

Aus dem Zentrum für Neurologie  
Neurologische Universitätsklinik Tübingen  
Hertie-Institut für klinische Hirnforschung  
Abteilung kognitive Neurologie  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-P. Thier

Genexpression von potentiellen Modulatoren inhibitorischer  
Neurotransmission in der  
Maus-Mutante Lurcher

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Isabella Maria Schmeh

aus

Villingen-Schwenningen

2012

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. Schwarz

2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Antkowiak

**Widmung:**

Diese Dissertation widme ich meinen Eltern, welche mir Studium und Promotion ermöglicht haben.

## **Inhaltsverzeichnis:**

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>vi</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Das Cerebellum</b>	<b>7</b>
1.1.1. Kortex	8
1.1.2. DCN	9
<b>1.2. Die Lurcher-Mutante</b>	<b>11</b>
1.2.1. Klinische Defizite und motorisches Lernen	11
1.2.2. Gain of Function Mutation	12
1.2.3. Purkinjezelldegeneration	13
1.2.4. Folgen der PC-Degeneration	13
1.2.5. DCN in Lc-Mutanten	14
1.2.6. Elektrophysiologische Veränderungen in den DCN	15
<b>1.3. Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor</b>	<b>15</b>
1.3.1. Aufbau der GABA <sub>A</sub> -Rezeptoren	16
1.3.2. Genexpression, Rezeptor-Aufbau und Transport zur Plasmamembran	18
1.3.3. Endozytose	20
<b>1.4. Regulation der synaptischen Überleitung an GABAergen Terminalen</b>	<b>23</b>
<b>1.5. Die <math>\gamma</math>2-Untereinheit</b>	<b>24</b>
<b>1.6. GABARAP, Struktur und Funktion</b>	<b>26</b>
1.6.1. Struktur	26
1.6.2. Lokalisation	27
1.6.3. Bindungspartner	27
1.6.4. Funktion	30
<b>1.7. Zielsetzung</b>	<b>32</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>34</b>
2.1.1. Versuchstiere	34
<b>2.2. Gewebeentnahme und -aufreinigung</b>	<b>34</b>
2.2.1. Gewebeentnahme	34
2.2.2. Slicing	35
<b>2.3. Isolierung der RNA</b>	<b>35</b>
2.3.1. Einleitung	35
2.3.2. DNA-freies Protokoll	36
<b>2.4. Photometrische Bestimmung der RNA – Konzentration</b>	<b>37</b>
<b>2.5. Reverse Transkription</b>	<b>37</b>
<b>2.6. Real-Time PCR</b>	<b>38</b>
2.6.1. Prinzip der PCR	38
2.6.2. Quantitative Real-time-PCR	40
2.6.3. SYBR Green Master Mix	41
2.6.4. Primer	41
2.6.5. Standards	44
2.6.6. Protokoll Real-time PCR	46
2.6.7. Datenanalyse	47
2.6.8.1 ROX	47
2.6.8.2 Amplifikationskurven und $C_t$ – Kreuzungspunkt	47
2.6.8.3 NTC	48
2.6.8.3 Dissoziationskurve	49

2.6.8.3	<i>Standardkurven und Regressionsgeraden</i>	50
2.6.8.4	<i>Statistische Tests</i>	51
<b>2.7.</b>	<b>Genotypisierung</b>	<b>52</b>
2.7.1.	Einleitung	52
2.7.2.	DNA Isolierung	53
2.7.3.	PCR	53
2.7.4.	Aufreinigung nach der PCR	55
2.7.5.	Gelelektrophorese zum Nachweis des PCR Produktes	55
2.7.6.	Sequenzierung	56
2.7.7.	Auswertung	58
<b>2.8.</b>	<b>Bestimmung des Corticosteronspiegels</b>	<b>59</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>60</b>
<b>3.1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>60</b>
<b>3.2.</b>	<b>mRNA Expression der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten</b>	<b>60</b>
<b>3.3.</b>	<b>mRNA Expression des GABA<sub>A</sub>-Rezeptor assoziierten Proteins</b>	<b>63</b>
<b>3.4.</b>	<b>Untersuchungen zur Spezifität</b>	<b>64</b>
3.4.1.	Hippocampus und Vorderhirn	64
3.4.2.	Hormonelle Beeinflussung	65
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>67</b>
<b>4.1.</b>	<b>Spatiotemporale Korrelation, Spezifität und Normierung</b>	<b>67</b>
4.1.1.	Zeitliche Korrelation	67
4.1.2.	Spezifität	67
4.1.3.	DCN und Normierung mittels Housekeeping-Gen	68
<b>4.2.</b>	<b>transiente Herunterregulation der <math>\gamma</math>2-Untereinheit und von GABARAP</b>	<b>69</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung und Schlussfolgerung</b>	<b>75</b>
	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	77
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>78</b>
<b>7.</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>87</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	adrenocorticotropen Hormon
DCN	tiefe Kleinhirnkerne (deep cerebellar nuclei)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GABA <sub>A</sub> -Rezeptor	GABAAR
GABARAP	GABAA-Rezeptor assoziiertes Protein
GRID2	Glutamatrezeptor, ionotrop, delta 2
HPRT1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1
IPSC	inhibitorische postsynaptische Ströme
Lc	Lurcher
P8	postnataler Tag 8
P11	postnataler Tag 11
P14	postnataler Tag 14
8Wo	8 Wochen
PC	Purkinjezelle
PRIP	Phospholipase C-related katalytisch inaktive Protein
PKC	Proteinkinase C
RNA	Ribonukleinsäure
TM	Transmembrandomäne
Wt	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1. Einleitung

Das Cerebellum spielt eine zentrale Rolle in der Steuerung der Motorik und im Erlernen motorischer Fertigkeiten. Zwei Strukturen sind hierfür von besonderer Bedeutung: Der Kortex und die tiefen Kleinhirnkernen (DCN). Zahlreiche Studien wurden der Untersuchung des Kleinhirnkortex gewidmet, verhältnismäßig wenig ist über den Beitrag der DCN bekannt. Daher befasst sich diese Arbeit mit der Erforschung dieser besonderen Strukturen.

In der Maus-Mutante Lurcher (Lc) gehen, ähnlich der spinocerebellären Ataxie 2 und 3 im Menschen (Scherzed et al.), die Purkinjezellen (PC) respektive große Teile der GABAergen DCN-Afferenzen während der ersten zwei bis drei Lebenswochen zugrunde. Während dieser Degeneration konnte eine verstärkte inhibitorische Erregungsüberleitung detektiert werden (Linnemann et al. 2004), welche einem Kompensationsversuch des PC-Verlustes entsprechen kann. Diese Arbeit widmet sich der Erforschung zugrunde liegender molekularer Mechanismen.

Ein besseres Verständnis dieser Kompensationsvorgänge kann in der Zukunft zu neuen Behandlungsansätzen beitragen.

## 1.1. *Das Cerebellum*

Das Kleinhirn (lat.: Cerebellum) zeichnet sich durch seine komplexe strukturelle Organisation und eine hohe Faser- und Zelldichte aus. Während es im Vergleich zum Großhirn ein Volumen von etwa 10 % aufweist, erreicht seine Oberfläche aufgrund der starken Fältelung etwa 50-70 % derjenigen des Großhirns. Über 50 % aller Neurone des zentralen Nervensystems sind im Kleinhirn lokalisiert. Die Kleinhirnrinde beheimatet ferner die größte Nervenzellpopulation des Menschen: die Körnerzellen.

### **Makro- und Mikroskopischer Aufbau:**

Das Kleinhirn gliedert sich makroskopisch in zwei Hemisphären und den mittigen Vermis (Wurm). Die Hemisphären werden in jeweils zehn Lobuli unterteilt und von transversal und nahezu parallel verlaufenden Furchen durchzogen. Im Querschnitt ähnelt diese Rindenfältelung einem Baum, man nennt sie daher Arbor vitae (Lebensbaum). Des Weiteren erfolgt eine Unterscheidung in die Zellkörper enthaltende Rinde (Kortex) und die sich nach innen anschließende Nervenfaserschicht aus weißer

Substanz, das Mark (Medulla). In das Mark sind mehrere Kerngebiete eingebettet, die DCN.

### 1.1.1. Kortex

Mikroskopisch lässt sich der Kortex von außen nach innen in drei Schichten gliedern: die Molekularschicht (Stratum moleculare), die PC-Schicht (Stratum purkinjense) und die Körnerschicht (Stratum granulosum).

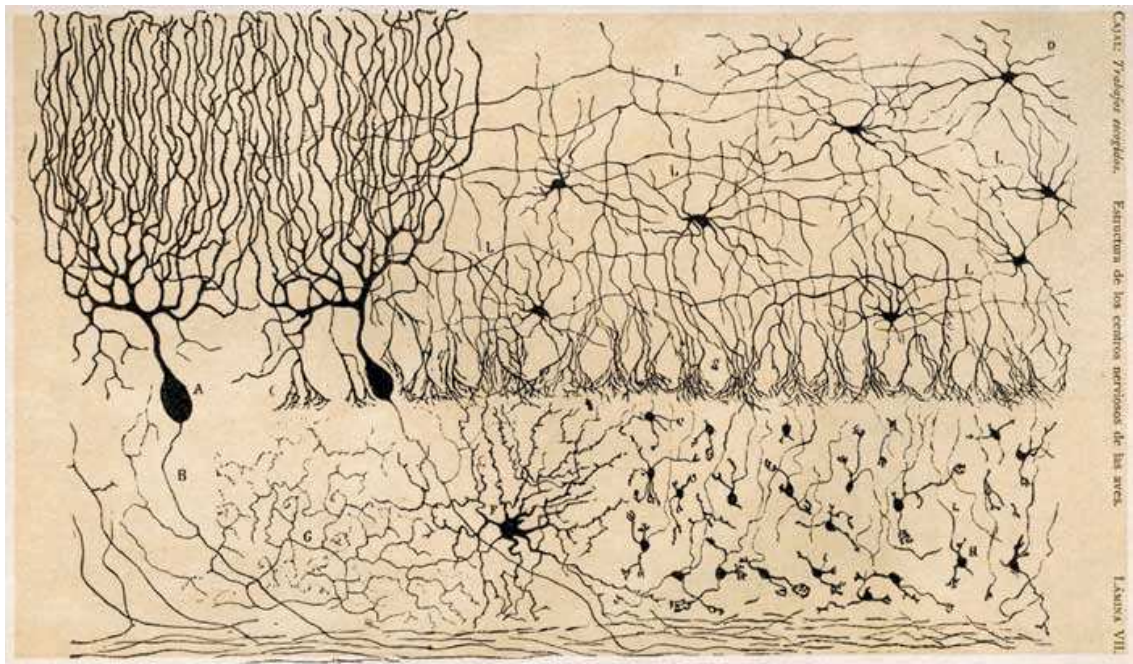


Abb.1.1: Histologischer Aufbau der Hühner-Kleinhirnrinde. Historische Zeichnung aus Ramon und Cajal's "Estructura de los centros nerviosos de las aves", Madrid, 1905: Stratum purkinjense: PC (A). PC-Axon (B). Stratum moleculare: Korbzellen (C), Sternzellen (D). Stratum granulosum: Golgizellen (F), Körnerzellen (H).

Der Kortex erhält im Wesentlichen zwei exzitatorische Afferenzen, deren Impulse verarbeitet und auf die PC projiziert werden. Diese Afferenzen erreichen die PC einerseits als Moosfasern indirekt über die Parallelfasern der Körnerzellen und andererseits direkt als Kletterfasern aus dem unteren Olivenkerngebiet (IO). Moosfasern übermitteln unter anderem sensorische und motorische Informationen aus Peripherie und Großhirn. Über Kletterfasern werden Informationen über aktuell zur Muskulatur führende Impulse sowie über die vom Kleinhirn selbst ausgesandten Signale vermittelt. Die DCN interagieren über Rückkopplungsschleifen mit den Kerngebieten der IO und der Pons.



Die PC schicken als einzige Neurone der Kleinhirnrinde Efferenzen zu den DCN, welche ihrerseits gleichzeitig Kollateralen der beiden zum Kortex ziehenden Afferenzen empfangen. Die DCN entsenden ihrerseits schließlich die einzigen Efferenzen des Kleinhirns.

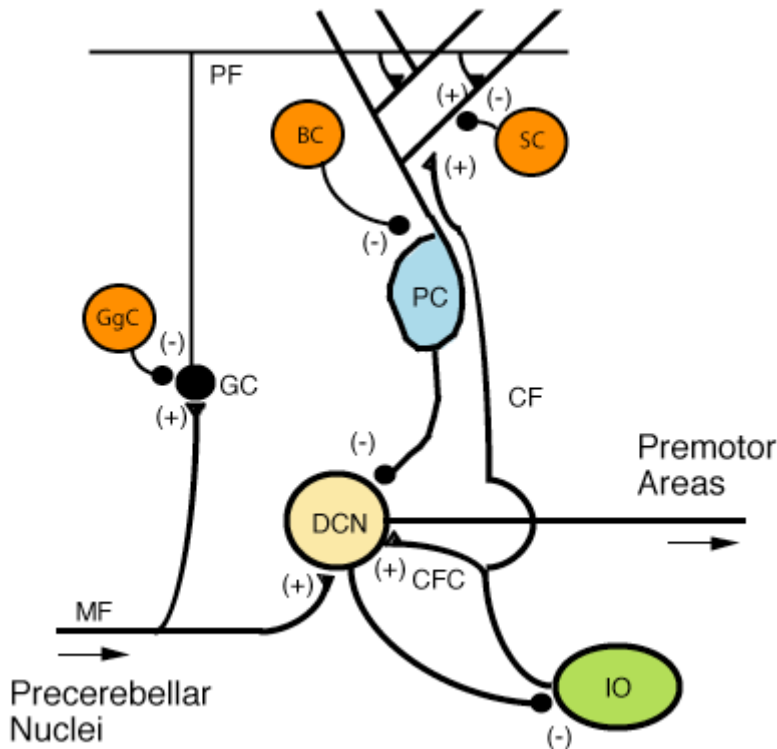


Abb.1.2: Schaltkreis des Kleinhirns. Exzitatorische Synapsen sind mit (+), inhibitorische mit (-) gekennzeichnet. Die Afferenzen erreichen die PC indirekt über Moosfasern (MF) und Parallelfasern (PF) aussendende Körnerzellen (GC) und direkt über aus der IO stammenden Kletterfasern (CF). Der einzige Output der PC erreicht die DCN welche ebenfalls durch Kollateralen der MF und der CF (CFC) erregt werden. Die als Interneurone fungierenden Golgizellen (GgC), Sternzellen (SC) und Korbzellen (BC) modulieren die Übertragung.

### 1.1.2. DCN

Die DCN spielen eine entscheidende Rolle im cerebellären Regelkreis. In Ihnen entspringen die einzigen Efferenzen des Kleinhirns. Folgende DCN werden beim Menschen (Maus) von lateral nach medial unterschieden:

1. Nucleus dentatus (Nucleus lateralis)
2. Nucleus emboliformis (Nucleus interpositus anterior/posterior)
3. Nucleus globosus (Nucleus interpositus anterior/posterior)
4. Nucleus fastigii (Nucleus medialis)

Bestimmte Kortexareale können den jeweiligen DCN zugeordnet werden, so dass je nach Projektionsort der DCN-Efferenzen eine funktionelle Bedeutung resultiert. Von median nach lateral wird das Kleinhirn in das Vestibulo-, Spino- und Pontocerebellum eingeteilt. Das Vestibulocerebellum unterhält über den Ncl. fastigii bzw. medialis vorwiegend Faserverbindungen zu den Vestibulariskernen. Entsprechend wird dieser Region eine vorrangige Beteiligung an der Steuerung von Okulomotorik und Gleichgewicht zugeschrieben. Das Spinocerebellum, im Bereich der Vermis und der paravermalen Zone repräsentiert, kommuniziert bevorzugt mit dem Rückenmark und vermittelt seine Efferenzen über die entsprechenden humanen DCN Ncll. emboliformis und globosus respektive Nucleus interpositus anterior/posterior in der Maus. Folglich obliegt diesem Teil des Kleinhirns die Kontrolle der Stütz- und Okulomotorik. Ferner unterhält das im Bereich der lateralen Hemisphären lokalisierte Pontocerebellum über den Nucleus dentatus bzw. lateralis insbesondere Verbindungen zu pontinen Kerngebieten. Es ist dementsprechend für die Regulation von Bewegungs- und Zielmotorik zuständig.

Diese Arbeit untersucht Veränderungen in den Ncll. interpositus anterior und posterior.

### **Verschaltung:**

Die DCN erhalten im Wesentlichen Informationen von drei verschiedenen Quellen:

1. Inhibitorische Impulse der PC (Transmitter  $\gamma$ -Aminobuttersäure [GABA])
2. Exzitatorische Impulse der Moosfaser-Kollateralen
3. Exzitatorische Impulse der Kletterfaser-Kollateralen.

Auf diese Art und Weise erhalten die DCN Informationen über die zum cerebellären Kortex führenden Impulse. Die Neurone der DCN werden nach morphologischen und funktionellen Gesichtspunkten in wenigstens drei Gruppen eingeteilt. Unterschieden werden GABAerge oder glutamaterge Projektionsneurone und eine Gruppe kleinerer Neurone, deren Axone sich im Wesentlichen auf das Gebiet der DCN beschränken.

Die exzitatorischen glutamatergen Projektionsneurone bilden den größten Anteil der DCN-Efferenzen und besitzen variable Somagrößen. Sie entsenden ihre Axone zu motorischen Zentren des Hirnstamms, zum kontralateralen Thalamus und Mittelhirn. Sie senden Feedbacksignale zu präcerebellären Kernen. Die etwas kleineren

inhibitorischen GABAergen Projektionsneurone vermitteln Feedback-Signale zur IO und sind somit an der Cerebello-rubro-olivo-cerebellären Feedback-Schleife beteiligt. Man nimmt an, dass die PC-Axone auf beide Arten von Projektionsneuronen projizieren (de Zeeuw and Berrebi 1996). Die dritte und zahlenmäßig kleinste Gruppe benutzen als Transmitter GABA und Glycin (De Zeeuw and Berrebi 1995; Fredette and Mugnaini 1991). Es wird vermutet, dass diese sich auf das Kerngebiet der DCN beschränken und als Interneurone fungieren.

Die Zellpopulationen können gemäß ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften in Ratten in zwei Gruppen eingeteilt werden (Czubayko et al. 2001): Beide Gruppen zeigen spontane Aktivität. Die größere Gruppe der Typ I-Neurone zeichnet sich unter anderem durch zyklische hochfrequente Entladungen während kontinuierlicher Hyperpolarisation aus. Die kleinere Gruppe der sog. Typ II-Neurone hingegen stellt ihre Aktivität unter Hyperpolarisation ein. Während Typ I-Neurone das gesamte Größenspektrum aufweisen und ebenfalls den großen glutamatergen Projektionsneuronen entsprechen können, spricht einiges dafür, dass Typ II-Neurone die kleineren Interneurone repräsentieren.

