eingeführt, die eine XbaI-Restriktionsschnittstelle generierte. Diese Schnittstelle wurde benutzt, um die cDNA, die für die entsprechenden Exons 4 bis 12 der ϵ -Untereinheit codiert, zu inserieren.

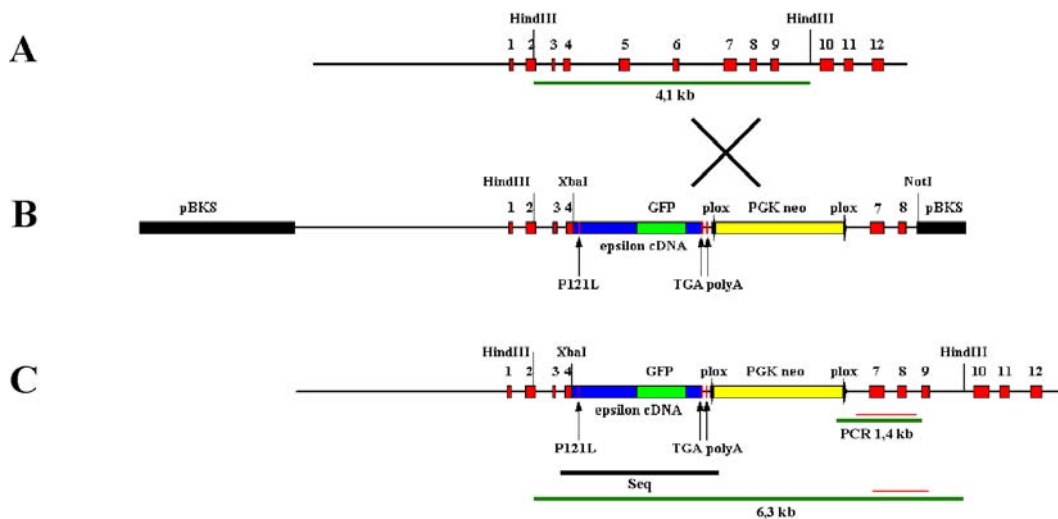


Abb. V-6: Schematische Darstellung des γ -Gens, des γ/ϵ P121L-GFP-p1002 Targetingvektors und des γ/ϵ P121L GFP-Gens nach erfolgreicher homologer Rekombination.

Das γ -Gen ist in **A** schematisch dargestellt. Exons 1 bis 12 sind durch rote Kästen repräsentiert. Die Positionen der HindIII-Schnittstellen, die bei der Southern-Blot-Analyse benutzt wurden, sind markiert. Das dabei entstehende 4,1 kb große Fragment ist grün gekennzeichnet. **B** zeigt die schematische Darstellung des γ/ϵ P121L-GFP-p1002 Targetingvektors. Die schwarzen Balken repräsentieren den pBKS-Vektor. Die ϵ -cDNA (blauer Balken) wurde mit der gekennzeichneten XbaI-Restriktionsschnittstelle in die genomische cDNA eingefügt. Die cDNA beinhaltet die P121L-Mutation, das Stopcodon und die polyA-Sequenz (durch Pfeile gekennzeichnet). Die PGK neo-Selektionskassette ist durch einen gelben Kasten dargestellt und von zwei loxP-Sequenzen (dicke Pfeile) flankiert. In **C** ist das mutierte γ/ϵ -Gen nach erfolgter homologer Rekombination schematisch dargestellt. Das bei der PCR-Analyse amplifizierte Fragment war 1,4 kb groß und wurde mit der in rot dargestellten Sonde (Eco-Not-Sonde) nachgewiesen. Bei der Southern-Blot-Analyse der mit HindIII geschnittenen genomischen DNA zeigte das homolog rekombinierte Allel ein 6,3 kb großes Fragment (grün), das mit der rot dargestellten Sonde 7 nachgewiesen wurde. Der sequenzierte genomische Abschnitt (Seq) ist mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet.

Die cDNA der ϵ -Untereinheit trug die Punktmutation, die zum Austausch von Prolin nach Leucin führt. Desweiteren wurde die GFP codierende Sequenz über PstI-Restriktionsschnittstellen in die ϵ -Untereinheit integriert (Gensler et al., 2001). An die cDNA

schloss sich das Neomycin-Resistenzgen an, das der Selektion der embryonalen Stammzellen diene und durch zwei EcoRI-Schnittstellen in den Vektor eingefügt wurde. Es steht unter der Kontrolle des PGK-Promotors und wurde von zwei loxP-Sequenzen flankiert, die es ermöglichen sollten, die Resistenz bei möglicherweise auftretenden Transkriptionsproblemen zu deletieren. Am 3'-Ende des genomischen Sequenzabschnitts befindet sich zur Linearisierung des Targetingvektors eine NotI-Restriktionsschnittstelle.

V.1.4.2. Transfektion von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus mit dem Targetingvektor γ/ϵ P121L-GFP-p1002

Der mit NotI linearisierte Vektor wurde mit dem „QIAquick Purification Kit“ (Qiagen) aufgereinigt und auf einem 1% Agarosegel analysiert. Etwa 10^7 ES-Zellen der Linie E14-1 (Kuhn et al., 1991) wurden mit 30 μ g linearisiertem γ/ϵ P121L-GFP-p1002 durch Elektroporation transfiziert. Nach der Selektion mit G418 zeigte sich, dass etwa 400 Klone durch Integration des Targetingvektors gegen G418 resistent wurden. Resistente Klone wurden isoliert, trypsiniert und in 96-Well-Platten kultiviert.

V.1.4.3. Analyse der homologen Rekombination durch PCR

Eine erste Analyse der homologen Rekombination in den ES-Zellen erfolgte mittels PCR. Dazu wurde die genomische DNA der ES-Zellen mit Hilfe des „DNeasy 96 Tissue Kit“ (Qiagen) isoliert.

25 μ l der DNA-Lösung wurden für die PCR-Reaktion eingesetzt, mit weiteren 25 μ l Reaktionslösung gemischt und die Hälfte der Ansätze auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abb. V-7). Anschließend wurde die DNA auf eine Membran transferiert. Mit der fluoresceinmarkierten Eco-Not-Sonde (siehe Abb. V-6) wurde die 1,4 kb große, amplifizierte DNA spezifisch nachgewiesen. Die Eco-Not-Sonde wurde durch Restriktionsspaltung des p1005-Vektors mit EcoRI und NotI hergestellt. Das dabei entstehende 1013 bp große Fragment wurde isoliert. Der p1005-Vektor entspricht dem p1002-Vektor, mit dem Unterschied, dass er am 3'-Ende um ein genomisches NotI-Fragment verlängert ist. Wie der p1002-Vektor wurde auch der p1005-Vektor freundlicherweise von Dr. Michael Koenen zur Verfügung gestellt.

Neben dem erwarteten 1,4 kb Fragment konnte durch PCR auf genomische DNA putativ positiver ES-Zell Klone ein zweites, kleineres Fragment amplifiziert und nachgewiesen werden. Dieses Fragment trat sowohl in positiven Proben als auch in der Positivkontrolle auf.

Wahrscheinlich handelt es sich bei dieser Bande um ein kleineres Nebenprodukt der PCR. Weil keine Beeinträchtigung der Versuchsergebnisse vorlag, wurden die Ursachen nicht genauer untersucht.

Durch die PCR-Analyse ließen sich 11 ES-Zell-Klone identifizieren, in denen die gewünschte homologe Rekombination putativ stattgefunden hatte. Zur Absicherung und Bestätigung wurden diese Klone mit Hilfe von genomischem Southern-Blot weiter analysiert.

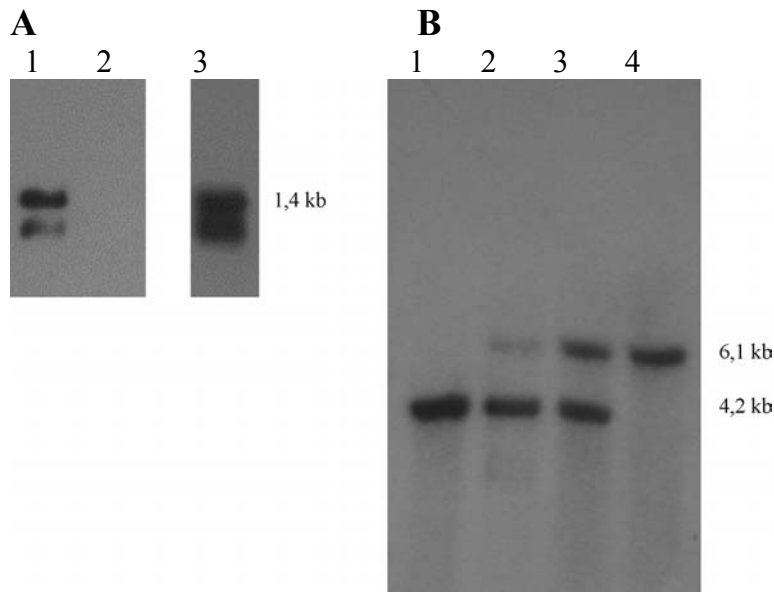


Abb. V-7: PCR-Analyse und Southern-Blots genomischer ES-Zell- und Maus-DNA.

In **A** ist die PCR-Analyse genomischer ES-Zell-DNA abgebildet. Die amplifizierten Fragmente wurden mit der Eco-Not-Sonde hybridisiert, die mit dem ECL-System nachgewiesen wurde. Beide Bilder stammen von der gleichen Membran und sind unterschiedlich lang belichtet (Bahn 1 und 2: 5 min; Bahn 3: 10 s). In Bahn 1 wurde eine PCR aufgetragen, in der der p1005-Vektor als Template diente. Diese Reaktion diente als Positivkontrolle. In Bahn 2 diente ES-Zell-DNA als Template, in der keine homologe Rekombination stattgefunden hatte. In der Reaktion, die in Bahn 3 aufgetragen wurde, wurde genomische DNA des Klons 4C5, in der die gewünschte Rekombination stattgefunden hatte, als Template benutzt. Zusätzlich zu der erwarteten 1,4 kb Bande war eine kleinere Bande zu erkennen, die wahrscheinlich ein Nebenprodukt der PCR ist. **B** zeigt die Autoradiographie eines Southern-Blots, bei dem die genomische DNA mit HindIII gespalten und mit Sonde 7 nachgewiesen wurde. Nach der korrekten homologen Rekombination konnte in der genomischen ES-Zell-DNA von Klon 4C5 (Bahn 2) und genomischer DNA heterozygoter Mäuse (Bahn 3) sowohl das 4,2 kb-Fragment als auch das 6,1 kb-Fragment nachgewiesen werden. Genomische DNA aus WT-Tieren zeigte nur das 4,2 kb-Fragment (Bahn 1) und DNA aus homozygoten Tieren nur das 6,1 kb-Fragment (Bahn 4).

V.1.4.4. Southern-Blot Analyse der ES-Zell-Klone mit der putativ richtigen homologen Rekombination

Die vorläufigen Ergebnisse, die die PCR-Analyse geliefert hatte, sollten durch Southern-Blot Analyse bestätigt werden. Dazu wurden 10 µg genomischer ES-Zell DNA mit HindIII (100 Units) gespalten und das Fragment, dessen Größe sich durch die homologe Rekombination verändert hatte, mit Sonde 7 nachgewiesen (siehe Abb. V-6). Die Sonde wurde durch PCR synthetisiert (Primer: mgf 689 und 1002/10480R). Als Template für diese PCR diente der p1005-Vektor.

In dem unveränderten Allel ist das DNA-Fragment, das durch die Sonde markiert wird, etwa 4,2 kb groß. Nach erfolgreicher homologer Rekombination ist das entsprechende DNA-Fragment dagegen etwa 6,1 kb groß. Ein exemplarischer Southern-Blot ist in Abb. V-7 dargestellt.

Zwei Klone (4C5 und 4H11) zeigten nach der Southern-Blot Analyse die erwarteten Signale.

V.1.4.5. Sequenzierung des homolog rekombinierten genomischen DNA-Abschnitts

Eine weitere Kontrolle der korrekten homologen Rekombination war die Sequenzierung des rekombinierten Teils der genomischen DNA. Dazu wurde ein Teil der genomischen DNA des ES-Zell Klons 4C5 mittels PCR amplifiziert (Abb. V-6, Primer: 5': mg Exon4 for; 3': TVneo1 rev) und mit dem Vektor TOPOII (Invitrogen) ligiert. Nach Transformation in *E.coli* und Restriktionsanalyse der daraus resultierenden Plasmid-DNA wurde der amplifizierte DNA-Abschnitt komplett sequenziert. Die Sequenzen zeigten, dass die homologe Rekombination, ausgehend von der Integrationsstelle am 5'-Ende, wie gewünscht erfolgt war.

V.1.4.6. Zucht der γ /eFC-Mauslinie

ES-Zellen von Klon 4C5 wurden in C57 Black/6 (C57 Bl/6) Blastocysten injiziert, die in den Uterus pseudoschwangerer Mausweibchen des Stammes C57 Bl/6 implantiert wurden. Die Injektion und Implantation wurde von Dr. Frank Zimmermann (ZMBH, Heidelberg) durchgeführt.

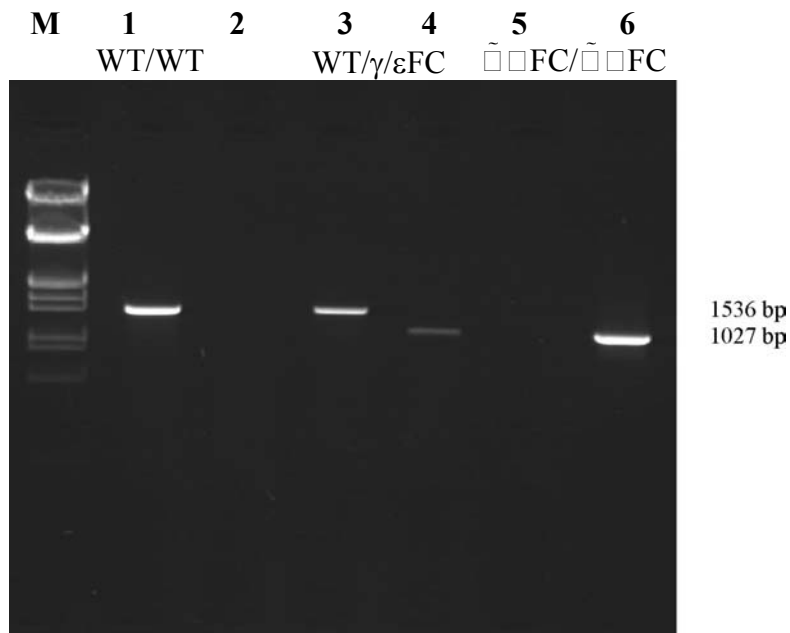


Abb. V-8: Genotypisierung der Tiere der γ/ϵ FC-Linie mittels PCR.

Genomische DNA aus Schwanzbiopsien wurde in je zwei PCRs amplifiziert und die Reaktion auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Wurde die PCR mit genomischer DNA eines WT-Tieres durchgeführt, ist nur in der Reaktion mit den für das WT-Allel spezifischen Primern (Bahn 1, Größe 1536 bp) und nicht mit den für das γ/ϵ FC-Allel spezifischen Primern (Bahn 2) eine Amplifikation der Fragmente nachzuweisen. Wurde entsprechend genomische DNA eines heterozygoten γ/ϵ FC-Tieres als Template benutzt, erfolgte mit beiden Primerpaaren (Bahn 3 und 4) eine Amplifikation. Bei Template-DNA aus einem homozygoten γ/ϵ FC-Tier war in der Reaktion mit den WT-spezifischen Primern (Bahn 5), im Gegensatz zu der Reaktion mit den γ/ϵ FC-spezifischen Primern (Bahn 6, 1027 bp), keine Amplifikation zu erkennen (M: λ /EcoRI,HindIII-Marker).

Die injizierten Blastocysten entwickelten sich zu insgesamt 32 für das γ -Gen chimären Mäusen, von denen 27 Tiere eine hohe Chimarität zeigten. Der Grad der Chimarität konnte anhand der Fellfarbe der Tiere erkannt werden. Hochchimäre, männliche Tiere wurden mit weiblichen Wildtyp C57 Bl/6 Tieren verpaart. Aus diesen Verpaarungen gingen für das homolog rekombinierte Allel heterozygote γ/ϵ FC-Männchen und Weibchen hervor, die untereinander verpaart wurden. Aus diesen Verpaarungen gingen homozygote γ/ϵ FC-Tiere hervor, die jedoch perinatal sterben. Die Analyse der Schwanzbiopsien erfolgte mittels PCR. Eine exemplarische Analyse ist in Abb. V-8 dargestellt.

V.1.5. Phänotypische Veränderungen von Tieren der γ/ϵ FC-Linie

V.1.5.1. Phänotypische Veränderungen heterozygoter γ/ϵ FC-Tiere

Heterozygote γ/ϵ FC-Mäuse zeigten keine phänotypischen Veränderungen. Sowohl Männchen als auch Weibchen entwickelten sich normal, waren fertil und hatten keine reduzierte Lebensspanne.

V.1.5.2. Phänotypische Veränderungen homozygoter γ/ϵ FC-Tiere

Im Gegensatz zu heterozygoten γ/ϵ FC-Tieren starben homozygote γ/ϵ FC-Tiere perinatal. Bei 32 Würfen konnte nach der Geburt kein lebendes homozygotes Tier gefunden werden, obwohl die Würfe innerhalb weniger Stunden nach der Geburt kontrolliert wurden. Ein Unterschied im Aussehen von homozygoten γ/ϵ FC-Tieren zu Geschwistertieren konnte nicht festgestellt werden.

V.1.6. Morphologische Untersuchungen der γ/ϵ FC-Tiere

V.1.6.1. Nachweis der Expression der γ/ϵ P121LGFP-Untereinheit

Die korrekte Expression der γ/ϵ P121L-Untereinheit konnte durch das in die Untereinheit integrierte GFP nachgewiesen werden. Die grüne Fluoreszenz des GFP wurde an NMJ von Diaphragmen aus homozygoten Tieren untersucht. Dazu wurde das Diaphragma aus homozygoten Tieren präpariert und die AChR mit Rhodamin-gekoppeltem Bungarotoxin (Rh-Bgtx.) markiert. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des konfokalen Mikroskops.

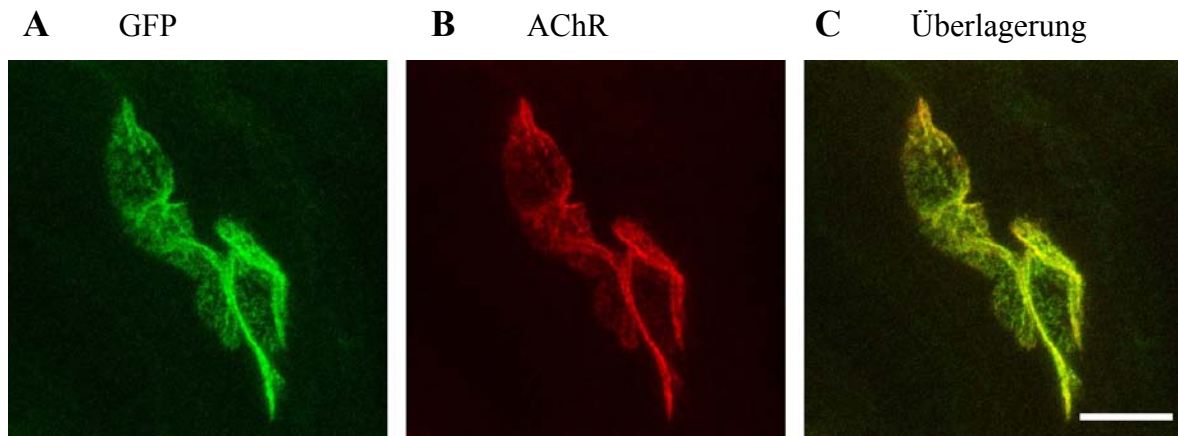


Abb. V-9: Konfokale Aufnahme von NMJ aus einem P0 homozygoten γ/ϵ FC-Tier.

Die AChR des Diaphragmas eines P0 homozygoten γ/ϵ FC-Tieres wurde mit Rh-Bgtx. markiert und mit dem konfokalen Mikroskop analysiert. **A** zeigt die grüne Fluoreszenz des GFP, das in die γ/ϵ -Untereinheit integriert ist und die Struktur der NMJ erkennen lässt. Die rote Fluoreszenz in **B** zeigt die mit Rh-Bgtx. gefärbten AChR, die mit dem grünen Signal kolokalisiert sind, wie das Überlagerungsbild in **C** zeigt (Maßstab: 10 μ m).

Abb. V-9 zeigt, dass die grüne Fluoreszenz, die durch das in die chimäre γ/ϵ -Untereinheit integrierte GFP erzeugt wird, mit der roten Fluoreszenz des Rh-Bgtx. kolokalisiert ist. Das in die AChR-Untereinheit integrierte GFP ist also funktionell. Darüber hinaus beweist die grüne Fluoreszenz, dass die γ/ϵ -Untereinheit zum Zeitpunkt der Geburt exprimiert und in den AChR-Komplex integriert wird.

V.1.6.2. Das Clustering der AChR in homozygoten γ/ϵ FC-Tieren

Mit konfokalen Aufnahmen von NMJ des Diaphragmas wurde untersucht, ob die Reduktion der AChR-Aktivität einen Einfluss auf das Clustering der AChR in der NMJ hat.

Abbildung V-10 A und B zeigen konfokale Aufnahmen von NMJ aus einem WT-Tier, das am 16 Tag der Embryonalentwicklung (E16) seziiert wurde. Die mit Rh-Bgtx. nachgewiesenen NMJ dieses Tieres besitzen eine runde Form. Das Clustering der AChR in der NMJ findet statt. Die NMJ eines homozygoten γ/ϵ FC-Tieres zeigen bei E16 im Gegensatz dazu eine längliche, strichförmige Struktur (Abb. V-10 D und E). Das Clustering ist zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung nicht so weit fortgeschritten wie in den NMJ von WT-Tieren.

Vergleicht man konfokale Aufnahmen von NMJ aus P0 Tieren, zeigen sich jetzt sowohl in WT- als auch in homozygoten γ/ϵ FC-Tieren runde AChR-Cluster (Abb. V-10 C und F). Allerdings erscheinen die Cluster von WT-Tieren kompakter als die von homozygoten γ/ϵ FC-Tieren.

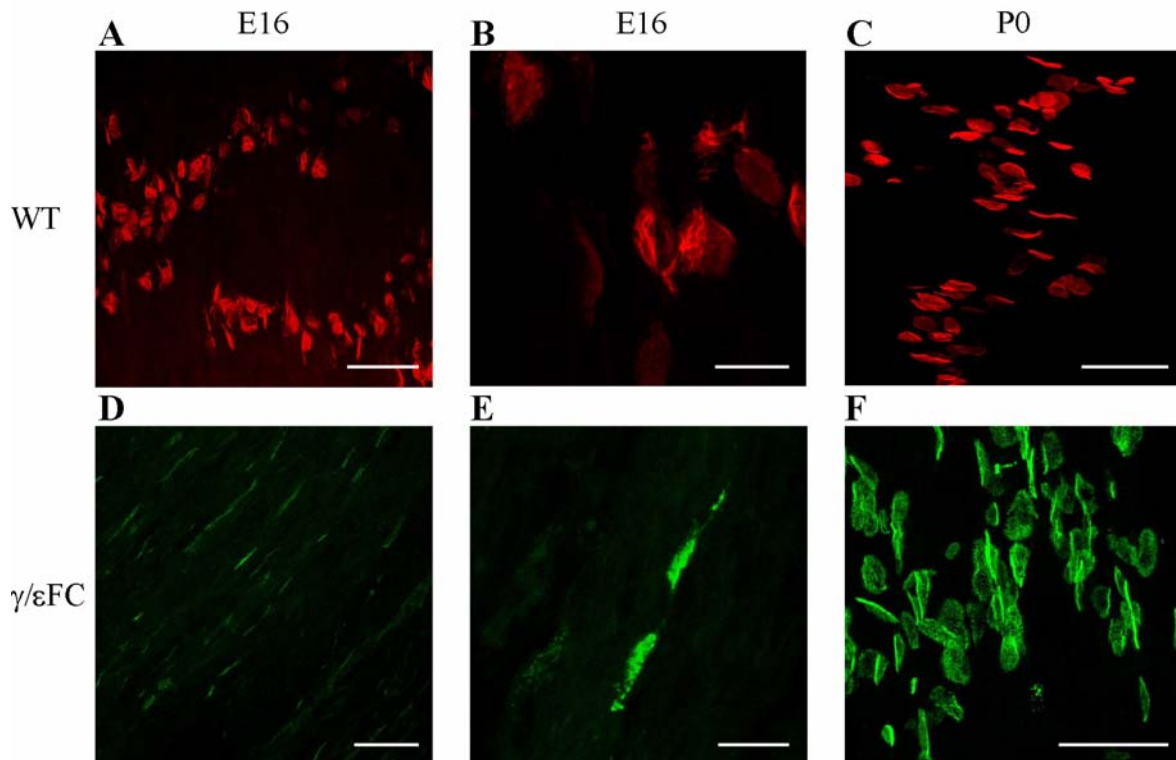


Abb. V-10: Clustering der AChR in NMJ von E16 und P0 Tieren.

Diaphragmen von WT-Tieren wurden mit Rh-Bgtx. inkubiert, um die AChR nachzuweisen (Bilder A bis C). A und B zeigen Aufnahmen von AChR aus E16 Tieren, C zeigt eine Aufnahme von AChR aus einem P0 Tier. Die AChR des γ/ϵ FC-Tieres konnten durch das integrierte GFP in Diaphragmen von E16 Tieren direkt nachgewiesen werden (D und E). Diaphragmen von P0 homozygoten γ/ϵ FC-Tieren wurden zur Verstärkung des GFP-Signals mit Fluorescein-Bgtx. inkubiert (F) (Maßstab: 100 μ m in A und D; 10 μ m in B und E; 50 μ m in C und F).

V.1.6.3. Nervenwachstum im Diaphragma homozygoter γ/ϵ FC-Tiere

Die Motoraxone wurden mit Hilfe von Antikörpern gegen Neurofilament dargestellt. Für Diaphragmen aus WT-Tieren wurde ein Fluorescein-gekoppelter und für Diaphragmen aus γ/ϵ FC-Tieren ein Rhodamin-gekoppelter Zweitantikörper benutzt. Die Bilder wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops aufgenommen.

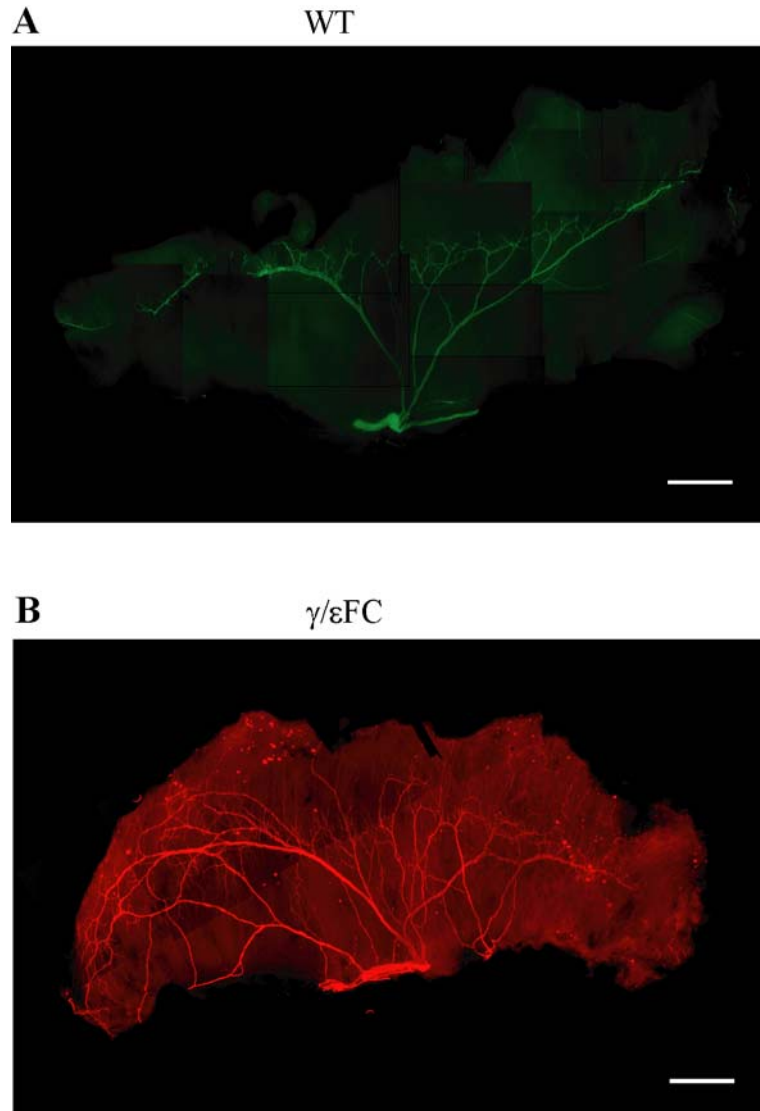


Abb. V-11: Aufnahmen von Hemidiaphragmen aus P0 Mäusen.

Motoraxone wurden mit Neurofilament-Antikörpern markiert. **A** zeigt die Gesamtansicht eines Hemidiaphragmas aus einem P0 WT-Tier, der Zweitantikörper war mit grünem Fluorescein gekoppelt. **B** zeigt ein Hemidiaphragma aus einem homozygoten γ/ϵ FC-Tier (P0). Hier wurde ein mit Rhodamin gekoppelter Zweitantikörper benutzt. Der Vergleich der beiden Hemidiaphragmen zeigt deutlich das ungerichtete Wachstum der Motoraxone im Diaphragma des homozygoten γ/ϵ FC-Tieres (Maßstab: 500 μ m).

Vergleicht man das Wachstum der Motoraxone, zeigt sich, dass sie in homozygoten γ/ϵ FC-Tieren über eine größere Fläche wachsen und nicht auf den medianen Teil des Diaphragmas beschränkt sind wie bei WT-Tieren (Abb. V-11). In Diaphragmen aus WT-Tieren sind die Motoraxone geordnet angelegt. Von den beiden Hauptnervensträngen gehen mehrere Nebennervenstränge ab, die sich verästeln, um die NMJ am synaptischen Band zu innervieren. In Diaphragmen von homozygoten γ/ϵ FC-Tieren sind keine Hauptnervenstränge

zu erkennen. Die Nerven verzweigen sich extrem stark und das Nervenwachstum sieht ungeordnet und ungerichtet aus.

V.1.6.4. Lokalisierung der AChR im Diaphragma

Die Lokalisierung der AChR wurde mit Hilfe von ^{125}I - α -Bgtx. durchgeführt, das mit Hilfe des Phosphoimagers visualisiert und gemessen wurde. Die AChR der NMJ sind in P0 WT-Tieren etwa in der Mitte des Diaphragmas, im synaptischen Band, lokalisiert (Abb. V-12 A). Im Gegensatz dazu ist das synaptische Band auf Diaphragmen von P0 homozygoten γ/ϵ FC-Tieren nicht zu erkennen. Es findet also keine messbare Konzentration der AChR im synaptischen Band statt (Abb. V-12 B).

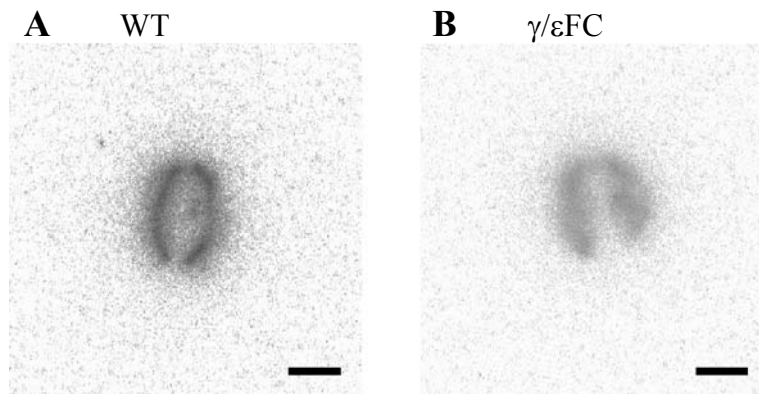


Abb. V-12: Lokalisierung der AChR in Diaphragmen von P0 Tieren.

A zeigt die Autoradiographie eines mit ^{125}I - α -Bgtx. markierten Diaphragmas aus einem P0 WT-Tier. Das zentrale synaptische Band ist deutlich zu erkennen. In der autoradiographischen Darstellung des Diaphragmas aus dem P0 homozygoten γ/ϵ FC-Tier (B) ist das synaptische Band nicht zu erkennen (Maßstab in A und B: 1 cm).

V.1.7. Transkriptionsanalysen

V.1.7.1. Transkription der mRNA der γ - und γ/ε -Untereinheit in Muskeln von WT- und homozygoten γ/ε FC-Tieren

Mit Hilfe von RT-PCR sollte gezeigt werden, dass in WT-Tieren nur die γ -Untereinheit und in homozygoten γ/ε FC-Tieren nur die γ/ε -Untereinheit als mRNA vorhanden ist.

Als Template-DNA diente cDNA, die durch reverse Transkription aus mRNA synthetisiert worden war. Die mRNA wurde aus den Beinmuskeln eines P0 WT- und eines P0 homozygoten γ/ε FC-Tieres isoliert.

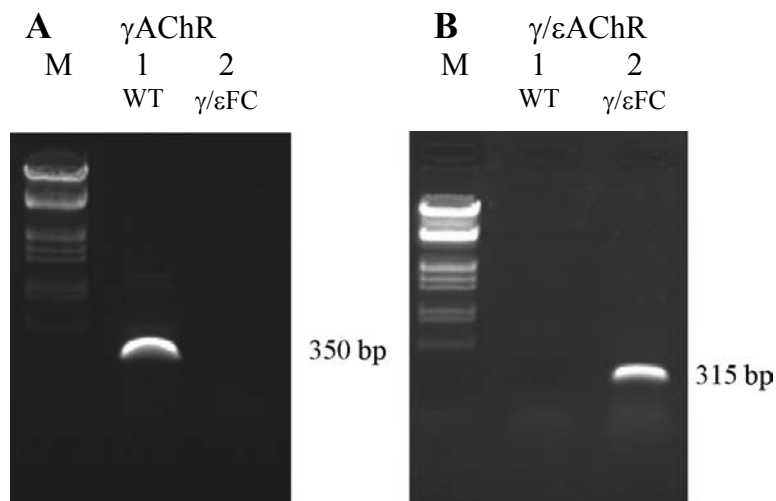


Abb. V-13: RT-PCR-Nachweis der mRNA der γ AChR- und γ/ε AChR-Untereinheit in Muskeln von P0.