## **1.2. Die Lurcher-Mutante**

Die Maus-Mutante Lc hat bereits über viele Jahrzehnte zur Erforschung der Kleinhirnentwicklung, -physiologie und -funktion beigetragen. Sie wurde im Jahre 1954 entdeckt und weist eine autosomal dominant vererbte Spontanmutation auf. Folge dieser Mutation ist eine vermehrte Exzitation der PC und ein konsekutiver Untergang derselben. Sekundär gehen Körnerzellen und Neurone der IO sowie in geringerem Ausmaß Nervenzellen der DCN zugrunde. Klinisch resultieren die typischen Symptome des Kleinhirnfunktionsausfalls. Diese Mutante gilt als Maus-Modell für die humanen spinocerebellären Ataxien, in deren Pathogenese u.a. PC-Verlust und DCN-Degeneration eine signifikante Rolle spielen (Hoche et al.; Scherzed et al.).

### **1.2.1. Klinische Defizite und motorisches Lernen**

Lc-Mäuse zeigen früh eine statomotorische Entwicklungsverzögerung, zögerliche Gewichtszunahme und hypotrophe Muskulatur. Das Erlernen motorischer Fähigkeiten sowie das Halten des statischen oder dynamischen Gleichgewichts ist beeinträchtigt

(Thifault et al. 1996). Das ataktische Gangbild ist bereits klinisch erkennbar. Die Defizite lassen sich auf dem Rotarod oder auf dem Laufband objektivieren: Lc weisen eine verstärkte Fallneigung auf. Dennoch sind diese Mutanten fähig, in Versuchen ihre Leistung durch Training zu verbessern, wenngleich sie das Niveau ihrer Kontrollgruppe bei höheren Schwierigkeitsgraden nicht erreichen (Lalonde 1994; Lalonde et al. 1996; Lalonde and Thifault 1994).

Die zusätzliche Läsion der DCN führt zu protrahierten motorischen Defiziten und legt eine gewisse kompensierende Funktion durch die DCN nahe (Caston et al. 1997; Caston et al. 1995). Die eingeschränkte Lernfähigkeit bei hohem Schwierigkeitsgrad (Caston et al. 1995) zeigt jedoch, dass ein intakter cerebellärer Kortex unerlässlich für das Erlernen schwieriger Aufgaben ist, welche eine präzise motorische Koordination erfordern. Neuere Studien weisen auf die Bedeutung der DCN (insbesondere des Nucleus interpositus anterior) in der lerninduzierten Plastizität hin (Ohyama et al. 2006; Vogel et al. 2007). Die Fähigkeit zu motorischem Lernen nimmt mit zunehmendem Alter der Lc ab während sie bei den Kontrolltieren erhalten bleibt. Dies spricht für einen Langzeiteffekt der PC-Degeneration, welcher auch durch erhaltene Strukturen wie die DCN und die Basalganglien nicht mehr kompensiert werden kann.

Der PC-Verlust der Lc führt neben Defiziten in der Entwicklung motorischer Fähigkeiten zu kognitiven und emotionalen Alterationen. Dies drückt sich in verminderter Erforschungsbereitschaft einer neuen Umgebung und Defiziten in der räumlichen Orientierung aus. Ferner ist das räumliche Gedächtnis sowie das Arbeits- und Referenzgedächtnis beeinträchtigt (Hilber et al. 1998). Lc weisen eine erhöhte Stressbereitschaft (Hilber et al. 2004) und immunoendokrinologische Veränderungen auf (Vogel et al. 2007).

### **1.2.2. Gain of Function Mutation**

Ursächlich für das Krankheitsbild der Lc ist eine im Genabschnitt des  $\delta 2$  Glutamatrezeptors (GluR $\delta 2$ ) lokalisierte Punktmutation (Zuo et al. 1997). GluR $\delta 2$  nehmen unter ihresgleichen eine Sonderstellung als sogenannte "orphan"-Rezeptoren ein. Diese Bezeichnung bringt zum Ausdruck, dass GluR $\delta 2$  im Gegensatz zu ihren Verwandten keine funktionellen glutamatergen Ionenkanäle ausbilden. Sie besitzen

zwar eine Kanalöffnung, welche aber (außer in der Lc-Mutante) keine funktionelle Bedeutung hat.

GluR $\delta$ 2 werden vorwiegend in den PC exprimiert (Araki et al. 1993; Lomeli et al. 1993; Yatsushiro et al. 2000), und sind maßgeblich an der Ausbildung von Kletterfaser- und Parallelfasersynapsen beteiligt.

Bei der Punktmutation im GluR $\delta$ 2-Gen (Grid2) der Lc-Maus handelt es sich um eine Transition von Guanin zu Adenin, die zur Substitution von Alanin durch Threonin in der Aminosäureposition 654 führt (A654T). Diese missense Mutation befindet sich am Ende des dritten hydrophoben Segmentes des GluR $\delta$ 2, in einem stark konservierten Segment aller ionotropen Glutamatrezeptoren. Die Punktmutation der Lc-Maus konvertiert den Orphan-Rezeptor in einen Ionenkanal, über welchen Kationen auch in Abwesenheit eines Transmitters einströmen. Sie ist somit eine Gain-of-Function-Mutation. Infolge des Kationeneinstroms depolarisiert die Zelle (Zuo et al. 1997). Die Folge dieser übermäßigen Exzitation ist die Degeneration der PC in vivo und vitro (Zanjani et al. 2009).

### **1.2.3. Purkinjezelldegeneration**

Die Degeneration der PC beginnt zwischen dem dritten und achten postnatalen Tag (Swisher and Wilson 1977). Die Zellkörper und Dendritenbäumchen zeigen einen unvollständigen und verlangsamten Reifungsprozess (Swisher and Wilson 1977). Die regelmäßige Anordnung der Zellen bleibt aus. Auch die anfänglich regelrechte Synaptogenese alteriert zunehmend. Die Kletterfasern erreichen kaum die Dendriten und die Korbzellaxone schaffen es nicht, den PC-Körper zu umfassen. Ab dem 12. Lebensstag beginnt schließlich der Untergang der Zellen (Dumesnil-Bousez and Sotelo 1992; Heckroth 1994). Nach 26 Tagen sind bereits 90 % der Zellen degeneriert und nach 90 Tagen nahezu keine PC mehr nachzuweisen (Caddy and Biscoe 1979). Als Mechanismus werden vor allem kationeneinstrominduzierte Apoptose, Autophagie und Exzitotoxizität diskutiert (Vogel et al. 2007).

### **1.2.4. Folgen der PC-Degeneration**

Die Degeneration der PC in der heterozygoten Lc führt einerseits zu einer sekundären retrograden Degeneration ihrer Afferenzen, also zum Untergang von 90 % der Körnerzellen und 75 % der Zellen der IO (Caddy and Biscoe 1979). Andererseits tritt

eine anterograde transneuronalen Degeneration der DCN auf, welche die Hauptefferenz der PC-Axone darstellen (Wetts and Herrup 1982a). Der sekundäre Charakter des Körner- und IO-Zelluntergangs konnte in Chimärenstudien nachgewiesen werden (Wetts and Herrup 1982b). Der Zelluntergang spiegelt sich im histologischen Aufbau der sich entwickelnden Kleinhirnrinde in Form einer Ausdünnung aller Schichten wider (Swisher and Wilson 1977).

### **1.2.5. DCN in Lc-Mutanten**

Es mehren sich die Hinweise, dass in den DCN eine gewisse Kompensation des PC-Verlustes stattfinden könnte. Ferner wird ihnen eine Rolle in der lerninduzierten Plastizität zugeschrieben.

Durch den PC-Verlust verlieren die DCN ihre einzigen inhibitorischen Afferenzen, welche einen Anteil von etwa 62-73 % aller Afferenzen stellen (De Zeeuw and Berrebi 1995; Palkovits et al. 1977). Die exzitatorischen Impulse aus Moos- und Kletterfaserkollateralen bleiben währenddessen erhalten. Der Untergang nahezu aller PC ließe eine vergleichbare Reduktion der Anzahl der Neurone in den DCN und der GABAergen Synapsen vermuten. Diese Reduktion ist jedoch erstaunlich schwach ausgeprägt. Die Gesamtzahl der Neurone verringert sich nach vorhandener Literatur nicht (Caddy and Biscoe 1979) oder lediglich um 20-30 % (Heckroth 1994; Sultan et al. 2002).

Die Zahl inhibitorischer GABAerger Neurone verringert sich um 39 % (Sultan et al. 2002), während glutamaterge Neurone eine Reduktion von nur etwa 20 % zeigen (Heckroth 1994; Sultan et al. 2002). Dies weist auf die erhaltene Funktion der Hauptefferenzen, der exzitatorischen Neurone der DCN hin. Der vergleichsweise stärkere Untergang GABAerger Projektionsneurone kann auf den Untergang von 75 % der Nervenzellen der IO, deren Projektionsort, zurückgeführt werden. Die Neuronengruppe, welche die kleinsten Nervenzellen der DCN umfasst, sind GABAerg und glycinerg. Hierbei handelt es sich am ehesten um Interneurone, welche auf die DCN beschränkt sind. Sie machen etwa 40 % aller GABA-markierten Neurone aus. Bei Lc konnte eine Zunahme dieser Neuronenpopulation um etwa 40 % in der vierten postnatalen Woche festgestellt werden (Sultan et al. 2002). Diesen Neuronen könnte

folglich in der Lc-Maus eine besondere Bedeutung in der Kompensation der inhibitorischen Funktion zukommen.

Die Zahl der GABAergen Synapsen in der Lc-Mutante sind nur um etwa 30% reduziert (Sultan et al. 2002). Es konnte sogar eine Größenzunahme der Durchmesser der GABA-immunomarkierten Endknöpfchen an den Zellkörpern um 57 % beobachtet werden (Sultan et al. 2002). Dies kann auf eine erhöhte postsynaptische Rezeptordichte oder einen vermehrten Vesikelpool hinweisen und unterstreicht zusammen mit der Zunahme der GABA und Glycin-markierten Neuronenzahl die Bedeutung der GABAergen Überleitung in der Kompensation des PC-Verlustes für einen Erhalt der Kleinhirnfunktion.

### **1.2.6. Elektrophysiologische Veränderungen in den DCN**

In P14 alten Lc konnte eine verstärkte synaptische Überleitung von GABAergen spontanen- und miniatur- inhibitorischen postsynaptischen Strömen (IPSCs) im Vergleich zu Wt-Tieren festgestellt werden (Linnemann et al. 2004). Die synaptische Überleitung  $g_{syn}$  ist definiert als mittlere Peak-Amplitude der IPSCs/Haltepotential – Gleichgewichtspotential der IPSCs. Die Anzahl kleiner spontaner IPSCs verschiebt sich in Lc zugunsten größerer IPSCs. Die mittels Peak-skaliertes nichtstationärer Fluktuationsanalyse kalkulierte Anzahl von offenen Kanälen während des Peaks war in Lc signifikant höher bei Tieren im Alter von P14-P21. Dies ist vereinbar mit einer Erhöhung der Anzahl verfügbarer Rezeptoren an der Plasmamembran.

### **1.3. Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor**

Die Kontrolle der Erregbarkeit von Nervenzellen ist wesentlich für die korrekte Funktion neuronaler Prozesse. Sie kann durch exzitatorische Transmitter wie Glutamat gesteigert oder durch inhibitorische Transmitter wie GABA verringert werden. GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (GABAAR) und Glycin-Rezeptoren sind die wichtigsten Vermittler schneller synaptischer Inhibition. GABA ist der Transmitter der PC, der wesentlichen inhibitorischen Afferenz der DCN, und ist daher in der Erregungsüberleitung in den DCN bedeutend.

Die Gruppe der GABA-Rezeptoren umfasst die ionotropen GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren sowie die metabotropen GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren. GABAAR gehören in die Superfamilie der ligandenkontrollierten Chlorid-Ionenkanäle. GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>C</sub>-

Rezeptoren unterscheiden sich in ihren pharmakologischen Eigenschaften. Diese Arbeit beschränkt sich auf die ionotropen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren.

### **1.3.1. Aufbau der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren**

GABA<sub>A</sub> sind heteropentamere Ionenkanäle, welche aus einem breiten Repertoire verschiedener Untereinheiten ( $\alpha$  1-6,  $\beta$  1-3,  $\gamma$  1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  und  $\pi$ ) zusammengesetzt sind (Sieghart and Sperk 2002). Innerhalb der Unterfamilien  $\alpha$ - $\gamma$  können durch alternatives Splicing zusätzliche Varianten generiert werden. In dieser Arbeit wurden die für die DCN relevanten Einheiten untersucht:  $\alpha$ 1-5,  $\beta$ 1-2,  $\gamma$ 1-3 und  $\delta$ .

Die verschiedenen Untereinheiten bestehen aus vier Transmembrandomänen (TM), einem großen extrazellulären Amino-Terminus, welcher die GABA-Bindungsstelle beinhaltet, und einer großen intrazellulären Domäne zwischen TM3 und TM4. Die Sequenz dieser etwa 125 Aminosäuren enthaltenden Schlaufe divergiert am stärksten zwischen den verschiedenen Untereinheiten. Sie enthält unter anderem Serin/Thyrosin- oder Thyrosinresiduen zur Phosphorylierung, Regionen zur Palmitoylierung und die Bindungsstellen für GABARAP. Posttranslationale Modifikationen dieser Stellen ermöglichen die Modulation von Transportvorgängen und Rezeptorfunktion (Chen and Olsen 2007).



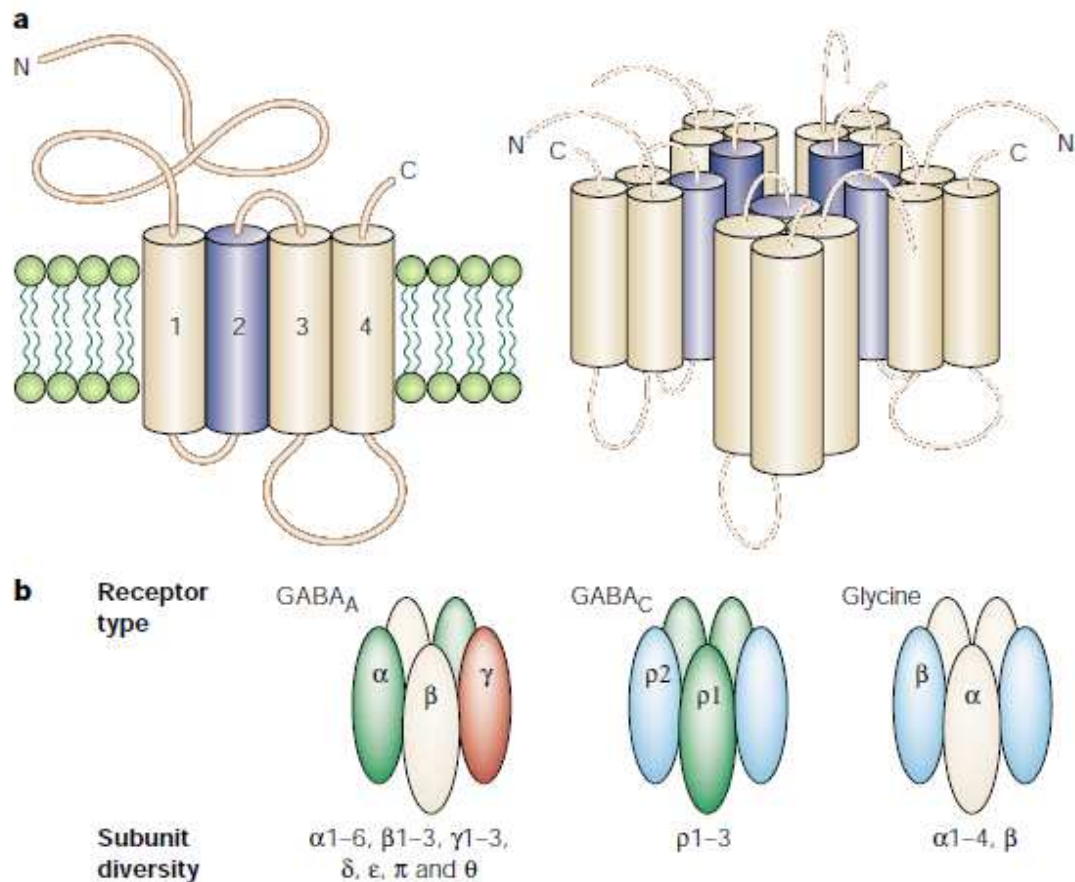


Abb. 1.3: Struktur und Unterschiede von inhibitorischen ligandenkontrollierten Ionenkanälen aus (Moss and Smart 2001). A: Struktur eines ligandenkontrollierten Ionenkanals. Die Rezeptoruntereinheiten enthalten vier Transmembrandomänen (TM). Für TM2 nimmt man an, dass sie den Ionenkanal formt. Die große aminoterminal Domäne ist extrazellulär lokalisiert und soll Neurotransmitter inkorporieren und einige weitere Bindungsstellen besitzen. Die intrazelluläre Domäne zwischen TM3 und TM4 ist die am stärksten divergierende und enthält zahlreiche Ansatzstellen für Serin/Threonin- und Tyrosinproteinkinasen. b.: Pentamere von GABA<sub>A</sub>-, GABA<sub>C</sub>- und Glycin-Rezeptoren. Die meisten GABAAR sollen aus  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  Untereinheiten im Verhältnis 2:2:1 zusammengesetzt sein. Die  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  Untereinheiten können die  $\gamma$  Untereinheit ersetzen. GABA<sub>C</sub> Rezeptoren sind aus  $\rho$ 1- $\rho$ 3 Untereinheiten als hetero- oder homomere Pentamere zusammengesetzt. Glycin-Rezeptoren sind Pentamere aus  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheiten im Verhältnis 3 $\alpha$ :2 $\beta$ .

Die pentameren GABAAR bestehen am häufigsten aus  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ 2 Untereinheiten (Chang et al. 1996; Macdonald and Olsen 1994; Rabow et al. 1995). Im ZNS der Ratte stellen die Rezeptoren aus  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 $\gamma$ 2-Untereinheiten einen Anteil von 43 % (McKernan and Whiting 1996). Studien mit rekombinanten GABAAR indizieren ein Verhältnis von 2 $\alpha$ :2 $\beta$ :1 $\gamma$ 2 (Chang et al. 1996; Kittler et al. 2002; Tretter et al. 1997). Die Vielzahl an Untereinheiten erlaubt eine geraume örtliche und zeitliche Heterogenität in der

Komposition von Rezeptoren (Fritschy and Mohler 1995; Laurie et al. 1992; Wisden et al. 1992). In den verschiedenen neuronalen Strukturen können gewebespezifische Untereinheitenkompositionen identifiziert werden. Untereinheiten wie die  $\gamma 2$ -Untereinheiten können ubiquitär nachgewiesen werden (Persohn et al. 1992; Pirker et al. 2000; Sieghart and Sperk 2002). Rezeptoren verschiedener Komposition können ferner an unterschiedlichen Abschnitten der Neurone lokalisiert sein. Während  $\alpha 1$ -Untereinheiten gleichmäßig über alle inhibitorischen Synapsen verteilt sind, kommen  $\alpha 2$  vorwiegend an axo-axonalen Synapsen am Initialsegment des Axons vor (Moss and Smart 2001). Die Zusammensetzung der Rezeptoren und die Lokalisation der Untereinheiten unterliegt ferner Veränderungen während der postnatalen Entwicklung (Fritschy et al. 1994; Zdilar et al. 1991).

Trotz der großen theoretischen Kombinationsmöglichkeiten wird nur ein kleiner Anteil tatsächlich beobachtet (McKernan and Whiting 1996). Dies dürfte durch die strukturellen Eigenschaften der Untereinheiten, deren Ziellokalisation und durch die involvierten Proteine bedingt sein.

### **1.3.2. Genexpression, Rezeptor-Aufbau und Transport zur Plasmamembran**

GABAAR-DNA wird im Zellkern in RNA umgeschrieben. Die Transkriptionsrate bestimmt die Verfügbarkeit der zur Translation an den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums benötigten mRNA. Im endoplasmatischen Retikulum werden GABAAR zu funktionsfähigen Rezeptoren zusammengesetzt (Hawkins et al. 2004). Das richtige Zusammenfügen der Untereinheiten ist ein komplexer, untereinheitenspezifischer Vorgang, welcher die Interaktion mit diversen Proteinen und Zytoskelettstrukturen erfordert. Multiple spezifische Assembly-Signale werden nach und nach identifiziert (Bollan et al. 2003; Connolly et al. 1999b). Einige Untereinheiten wie  $\beta 1$  und  $\beta 3$  besitzen per se Signalsequenzen, welche sie zur Oberflächenexpression befähigen. Punktmutationen in den entsprechenden Sequenzen können ausreichen, um das regelrechte Assembly der Untereinheiten zu behindern. Die Rezeptoren werden anschließend in den Golgiapparat überführt, wo sie posttranslational modifiziert werden können. Es wird angenommen, dass sie über das trans-Golgi-Netzwerk in spezifische

Transportvesikel verpackt und durch Adaptorproteine für ihren Zielort adressiert werden (Tang 2001).

GABAAR unterliegen einem aktiven Transport entlang zytoskelettaler Strukturen respektive Mikrotubuli und Aktin-Mikrofilamenten. Dieser wird durch Motorproteinkomplexe vermittelt (Meyer et al. 2000). Verschiedene Adaptorproteine für den Transport können zugleich in den postsynaptischen Verdichtungen identifiziert werden, was für eine gleichzeitige Rolle beim Transport und der Verankerung spricht (Kneussel and Loeblich 2007; Maas et al. 2006). Der genaue Transport- und Verankerungs-Mechanismus ist bislang nicht endgültig und nicht im Detail geklärt. Einige Studien weisen auf eine Rolle von Phospholipase C-related inaktivem Protein (PRIP) im Transport der  $\gamma 2$ -Untereinheit-enthaltenden GABAAR hin. Es könnte als Brückenmolekül zwischen GABARAP und den GABAAR fungieren und die Bindung von GABARAP und  $\gamma 2$  in einem Komplex mit PRIP und  $\beta$  erleichtern (Kanematsu et al. 2007; Mizokami et al. 2007).

Für die korrekte Akkumulation der Rezeptoren an der Synapse wird die Palmitoylierung der  $\gamma 2$ -Untereinheit durch das Golgi-spezifische DHHC-Domäne-enthaltende Zinkfingerprotein benötigt (Fang et al. 2006).

Es folgt die Insertion in die Plasmamembran und die Bildung von Clustern zur Ausbildung funktioneller Synapsen. (Kneussel and Betz 2000; Moss and Smart 2001). Für das Clustering wird außer der  $\gamma 2$ -Untereinheit GABARAP und Gephyrin benötigt. Die Rezeptoren können durch das Ausbilden und Lösen der Bindungen zwischen diffuser und geclusterter Form wechseln und dadurch in die synaptischen Eigenschaften beeinflussen. Gephyrin verringert diese laterale Mobilität der synaptischen Cluster (Jacob et al. 2005).

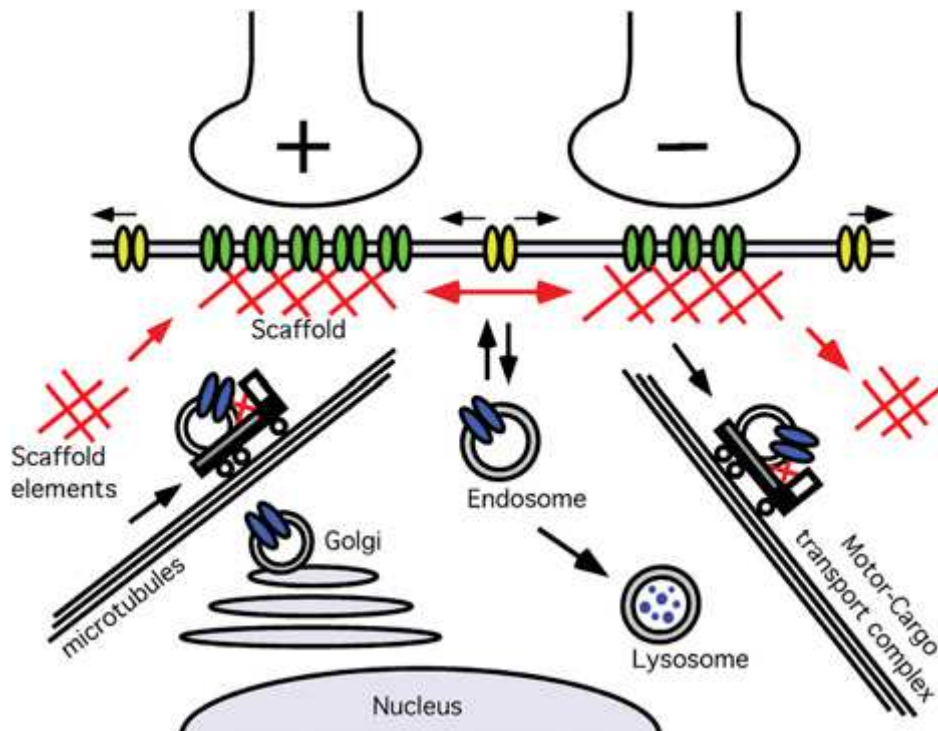


Abb. 1.4: Zyklus der GABAAR zwischen Organellen und Plasmamembran aus (Kneussel and Loebrich 2007). Im Zellkern transkribiert und im Endoplasmatischen Retikulum zusammengesetzt werden sie über das Trans-Golgi-Netzwerk in spezifische Transportvesikel verpackt und entlang des Zytoskeletts mit Hilfe postsynaptischer Gerüstproteine (rot) zur Plasmamembran transportiert (dunkelblaue Ovale). In der Plasmamembran kommen sie in Clustern (grün) oder diffus (gelb) vor. Die Rezeptorzahl erhöht (+, erhöhte Rezeptorzahl) oder erniedrigt (- erniedrigte Rezeptorzahl) die synaptische Überleitung. Gerüstproteine weisen ebenfalls horizontale und vertikale Bewegungen auf. Im Besonderen gilt dies für Gephyrin (Maas et al. 2006).

### 1.3.3. Endozytose

Die meisten GABAAR wie diejenigen aus  $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ ,  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ , und  $\alpha 1\beta 3$  unterliegen clathrin-abhängiger konstitutiver Endozytose in ein endosomales Kompartiment (Connolly et al. 1999a; Kittler et al. 2000) wodurch sie von der Plasmamembran entfernt werden. Für die  $\alpha 1\beta 2$  enthaltenden GABAAR konnte jedoch keine konstitutive Endozytose beobachtet werden (Connolly et al. 1999a).

Bei der Endozytose wird die Plasmamembran zunächst nach innen gestülpt (Abb.1.5). Dadurch werden sogenannte coated pits geformt. Dieser Vorgang wird auch als Knospung bezeichnet. Die Einstülpung wird im Wesentlichen durch die Interaktion mit dem AP2-Clathrin-Adaptorprotein-Komplex vermittelt (Kittler et al. 2005; Kittler et al. 2002), welcher direkt unterhalb des einzuverleibenden Membranabschnittes lokalisiert

ist. Das Clathrin-Adaptor-Protein (AP2) interagiert mit den intrazellulären Domänen der Untereinheiten  $\beta 1+3$  sowie  $\gamma 1-3$  (Kittler et al. 2000; Smith et al. 2008). Vier Bindungsmotive für AP2 konnten identifiziert werden:

1. Die  $\beta 2$ -Untereinheit besitzt ein sogenanntes Dileucin-Motiv. Dieses Motiv wird für die PKC-mediierte Verstärkung der GABAAR-Endozytose benötigt.
2. Auf der  $\gamma 2$ -Untereinheit ist das YECL-Motiv lokalisiert, welches seinen Namen der entsprechenden Aminosäuresequenz verdankt (Kittler et al. 2008).
- 3./4. Weitere Bindungsstellen an AP2 befinden sich auf der  $\beta$ - und der  $\gamma 2$ -Untereinheit. Diese sind reich an basischen Aminosäuren (basic-patch-Motiv) und weisen eine starke Ähnlichkeit in den beiden Untereinheiten auf (Smith et al. 2008).

Im Anschluss an die Ausbildung der coated pits fusionieren die Membranenden und lösen sich von der Plasmamembran. Dadurch entsteht ein Endozytosevesikel. Die Andock- und Fusionsvorgänge werden mittels sogenannter SNARE-Proteine und SNAP-Rezeptoren (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) vermittelt. Internalisierte Rezeptoren können schließlich recycelt oder abgebaut werden.

Die Endozytoserate determiniert die Rezeptorverfügbarkeit an der Oberfläche. Wird die Endozytoseaktivität verringert, finden sich verstärkte IPSCs (Kittler et al. 2000).

Die Affinität der Bindungsstellen 2-4 zum AP2-Komplex wird durch Phosphorylierung verringert, wodurch eine herabgesetzte Endozytoserate, erhöhte Rezeptorzahl und verstärkte GABAerge Erregungsübertragung resultiert. Eine simultane Blockierung des YECL-Motivs und des basic-patch-Motivs zeigt additive Effekte (Smith et al. 2008).

Im Gegensatz hierzu resultiert aus der PKC-Aktivierung eine Erhöhung der Endozytoserate. Dazu wird die  $\gamma 2$ -Untereinheit benötigt. Diese Aktivierung kann durch Blockierung des Dileucin-Motivs der  $\beta 2$  Untereinheit unterbunden werden. Die Inhibition der PKC ihrerseits vermindert jedoch nicht die Endozytoserate oder die GABAergen Ströme, was für eine modulatorische Rolle der PKC spricht (Herring et al. 2005; Herring et al. 2003).

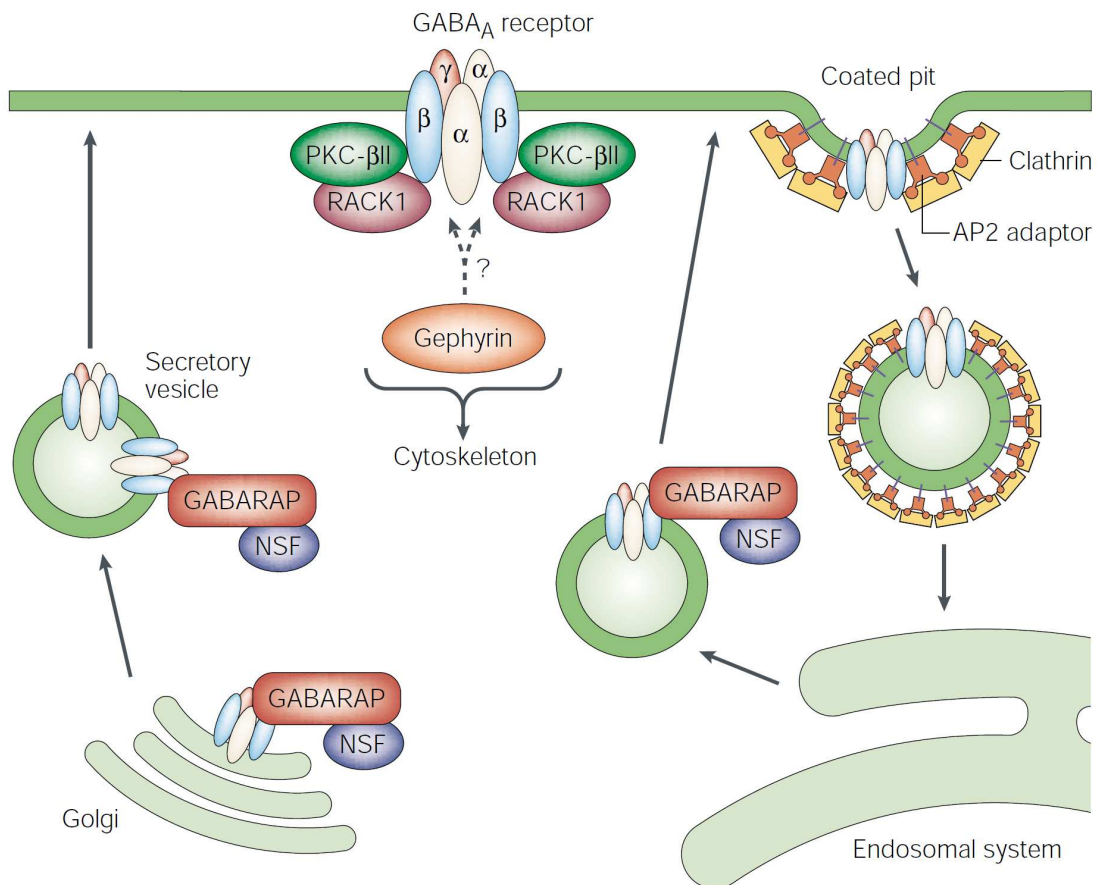


Abb. 1.5: Dynamische Kontrolle der GABAAR Expression an der Zelloberfläche. Aus (Moss and Smart 2001). GABAAR aus  $\alpha\beta\gamma$  Untereinheiten sind geclustert an der synaptischen Seite von gephyrinabhängigen und unabhängigen Mechanismen. GABAAR sind assoziiert mit Proteinkinase C  $\beta$ II (PKC $\beta$ II) und dem Rezeptor für aktivierte C Kinase (RACK1), die gemeinsam die Phosphorylierung der  $\beta$  Untereinheit medieren, die zur funktionellen Modulation der GABAAR führt. GABAAR an Synapsen erfahren DYNAMIN abhängige Clathrin-vermittelte Endozytose. Dieser Prozess ist durch Interaktion von  $\beta$  und  $\gamma$  Untereinheiten vermittelt mit  $\alpha$  und  $\beta$  Adaptinen, Proteine die für das Überführen der Fracht in „clathrin-coated pits“ verantwortlich ist. Internalisierte Rezeptoren treten in das endosomale System ein, wo sie zur Zelloberfläche zurückgeführt werden oder abgebaut werden. GABARAP (assoziiert zum Golgiapparat und zum N-ethylmaleimid-sensitiven Faktor u.a.) fördert das Clustern von GABAAR. Es fungiert wohl als Adaptorprotein durch seine Vielzahl an Bindungspartnern komplex die Insertion in die Zellmembran vermitteln.

## **1.4. Regulation der synaptischen Überleitung an GABAergen Terminalen**

Die synaptische Überleitung an GABAergen Terminalen wird im Wesentlichen von folgenden Faktoren beeinflusst:

1. präsynaptischer Transmitterpool, Exozytose der Vesikel, Calciumeinstrom durch spannungsabhängige Calciumkanäle
2. Transmitterkonzentration im synaptischen Spalt, Transmittermetabolismus, GABA-Reuptake in die präsynaptische Terminale
3. Rezeptorzahl und -dichte an der postsynaptischen Membran (Expressionshöhe der Rezeptoren, Rezeptormetabolismus, Endozytose)
4. Rezeptoreigenschaften (Einzelkanalkinetik, Komposition der Untereinheiten, posttranslationale Rezeptormodifikation, Affinität)
5. Interaktion mit assoziierten Proteinen und dem Zytoskelett (Clustering)
6. Hormonelle und pharmakologische Modulation (Corticosteron, Benzodiazepine, Insulin)

Die Kinetik von einzelnen GABA-regulierten Kanälen wird von einer Vielzahl verschiedener Faktoren beeinflusst. Trifft ein Aktionspotential ein, folgt ein Calciumeinstrom durch spannungsaktivierte Calciumkanäle, was die Exozytose der transmitterenthaltenden Vesikel in den synaptischen Spalt induziert. Die synaptische Überleitung wird von der GABA-Konzentration im synaptischen Spalt bestimmt (Frerking et al. 1995; Lorez et al. 2000), welche ihrerseits durch den Transmittergehalt der präsynaptischen Vesikel, deren korrekter Exozytose und den Transmitterabbau im synaptischen Spalt und Wiederaufnahme in die präsynaptische Endigung determiniert ist. Beeinflusst wird die synaptische Aktivität ferner von der Frequenz eintreffender Aktionspotentiale. Bei niedriger Frequenz erfolgt die Ausschüttung synchron, bei repetitiver Stimulation erfolgt ein Wechsel zu asynchroner Exozytose (Kirischuk and Grantyn 2003). Bei der Interaktion der Rezeptoren mit ihrem Transmitter spielt deren Rezeptoraffinität für GABA eine Rolle (Hajos et al. 2000; Nusser et al. 1997). Die Affinität hängt unter anderem mit der Untereinheitenkomposition zusammen und wird durch das Clustering der Rezeptoren beeinflusst (Chen et al. 2000). Die Öffnungswahrscheinlichkeit wird weiterhin von der Synapsengröße beeinflusst (Auger and Marty 1997; Nusser et al. 1997).

Bei steigender Rezeptoranzahl findet sich eine erhöhte synaptische Überleitung (Nusser et al. 1997; Nusser et al. 1998) und eine Beeinflussung der synaptischen Stärke der inhibitorischen Synapse (Kittler and Moss 2003). Die Zahl der postsynaptisch zur Verfügung stehenden GABAAR wird bedarfsabhängig hinauf- oder herunterreguliert (Barnes 1996). Diese wird im Wesentlichen durch die Genexpression der jeweiligen GABAAR-Untereinheiten, deren Zusammenbau und Transport zur Plasmamembran und durch die Entfernung mittels Rezeptor-Endozytose beeinflusst. Inhibition des Transportes (wie etwa durch Spaltung der Mikrotubuli und Aktinfilamente) führt zu verringerter Expression der GABAAR an der Zelloberfläche (Meyer et al. 2000) während eine verminderte Endozytoseaktivität die Rezeptorzahl erhöht (Kittler et al. 2008).