A zeigt ein Agarosegel, der RT-PCRs, bei denen die für die γ -Untereinheit spezifischen Primer benutzt wurden, (Primer: mg F 187, mg R 536; Bahn 1: WT; Bahn 2: homozygot γ/ε FC). Nur in Muskeln von WT-Tieren lässt sich das erwartete 350 bp große DNA-Fragment nachweisen. Wurden für die RT-PCR Primer benutzt, die die γ/ε -Untereinheit nachweisen (Primer: g/e 241 for, mg/e 555 rev), ist nur in der RNA-Probe aus Muskeln von homozygoten γ/ε FC-Tieren das erwartete 315 bp große Fragment nachzuweisen (M: λ /EcoRI,HindIII-Marker).

Wie in Abb. V-13 gezeigt wird, konnte in Muskeln von WT-Tieren nur mRNA nachgewiesen werden, die für die γ -Untereinheit codiert. γ/ε -mRNA konnte in Muskeln dieser Tiere nicht nachgewiesen werden. Muskeln von homozygoten γ/ε FC-Tieren enthielten dagegen keine γ -mRNA sondern nur γ/ε -mRNA.

V.1.7.2. Semiquantitative Analyse verschiedener mRNA-Mengen in Muskeln von homozygoten γ/ϵ FC-Tieren

Mit Hilfe von RT-PCR wurde Gesamt-mRNA, die aus Muskeln von P0 Tieren isoliert worden war, quantitativ analysiert. Um sicherzustellen, dass alle Proben vergleichbare Mengen Gesamt-mRNA besitzen, wurden Reaktionen mit Primern für GAPDH als Mengenstandard durchgeführt. Eventuelle Abweichungen der eingesetzten mRNA-Menge wurden mit Hilfe des Mengenstandards umgerechnet.

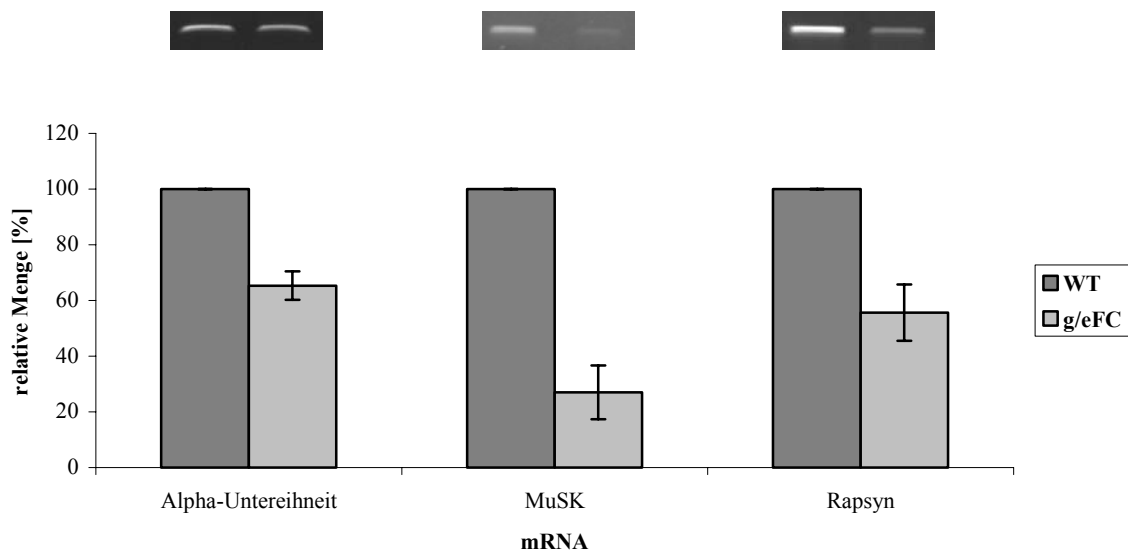


Abb. V-14 Semiquantitative Analyse der Expression verschiedener mRNAs von P0 Tieren.

RT-PCR-Analysen wurden mit RNA durchgeführt, die aus Beinmuskeln von P0 Tieren isoliert worden war. Die relative Menge an GAPDH-mRNA wurde in jeder Probe bestimmt, um sicherzustellen, dass in allen Proben die gleiche Menge Gesamt-mRNA vorhanden war. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der relativen DNA-Menge, die mittels RT-PCR amplifiziert und über Agarosegelelektrophorese getrennt wurden ($n = 3$). Die Gele wurden digital fotografiert und die Fluoreszenzintensität der amplifizierten PCR-Fragmente quantifiziert. In den Reaktionen wurden mit spezifischen Primern die α -Untereinheit, MuSK und Rapsyn-mRNAs nachgewiesen. Dunkle Balken geben die relative Menge mRNA aus Muskeln des WT-Tieres an, diese Messwerte wurden als 100% angenommen. Helle Balken geben die Messwerte der relativen mRNA-Mengen aus dem homozygoten γ/ϵ FC-Tier an. Über jedem Balken ist ein exemplarischer Gelausschnitt der jeweiligen Reaktion gezeigt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die mRNA-Mengen der α -Untereinheit sowie von MuSK und Rapsyn wurden untersucht (siehe Abb. V-14).

Die Menge aller untersuchten mRNAs ist in Muskeln von homozygoten γ/ϵ FC-Tieren geringer als in Muskeln von WT-Tieren. Die Unterschiede reichen von einer Reduktion der α -Untereinheit-mRNA-Menge auf $65 \pm 5,1\%$ und Rapsyn-mRNA-Menge auf $55 \pm 10,1\%$ bis zu einer Reduktion auf $27 \pm 9,6\%$ für MuSK-mRNA.

V.1.7.3. Untersuchung der ϵ -mRNA-Menge in Muskeln homozygoter γ/ϵ FC-Tiere

Die Menge an ϵ -mRNA ist in Muskeln von P0-Tieren zu gering, um sie quantitativ analysieren zu können. Der Fehler, der bei der benutzten Methode entstehen würde, würde ein verfälschtes Bild der ϵ -mRNA-Menge ergeben. Deshalb wurde die Stärke der DNA-Bande, die bei der RT-PCR amplifiziert wurde, nur optisch untersucht. Die Primer für die PCR wurden so gewählt, dass nur mRNA, die von dem endogenen ϵ -Gen transkribiert wurde, nachgewiesen wurde, und nicht die des neu integrierten γ/ϵ FC-Gens.

Die Bandenstärke der in der RT-PCR amplifizierten DNA aus Muskeln von P0 WT- und homozygoten γ/ϵ FC-Tieren ist vergleichbar (Abb. V-15). Es konnten keine bedeutenden Unterschiede festgestellt werden.



Abb. V-15: RT-PCR zum Nachweis der ϵ -mRNA.

1% Agarosegel mit RT-PCRs von Gesamt-RNA aus Muskeln von WT-Tieren (Bahn 1) und homozygoten γ/ϵ FC-Tieren (Bahn 2). In beiden Proben ist nur eine sehr schwache Bande bei 140 bp zu erkennen (M: λ /EcoRI,HindIII-Marker).

V.2. Generierung einer Mauslinie als Modell für eine Form des Slow-Channel Congenital Myasthenic Syndrome (SCCMS)

In Patienten, die an congenitaler Myasthenie leiden, konnten vor allem in der ϵ -Untereinheit zahlreiche Mutationen festgestellt werden, die für die Auslösung der myasthenischen Symptome verantwortlich gemacht werden. 1995 wurde eine weitere Punktmutation in der ϵ -Untereinheit entdeckt (Gomez and Gammack, 1995). Die dadurch bedingte Krankheit besitzt einen dominanten Erbgang und gehört in die Gruppe der Slow-Channel Congenital Myasthenic Syndromes (SCCMS). Die Punktmutation in der ϵ -Untereinheit führt zu einem einzelnen Aminosäureaustausch (Leucin 269 nach Phenylalanin, ϵ L269F) und dadurch zu einer Verlängerung der Kanaloffenzeit.

Es sollte eine Mauslinie etabliert werden, die als Modell für das SCCMS dienen kann. Diese Mauslinie sollte die ϵ L269F-Punktmutation tragen und Muskelschwäche entwickeln. An ihr können die Ursachen des SCCMS *in vivo* erforscht und Behandlungsmethoden untersucht werden. Desweiteren kann der Einfluss, den die Aktivität des AChR auf die Funktion und Struktur der NMJ in adulten Tieren hat, an diesen Tieren untersucht werden.

V.2.1. Einführung der L269F-Mutation in die ϵ -Untereinheit der Maus

Die Mutation, die dazu führt, dass Leucin 269 durch Phenylalanin ersetzt wird, basiert auf zwei Austauschen in der Nukleotidsequenz der cDNA der ϵ -Untereinheit (C884T und A886C). Beide Austausche wurden in die rekombinante ϵ -Untereinheit der Maus eingeführt. Dazu wurde das „QuickChange Mutagenesis Kit“ (Stratagene) und die Primer me L269F for und me L269F rev benutzt. Die eingeführten Sequenzänderungen wurden mittels Sequenzierung der kompletten cDNA bestätigt.

V.2.2. Einzelkanalmessungen von AChR ϵ L269F

Bevor die ϵ L269F-Untereinheit für die homologe Rekombination in die Maus benutzt wurde, musste zunächst untersucht werden, ob die Einführung der Mutation zu einer vergleichbaren Verlängerung der Kanaloffenzeit des Maus-AChR führt wie im humanen AChR.

Zur elektrophysiologischen Charakterisierung der AChR ϵ L269F wurden Einzelkanalmessungen an *X.laevis*-Oocyten durchgeführt, die mit cRNA injiziert worden

waren. Die cRNAs der einzelnen Untereinheiten wurden im Verhältnis 2:1:1:1 für α : β : δ : ϵ bzw. ϵ L269F injiziert.

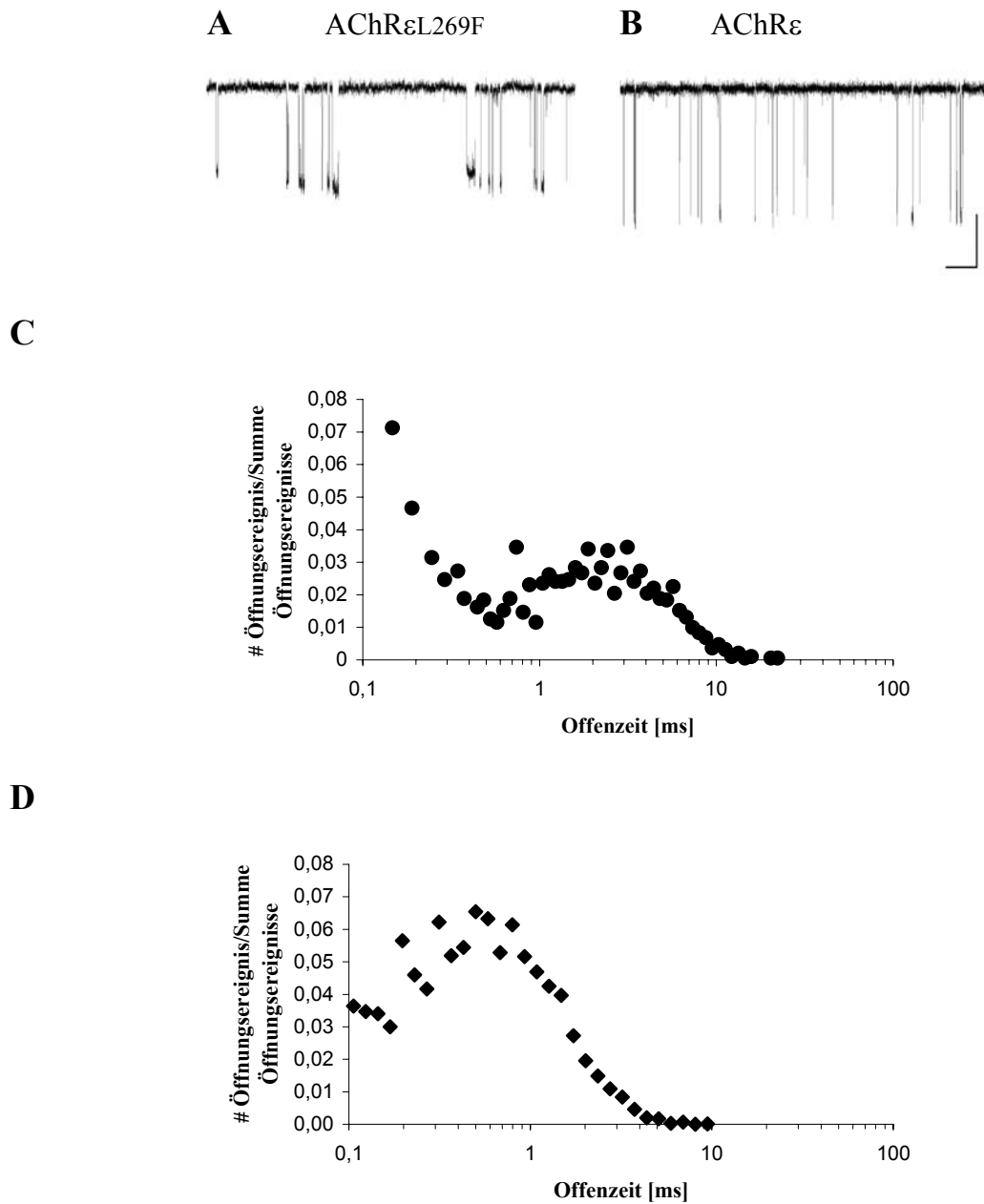


Abb. V-16: Einzelkanalmessungen der AChR an *X.laevis*-Oocyten.

Einzelkanalöffnungen des AChR ϵ L269F (**A**) und des AChR ϵ (**B**) wurden mit 1 μ M ACh aufgezeichnet. In **A** und **B** sind exemplarische Kurven von Öffnungsereignissen dargestellt, wobei ein Ausschlag nach unten die Öffnung eines Kanals bedeutet (Maßstäbe: X-Achse: 50 ms; Y-Achse: 4 pA). Die Kanaloffenzeit der AChR ϵ L269F ist im Vergleich zu der der WT-Kanäle verlängert. Statistische Auswertung der Aufzeichnungen sind in **C** für AChR ϵ L269F und **D** für AChR ϵ gezeigt. In den Diagrammen ist die Offenzeit gegen die relative Häufigkeit ihres Vorkommens aufgetragen.

Die Offenzeiten der AChR wurden mittels „cell attached single channel patch clamp“-Technik bei -70 mV und einer ACh-Konzentration von 1 μ M bestimmt.

Vergleicht man die Offenzeiten der AChR ϵ mit denen der AChR ϵ L269F (Abb. V-16 A und B) zeigt sich, dass die Offenzeiten der AChR ϵ L269F deutlich verlängert sind. Um eine genauere Darstellung einer großen Menge von Öffnungsereignissen auszuwerten, wurden die Anzahl der Öffnungsereignisse, die eine bestimmte Zeit andauern, addiert und in einem Diagramm eingezeichnet (Abb. V-16 C und D). Die Verteilung der Offenzeiten der AChR ϵ hat ihr Maximum bei etwa 0,2 bis 0,5 ms. Das Maximum der Offenzeiten, die bei AChR ϵ L269F gemessen wurden, war mit etwa 3 bis 5 ms etwa 6 bis 10 mal länger.

Es konnte gezeigt werden, dass die Maus-AChR ϵ L269F genauso wie die humanen Rezeptoren im Vergleich zu AChR ϵ eine deutlich längere Offenzeit besitzen.

V.2.3. Generierung der ϵ SC-Mauslinie

Nachdem die Ergebnisse aus den *in vitro X.laevis* Experimenten gezeigt hatten, dass die in die ϵ -Untereinheit der Maus eingeführte L269F-Mutation zu einer vergleichbaren Verlängerung der Kanaloffenzeit des AChR führt wie im Menschen, wurde die ϵ L269F-cDNA benutzt, um sie durch homologe Rekombination in das Mausgenom zu integrieren. Die Mauslinie, in deren Genom die ϵ -Untereinheit mit der L269F-Mutation eingeführt wurde, wird im Folgenden als ϵ SC-Linie bezeichnet.

V.2.3.1. Strategie und Klonierung des ϵ L269F-p ϵ GTHS1 Targetingvektors

Die homologe Rekombination der ϵ L269F-Untereinheit in das ES-Zell Genom erfolgte mit Hilfe des ϵ L269F-p ϵ GTHS1 Targetingvektors (Vgl. Abb. V-17). Der Basisvektor (p ϵ GTHS1) lag bereits im Labor vor und wurde zur Generierung anderer transgener Mauslinien wie dem ϵ -Untereinheit-Knock-Out und zwei weiterer Knock-In Mauslinien benutzt (Schwarz, H. Dissertation 1999).

Der p ϵ GTHS1 Vektor besteht aus dem pBKSII-Vektor, der mit Sall geschnitten wurde. Anschließend wurde der etwa 7 kb lange Abschnitt aus dem Mausgenom, der von XhoI-Restriktionsschnittstellen flankiert ist und auf dem das gesamte ϵ -Gen liegt, in die Sall-Schnittstellen ligiert. Sowohl die Sall- als auch die XhoI-Schnittstellen wurden dadurch zerstört. In die genomische DNA wurde über zwei NsiI-Schnittstellen das Neomycin-Resistenzgen unter der Kontrolle des PGK-Promotors inseriert, das als Selektionsmarker in den ES-Zellen fungiert.

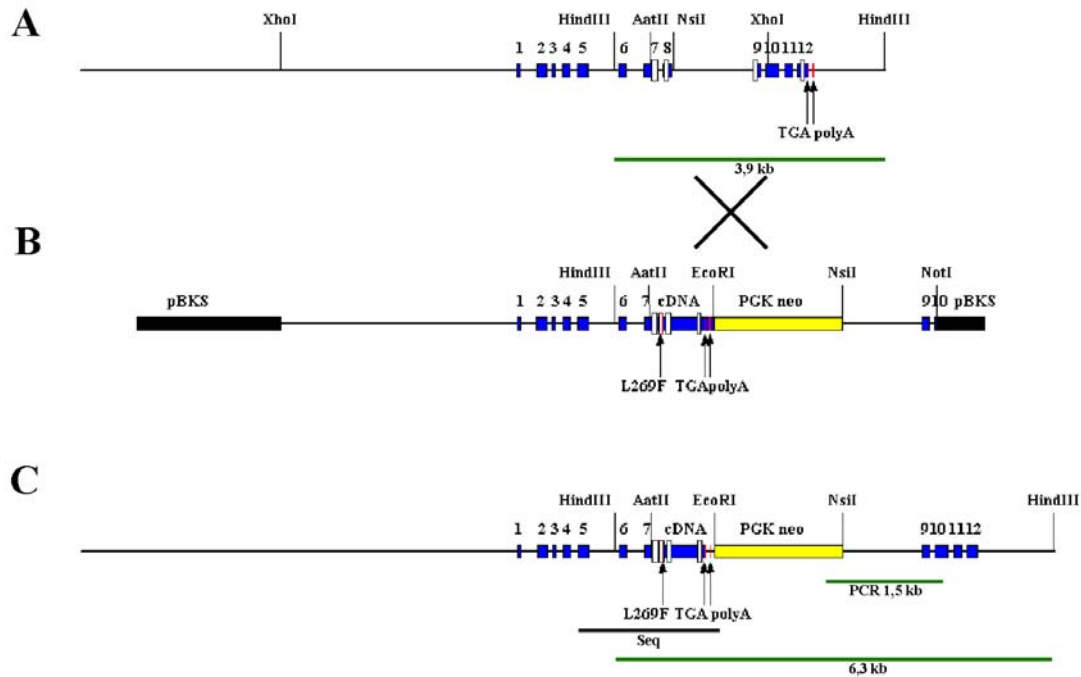


Abb. V-17: Schematische Darstellung des ϵ -Gens, des ϵ L269F-peGTHS1 Targetingvektors und des ϵ L269F-Gens nach erfolgreicher homologer Rekombination.

Das ϵ -Gen ist in **A** schematisch dargestellt. Exons 1 bis 12 sind durch blaue Kästen repräsentiert, die Transmembrandomänen durch große weiße Kästen. Die Positionen des Stopcodons (TGA) und der Polyadenylierungssequenz (polyA) sind durch Pfeile gekennzeichnet. Das bei der Southern-Blot-Analyse der mit HindIII geschnittenen genomischen DNA nachgewiesene 3,9 kb große Fragment ist grün gekennzeichnet. **B** zeigt die schematische Darstellung des ϵ L269F-peGTHS1 Targetingvektors. Die schwarzen Balken repräsentieren den pBKS-Vektor. Die ϵ -cDNA (blauer Balken) wurde zwischen die gekennzeichneten AatII- und EcoRI-Schnittstellen eingefügt und beinhaltet die L269F-Mutation, das Stopcodon und die polyA-Sequenz (durch Pfeile gekennzeichnet). Die PGK neo-Selektionskassette ist durch einen gelben Kasten dargestellt. In **C** ist das ϵ -Gen nach erfolgter homologer Rekombination dargestellt. Das bei der PCR-Analyse amplifizierte Fragment (grün) war 1,5 kb groß und wurde mit der in rot dargestellten Sonde (me5end Probe) nachgewiesen. Bei der Southern-Blot-Analyse der mit HindIII geschnittenen genomischen DNA zeigte das homolog rekombinierte Allel ein 6,3 kb großes Fragment (grün), das mit der rot dargestellten Sonde 6 nachgewiesen wurde. Der sequenzierte genomische Abschnitt (Seq) ist mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet.

In den Grundvektor pεGTHS1 wurde über eine AatII-Restriktionsschnittstelle (in Exon 7) und eine EcoRI-Schnittstelle die ϵ -cDNA eingeführt, die die L269F-Mutation trug. Dieser Teil der cDNA enthält die Exons 7 bis 12 und beinhaltet das Stop-Codon und die Polyadenylierungssequenz des ϵ -Gens.

V.2.3.2. Transfektion von ES-Zellen mit dem ϵ L269F-peGTHS1 Targetingvektor

ES-Zellen des Stammes E14-1 (Kuhn et al., 1991) (ca. 10^7) wurden mit dem ϵ L269F-peGTHS1 Targetingvektor transfiziert. Dazu wurden 30 μ g des Vektors mit NotI linearisiert, mit Hilfe des „QIAquick Purification Kit“ (Qiagen) aufgereinigt und mittels Elektroporation

transfiziert. ES-Zellen wurden mit G418 behandelt, so dass nur ES-Zell-Klone überlebten, die den Targetingvektor, und damit die Neomycinresistenz, genomisch integriert hatten.

V.2.3.3. PCR-Analyse der genomischen Maus-DNA auf korrekte homologe Rekombination

Die erste Analyse auf korrekte homologe Rekombination in den ES-Zellen erfolgte durch PCR.

Die genomische DNA aus den ES-Zellen wurde mit Hilfe des „DNeasy 96 Tissue Kit“ (Qiagen) isoliert. 25 µl der DNA-Lösung wurden mit 25 µl Reaktionsmix gemischt und in der PCR eingesetzt. Die Primer für die Reaktion wurden so gewählt, dass der 5'-Primer auf einem Teil der Targetingvektor-Sequenz und der 3'-Primer in der genomischen Sequenz lag.

25 µl der Reaktionslösung wurden auf ein 1% Agarosegel aufgetragen, über Elektrophorese getrennt und auf eine Membran geblottet. Die Spezifität der DNA-Banden wurde mit der Primersonde me5end Probe nachgewiesen (siehe Abb. V-17).

Die spezifische 1,5 kb große Bande konnte durch PCR von genomischer DNA aus 10 ES-Zell-Klonen amplifiziert werden (siehe Abb. V-18 A).

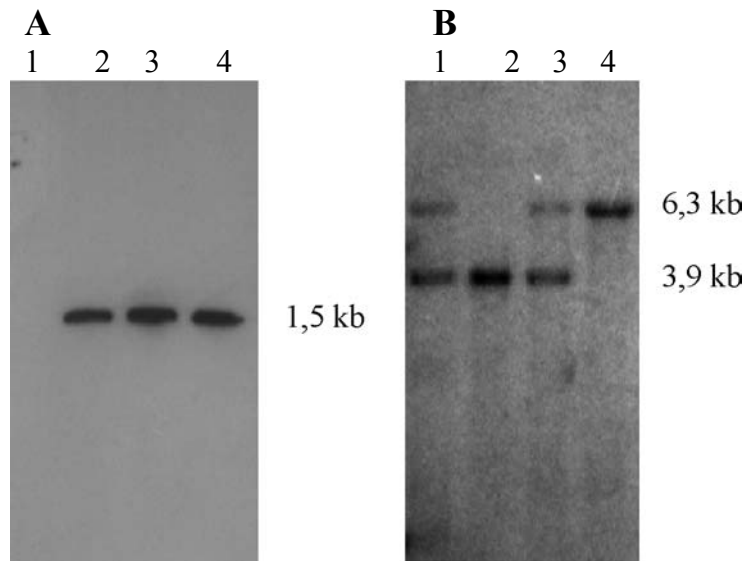


Abb. V-18: PCR und Southern-Blot Analyse genomischer ES-Zell- und Maus-DNA.

In **A** ist die PCR-Analyse genomischer DNA dargestellt. Als Template wurde in der PCR genomische DNA einer WT-Maus (Bahn 1), des ES-Zell-Klons 2C9 (Bahn 2) und eines heterozygoten und homozygoten ϵ SC-Tieres (Bahn 3 bzw. Bahn 4) benutzt. Die amplifizierten Fragmente wurden mit der Sonde me5 end probe hybridisiert und mit dem ECL-System nachgewiesen. Nur nach korrekter homologer Rekombination führte die PCR zur Amplifikation des 1,5 kb-Fragments (Bahn 2-4). Genomische DNA von WT-Tieren wurde dagegen nicht amplifiziert (Bahn 1). **B** zeigt das autoradiographische Bild eines Southern-Blots. Die mit HindIII gespaltene genomische DNA wurde mit Sonde 6 nachgewiesen. Nach der korrekten homologen Rekombination konnte in der genomischen ES-Zell-DNA von Klon 2C9 (Bahn 1) und genomischer DNA heterozygoter ϵ SC-Mäuse (Bahn 3) sowohl das 3,9 kb-Fragment als auch das 6,3 kb-Fragment nachgewiesen werden. Genomische DNA aus WT-Tieren zeigte nur das 3,9 kb-Fragment (Bahn 2) und DNA aus homozygoten Tieren nur das 6,3 kb-Fragment (Bahn 4).

V.2.3.4. Southern-Blot Analyse der PCR-positiv getesteten ES-Zell-Klone

Die Bestätigung der Ergebnisse der PCR-Analyse erfolgte durch Southern-Blot Analyse der genomischen DNA von PCR-positiv getesteten ES-Zell-Klonen.

Die 10 ES-Zell-Klone, in denen die gewünschte homologe Rekombination putativ stattgefunden hatte, wurden weiter in Kultur gehalten und vermehrt. Die genomische DNA dieser Klone wurde nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des „Blood & Cell Culture DNA Maxi“ Kits (Qiagen) isoliert. 10 μ g der genomischen DNA wurden mit 100 Units HindIII gespalten. Nach der Auftrennung der Proben auf einem 1% Agarosegel wurden sie auf eine Membran transferiert. Durch die homologe Rekombination verlängerte sich das durch Sonde 6 nachgewiesene HindIII-Fragment von 3,9 kb auf 6,3 kb. Sonde 6 wurde mit Hilfe

einer PCR synthetisiert, bei der die Primer e1458f und me 785r eingesetzt wurden. Als Template DNA diente der ϵ L269F-p ϵ GTHS1 Targetingvektor.

Die Southern-Blot Analyse ergab 1 ES-Zell-Klon (2C9), in dem die gewünschte homologe Rekombination stattgefunden hatte (siehe Abb. V-18 B).

V.2.3.5. Sequenzierung des homolog rekombinierten genomischen DNA-Abschnitts

Als letzte Versicherung der korrekten homologen Rekombination wurde ein Teil der genomischen DNA des ES-Zell Klons 2C9 sequenziert.

1,5 μ g der genomischen DNA wurden mit den Primern TVneo1 rev und me f 368 in einer PCR amplifiziert (siehe Abb. V-17). Das aus der Reaktion resultierende 2017 bp DNA-Fragment wurde nach Angaben des Herstellers in den TOPO 2.1-Vektor (Invitrogen) ligiert, *E.coli* mit dem Vektor transformiert und das Plasmid schließlich durch Mini-Präp isoliert.

Die komplette Sequenz des durch die PCR amplifizierten Fragments wurde durch Sequenzierung bestätigt.

V.2.3.6. Zucht der ϵ SC-Mäuse

ES-Zellen des Klons 2C9 wurden in C57Bl/6-Blastocysten injiziert, die in 6 pseudoschwangere C57Bl/6 Weibchen transferiert wurden. Die Injektion der ES-Zellen in die Blastocysten und der Transfer in die Mäuse wurde von der Firma BRL (Basel, Schweiz) durchgeführt. Von den 6 Weibchen wurden 10 hochchimäre Nachkommen geboren. Hochchimäre männliche Nachkommen wurden mit C57Bl/6 WT-Weibchen verpaart, die heterozygote ϵ SC-Tiere hervorbrachten. Heterozygote ϵ SC-Tiere konnten untereinander verpaart werden, so dass homozygote ϵ SC-Tiere erhalten wurden.

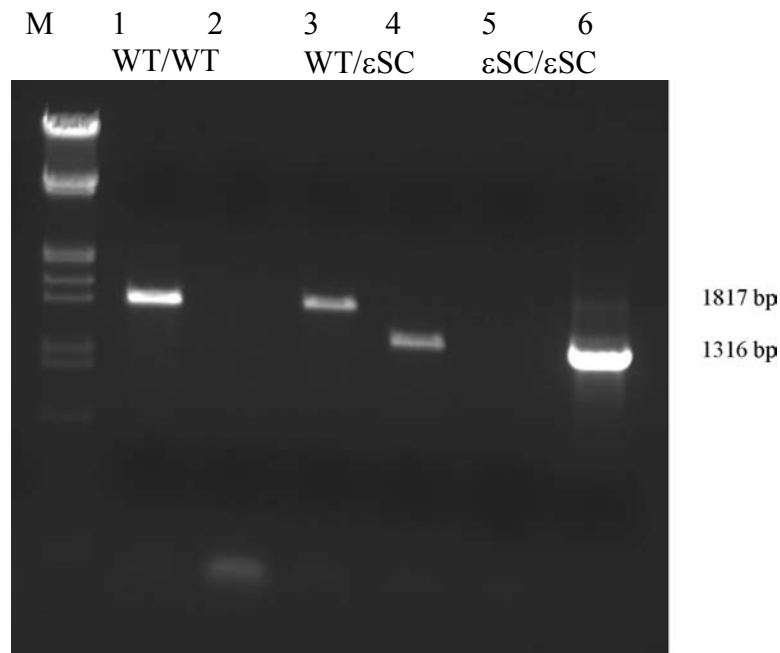


Abb. V-19: Genotypisierung der Tiere der εSC-Linie mittels PCR.

Genomische DNA aus Schwanzbiopsien wurde in je zwei PCRs eingesetzt und die Reaktion auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Wurde die PCR mit genomischer DNA eines WT-Tieres durchgeführt, ist nur in der Probe mit den für das WT-Allel spezifischen Primern (Bahn 1, 1817 bp) und nicht mit den für das εSC-Allel spezifischen Primern (Bahn 2) eine Amplifikation der Fragmente nachzuweisen. Wurde entsprechend genomische DNA eines heterozygoten εSC-Tieres als Template benutzt, erfolgte mit beiden Primerpaaren (Bahn 3 und 4) eine Amplifikation. Bei Template-DNA aus einem homozygoten εSC-Tier war bei einer Reaktion mit WT-spezifischen Primern (Bahn 5), im Gegensatz zu der Reaktion mit εSC-spezifischen Primern (Bahn 6, 1316 bp), keine Amplifikation zu erkennen (M: λ /EcoRI,HindIII-Marker).

Das Verhältnis der Nachkommen aus Verpaarungen heterozygoter Mäuse war WT: homozygot: heterozygot 100:155:94 (n = 349). Der Genotyp wurde mittels PCR bestimmt, bei der genomische DNA aus Schwanzbiopsien als Template fungierte. Exemplarische Reaktionen sind in Abb. V-19 dargestellt.

V.2.4. Einzelkanalmessungen an Mausmuskeln von homozygoten ϵ SC-Tieren

Die Einzelkanalmessungen wurden an Fußmuskeln der Hinterbeine von homozygoten ϵ SC-Tieren durchgeführt. Sie zeigen, dass homozygote ϵ SC-Tiere über funktionelle Kanäle verfügen, (siehe Abb. V-20). Diese Untersuchungen sind der direkte Beweis, dass die Expression des durch homologe Rekombination veränderten ϵ -Gens zu einer funktionellen ϵ -Untereinheit führt, die in den AChR-Komplex integriert wird. Weitere elektrophysiologische Untersuchungen, die Aufschluss über die endgültige Verlängerung der Kanaloffenzeit geben, sind in Vorbereitung.



Abb. V-20: Aufzeichnungen von Einzelkanalmessungen aus Mausmuskeln.

Die Einzelkanalmessungen wurden an AChR von vereinzelt Mausmuskelfasern durchgeführt. Die gezeigte Aufzeichnung wurde an Rezeptoren aus Muskelfasern eines homozygoten ϵ SC-Tieres (P12) gemacht (Maßstab: horizontal 500 ms, vertikal 6pA). Die Öffnungseignisse der Rezeptoren werden durch Ausschläge nach unten repräsentiert.