Schließlich tragen posttranslationale Modifikationen zur Modulation der GABAergen Überleitung bei. Dies kann über die Phosphorylierung von Kanalproteinen durch diverse Proteinkinasen geschehen (Brandon et al. 2001; Brandon et al. 2000; Haganir and Greengard 1990; McDonald et al. 1998; Moss and Smart 2001; Sigel 1995).

Zuletzt wird eine hormonelle Beeinflussung beobachtet. Häufig beschrieben sind Modulationen durch Corticosteron (Teschemacher et al. 1996), BDNF (Jovanovic et al. 2004) oder Insulin (Wan et al. 1997; Williams 2008).

### **1.5. Die $\gamma$ 2-Untereinheit**

Die Zusammensetzung der Untereinheiten und die Interaktion mit GABARAP spielt in den verschiedenen Abschnitten der Signalübertragung eine Rolle. Sie beeinflusst vor allem die elektrophysiologischen Eigenschaften (Fisher and Macdonald 1997; Hevers and Luddens 1998; Lorez et al. 2000; Neelands and Macdonald 1999; Verdoorn et al. 1990) und die Rezeptorverfügbarkeit an der postsynaptischen Membran (Bollan et al. 2003; Connolly et al. 1999a; Connolly et al. 1996; Hevers and Luddens 1998; Kittler et al. 2000; Moss and Smart 2001).

Die  $\gamma$ -Untereinheit ist von besonderer Bedeutung für die Ausbildung funktionsfähiger Synapsen. Ihre An- oder Abwesenheit bestimmt maßgeblich die elektrischen Kanaleigenschaften. Sie ist in das Clustering und die Endozytose involviert. Hierdurch kann sie Einfluss auf die inhibitorische Erregungsübertragung nehmen.



1. Clustering: Die  $\gamma 2$ -Untereinheit wird für das regelrechte Clustering von GABAAR benötigt (Essrich et al. 1998; Gunther et al. 1995). GABARAP konnte als Promotor des Clusterings identifiziert werden (Chen et al. 2000). Dieses GABARAP-getriggerte Clustern bedarf wiederum der  $\gamma 2$ -Untereinheit. Allerdings konnte eine direkte Interaktion bislang nicht nachgewiesen werden.

2. Clathrin-abhängige Endozytose: Die  $\gamma 2$ -Untereinheit besitzt zwei Bindungsstellen für AP2. Die Phosphorylierung dieser Stellen führt zur Inhibition der Bindung des AP2-Komplexes und zu einer Abnahme der Endozytoserate. Dadurch steigt die Rezeptorzahl an der Zelloberfläche und es resultieren verstärkte mIPSCs.

Die Aktivierung der PKC andererseits führt  $\gamma 2$ -abhängig über das Dileucin-Motiv der  $\beta 2$ -Untereinheit zur Erhöhung der Endozytoserate.

3. Elektrophysiologische Kanaleigenschaften: Veränderlich sind Leitfähigkeit, Öffnungsdauer, scheinbare Agonistaffinität, Deaktivierungs- und Desensibilisierungsgeschwindigkeit.

➤ Bei  $\gamma 2$ -Untereinheiten-enthaltenden GABAAR können größere Leitfähigkeiten festgestellt werden (Everitt et al. 2004; Gunther et al. 1995; Lorez et al. 2000; Verdoorn et al. 1990).

➤  $\gamma 2$ -defiziente Mäuse haben eine niedrigere mittlere Kanalöffnungsdauer im Vergleich zu Wt (Lorez et al. 2000).

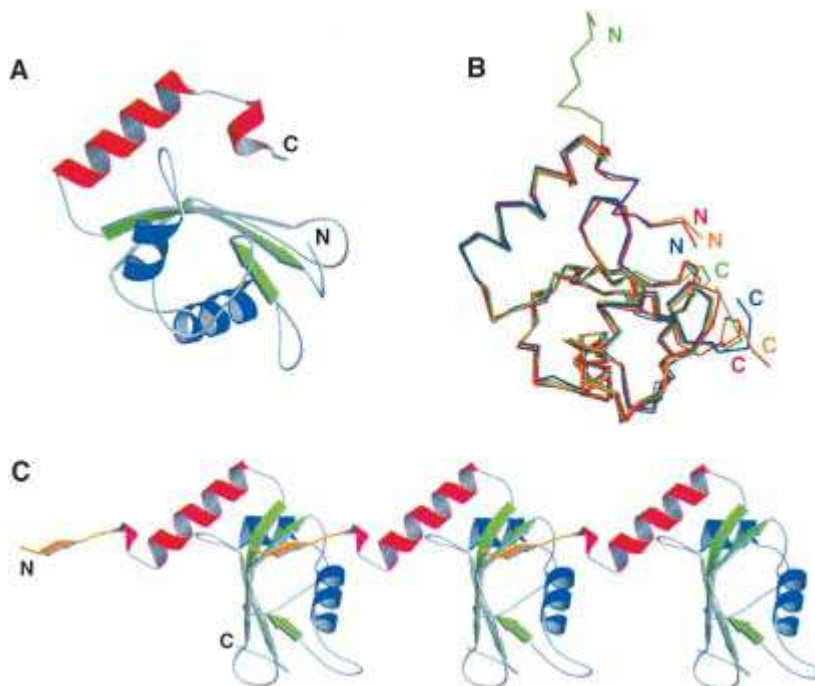
➤ Das Fehlen der  $\gamma 2$ -Untereinheit führt zu höheren scheinbaren Agonistaffinitäten (Gunther et al. 1995; Moss and Smart 2001).  $\alpha 1\beta 1\delta$  und  $\alpha 1\beta 3$  zeigen eine höhere Sensitivität für GABA und niedrigere maximale Strom-Amplitude im Vergleich zu Rezeptoren aus  $\alpha 1\beta 3\gamma 2L$  (Chen et al. 2000; Fisher and Macdonald 1997). Sie deaktivieren später und desensibilisieren früher bei einer gegebenen Transmitterkonzentration (Chen et al. 2000). Vergleichbar zu nicht geclusterten Rezeptoren verhalten sich GABAAR aus  $\alpha 1\beta 2$ . Sie desensibilisieren schneller und bei niedrigeren GABA-Konzentrationen als  $\alpha 1\gamma 2$  (Verdoorn et al. 1990).

Die hohen Leitfähigkeiten können als Folge des  $\gamma 2$ -abhängigen Clusterings und der Kommunikation zwischen den intrazellulären Domänen benachbarter Kanäle interpretiert werden, was zum kooperativen Öffnen der Rezeptoren führen könnte (Khakh et al. 2000; Liu et al. 2000).

## 1.6. GABARAP, Struktur und Funktion

### 1.6.1. Struktur

Das GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-assoziierte Protein (GABARAP) ist ein aus 117 Aminosäuren bestehendes, 17 kDa schweres Protein. Es besteht aus zwei Domänen, einer größeren C-terminalen (27-117) und einer kleineren N-terminalen (1-26) Domäne. Während die N-terminale Domäne die Tubulinpolymerisation zu vermitteln scheint (Coyle and Nikolov 2003; Coyle et al. 2002) zeigt die C-terminale Domäne eine strukturelle Ähnlichkeit zu Ubiquitin. Sie enthält die Bindungsstelle (Aminosäuren 36-52, (Nymann-Andersen et al. 2002)) für die intrazelluläre Schlaufe der  $\gamma$ 2-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>R (Coyle et al. 2002; Nymann-Andersen et al. 2002; Phillips and Froehner 2002; Wang et al. 1999). In verschiedenen Studien konnten diverse Konformationen der N- und C-terminalen Enden (Coyle and Nikolov 2003; Coyle et al. 2002) gefunden werden (Abb. 1.6B). Es konnten *in vitro* Oligomere von GABARAP gefunden werden, deren Bindungsstellen untereinander (Abb. 1.6 C) mit denjenigen für  $\gamma$ 2 überlappen (Chen and Olsen 2007; Coyle et al. 2002).



D

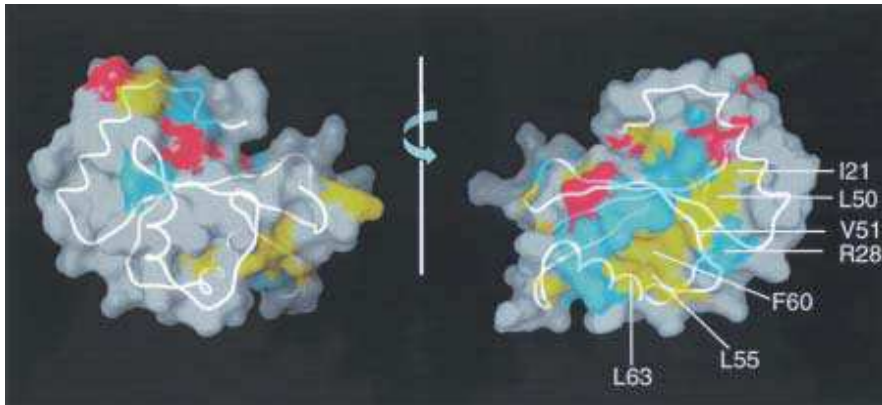


Abb. 1.6: Strukturmodelle für GABARAP aus (Coyle and Nikolov 2003). A: Die beiden Domänen von GABARAP mit Ubiquitin ähnelnder Kerndomäne (blau, grün) und helikaler tubulinbindender Domäne (rot). B,A: übereinandergelegte Strukturmodelle von GABARAP in monomerer und oligomerer Konformation und GATE-16. Die N- und C-Termini zeigen strukturelle Flexibilität. C: GABARAP-Oligomere in vitro ausgebildet bei hohen Salzkonzentrationen. D: 3-dimensionales Modell von GABARAP rechts um 180° gedreht. Bunt hervorgehoben sind die konservierten, zur Oberfläche exponierten Aminosäuresequenzen (blau: basische, rot: saure, gelb: hydrophobe Aminosäuren), die konservierten Regionen betreffen insbesondere eine Seite (rechts).

### 1.6.2. Lokalisation

GABARAP wird im ZNS exprimiert. Es zeigt höchste Expressionsraten in Epiphyse, Pons, Sehnerv, Dienzephalon und Cerebellum (Mansuy-Schlick et al. 2006). GABARAP ist vorwiegend an intrazellulären Membranen lokalisiert. Es akkumuliert an den Enden der Golgi-Zisternen, an welchen Transportvesikel gebildet werden sowie in postsynaptischen Zisternen (Kittler et al. 2001; Kneussel et al. 2000). Im Bereich synapsenbildender proximaler Dendriten und perinukleär kommt es gemeinsam mit der  $\gamma$ 2-Untereinheit vor (Leil et al. 2004). Ein verhältnismäßig kleiner Teil findet sich assoziiert zu GABAAR an der synaptischen Membran (Kittler et al. 2001; Kneussel et al. 2000; Leil et al. 2004). Es konnte bisher nicht an Gephyrin-positiven postsynaptischen Membranen nachgewiesen werden (Kneussel et al. 2000; Leil et al. 2004).

### 1.6.3. Bindungspartner

Das GABARAP besitzt zahlreiche Bindungspartner. Im Folgenden werden die Interaktionen mit gut untersuchten und im Kontext relevanten Bindungspartner beschrieben. Die Funktion des GABARAP erklärt sich durch seine Bindungspartner:

GABARAP beteiligt sich maßgeblich am GABAAR-Clustering, worüber es zudem die elektrophysiologischen Eigenschaften moduliert. Ferner wird ihm eine Bedeutung im intrazellulären Vesikeltransport zugeschrieben.

#### **$\gamma$ 2-Untereinheit:**

Das Protein bindet an die 23-Aminosäuren-Region der intrazellulären Schlaufe der  $\gamma$ 2- und  $\gamma$ 1-Untereinheit (Kneussel et al. 2000; Wang et al. 1999). Die Bindung des GABARAP an  $\gamma$ 2 ist für dessen Funktion unerlässlich.

GABARAP hat im Wesentlichen zwei Effekte auf  $\gamma$ 2-enthaltende Untereinheiten:

1. GABARAP begünstigt das Clustern von GABAAR (Chen et al. 2000) über die Tubulin- und  $\gamma$ 2-Bindungsstellen. Über dieses Clustering nimmt GABARAP Einfluss auf die Kanaleigenschaften.
2. Es beeinflusst die Rezeptorexpression an der Zelloberfläche, möglicherweise durch Erhöhung des intrazellulären Rezeptortransports.

#### **Mikrotubuli:**

GABARAP interagiert mit löslichen und polymerisierten Formen des Tubulins (Wang et al. 1999; Wang and Olsen 2000) und ist in der Lage, gleichzeitig Tubulin und GABAAR zu binden (Wang and Olsen 2000). Auf diese Art und Weise können GABAAR mit dem Zytoskelett verknüpft werden. Das Unterbinden dieser Assoziation zu Mikrotubuli verhindert wiederum das Clustering von GABARAP und GABAAR (Chen et al. 2000; Wang and Olsen 2000).

#### **Gephyrin:**

Gephyrin interagiert mit GABARAP (Kneussel et al. 1999) und bindet Tubulin. Dies ist für das Clustern von GABAAR von Belang (Essrich et al. 1998; Jacob et al. 2005; Kneussel and Betz 2000). Die verminderte Expression dieses Proteins führt zu einer Abnahme der GABAAR-Cluster (Fischer et al. 2000; Yu et al. 2007), während die Gesamtzahl an GABAAR konstant bleibt (Jacob et al. 2005; Kneussel and Betz 2000; Kneussel et al. 1999). Die laterale Beweglichkeit der GABAAR nimmt zu (Jacob et al. 2005). Während der Mangel an Gephyrin oder GABARAP die Expression des jeweils anderen Proteins nicht beeinflusst, führt das Fehlen der  $\gamma$ 2-Untereinheit zu einer

Reduktion des Gephyrins (Essrich et al. 1998; Schweizer et al. 2003). In adulten Lc konnte eine Abnahme der Anzahl an Gephyrin-Aggregaten beobachtet werden (Garin et al. 2002).

### **Phospholipase C-related katalytisch inaktive Protein (PRIP)**

PRIP ist entsprechend seinem Namen ein der Phospholipase C ähnelndes Protein ohne katalytische Aktivität, welches GABARAP bindet und im Zusammenbau oder Transport der  $\gamma 2$ -Untereinheit-enthaltenden GABAARs involviert ist. Es existieren zwei Unterformen, PRIP1+2. PRIP teilt sich mit der  $\gamma 2$ -Untereinheit die Bindungsstelle des GABARAP (Kanematsu et al. 2002). PRIP inhibiert in vitro die Bindung der  $\gamma 2$ -Untereinheit an GABARAP kompetitiv (Kanematsu et al. 2002). In Knock-out Mäusen für beide Gene, PRIP1+2, wird eine Abnahme der Expression von  $\gamma 2$ -Untereinheiten enthaltenden GABAARs beobachtet (Mizokami et al. 2007). Die Assoziation zwischen GABAARs und GABARAP war signifikant verringert in diesen Mäusen. Die Unterbindung der direkten Interaktion zwischen PRIP-1 und der GABAAR- $\beta$  Untereinheit reduziert ebenfalls die Oberflächenexpression  $\gamma 2$ -Untereinheit-enthaltender GABAARs. Dies weist auf eine Rolle von PRIP im Transport der  $\gamma 2$ -Untereinheit-enthaltenden GABAARs hin, etwa als Brückenmolekül zwischen GABARAP und den GABAARs oder durch Erleichterung der Bindung von GABARAP und  $\gamma 2$  in einem Komplex mit PRIP und  $\beta$  (Kanematsu et al. 2007; Mizokami et al. 2007). Der genaue Mechanismus bleibt zu klären.

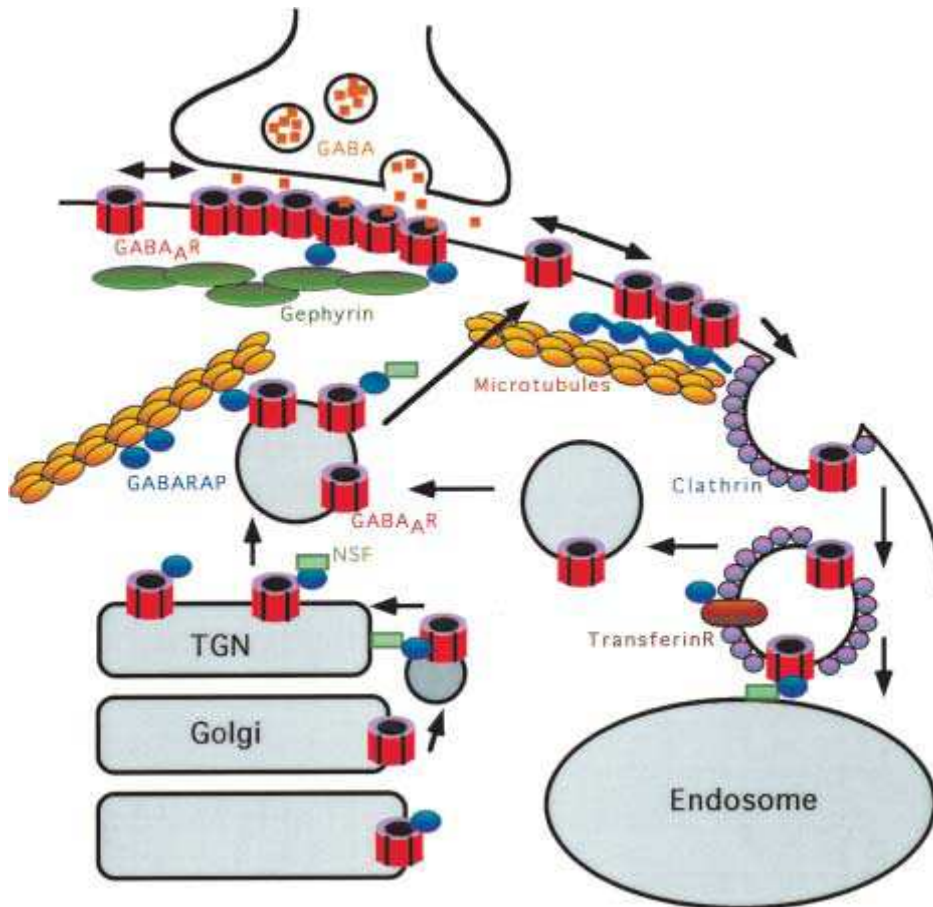


Abb. 1.7: Ein Modell für den intrazellulären Verkehr und Lokalisation von GABAAR und für die Rolle von GABARAP. GABARAP verbindet GABAAR Cluster mit den Mikrotubuli. Aus (Coyle and Nikolov 2003).

#### 1.6.4. Funktion

Die exakte Rolle des GABARAP im Transport und im Clustering der GABAAR und folglich in der GABAergen synaptischen Übertragung ist nicht endgültig geklärt. Die Expression von GABARAP fördert das Clustering der GABAAR und erhöht deren Anzahl an der Plasmamembran. Daraus resultieren verstärkte GABAerge Ströme. Die Assoziation zur  $\gamma$ 2-Untereinheit und den Mikrotubuli suggeriert eine Funktion als Adaptorprotein im intrazellulären Rezeptortransport und deutet auf eine Beteiligung an der Rezeptorinsertion und am Clustering hin.

### 1. Erhöhung der Rezeptorverfügbarkeit durch Beeinflussung des Transportes:

Die Überexpression des GABARAPs erhöht die Zahl  $\gamma 2$ -enthaltender GABAAR an der Zelloberfläche (Leil et al. 2004). Hierfür ist die Bindung an  $\gamma 2$  sowie die Intaktheit der Tubulinbindungsdomäne und der Mikrotubuli essentiell (Chen et al. 2005; Leil et al. 2004).

Die intrazelluläre Lokalisation von GABARAP suggeriert zusammen mit der Erhöhung der Rezeptorverfügbarkeit an der postsynaptischen Membran eine Rolle im intrazellulären Transport der  $\gamma 2$  Untereinheit zur Plasmamembran (Leil et al. 2004). Die posttranslationale Modifikation des C-Terminus scheint für die Lokalisation und die Interaktion mit GABAAR relevant zu sein (Chen et al. 2007). Ähnlich den Homologen des GABARAP wird eine Verknüpfung mit Lipiden in dieser Position mit konsekutiv verstärkter Affinität zu Plasmamembranen angenommen.

### 2. Die Vermittlung von Clustering durch GABARAP erfolgt am ehesten indirekt:

Obwohl GABARAP das Clustering begünstigt und in der Nähe von  $\gamma 2$ -GABAAR-Clustern in synapsenbildenden Dendriten lokalisiert ist (Leil et al. 2004; Wang et al. 1999), gelang es lediglich eine niedrige Menge an GABARAP direkt an der postsynaptischen Membran zu detektieren (Leil et al. 2004). In elektronenmikroskopischen Studien fanden sich bisher keine Hinweise auf eine Beteiligung an der plasmalemmalen Verankerung. Dies spricht dafür, dass GABARAP nicht unmittelbar GABAAR verknüpft oder dass es mit den angewandten Methoden nicht erfasst wurde. Ferner könnte GABARAP das bisher fehlende Bindeglied zwischen Gephyrin und den GABAAR verkörpern und über dieses Zusammenspiel das Clustering vorantreiben.

Die bisher erwähnten Ergebnisse werden durch Untersuchungen in der GABARAP-knockout-Maus relativiert. Diese zeigten einen normalen Phänotyp ohne Verlust der synaptischen Lokalisation von GABAAR. Die totale Rezeptoranzahl war konstant (O'Sullivan et al. 2005). Dies deutet darauf hin, dass GABARAP nicht essentiell für die synaptische Lokalisation ist, sondern diesen Prozess vorantreibt und beschleunigt. Möglicherweise kann der GABARAP-vermittelte Transport und das Clustering durch andere Proteine kompensiert werden (O'Sullivan et al. 2005).

### Elektrophysiologische Veränderungen:

Die elektrophysiologischen Veränderungen durch die Depletion von GABARAP sind mit denen  $\gamma$ 2-deprivierter Rezeptoren vergleichbar. Geclusterte Rezeptoren haben im Vergleich zu diffus verteilten veränderte Kanaleigenschaften wie eine erhöhte Leitfähigkeit (Everitt et al. 2004) und kürzere Deaktivierungszeitkonstanten (Chen et al. 2000). Andererseits weisen geclusterte Rezeptoren eine niedrigere scheinbare Affinität für GABA auf, deaktivieren früher und desensibilisieren langsamer bei einer gegebenen Transmitterkonzentration (Chen et al. 2000). In Zellen ohne GABARAP-Expression findet sich eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit.

### **1.7. Zielsetzung**

Die vorliegende Arbeit ist der Untersuchung von Modulatoren der inhibitorischen Erregungsüberleitung in der Lc gewidmet. Es konnte eine Verstärkung derselben in P14 alten Lc nachgewiesen werden (Linnemann et al. 2004). Hieraus folgt die Hypothese, dass dieser Potenzierung eine veränderte Expression involvierter Proteine zugrunde liegt. Um diese Hypothese zu verifizieren wurden die Genexpressionslevel beteiligter Proteine untersucht. Aufgrund ihrer herausragenden Bedeutung in der inhibitorischen Transmission waren die GABAAR-Untereinheiten und das GABARAP Gegenstand der Experimente. Es wurden die DCN-relevanten GABAAR-Untereinheiten betrachtet:  $\alpha$ 1-5,  $\beta$ 1-2,  $\gamma$ 1-3 und  $\delta$ .

Zur Bestimmung der Genexpressionslevel wurden die Kleinhirnerkerne Ncl interpositus anterior/posterior den Versuchstieren zu den Zeitpunkten P11, P14 und 8 Wochen entnommen. Diese Zeitpunkte wurden analog zum Verlauf der PC-Degeneration und den beobachteten elektrophysiologischen Veränderungen gewählt. Die mRNA wurde nach Umschreibung in cDNA mittels quantitativer Realtime-PCR gemessen und über das Housekeeping-Gen HPRT1 normiert. Die Untersuchung auf DNA-Ebene wurde ausgesucht, um eine im Vergleich zu proteinbasierten Methoden höhere Sensitivität zu erreichen. Über die dadurch mögliche Normierung über ein Housekeeping-Gen ist zusätzlich die Fehleranfälligkeit durch unterschiedliche Zellmengen und -dichten, wie sie in Lc vorkommen, im Vergleich zu anderen Untersuchungsmethoden vermindert.

Die Genexpression auf mRNA-Ebene spiegelt den Bedarf des entsprechenden Proteins wider. Eine Veränderung der Genexpression kann als Grundlage der verstärkten



Inhibition Ausdruck eines Kompensationsmechanismus sein. Die Kenntnisse solcher Mechanismen zu erforschen und zu vertiefen kann dazu beitragen, neue Therapieansatzpunkte für neurodegenerative Erkrankungen wie die spinocerebelläre Ataxie zu identifizieren.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1.1. Versuchstiere**

Für die Experimente wurden heterozygote B6CBACa-A<sup>w-J</sup>/A-Grid2<sup>Lc</sup>/J Mäuse, Lc-Mäuse verwandt (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA). Lc sind charakterisiert durch die Folgen einer Spontanmutation im Grid2-Gen, welches für den ionotropen Glutamatrezeptor  $\delta 2$  kodiert. Heterozygote B6CBACa-A<sup>w-J</sup>/A-Grid2<sup>Lc</sup> - Mäuse unterscheiden sich typischerweise ab Tag 12-14 von den Wt-Tieren. Sie zeigen ein ataktisches Gangbild mit erhöhter Falltendenz. Jüngere Tiere konnten nach Sequenzierung und Nachweis der Punktmutation, die zur Substitution von Alanin durch Threonin (A654T) im Grid2-Gen führt (Zuo et al. 1997), genotypisiert werden. Für die Versuche wurden Tiere im Alter von P11, P14 und 8Wo verwendet. Die Organentnahme wurde vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt. Die Anzeigennummer lautete 3.03.03 bis Februar 2006 und seither 8.02.06.

## **2.2. Gewebeentnahme und -aufreinigung**

### **2.2.1. Gewebeentnahme**

Zur Gewebeentnahme wurden die Versuchstiere mit Ketamin (Ratiopharm GmbH, Ulm, Germany) narkotisiert. Es wurden etwa 150 mg/kgKG Ketamin intraperitoneal verabreicht. Die ausreichende Tiefe der Anästhesie wurde durch fehlende Abwehrreaktionen auf Schmerzreize festgestellt. Im Falle unzureichender Narkosetiefe wurden zusätzliche Injektionen verabreicht.

Die anästhesierten Mäuse wurden per Hand fixiert, die Kopfhaut median entlang der Sutura sagittalis gespalten und vom Schädelknochen zu beiden Seiten hin abgelöst. Da der Mäuseschädel sehr dünn ist, konnte nach Durchtrennung der Nackenmuskulatur eine kleine Federschere ins Foramen magnum eingeführt werden, um das Cranium zu beiden Seiten hin bogenförmig nach rostralateral zu durchtrennen. Nach Abheben und Entfernen der Schädelkalotte und der harten Hirnhäute wurde das Cerebrum von der Schädelgrube angehoben. Es folgte die Durchtrennung der Hirnnerven und der Medulla oblongata sodass Groß- und Kleinhirn gemeinsam entnommen werden konnte.

### **2.2.2. Slicing**

Groß- und Kleinhirn wurden sofort in der Sagittalebene median in beide Hälften geteilt und mit RNAlater Stabilization Reagent (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland), einer Lösung, die der Degradation von RNA vorbeugt, bedeckt. Für die Präparation der DCN wurde eine der Hälften auf im Probenteller fixierte Agar-Würfelchen mit der sagittalen Schnittebene nach unten aufgebracht und mit Sekundenkleber fixiert. Die Probenschale wurde vollständig mit RNAlater gefüllt. Mit einem DTK-1000 Microslicer (Ted Pella, Redding, CA, USA) und Rasierklingen (Rotbart extra dünn, Procter & Gamble Service GmbH, Schwalbach am Taunus, Deutschland) wurden parasagittale Schnitte von 400µm Dicke angefertigt. Aus einem dieser Schnitte, auf welchem sich die DCN gut darstellten (in Höhe der Ncll. interpositus anterior und posterior), wurden diese sorgfältig ausgeschnitten und sofort in 400µl RNAlater stabilisiert. Die Dicke von 400µm wurde so dünn gewählt, um selektiv DCN-Gewebe zu erhalten. Die Proben wurden dann bis zur Weiterverarbeitung bei -28°C gelagert. Mit derselben Technik wurden die Schnitte der Hippocampus - Regionen und des Frontalhirns angefertigt. Das hippocampale Gewebe wurde aus Horizontalschnitten von 400 – 500 µm Dicke isoliert, Gewebe des Vorderhirns wurde aus 1000-1200µm dicken coronaren Schnitten gewonnen.

## **2.3. Isolierung der RNA**

### **2.3.1. Einleitung**

Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) isoliert. Nach der Lyse des Gewebes wurde die RNA auf der Säulenmembran gebunden, gewaschen und anschließend eluiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei maximaler Geschwindigkeit durchgeführt. Folgendes Protokoll wurde zur Isolierung und Aufreinigung der RNA verwendet:

1. Das aufbewahrte Gewebe wurde in ein 13 ml Reagenzröhrchen (Sarstedt, AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) überführt und 600µl RLT Puffer mit β-Mercaptoethanol (1µl β-ME pro 1 ml RLT Puffer) zur Lyse von Zellen und Gewebe hinzugefügt

2. Die Proben wurden mit einem Ultra-Turrax T8 Rotor-Stator Homogenisierer (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Germany) für 30 Sekunden zerkleinert und homogenisiert.
3. Nach 3-minütigem Zentrifugieren wurde der Überstand des Lysats in ein neues 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und das gleiche Volumen 70 %-igen Ethanols (600µl) hinzugefügt und vermischt.
4. 700µl des Lysats wurden auf eine RNeasy – Drehsäule aufgebracht und für 15 Sekunden zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurden die restlichen 500µl aufgetragen und zentrifugiert.
5. Um die Drehsäulenmembran zu waschen wurden 700µl RW1 Puffer auf die Drehsäule pipettiert und für 15 Sekunden zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen.
6. Es wurden 500µl RPE Puffer hinzugefügt und für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen. Dieser Schritt wurde mit 2-minütiger Zentrifugierung wiederholt.
7. In einem neuen 2 ml Sammelröhrchen wurde für eine weitere Minute zentrifugiert, um die Membran zu trocknen.
8. Die RNA wurde durch das Auftragen von 40 µl nucleasefreiem Wasser auf die Drehsäulenmembran eluiert und für 1 Minute zentrifugiert.

Die eluierte RNA wurde bei -28°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

### **2.3.2. DNA-freies Protokoll**

Zur Beseitigung von DNA-Kontaminationen wurde das *DNA-free* Kit (Ambion, Austin, TX, USA) durchgeführt. Die im Kit enthaltene rekombinante DNase (rDNaseI) wurde in tierfreien Systemen überexprimiert und sorgfältig gereinigt, um RNase freies Enzym zu gewinnen. Zunächst wurde mittels dieser DNase die kontaminierende DNA entfernt und in einem weiteren Schritt werden DNase und auch divalente Kationen wie Magnesium und Calcium entfernt, welche die Degradierung von RNA bei Erhitzung katalysieren können.

Dies wurde gemäß folgendem Protokoll durchgeführt:

1. 0,1 Volumenanteile (4µl) 10X DNase 1 Puffer und 1 µl DNase 1 (2 Units) wurden zur RNA hinzugefügt und vorsichtig vermischt.
2. Die RNA und DNase wurden für 20 Minuten bei 37°C inkubiert.
3. Es wurden 0,1 Volumenanteile (5µl) des resuspendierten DNase Inaktivierungs-Reagens hinzugefügt und gründlich vermischt.
4. Nach 2-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei maximaler Geschwindigkeit für 1,5 Minuten zentrifugiert. Die RNA enthaltende obere klare Phase wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt.

#### **2.4. Photometrische Bestimmung der RNA – Konzentration**

Um vergleichbare RNA-Konzentrationen für die Transkription in cDNA einsetzen zu können wurde die Gesamtmenge an RNA photometrisch bestimmt (Biophotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Hierzu wurde eine 1:10 Verdünnung (10µl isolierte RNA + 90 µl nucleasefreies Wasser (Ambion)) analysiert. Es wurden die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260nm ( $OD_{260}$ ) und der 260/280 nm Quotient ermittelt. Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht in etwa der Konzentration von 40µgRNA/ml. Daraus berechnet sich eine Menge von 0,2-1,2 µg RNA, die aus der geringen Menge an Ausgangsmaterial extrahiert werden konnte. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die Proben mit nucleasefreiem Wasser auf vergleichbare RNA-Konzentrationen verdünnt.

#### **2.5. Reverse Transkription**

Die reverse Transkription wurde durchgeführt, um RNA in die stabilere cDNA umzuschreiben, welche für die real-time PCR benötigt wurde. Dies geschah mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (RT), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Sie kann Einzelstrang-RNA ablesen und synthetisiert am Gegenstrang zur RNA komplementäre cDNA. Sie benötigt hierzu Primer und dNTPs (desoxy Nucleosid Triphosphate). Als Primer wurden hexamere Randomprimer verwendet, die an multiplen Positionen auf der RNA als Startpunkt fungieren.

Verwendet wurde hierfür das SuperScript™ II Reverse Transkriptase Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit folgendem Protokoll:

1. Folgende Komponenten wurden zusammengefügt:
  - 10 µl RNA der gewünschten Quantität (200-500 ng)
  - 1 µl pd(N)6 Randomprimer 200 ng/µl (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)
  - 1 µl dNTP Mix 10mM (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

---
- 12 µl Gesamtvolumen
2. Die Komponenten wurden gemischt und bei 65°C über 5 Minuten inkubiert.
3. Danach wurden die Proben schnell für wenige Minuten auf Eis gekühlt und zentrifugiert.
4. Weitere Komponenten wurden addiert, vermischt und bei Raumtemperatur anschließend für 2 Minuten inkubiert:
  - 4µl 5X First-Strand Puffer
  - 2 µl 0,1 M DTT
  - 1µl RNase OUT™ (40 units/µl)

---
- 19 µl Gesamtvolumen
- Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 2 Minuten inkubiert.
5. Zur Transkription wurde im Anschluss 1 µl (200 units) SuperScript II RT addiert und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert.
6. Anschließend folgte die Inkubation bei 42°C für 50 min.
7. Durch Erhitzen auf 70°C für 15 min wurde die Reaktion inaktiviert.

## **2.6. Real-Time PCR**

### **2.6.1. Prinzip der PCR**

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation eines spezifischen DNA-Abschnittes. Auf diese Art und Weise kann genügend Ausgangsmaterial bereitgestellt werden, um die DNA adäquat analysieren zu können.

Zur Durchführung einer PCR benötigt man verschiedene Komponenten: Die DNA, welche vervielfältigt werden soll, zwei Primer, Polymerase, dNTPs und Pufferlösung.

Primer sind etwa 20-30 Basenpaare (bp) kurze DNA-Stücke, die komplementär zu den DNA-Abschnitten an beiden Enden des zu amplifizierenden Bereiches sind, dort anlagern und so der TaqPolymerase einen Startpunkt zur Synthese bieten. Die TaqPolymerase benötigt zur Synthese dNTPs der Basen Guanin (G), Adenin (A), Cytosin (C) und Thymin(T). Die Basen dienen als Baumaterial und in der Form von Triphosphaten sind sie gleichzeitig Energielieferanten. Um optimale Bedingungen für die PCR zu schaffen, wird ein Puffer benötigt, der den pH konstant hält und  $Mg^{2+}$ -Ionen, die zur Stabilisierung der NTPs dienen. Die PCR besteht im Wesentlichen aus drei Schritten, welche 30- bis 40-fach wiederholt werden.

1. Denaturierung/Schmelzen (95°C): Die Wasserstoffbrücken zwischen den Doppelsträngen werden gelöst und die DNA dissoziiert („schmilzt“) in Einzelstränge. Dies ist die Voraussetzung für die Anlagerung der Primer und der Polymerase.
2. Primerhybridisierung (60°C): Die in Einzelsträngen vorliegenden Primer lagern sich an, es folgt die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Basen.
3. Extension (Polymerisation, Verlängerung, Amplifikation, z.B. 72°C, polymeraseabhängig): Die DNA-Polymerase kann nur jeweils einen Strang in eine Richtung verlängern. Sie fügt an die bereits angelagerten Primer die zum Gegenstrang komplementären Nukleotide. Dazu verknüpft sie unter Abspaltung eines Pyrophosphatrestes (Energiegewinn) das 3'OH-Ende der Desoxyribose mit der basennahen Phosphatgruppe des darauf folgenden dNTPs (nukleophiler Angriff der 3'-OH-Gruppe des Primers bzw. der wachsenden Kette auf das innerste Phosphoratom). Es resultiert eine Synthese in  $5' \Rightarrow 3'$  – Richtung und Ablesung von  $3' \Rightarrow 5'$ .

In jedem Zyklus der PCR werden die beiden komplementären Stränge kopiert, daraus ergibt sich eine exponentielle Vermehrung.

$$y = a * 2^z$$

mit  $y$ :=Anzahl der DNA-Stränge nach PCR

$a$ :=Anzahl der DNA-Stränge zu Beginn

$z$ :=Anzahl der Zyklen

Es entstehen jedoch nicht nur die kurzen Stücke des gewünschten DNA-Abschnittes, sondern auch längere:

Im ersten Zyklus entstehen zunächst Einzelstränge, welche am 3'-Ende länger als das gewünschte Stück sind, da die Polymerase die Matrizen-DNA ungehindert bis zum Zyklusende weiter kopiert. Da die Polymerase nur in 5'  $\Rightarrow$  3'-Richtung synthetisieren kann, beginnt sie bei den Primern am 3'-Ende des langen PCR-Produktes. Sie verlängert den Gegenstrang bis zum 5'-Ende, welches bereits die gefragte Länge besitzt. Ab dem zweiten Zyklus entstehen also die gewünschten kurzen PCR-Produkte die dann exponentiell amplifiziert werden. Die unerwünschten langen Produkte steigen hingegen nur linear an, da nur die eingesetzte DNA als Matrize dient.