V.2.5. Phänotypische Untersuchungen von Tieren der ϵ SC-Linie

V.2.5.1. Phänotypische Merkmale heterozygoter ϵ SC-Tiere

Heterozygote ϵ SC-Tiere zeigten im Vergleich zu WT-Tieren keine phänotypischen Veränderungen. Sie wurden normal geboren, waren fertil und zeigten keine erhöhte Mortalitätsrate. Während der postnatalen Entwicklung zeigten sie im Vergleich zu WT-Tieren keine Veränderung im Bezug auf Gewicht- oder Kraftzunahme (siehe Abb. V-22 und V-23). Auch konnten keine Veränderungen der heterozygoten Tiere im Bezug auf Merkmale wie Gestalt oder Verhalten festgestellt werden.

V.2.5.2. Phänotypische Merkmale homozygoter ϵ SC-Tiere

Homozygote ϵ SC-Mäuse wurden normal geboren und zeigten während der frühen postnatalen Entwicklung auch keine phänotypischen Unterschiede zu heterozygoten ϵ SC- oder WT-Geschwistern. Ab etwa P15 konnten jedoch phänotypische Veränderungen festgestellt werden.

V.2.5.3. Körperliche Veränderungen homozygoter ϵ SC-Tiere

Homozygote ϵ SC-Tiere zeigten eine Reihe körperlicher Veränderungen. Ab etwa P17 gaben homozygote Tiere bei körperlichen Anstrengungen und Aufregung einen zwitschernden Ton von sich, der sich bei anhaltender Anstrengung zu einer Art Schnappatmung steigerte und zum schnellen Ermüden der Tiere führte. Eine weitere phänotypische Veränderung homozygoter ϵ SC-Tiere war die Ausbildung eines Buckels (siehe Abb. V-21), der in der späteren postnatalen Entwicklung auftrat. Diese Symptome wurden mit steigendem Alter der Tiere ausgeprägter.



Abb. V-21: Adulte homozygote ϵ SC-Maus.

Adulte, homozygote ϵ SC-Mäuse zeigten körperliche Veränderungen. Sie haben Probleme bei der Atmung und bilden einen Buckel aus.

V.2.5.3.1. Körpergewichtsmessung der Mäuse während der postnatalen Entwicklung

Während der postnatalen Entwicklung wurde das Gewicht von homozygoten und heterozygoten ϵ SC- und von WT-Tieren gemessen. Die Messungen wurden von P15 bis P50 jeden Tag und von P50 bis P71 einmal in der Woche durchgeführt (siehe Abb. V-22).

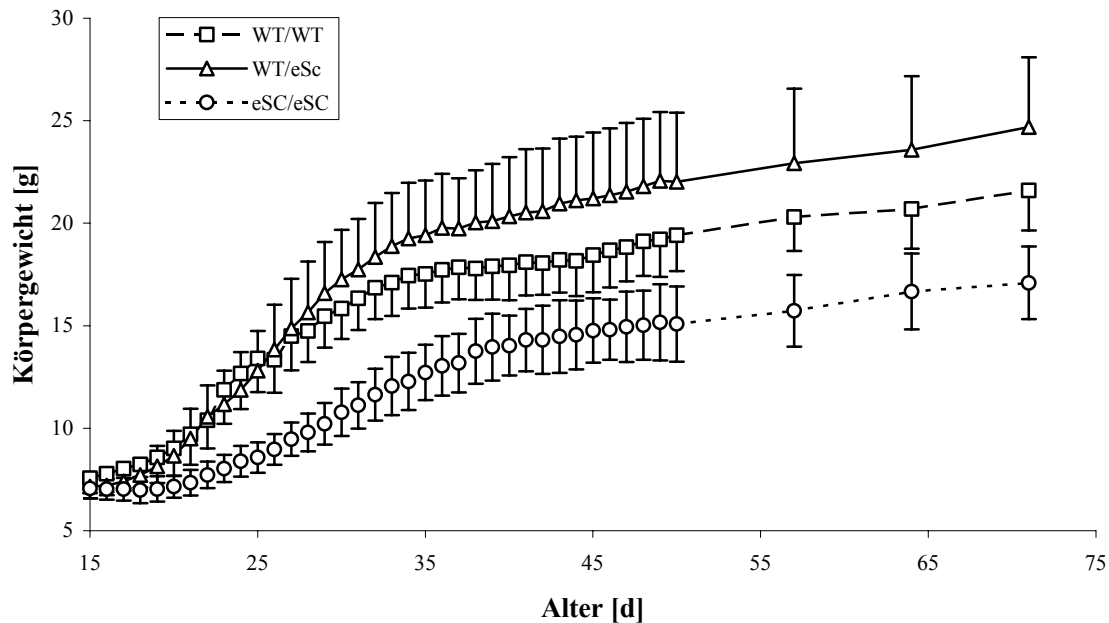


Abb. V-22: Körpergewicht von WT-, heterozygoten und homozygoten ϵ SC-Tieren während der postnatalen Entwicklung.

Das Gewicht der Tiere wurde zwischen P15 und P50 täglich und zwischen P50 und P71 wöchentlich bestimmt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte des Körpergewichts von homozygoten ϵ SC-Tieren (je 7 Weibchen und Männchen, Kreise, gepunktete Linie), 14 heterozygoten ϵ SC-Tieren (je 7 Weibchen und Männchen, Dreiecke, gestrichelte Linie) und WT-Mäusen (7 Weibchen, 5 Männchen, Quadrate, durchgezogene Linie). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Bei P15 war das Gewicht der drei untersuchten Gruppen ungefähr gleich (7,1 bis 7,6 g). Die Gewichtszunahme von heterozygoten ϵ SC- und WT-Tieren war ähnlich. Von P15 bis P35 konnten tägliche durchschnittliche Gewichtszunahmen von bis zu 1,2 g beobachtet werden. Nach P35 bis P71 stieg das Körpergewicht langsamer an, bis die Tiere durchschnittlich $21,6 \pm 1,96$ g (WT) bzw. $24,7 \pm 3,39$ g (heterozygote ϵ SC) wogen.

Bis P20 nahm das Gewicht homozygoter ϵ SC-Tiere nur um 0,1 g zu. Anschließend war bis P39 eine langsame Gewichtszunahme homozygoter ϵ SC-Tiere zu beobachten (zwischen 0,1 und 0,6 g pro Tag). Nach P39 bis P71 verlangsamte sich auch bei homozygoten ϵ SC-Tieren die Gewichtszunahme. Bei P71 wogen sie mit $17,1 \pm 1,77$ g signifikant weniger als die Kontrolltiere ($p < 0,00001$).

V.2.5.3.2. Kraftmessung der Vorderextremitäten im Verlauf der postnatalen Entwicklung
Die Ausprägung der Muskelschwäche lässt sich bestimmen, indem die Kraftzunahme der Vorderextremitäten während der Entwicklung gemessen wird. Der früheste Zeitpunkt, an dem diese Messungen durchgeführt werden können, ist P15, da jüngere Tiere sich nicht an der Versuchsanordnung festhalten können.

In Abb. V-23 sind die Ergebnisse der Kraftmessungen zwischen P15 und P71 dargestellt. Die Messungen erfolgten zwischen P15 und P50 täglich, danach wöchentlich. Die Kraftzunahme während der postnatalen Entwicklung ist bei WT-Tieren und heterozygoten ϵ SC-Tieren vergleichbar. Sie gewinnen von P15 bis etwa P45 täglich an Kraft hinzu. Dabei steigert sich die Griffstärke von etwa 0,3 N bei P15 auf etwa 1,2 N bei P45. Nach P45 bis P71 ist keine weitere bedeutende Kraftzunahme in diesen beiden Gruppen zu erkennen. Die Griffstärke schwankt zwischen P45 und P71 um etwa 1,2 N.

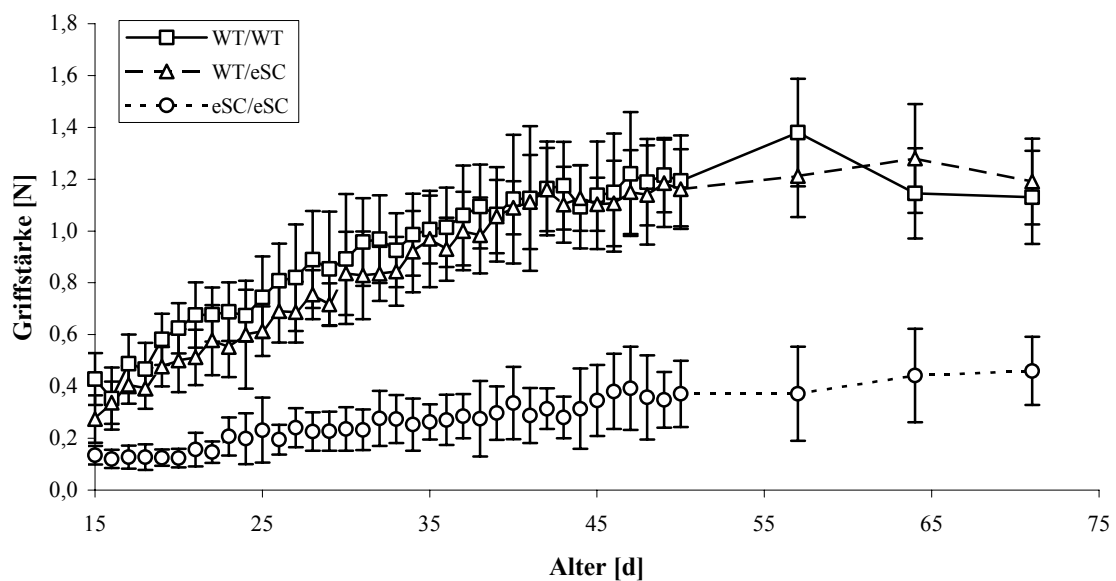


Abb. V-23: Griffstärke von WT-, heterozygoten und homozygoten ϵ SC-Tieren während der postnatalen Entwicklung.

Die Griffstärke der Tiere wurde zwischen P15 und P50 täglich und zwischen P50 und P71 wöchentlich bestimmt. Die Mittelwerte der Messungen wurden gegen das Alter der Tiere aufgetragen (WT: Quadrate, durchgezogene Linie, heterozygote ϵ SC: Dreiecke, gestrichelte Linie und homozygote ϵ SC: Kreise, gepunktete Linie). Für die Messungen wurden 12 WT- (7 Weibchen, 5 Männchen), 14 heterozygote ϵ SC- (je 7 Männchen und Weibchen) und 14 homozygote ϵ SC-Tiere (je 7 Weibchen und Männchen) benutzt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Die Griffstärke homozygoter ϵ SC-Tiere ist bereits bei P15 im Vergleich zu den beiden anderen untersuchten Gruppen signifikant reduziert ($0,14 \pm 0,036$ N; $p < 0,0001$). Während der Entwicklung nimmt die Griffstärke im Vergleich zu den Kontrolltieren langsamer zu, bis

sie bei P45 etwa 0,4 N erreicht. Bis P71 ist noch eine geringe Zunahme der Griffstärke auf etwa 0,5 N zu beobachten.

V.2.5.3.3. Messung der Geschicklichkeit und Kraft mit Hilfe des Dowel-Perch Tests

Die Geschicklichkeit und Kraft von Mäusen lässt sich bestimmen, indem die Mäuse auf ein Holzstäbchen gesetzt werden, und die Zeit gemessen wird, die sich die Tiere auf dieser Stange halten konnten (Gomez et al., 2002).

Dieser sogenannte Dowel-Perch Test wurde mit adulten Tieren (ca. P150) durchgeführt. Jedes Tier wurde dreimal hintereinander auf die Stange gesetzt. Der Versuch wurde an drei verschiedenen Tagen wiederholt. Die Ergebnisse des Dowel-Perch Tests sind in Abb. V-24 dargestellt. Homozygote ϵ SC-Mäuse können sich im Vergleich zu Kontrolltieren nur etwa 10% der Zeit auf der Stange halten.

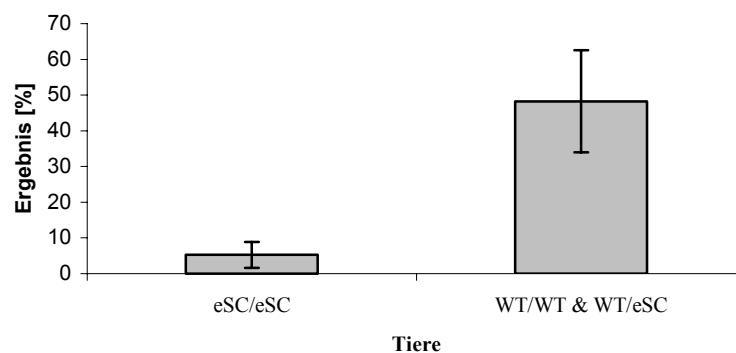


Abb. V-24: Ergebnis des Dowel-Perch Tests.

Jedes Tier wurde dreimal hintereinander auf eine Stange gesetzt. Die Zeit, die jedes Tier auf der Stange sitzen bleiben konnte, wurde gemessen und daraus das prozentuale Ergebnis ermittelt. Wenn ein Tier eine Minute auf der Stange sitzen oder von ihr herunterklettern konnte, wurde der Versuch mit 100% gewertet. Für kürzere Zeiten wurden entsprechend niedrigere Werte errechnet. Die Versuche wurden mit adulten Tieren (ca. P150) an drei Tagen wiederholt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der Ergebnisse von 14 homozygoten ϵ SC-Tieren (je 7 Männchen und Weibchen) und 16 Kontrolltieren (heterozygote ϵ SC und WT, 7 Weibchen, 9 Männchen). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

V.2.6. Morphologische Untersuchung der ϵ SC-Tiere

Die Morphologie der Muskeln und der NMJ wurde mit mehreren Methoden untersucht. Die Anzahl und Verteilung der NMJ wurde mit Hilfe der Koelle-Färbung durchgeführt, mit der die Acetylcholinesterase (AChE) nachgewiesen werden kann. Informationen über die Struktur der NMJ wurden mit immunhistochemischen Methoden und konfokaler Mikroskopie gewonnen. Um detailliertere strukturelle Untersuchungen durchführen zu können, wurde die Elektronenmikroskopie eingesetzt. Autoradiographische Methoden dienten der Quantifizierung der AChR.

V.2.6.1. Untersuchung der Dichte der NMJ durch Nachweis der Acetylcholinesterase

Die AChE wurde nachgewiesen, um die Menge und Lokalisierung der NMJ zu untersuchen. Die Analyse mit Hilfe der Koelle-Färbung wurde an Hemidiaphragmen aus P36 Mäusen durchgeführt.

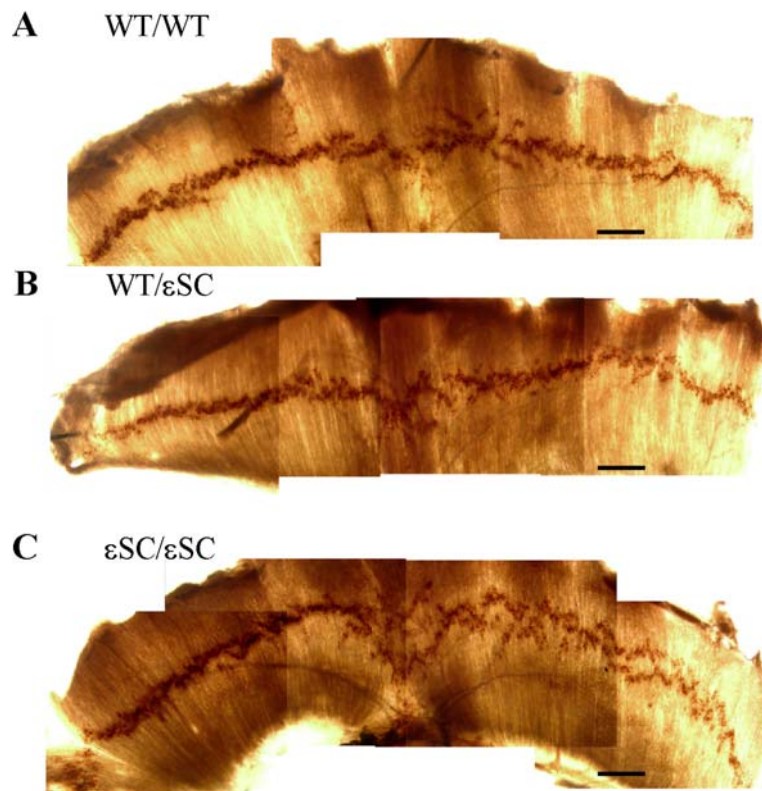


Abb. V-25: Aufnahmen von Koelle-gefärbten Hemidiaphragmen aus P36 Mäusen.

Die Abbildungen zeigen die lichtmikroskopischen Aufnahmen von Hemidiaphragmen von P36 WT (A), heterozygoten (B) und homozygoten (C) ϵ SC Mäusen. Der dorsale Teil der Diaphragmen liegt auf der linken Seite. Die AChE wurde mit Hilfe der Koelle-Färbung nachgewiesen. Der Maßstab entspricht 1 mm.

Abb. V-25 zeigt mikroskopische Aufnahmen der Hemidiaphragmen, in denen keine auffälligen Unterschiede der Menge der NMJ aus homozygoten, heterozygoten und WT-Tieren zu erkennen sind.

Eine zweite Analyse, mit der eine genauere Untersuchung der Lokalisierung von AChE möglich war, wurde mit Hilfe von Rhodamin-gekoppeltem Fasciculin durchgeführt, dem Gift der Grünen Mamba (*Dendroaspis angusticeps*). Fasciculin bindet spezifisch an AChE und kann durch die Kopplung mit Rhodamin im konfokalen Mikroskop lokalisiert werden. Abb. V-26 zeigt Ausschnitte des Diaphragmas aus einer WT- und einer homozygoten ϵ SC-Maus. Die Dichte des AChE in den NMJ ist in beiden Geweben vergleichbar.

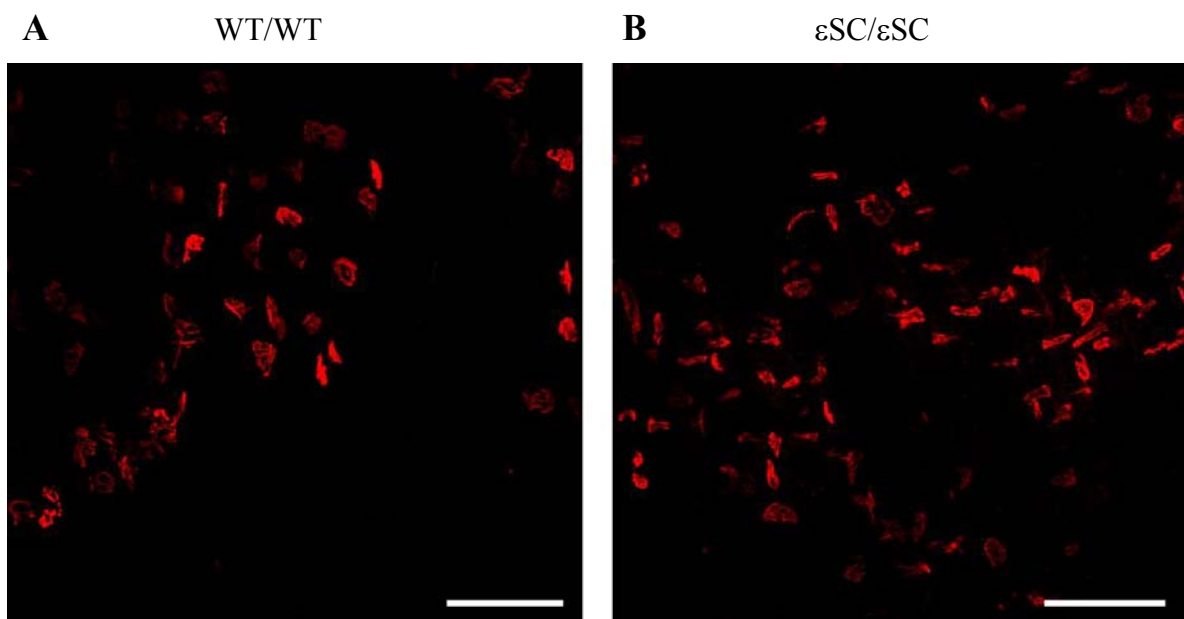


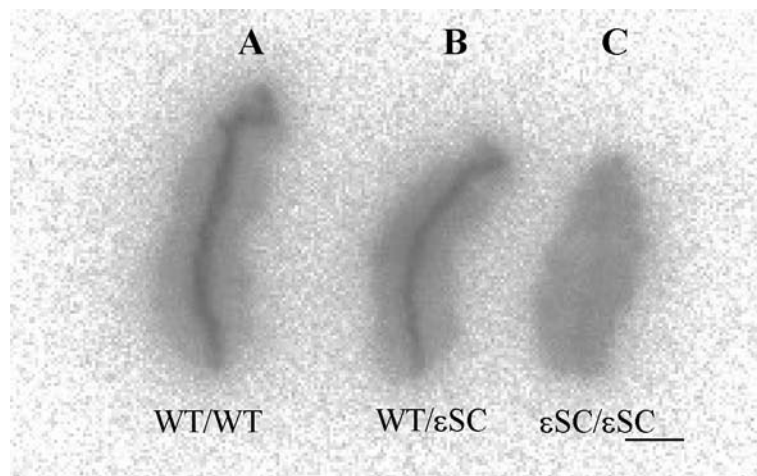
Abb. V-26: Konfokale Aufnahmen von mit Rhodamin-Fasciculin markierter AChE des Diaphragmas aus P56 Tieren.

A zeigt eine konfokale Aufnahme der Verteilung von AChE im Diaphragma einer P56 WT-Maus. **B** zeigt eine Aufnahme eines Diaphragmas aus einem P56 homozygoten ϵ SC-Tier. In **A** und **B** erkennt man, dass die AChE in der typischen Form der NMJ angeordnet ist. Sowohl die Größen der NMJ als auch die Dichte der AChE in der NMJ sind in beiden Diaphragmen vergleichbar (Maßstab: 100 μ m).

Die Ergebnisse beider Analysen zeigen, dass kein markanter Unterschied in der AChE-Menge in den NMJ von adulten WT-, heterozygoten und homozygoten ϵ SC-Tieren besteht. Auch die Anzahl und Größe der NMJ scheint nicht reduziert zu sein.

V.2.6.2. Analyse der AChR-Dichte in WT-, heterozygoten und homozygoten ϵ SC-Tieren

Die Dichte der AChR im Diaphragma konnte mit Hilfe von ^{125}I - α -Bgtx. quantifiziert werden. Schon der visuelle Vergleich zeigt, dass die AChR-Menge im Diaphragma des homozygoten ϵ SC-Tieres im Vergleich zum WT-Tier deutlich reduziert ist (siehe Abb. V-27 A bis C). Zwischen dem Diaphragma des heterozygoten ϵ SC-Tieres und dem WT-Tier besteht dagegen kein auffälliger Unterschied.



D

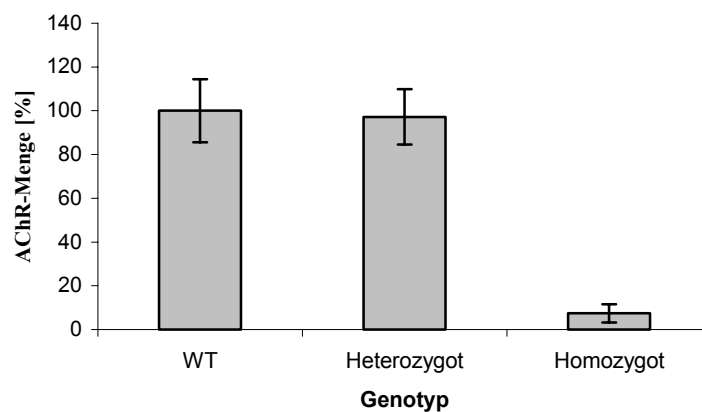


Abb. V-27: Analyse der AChR-Dichte in Diaphragmen von P49 Tieren.

A bis C zeigt Autoradiographien von Diaphragmen, deren AChR mit ^{125}I - α -Bgtx. markiert wurden. Im Diaphragma aus dem WT- (A) und heterozygoten (B) ϵ SC-Tier ist deutlich das zentral gelegene synaptische Band zu erkennen, an dem die AChR konzentriert sind. Das Diaphragma des homozygoten ϵ SC-Tieres (C) zeigt fast keine AChR-Aggregation am synaptischen Band mehr (Maßstab: 1 cm). Die Quantifizierung des gebundenen ^{125}I - α -Bgtx. (D) zeigt, dass nur noch etwa 10% der AChR im Diaphragma des homozygoten ϵ SC-Tieres vorhanden sind.

Quantifiziert man die Menge des gebundenen ^{125}I - α -Bgtx., zeigt sich, dass das Diaphragma aus der homozygoten ϵ SC-Maus nur noch etwa $10 \pm 4,2\%$ der AChR der WT- und heterozygoten ϵ SC-Tiere besitzt (siehe Abb. V-27 D).

V.2.6.3. Untersuchung der AChR-Dichte und Verteilung in der NMJ

Die Ergebnisse der AChE-Färbung am Diaphragma zeigte keine Unterschiede zwischen WT-, heterozygoten und homozygoten ϵ SC-Tieren in Bezug auf die Dichte der NMJ. Im Gegensatz dazu zeigten die Experimente, bei denen die AChR nachgewiesen wurden, eine deutlich verminderte Dichte in homozygoten, aber nicht in heterozygoten ϵ SC-Tieren. Folglich sollte in homozygoten ϵ SC-Tieren die Dichte der Rezeptoren in den einzelnen NMJ, aber nicht die Menge der NMJ reduziert sein. Um das genauer zu untersuchen, wurden die Diaphragmen mit Bungarotoxin inkubiert, an das der Farbstoff Rhodamin gekoppelt war.

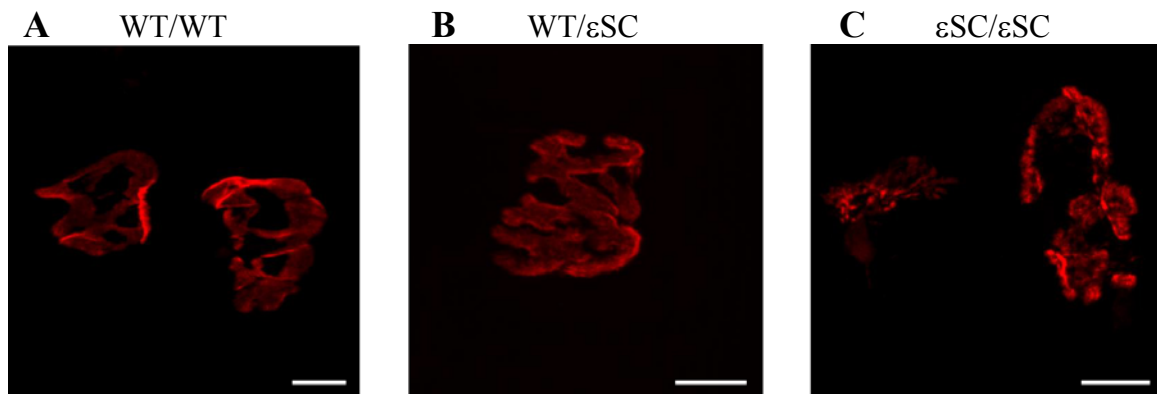


Abb. V-28: Aufnahmen von NMJ aus WT-, heterozygoten und homozygoten ϵ SC-Mäusen.

Die Aufnahmen wurden mit Hilfe des konfokalen Mikroskops an Diaphragmen aus P36 Mäusen gemacht. Die AChR wurden zuvor mit Rh-Bgtx. markiert. **A** zeigt zwei NMJ eines WT-Tieres. Die NMJ besitzen die typische Bretzel-Struktur von differenzierten NMJ. In **B** ist eine NMJ aus einem heterozygoten ϵ SC-Tier abgebildet. Weder in Größe noch Struktur sind markante Unterschiede zu der NMJ des WT-Tieres zu erkennen. **C** zeigt drei NMJ einer homozygoten ϵ SC-Maus. Die Größe der NMJ ist mit denen aus WT- und heterozygoten Tieren vergleichbar. Im Gegensatz dazu sind strukturelle Unterschiede zu erkennen. Die geschlossene Form der NMJ ist aufgebrochen, die Rezeptoren sind in nicht zusammenhängenden Clustern verteilt und ihre Dichte ist deutlich reduziert (Maßstab: 10 μm).

Zwischen NMJ aus WT- und heterozygoten ϵ SC-Tieren einerseits, und NMJ aus homozygoten ϵ SC-Tieren andererseits waren deutliche strukturelle Unterschiede zu erkennen. NMJ von WT-Tieren zeigen die typische, geschlossene Bretzel-Struktur (Abb. V-28 A). Das selbe gilt für NMJ von heterozygoten ϵ SC-Tieren (Abb. V-28 B). Im Gegensatz dazu ist diese Struktur in den NMJ aus homozygoten ϵ SC-Mäusen nicht mehr zu erkennen (Abb. V-28 C). Die geschlossene Form der NMJ ist aufgebrochen und die AChR bilden kleine, nicht

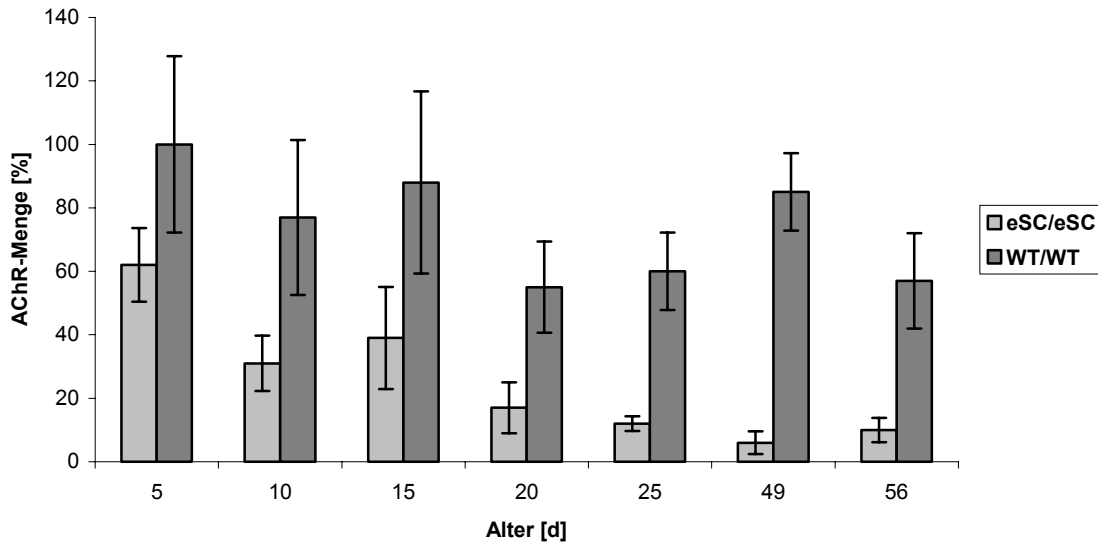
zusammenhängende Cluster. Auch die Dichte der Rezeptoren ist deutlich reduziert. Auffällige Größenunterschiede konnten zwischen den NMJ der verschiedenen Tiergruppen nicht festgestellt werden.

V.2.6.4. Vergleich der AChR-Dichte von Tieren verschiedenen Alters

Nach der Feststellung, dass homozygote ϵ SC-Tiere weniger AChR besitzen als WT-Tiere, sollte der zeitliche Verlauf der Abnahme der AChR-Dichte untersucht werden.

Dazu wurde Tieren verschiedener Altersstufen das Diaphragma entnommen und die AChR-Dichte mit Hilfe von ^{125}I - α -Bgtx. quantifiziert. In WT-Tieren ist bei P5 die Dichte der Rezeptoren am größten. Während der postnatalen Entwicklung nimmt die Dichte auf 60 bis 80% der ursprünglichen Dichte ab (siehe Abb. V-29 A). Bei homozygoten ϵ SC-Mäusen ist der Verlauf ähnlich, mit dem Unterschied, dass die Dichte der AChR stärker abnimmt und im adulten Tier nur noch etwa 15% der ursprünglichen Dichte besitzt. Dieser stärkere Abfall wird auch deutlich, wenn man die Verhältnisse der AChR-Dichte zwischen WT-Tieren und homozygoten ϵ SC-Tieren im Verlauf der Entwicklung vergleicht (siehe Abb. V-29 B). Bei P5 beträgt die Rezeptordichte in homozygoten ϵ SC-Tieren noch etwa 60% von der in WT-Mäusen. Während der Entwicklung nimmt dieser Wert ab, bis im adulten Tier die Rezeptordichte in homozygoten ϵ SC-Tieren nur noch zwischen 10% (P49) und 20% (P56) der Rezeptordichte in WT-Tieren entspricht.

A



B

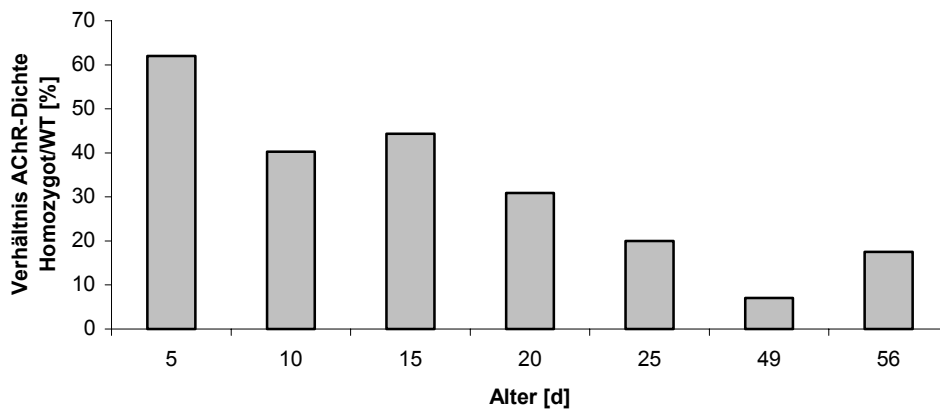


Abb. V-29: Bestimmung der AChR-Dichte in Diaphragmen von Tieren verschiedenen Alters.