Bei einer Laufzeit von 35 Zyklen erhält man folglich das  $2^{35}$ -fache des Ausgangsmaterials. Bei lediglich einem Einzelstrang als Vorlage entspricht dies einer Amplifikation auf  $\approx 34,36$  Billionen Einzelstränge. Hiervon stellen die langen Produkte nur das 35-fache des Ausgangsmaterials, im genannten Beispiel also 35 Einzelstränge. Die genaue Anzahl der erwarteten kurzen Produkte lässt sich also wie folgt berechnen:

$$p = 2^z a - za - a$$

p:= Anzahl der kurzen Einzelstränge

a:= Einzelstränge zu Beginn

z:=Anzahl der Zyklen

als Annäherung gilt:

$$\lim_{z \rightarrow \infty} = 2^z$$

### 2.6.2. Quantitative Real-time-PCR

Die quantitative Real-time PCR eignet sich zur quantitativen Bestimmung der Expression der gewünschten mRNA. In einer Real-time PCR wird dem gewöhnlichen PCR-Ansatz ein fluoreszierender Stoff beigefügt, welcher sich an die Doppelstränge anlagert. Die Fluoreszenzfarbstoffkonzentrationen werden kontinuierlich bestimmt. Die Konzentrationsanstiege entsprechen der Zunahme der DNA und folgen einer logarithmischen Funktion. Je größer die Ausgangskonzentration der zu untersuchenden DNA ist, desto früher stellt sich der Wendepunkt in der logarithmischen Darstellung dar.



Bei der zuvor durchgeführten Transkription in cDNA wurde die gesamte Menge RNA umgeschrieben, an welche die Random-Hexamer-Primer binden konnten. Es war im Folgenden von Bedeutung, nur die spezifische Ziel-cDNA zu quantifizieren. Um die differierenden Mengen an Ausgangsmaterial berücksichtigen zu können wurde ein konstant exprimiertes Referenz-Gen benötigt, ein sogenanntes Housekeeping Gen. Durch Normierung auf ein solches Gen werden Unterschiede in Zellzahl, RNA-Qualität und RT-Effizienz berücksichtigt. Als Housekeeping-Gen wurde Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1) verwendet. HPRT1 ist für diesen Zweck untersucht und anerkannt worden (de Kok et al. 2005; Meldgaard et al. 2006).

### **2.6.3. SYBR Green Master Mix**

Der SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) enthält SYBR Green 1 Farbstoff, AmpliTaq Gold DNA Polymerase, dNTPs mit dUTP, die passive Referenz 1 (ROX), und Pufferkomponenten. SYBR Green 1 ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, der spezifisch an die kleine Furche doppelsträngiger DNA bindet und somit deren Nachweis dient. SYBR Green 1 wird durch blaues Licht der Wellenlänge 497 nm maximal angeregt und emittiert grünes Licht von einer Wellenlänge von etwa 520 nm.

Die passive Referenz 1 (ROX) liefert eine konstante Fluoreszenz unabhängig von den Konzentrationen der DNA oder anderer Komponenten. Daher ist ROX notwendig zur Normalisierung der SYBR Green 1 Fluoreszenz. So lässt sich das Hintergrundsignal eliminieren und die Variabilität zwischen den verschiedenen Platten minimieren, welche zum Beispiel durch Pipettierfehler oder Evaporation zustande kommt. Der Einsatz von hot-start DNA Polymerase erhöht die Ausbeute und minimiert die Entstehung unspezifischer Produkte.

### **2.6.4. Primer**

Bei der Wahl der Oligonukleotidsequenzen für die Primer muss sowohl auf die Primereigenschaften als auch auf die Charakteristika des umspannten PCR-Produktes geachtet werden. Im Primerdesign wurden folgende Punkte berücksichtigt:

1. Die Primersequenz muss in ihrer Gesamtlänge spezifisch für die zu amplifizierende cDNA sein. Dies wurde mittels des nucleotide-BLAST Suchalgorithmus (blastn), eine von NCBI bereitgestellte Datenbank, überprüft.

2. Die Schmelzpunkte der Primer sollten etwas oberhalb der Temperatur des Anlagerungsschrittes in der PCR liegen, damit die Primer nur spezifisch an den komplementären cDNA-Abschnitten anlagern. Bei zu tiefen Temperaturen würden sie zusätzlich an ähnliche Sequenzen binden und zu falschen Produkten führen. Der Schmelzpunkt ist diejenige Temperatur, bei der die Primer als Einzelstränge vorliegen bzw. bei welcher sie mit der Matrizen-DNA hybridisieren. Der Schmelzpunkt steigt mit zunehmender Länge der Sequenz. Sie sollte die Länge von 30 bp nicht überschreiten und lag in unseren Versuchen bei 16-25 bp. Des Weiteren wird die Schmelztemperatur durch das Verhältnis des Gehaltes an A/T zu G/C bestimmt. Zwischen G und C werden drei Wasserstoffbrücken ausgebildet während A und T lediglich zwei verbinden. Daher ist die Bindung zwischen G und C stärker und es gilt: umso höher der G/C Gehalt, desto höher der Schmelzpunkt. Der G/C Gehalt sollte zwischen 40 und 60 % liegen.

Alle Primer wurden so gewählt, dass das PCR Produkt nicht länger als 150 bp ist, um die vollständige Replikation zu gewährleisten. Wenn möglich wurden Primersequenzen gewählt, welche ein Intron umspannen, um die Selektivität für die cDNA zu erhöhen. Dies war der Fall für die GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten  $\alpha$  1,2,5,  $\beta$ 1,  $\gamma$ 2,  $\delta$  und GABARAP.

Die Vorwärts- (fw) und Rückwärts- (rv) Primer für die GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten  $\alpha$ 1-5,  $\beta$ 1-2,  $\gamma$ 1-3 und  $\delta$ , GABARAP und HPRT1 hatten folgende Sequenzen:

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5' <math>\Rightarrow</math> 3')</b>	<b>Genbank-Zugangsnummer</b>	<b>Transkriptposition</b>
GABA <sub>A</sub> $\alpha$ 1 fw	gcc ccg agc tgt gca a	NM_010250.3	758-773
GABA <sub>A</sub> $\alpha$ 1 rv	ggt cca ggc cca aag ata gtc		805-825
GABA <sub>A</sub> $\alpha$ 2 fw	aca gtc caa gcc gaa tgt cc	NM_008066.3	499-518
GABA <sub>A</sub> $\alpha$ 2 rv	aac gga gtc aga agc att gta agt		613-636
GABA <sub>A</sub> $\alpha$ 3 fw	aac aaa tct gtg gaa gta gca cag g	NM_008067.3	897-921

GABA <sub>A</sub> α3 rv	tct ctg tcc caa caa cat ggc c		954-975
GABA <sub>A</sub> α4 fw	ata agt gcg gag tgc ccc atg	NM_010251.2	1001-1021
GABA <sub>A</sub> α4 rv	tcc caa att tca aag ggc ag		1054-1073
GABA <sub>A</sub> α5 fw	gca gct tga gga ctt tcc aat g	NM_176942.3	874-891
GABA <sub>A</sub> α5 rv	ggt aag cat aac tgc caa att tca		911-934
GABA <sub>A</sub> β1 fw	acc aga gtg cca atg aaa aga ac	NM_008069.4	1034-1056
GABA <sub>A</sub> β1 rv	gct gag gag aat aat gcc gtg		1090-1110
GABA <sub>A</sub> β2 fw	cca cat ccg aag cag taa tgg g	NM_008070.3	1560-1581
GABA <sub>A</sub> β2 rv	tgc tgg agg cat cat agg c		1610-1628
GABA <sub>A</sub> γ1 fw	cac tcc ttg tac tca ctg tgt ggt	NM_010252.4	303-326
GABA <sub>A</sub> γ1 rv	tcc ttc ctc cac tag ctc agt cc		359-381
GABA <sub>A</sub> γ2 fw	caa ata cat gga gca ttg gaa gc	NM_008073.2	359-381
GABA <sub>A</sub> γ2 rv	tca tag tca tca tct gac ttt tgg c		461-485
GABA <sub>A</sub> γ3 fw	ttc agt tga ggc agc tga tca	NM_008074.2	716-736
GABA <sub>A</sub> γ3 rv	ctg agg ccc atg aag tca aac		758-778
GABA <sub>A</sub> δ fw	gtg gcc agc att gac cat atc	NM_008072.1	314-334
GABA <sub>A</sub> δ rv	tct gat gca gga aca cag tca tg		358-380
GABARAP fw	aag agg agc atc cgt tcg aga	NM_019749.3	369-389
GABARAP rv	gct ttg ggg gct ttt tcc ac		449-468
HPRT1 fw	gcc taa gat gag cgc aag ttg	NM_013556.2	798-818
HPRT1 rv	tac tag gca gat ggc cac agg		878-898

Die PCR Produkte wiesen folgende Länge auf und befanden sich auf den genannten Exons:

PCR Produkt	Länge in Basenpaaren (bp)	Exon
GABA <sub>A</sub> $\alpha$ 1	68	1-2
GABA <sub>A</sub> $\alpha$ 2	69	6-7
GABA <sub>A</sub> $\alpha$ 3	79	7
GABA <sub>A</sub> $\alpha$ 4	73	5
GABA <sub>A</sub> $\alpha$ 5	61	6-7
GABA <sub>A</sub> $\beta$ 1	77	8-9
GABA <sub>A</sub> $\beta$ 2	69	10
GABA <sub>A</sub> $\gamma$ 1	79	1
GABA <sub>A</sub> $\gamma$ 2	127	1-2
GABA <sub>A</sub> $\gamma$ 3	63	6
GABA <sub>A</sub> $\delta$	67	3-4
GABARAP	100	1-2
HPRT1	101	9

Alle Primer wurden bei der MWG-Biotech AG (Ebersberg) bestellt.

Die Spezifität der PCR Produkte wurde mittels Analyse der Dissoziationskurve und/oder 2 %-iger Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen.

### 2.6.5. Standards

Zur korrekten Bestimmung der Menge an cDNA war es notwendig, eine verlässliche und reproduzierbare Standardkurve zu erstellen. Da bei Realtime-PCRs auf jeder Platte die Schwellenfluoreszenz manuell eingestellt wurde, und dadurch leicht variieren kann, wurden die Standards auf jeder Platte mitgeführt. Als Standards wurden mittels Polyacrylamid Gelelektrophorese aufgereinigte Oligonukleotide (Thermo Fischer Scientific, Ulm) verwendet, welche der zu amplifizierenden Sequenz identisch waren. Sie wurden zum Lösen auf eine Konzentration von 100 pmol/ $\mu$ l geliefert. Es wurden Verdünnungsreihen im Abstand 10-facher Konzentrationsunterschiede erstellt. Für die

Experimente wurden die fünf Verdünnungsstufen benutzt, bei welchen die Proben etwa bei der mittleren Verdünnungsstufe zu erwarten sind ( $10^{-5}$  pmol/ $\mu$ l –  $10^{-9}$  pmol/ $\mu$ l).

Die Standardsequenzen waren Folgende:

<b>Gen</b>	<b>Sequenz (5' <math>\Rightarrow</math> 3')</b>	<b>Genbank-Zugangsnummer</b>	<b>Transkript-position</b>
GABA <sub>A</sub> $\alpha$ 1	gccccgagctgtgcaagcccgtgatgaagaaaagtcgggggt ctctctgactatctttgggctggacc	NM_010250.3	758-825
GABA <sub>A</sub> $\alpha$ 2	acagtccaagccgaatgtccatgcacctggaggatttcccg atggatgctcattcatgccactgaaatttggagctacgctta cacaacctcagaagtcacatatattggacttacaatgcttctga ctccgtt	NM_008066.3	772-909
GABA <sub>A</sub> $\alpha$ 3	aacaaatctgtggaagtagcacaggatggctcacgcctgaat cagtatgacttgcttggccatgttgttgggacagaga	NM_008067.3	897- 975
GABA <sub>A</sub> $\alpha$ 4	ataagtgcggagtgccccatgagactggaggatttctctatgg atggcatgcctgcccttgaatttggga	NM_010251.2	1001-1073
GABA <sub>A</sub> $\alpha$ 5	gcagcttgaggactttcaatggatgccatgcctgtcccctg aaatttggcagttatgcttacc	NM_176942.3	874-934
GABA <sub>A</sub> $\beta$ 1	accagagtccaatgaaaagaacagactggagatgaacaaa gtccaagttgatgccacggcaatattctcctcage	NM_008069.4	1034-1110
GABA <sub>A</sub> $\beta$ 2	ccacatccgaagcagtaatgggacttgagaccccaggagc acaatgctgcctatgatgcctccagca	NM_008070.3	1560-1628
GABA <sub>A</sub> $\gamma$ 1	cactccttgactcactgtgtggttctgagccttgaggcaaaa ctctgtgcttggggactgagctagtggaggaagga	NM_010252.4	303-381
GABA <sub>A</sub> $\gamma$ 2	caaatacatggagcattggaagctcagctactctctgtatttt cacagaaaatgacgctgtggattctgctcctgctacgctctac ccaggcttcacaagccaaaagtcagatgatgactatga	NM_008073.2	359-485
GABA <sub>A</sub> $\gamma$ 3	ttcagttgaggcagctgatcagaaatcatggcggctctatcag ttgacttcatggcctcag	NM_008074.2	716-778
GABA <sub>A</sub> $\delta$	gtggccagcattgaccatatctcagaggcaaacatggaatac accatgactgttctcctgcacaga	NM_008072.1	314-380
GABARAP	aagaggagcatccgttcgagaaacgccgctctgagggcga gaaaatccgaaagaaataccagaccgggtcccggatag tggaanaagccccaaagc	NM_019749.3	369-468
HPRT1	gcctaagatgagcgcgaagtgaatctgcaatacaggagtc ctgttgatgttccagtaaaattagcaggtgttctagtctgtgg ccatctgcctagta	NM_013556.2	798-898

### 2.6.6. Protokoll Real-time PCR

Die cDNA wurde 1:10 verdünnt (5µl cDNA + 45 µl nucleasefreies H<sub>2</sub>O). Für die Real-time PCR wurden 5 µl verdünnte cDNA bzw. Standardverdünnungen + 10 µl Mastermix für ein Gesamtvolumen von 15 µl eingesetzt.

Der Mastermix enthielt folgende Komponenten pro Probe:

7,5 µl	2x MasterMix (SYBR Green)
0,9 µl	5 µM Primer vorwärts
0,9 µl	5 µM Primer rückwärts
0,7 µl	H <sub>2</sub> O (nucleasefrei)
10 µl	total

Auf jeder Platte wurden Duplikate aus Negativkontrollen (NTC, von englisch No template control), Standardverdünnungen und Proben analysiert. Es wurden jeweils zur Hälfte die Genexpression des zu untersuchenden Gens und diejenige von HPRT1 gemessen. Die Proben waren ebenfalls zur Hälfte von Lc - und Wt-Tieren. Es wurden optische Reaktionsplatten im 96 Proben-Format benutzt und mit optisch klaren Hitzeversiegelungsfilmen (beides ABgene, Epsom, UK) verschlossen.

Die Platten wurden im ABI Prism 7700 Detektions System (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) mit folgendem Protokoll analysiert:

	Temperatur	Dauer	Wiederholungen	Funktion
1.	50°C	2 min.	1	Carryover Dekontaminierung via UNG*
2.	95°C	10 min.	1	AmpliTaq Gold DNA Polymerase Vor-Aktivierung
3.	95°C	15 sek.	40	Schmelzen/Denaturierungsschritt
4.	60°C	1 min		Anlagerungs-/Extensionsschritt
5.	60°C ⇒ 95°C	20 min	1	Dissoziation

\* UNG = Uracil N-glycosylase ist ein Enzym, welches desoxy-Uracil enthaltende Ribonucleinsäuren von früheren PCR – Reaktionen spaltet und dadurch von etwaiger Kontamination mit RNA befreit.

Am Ende jeder Analyse wurde die Dissoziationskurve zur Kontrolle des spezifischen Schmelzpunktes  $T_m$  der PCR Produkte bestimmt.

## **2.6.7. Datenanalyse**

Die Datenanalyse der PCR wurde mit der ABI Prism 7000 SDS Software durchgeführt.

### **2.6.8.1 ROX**

Nach erfolgreicher Real-time PCR wurden die Proben auf einen korrekten Anstieg des ROX, der passiven Referenz untersucht. Die NTCs zeigen normalerweise keinen Anstieg.

### **2.6.8.2 Amplifikationskurven und $C_t$ – Kreuzungspunkt**

Proben und Standards wurden daraufhin überprüft, dass jeweils nur ein Peak vorhanden war. Dies zeigt, dass nur ein PCR Produkt amplifiziert und analysiert wurde. Zunächst wurde für die Berechnung einer Grundlinie der Hintergrundfluoreszenz ein Zyklusintervall festgelegt. Während dieses Intervalls kommt es noch zu keiner signifikanten Akkumulation von PCR-Produkten. Das Intervall umfasst üblicherweise in etwa die Zyklen 3-15. Diese Normalisierung ist notwendig, um sicherzustellen, dass der Anstieg von einem einheitlichen Basiswert aus stattfindet. Zur weiteren Analyse ist der Zeitpunkt des Erreichens einer gewählten Fluoreszenzschwelle entscheidend. Diese Schwelle kann nur vergleichbar schnell erreicht werden, wenn der Anstieg von einer gemeinsamen Grundlinie aus stattfindet.

Der wichtigste Parameter ist der Schwellenzyklus ( $C_t$ , von engl. threshold cycle).  $C_t$  ist definiert als die Zykluszahl, bei welcher die gemessene Fluoreszenz eine gewählte Schwelle oberhalb der Grundlinie überschreitet. Die entsprechenden Schwellenfluoreszenzwerte nennt man  $\Delta R_n$  Werte (Basislinien-korrigierte normalisierte Fluoreszenz).  $\Delta R_n$  ist hierbei die Differenz zwischen den  $R_n$ -Werten in einem bestimmten Zyklus und der Grundlinie. Die  $R_n$ -Werte entsprechen der SYBR-Green-Fluoreszenz geteilt durch die Fluoreszenz des passiven Referenzsignals ROX.

Die Höhe der Schwellenfluoreszenz und somit die  $\Delta R_n$ -Werte zur Bestimmung von  $C_t$  wurden manuell in der exponentiellen Phase festgelegt. In der logarithmischen Darstellung konnte dies leicht durchgeführt werden.

Für weitere Berechnungen wurden die  $C_t$ -Werte in SigmaStat 2.03 (Access softek Inc., San. Rafael, CA, USA) exportiert.