In **A** sind die relativen Messwerte der AChR-Quantifizierung mit ^{125}I - α -Bgtx. gegen das Alter des Tieres, aus dem das Diaphragma entnommen wurde, aufgetragen. Der höchste absolute Wert (P5, Wildtyp) wurde auf 100% gesetzt. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Rezeptordichte nimmt sowohl in WT, als auch in homozygoten ϵ SC-Tieren im Lauf der Entwicklung ab. Die Reduktion der Rezeptoren ist während der Entwicklung in homozygoten ϵ SC-Tieren stärker ausgeprägt als in WT-Mäusen. Dies wird in **B** deutlich, wo das Verhältnis der Dichte von homozygoten ϵ SC- zu WT-Tieren gegen das Alter aufgetragen ist.

Die Reduktion der AChR während der Entwicklung konnte auch in konfokalen Aufnahmen gezeigt werden. Abb. V-30 zeigt den Vergleich der AChR-Anordnung in NMJ zwischen WT- und homozygoten ϵ SC-Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten der postnatalen Entwicklung. Bei P5 sind keine sichtbaren Unterschiede in der AChR-Dichte und Verteilung in der NMJ zu erkennen (Abb. V-30 A und B). NMJ aus homozygoten P15 ϵ SC-Tieren zeigen teilweise eine Reduktion der AChR-Dichte und Veränderungen der Anordnung (Abb. V-30 C und D). Die

Unterschiede sind zu diesem Zeitpunkt jedoch nur gering und nicht in allen NMJ homozygoter ϵ SC-Tiere zu erkennen. Während der späteren Entwicklung (P25 und P70 Abb. V-30 E bis H) werden die Unterschiede der AChR-Dichte und Anordnung zwischen WT- und ϵ SC-Tieren deutlicher. Die gleichmäßigen, kompakten Strukturen, die in NMJ von WT-Tieren diesen Alters vorhanden sind, können in NMJ entsprechender homozygoter ϵ SC-Tiere nicht beobachtet werden. Hier verteilen sich die AChR in den NMJ auf nicht zusammenhängende Cluster.

Auffällige Größenunterschiede zwischen den NMJ von WT- und homozygoten ϵ SC-Tieren konnten zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung festgestellt werden.

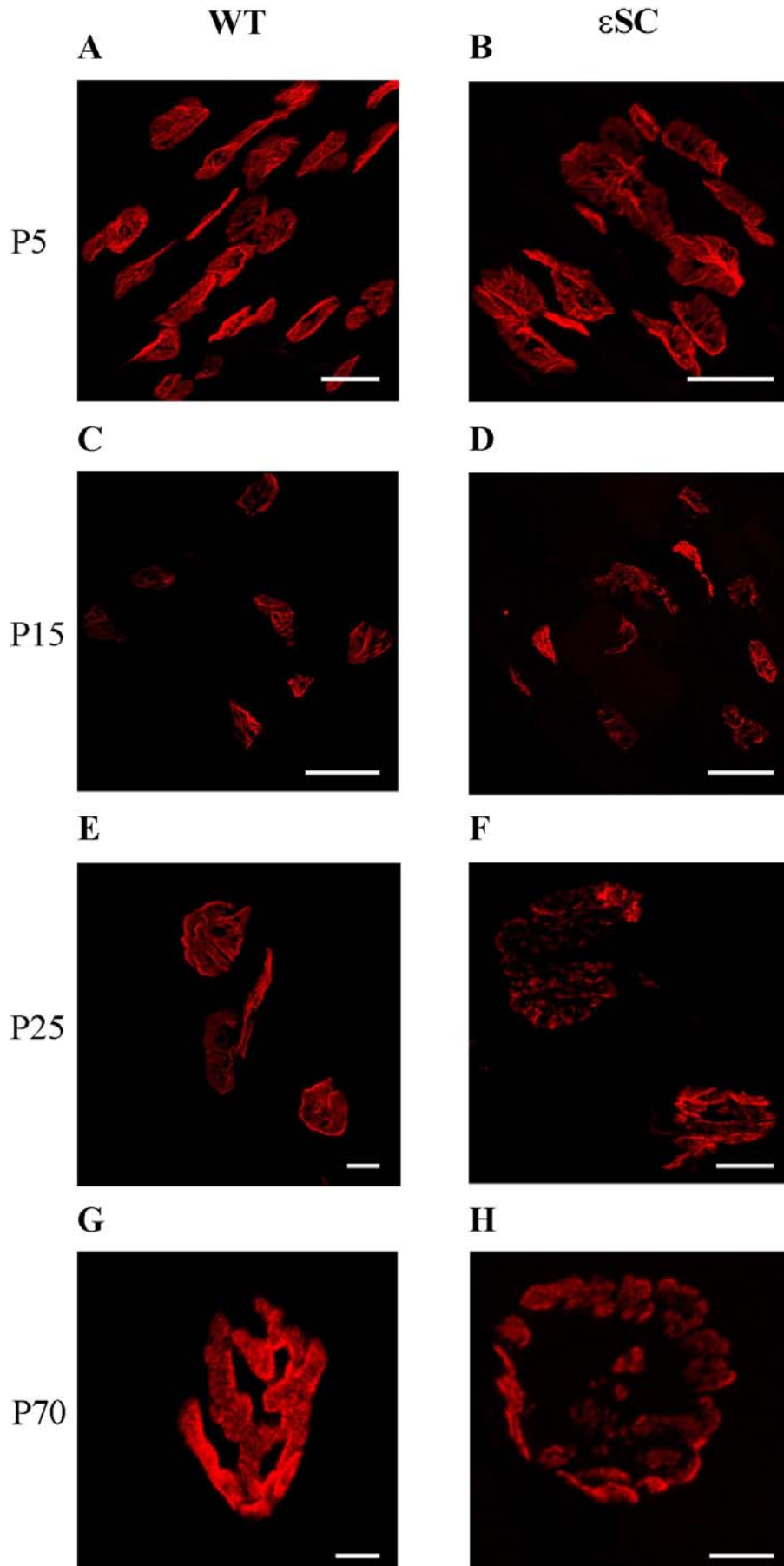


Abb. V-30: Konfokale Aufnahmen von AChR aus P5, P15, P25 und P70 Tieren. Legende siehe nächste Seite.

Legende zu Abb. V-30: AChR des Diaphragmas wurden mit Rh-Bgtx. markiert. Die Bilder zeigen die AChR von P5 (**A, B**), P15, (**C, D**), P25 (**E, F**) und P70 (**G, H**) Tieren. AChR von WT-Tieren sind in der ersten Spalte (**A, C, E** und **G**) und AChR von homozygoten ϵ SC-Tieren in der zweiten Spalte (**B, D, F** und **H**) dargestellt. Bei P5 (**A, B**) gibt es keine auffälligen Unterschiede zwischen NMJ aus WT- und homozygoten ϵ SC-Tieren. AChR-Dichte und Anordnung sind in beiden Tiergruppen ähnlich. Bei P15 (**C, D**) können in manchen NMJ bereits Unterschiede zwischen WT- und homozygoten ϵ SC-Tieren festgestellt werden. Manche NMJ von ϵ SC-Tieren zeigen eine reduzierte AChR-Dichte. Die Unterschiede zwischen den NMJ der beiden Tiergruppen werden bei P25 deutlicher (**E, F**). In WT-Tieren sind die AChR in den NMJ in der typischen „Bretzel“-Form angeordnet. In NMJ von homozygoten ϵ SC-Tieren ist die AChR-Dichte reduziert und die Rezeptoren verteilen sich in nicht zusammenhängenden Clustern. Die gleichmäßige, dichte Struktur von NMJ aus P70 WT-Tieren (**G**) ist in NMJ homozygoter ϵ SC-Tiere (**H**) nicht mehr zu erkennen (Maßstab: 50 μ m in **C, D**; 20 μ m in **A, B**; 10 μ m in **E, F**; 5 μ m in **G, H**).

V.2.6.5. Untersuchung der Innervierung der NMJ

Die Motoraxone und präsynaptischen Strukturen wurden mit Antikörpern gegen Neurofilament und gegen Synaptophysin durchgeführt, die wiederum durch fluoreszierende Zweitantikörper nachgewiesen wurden. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des konfokalen Mikroskops.

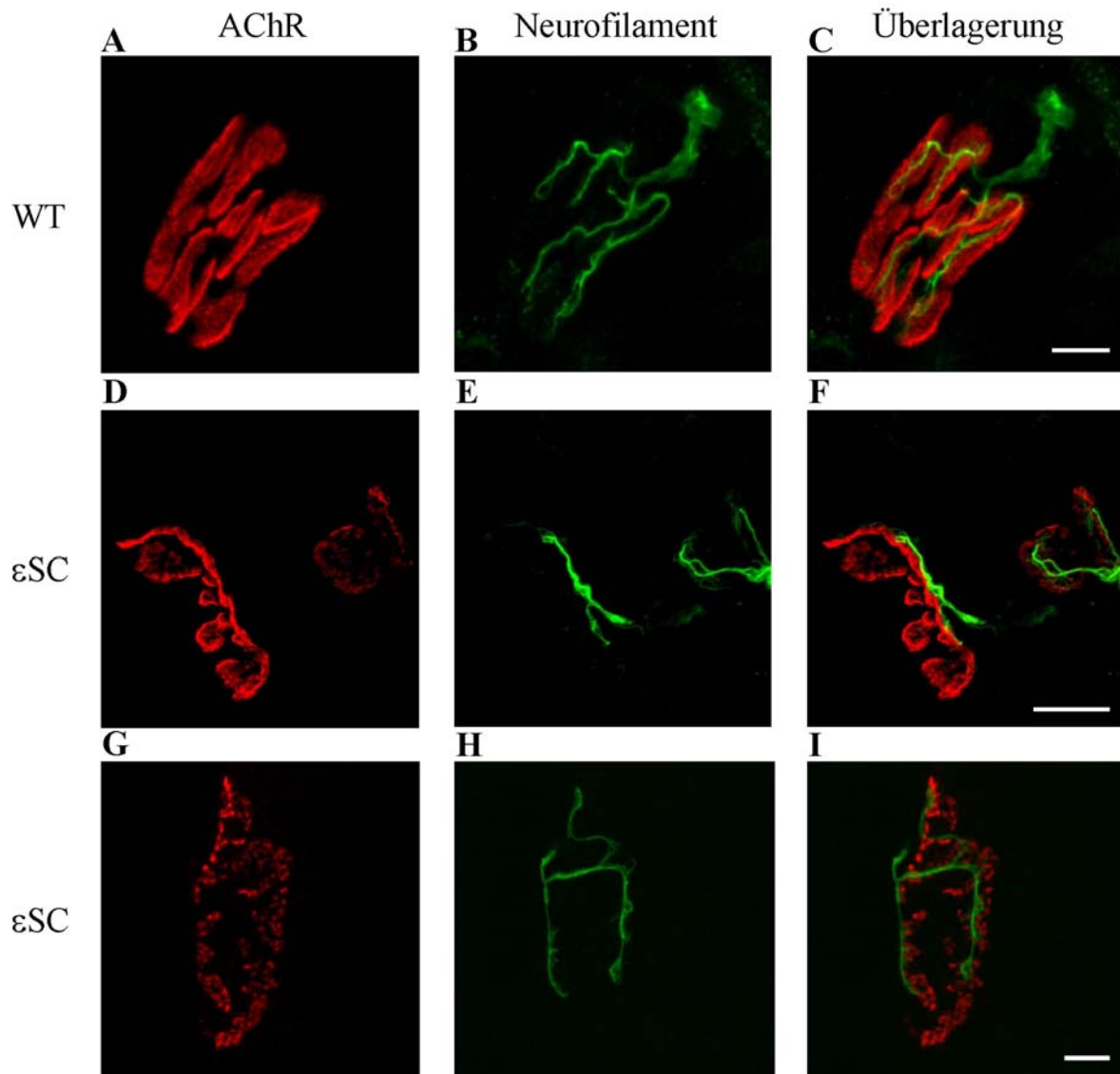


Abb. V-31: Konfokale Aufnahmen von AChR und Motoraxonen aus adulten Tieren.

AChR wurden mit Rh-Bgtx. (rot) und Neurofilament mit einem Antikörper (grün) markiert. **A bis C** zeigen die Aufnahme einer NMJ des Diaphragmas einer P70 WT-Maus, **D bis F** die Aufnahmen zweier NMJ des Diaphragmas einer P70 homozygoten ϵ SC-Maus und **G bis I** die Aufnahmen einer NMJ des Diaphragmas einer P49 homozygoten ϵ SC-Maus. Dabei sind in **A, D** und **G** die AChR im roten Kanal, in **B, E** und **H** das Neurofilament im grünen Kanal und in **C, F** und **I** das Überlagerungsbild beider Kanäle dargestellt. Homozygote ϵ SC-Tiere zeigen keine Veränderungen im Bezug auf die Struktur oder den Verlauf der Motoraxone (Maßstab: 5 μ m in A bis C; 10 μ m in D bis I).

Neurofilament findet man in den Axonen der Motorneuronen und Synaptophysin in der Nervenendigung des Motorneurons.

Die Bilder A bis C der Abb. V-31 zeigen den Verlauf des Motoraxons an einer NMJ des Diaphragmas eines adulten WT-Tieres. Das Motoraxon spaltet sich auf und verteilt sich über die Bereiche, in denen AChR konzentriert sind. Die Innervierung der NMJ homozygoter ϵ SC-Mäuse unterscheidet sich nicht von der Innervierung der NMJ von WT-Tieren (Abb. V-31 D bis I). Obwohl die Dichte der AChR auf der postsynaptischen Seite der NMJ reduziert ist, verlaufen die Motoraxone über den ganzen Bereich der NMJ. Es gibt keine Anzeichen morphologischer Veränderungen der Motoraxone.

Synaptophysin ist in der präsynaptischen Membran lokalisiert und kann als „Marker“ für die immunhistochemische Darstellung der Nervenendigung benutzt werden (Abb. V-32). In NMJ von WT-Tieren sind Synaptophysin und die AChR kolokalisiert. Das Gleiche gilt für NMJ von homozygoten ϵ SC-Tieren. Es konnten keine Bereiche beobachtet werden, an denen nur AChR oder nur Synaptophysin vorhanden ist.

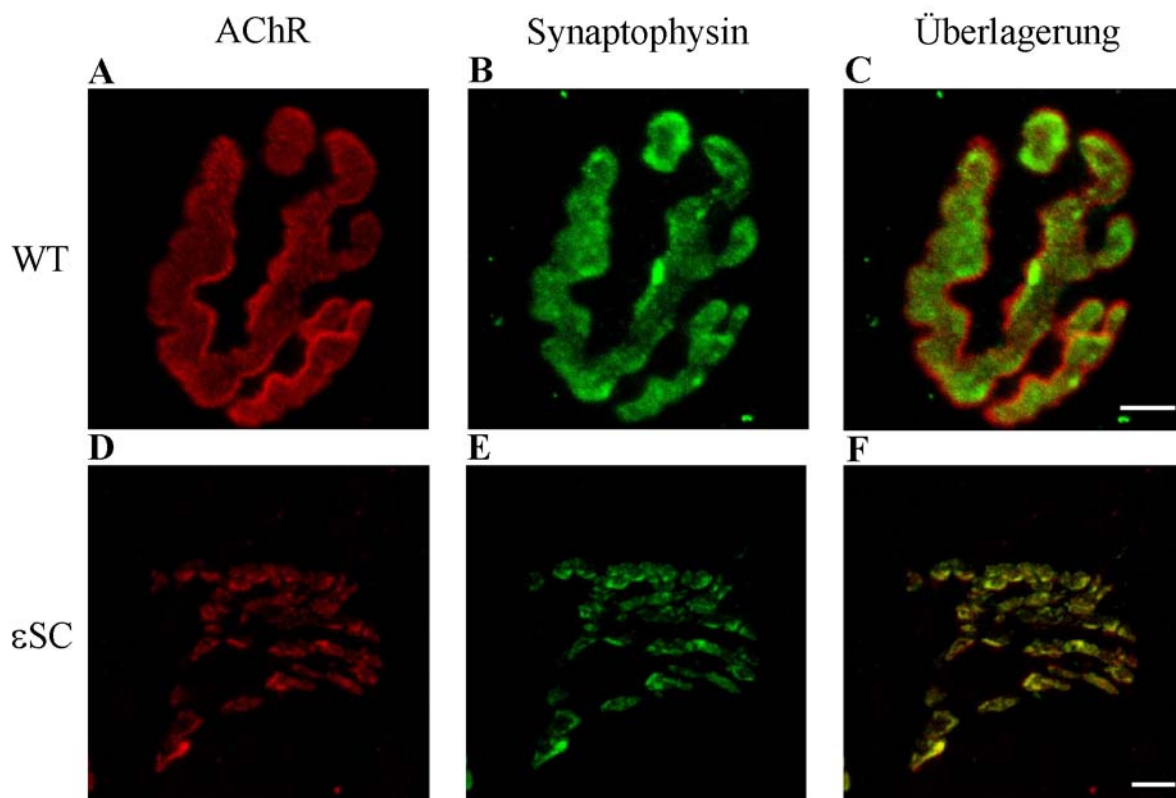


Abb. V-32: Konfokale Aufnahmen von AChR und präsynaptischem Synaptophysin aus adulten Tieren.

AChR von Diaphragmen wurden mit Rh-Bgtx. und das in der Präsynapse lokalisierte Synaptophysin mit einem Antikörper nachgewiesen. A bis C zeigt die NMJ eines P70 WT-Tieres und D bis F die NMJ eines homozygoten ϵ SC-Tieres (P200). A und C zeigt den AChR in rot, B und E Synaptophysin in grün und C und F das Überlagerungsbild (Maßstab: 5 μ m).

V.2.6.6. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Strukturelle Veränderungen in der NMJ des Soleusmuskels von homozygoten ϵ SC-Tieren wurden mit Hilfe der Elektronenmikroskopie untersucht.

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Muskeln aus WT-Tieren sind die typischen Strukturen der NMJ deutlich zu erkennen (Abb. V-33 A). Auf der präsynaptischen Seite ist die Nervenendigung mit den präsynaptischen Vesikeln zu sehen, die mit ACh gefüllt sind. Darüber liegt die Schwann'sche Zelle, die die NMJ bedeckt. Im postsynaptischen, muskulären Teil der Synapse sind deutlich die synaptischen Einfaltungen der Membran zu erkennen.

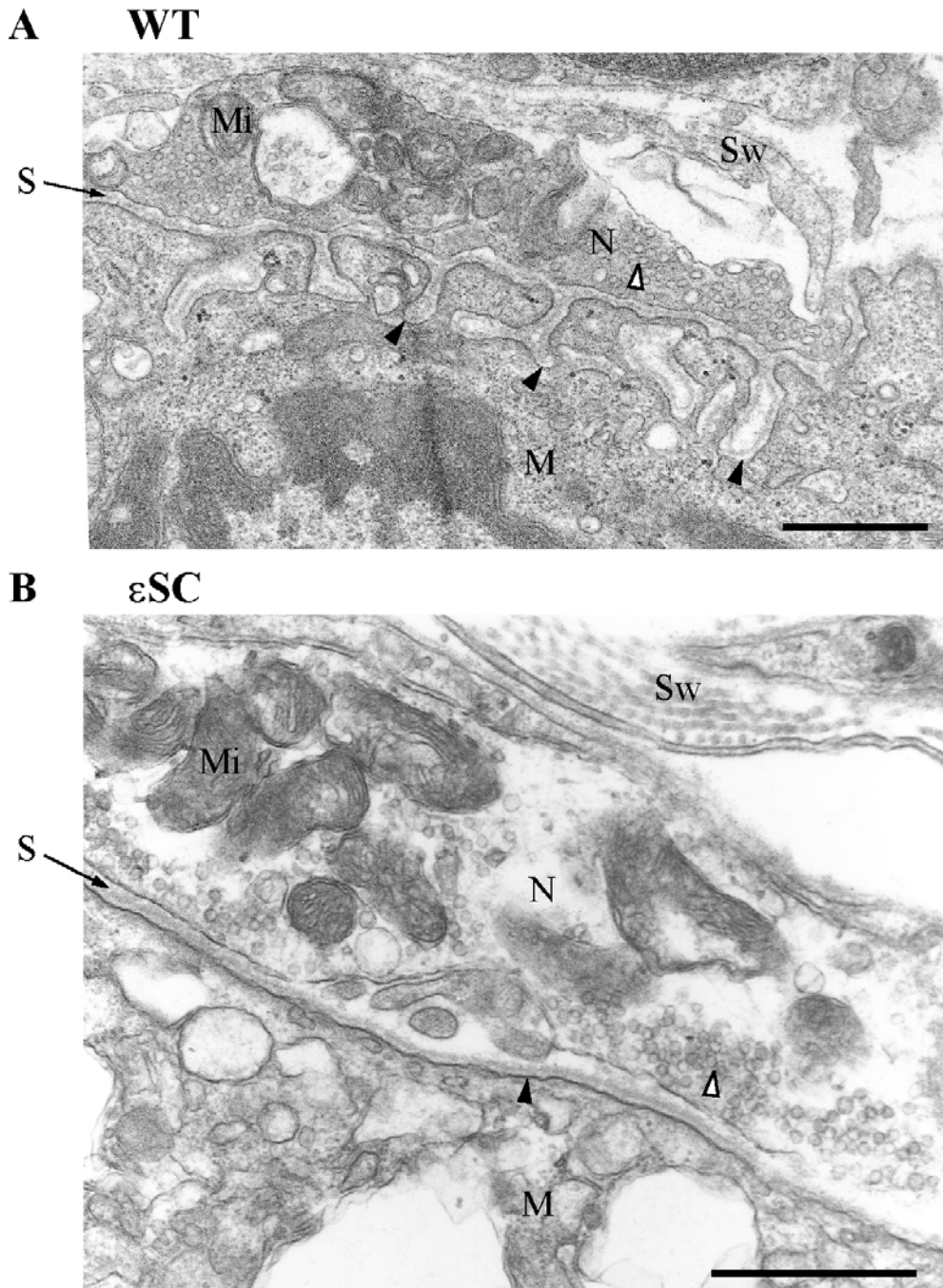


Abb. V-33: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von NMJ adulter Mäuse.

A: NMJ von adulten WT-Mäusen (P60) zeigen im elektronenmikroskopischen Bild die typischen Strukturen. Nervenendigung (N) und Muskel (M) sind durch den synaptischen Spalt (S) getrennt. Die Nervenendigung ist gefüllt mit synaptischen Vesikeln (weiße Pfeilspitze), in denen ACh gespeichert ist. Auf den Abbildungen sind außerdem Mitochondrien (Mi) und die Schwann'schen Zellen (Sw) zu erkennen. Die postsynaptische Membran des Muskels zeigt die typischen synaptischen Einfaltungen (schwarze Pfeilspitze). **B** zeigt eine Aufnahme der NMJ aus einem homozygoten ϵ SC-Tier (P57). Die Nervenendigung enthält alle strukturellen Komponenten. Die Einfaltungen der postsynaptischen Membran sind dagegen nicht mehr zu erkennen (Maßstab: 2 μ m).

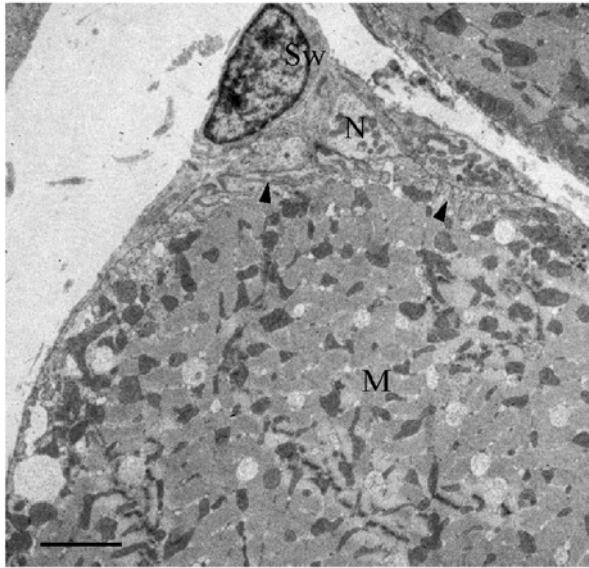
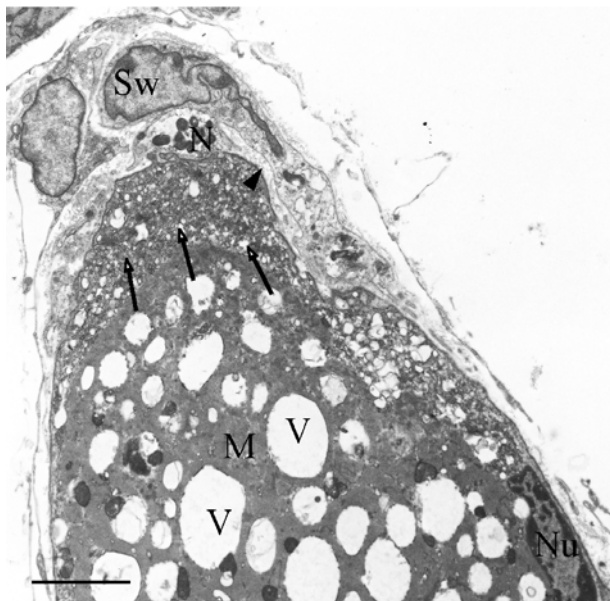
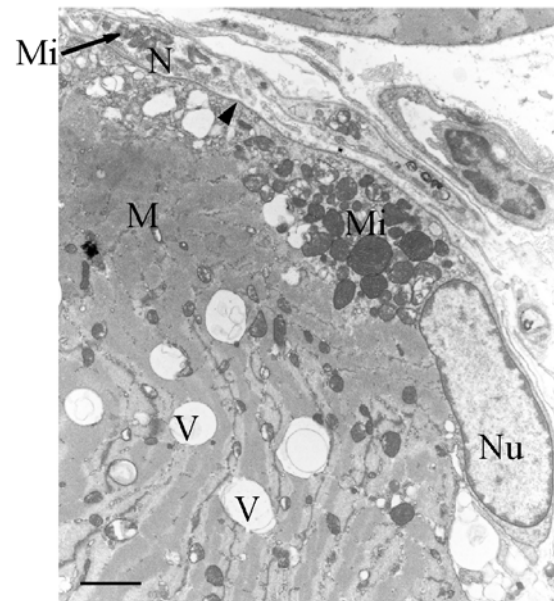
A WT**B** ϵ SC**C** ϵ SC

Abb. V-34: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen von NMJ.

Elektronenmikroskopische Bilder wurden von Querschnitten des Soleusmuskels aufgenommen. **A** zeigt die Aufnahme eines Muskels aus einem P60 WT-Tier und **B** und **C** die Aufnahmen von Muskelfasern aus einem P57 homozygoten ϵ SC-Tier. In der Muskelfaser des homozygoten ϵ SC-Tieres können einige Veränderungen beobachtet werden. Unter der postsynaptischen Membran akkumulieren zahlreiche Vesikel, große vakuolenartige Strukturen bilden sich im Sarkoplasma und manche subsynaptischen Nuklei (**B**) zeigen degenerative Merkmale (N: Nerv; M: Muskel; Sw: Schwann'sche Zelle; schwarze Pfeilspitze: postsynaptische Membran; V: vakuolenartige Struktur; Pfeile mit weißem Kopf: subsynaptische Vesikel, NU: Nukleus, Mi: Mitochondrien, Maßstab: 10 μ m).

Die Struktur der Präsynapse zeigt in elektronenmikroskopischen Aufnahmen der NMJ homozygoter ϵ SC-Tiere keine auffälligen Unterschiede (Abb. V-33 B). Auf der postsynaptischen Seite können dagegen verschiedene Veränderungen festgestellt werden.

Die subsynaptischen Einfaltungen der Membran sind in diesen NMJ nicht vorhanden. In subsynaptischen Abschnitten der Muskelfaser von homozygoten ϵ SC-Tieren sind außerdem große vakuolenartige Strukturen zu erkennen, die in Fasern von WT-Tieren nicht vorhanden sind (siehe Abb. V-34). Diese Strukturen sind nur auf die subsynaptischen Abschnitte der Muskelfaser beschränkt und können in extrasynaptischen Bereichen nicht gefunden werden. Unterhalb der postsynaptischen Membran können in Muskelfasern homozygoter ϵ SC-Tiere ungewöhnlich viele postsynaptische Vesikel und vergrößerte Mitochondrien beobachtet werden.

Manche subsynaptischen Zellkerne der Muskelfaser zeigen eine ungewöhnliche, elektronendichte Struktur (Vgl. Nukleus in Abb. V-34 B mit Nukleus in Abb. V-34 C).

V.2.7. Transkriptionsanalysen

V.2.7.1. Semiquantitative Analyse der Expression verschiedener mRNAs in Muskeln von adulten ϵ SC-Mäusen

mRNA-Mengen wurden mit Hilfe von RT-PCR quantifiziert. Zunächst wurde die RNA aus Soleusmuskeln von P57-Tieren isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde in PCRs mit Primern, die für die zu untersuchenden mRNAs spezifisch waren, eingesetzt. PCR-Produkte wurden über 1% Agarosegele getrennt und digital fotografiert. Mit Hilfe des Programms IPLab Gel wurde die Fluoreszenzintensität der Ethidiumbromid-gefärbten PCR-Produkte quantifiziert (Abb. V-35). Um sicherzustellen, dass alle Proben vergleichbare Mengen Gesamt-mRNA besitzen, wurden Reaktionen mit Primern für GAPDH als Mengenstandard durchgeführt. Eventuelle Abweichungen der eingesetzten mRNA-Menge wurden mit Hilfe des Mengenstandards umgerechnet.

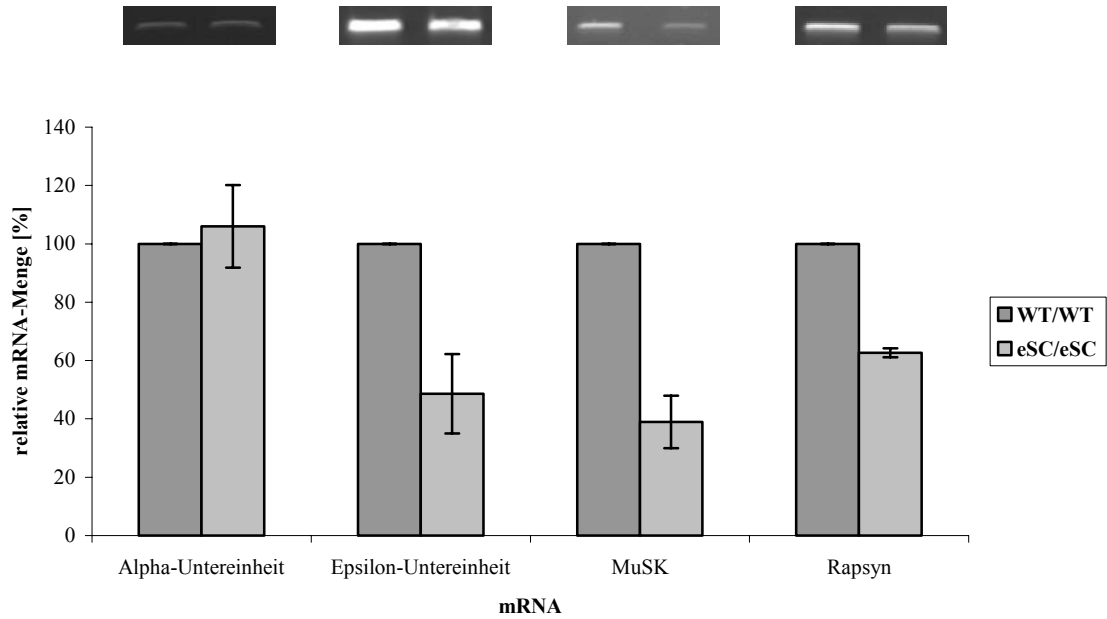


Abb. V-35: Semiquantitative Analyse der Menge verschiedener mRNAs aus P57 Mäusen.

Mit Hilfe von RT-PCR wurden semiquantitative Analysen der Mengen verschiedener mRNAs, die aus Soleusmuskeln von P57 Tieren stammen, durchgeführt. Die Graphik zeigt die zum Mengenstandard GAPDH normalisierten relativen mRNA-Mengen aus 3 bis 5 Experimenten, wobei die mRNA-Menge des WT-Muskels auf 100% gesetzt wurde. Dunkle Balken geben die Messwerte für mRNAs aus Muskeln von WT-Tieren und helle Balken die Messwerte für mRNAs aus Muskeln von homozygoten εSC-Tieren an. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Über den Balken für die jeweiligen mRNAs sind exemplarische Bilder der entsprechenden PCR-Produkte abgebildet.

Die relativen Mengen der α-Untereinheit-mRNA ist in Muskeln von WT- und εSC-Tieren gleich. Die Menge der anderen untersuchten mRNAs ist dagegen reduziert. So konnte in Muskeln homozygoter εSC-Tiere $38 \pm 1,5\%$ weniger Rapsyn-mRNA festgestellt werden als in Muskeln von WT-Tieren. Auch die Menge der ε-Untereinheit-mRNA ist auf $49 \pm 13,6\%$ reduziert. Die Reduktion der Menge der MuSK-mRNA ist mit $61 \pm 9\%$ am deutlichsten.

V.2.7.2. Untersuchung der γ -mRNA Mengen im adulten Muskel

Die geringe Menge γ -mRNA, die im adulten Muskel vorhanden ist, ließ keine quantitative Analyse zu. Die Fehler, die bei der benutzten Methode auftreten würden, würden ein verfälschtes Bild ergeben. Deshalb wurde die γ -Menge nicht quantifiziert, sondern optisch abgeschätzt.

Auf dem Gel in Abb. V-36 lässt sich erkennen, dass zwischen Muskeln von WT- und homozygoten ϵ SC-Tieren kein bedeutender Mengenunterschied der γ -mRNA besteht.

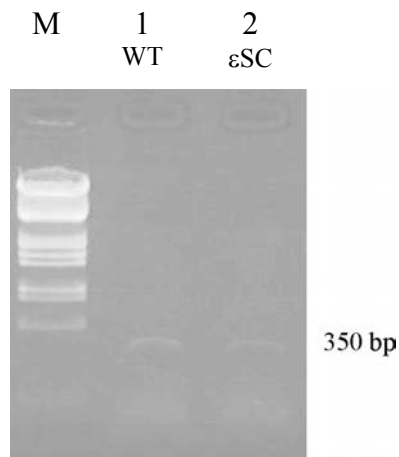


Abb. V-36: RT-PCR-Nachweis der γ -mRNA.

1% Agarosegel mit RT-PCRs von Gesamt-RNA aus Muskeln von WT-Tieren (Bahn 1) und homozygoten ϵ SC-Tieren (Bahn 2). In beiden Proben ist nur eine sehr schwache Bande bei 350 bp zu erkennen (M: λ /EcoRI, HindIII-Marker).

V.2.8. Verpaarung von ϵ SC-Tieren mit ϵ Tet-Tieren

SCCMS ist im Menschen eine dominant vererbte Krankheit. Im Gegensatz dazu zeigen nur homozygote ϵ SC-Tiere myasthenische Symptome, heterozygote nicht. Vermutlich hängt dies mit der reduzierten Expression des ϵ SC-Allels gegenüber dem WT-Allel zusammen. Das ϵ SC-Allel ist eine Fusion aus genomischer DNA (Exons 1-6) und cDNA (Exons 7-12), was negative Einflüsse auf die Transkriptionseffizienz, das Spleißing oder die Stabilität der mRNA haben könnte. Außerdem ist ein negativer Einfluss der Neomycinresistenz auf die Transkription der ϵ L269F-mRNA nicht auszuschließen.

Um die reduzierte Genexpression des ϵ SC-Allels gegenüber dem WT-Allel zu kompensieren, wurden homozygote ϵ SC-Männchen mit homozygoten Weibchen der ϵ Tet-Linie gekreuzt. Die Tiere der ϵ Tet-Linie transkribieren die ϵ -mRNA unter der Kontrolle des Tetracyclin-Promotors (Güth, A.Dissertation1999). Die ϵ -Expression war zwar in diesen Tieren nicht durch Tetracyclin regulierbar, die Einführung des Tetracyclin-Promotors führte jedoch zu einer Reduktion der ϵ -mRNA-Menge auf etwa 60%. Dennoch zeigten homozygote ϵ Tet-Tiere keine phänotypischen Veränderungen. Diese Reduktion der WT-mRNA sollte helfen, den transkriptionellen Nachteil der ϵ L269F-mRNA zu kompensieren.

V.2.8.1. Zucht der ϵ SC/ ϵ Tet-Tiere

Homozygote ϵ SC-Tiere wurden mit homozygoten ϵ Tet-Tieren gekreuzt. Wie erwartet besaßen alle Nachkommen dieser Kreuzung sowohl das ϵ SC- als auch das ϵ Tet-Allel (n = 14). Die Analyse des Genotyps erfolgte mittels PCR (siehe Abb. V-37).

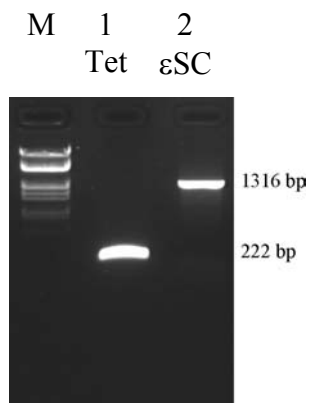


Abb. V-37: PCR-Analyse zur Genotypisierung von ϵ SC/ ϵ Tet-Tieren.

Schwanzbiopsien von ϵ SC/ ϵ Tet-Tieren wurden mit zwei PCRs analysiert. Die Abbildung zeigt ein 1% Agarosegel. Auf Bahn 1 wurde eine PCR mit ϵ Tet spezifischen Primern (EProm 3290F und 880-1708R) aufgetragen, bei der ein 222 bp großes Fragment amplifiziert wurde. In Bahn 2 wurde eine PCR mit den spezifischen Primern für ϵ SC aufgetragen, bei der das 1316 bp große Fragment amplifiziert wurde (M: λ /EcoRI,HindIII-Marker).

V.2.8.2. Phänotypische Veränderungen der ϵ SC/ ϵ Tet-Tiere

ϵ SC/ ϵ Tet-Tiere waren bei der Geburt nicht von WT-Tieren zu unterscheiden. Wie bei homozygoten ϵ SC-Tieren waren erste phänotypische Veränderungen ab P17 zu erkennen. ϵ SC/ ϵ Tet-Mäuse gaben bei Anstrengung oder Aufregung einen zwitschernden Laut von sich, der auf Probleme bei der Atmung schliessen lässt.

V.2.8.2.1. Untersuchung des Körpergewichts von ϵ SC/ ϵ Tet-Tieren

Das Körpergewicht wurde zwischen P15 und P50 täglich und danach bis P71 wöchentlich bestimmt und die Mittelwerte errechnet (Abb. V-38). Es wurden drei Gruppen untersucht und verglichen: WT- Mäuse, homozygote ϵ SC-Mäuse und ϵ SC/ ϵ Tet-Mäuse.

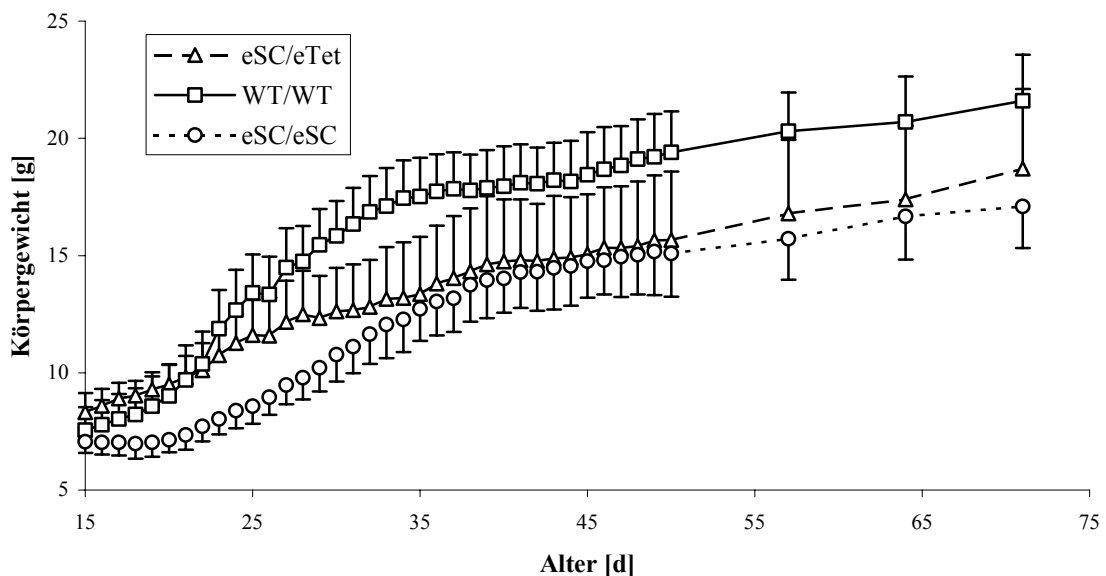


Abb. V-38: Körpergewicht von WT-, ϵ SC/ ϵ Tet- und homozygoten ϵ SC-Tieren während der postnatalen Entwicklung.

Das Gewicht der Tiere wurde zwischen P15 und P50 täglich und zwischen P50 und P71 wöchentlich bestimmt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte des Körpergewichts von homozygoten ϵ SC-Tieren (je 7 Weibchen und Männchen, Kreise, gepunktete Linie), 13 ϵ SC/ ϵ Tet-Tieren (6 Weibchen und 7 Männchen, Dreiecke, gestrichelte Linie) und WT-Mäusen (7 Weibchen, 5 Männchen, Quadrate, durchgezogene Linie). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

WT-Tiere nahmen zwischen P15 und P35 täglich konstant (0,2 und 1,5 g) zu. Nach P35 bis P71 verringerte sich die Gewichtszunahme (0 bis 0,3 g), bis sie bei P71 ein Durchschnittsgewicht von $21,6 \pm 1,96$ g hatten.

Bei homozygoten ϵ SC-Tieren war zwischen P15 und P20 keine Gewichtszunahme zu erkennen. Nach P20 bis P40 nahmen homozygote ϵ SC-Tiere täglich zwischen 0,1 und 0,5 g zu. Von P40 bis P71 konnte eine Gewichtszunahme zwischen 0 und 0,2 g festgestellt werden. Der Verlauf der Gewichtszunahme von ϵ SC/ ϵ Tet-Tieren liegt zwischen dem von WT- und homozygoten ϵ SC-Tieren. Die Tiere nehmen bis P20 wie WT-Tiere zu. Anschließend kann nur eine geringe tägliche Gewichtszunahme gemessen werden (0 bis 0,6 g), die dazu führt, dass das Durchschnittsgewicht homozygoter ϵ SC-Tiere und ϵ SC/ ϵ Tet-Tiere zwischen P40 und P50 gleich ist. Bei P71 liegen ϵ SC/ ϵ Tet-Tiere mit einem Durchschnittsgewicht von $18,7 \pm 3,4$ g zwischen WT- und homozygoten ϵ SC-Tieren.

V.2.8.2.2. Untersuchungen der Griffstärke von ϵ SC/ ϵ Tet-Tieren

Die Griffstärke der Vorderpfoten wurde zwischen P15 und P50 täglich, danach bis P71 wöchentlich bestimmt. Die Messwerte von drei Gruppen, WT-, ϵ SC/ ϵ Tet- und homozygoten ϵ SC-Mäusen werden in Abb. V-39 verglichen.

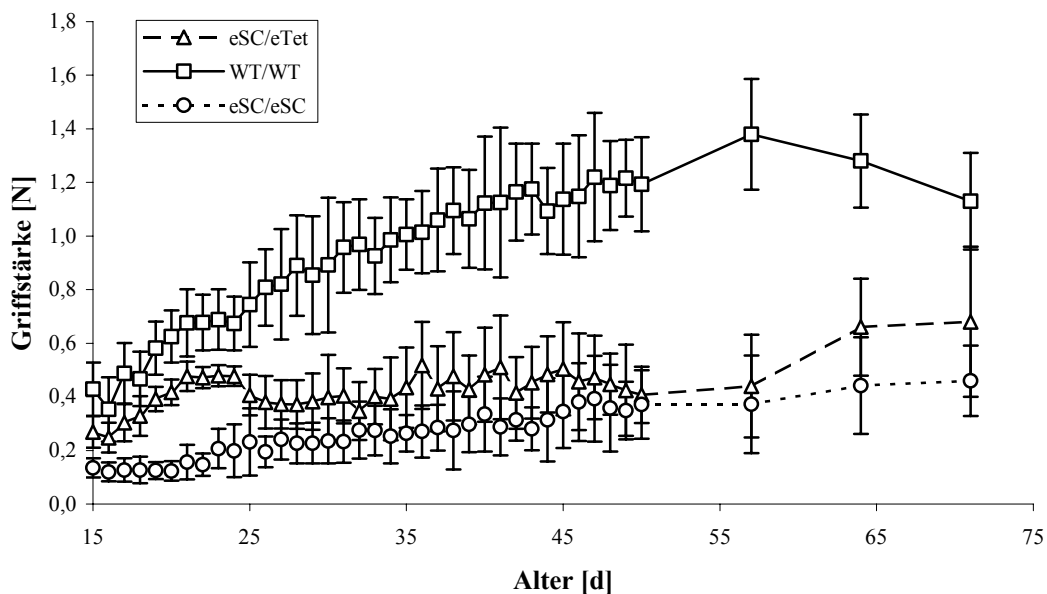


Abb. V-39: Griffstärke von WT-, ϵ SC/ ϵ Tet- und homozygoten ϵ SC-Tieren während der postnatalen Entwicklung.

Die Griffstärke der Tiere wurde zwischen P15 und P50 täglich und zwischen P50 und P71 wöchentlich bestimmt. Die Mittelwerte der Messungen wurden gegen das Alter der Tiere aufgetragen (WT: Quadrate, durchgezogene Linie, ϵ SC/ ϵ Tet: Dreiecke, gestrichelte Linie und homozygote ϵ SC: Kreise, gepunktete Linie). Für die Messungen wurden 12 WT- (7 Weibchen, 5 Männchen), 13 ϵ SC/ ϵ Tet- (7 Männchen, 6 Weibchen) und 14 homozygote ϵ SC-Tiere (je 7 Weibchen und Männchen) benutzt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

WT-Tiere zeigten von P15 bis P43 eine stetige Zunahme der durchschnittlichen Griffstärke von 0,3 N auf etwa 1,2 N. Zwischen P44 und P71 schwankte die durchschnittliche Griffstärke zwischen 1,1 und 1,4 N.

Homozygote ϵ SC-Mäuse besaßen bei P15 eine durchschnittliche Griffstärke von $0,14 \pm 0,036$ N. Sie nahm im Lauf der Entwicklung nur langsam bis auf etwa 0,5 N zu.

ϵ SC/ ϵ Tet-Tiere besaßen bei P15 eine durchschnittliche Griffstärke, die mit $0,27 \pm 0,059$ N zwischen der von WT- und homozygoten ϵ SC-Tieren lag. Bis P21 stieg die Griffstärke ähnlich wie die von WT-Tieren an. Danach war nur noch eine geringe Kraftzunahme zu erkennen, die vergleichbar mit der von homozygoten ϵ SC-Tieren war. Bei P71 besaßen ϵ SC/ ϵ Tet-Tiere mit $0,68 \pm 0,028$ N etwa halb so viel Kraft wie WT-Tiere, jedoch mehr Kraft als homozygote ϵ SC-Tiere.

V.2.8.3. Morphologische Untersuchung der NMJ von ϵ SC/ ϵ Tet-Tieren

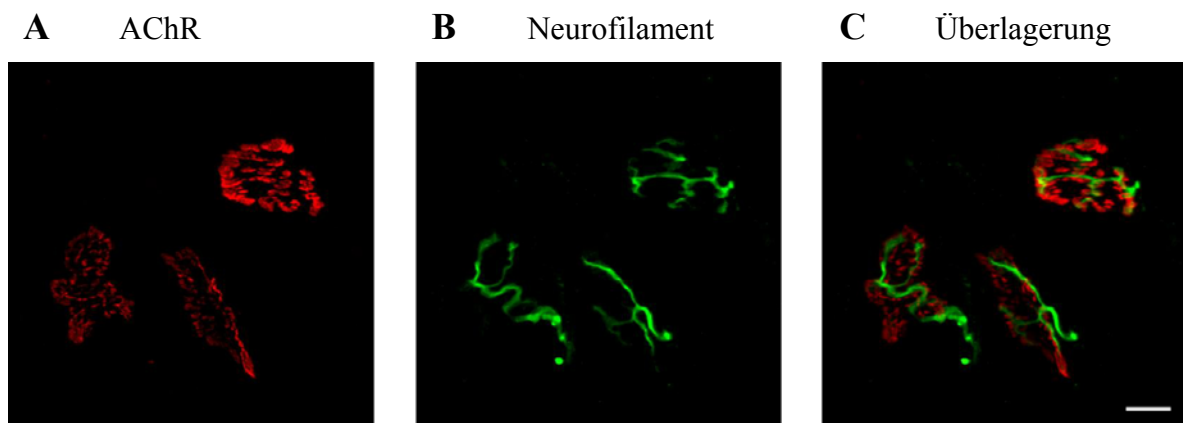


Abb. V-40: Konfokale Aufnahmen von AChR und Motoraxonen eines P49 ϵ SC/ ϵ Tet-Tieres.

AChR wurden mit Rh-Bgtx. und die Motoraxone mit einem Antikörper gegen Neurofilament markiert, der mit einem fluoresceinmarkierten Zweitantikörper nachgewiesen wurde. Die AChR (A) zeigen eine vergleichbare Verteilung in der NMJ wie in NMJ von homozygoten ϵ SC-Tieren. Die Motoraxone (B) zeigen keine auffälligen Veränderungen. C zeigt das Überlagerungsbild von A und B (Maßstab: 10 μ m).

Die NMJ des Diaphragmas eines adulten (P49) ϵ SC/ ϵ Tet-Tieres wurden untersucht, indem die AChR mit Rh-Bgtx. und die Motoraxone mit Antikörpern gegen Neurofilament markiert wurden.

Wie bei homozygoten ϵ SC-Tieren zeigte sich in ϵ SC/ ϵ Tet-Mäusen eine Reduktion der AChR-Dichte in der NMJ (Abb. V-40). Die AChR waren auch hier in Inseln zusammengefasst und nicht zusammenhängend wie in NMJ von WT-Tieren (Vgl. Abb. V-31). Auch die Motoraxone zeigten keine auffälligen morphologischen Veränderungen.

VI. Diskussion

Der zentrale Proteinkomplex der neuromuskulären Signalübertragung ist der nikotinische Acetylcholinrezeptor (AChR). Er ist essentiell für die Umsetzung des chemischen Signals der Präsynapse, dem Acetylcholin (ACh), in ein elektrisches Signal, das zur Kontraktion des Muskels führt. Veränderungen der Rezeptoraktivität, die durch Mutationen ausgelöst werden können, führen zu Störungen in der Reizweiterleitung vom Nerv an den Muskel und können in schwerwiegenden Muskelerkrankungen, wie Muskelschwäche (Myasthenie), enden.

In dieser Arbeit wurden zwei transgene Knock-In-Mauslinien generiert, deren Acetylcholinrezeptor-Aktivität durch Einführung von Mutationen verändert war.

VI.1. Die transgene Knock-In γ/ϵ FC-Mauslinie

Mit der transgenen γ/ϵ FC-Mauslinie soll der Einfluss, den die synaptische Aktivität des AChR auf die Entwicklung der NMJ hat untersucht werden. Dazu wurde die fötal exprimierte γ -Untereinheit durch eine AChR-Untereinheit ersetzt, die einerseits erlaubt, strukturell intakte AChR zu bilden, die aber andererseits bewirkt, dass die AChR nur geringe Ionenleitfähigkeit besitzen.

Eine geeignete Modifikation ist der Austausch einer einzigen Aminosäure (Prolin 121 nach Leucin), die ursprünglich in Myasthenie-Patienten gefunden wurde und zu einer reduzierten Affinität des AChR für ACh führt (Ohno et al., 1996). Dadurch reduziert sich die Kanaloffenzeit des Rezeptors.

VI.1.1. Die P121L-Mutation führt zu unterschiedlich ausgeprägten Veränderungen in dem fötalen und adulten AChR

Die P121L Mutation wurde sowohl in die cDNA der γ - und der ϵ -Untereinheit der Maus eingeführt. Mit Hilfe des *X.laevis* Oocyten-Expressionssystems und elektrophysiologischer Methoden wurde dann gezeigt, dass die P121L-Mutation im Maus-AChR ähnliche Veränderungen wie im humanen AChR auslöst. Darüber hinaus wurde diese „natürliche“ Mutation ausgenutzt, um herauszufinden, in welcher Untereinheit die P121L-Mutation zu geringerer Aktivität des Rezeptors führt und ob der Einbau der Rezeptorkomplexe in die NMJ durch die Mutation beeinträchtigt würde.

Die physiologischen Unterschiede des fötalen und adulten AChR werden durch den Untereinheiten austausch bewirkt, bei dem die γ -Untereinheit durch die ε -Untereinheit ersetzt wird. In elektrophysiologischen Einzelkanalmessungen konnten wir zeigen, dass die P121L-Mutation sowohl im AChR ε P121L als auch im AChR γ P121L die Kanaloffenzeit des Rezeptors reduziert. Die Reduktion der Kanaloffenzeit, die durch die P121L-Mutation bewirkt wird, ist im AChR ε P121L stärker ausgeprägt als im AChR γ P121L.

Neben den veränderten Kanalöffnungseigenschaften führt diese Mutation gleichzeitig zu einer Erhöhung der Bindungskonstanten des AChR für ACh. Es zeigt sich, dass AChR γ P121L ACh mit einer geringeren Affinität bindet. Die Affinität des AChR ε P121L für ACh ist im Vergleich dazu noch weiter reduziert. Die P121L-Mutation liegt auf einer Schleife in der Nähe der ACh-Bindestelle, die sich an der Kontaktstelle zwischen der α - und ε -Untereinheit bzw. α - und γ -Untereinheit befindet (Miyazawa et al., 2003). Im Fall des menschlichen AChR wurde gezeigt, dass die ACh-Bindung nicht grundsätzlich für alle funktionellen Zustände des AChR reduziert ist (Ohno et al., 1996). ACh bindet nur schwach an den geöffneten AChR-Komplex und kann diesen Zustand nicht stabilisieren. Dadurch wird der geschlossene Zustand bevorzugt. Während der Einfluss der P121L-Mutation auf die ACh-Bindung auf Grund der Nähe zur Ligandenbindungsstelle nicht unerwartet ist, ist die selektive Veränderung des Kanalöffnungsmechanismus überraschend und könnte helfen zu verstehen wie, Ligandenbindung und Kanalöffnung gekoppelt sind.

Desweiteren zeigen die hier dargestellten Ergebnisse eine Beeinträchtigung der Integration der AChR-Komplexe in die Plasmamembran, wenn die P121L-Mutation in die γ -Untereinheit eingeführt wurde. Diese Beeinträchtigung konnte bei AChR ε P121L nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wirkung der P121L-Mutation im AChR der Maus vergleichbar mit der im AChR des Menschen ist. In beiden Organismen führt sie in der adult exprimierten ε -Untereinheit zu einer Verkürzung der Kanaloffenzeit. In der fötal exprimierten γ -Untereinheit ist der Effekt, den die Mutation auf den AChR hat, dagegen nicht so ausgeprägt wie im adulten Rezeptor.

Auf Grund dieser Beobachtungen entschlossen wir uns, die ε -Untereinheit mit der P121L-Mutation durch homologe Rekombination in den γ -Genlocus einzuführen, um so bei Erhaltung der AChR-Komplexbildung und Membranintegration die Funktion möglichst stark zu reduzieren.

VI.1.2. Generierung der γ/ϵ FC-Mauslinie

Zur Generierung der γ/ϵ FC-Mauslinie diente ein Targetingvektor, der bereits erfolgreich für homologe Rekombination in den γ -Genlocus benutzt wurde (persönliche Mitteilung von Michael Koenen). Der γ -Genlocus sollte so verändert werden, dass nach den Exons 1 bis 4 des γ -Gens die cDNA des ϵ -Gens folgte, die neben der P121L-Mutation zusätzlich die Sequenz für GFP beinhaltete.

Die korrekte homologe Rekombination in das Genom embryonaler Stammzellen der Maus konnte durch PCR, Southern-Blot und Sequenzierung in zwei Klonen bestätigt werden. Einer dieser ES-Zell-Klone wurde in Maus-Blastocysten injiziert, die in den Uterus weiblicher Mäuse transferiert wurden. Aus diesen Blastocysten entwickelten sich chimäre Tiere, die durch Kreuzung heterozygote und homozygote γ/ϵ FC-Tiere hervorbrachten. Die Expression des rekombinierten Gens konnte auf mRNA- und Proteinebene gezeigt werden.

VI.1.3. Homozygote γ/ϵ FC-Tiere sterben bei der Geburt

Heterozygote γ/ϵ FC-Tiere zeigen keine phänotypischen Auffälligkeiten. Homozygote γ/ϵ FC-Tiere starben dagegen bei der Geburt. Vermutlich verhinderte die fehlende synaptische Aktivität die Kontraktion des Diaphragmas, die zur Atmung benötigt wird, und führte so zum Erstickungstod der Tiere.

Der perinatale Tod konnte bereits bei einer anderen transgenen Mauslinie beobachtet werden, in der die Cholin-Acetyltransferase (ChAT) deletiert worden war (Brandon et al., 2003). Ohne ChAT kann keine ACh-Synthese stattfinden, was zum Verlust der synaptischen Aktivität der NMJ führt. Im Gegensatz dazu lebten Tiere, in denen die γ -Untereinheit deletiert wurde, bis zu 2 Tage (Takahashi et al., 2002). Nach dieser Zeit starben sie, weil sie nicht in der Lage waren, Milch aufzunehmen.

Lebende, homozygote γ/ϵ FC-Tiere konnten nie gefunden werden, obwohl die Würfe innerhalb weniger Stunden nach der Geburt kontrolliert wurden. Ein zwei Tage langes Überleben homozygoter γ/ϵ FC-Tiere, wie es in γ -Knock-Out-Tieren beobachtet wurde, kann deshalb ausgeschlossen werden.

VI.1.4. Die Rolle der synaptischen Aktivität bei der Entwicklung der NMJ während der Embryonalphase

In homozygoten γ/ε FC-Tieren konnten bedeutende morphologische Veränderungen beobachtet werden, die durch die drastische Reduktion der Aktivität des AChR bewirkt werden. Das Clustering der AChR verzögert sich und Motoraxone wachsen ungerichtet über die Muskeln, wie mit immunhistochemischen Fluoreszenzaufnahmen von Diaphragmen gezeigt werden konnte. Untersuchungen mit ^{125}I - α -Bungarotoxin konnten in Kombination mit den immunhistochemischen Analysen zeigen, dass die Verteilung der NMJ im Diaphragma deutlich verbreitert ist, so dass das median im Muskel gelegene synaptische Band, in dem die NMJ normalerweise konzentriert sind, nicht mehr zu identifizieren ist.

In Muskeln von WT-Embryonen (E 16) können runde Aggregationen von AChR beobachtet werden, die in homozygoten γ/ε FC-Embryonen des gleichen Alters nicht vorhanden sind. Hier können nur strichförmige Ansammlungen von AChR nachgewiesen werden. Bei der Geburt besitzen beide Gruppen runde AChR-Cluster, die in homozygoten γ/ε FC-Tieren jedoch nicht so dicht erscheinen wie in WT-Tieren. Die Unterschiede in der Morphologie zeigen, dass das Clustering und die Etablierung der postsynaptischen Strukturen in homozygoten γ/ε FC-Tieren verzögert ist. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die synaptische Aktivität, d.h. das Öffnen der AChR, einen bedeutenden Einfluss auf das Clustering der AChR und damit auf die Etablierung und Entwicklung der NMJ während der Embryonalentwicklung besitzt. Diese Schlussfolgerung wird von Beobachtungen gestützt, die in anderen transgenen Mauslinien gemacht wurden. In ChAT-defizienten Mäusen, γ -Knock-Out-Mäusen und γ/ε -Mäusen, in denen die Aktivität der γ -Untereinheit reduziert wurde, indem sie durch ε -Untereinheit ersetzt wurde, konnte ebenfalls eine Verzögerung des Clusterings beobachtet werden ((Brandon et al., 2003; Takahashi et al., 2002) persönliche Mitteilung Michael Koenen). In allen Mauslinien konnte gezeigt werden, dass sich die Funktion des fötalen AChR auf Bildung und zelluläre Lokalisation der AChR-Cluster auswirkt.

Das gleiche gilt für die Anordnung der NMJ im synaptischen Band. In homozygoten γ/ε FC-Tieren sind die AChR-Cluster über das Diaphragma verteilt, so dass das synaptische Band nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Auch diese morphologische Veränderung konnte sowohl in ChAT-Knock-Out-, γ -Knock-Out- und deutlich schwächer in γ/ε -Tieren festgestellt werden.

Das Wachstum der Motoraxone ist in homozygoten γ/ϵ FC-Tieren verändert. Die Axone wachsen über die AChR-Cluster hinaus bis an den Rand des Diaphragmas. In Diaphragmen von WT-Tieren ist der Motorneuronenstrang in 2 bis 3 Hauptnervenstränge gegliedert, von denen Motoraxone abgehen, um die NMJ im synaptischen Band zu innervieren. Diaphragmen von homozygoten γ/ϵ FC-Tieren zeigen dieses Muster nicht. Die Motoraxone wachsen ungerichtet über das Diaphragma und spalten sich in viele kleinere Nervenstränge auf. Das gleiche unkontrollierte Nervenwachstum zeigte sich auch in ChAT- und γ -Knock-Out-Tieren und in abgeschwächter Form auch in γ/ϵ -Tieren (Brandon et al., 2003; Takahashi et al., 2002)(persönliche Mitteilung Michael Koenen).

Durch die γ/ϵ FC-Mauslinie konnte direkt gezeigt werden, dass die Aktivität des fötalen AChR gewichtigen Einfluss auf das Clustering der AChR, die Lokalisierung der NMJ im Muskel und die Steuerung des Axonwachstums hat. Diese Vorgänge sind die Grundlagen für die Etablierung von funktionsfähigen NMJ und damit eines lebensfähigen Organismus und sind abhängig von muskelintrinsischen Signalen, die über die Aktivität des AChR gesteuert werden. Sie laufen unabhängig von Signalen des Motorneurons ab, wie auch in einer Mauslinie gezeigt werden konnte, die keine Motoraxone im Diaphragma ausbildet, aber dennoch AChR-Cluster aufweist (Yang et al., 2001).

VI.1.5. Die Menge von Rapsyn- und MuSK-mRNA ist in Muskeln von γ/ϵ FC-Tieren reduziert

Analysen der mRNA-Mengen verschiedener Gene, deren Produkte auf der postsynaptischen Seite der NMJ eine Rolle spielen, zeigen, dass sowohl die MuSK-mRNA-, als auch die Rapsyn-mRNA-Menge in Muskeln homozygoter γ/ϵ FC-Tiere reduziert ist. MuSK und Rapsyn spielen beim Clustering der AChR eine zentrale Rolle (DeChiara et al., 1996; Gautam et al., 1995). Rapsyn verbindet den AChR-Komplex über β -Dystroglykan mit dem Cytoskelett und MuSK dient als Kinase, die einen second-messenger pathway aktiviert, der zum AChR-Clustering führt (Apel et al., 1997; Glass et al., 1996; Gautam et al., 1995; Weston et al., 2000; Luo et al., 2002). Reduzierte mRNA-Mengen dieser beiden Gene könnten zu dem verzögerten Clustering der AChR beitragen.

VI.1.6. Zukünftige Projekte mit der γ/ϵ FC-Linie

Die histologischen und genetischen Analysen der Tiere der γ/ϵ FC-Linie stehen erst am Anfang. So muß zum Beispiel die Innervierung der einzelnen NMJs genauer untersucht werden und ultrastrukturelle Analysen der Morphologie der NMJ mit Hilfe der Elektronenmikroskopie durchgeführt werden. Genetische Analysen, in denen die Expression weiterer Gene und die Lokalisierung der dazugehörigen mRNA untersucht werden, können mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen und cDNA-Microarrays durchgeführt werden. Auch die Verpaarung von γ/ϵ FC-Tieren mit Tieren anderer transgener Linien, wie der γ/ϵ -Linie, sind geplant. Diese Kreuzungen werden vermutlich Tiere hervorbringen, in denen der Grad der morphologischen Veränderungen zwischen den schwach ausgeprägten Veränderungen der γ/ϵ - und den weitreichenden Veränderungen der γ/ϵ FC-Tiere liegt. Diese Tiere könnten weitere Hinweise über den Einfluss liefern, den die synaptische Aktivität auf die Entwicklung der NMJ während der Embryonalphase besitzt. Weitere Aufschlüsse könnte auch ein Mausmodell liefern, bei dem die synaptische Aktivität des embryonalen AChR nicht reduziert, sondern gesteigert wird, wie z.B. durch Einführung einer Mutation, die im Menschen das Slow-Channel Congenital Myasthenic Syndrome auslöst.

VI.2. Die transgene Knock-In ϵ SC-Mauslinie

Als Congenitales Myasthenisches Syndrom (CMS) wird eine Gruppe vererbter Krankheiten bezeichnet, die die NMJ betreffen und zu Muskelschwäche mit variablen Symptomen führen. Die Ursachen für die Krankheit sind vielschichtig, hängen aber alle mit Mutationen in Genen zusammen, deren Produkte in der NMJ eine Rolle spielen. So konnten Mutationen in Proteinen der präsynaptischen Seite (ChAT, AChE) und der postsynaptischen Seite (AChR-Untereinheiten, Rapsyn) identifiziert werden, die mit dem CMS in Verbindung gebracht werden können (Engel et al., 2003b).

Eine Mutation in der ϵ -Untereinheit führt zu einem Aminosäureaustausch des Leucin an Position 269 zu Phenylalanin (L269F) und wurde in Patienten, die an CMS leiden, gefunden (Gomez and Gammack, 1995). Der Aminosäureaustausch führt zur Verlängerung der Kanaloffenzeit des AChR. Deshalb wird diese Form der CMS in die Gruppe der Slow-Channel Congenital Myasthenic Syndromes (SCCMS) eingeordnet.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Knock-In Mauslinie zu etablieren, die die L269F-Mutation in der ϵ -Untereinheit trägt. Diese Mauslinie dient als Modellorganismus, an dem grundlegende

physiologische und genetische Vorgänge, die bei der Etablierung des SCCMS eine Rolle spielen, untersucht werden können. Zukünftige Behandlungsmethoden können an diesen Tieren getestet werden. Zusätzlich kann auch der Einfluss, den die synaptische Aktivität des AChR auf die Entstehung und Aufrechterhaltung der NMJ hat, an Tieren dieser transgenen Linie untersucht werden.

VI.2.1. Die Generierung der ϵ SC-Mauslinie

Die L269F-Mutation wurde mit Hilfe der homologen Rekombination in das Mausgenom integriert. Zunächst wurden Ergebnisse bestätigt, die zeigten, dass die L269F-Mutation, die im humanen AChR zu einer verlängerten Kanaloffenzeit führt, die gleiche Verlängerung der Kanaloffenzeit im AChR der Maus bewirkt (Gomez et al., 1997).

Für die homologe Rekombination in das ϵ -Gen der Maus wurde ein Targetingvektor benutzt, der bereits zur Generierung anderer transgener Knock-In- und Knock-Out-Mauslinien benutzt worden war (Witzemann et al., 1996; Schwarz, H. Dissertation 1999).