Die Standardkurven und Proben zeigen zunächst einen logarithmischen Verlauf, gefolgt von einem exponentiellen Anstieg und enden in einer Sättigungs- oder Plateauphase.

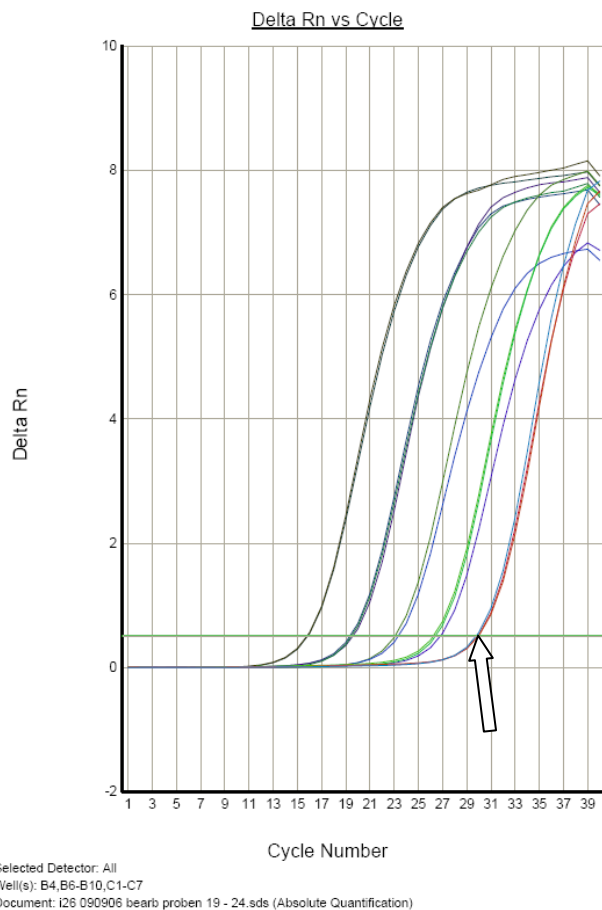


Abb.2.1:Amplifikations-Kurven der Duplikate von 5 Standardverdünungen von GABARAP in linearer Darstellung,  $\Delta R_n$  über der Zykluszahl. Der Blockpfeil zeigt auf den Kreuzungspunkt der Amplifikation der höchsten Verdünnung mit der Schwellenfluoreszenz-Gerade (grün). Die Zykluszahl am Kreuzungspunkt entspricht dem  $C_t$ -Wert der höchsten Verdünnung. Die Grundlinie befindet sich bei  $\Delta R_n=0$

### 2.6.8.3 NTC

Die NTCs bleiben optimalerweise im Bereich der Grundlinie und unterhalb der Schwellenfluoreszenz. In Anlehnung an (Bustin and Nolan 2004) wurden für die Auswertung der NTCs folgende Regeln angewandt:

1. NTC mit einer  $C_t$  von weniger als 30 wurden als positiv gewertet.
2.  $C_t$  Unterschiede von mindestens 5 zwischen den Proben und NTC wurden akzeptiert und als nicht kontaminationsverdächtig eingestuft.



3. bei gleichzeitigem Vorhandensein von negativen und positiven Cts in den Triplets wurde die NTC als positiv gewertet.

$C_t$ -Unterschiede von mindestens 5 entsprechen einem  $(1+\text{Effizienz})^5$ -fachen Konzentrationsunterschied zwischen NTC und Probe. Bei Effizienzen annähernd 100 % entspricht dies dem Faktor  $2^5=32$ . Die Menge des PCR Produktes in der NTC entspräche somit 1/32 der Menge in der Probe, also ~3 %.

### 2.6.8.3 Dissoziationskurve

Am Ende jeder Real-time PCR wurde eine Dissoziationskurve erstellt. Durch Analyse der spezifischen Schmelzpunkte können die PCR-Produkte identifiziert werden und unerwünschte Amplifikate wie Primer-Dimere oder unspezifische Sequenzen erkannt werden. Primer-Dimere zeigen einen Scheitelpunkt bei niedrigeren Temperaturen. NTCs amplifizieren nicht und dürfen keinen Peak aufweisen.

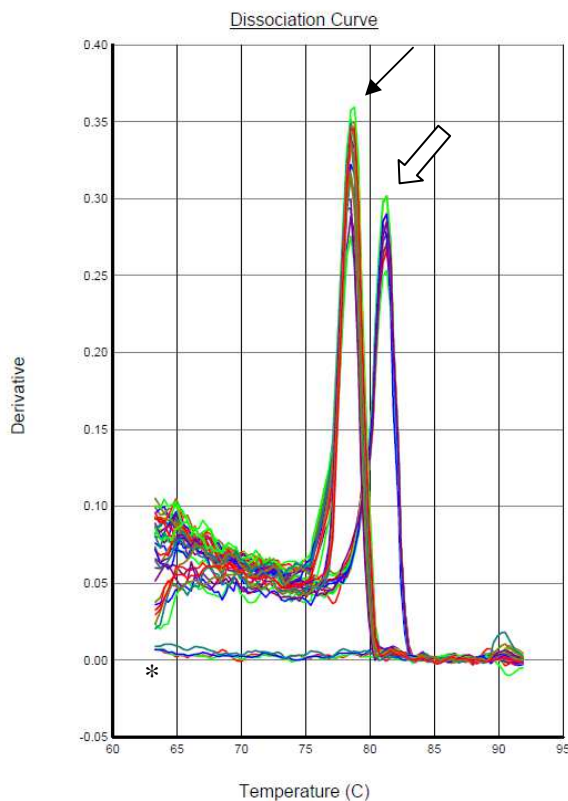


Abb. 2.2: Dissoziationskurven von GABARAP  $\leftarrow$  und HPRT  $\leftarrow$   
 Die Änderungen der Fluoreszenz sind als Funktion der Temperatur in °C aufgetragen. Die Temperatur am Scheitelpunkt entspricht der Schmelztemperatur. Fluoreszenzänderungen als Funktion der Temperatur in °C. NTCs (\*) zeigen keine Dissoziationskurve

### 2.6.8.3 Standardkurven und Regressionsgeraden

Die Bestimmung der Ausgangskonzentrationen von cDNA wurde mittels Interpolation ermittelt. Hierzu wurden zunächst die Standardkurven bestimmt. Aus den  $C_t$ -Werten der Duplikate der Standardverdünnungen wurden Mittelwerte gebildet und als Funktion des Logarithmus des entsprechenden Verdünnungsfaktors aufgetragen. Hieraus wurden mit Hilfe des Statistikprogrammes SigmaStat lineare Regressionsgeraden berechnet. Diese werden mit der Methode der kleinsten Quadrate bestimmt. Das bedeutet, dass diejenige als Regressionsgerade gewählt wird, bei der die Summe der Quadrate der Residuen minimal ist. Die Residuen sind als Differenz der y-Werte der Messwerte zur zu ermittelnden Regressionsgerade definiert.

Die Regressionsgerade hat folgende Form:

$$y = bx + c$$

mit

$y := C_t$

$b :=$  Steigung

$c :=$  y-Achsenabschnitt.

Die x-Werte entsprechen dem Logarithmus der gesuchten Konzentration  $q_{rel}$ . Es handelt sich hierbei um relative Konzentrationen, die je nach Menge des Ausgangsmaterials variieren können. Nach Umstellung der Gleichung kann  $q_{rel}$  wie folgt berechnet werden:

$$\log q_{rel} = \frac{y - c}{b}$$

$$q_{rel} = 10^{\frac{y - c}{b}}$$

Um die Expressionslevel der verschiedenen Proben vergleichen zu können, müssen die errechneten Konzentrationen in Relation zum House-keeping Gen gesetzt werden. Für das normalisierte  $q_{norm}$  gilt:

$$q_{norm} = \frac{q_{relGABARAP}}{q_{relHPRT}}$$

$q_{norm}$  wurde zur weiteren statistischen Berechnung verwendet.

Bei der Berechnung der Regressionsgeraden wurde auch  $r^2$  mitbestimmt, das Bestimmtheitsmaß bzw. Determinationskoeffizient.  $R^2=0$  bedeutet keine,  $r^2=1$  bedeutet exakte lineare Abhängigkeit der beiden Variablen. Der Determinationskoeffizient lag in den Versuchen bei  $r^2 = 0,967-0,999$ .

Die Effizienz E für die PCR wurde folgendermaßen berechnet:

$$E = 10^{\frac{-1}{b}} - 1 \quad \text{b:=Steigung}$$

Die Effizienz der PCR liegt optimalerweise bei  $E=1$ , was einer Steigung von  $b = -1/\log 2 \approx 3,322$  entspricht. Das bedeutet, dass in jedem PCR-Zyklus jedes cDNA-Stranges dupliziert wird. Sie lag in den Experimenten bei 94-99,99 %.

#### **2.6.8.4            Statistische Tests**

Signifikante Unterschiede zwischen den normalisierten Werten der Lc- und Wt-Gruppen wurden mit dem student's paired t-test verifiziert. Der t-test eignet sich für normalverteilte Stichproben. Jede Gruppe wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test (mit Lilliefors' Korrektur) auf Normalverteilung überprüft. Ebenso wurden die Stichproben auf gleiche Varianz geprüft.

Die Statistischen Analysen wurden mit SigmaStat 2.03 durchgeführt und mit SigmaPlot 2001 dargestellt.

Die Testprüfgröße  $t$  wird mit der empirischen Standardabweichung  $\sigma$  und dem arithmetischen Mittel  $\bar{X}$  berechnet:

$$t = \frac{\bar{X}}{\sigma} \sqrt{n}$$

wobei

$\bar{X}$  := arithmetisches Mittel

$\sigma$  := empirische Standardabweichung

$n$  := Probenanzahl pro Gruppe

mit: 
$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

und 
$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}$$

Hierbei handelt es sich aber um zwei unabhängige normalverteilte Stichproben  $x_1, x_2, \dots, x_n$  (Lc) und  $y_1, y_2, \dots, y_m$  (Wt) jeweils aus normalverteilten Grundgesamtheiten mit den Erwartungswerten  $\mu_x$  bzw.  $\mu_y$  und unbekannter, aber gleicher Standardabweichung  $\sigma$ . Es soll die Nullhypothese  $H_0: \mu_x = \mu_y$  gegen die zweiseitige Alternative  $H_1: \mu_x \neq \mu_y$  mit dem Erwartungswert  $\mu$  getestet werden.

Dazu wird mit den Stichprobenmittelwerten  $\bar{x}, \bar{y}$ , mit

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad \text{und} \quad \bar{y} = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m y_i$$

den Stichprobenvarianzen  $s_x^2, s_y^2$ , definiert als

$$s_x^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

und der sogenannten gewichteten Varianz  $s^2$

$$s^2 = \frac{(n-1)s_x^2 + (m-1)s_y^2}{n+m-2}$$

die Prüfgröße  $t$

$$t = \sqrt{\frac{nm}{n+m}} \frac{\bar{x} - \bar{y}}{s}$$

berechnet. Die Prüfgröße ist t-verteilt mit  $n + m - 2$  Freiheitsgraden, also wird  $H_0$  zum Signifikanzniveau  $\alpha$  abgelehnt, wenn  $|t| > t(1 - \frac{\alpha}{2}, n + m - 2)$  gilt.

## 2.7. Genotypisierung

### 2.7.1. Einleitung

Lc können aufgrund ihrer abnormen Bewegungsmuster ab einem Alter von circa 12-14 Tagen identifiziert werden. Zu diesem Zeitpunkt haben die Wildtyptiere ihre volle Koordinationsfähigkeit entwickelt. Da in den Experimenten auch P11 Tiere verwendet wurden, welche klinisch nicht zu differenzieren sind, war eine genetische Untersuchung der Tiere zum Nachweis der Punktmutation notwendig. Die DNA wurde aus den Enden der Mäuseschwänze isoliert, mittels PCR vervielfacht, aufgereinigt und anschließend sequenziert.

### 2.7.2. DNA Isolierung

Um die DNA aus dem Gewebe aufzureinigen wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) verwendet.

Zuerst wurde das zerkleinerte Gewebe mit Proteinase K lysiert, daraufhin an die Säulenmembran gebunden und nach zwei Waschschrinen schließlich eluiert. Mit einer Ausnahme wurden alle Zentrifugierungsschritte bei 9000rpm durchgeführt.

Das Drehsäulen Protokoll (Spin-Column-Protokoll) für tierisches Gewebe wurde war folgendes:

1. Das Gewebe wurde in kleine Stücke geschnitten und in ein 1,5 ml Mikrozentrifugierröhrchen. mit 180 µl ATL Puffer überführt.
2. 20 µl Proteinase K wurde hinzugefügt und bei 56°C im Schüttelbad für 10h lysiert.
3. Daraufhin wurden 200 µl AL Puffer addiert, vermischt und 200µl Ethanol (96-100 %) hinzupipettiert.
4. Die Proben wurden nun auf eine DNeasy Mini Drehsäule aufgetragen und für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.
5. Anschließend wurde für den ersten Waschschrift 500 µl Puffer AW1 beigefügt und für 1 Minute zentrifugiert.
6. In einem neuen Sammelröhrchen wurde 500 µl Puffer AW2 addiert und durch 3-minütiges Zentrifugieren bei  $\geq 14.000$  rpm getrocknet.
7. Zum Eluieren wurde in einem neuen Mikrozentrifugiergefäß 200µl AE Puffer auf die Säulenmembran pipettiert. Nach 1-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben für 1 Minute. zentrifugiert. Um eine maximale Ausbeute zu erreichen wurde dieser Schritt wiederholt.

### 2.7.3. PCR

Um die Menge an Matrizen-DNA zu erhöhen wurde zunächst eine PCR durchgeführt. Heterozygote B6CBACa-A<sup>w-J</sup>/A-Grid2<sup>Lc</sup>/J Mäuse weisen im Grid2-Gen auf Exon 12 eine Punktmutation von G zu A (Plusstrang) auf. Exon 12 ist 139 bp lang. Zusammen mit den umspannenden Primer beträgt die Länge des PCR Produktes 227 bp. Die Primer

zur Genotypisierung wurden so gewählt, dass sie das Exon 12 umspannen (Zuo et al. 1997). Dies erhöht die Spezifität für genomische DNA, da Intronsequenzen vervielfacht werden. Folgende Primer wurden verwendet:

Primer	Sequenz (5'⇒ 3')	Startpunkt
Grid2 fw	taa aag cat att gat gtt gtt g	Intron 11-12 6326099 - 6326120
Grid2 rv	cag cat ttg tca ggt ttg gtg ac	Intron 12-13 6326303 - 6326325

Gendatenbank-Zugangsnummer (BLAST): NW\_001030811.1

Der amplifizierte Genabschnitt mit Introns (Minuskel) und Exon 12 (Majuskel) aus dem Ensembl-Projekt (Birney et al. 2004) besitzt folgende Nukleotidsequenz:

5'taaaagcatattgatgttggtgcatctctcctttccacagGTGGGGAAGTCCCATACACAACCTCTG  
GCAACCCGAATGATGATGGGGGCTTGGTGGTTATTTGCTCTGATTGTCATCT  
CATCTTATACAGCCAACCTTGCCGCTTTCCTCACTATCACCCGCATTGAGAG  
CTCCATCCA gtaagtaggcataattccaggtgcaccaaactgacaaatgctg3'

Für die PCR wurde Platinum Taq DNA Polymerase high fidelity (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verwendet, das Protokoll war wie folgt:

Der Mastermix enthielt folgende Komponenten je Probe:

5 µl	HiFi Puffer
1 µl	Primer fw
1 µl	Primer rv
0,2 µl	Polymerase
1µl	dNTP
2µl	MgSO <sub>4</sub>
-----	
10,2µl	Mastermix

Der PCR-Ansatz setzte sich je Probe wie folgt zusammen:

10,2	µl Mastermix
1µl	unverdünnte DNA
38,8 µl	nucleasefreies Wasser

Für die PCR wurde folgendes Protokoll verwendet:

94°C	2 min.		
94°C	30 sek.	} x 32	Denaturierung
59°C	30 sek.		Anlagerung der Primer
68°C	2 min.		Extension durch Polymerase
68°C	10 min.		
4°C	x min.		

#### **2.7.4. Aufreinigung nach der PCR**

Zur Aufreinigung der DNA wurde das QIAquick PCR Purifikation Kit Protokoll von QIAGEN durchgeführt:

1. 5 Volumeneinheiten (250µl) Puffer PBI und 1 Volumeneinheit (50 µl) des PCR-Produktes wurden addiert und vermischt. Die gelbe Farbe der Mischung zeigte einen optimalen pH an.
2. Um die DNA zu binden, wurden die Proben auf die Drehsäule überführt, 60 Sekunden lang zentrifugiert und anschließend wurde der Durchfluss verworfen.
3. Für den darauf folgenden Waschschrift wurden 0,75 ml Puffer PE zur QIAquick-Drehsäule pipettiert und 60 Sekunden lang zentrifugiert.
4. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde die Säulenmembran durch 1-minütiges Zentrifugieren getrocknet.
5. Zum Eluieren wurde in einem neuen Mikrozentrifugierröhrchen 30 µl Puffer EB auf die Membran aufgetragen, 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und für eine weitere Minute zentrifugiert.

#### **2.7.5. Gelelektrophorese zum Nachweis des PCR Produktes**

Der Nachweis des PCR-Produktes wurde mittels Gelelektrophorese erbracht.

Hierzu wurde 2 %-iges Agarosegel und OrangeRuler 50bp DNA Ladder und 6x Orange Loading Dye Solution von Fermentas LifeSciences (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Die Leiter enthält 20 Fragmente im Abstand von je 50bp. 200bp, 500bp und 1000 bp besonders deutlich sichtbar sind. Das Exon 12 (139 bp) umfassende PCR-Produkt hat inklusive umspannender Primer eine Länge von 227 bp. Die aufgetragenen Proben projizieren sich auf die 250 bp repräsentierende Bande:

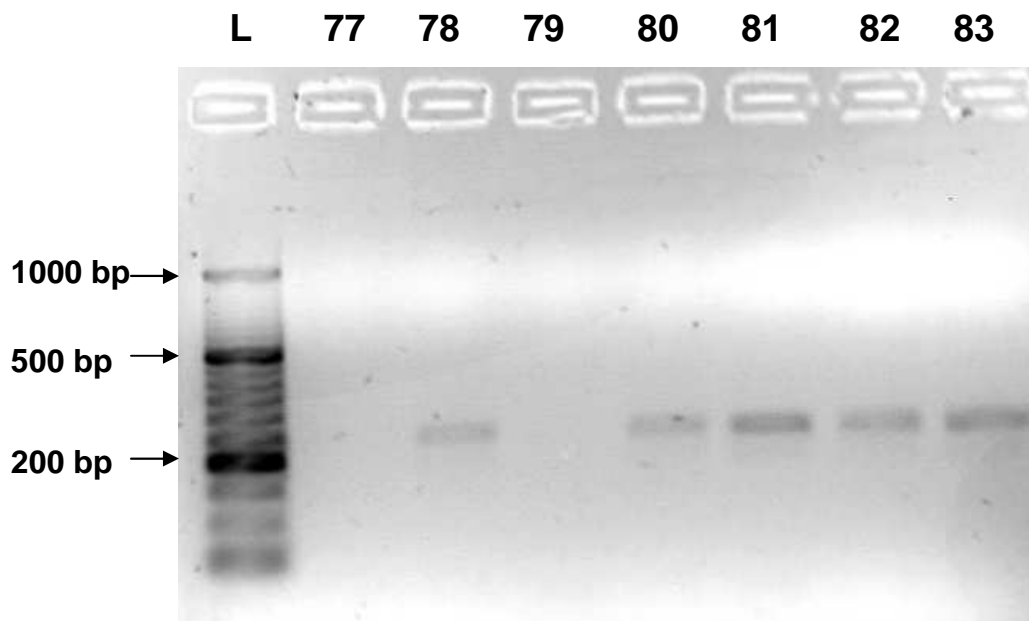


Abb. 2.3: 2 % Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte der Proben 77-83: Linie L: Längenstandard (50 – 1000 bp in 50 bp Intervallen), 77-83: PCR-Produkte der Proben 77-83. Mit Ausnahme der Proben 77 und 79 sind die PCR-Produkte als Banden bei 227 bp abgebildet.