Die korrekte homologe Rekombination des Targetingvektors in das Genom eines ES-Zell Klons konnte mit PCR-, Southern-Blot- und Sequenzierungsanalysen nachgewiesen werden. ES-Zellen dieses Klons wurde in Blastocysten injiziert, die in den Uterus weiblicher Mäuse transferiert wurden. Chimäre Nachkommen wurden geboren und brachten durch Kreuzung heterozygote Tiere hervor, die durch weitere Kreuzung homozygote Tiere erzeugten.

Die Expression des in das Genom inserierten ϵ -Gens konnte mit elektrophysiologischen Methoden bestätigt werden.

VI.2.2. Homozygote ϵ SC-Tiere entwickeln myasthenische Symptome

Heterozygote und homozygote ϵ SC-Tiere wurden mit mehreren Methoden auf Anzeichen von Muskelschwäche untersucht. Im Verlauf der postnatalen Entwicklung wurde das Körpergewicht der Mäuse und die Griffstärke der Vorderpfoten überprüft.

Homozygote ϵ SC-Tiere zeigten während der gesamten postnatalen Entwicklung eine signifikant reduzierte Griffstärke, ein eindeutiges Zeichen für Myasthenie. Heterozygote ϵ SC-Tiere zeigten dagegen keine phänotypischen Veränderungen, was erstaunlich ist, da das SCCMS im Menschen einen dominanten Erbgang hat (Gomez and Gammack, 1995). Die möglichen Ursachen dafür werden später diskutiert.

Homozygote ϵ SC-Tiere nehmen nach dem postnatalen Tag 15 (P15) weniger Körpergewicht zu als WT-Tiere und heterozygote ϵ SC-Tiere. Ob das reduzierte Körpergewicht durch weniger Muskelmasse oder weniger Körperfett verursacht wird, bleibt noch zu klären.

Im Alter von etwa zwei Wochen erzeugen homozygote ϵ SC-Tiere ein atypisches Piepsen, das sich bei Aufregung oder Anstrengung der Tiere zu einer Art Schnappatmung steigert und schnell zu einer sichtlichen Erschöpfung der Tiere führt. Dieser phänotypische Effekt konnte bereits in ϵ -Knock-Out-Mäusen beobachtet werden, die ebenfalls myasthenische Symptome zeigen. (Schwarz et al., 2000; Schwarz, H. Dissertation 1999). Die Ursache der atypischen Lautgebung und Atemprobleme liegt wahrscheinlich in der reduzierten Muskelleistungen der Laryngealmuskulatur und der Muskeln, die zur Respiration benötigt werden. In CMS-Patienten konnten phonetische Veränderungen und respiratorische Defizite festgestellt werden, die zu schneller Erschöpfung führen (Rontal et al., 1978; Engel and Franzini-Armstrong, 1994).

VI.2.3. Die L269F-Mutation in der ϵ -Untereinheit führt in homozygoten ϵ SC-Tieren, wie in SCCMS-Patienten, zu morphologischen Veränderungen auf der muskulären Seite der NMJ

Die prä- und postsynaptische Morphologie der NMJ wurde mit verschiedenen histochemischen und immunhistochemischen Methoden an Diaphragmen und Soleusmuskeln untersucht. Dabei kamen konventionelle, Konfokale- und Elektronenmikroskope zum Einsatz. Die Fläche der postsynaptischen Membran der NMJ ist in der intakten Synapse durch Einfaltungen vergrößert. Sie ermöglichen die räumliche Trennung der AChR von spannungsgesteuerten Na^+ -Kanälen ($\text{Na}_v1.4$ -Kanäle). Postsynaptische Einfaltungen konnten in NMJ von adulten homozygoten ϵ SC-Tieren nicht gefunden werden. Hier war die subsynaptische Membran des Muskels flach.

Mit verschiedenen Methoden konnte gezeigt werden, dass zusätzlich zu dem Verlust der subsynaptischen Einfaltungen auch die Zahl der AChR in den NMJ reduziert ist. Dieser Prozess ist während der postnatalen Entwicklung homozygoter ϵ SC-Mäuse progressiv und führt zum Verlust der typischen geschlossenen Bretzel-Struktur der NMJ.

Weitere auffällige Veränderungen betreffen die subsynaptischen Zellorganellen der Muskelfasern homozygoter ϵ SC-Mäuse. Dazu gehören die Anhäufung postsynaptischer Vesikel, das Auftreten großer Vakuolen im subsynaptischen Sarkoplasma, und die massive Vergrößerung der Mitochondrien.

Auch einige subsynaptische Zellkerne zeigen morphologische Veränderungen. Sie sind mit elektronendichtem Material gefüllt. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um kondensiertes Chromatin, das bei der Degeneration von Zellkernen auftritt (Engel and Franzini-Armstrong, 1994).

Das Gesamtbild dieser morphologischen Veränderungen, also der Verlust der AChR, die Veränderung der Organellen des subsynaptischen Sarkoplasmas und Degeneration der subsynaptischen Zellkerne, wurde auch in Gewebe von SCCMS-Patienten gefunden und wird als Endplattenmyopathie bezeichnet (Engel et al., 2003b). Der einzige Unterschied, der in der Morphologie der Postsynapse zwischen dem Mausmodell und SCCMS-Patienten festgestellt werden konnte, ist der Grad des Rückgangs der postsynaptischen Einfaltungen. Im Menschen wird nur eine Reduktion der Einfaltungen der Membran beobachtet (Engel and Franzini-Armstrong, 1994), wohingegen die postsynaptische Membran in homozygoten ϵ SC-Tieren keine Einfaltungen mehr besitzt.

Wie hängen diese morphologischen Veränderungen im Muskel und auf der postsynaptischen Seite der NMJ mit dem SCCMS zusammen?

Die L269F-Mutation in der ϵ -Untereinheit bewirkt eine Verlängerung der Kanaloffenzeit des Rezeptors, die zu einer Verlängerung des Ioneneinstroms in den Muskel führt. Dadurch verlängert sich die als Endplattenpotential (EPC) bezeichnete Depolarisation des Muskels. Die Verlängerung des EPC kann zur Summation einzelner EPC führen, die das Auslösen eines Aktionspotentials im Muskel (compound muscle action potential, CMAP) erleichtert. Dadurch erhöht sich die Zahl der CMAPs (Engel et al., 2003a).

Zusätzlich wird der elektrische Schwellenwert, der erreicht werden muss, um ein CMAP auszulösen, durch den Verlust der postsynaptischen Einfaltungen verringert. Die Einfaltungen trennen in der gesunden NMJ die AChR räumlich von den spannungsgesteuerten $\text{Na}_v1.4$ -Kanälen, wodurch der elektrische Schwellenwert erhöht wird. In NMJ homozygoter ϵ SC-Tiere sind die Einfaltungen der postsynaptischen Membran verschwunden, was zusammen mit der Reduktion der AChR-Zahl zu einer Herabsetzung des elektrischen Schwellenwertes führt. Der verringerte Schwellenwert führt schließlich zu einer weiteren Zunahme der CMAPs (Engel et al., 2003a).

Diese gesteigerte postsynaptische Aktivität führt in subsynaptischen Bereichen der Muskelfasern zur massiven Akkumulation von Kationen, vor allem von Ca^{2+} (Gomez et al., 2002). Intrazelluläres Ca^{2+} wird von Zellorganellen, wie dem sarkoplasmatischem Retikulum und den Mitochondrien, gepuffert. Der Überschuss an Ca^{2+} könnte zu der beobachteten

Anreicherung postsynaptischer Vesikel und der Vergrößerung der Mitochondrien führen. Die Vesikel entspringen vermutlich dem sarkoplasmatischen Retikulum (Engel et al., 1982).

Die Ursache für die degenerativen Prozesse der Zellstruktur, wie der Verlust der subsynaptischen Einfaltungen und die Degeneration der Zellkern, werden ebenfalls mit den hohen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen in Verbindung gebracht und als Excitotoxizität bezeichnet (Choi, 1992). Die ungewöhnliche Steigerung der Ca^{2+} -Konzentration kann zur Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Enzymen wie DNasen, Phospholipasen oder Proteasen führen. Es gibt Hinweise, dass im Muskel die muskelspezifische Protease Calpain 3 aktiviert wird, die Schädigungen der Zellarchitektur bewirkt (Gomez et al., 2002). Vermutlich spielt auch die Anreicherung freier Radikale bei der Excitotoxizität eine Rolle (Choi, 1992).

Durch die L269F-Mutation konnte, im Gegensatz zu anderen SCCMS-Mutationen in der ϵ -Untereinheit, in Zellkulturversuchen keine Aktivierung apoptotischer Markerproteine beobachtet werden (Zayas et al., 2002).

Die Unterschiede im Reduktionsgrad der subsynaptischen Einfaltungen, die zwischen SCCMS-Patienten und homozygoten ϵ SC-Tieren bestehen, sind vermutlich auf die Unterschiede in der Zusammensetzung der AChR in der NMJ zurückzuführen. In homozygoten ϵ SC-Tieren sind nur Rezeptoren mit verlängerter Kanaloffenzeit in der NMJ vorhanden. In SCCMS-Patienten dagegen, die heterozygot für das ϵ -Allel sind, sind in den NMJ zwei Rezeptortypen nebeneinander vorhanden. Es wird sowohl die nicht mutierte ϵ -Untereinheit, als auch die ϵ L269F-Untereinheit in die Rezeptoren eingebaut. Betrachtet man die Gesamtaktivität aller AChR in der NMJ, ist sie demzufolge in homozygoten ϵ SC-Tieren höher als in Menschen, die für das ϵ -Allel heterozygot sind. Diese Unterschiede in der Zusammensetzung und daraus folgenden Gesamtaktivität der AChR führen vermutlich zu den Unterschieden in der Reduktion der subsynaptischen Einfaltungen.

Der Grund für die Reduktion der AChR an der Postsynapse ist noch nicht geklärt. Durch semiquantitative Analysen der ϵ -mRNA konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in adulten homozygoten ϵ SC-Tieren die Menge der ϵ -mRNA reduziert ist. Die Reduktion der ϵ -mRNA könnte zu einer Verminderung der AChR-Dichte in den NMJ führen. Experimentell bedingte Einflüsse, die durch die in das ϵ -Gen eingebrachte Targetingvektorsequenz ausgelöst werden, können hier jedoch nicht ausgeschlossen werden. So ist es möglich, dass entweder die cDNA, die in das Genom integriert wurde, das Spleißing der mRNA verändert oder die Stabilität der mRNA beeinflusst. Eine zuvor postulierte Möglichkeit, dass die AChR-Reduktion durch die Degenerierung der subsynaptischen Nuklei ausgelöst würde (Gomez et al., 2002), konnte widerlegt werden. Die Degenerierung der Nuklei hätte einen Rückgang

sämtlicher mRNAs zur Folge. Da in Muskeln von WT- und homozygoten ϵ SC-Tieren jedoch kein Unterschied in der α -mRNA Menge bestand, kann dies ausgeschlossen werden.

VI.2.4. Die L269F-Mutation führt zur Reduktion der Fläche der Kontaktstellen zwischen Nerv und Muskel, aber nicht zu einer Veränderung der Innervierung

Mit Hilfe immunhistochemischer Analysen wurde die Innervierung der NMJ des Diaphragmas untersucht.

Der Verlauf und die Morphologie der Motoraxone wurde mit einem Antikörper gegen Neurofilament, einem Intermediärfilament von Neuronen, untersucht. Motoraxone homozygoter ϵ SC-Tiere zeigen dabei keinen Unterschied zu denen von WT-Tieren. In adulten homozygoten ϵ SC-Tieren konnten keine degenerativen Merkmale der Motoraxone, wie „retraction bulbs“, gefunden werden, die entstehen, wenn NMJ zerstört werden und der Nerv sich zurückzieht. Eine komplette Auflösung von NMJ findet also nicht statt.

Die Kontaktstellen der motorischen Präsynapse mit dem Muskel wurden mit einem Antikörper gegen Synaptophysin, einem Membranprotein neuronaler Vesikel, markiert. Hierbei zeigte sich, dass die direkten Kontaktbereiche zwischen Motoraxon und Muskel in homozygoten ϵ SC-Tieren wie in WT-Tieren auf die Bereiche beschränkt sind, die den AChR-Clustern gegenüberliegen. Dadurch wird die Fläche dieser Kontaktbereiche verkleinert, weil die von den AChR bedeckte Fläche in homozygoten ϵ SC-Tieren durch die Reduktion der AChR verkleinert ist. Von den AChR-Clustern scheinen also retrograde Signale auszugehen, die Größe und Verteilung der synaptischen Kontaktstellen bestimmen.

Die zellulären Bestandteile der Nervenendigung, wie präsynaptische Vesikel, zeigen keine morphologischen Veränderungen, wie Anzahl der Vesikel oder Vesikelgröße. Das deutet darauf hin, dass die gesteigerte Aktivität der AChR keine Veränderungen in den subzellulären Bestandteilen der Nervenendigung bewirkt.

In Gewebeproben von SCCMS-Patienten konnten ebenfalls keine Veränderungen am präsynaptischen Teil der NMJ festgestellt werden (Engel and Franzini-Armstrong, 1994). Man kann davon ausgehen, dass vergleichbare strukturelle Veränderungen, die in den Nerv/Muskel-Kontaktstellen homozygoter ϵ SC-Mäuse gefunden werden, auch an den Kontaktstellen von SCCMS-Patienten vorliegen. Auf Grund der limitierten Probenmenge, die von SCCMS-Patienten gewonnen werden kann, konnten die bisherigen Untersuchungen an

humanem Gewebe nicht mit der gleichen Auflösung und Genauigkeit durchgeführt werden, wie sie am transgenen Mausmodell möglich sind.

VI.2.5. Die Anzahl der NMJ und ihre Position im Muskel ist in homozygoten ϵ SC-Tieren nicht verändert

Die NMJ sind in Muskeln, wie dem Diaphragma, median im synaptischen Band angeordnet. Mit Hilfe der Koelle-Färbung konnte AChE, und damit die NMJ, unabhängig von den AChR nachgewiesen werden.

Der Vergleich der Anordnung und Menge der NMJ zwischen WT-Tieren, heterozygoten und homozygoten ϵ SC-Tieren zeigt keine Veränderung. Die NMJ sind in allen drei Gruppen im medianen Teil des Diaphragmas angeordnet und es findet keine Reduktion der Anzahl der NMJ statt.

Die Positionierung der NMJ im synaptischen Band findet während der Embryonalentwicklung statt und ist abhängig von der synaptischen Aktivität der AChR (vgl. γ/ϵ FC-Mauslinie). Die mutierte ϵ -Untereinheit wird erst perinatal in die NMJ integriert, wenn die Positionierung der NMJ bereits abgeschlossen ist (Sakmann and Brenner, 1978;Witzemann et al., 1987;Witzemann et al., 1989;Witzemann et al., 1991;Kues et al., 1995a;Kues et al., 1995b). Deshalb können sich eventuelle Einflüsse, die die verlängerte Kanaloffenzeit der AChR auf die Aggregation der NMJ im synaptischen Band besitzt, nicht auswirken.

Die konstante Zahl der NMJ, die auch in homozygoten ϵ SC-Tieren gefunden wurde, zeigt, dass die Verlängerung der AChR-Offenzeit zwar zur Endplattenmyopathie, aber nicht zur völligen Auflösung von NMJ führt. Diese würde sich in der Reduktion der NMJ-Zahl und dem Rückzug der Motoraxone zeigen. Beides konnte nicht beobachtet werden.

VI.2.6. Der Verlauf des SCCMS ist in homozygoten ϵ SC-Tieren, wie im Menschen, progressiv

Die Symptome des SCCMS und die morphologischen Veränderungen nehmen während der postnatalen Entwicklung homozygoter ϵ SC-Tiere zu.

Während der frühen postnatalen Entwicklung (P5) können homozygote ϵ SC-Tiere nicht von heterozygoten ϵ SC- und WT-Tieren unterschieden werden. Sie zeigen keine abnormalen

Verhaltensweisen oder verändertes Aussehen und die Anordnung der AChR in den NMJ ist nicht verändert. Nur die Zahl der AChR ist etwas reduziert.

Während der weiteren Entwicklung nehmen die Symptome und morphologischen Veränderungen jedoch zu. Bereits bei P15 ist eine reduzierte Griffstärke und reduziertes Körpergewicht homozygoter ϵ SC-Tiere zu beobachten. Ab etwa P17 bilden sich nach und nach stärkere Symptome aus. Die Tiere geben zwitschernde Laute von sich, die bei Anstrengung und Aufregung zu sichtlicher Erschöpfung der Tiere führt. Mit steigendem Alter werden diese Symptome stärker. Zusätzlich bilden homozygote ϵ SC-Mäuse mit zunehmenden Alter einen Buckel aus, der auch bei anderen myasthenischen Mauslinien wie z.B. der konditionalen MuSK-Knock-Out-Mauslinie (Hesser, B. A. Dissertation 2000) oder der ϵ -Knock-Out-Mauslinie (Witzemann et al., 1996) beobachtet werden konnten.

Die Progressivität der Krankheit ist auch im Menschen typisch für SCCMS (Engel et al., 2003a). Zwei Ursachen können dafür verantwortlich gemacht werden. In der NMJ von Mäusen ist in der embryonalen und frühen postnatalen Phase die γ -Untereinheit an Stelle der ϵ -Untereinheit in den AChR integriert. Erst nach dem Untereinheitenaustausch, der in Mäusen perinatal beginnt und etwa im Alter von 2 Wochen abgeschlossen ist, ist die ϵ -Untereinheit, die die L269F-Mutation trägt, in die AChR integriert. Deshalb können in jungen ϵ SC-Tieren keine myasthenischen Symptome festgestellt werden. Im Menschen konnte die Relevanz des Untereinheitenaustauschs mit SCCMS nicht gezeigt werden, weil er Jahre vor dem Auftreten erster Krankheitsanzeichen im Menschen beendet ist. Die frühesten auffälligen Symptome für CMS konnten bei Menschen am Ende der ersten Lebensdekade beobachtet werden (Engel et al., 2003a).

Eine weitere Rolle könnten negative Langzeiteffekte spielen, die durch die permanent erhöhte Ca^{2+} -Konzentration entstehen. Dazu könnten z.B. falsch ablaufende second-messenger pathway Systeme zählen, in denen Ca^{2+} als Signalmolekül eine Rolle spielt. Die Progressivität könnte auch durch steigende intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen hervorgerufen werden. Es konnte gezeigt werden, dass mit zunehmendem Alter die Fähigkeit der Ca^{2+} -Speicherung in den Zellorganellen verringert wird (Satrustegui et al., 1996) und dadurch der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel ansteigt.

VI.2.7. Die Reduktion der MuSK- und Rapsyn-mRNAs in Muskeln adulter homozygoter ϵ SC-Tiere könnte zu der Veränderung des AChR-Clusterings führen

Die Untersuchung der mRNA-Mengen von MuSK und Rapsyn zeigten, dass beide mRNAs in Muskeln adulter homozygoter Tiere nur etwa halb so häufig vorhanden waren wie in Muskeln von WT-Tieren.

Die muskelspezifische Kinase MuSK spielt eine zentrale Rolle beim Clustering der AChR in der NMJ und bei der strukturellen Aufrechterhaltung der NMJ (DeChiara et al., 1996; Hesser, B. A. Dissertation 2000). Neuronal sezerniertes Agrin aktiviert MuSK, das über die Aktivierung von Src-Kinasen das Clustering der AChR in der NMJ bewirkt (Glass et al., 1996; Mohamed et al., 2001). Die Reduktion der MuSK-mRNA könnte Störungen im Clustering der AChR hervorrufen, die zu der veränderten Morphologie der AChR-Cluster führen könnte, wie sie sich im konfokalen Mikroskop darstellt.

Auch die Reduktion der Rapsyn-mRNA könnte einen Einfluss auf die Verteilung der AChR in der NMJ haben. Rapsyn liegt in der NMJ äquimolar mit den AChR vor und spielt bei der Verankerung der Rezeptoren am Cytoskelett eine Rolle (Apel et al., 1997; Gautam et al., 1995; Moransard et al., 2003).

Die Reduktion der MuSK- und Rapsyn-mRNA könnte entweder durch eine reduzierte Transkription oder durch gesteigerten Abbau der mRNAs hervorgerufen werden. Die Aktivität der AChR könnte also entweder einen Einfluss auf die Transkription oder die Stabilität der mRNA besitzen.

Um einen Zusammenhang deutlicher zeigen zu können, könnten zum einen Versuche mit der siRNA-Technik durchgeführt werden, durch die es möglich wäre, eine Verbindung zwischen reduzierten MuSK- und Rapsyn-mRNAs und morphologischen Veränderungen der AChR-Cluster zu beweisen. Auch die Untersuchung, wie sich die reduzierten mRNA-Mengen auf Proteinebene auf MuSK und Rapsyn auswirken, könnte weitere Aufschlüsse darüber liefern, ob ein Zusammenhang zwischen der MuSK- und Rapsyn-Expression und SCCMS besteht.

VI.2.8. Die ϵ -mRNA in ϵ SC-Tieren: im Gegensatz zum Menschen zeigen heterozygote ϵ SC-Tiere weder phänotypisch noch morphologisch myasthenische Symptome

SCCMS sind im Menschen generell dominant vererbte Krankheiten (Engel et al., 2003a). Das gilt auch für das SCCMS, das durch die L269F-Mutation in der ϵ -Untereinheit ausgelöst wird (Gomez and Gammack, 1995). Patienten, die Mutationen in beiden Genen der ϵ -Untereinheit tragen, die zu verlängerten Kanaloffenzeiten führen, sind bis heute nicht beschrieben. Heterozygote ϵ SC-Tiere zeigen im Gegensatz dazu weder phänotypisch noch morphologisch myasthenische Symptome. Der Grund dafür könnte sein, dass das in heterozygoten ϵ SC-Tieren veränderte ϵ SC-Allel im Vergleich zu dem WT-Allel schlechter exprimiert wird. Hinweise darauf konnten bei der Quantifizierung der ϵ -mRNA in Muskeln homozygoter ϵ SC-Tiere gefunden werden. In diesen Muskeln konnte im Vergleich zu Muskeln von WT-Tieren nur etwa die Hälfte der ϵ -mRNA gefunden werden. Auch in Muskeln zweier anderer Mauslinien, die mit dem gleichen Targetingvektor generiert worden waren, konnte die Reduktion der ϵ -mRNA festgestellt werden (Schwarz, H. Dissertation 1999). Dazu zählt eine Mauslinie, in der die Transmembrandomänen M1 bis M4 der ϵ -Untereinheit durch die der γ -Untereinheit ersetzt worden waren (ϵ/γ M1-M4) und die schwache myasthenische Symptome ausbildet. In einer zweiten Mauslinie wurde nur die zweite Transmembrandomäne M2 der ϵ -Untereinheit gegen die der γ -Untereinheit ausgetauscht (ϵ/γ M2) wobei diese Tiere keinerlei myasthenische Symptome zeigen. In homozygoten Tieren beider Mauslinien konnten reduzierte Mengen ϵ -mRNA nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen lassen zwei Schlussfolgerungen zu. Erstens bewirkt die Integration des Targetingvektors eine Reduktion der ϵ -mRNA, die jedoch zweitens nicht automatisch zu myasthenischen Symptomen führt.

Die Reduktion der ϵ -mRNA könnte durch schlechtere Transkription, Destabilisierung der mRNA oder verändertes Spleißing der mRNA hervorgerufen werden, da der Abschnitt zwischen Exon 7 und 12 aus cDNA, ohne Introns, besteht. Auch ein reduktiver Einfluss des Neomycin-Resistenzgens kann nicht ausgeschlossen werden.

Eine zusätzliche Reduktion der ϵ -mRNA, die möglicherweise durch die gesteigerte Aktivität des AChR ausgelöst wird, könnte durch genauere Vergleiche der mRNA-Mengen in Muskeln der drei Mauslinien analysiert werden.

VI.2.9. ϵ SC/ ϵ Tet-Tiere zeigen myasthenische Symptome und Veränderungen auf der postsynaptischen Seite der NMJ

Um zu untersuchen, ob das unerwartete Fehlen myasthenischer Symptome in heterozygoten ϵ SC-Tieren auf eine ungleiche Expression der beiden ϵ -Gene zurückzuführen ist, wurden homozygote ϵ SC-Männchen mit homozygoten Weibchen der ϵ Tet-Linie gekreuzt. In Tieren der ϵ Tet-Linie steht das ϵ -Gen unter der Kontrolle des Tet-Promotors (Güth, A.Dissertation1999). Ursprünglich sollte diese Mauslinie die Regulation des ϵ -Gens über Doxycyclin ermöglichen. Bei der Analyse der Mauslinie stellte sich jedoch heraus, dass das Gen nicht regulierbar war und eine konstante Expression des ϵ -Gens erfolgte. Im Unterschied zu WT-Tieren war die Expression des ϵ -Gens auf mRNA- und Proteinebene auf etwa 60% reduziert. Phänotypische oder morphologische Veränderungen konnten an Tieren dieser Mauslinie nicht beobachtet werden.

In den heterozygoten ϵ SC/ ϵ Tet-Nachkommen, die durch die Kreuzung von homozygoten ϵ Tet- und ϵ SC-Tieren entstanden, sollte der Anteil der ϵ SC-mRNA im Verhältnis zur ϵ -mRNA gesteigert sein. So sollten die Expressionsnachteile ausgeglichen werden, die das mutierte Allel vermutlich gegenüber dem WT-Allel in heterozygoten ϵ SC-Tieren hat.

Alle ϵ SC/ ϵ Tet-Tiere zeigen myasthenische Symptome. Sie sind schwächer und leichter als WT-Tiere, scheinen aber nicht so schwer erkrankt zu sein wie homozygote ϵ SC-Tiere. Sie zeigen wie homozygote ϵ SC-Tiere reduzierte AChR-Mengen in den NMJ.

Die Ergebnisse dieser Kreuzungsversuche beweisen, dass die reduzierte Expression des ϵ SC-Gens für das unerwartete Fehlen phänotypischer Veränderungen in heterozygoten ϵ SC-Tieren verantwortlich ist. Die schwächer exprimierte, aber in ihrer Sequenz unveränderte, ϵ -Untereinheit ist nur in der Lage die myasthenischen Symptome leicht abzuschwächen. Tiere der ϵ SC/ ϵ Tet-Linie stellen eine Verbesserung des ϵ SC-Mausmodells dar, und sind näher als homozygote ϵ SC-Tiere an der genetischen und physiologischen Situation, die in SCCMS-Patienten herrscht.

Weitere Analysen dieser Tiere sind erforderlich. Mit der Elektronenmikroskopie kann der Grad der morphologischen Veränderungen an der NMJ untersucht werden. mRNA-Quantifizierungen können Aufschluss über die Anteile der WT-mRNA und ϵ SC-mRNA geben und mit Einzelkanalmessungen können die Anteile der ϵ WT- bzw. ϵ SC-Untereinheiten bestimmt werden, die in die AChR-Komplexe der NMJ integriert sind.

VI.2.10. Die ϵ SC-Mauslinie im Vergleich mit einer transgenen Mauslinie

Die L269F-Mutation wurde bereits in einem transgenen Mausmodell für das SCCMS benutzt, bei dem die mutierte DNA durch Pronukleusinjektion in das Genom der transgenen Mauslinie eingebracht wurde (Gomez et al., 1996; Gomez et al., 1997; Gomez et al., 2002). Bei der Generierung transgener Mauslinien hat die Pronukleusinjektion gegenüber der homologen Rekombination den Nachteil, dass nur zusätzliches genetisches Material eingeführt werden kann, wobei das endogene Gen unbeeinflusst bleibt. Desweiteren integriert das eingebrachte Plasmid zufällig und mit unterschiedlichen Kopienzahlen in das Genom, was zu kopienzahl- und ortsabhängigen Expressionsschwankungen führt. Bei der Generierung einer transgenen Mauslinie durch homologe Rekombination wird das endogene genetische Material durch das neu eingebrachte ersetzt. Das macht die Knock-In-Mauslinie vergleichbarer mit der genetischen Situation in SCCMS-Patienten.

In das Genom der von Gomez et al. beschriebenen transgenen Mauslinie ist die ϵ -Untereinheit mit der L269F-Mutation zwischen 2 und 25 mal integriert (Gomez et al., 1997). Sie steht unter der Kontrolle des muskelspezifischen Muskelkreatinkinase Promotors, was auf transkriptioneller Ebene schließlich zu einer 8 bis 64 fachen Überexpression des mutierten ϵ -Allels führt.

Die Tiere zeigen nur schwache phänotypische Veränderungen gegenüber WT-Tieren. So ist die Atmung der Tiere ab einem Alter von 6 bis 8 Wochen beschleunigt und ab einem Alter von etwa 5 Monaten „scheinen transgene Tiere einen reduzierten Erkundungstrieb zu besitzen“ (Gomez et al., 1997). Der bei diesen Tieren durchgeführte Dowel-Perch-Test zur Untersuchung der Kraft und Geschicklichkeit zeigte, dass transgene Tiere nur etwa 50% des bei WT-Tieren gemessenen Wertes erreichen konnten (Gomez et al., 1997).

Homozygote ϵ SC- und ϵ SC/ ϵ Tet-Tiere zeigen ausgeprägtere phänotypische Veränderungen, wie die atypische zwitschernde Lautgebung und Erschöpfungserscheinungen. Die myasthenischen Symptome setzen bei diesen Tieren bereits in der zweiten bis dritten Lebenswoche ein. Die Ergebnisse des Dowel-Perch-Tests zeigen zumindest bei homozygoten ϵ SC-Tieren eine stärkere Reduktion (auf etwa 10%) als bei den transgenen Tieren von Gomez et al.. Für ϵ SC/ ϵ Tet-Tiere ist mit ähnlichen Ergebnissen zu rechnen.

Sowohl die von Gomez et al. beschriebene Mauslinie als auch die homozygoten ϵ SC-Tiere zeigen im Elektronenmikroskop degenerative Veränderungen, die als Endplattenmyopathie bezeichnet werden. Die Kennzeichen in homozygoten ϵ SC-Tieren scheinen, insbesondere im Bezug auf die postsynaptischen Einfaltungen, stärker ausgeprägt zu sein als in transgenen Tieren.

Eine Reduktion der AChR, wie sie in SCCMS-Patienten gezeigt wurde (Engel and Franzini-Armstrong, 1994), wurde in den transgenen Tieren nicht beschrieben (Gomez et al., 1997). Der Grund dafür ist vermutlich die transkriptionelle Überexpression der mutierten ϵ -Untereinheit in diesen transgenen Tieren. Genregulatorische Veränderungen, die durch die Verlängerung der Kanaloffenzeit bewirkt werden könnten, spielen in diesen Tieren keine Rolle. Dies könnte auch ein Grund für die geringe Ausprägung der myasthenischen Symptome sein, die zumindest teilweise durch eine reduzierte Expression der AChR ausgelöst werden könnten.

VI.2.11. Die Ausprägung myasthenischer Symptome nimmt mit der Steigerung der Aktivität des adulten AChR zu

In unserem Labor wurden mit Hilfe der homologen Rekombination bereits verschiedene Mutationen in das ϵ -Gen von Mäusen eingeführt (Witzemann et al., 1996; Schwarz, H. Dissertation 1999; Schwarz et al., 2000). Unter anderem wurde dabei der Einfluss untersucht, den die Verlängerung der Kanaloffenzeit des AChR auf die Bildung und Aufrechterhaltung der NMJ hat.

Zwei Mauslinien dienten diesen Untersuchungen. In der ϵ/γ M2-Linie wurde die Transmembrandomäne M2 der ϵ -Untereinheit durch die der γ -Untereinheit ersetzt, was zu einer Verlängerung der Kanaloffenzeit führt (Herlitze, S. Dissertation 1994; Herlitze et al., 1996). In der ϵ/γ M1-M4-Linie wurden alle vier Transmembrandomänen der ϵ -Untereinheit durch die der γ -Untereinheit ersetzt und damit die Kanaloffenzeit weiter verlängert. In der ϵ SC-Mauslinie konnte die Kanaloffenzeit im Vergleich zu der ϵ/γ M1-M4-Linie noch weiter verlängert werden.

Die phänotypischen Veränderungen steigern sich mit der Zunahme der Kanaloffenzeit. Die Verlängerung der Kanaloffenzeit in homozygoten ϵ/γ M2-Tieren reichte nicht aus, um phänotypische oder morphologische Veränderungen herbeizuführen (Schwarz, H. Dissertation 1999).

Durch eine weitere Verlängerung der Kanaloffenzeit in homozygoten ϵ/γ M1-M4-Tieren konnten morphologische Veränderungen erreicht werden. Die Tiere zeigten eine reduzierte Dichte der AChR in der NMJ und progressive Reduktion der subsynaptischen Einfaltungen, die im kompletten Verlust der Einfaltungen resultierte. Trotz dieser morphologischen Degenerationen waren die phänotypischen Veränderungen homozygoter ϵ/γ M1-M4-Tiere nur schwach ausgeprägt. In Griffstärke-Tests konnten keine signifikanten Unterschiede zu WT-

Tieren festgestellt werden. Auch eine atypische Lautgebung homozygoter ϵ/γ M1-M4-Tiere konnte nur in abgeschwächter Form beobachtet werden.

In den ϵ SC-Tieren wurde die Kanaloffenzeit des adulten AChR durch Einführung der L269F-Mutation in die ϵ -Untereinheit weiter verlängert. Morphologisch konnten in homozygoten ϵ SC-Tieren im Vergleich zu homozygoten ϵ/γ M1-M4-Tieren zusätzlich zu dem Verlust der subsynaptischen Einfaltungen auch weitere degenerative Anzeichen, wie Anreicherung postsynaptischer Vesikel, abnormale Vakuolen und die Degeneration mancher Zellkerne, beobachtet werden. Analog dazu ist die phänotypische Expression der myasthenischen Symptome in homozygoten ϵ SC-Tieren deutlich ausgeprägter als in ϵ/γ M1-M4-Tieren.

Der Vergleich der drei Mauslinien zeigt, dass die morphologischen und phänotypischen Veränderungen in der NMJ von dem Grad der Aktivitätssteigerung des AChR abhängig sind. Einflüsse durch strukturelle Veränderungen, die bei den Fusionsproteinen aus der ϵ - und γ -Untereinheit hätten auftreten können, können durch die ϵ SC-Mauslinie ausgeschlossen werden. Andererseits zeigen die ϵ/γ M2-Tiere, in denen keine Reduktion der AChR festgestellt werden konnte, dass die Reduktion der AChR in homozygoten ϵ SC-Tieren nicht auf Problemen bei der Expression des mutierten ϵ -Gens beruht, die eventuell durch die eingeführten Veränderungen der genomischen Sequenz entstehen könnten.

VI.2.12. Zukünftige Projekte mit der ϵ SC-Mauslinie

Die bisherigen phänotypischen Analysen der ϵ SC-Mäuse konnten zeigen, dass homozygote ϵ SC-Tiere an CMS leiden. Zukünftig sollen Untersuchungen durchgeführt werden, in denen Laufräder eingesetzt werden, um den konditionellen Zustand der ϵ SC-Tiere festzustellen. Auch die weiteren phänotypischen Analysen der ϵ SC/ ϵ Tet-Tiere sind in Vorbereitung.

Ein Schwerpunkt soll künftig auch auf die Progressivität der morphologischen Veränderungen während der postnatalen Entwicklung gelegt werden. So sind weitere altersabhängige Untersuchungen der Ultrastruktur der NMJ und der mRNA-Mengen geplant. In Zusammenhang mit der Quantifizierung der mRNA-Mengen eignet sich die ϵ SC-Mauslinie auch für Analysen mit Hilfe von cDNA-Microarrays, mit denen die Expression einer Vielzahl von Genen untersucht werden kann. Dabei könnte besonderes Augenmerk auf den Vergleich der Expressionsunterschiede zwischen Tieren der ϵ SC-, der ϵ/γ M2 und der ϵ/γ M1-M4-Mauslinie gelegt werden. Der genauere Vergleich dieser drei Mauslinien könnte sowohl

offene Fragen der physiologischen und genetischen Veränderungen bei SCCMS beantworten, als auch generelle Prozesse bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der NMJ aufklären.

Die eventuellen positiven morphologischen Effekte, die durch Langzeitgaben von Medikamenten wie Quinidin auftreten könnten (Sieb et al., 1996), könnten an ϵ SC-Tieren untersucht werden. Auch neue Medikamente zur Behandlung von SCCMS könnten zukünftig an ϵ SC-Tieren getestet werden.

Physiologische und genetische Erkenntnisse, die zukünftig durch diese Tiere gewonnen werden, sind nicht nur auf die NMJ und SCCMS beschränkt. Mechanismen, die dem SCCMS zugrunde liegen, könnten auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Epilepsie und Schlaganfall eine Rolle spielen.

VI.3. Die Aufklärung der Ursachen und Mechanismen von Erbkrankheiten wie den congenitalen myasthenischen Syndromen

Die L269F-Mutation in der ϵ -Untereinheit des AChR und das durch sie hervorgerufene myasthenische Syndrom sind ein gutes Beispiel für die Vorgehensweise, die zu der kompletten Aufklärung der Ursachen und Mechanismen von Erbkrankheiten führen kann.

Zuerst wurde die Krankheit in Patienten entdeckt und durch klinische Untersuchungen festgestellt, dass erworbene Faktoren, wie autoimmune Vorgänge oder Intoxikationen, nicht die Ursache für den Ausbruch der Krankheit sind. Nachdem diese Möglichkeiten ausgeschlossen werden konnten, folgten genetische Analysen. Dadurch konnte die L269F-Mutation in der ϵ -Untereinheit des AChR identifiziert werden (Gomez and Gammack, 1995).

Die Mutation wurde in rekombinante cDNA eingeführt und ermöglichte so die Expression und elektrophysiologische Analyse *in vitro*. Durch diese Untersuchungen war es möglich, den direkten Zusammenhang zwischen der Mutation und der Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften des Rezeptors zu beweisen (Gomez et al., 2002). In diesem Fall bewirkt die Mutation die Verlängerung der Kanaloffenzeit. In vorangegangenen Untersuchungen anderer Mutationen in der ϵ -Untereinheit des AChR konnte gezeigt werden, dass die Verlängerung der Kanaloffenzeit zu morphologischen Veränderungen im postsynaptischen Teil der NMJ führt, die als Endplattenmyopathie bezeichnet werden (Engel et al., 1982; Engel and Franzini-Armstrong, 1994).

Die Untersuchung der physiologischen und genetischen Ursachen für die Krankheit *in vivo* wurde durch die Generierung transgener Mauslinien ermöglicht (Gomez et al., 2002). Momentan gibt es zwei Möglichkeiten, transgene Mäuse zu generieren. Für die Untersuchung dieser genetisch verursachten Krankheiten scheint die Technik der homologen Rekombination in ES-Zellen (Knock-In) der Injektion in den Pronukleus überlegen zu sein. Die Vorteile liegen in der Substitution des endogenen genetischen Materials und der Genexpression, die in Knock-In Mauslinien vergleichbarer mit der genetischen Expression ist, die in SCCMS-Patienten besteht. Neben der Untersuchung der genetischen und physiologischen Ursachen für SCCMS, die an diesen Tieren *in vivo* möglich ist, können auch allgemeine Mechanismen, die zu der Entstehung und Aufrechterhaltung der NMJ eine Rolle spielen, aufgeklärt werden.

Der Weg, der bei der Erforschung des SCCMS eingeschlagen wurde, also klinische und genetische Analysen am Menschen, gefolgt von *in vitro* Experimenten und schließlich die Generierung transgener Mauslinien, kann als Beispiel dienen, wie auch die Ursachen und Mechanismen anderer Erbkrankheiten erforscht und aufgeklärt werden können.

VII. Methoden

VII.1. Molekularbiologische Methoden

VII.1.1. Molekularbiologische Standardmethoden

Standardmethoden der Molekularbiologie, wie Schneiden von DNA mittels Restriktionsendonukleasen, Transformation, Ligation, Dephosphorylierung von DNA-Enden oder Elektrophorese von DNA in Agarosegelen, wurden nach Standardprotokollen des Laborhandbuchs Maniatis (Maniatis et al., 1987) durchgeführt. Die Methoden werden im Folgenden nicht weiter behandelt.

VII.1.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurden entweder das „Qiaprep Miniprep Kit“ für geringe Mengen Plasmid-DNA (bis 20 µg) oder das „Qiagen Maxi Kit“ (beides Qiagen) für große Mengen Plasmid-DNA (bis 500 µg) benutzt.

VII.1.3. Isolierung von DNA aus Agarosegelen und Aufreinigung von PCR Produkten

DNA wurde aus Agarosegelen mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kits“ isoliert. Zur Aufreinigung von PCR Produkten und DNA-Dephosphorylierungsansätzen wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ (beides Qiagen) benutzt.

VII.1.4. Ligation von PCR-Fragmenten in TOPO-Vektoren

Die Ligation von PCR-Fragmenten in „TOPO-Vektoren“ (Invitrogen) erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die TOPO-Ligation ermöglicht eine Insertion eines PCR-Fragments direkt in einen Vektor, ohne es vorher mit Restriktionsenzymen spalten zu müssen.

VII.1.5. Isolierung von genomischer embryonaler Stammzell-(ES-Zell) DNA und genomischer DNA aus Schwanz-Biopsien von Mäusen

Für die Isolierung von genomischer DNA aus ES-Zell Klonen wurde das „DNeasy 96 Tissue Kit“ (Qiagen) benutzt. Mit diesem Kit konnten 96 DNA-Proben, die mittels PCR analysiert werden sollten, auf einmal aufgereinigt werden. Nach der selben Methode wurde genomische DNA aus Schwanz-Biopsien von Mäusen isoliert. Sollte genomische ES-Zell-DNA mittels Restriktionsanalyse untersucht werden, wurde sie mit dem „Blood & Cell Culture DNA Maxi Kit“ (Qiagen) isoliert.

VII.1.6. Isolierung von genomischer Maus-DNA aus Gewebe

Zur Isolierung genomischer DNA aus Gewebe wurden 100 mg einer Mausleber zunächst in flüssigem Stickstoff gefroren und mit Stößel und Mörser zerkleinert. Dazu wurden anschließend 300 µl Lysepuffer und 2 µl Proteinase K [20 mg/ml] gegeben und die Probe für 2 h bei 50°C inkubiert. Nach einer zweiten Inkubation bei 37°C (ÜN) wurden 300 µl 5 M LiCl und 600 µl Chloroform zu der Lösung gegeben und 30 min gemischt. Die Probe wurde für 15 min mit 13000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert und die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1 ml abs. Ethanol und 15 minütiger Zentrifugation (13000 rpm) wurde die genomische DNA präzipitiert, mit 70% Ethanol gewaschen (Zentrifugation 5 min, 13000 rpm) und nach 10 min Trocknen in 100-200 µl H₂O aufgenommen.

Lysepuffer:

100 mM	NaCl
50 mM	Tris/HCl pH 8,0
1%	SDS
50 mM	EDTA

VII.1.7. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem „Big Dye Terminator Mix“ (ABI) und dem Kapillar-Sequenzierer „3730 DNA Analyzer“ (ABI).

VII.1.8. Erzeugung gerichteter Mutationen

Gerichtete Mutationen wurden mit Hilfe des „Site Directed Mutagenesis Kits“ (Stratagene) nach Angaben des Herstellers in Plasmide eingeführt.

VII.1.9. In vitro cRNA-Synthese

cRNA, die später in *Xenopus laevis* (*X.laevis*) Oocyten injiziert werden sollte, wurde mit dem „mMessage mMachine Kit“ (Ambion) nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Die so hergestellten RNA Produkte besitzen am 5'-Ende ein 7-Methyl-Guanosin-Analog als „Cap“-Struktur, die für eine effektive eukaryotische Translation benötigt wird.

VII.1.10. PCR-Analyse genomischer Maus-DNA

Die PCR-Analyse genomischer DNA wurde zur Identifizierung von ES-Zell-Klonen, die die gewünschte homologe Rekombination trugen, benutzt. Außerdem wurde die Genotypisierung transgener Tiere über PCR-Analyse durchgeführt.

Zur Analyse der ES-Zell-Klone wurde der 5'-Primer so gewählt, dass er in einem Teil des Targetingvektors positioniert war, der in der genomischen Sequenz nicht vorhanden war. Der 3'-Primer dagegen lag in einem Teil der genomischen Sequenz, der durch den Targetingvektor nicht verändert wurde. Dadurch wurde sichergestellt, dass die PCR nur ein DNA Produkt ergab, wenn die gewünschte homologe Rekombination erfolgt war.

Die Analyse der Schwanz-Biopsien von transgenen Tieren erfolgte in zwei getrennten PCRs, eine Reaktion zum Nachweis des Wildtyp-Allels (WT-Allels) und eine zum Nachweis des rekombinierten Allels.

Da die genomische DNA im 96-Well Format isoliert wurde, wurde die Konzentration der einzelnen Proben nicht bestimmt und für die PCR ein festes Volumen eingesetzt. Nach der Reaktion wurden 25 µl des jeweiligen Ansatzes auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

PCR-Ansatz:

25 µl genomische ES-Zell-DNA
 bzw.
 1 µl genomische DNA aus
 Schwanz Biopsien
 8 µl dNTPs [je 1,25mM]
 2 µl 5'-Primer [125ng/µl]
 2 µl 3'-Primer [125ng/µl]
 5 µl 10x Hot Star Taq Buffer
 0,5 µl Hot Star Taq Polymerase
 ad 50 µl H₂O

γ/εFC-Linie:

Schwanz-Biopsie Analyse:

Programm:

15 min	95°C)	32x
45 s	94°C		
45 s	60°C)	
1 min 30 s	72°C)	
10 min	72°C)	

Primer:

WT: 5' mg F 187
 3' mg R 536
 Knock-In: 5' mg F 187
 3' me 785 r

ES-Zell Analyse:

Programm:

15 min	95°C)	45x
45 s	94°C		
45 s	60°C)	
3 min	72°C)	
10 min	72°C)	

Primer:

5' 1002/9106 F
 3' 1002/10381 R

εSC-Linie:

Schwanz-Biopsie Analyse:

Programm:

15 min	95°C)	32x
45 s	94°C		
45 s	60°C)	
2 min	72°C)	
10 min	72°C)	

Primer:

WT: 5' cDNA 912 s
 3' neo WT2 rev
 Knock-In: 5' RS1
 3' ES/R 1990

ES-Zell Analyse:

Programm:

15 min	95°C)	35x
45 s	94°C		
45 s	62°C)	
3 min	72°C)	
10 min	72°C)	

Primer:

5' TVneo2 for
 3' ES/R 2029

εTet-Linie:

Schwanz-Biopsie Analyse:

Programm:

15 min	95°C)	35x
45 s	94°C		
45 s	60°C)	
45 s	72°C)	
10 min	72°C)	

Primer:

Knock-In: 5' E prom 3290 F
 3' 880-1708 R

VII.1.11. Southern-Blot

Southern-Blots wurden durchgeführt, um genomische oder über PCR amplifizierte DNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran zu transferieren.

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA in einem 1%igen Agarosegel wurde das Gel 2x 15 min in Denaturierungspuffer inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation für 2x 15 min in Neutralisierungspuffer. Equilibriert wurde das Gel für 5 min in 20x SSC. Der Transfer der DNA auf Nylonmembran (Biodyne A 0,2 µm, PALL, bei genomischer DNA oder Hybound N⁺, Amersham, bei PCR-Analysen) erfolgte ÜN im Kapillarblot-Verfahren. Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 min in 6x SSC inkubiert. Die transferierte DNA wurde durch zweimalige Bestrahlung mit UV-Licht (UV Stratalinker, Stratagene) an die Membran gekoppelt. Daraufhin wurde die an die Membran gebundene DNA mit radioaktiv- oder fluoreszenz-gekoppelten DNA-Sonden hybridisiert.

Denaturierungspuffer:

0,5 M NaOH
1,5 M NaCl

20x SSC:

3 M NaCl
0,3 M Na₃Citrat
pH 7,0

Neutralisierungspuffer:

1 M Tris/HCl pH 6,0
1,5 M NaCl

VII.1.12. Hybridisierung des Southern-Blots mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Radioaktiv markierte Sonden wurden benutzt, um nach Restriktionsspaltung genomischer DNA spezifische Fragmente nachzuweisen.

4 Ansätze mit je 10-100 ng Sonden-DNA wurden mit dem „Random Primed DNA Labeling Kit“ (Boehringer) mit 50 µCi α-³²P-dCTP markiert. Nach Aufreinigung der Sonde über Spin Columns (Biorad) wurde sie für 5 min bei 96-100°C denaturiert.

Die Membran, auf die die genomische DNA transferiert worden war, wurde für mindestens 30 min in NTX-Puffer bei 42°C vorhybridisiert, und anschließend mit mindestens 1x10⁶ cpm radioaktiv markierter Sonde für mindestens 10 h bei 42°C inkubiert.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran mit einer absteigenden Pufferreihe (1x SSC/0,1% SDS, 0,5x SSC/0,1% SDS und 0,1x SSC/0,1% SDS) je 2 mal für 15 min bei 42°C gewaschen, wobei die Signalstärke nach jedem Waschschrift mit einem Handmessgerät bestimmt wurde. Die Exposition erfolgte auf Biomax MS (Kodak) in signalverstärkenden Röntgenfilmkassetten für 10 h bis 5 d.

NTX-Puffer:

255 ml	99% Formamid
125 ml	20x SSC
50 ml	1 M NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ pH 7,0
25 ml	100x Denhardts Solution
5 ml	20% SDS
5 ml	10 mg/ml Herings-Sperma- DNA
ad 500 ml H ₂ O	

VII.1.13. Hybridisierung des Southern-Blots mit fluoresceinmarkierten DNA-Sonden

PCR amplifizierte DNA wurde mit Fluorescein markierten DNA-Sonden spezifisch nachgewiesen. Als Sonden dienten entweder Oligonukleotide, die bereits am 3'-Ende mit Fluorescein markiert waren (MWG), oder ein isoliertes DNA-Fragment (50 ng) das mit dem „ECL Labeling Kit“ (Roche) am 3'-Ende mit Fluorescein markiert wurde.

Nachdem die Membran für mindestens 30 min bei 60°C in Hybridisierungspuffer vorinkubiert worden war, wurde die markierte Sonde dazugegeben. Die Hybridisierung erfolgte entweder 1-4 h bei 50°C (Oligonukleotid als Sonde) oder ÜN bei 60°C (DNA-Fragment als Sonde).

Anschließend wurde die Membran bei Verwendung von Oligonukleotiden 1x für 15 min bei 60°C mit 1x SSC/0,1% SDS gewaschen, oder bei Verwendung eines DNA-Fragments zunächst 2x für 15 min bei 60°C mit 1x SSC/0,1% SDS und anschließend erneut 2x für 15 min bei 60°C mit 0,5x SSC/0,1% SDS gewaschen.

Danach wurde die Membran für 1 min bei RT in Puffer A äquilibriert, und freie Bindestellen der Membran für 30 min mit in Puffer A 1:20 verdünntem “Liquidblock” (Amersham) geblockt. Zum Nachweis des an die Sonde gekoppelten Fluoresceins dienten monoklonale Horseradish-Peroxidase (HRP) gekoppelte anti-Fluorescein-Antikörper (AK) (Amersham), die 1:1000 in 0,5%BSA/Puffer A verdünnt wurde. Die Inkubation des AK erfolgte für 30 min bei RT. Anschließend wurde die Membran 2x 10 min und 2x 5 min in 0,1%Tween20/Puffer A gewaschen.

Der Nachweis der HRP erfolgte mit “Super Signal” (Pierce) und Hyperfilm-ECL (Biorad), wobei die Expositionszeit je nach Stärke des Signals zwischen 1 s und 10 min betrug.

Hybridisierungspuffer:		Puffer A:	
25 ml	20x SSC	100 mM	Tris/HCl pH 7,5
0,5 ml	20% SDS	600 mM	NaCl
1 ml	10 mg/ml Herings-Sperma-DNA		
25 ml	20% Dextransulfat		
5 ml	Liquidblock		
ad 100 ml H ₂ O			

VII.1.14. RNA-Isolierung aus Gewebe

Total RNA wurde aus Gewebe mittels der Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987) isoliert. Hierfür wurden 0,25 g Gewebe in 5 ml 4 M Guanidiniumisothiocyanat (GITC) mit dem Polytron (Kinematic) homogenisiert. Dazu wurden 500 µl 2 M Na-Acetat, 5 ml Phenol und 2 ml Chloroform gegeben. Nach 15 min auf Eis wurde die Probe für 20 min mit 4000 rpm zentrifugiert. Die sich dabei bildende wässrige Phase wurde mit 6 ml Isopropanol versetzt und für 1 h bei -20°C inkubiert, um die RNA zu präzipitieren. Die Probe wurde für 30 min bei 9000 rpm (4°C) zentrifugiert (JS13.1-Rotor, Beckman). Das dabei entstehende Präzipitat wurde in 1,5 ml 4 M GITC resuspendiert, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach einer Inkubation von 1 h bei -20°C wurde die RNA mit 13000 rpm in der Tischzentrifuge präzipitiert und anschließend in 200 µl H₂O^{DEPC} resuspendiert.

Um Degradationen der RNA vorzubeugen, wurde sie als ethanolisches Präzipitat, durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat und 2,5 Volumen Ethanol, bei -20°C gelagert.

VII.1.15. Reverse Transkription (RT) PCR

Transkriptmengen verschiedener mRNAs aus Mausmuskeln wurden mittels RT-PCR ermittelt.

VII.1.15.1. Reverse Transkription

Zunächst wurden 5 µg total RNA aus Mausmuskeln mit dem Kit „DNA-free“ (Ambion) nach Angaben des Herstellers von Resten genomischer DNA befreit. Das Endvolumen dieser Reaktion war 70 µl. Die RNA wurde durch Zugabe von 6 µl 3 M Na-Acetat und 150 µl abs. EtOH präzipitiert. Dazu wurde sie 5 min bei -20°C inkubiert und anschließend für

10 min bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Das RNA-Präzipitat wurde in 10 µl H₂O^{DEPC} gelöst, indem es 5 min bei 68°C inkubiert wurde.

Die RNA-Lösung wurde mit dem RT-Ansatz gemischt und 1 µl Reverse Transkriptase (Invitrogen) zugegeben [200 U/µl]. Die RT-Reaktion dauerte 1 h bei 37°C. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase durch 5 min Inkubation bei 95°C inaktiviert.

RT-Ansatz:

4 µl	5x RT-Puffer (Invitrogen)
2 µl	0,1 M DTT
1 µl	RNA-Guard
1 µl	dNTPs [4 µM]
1 µl	pd(N ₆)-Primer

VII.1.15.2. Quantitative PCR

Die relative Quantifizierung der Transkriptmengen erfolgte mit den cDNAs aus der RT-Reaktion. Um sicherzustellen, dass vergleichbare Mengen Gesamt-cDNA für die Reaktion eingesetzt wurden, wurde von jeder Probe zunächst eine Reaktion mit Primern, die GAPDH-cDNA amplifizierten, durchgeführt und das in den folgenden Reaktionen eingesetzte Volumen der Probe entsprechend angepasst.

Die Zyklenzahl der einzelnen Reaktionen wurde so gewählt, dass die Reaktion im Anfangsbereich der exponentiellen Amplifikationsphase war, und wurde in Vorversuchen bestimmt.

25 µl der jeweiligen Ansätze wurden auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, digital fotografiert und die Bandenstärke mit Hilfe des Programms IPLab Gel (Scanalytics) quantifiziert.

PCR-Ansatz:

x µl	cDNA-Lösung
8 µl	dNTPs [je 1,25 mM]
5 µl	Hot Star Puffer
0,5 µl	Hot Star Taq Polymerase
1 µl	5'-Primer [20 µM]
1 µl	3'-Primer [20 µM]
ad 50µl H ₂ O	

GAPDH-cDNA:

Programm:

15 min	95°C	} 22x
45 s	94°C	
45 s	57°C	
1 min	72°C	

Primer:

5'	GAPDH for
3'	GAPDH rev

εAChR-cDNA (eSC-Linie):

Programm:

15 min	95°C	} 32x
45 s	94°C	
45 s	57°C	
1 min	72°C	

Primer:

5'	me f 368
3'	e 306 r

εAChR-cDNA (g/eFC-Linie):

Programm:

15 min	95°C	} 31x
45 s	94°C	
45 s	63°C	
1 min	72°C	

Primer:

5'	244 F
3'	384 R

γAChR-cDNA:

Programm:

15 min	95°C	} 28x
45 s	94°C	
45 s	60°C	
1 min	72°C	

Primer:

5'	mg F 187
3'	mg R 536

αAChR-cDNA:

Programm:

15 min	95°C	} 25x
45 s	94°C	
45 s	63°C	
1 min	72°C	

Primer:

5'	ma 502 F
3'	ma 970 r

γ/εAChR-cDNA:

Programm:

15 min	95°C	} 32x
45 s	94°C	
45 s	55°C	
1 min	72°C	

Primer:

5'	g/e 241 for
3'	mg/e 555 rev

MuSK-cDNA:

Programm:

15 min	95°C	} 26x
45 s	94°C	
45 s	65°C	
1 min	72°C	

Primer:

5'	msk2.2053.for
3'	msk2.2648.rev

Rapsyn-cDNA:

Programm:

15 min	95°C	} 26x
45 s	94°C	
45 s	65°C	
1 min	72°C	

Primer:

5'	m43k.240.for
3'	m43k.1318.rev

VII.2. Zellbiologische Methoden

VII.2.1. Injektion von cRNA in *X.laevis* Oocyten

Die Injektion von cRNA in *X.laevis* Oocyten diente zur Expression und anschließender Analyse von Acetylcholinrezeptoren durch konventionelle Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemme oder Einzelkanalmessungen. Sie erfolgte nach der Methode von Methfessel (Methfessel et al., 1986). Die Injektionskapillare wurde mit Hilfe eines vertikalen Pipettenziehgeräts hergestellt und hatte einen Spitzendurchmesser von 10 bis 15 μm .

Pro Oocyte wurden 50 nl einer cRNA-Lösung mit einer Konzentration von etwa 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ cRNA injiziert. Die Konzentration der cRNA-Proben wurden abgeschätzt, indem je 2 μl der cRNA-Lösungen auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, die cRNA-Banden digital fotografiert und computergestützt (IPLab Gel, Scanalytics) quantifiziert wurden. Zur Expression der cRNA wurden die Oocyten für 2-3 d bei 19°C in Oocyten-Ringerlösung inkubiert. Vor der Analyse wurde die Follikelmembran, die die Oocyten umgibt, durch 15 minütige Inkubation der Oocyten bei 19°C in Kollagenase-Ringerlösung entfernt. Sollten die Einzelkanalströme der Rezeptoren analysiert werden, musste zusätzlich die fibröse Vitellinhülle der Oocyten entfernt werden. Dazu wurden die Oocyten in eine hypertonische „Stripping“-Lösung gelegt. Aufgrund des Zusammenschrumpfens der Oocyten ließ sich die Vitellinhülle mechanisch entfernen. Nach diesem Vorgang wurden die Oocyten erneut in Oocyten-Ringerlösung inkubiert.

Oocyten-Ringerlösung:

82,5 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
1 mM	CaCl ₂
1 mM	MgCl ₂
1 mM	Na ₂ HPO ₄
5 mM	HEPES
0,5%	Polyvinylpyrrolidon
30 µg/ml	Penicillin
69 µg/ml	Streptomycin
pH 7,2	

„Stripping“-Lösung:

200 mM	K-Aspartat
20 mM	KCl
1 mM	MgCl ₂
10 mM	EGTA
10 mM	HEPES
pH 7,4	

Kollagenase-Ringerlösung:

82,5 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
1 mM	MgCl ₂
1 mM	Na ₂ HPO ₄
5 mM	HEPES
0,5%	Polyvinylpyrrolidon
500 U/ml	Kollagenase IA (Sigma)
pH 7,5	

VII.2.2. Immunhistochemische Färbung von Mausdiaphragmen

Diaphragmen, die Mäusen entnommen worden waren, wurden mit Antikörpern (AK) oder fluoreszenzmarkiertem Bungarotoxin (Bgtx.) inkubiert, um neuromuskuläre Synapsen oder Neurone sichtbar zu machen. Die so behandelten Diaphragmen konnten mit einem Fluoreszenzmikroskop bzw. einem konfokalen Mikroskop untersucht werden.

Diaphragmen, an denen ein bis zwei Rippenbögen bei der Präparation zunächst belassen wurden, wurden mit Insektennadeln in Schalen fixiert und für 90 min in 1% Formaldehyd/PBS (Phosphate buffered saline) inkubiert. Nachdem das Diaphragma einmal in PBS gewaschen worden war, erfolgte eine Inkubation für 15 min in 0,1 M Glycin/PBS.

Jetzt konnten die restlichen Rippenbögen und eventuell vorhandenes Bindegewebe entfernt werden, ohne dass sich die Muskelfasern zusammengezogen hätten. Um die Fasern zu permeabilisieren und damit für AK zugänglich zu machen, wurde das Diaphragma ÜN bei 4°C in 0,5% Triton/PBS inkubiert.

Die Inkubation mit dem Primäantikörper erfolgte ebenfalls ÜN bei 4°C in 2% BSA/PBS. Um ungebundenen Antikörper zu entfernen, wurde das Präparat 3x für mindestens 20 min mit 2% BSA/PBS gewaschen. Der Sekundäantikörper bzw. Bgtx. wurde ÜN bei 4°C in 2% BSA/PBS mit dem Diaphragma inkubiert. Das Diaphragma wurde erneut 3x in

2% BSA/PBS für je mindestens 20 min gewaschen. Schließlich wurde das Präparat mit Citifluor/Glycerin (Agar Scientific) zwischen einem Objektträger und einem Deckglas eingebettet und das Deckglas mit durchsichtigem Nagellack versiegelt.

PBS:		Antikörper und Toxine mit Verdünnungsangaben:
137 mM	NaCl	Neurofilament: 1:500
2,7 mM	KCl	Synaptophysin: 1:50
4,3 mM	Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	Bungarotoxin (1 mg/ml): 1:500
1,4 mM	KH ₂ PO ₄	Fasciculin (0,5 µg/ml): 1:2
pH 7,3		

VII.2.3. Nachweis von Acetylcholinesterase (AChE) in Muskeln nach Koelle (Koelle and Friedenwald, 1949)

Durch den Nachweis der AChE konnte die Anzahl und die Verteilung der neuromuskulären Synapsen (NMJ) im Muskel im Lichtmikroskop untersucht werden.

Das Muskelpräparat wurde für 90 min in Färbelösung inkubiert und anschließend mit H₂O gewaschen. Durch Inkubation für 20 min in 5 mM Kaliumhexacyanoferrat bildete sich an den Synapsen ein bräunlicher Niederschlag. So behandelte Präparate konnten auf einem Objektträger eingebettet und im Mikroskop untersucht werden.

Acetat-Puffer:		Färbelösung (frisch ansetzen):	
150 mM	CH ₃ COOH	9 ml	Acetatpuffer
350 mM	Na-Acetat	1 ml	Glycin-Kupfersulfat-Lösung
Glycin-Kupfersulfat-Lösung:		30 mg	Acetylcholin-Jodid
500 mM	Glycin		
100 mM	CuSO ₄		

VII.2.4. ¹²⁵I-α-Bungarotoxin-Bindungsstudien

¹²⁵I-α-Bgtx. wurde benutzt, um die Expression und die Aggregation der AChR in mit cRNA injizierten *X.laevis* Oocyten oder in Maus-Diaphragmen zu untersuchen und zu quantifizieren.

VII.2.4.1. ¹²⁵I-α-Bungarotoxin-Bindungsstudien an *X.laevis* Oocyten

Durch ¹²⁵I-α-Bgtx.-Bindungsstudien an *X.laevis* Oocyten ließen sich die Aggregationseigenschaften mutierter AChR untersuchen.

Die injizierten Oocyten wurden für 2 bis 4 h in $1,6 \mu\text{M}$ ^{125}I - α -Bgtx./Oocyten-Ringerlösung bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden sie 3x für 20 min und einmal ÜN bei 4°C mit Oocyten-Ringerlösung gewaschen. Das gebundene ^{125}I - α -Bgtx. wurde mit Hilfe des Cobra-Gamma-Counters (Packard) gemessen.

VII.2.4.2. ^{125}I - α -Bungarotoxin-Bindungsstudie an Maus-Diaphragmen

Die ^{125}I - α -Bgtx.-Bindungsstudie an Maus-Diaphragmen diente der Quantifizierung der AChR im synaptischen Band des Diaphragmas.

VII.2.4.2.1. Bindung von ^{125}I - α -Bungarotoxin an die AChR der Diaphragmen

Präparierte Diaphragmen, an denen 1 bis 2 Rippenbögen belassen wurden, um eine Kontraktion der Muskelfaser zu verhindern, wurden zunächst in $1,6 \mu\text{M}$ ^{125}I - α -Bgtx./PBS ÜN bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden sie 2x für 20 min und einmal ÜN mit ca. 150 ml PBS gewaschen. Die Fixierung des Gewebes erfolgte bei 4°C ÜN in 1% Formaldehyd/PBS. Jetzt konnte das Diaphragma von den Rippen abpräpariert und in Klarsichtfolie eingeschlagen werden. Die Exposition erfolgte für 30 min auf Phospho-Imager Platten (Fuji). Die Signale wurden mit dem Phospho-Imager BAS-1800 (Fuji) ausgelesen.

VII.2.4.2.2. Quantifizierung der AChR-Dichte

Die autoradiographischen Signale wurden mit Hilfe des Programms Image-Gauge (Fuji) oder ImageJ quantifiziert. Dazu wurde die Pixelintensität von runden Abschnitten synaptischer und extrasynaptischer Bereiche gemessen (siehe Abb. VII-1). Der Mittelwert der Pixelintensitäten von extrasynaptischen Bereichen wurde von dem der synaptischen Bereiche abgezogen. Wurden Diaphragmen an verschiedenen Tagen analysiert, wurde der Zerfall des radioaktiven Materials korrigierend eingerechnet.

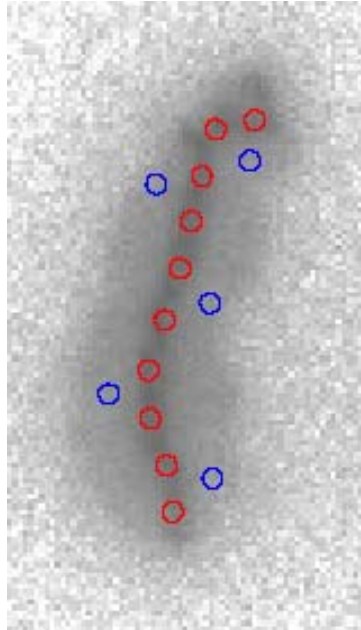


Abb. VII-1: Autoradiographie eines Hemidiaphragmas.

Die Quantifizierung der AChR erfolgte über die Messung der Pixelintensität runder Abschnitte. Extrasynaptische Bereiche (blau) wurden als Hintergrundkorrektur von den synaptischen Bereichen abgezogen.

VII.2.5. Arbeiten mit embryonalen Stammzellen (ES-Zellen)

VII.2.5.1. Herstellung von Feederzellen

Primäre Fibroblasten aus Mausembryonen wurden auf einer mit 0,1% Gelatine behandelten Schale ausplattiert und in Fibroblastenmedium bei 37°C mit 10% CO₂ für 5 bis 7 d inkubiert. Anschließend wurden Subkulturen der Fibroblasten hergestellt, indem sie auf vier neue Schalen verteilt wurden. Dieser Vorgang ließ sich im Abstand von 5 bis 7 d bis zu sechsmal wiederholen. Von jeder Subkultur wurden 1 bis 2 Schalen nicht weitergeführt, sondern die Fibroblasten durch Mitomycin C-Behandlung in der S-Phase arretiert, um sie als Feederzellen für ES-Zellen benutzen zu können. Die Mitomycin C Behandlung erfolgte mit 10 µg/ml Mitomycin/PBS für 4 h bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und konnten bei -20°C eingefroren oder direkt für die Kultivierung von ES-Zellen benutzt werden.

Fibroblastenmedium:

4,5 g	Glucose
5 ml	Penicillin/Streptomycin (100 U/ml)
5 ml	Glutamin (2 mM)
10%	Fötales Kälberserum (FCS, Gibco)
ad 11	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco)

VII.2.5.2. Transfektion von ES-Zellen

Die Transfektion der ES-Zellen erfolgte durch Elektroporation. ES-Zellen der Linie 14-1 wurden mit ES-Zell-Medium auf einer mit Feederzellen beschichteten Schale ausplattiert. Bei 37°C und 10% CO₂ wurden die Zellen für 5 d vermehrt, wobei das Medium jeden Tag gewechselt wurde. Nach 5 Tagen wurden die Zellen mit Trypsinmedium behandelt und anschließend dreimal mit PBS gewaschen.

Für die Elektroporation, die mit etwa 30 µg linearisierter DNA durchgeführt wurde, wurden die ES-Zellen in 700 µl PBS resuspendiert. Die Elektroporation erfolgte für 2,5 ms bei 300 V (Impulsgenerator EPI 2500, Intergen). Die ES-Zellen wurden nach der Elektroporation für 10 min im Eisbad gekühlt und anschließend auf eine mit Feederzellen beschichtete Schale ausplattiert. Das ES-Zell-Medium wurde jeden Tag gewechselt. 2 d nach der Elektroporation begann mit G418 [350 µg/ml] die Selektion auf die Neomycinresistenz, die die ES-Zellen durch den Targetingvektor erhalten haben sollten.

ES-Zell Medium:

100 U/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin
2 mM	L-Glutamin
1 mM	Natriumpyruvat
15%	FCS
100 U/ml	LiF
0,1 µM	β-Mercaptoethanol
ad 11	DMEM

Trypsinmedium:

2,5 g	Trypsin
0,4 g	EDTA
1 g	Glucose
3 g	Tris
ad 11	PBS

VII.3. Elektrophysiologische Methoden

VII.3.1. Zwei-Elektroden Spannungsklemme

Die Zwei-Elektroden Spannungsklemme erlaubt die Ganzzelleableitung des Gesamtzellstroms von Oocyten, in die zuvor cRNA, die für die AChR Untereinheiten codieren, injiziert wurde. Dadurch war es möglich, die Auswirkung der Mutationen, die in die Rezeptoruntereinheiten eingeführt wurden, funktionell zu analysieren.

Die verwendeten Mikropipetten wurden aus Borsilikatglas mit einem vertikalen Pipettenziehgerät (Hamill et al., 1981) gezogen und mit 3 M KCl gefüllt. Die Pipette der Spannungselektrode hatte einen Spitzendurchmesser von ca. 1 μm , die Pipette der Stromelektrode einen Spitzendurchmesser von 3-5 μm .

Für die Ganzzelleableitungen wurde ein konventioneller Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmverstärker verwendet (Neher and Sakmann, 1976). Durch die Stromelektrode, die neben der Spannungselektrode in die Oocyte injiziert wurde, wird eine definierte Spannung von -70 mV an die Membran der Oocyte angelegt. Dabei lag die Oocyte in einer Reaktionskammer, die kontinuierlich mit Oocyten-Ringerlösung perfundiert wird. Die Spannungselektrode dient der Messung des Membranpotentials der Oocyte.

Die AChR öffneten sich, sobald die Reaktionskammer mit Oocyten-Ringerlösung, die eine definierte Konzentration ACh (0,1-1000 μM) enthielt, perfundiert wurde. Dadurch änderte sich die Membranspannung der Oocyte, was von der Spannungselektrode registriert und über die Stromelektrode mittels eines Kompensationsstroms wieder ausgeglichen wurde. Die registrierte Änderung der Membranspannung wurde mit einem Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemm-Verstärker verstärkt, in digitale Impulse umgewandelt und mit dem Programm Pulsefit (HEKA) digital aufgezeichnet.

Die weitere Analyse der aufgezeichneten Ströme erfolgte mit Hilfe des Programms IgorPro (Wavemetrics).

VII.3.2. Einzelkanalmessungen an *X.laevis* Oocyten

Die Analyse der Kanaloffenzeiten des AChR wurde mit der Patch-Clamp Technik an injizierten *X.laevis* Oocyten durchgeführt (Neher and Sakmann, 1976).

Die Einzelkanalströme wurden von sogenannten „inside-out membrane patches“ gemessen. Die „membrane patches“ wurden aus den Oocyten herausgetrennt, nachdem die

Vitellinschicht entfernt worden war. Die Messungen wurden in Messpuffer durchgeführt, mit dem ebenfalls die Messpipette gefüllt war. Zusätzlich enthielt die Pipette 1 μM bis 60 μM ACh. Die Stromkurven wurden mit einem 4 poligen Besselfilter eines Axopatch 200B-Verstärkers (Axon Instruments) mit 5 kHz vorgefiltert und mit einem DTR-1205 Rekorder (Biologic) auf DAT-Band gespeichert. Die Kurven wurden mit 20 kHz digitalisiert und mit Hilfe des Programms IgorPro (Wavemetrics), für das selbst geschriebene Macros verwendet wurden, analysiert.

Messpuffer:

145 mM	KCl
5 mM	EGTA
10 mM	HEPES
pH 7,0	

VII.3.3. Einzelkanalmessungen an Mausmuskeln

Durch Einzelkanalmessung direkt am Mausmuskel sollte gezeigt werden, dass die genetischen Veränderungen die erwarteten physiologischen Veränderungen der AChR auslösen.

Zuvor getöteten Mäusen wurden die Fußmuskeln beider Hinterbeine entnommen. Die Muskelfasern wurden vereinzelt, indem sie für 1 h mit Kollagenase IA [2mg/ml] (Sigma) in Rattenringerlösung behandelt und anschließend durch eine Pipettenspitze gesaugt wurden. Die vereinzelt Fasern wurden mit einer Differential-Interferenzkontrast-Optik eines inversen Mikroskops sichtbar gemacht (siehe Abb. VII-2). Einzelkanalströme wurden im „cell-attached“ Modus bei $22 \pm 1^\circ\text{C}$ aufgezeichnet, wobei die Pipette mit „Extracellular Solution“ gefüllt war und einen Widerstand von 5 bis 10 $\text{M}\Omega$ besaß. Die Spitze wurde zusätzlich mit definierten Konzentrationen ACh gefüllt.

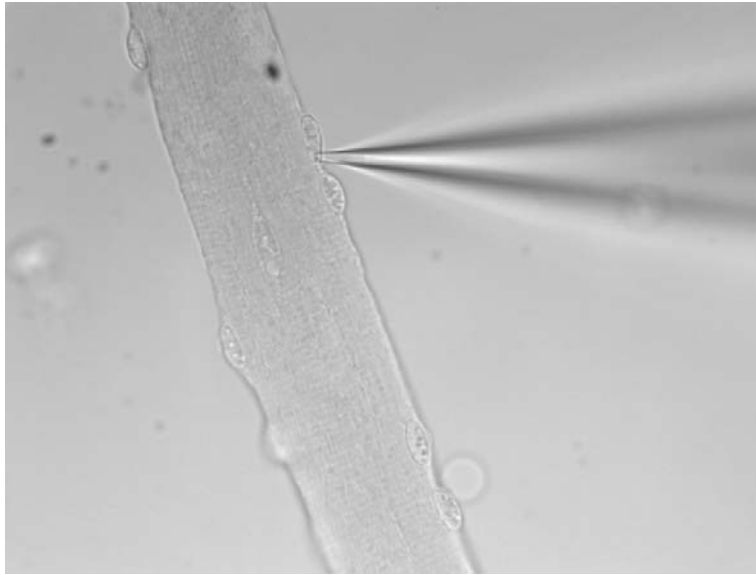


Abb. VII-2: Mikroskopische Aufnahme einer Mausmuskelfaser und der Pipette bei Einzelkanalmessungen.

In der mikroskopischen Aufnahme ist die isolierte Muskelfaser, die von oben nach unten verläuft, zu erkennen. Die Spitze der Messpipette wird an die Muskelfasermembran gedrückt.

Extracellular Solution:

135 mM NaCl
5,4 mM KCl
1,8 mM CaCl₂
1 mM MgCl₂
5 mM HEPES
pH 7,2

Rattenringerlösung:

135 mM NaCl
5,5 mM KCl
1 mM MgCl₂
1,8 mM CaCl₂
5 mM HEPES
pH 7,2

VII.4. Arbeiten mit Mäusen

VII.4.1. Kraftmessung der Vorderextremitäten von Mäusen *in vivo*

Die Kraftmessung der Vorderextremitäten *in vivo* ist eine Methode, mit der man Kraftunterschiede zwischen Mäusen quantifizieren kann. Die Messung ist frühestens 15 d nach der Geburt möglich, da jüngere Tiere sich nicht spontan an einem Haltegriff festhalten. Zur Ermittlung der Griffstärke wurde ein digitales Newtonmeter (Columbus Instruments) benutzt, an dem ein triangelförmiger Haltegriff befestigt war (siehe Abb. VII-3)(Meyer et al., 1979; Masu et al., 1993). Die zu untersuchende Maus wurde an der Schwanzwurzel gehalten und an den Haltegriff herangeführt. Hatte sich die Maus mit beiden Vorderpfoten an dem Haltegriff festgehalten, wurde sie gleichmäßig horizontal nach hinten gezogen, bis sie den

Griff losließ. Dieser Vorgang wurde mit jeder Maus fünfmal wiederholt, wobei das Newtonmeter den höchsten erreichten Wert aufzeichnete.



Abb. VII-3: Kraftmessung der Vorderextremitäten von Mäusen.

Mäuse wurden an der Schwanzwurzel gehalten. Sie griffen mit den Vorderpfoten einen Haltegriff, der mit einem Newtonmeter verbunden war. Die Maus wurde horizontal gezogen, bis sie den Griff losließ.

VII.4.2. Präparation von Gewebe aus der Maus

Mäuse wurden zunächst mit CO₂ betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Die Muskeln, wie das Diaphragma oder der Soleusmuskel, wurden freipräpariert und in mit Sylgard beschichtete und Rattenringerslösung gefüllte Schälchen mit Insektennadeln fixiert.

VII.5. Mikroskopische Methoden

VII.5.1. Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie ermöglicht es, Bilder in einer definierten Ebene des Präparates aufzunehmen, die anschließend entweder einzeln oder als zweidimensionale Projektion einer Bilderserie ausgewertet werden können.

Zur Aufnahme konfokaler Bilder wurde das Mikroskop Leica TCS NT (Leica Microsystems) mit Objektiven mit 10x, 40x oder 63x Vergrößerung verwendet.

Die Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte mit einem Argon-Krypton-Laser bei einer Wellenlänge von entweder 488 nm für Grünfluoreszenzen oder 566 nm für Rotfluoreszenzen. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit Hilfe eines digitalen Photomultipliers. Zur Darstellung der Aufnahmen wurde die TCS NT Software (Leica, Microsystems) benutzt.

VII.5.2. Elektronenmikroskopie

Sämtliche elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden von Gewebeproben aus dem Soleusmuskel angefertigt.

VII.5.2.1. Fixieren und Einbetten des Gewebes

Der Soleusmuskel wurde präpariert und mit zwei Insektennadeln in einer mit Sylgard beschichteten Schale gespannt. Um den Muskel zu fixieren, wurde er für 1 h in 4% PFA/PBS inkubiert und anschließend 2x kurz in PBS gewaschen. Synapsenreiche Muskelabschnitte wurden markiert, indem der Muskel für 30 min in 1:500 verdünntem Rhodamin-Bgtx./PBS inkubiert wurde. Diese Abschnitte wurden mit Hilfe einer Stanze, die an dem Mikroskop angebracht war, oder einem Skalpell isoliert.

Die Gewebeprobe wurde ÜN in Fixative inkubiert (4°C) und anschließend 2-3 h mit PBS bei 4°C gewaschen. Zur weiteren Fixierung wurde die Probe zunächst 2 h in 2% OsO₄/1,5% K₃Fe(CN)₆ inkubiert und anschließend für 2-3 h in H₂O gewaschen. Eine erste Kontrastierung des Gewebes erfolgte durch ÜN Inkubation in 0,4% Uranylacetat bei 4°C, gefolgt von 3x 20 min waschen in H₂O. Die Probe wurde dehydriert, indem sie je 30 min in 30%, 50% 70% und schließlich 2 mal 15 min in abs. EtOH inkubiert wurde. Um die Proben einzubetten, wurden sie zunächst 3 h in Spurr/Ethanol 1:1, anschließend ÜN in Spurr/Ethanol

3:1 (4°C) und schließlich 3 h in absolutem Spurr inkubiert. Die Probe wurde in frisches absolutes Spurr überführt, das bei 70°C für 48 h ausgehärtet wurde.

Fixative:		Spurr:	
2,5%	Glutaraldehyd	10 g	ERL-4221D
2%	PFA	6 g	DER-736
0,1 M	Cacodylat	26 g	NSA
pH 7,4			

VII.5.2.2. Schneiden und Kontrastieren des eingebetteten Gewebes

Die eingebetteten Gewebeproben wurden an der Schnittseite abgeschliffen, so dass eine gerade Schnittfläche entstand. An dieser Schnittfläche wurden mit Hilfe eines Mikrotoms und eines Diamantmessers etwa 80 nm dicke Ultradünnschnitte angefertigt, die auf Kupfernetzchen (Plano) aufgezogen wurden. Die Kupfernetzchen wurden zuvor mit 1% Formvarfilm/Chloroform (Plano) beschichtet. Vor der folgenden Kontrastierung der Proben wurden sie kurz an der Luft getrocknet.

Die Kontrastierung erfolgte mit einer gesättigten Uranylacetatlösung für 20 min. Anschließend wurden die Proben 4x kurz mit H₂O gewaschen und luftgetrocknet. Die endgültige Kontrastierung wurde durch eine etwa 5 min Inkubation mit Reynolds-Bleicitrat erreicht. Schließlich wurden die Proben erneut 4x mit H₂O gewaschen und gut getrocknet.

VIII. Material

VIII.1. Chemikalien

Chemikalien stammen, falls nicht abweichend angegeben von der Firma Roth (Heidelberg, Deutschland).

VIII.2. Enzyme

VIII.2.1. Restriktionsenzyme

Alle benutzten Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (Beverly, MA, USA) bezogen.

VIII.2.2. Polymerasen

Hot Star Taq Polymerase	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Pfu DNA Polymerase	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
Reverse Transcriptase	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

VIII.3. Primer, Oligonukleotide und synthetisierte Sonden

Die benutzten Primer, Oligonukleotide und synthetisierten Sonden wurden entweder in der hauseigenen Syntheseabteilung oder von MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) hergestellt. Sämtliche Sequenzen sind in 5'-3' Orientierung angegeben. Nukleotide, die bei einer Mutagenesereaktion einen Basenaustausch einführten, sind kursiv geschrieben.

Oligonukleotid	Sequenz	Modifikation
1002/10381 R	GTC CAG GGT CAG GCA AAC AG	-
1002/10480R	AGG GGG GTG TGT GTG AGG TA	-
1002/9106 F	AGG GCC AGC TCA TTC CTC	-
244 F	GAT TGG CAT TGA CTG GCA CG	-
384 R	CCA CTC CAA ACT GCC CAT C	-
520 alpha for	ATG ACG GCT CTG TGG TGG	-

Oligonukleotid	Sequenz	Modifikation
880-1708 R	CTT CTG GGG GAG TTT ACG G	-
970 alpha rev	CGG TGG TGT GTG TTG ATG AC	-
cDNA 912 s	CTC TGA GCG TGC CAc TGC TG	-
e 1458 f	GTG GAA CTA AGA TGG CTG C	-
e 306 r	AGC CAC AAA GTT CAC AGC ATC	-
E Prom 3290 F	GGA TTA GGT GAC AGT CCC	-
Eg 160 r	CTG GTC TCA GAC CTT TTC CC	-
eps P121L for	GAG CTG GTT GCC CCT AGC CAT CTA CCG CAG C	-
eps P121L rev	GCT GCG GTA GAT GGC TAG GGG CAA CCA GCT C	-
ES/R 1990	GTT CGG GGA TCC TCT GGG	-
ES/R 2029	CAG AAT GCC CAC AGA CGA G	-
gam P121L for	CTA CTG GCT GCC GCT TGC CAT CTT CCG C	-
gam P121L rev	GCG GAA GAT GGC AAG CGG CAG CCA GTA G	-
GAPDH for	TGT CTT CAC CAC CAT GGA A	-
GAPDH rev	CGG CCA TCA CGC CAC AGC TT	-
m43k.1318.rev	GAA AGA TGT GGG AGC AGG G	-
m43k.240.for	GGT GTG GAT GAA GGT GCT G	-
me 785 r	CAG AAA TGA GCA CGC AAG G	-
me f 368	GAT GGG CAG TTT GGA GTG G	-
me L269F for	CCA GAC TGT CTT CTT GTT TTT CAT TGC CCA GAA AAT TCC	-
me L269F rev	GCA ATT TTC TGG GCA ATG AAA AAC AAG AAG ACA GTC TGG	-
me5end Probe	CCT CTC CCC CTT TTA TTC CCA TCC CTC AGC CTC CCA GAG CAG CAC CTC TA	3'-Fluorescein
mg Exon 4 for	GGT GCG ACT ATC GCC TGC GC	-
mg F 187	GAT GCG AAA CTA CGA CCC C	-
mg F 689	ACA GAG ATT GGG GAG TGG G	-
mg R 536	AGG AGG AGC GGA AGA TGG	-
msh2.2053.for	CGA AGT ATG TCC CCG CAC	-
msh2.2648.rev	GTT CCC TCT GCT CTC TCG C	-
neo WT2 rev	CCA CCC CTG GGC AGT ACT TT	-
RS 1	TAC GGT ATC GCC GCT CCC GAT TCG CA	-
TVneo1 rev	GCG CAT GCT CCA GAC TGC CTT GG	-
TVneo2 for	CCA CAT ACA CTT CAT TCT CAG	-

VIII.4. Kit-Systeme

Bio-Spin chromatography Columns	Biorad (Hercules, CA, USA)
DNA-free	Ambion (Austin, TX, USA)
DNeasy 96 Tissue Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
mMessage mMachine	Ambion (Austin, TX, USA)
QIAGEN Blood & Cell Culture DNA Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAGEN Plasmid Purification	Qiagen (Hilden, Deutschland)

QIAprep Miniprep	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche (Mannheim, Deutschland)
Super Signal	Pierce (Rockford, IL, USA)
TOPO TA Cloning	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

VIII.5. Grössenmarker

Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker,3	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)

VIII.6. Radioaktive Isotope

I^{125} - α -Bungarotoxin und P^{32} - γ -dCTP wurden von Amersham (Little Chalfont, England) bezogen.

VIII.7. Puffer, Lösungen und Medien

Big Dye Terminator Mix	ABI (Foster City, CA, USA)
Citifluor	Agar Scientific (Stansted, England)
DER-736	Serva (Heidelberg, Deutschland)
DMEM	Gibco/Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
dNTPs	Pharmacia (Erlangen, Deutschland)
ERL-4221D	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Eukitt	O. Kindler GmbH (Freiburg, Deutschland)
FCS	Gibco/Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Liquidblock	Amersham (Little Chalfont, England)
NSA	Serva (Heidelberg, Deutschland)
PBS	Gibco/Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
pd(N ₆)-Primer	Pharmacia (Erlangen, Deutschland)
RNA-Guard	Pharmacia (Erlangen, Deutschland)

VIII.8. Antikörper und Toxine

Bodypie-Bungarotoxin	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
Bodypie-Goat-anti-Rabbit-IgG	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
Rabbit-anti-Neurofilament	Chemicon (Temecula, CA, USA)
Rabbit-anti-Synaptophysin	Zymed (San Francisco, CA, USA)
Rhodamin-Bungarotoxin	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
Rhodamin-Goat-anti-Rabbit-IgG	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)

VIII.9. Geräte

3730 DNA-Analyzer	ABI (Foster City, CA, USA)
Axopatch-200B Verstärker	Axon Instruments (Union City, CA, USA)
DAT-Rekorder	Biologic (Münster, Deutschland)
Elektronenmikroskop EM 400	Phillips (Deutschland)
EPI 2500 Impulsgenerator	Intergen (Heidelberg, Deutschland)
Fräse EM-trim	Leica Microsytems (Heidelberg, Deutschland)
Konfokales Mikroskop TCS NT	Leica Microsystems (Heidelberg, Deutschland)
Kryostat	Bright (Huntingdon, England)
Microtom Reichert-Ultracut	Leica Microsytems (Heidelberg, Deutschland)
Newtonmeter	Columbus Instruments (Columbus, OH, USA)
Phospho-Imager BAS-1800	Fuji (Düsseldorf, Deutschland)
Polytron	Kinematic (Littau, Schweiz)

VIII.10. Software

IgorPro	Wavemetrics (Lake Oswego, OR, USA)
IPLab	Scanalytics (Fairfax, Va, USA)
IPLab Gel	Scanalytics (Fairfax, Va, USA)
Pulsefit	HEKA (Lambrecht, Deutschland)

IX. Referenzen

1. Apel ED, Glass DJ, Moscoso LM, Yancopoulos GD, Sanes JR (1997) Rapsyn is required for MuSK signaling and recruits synaptic components to a MuSK-containing scaffold. *Neuron* 18: 623-635.
2. Balass M, Katchalski-Katzir E, Fuchs S (1997) The alpha-bungarotoxin binding site on the nicotinic acetylcholine receptor: analysis using a phage-epitope library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6054-6058.
3. Barchan D, Kachalsky S, Neumann D, Vogel Z, Ovadia M, Kochva E, Fuchs S (1992) How the mongoose can fight the snake: the binding site of the mongoose acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7717-7721.
4. Brandon EP, Lin W, D'Amour KA, Pizzo DP, Dominguez B, Sugiura Y, Thode S, Ko CP, Thal LJ, Gage FH, Lee KF (2003) Aberrant patterning of neuromuscular synapses in choline acetyltransferase-deficient mice. *J Neurosci* 23: 539-549.
5. Brejc K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der OJ, Smit AB, Sixma TK (2001) Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* 411: 269-276.
6. Choi DW (1992) Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23: 1261-1276.
7. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.
8. Colquhoun D, Sakmann B (1998) From muscle endplate to brain synapses: a short history of synapses and agonist-activated ion channels. *Neuron* 20: 381-387.
9. DeChiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM, Simmons MV, Poueymirou WT, Thomas S, Kinetz E, Compton DL, Rojas E, Park JS, Smith C, DiStefano PS, Glass DJ, Burden SJ, Yancopoulos GD (1996) The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* 85: 501-512.
10. Del Castillo J, Katz B (1954) The effect of magnesium on the activity of motor nerve endings. *J Physiol* 553-559.
11. Engel AG, Franzini-Armstrong C (1994) Myasthenic Syndromes. In: *Myology* pp 1798-1836.
12. Engel AG, Lambert EH, Mulder DM, Torres CF, Sahashi K, Bertorini TE, Whitaker JN (1982) A newly recognized congenital myasthenic syndrome attributed to a prolonged open time of the acetylcholine-induced ion channel. *Ann Neurol* 11: 553-569.
13. Engel AG, Ohno K, Sine SM (2003a) Congenital myasthenic syndromes: progress over the past decade. *Muscle Nerve* 27: 4-25.
14. Engel AG, Ohno K, Sine SM (2003b) Sleuthing molecular targets for neurological diseases at the neuromuscular junction. *Nat Rev Neurosci* 4: 339-352.

15. Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156.
16. Fatt P, Katz B (1951) An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. *J Physiol* 320-370.
17. Fatt P, Katz B (1952) Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol* 109-128.
18. Fertuck HC, Salpeter MM (1976) Quantitation of junctional and extrajunctional acetylcholine receptors by electron microscope autoradiography after ¹²⁵I-alpha-bungarotoxin binding at mouse neuromuscular junctions. *J Cell Biol* 69: 144-158.
19. Fu AK, Fu WY, Cheung J, Tsim KW, Ip FC, Wang JH, Ip NY (2001) Cdk5 is involved in neuregulin-induced AChR expression at the neuromuscular junction. *Nat Neurosci* 4: 374-381.
20. Gautam M, Noakes PG, Moscoso L, Rupp F, Scheller RH, Merlie JP, Sanes JR (1996) Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell* 85: 525-535.
21. Gautam M, Noakes PG, Mudd J, Nichol M, Chu GC, Sanes JR, Merlie JP (1995) Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature* 377: 232-236.
22. Gensler, S. Erzeugung transgener Mausmodelle mit fluoreszenz-markierten γ - und ϵ -Untereinheiten des AChR zur Untersuchung der Entwicklung der neuromuskulären Endplatte. *Dissertation* Universität Heidelberg. 2001.
23. Gensler S, Sander A, Korngreen A, Traina G, Giese G, Witzemann V (2001) Assembly and clustering of acetylcholine receptors containing GFP-tagged epsilon or gamma subunits: selective targeting to the neuromuscular junction in vivo. *Eur J Biochem* 268: 2209-2217.
24. Glass DJ, Bowen DC, Stitt TN, Radziejewski C, Bruno J, Ryan TE, Gies DR, Shah S, Mattsson K, Burden SJ, DiStefano PS, Valenzuela DM, DeChiara TM, Yancopoulos GD (1996) Agrin acts via a MuSK receptor complex. *Cell* 85: 513-523.
25. Gomez CM, Bhattacharyya BB, Charnet P, Day JW, Labarca C, Wollmann RL, Lambert EH (1996) A transgenic mouse model of the slow-channel syndrome. *Muscle Nerve* 19: 79-87.
26. Gomez CM, Gammack JT (1995) A leucine-to-phenylalanine substitution in the acetylcholine receptor ion channel in a family with the slow-channel syndrome 1. *Neurology* 45: 982-985.
27. Gomez CM, Maselli R, Gundeck JE, Chao M, Day JW, Tamamizu S, Lasalde JA, McNamee M, Wollmann RL (1997) Slow-channel transgenic mice: a model of postsynaptic organellar degeneration at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 17: 4170-4179.

28. Gomez CM, Maselli RA, Groshong J, Zayas R, Wollmann RL, Cens T, Charnet P (2002) Active calcium accumulation underlies severe weakness in a panel of mice with slow-channel syndrome. *J Neurosci* 22: 6447-6457.
29. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 7380-7384.
30. Güth, A. Integration des Tet-Systems durch homologe Rekombination in das AChR-Gen der Maus. *Dissertation* Universität Heidelberg. 1999.
31. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391: 85-100.
32. Herlitze, S. Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der beiden Isoformen des nikotinischen Acetylcholinrezeptors aus Rattenmuskel. *Dissertation* Universität Heidelberg. 1994.
33. Herlitze S, Villarroel A, Witzemann V, Koenen M, Sakmann B (1996) Structural determinants of channel conductance in fetal and adult rat muscle acetylcholine receptors. *J Physiol* 492 (Pt 3): 775-787.
34. Hesser, B. A. Isolierung und Charakterisierung der Muskel-spezifischen Kinase "MuSK" und die Etablierung eines neuen Versuchstiersystems zur konditionalen Expression von MuSK in transgenen Tieren. *Dissertation* Universität Heidelberg. 2000.
35. Karlin A, Akabas MH (1995) Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron* 15: 1231-1244.
36. Katz B, Miledi R (1967) The study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. *J Physiol* 407-436.
37. Koelle GB, Friedenwald JS (1949) A histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Proc Soc Exp Biol Med*.
38. Kues WA, Brenner HR, Sakmann B, Witzemann V (1995a) Local neurotrophic repression of gene transcripts encoding fetal AChRs at rat neuromuscular synapses. *J Cell Biol* 130: 949-957.
39. Kues WA, Sakmann B, Witzemann V (1995b) Differential expression patterns of five acetylcholine receptor subunit genes in rat muscle during development. *Eur J Neurosci* 7: 1376-1385.
40. Kuhn R, Rajewsky K, Muller W (1991) Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* 254: 707-710.
41. Lai KO, Ip NY (2003) Central synapse and neuromuscular junction: same players, different roles. *Trends Genet* 19: 395-402.

42. Luo ZG, Wang Q, Zhou JZ, Wang J, Luo Z, Liu M, He X, Wynshaw-Boris A, Xiong WC, Lu B, Mei L (2002) Regulation of AChR clustering by Dishevelled interacting with MuSK and PAK1. *Neuron* 35: 489-505.
43. Maimone MM, Enigk RE (1999) The intracellular domain of the nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit mediates its coclustering with rapsyn. *Mol Cell Neurosci* 14: 340-354.
44. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrock J (1987) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*.
45. Marques MJ, Conchello JA, Lichtman JW (2000) From plaque to pretzel: fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction. *J Neurosci* 20: 3663-3675.
46. Masu Y, Wolf E, Holtmann B, Sendtner M, Brem G, Thoenen H (1993) Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature* 365: 27-32.
47. Merlie JP, Sanes JR (1985) Concentration of acetylcholine receptor mRNA in synaptic regions of adult muscle fibres. *Nature* 317: 66-68.
48. Methfessel C, Witzemann V, Takahashi T, Mishina M, Numa S, Sakmann B (1986) Patch clamp measurements on *Xenopus laevis* oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels. *Pflugers Arch* 407: 577-588.
49. Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979) A method for the routine assessment of fore- and hindlimb grip strength of rats and mice. *Neurobehav Toxicol* 1: 233-236.
50. Mishina M, Takai T, Imoto K, Noda M, Takahashi T, Numa S, Methfessel C, Sakmann B (1986) Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 321: 406-411.
51. Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Stowell M, Unwin N (1999) Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol* 288: 765-786.
52. Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 423: 949-955.
53. Mohamed AS, Rivas-Plata KA, Kraas JR, Saleh SM, Swope SL (2001) Src-class kinases act within the agrin/MuSK pathway to regulate acetylcholine receptor phosphorylation, cytoskeletal anchoring, and clustering. *J Neurosci* 21: 3806-3818.
54. Moransard M, Borges LS, Willmann R, Marangi PA, Brenner HR, Ferns MJ, Fuhrer C (2003) Agrin regulates rapsyn interaction with surface acetylcholine receptors, and this underlies cytoskeletal anchoring and clustering. *J Biol Chem* 278: 7350-7359.
55. Neher E, Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802.
56. Ohno K, Wang HL, Milone M, Bren N, Brengman JM, Nakano S, Quiram P, Pruitt JN, Sine SM, Engel AG (1996) Congenital myasthenic syndrome caused by decreased

- agonist binding affinity due to a mutation in the acetylcholine receptor epsilon subunit. *Neuron* 17: 157-170.
57. Rontal M, Rontal E, Leuchter W, Rolnick M (1978) Voice spectrography in the evaluation of myasthenia gravis of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 87: 722-728.
58. Sakmann B, Brenner HR (1978) Change in synaptic channel gating during neuromuscular development. *Nature* 276: 401-402.
59. Sanes JR, Lichtman JW (2001) Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus 1. *Nat Rev Neurosci* 2: 791-805.
60. Satrustegui J, Villalba M, Pereira R, Bogonez E, Martinez-Serrano A (1996) Cytosolic and mitochondrial calcium in synaptosomes during aging. *Life Sci* 59: 429-434.
61. Schaeffer L, de Kerchove dA, Changeux JP (2001) Targeting transcription to the neuromuscular synapse. *Neuron* 31: 15-22.
62. Schwarz, H. Die Bedeutung des adulten nikotinischen Acetylcholinrezeptors für die Entwicklung und Erhaltung der neuromuskulären Synapse. *Dissertation* Universität Heidelberg. *Dissertation* Universität Heidelberg. 1999.
63. Schwarz H, Giese G, Muller H, Koenen M, Witzemann V (2000) Different functions of fetal and adult AChR subtypes for the formation and maintenance of neuromuscular synapses revealed in epsilon-subunit-deficient mice. *Eur J Neurosci* 12: 3107-3116.
64. Sieb JP, Milone M, Engel AG (1996) Effects of the quinoline derivatives quinine, quinidine, and chloroquine on neuromuscular transmission. *Brain Res* 712: 179-189.
65. Smit AB, Syed NI, Schaap D, van Minnen J, Klumperman J, Kits KS, Lodder H, van der Schors RC, van Elk R, Sorgedrager B, Brejc K, Sixma TK, Geraerts WP (2001) A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* 411: 261-268.
66. Takahashi M, Kubo T, Mizoguchi A, Carlson CG, Endo K, Ohnishi K (2002) Spontaneous muscle action potentials fail to develop without fetal-type acetylcholine receptors. *EMBO Rep* 3: 674-681.
67. Thompson S, Clarke AR, Pow AM, Hooper ML, Melton DW (1989) Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell* 56: 313-321.
68. Villarroel A, Sakmann B (1996) Calcium permeability increase of endplate channels in rat muscle during postnatal development. *J Physiol* 496 (Pt 2): 331-338.
69. Weston C, Yee B, Hod E, Prives J (2000) Agrin-induced acetylcholine receptor clustering is mediated by the small guanosine triphosphatases Rac and Cdc42. *J Cell Biol* 150: 205-212.
70. Witzemann V, Barg B, Criado M, Stein E, Sakmann B (1989) Developmental regulation of five subunit specific mRNAs encoding acetylcholine receptor subtypes in rat muscle. *FEBS Lett* 242: 419-424.

71. Witzemann V, Barg B, Nishikawa Y, Sakmann B, Numa S (1987) Differential regulation of muscle acetylcholine receptor gamma- and epsilon-subunit mRNAs. *FEBS Lett* 223: 104-112.
72. Witzemann V, Brenner HR, Sakmann B (1991) Neural factors regulate AChR subunit mRNAs at rat neuromuscular synapses. *J Cell Biol* 114: 125-141.
73. Witzemann V, Schwarz H, Koenen M, Berberich C, Villarroel A, Wernig A, Brenner HR, Sakmann B (1996) Acetylcholine receptor epsilon-subunit deletion causes muscle weakness and atrophy in juvenile and adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13286-13291.
74. Yang X, Arber S, William C, Li L, Tanabe Y, Jessell TM, Birchmeier C, Burden SJ (2001) Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation. *Neuron* 30: 399-410.
75. Zayas R, Vohra VPS, Gomez CM (2002) Calcium-dependent cell death in slow channel syndrome mutations: changes in distinct channel properties affect calcium entry. *SFN-Meeting 2002* 538.1.