### 2.7.6. Sequenzierung

Die Sequenzierung des von der Mutation betroffenen Genabschnittes beruht auf der 1975 von Sanger und Gilbert entwickelten Kettenabbruch-Synthese. Wesentliches Element dieser Sequenziermethode ist die PCR. Im Gegensatz zur konventionellen PCR wird sie nur mit einem Primer (vorwärts oder rückwärts) durchgeführt, um nur einen Strang zu replizieren und es werden zusätzlich zum konventionellen PCR-Ansatz mit dNTPs auch Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTP) hinzugefügt, deren Ribose keine 3'-Hydroxygruppe besitzen. Die Hydroxy-Gruppe am 3'-C-Atom ist für die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids essentiell. Immer wenn



ddNTPs eingebaut werden führt dies zum Abbruch der Strangsynthese. Auf diese Art und Weise entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die mit dem jeweiligen ddNTP enden. Um die Sequenz bestimmen zu können, ist es notwendig, die Kettenabbruchprodukte der Größe nach aufzutrennen und den vier mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierten Basen zuzuordnen. Dies erfolgt mittels Kapillarelektrophorese. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten zur Anode, werden ihrer Länge nach aufgetrennt. Die Fluoreszenz der verschiedenen Farbstoffe wird nacheinander detektiert. Das Chromatogramm gibt die Sequenz des Genabschnittes wieder.

Die Sequenzierung wurde zur Hälfte vom 4baselab (Reutlingen, Deutschland) und zur anderen Hälfte wie oben beschrieben durchgeführt.

Die Sequenzier-PCR wurde jeweils mit einem Primer (5  $\mu$ M) angesetzt und enthielt die folgenden Komponenten:

- 2 $\mu$ l Big Dye (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)
- 1  $\mu$ l 5x Puffer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)
- 1 $\mu$ l Primer
- 6 $\mu$ l PCR Produkt

Für die Sequenzier-PCR wurde folgendes Protokoll verwendet:

Temperatur	Dauer	Wiederholungen
94°C	1 min	1
94°C	10 sek	30
50°C	5 sek	
60°C	4 min	

Zur Aufreinigung wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt:

1. Zum Sequenzierprodukt wurde 2,5 fach 3M NaAc/100 % Ethanol (pH 4,8) hinzugefügt und für 45 min bei maximaler Drehzahl zentrifugiert.
2. Die Proben wurden mit 100 µl 70 % Ethanol gewaschen und 15 min. bei höchster Drehzahl zentrifugiert.
3. Um das Ethanol vollständig zu entfernen wurde zusätzlich über Kopf zentrifugiert.
4. Schließlich wurden die Proben in 15 µl H<sub>2</sub>O gelöst und für 30 Minuten gevortext.

Das aufgereinigte Produkt konnte nun durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt und analysiert werden.

### 2.7.7. Auswertung

Das Sequenzierchromatogramm wurde mit FinchTV 1.4.0 (Geospiza, Seattle, WA, USA) überprüft. Zur Auswertung der Sequenzen zum Vergleich mit der bekannten Exon Sequenz wurde die Staden Package 1.6.0 Software (Sourceforge) verwendet. Die Punktmutation der heterozygoten Lc-Mäuse stellt sich als Doppel-Peak der Basen G und A als Ausdruck der beiden Allele in der Sequenzierung mit Vorwärtsprimern (bzw. C und T im Ansatz mit Rückwärtsprimer) dar.

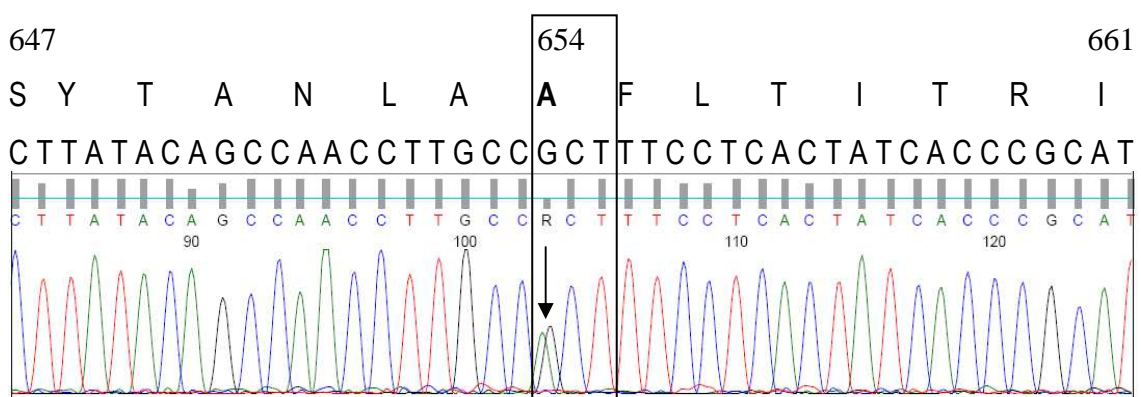


Abb.2.4: Chromatogrammausschnitt einer Lc-Probe mit Doppelpeak von G (schwarz) und A (grün) in Programmposition 103 (Pfeil). Durch die G/A Transition wird in Proteinposition 654 (Kasten, Proteinsequenz-Zugangsnummer NP\_032193.1) Alanin (GCT) durch Threonin (ACT) substituiert. Oberhalb des Chromatogramms ist die genomische Sequenz von Grid 2 dargestellt, Positionen 6326223-6326265, (Genbankzugangsnummer NW\_001030811.1)

## **2.8. Bestimmung des Corticosteronspiegels**

Zur Blutabnahme wurden die Versuchstiere mit Ketamin (150 mg/kgKG intraperitoneal) anästhesiert. Das Plasma wurde durch intrakardiale Punktion in ein mit Lithiumionen und Heparin versetztes Plasmaseparationsröhrchen (BD Microtainer PST LH, Becton Dickinson, Heidelberg) abgenommen und sofort auf Eis gekühlt. Nach der Zentrifugierung wurden die Seren bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Die Corticosteronspiegel im Serum wurden mit der Coat-A-Count Rat Corticosteron Methode (TRKC 1; DPC Biermann, Bad Nauheim) bestimmt. Es handelt sich hierbei um ein Festphasen-Radioimmunoassay bei welchem <sup>125</sup>I-markiertes Ratten-Corticosteron mit demjenigen aus der Probe für 2h bei Raumtemperatur um die Bindungsstellen der an der Wand des Polypropylenröhrchen befestigten Antikörper konkurriert. Durch das Abgießen des Überstandes wird die Konkurrenz beendet und nicht gebundenes Corticosteron entfernt. Zur Bestimmung der Antikörperbindungsfraktion des <sup>125</sup>I-markierten Corticosteron wurden mit einem Gammazähler (Multi-Crystal Counter LB 2104, Berthold, Bad Wildbad) die Anzahl der Zerfälle pro Minute im Röhrchen detektiert und mittels einer Kalibrierungskurve in die Corticosteronspiegel in der Probe umgerechnet. Die Blutentnahmen wurden jeweils nachmittags im selben Zeitfenster durchgeführt um durch den zirkadianen Rhythmus bedingten Schwankungen zu berücksichtigen.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1. Einleitung**

In den DCN von Lc- und Wt-Tieren wurden die mRNA-Expressionshöhen der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten  $\alpha$ 1-5,  $\beta$ 1-2,  $\gamma$ 1-3 und  $\delta$ , sowie von GABARAP zu den Zeitpunkten P11, P14 und 8Wo untersucht. Es wurden die Expressionslevels bei Tieren desselben Alters verglichen, da die Genexpression der GABAAR-Untereinheiten (Fritschy et al. 1994), des GABARAP und des Housekeeping-Genes HPRT1 (Brosh et al. 1990; Gutensohn and Guroff 1972) während der postnatalen Entwicklung variieren können.

### **3.2. mRNA Expression der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten**

An P11 zeigten die Tiere klinisch noch keine charakteristischen Zeichen des Lc Phänotyps. Die Untersuchung der mRNA Genexpression der GABAAR-Untereinheiten lieferte keine signifikanten Unterschiede zwischen Lc und Wt. Auf der Abbildung 3.1 sind die Expressionslevel der verschiedenen GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten/HPRT1 bei Lc und Wt zum Zeitpunkt P11 [jeweils n=5 Tiere, außer  $\alpha$ 2 (n=4),  $\gamma$ 3 (n=3), GABARAP Lc (n=10), GABARAP WT (n=8)] dargestellt.

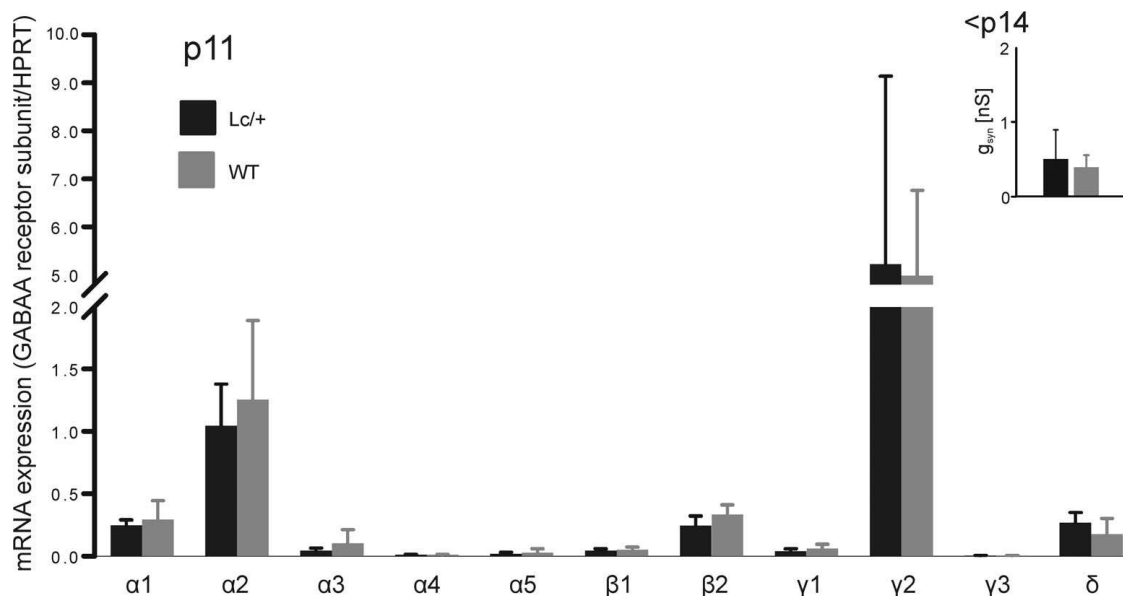


Abb. 3.1:

mRNA Expression [GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheit/Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT1)] in DCN Gewebe von Lc (schwarze Balken) und Wt (graue Balken; Mittelwert ± SD) zum Zeitpunkt P11. Für keine untersuchte Untereinheit konnten statistisch signifikante Unterschiede gefunden werden. Das eingefügte Schaubild ist aus (Linnemann et al. 2004) und zeigt die durchschnittliche synaptische Leitfähigkeit ( $g_{syn} \pm SD$ ) aus Miniatur- inhibitorischen postsynaptischen Strömen (IPSCs), abgeleitet in den DCN von Tieren < P14. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Lc [schwarze Balken,  $0,50 \pm 0,39$  nS ( $n = 3$ )] und Wt [graue Balken;  $0,39 \pm 0,16$  nS ( $n = 4$ ),  $P = 0,62$ ] gefunden.

Als nächstes wurden Mäuse im Alter von P14 betrachtet. Zu diesem Zeitpunkt war der Lc Phänotyp deutlich von den Kontrolltieren zu unterscheiden. Sie zeigten das typische ataktische Gangbild als Folge des massiven PC-Verlustes sowie eine erhöhte Falltendenz. Es konnte eine statistisch signifikante Abnahme der mRNA-Expression der  $\gamma 2$ -Untereinheit in Lc [1,6-fache Herunterregulation, das Verhältnis GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheit/HPRT1 war  $1,9390 \pm 0,9230$  SD, (Lc,  $n=9$ ) vs.  $3,0410 \pm 1,1530$  SD (Wt,  $n=10$ ),  $P=0,036$ ] beobachtet werden. Die Analyse der anderen Untereinheiten ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Lc und Wt [jeweils  $n = 5$  Tiere, außer Lc  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma 1$  ( $n = 9$ ), und Wt  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma 1$  ( $n = 10$ )]. Abbildung 3.2 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

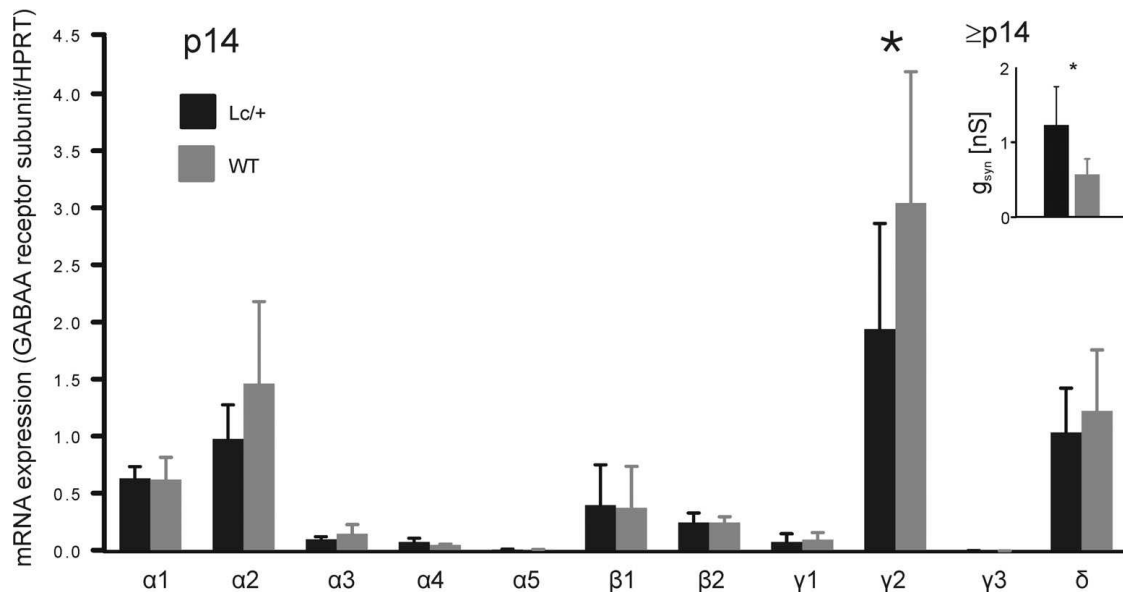


Abb.3.2:

mRNA Expression [GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheit/HPRT1] in DCN Gewebe von Lc (schwarze Balken) und Wt (graue Balken; Mittelwert ± SD) an P14 aus (Linnemann et al. 2006). \* Statistisch signifikanter Unterschied für die γ2 Untereinheit (n = 9 für Lc, n=10 für Wt; P = 0,036); es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Lc und Wt der anderen untersuchten Untereinheiten beobachtet. Das eingefügte Schaubild ist aus (Linnemann et al. 2004) und zeigt die durchschnittliche synaptische Überleitung ( $g_{syn} \pm SD$ ) abgeleitet in mIPSCs aus DCN von Tieren  $\geq$  P14. \* Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Lc [schwarze Balken,  $1,23 \pm 0,51$  nS (n = 10)] und Wt [graue Balken:  $0,57 \pm 0,21$  nS (n = 19), P  $\leq$  0,001]

Die Abnahme der mRNA-Expression der γ2-Untereinheit an P14 war transient, sie konnte in 8 Wochen alten Tieren nicht mehr nachgewiesen werden [γ2: Lc und Wt je n = 8, P = 1,000, GABARAP Lc (n = 11), Wt (n = 10), P = 0,767].

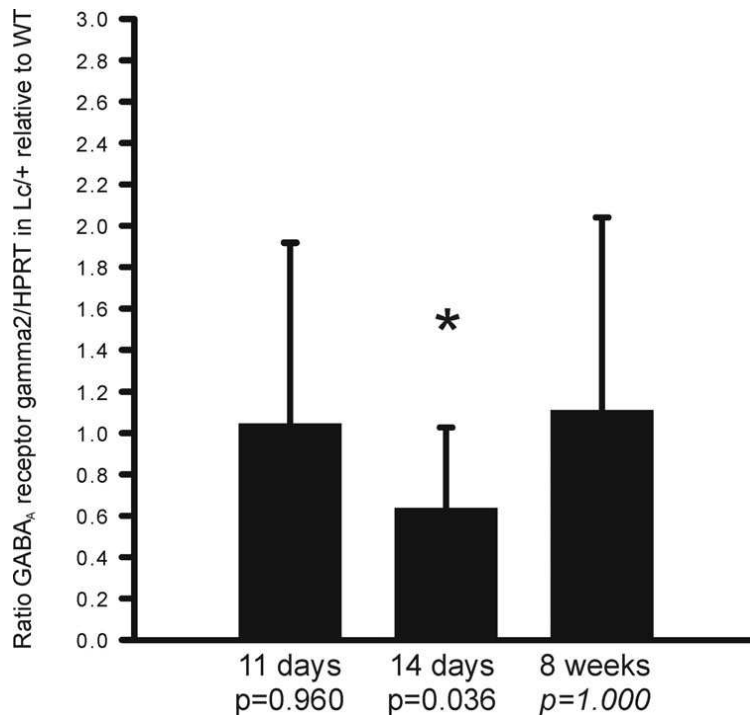


Abb. 3.3:

mRNA Expression [GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheit  $\gamma$ 2/HPRT1] in DCN Gewebe von Lc im Verhältnis zu Wt (Wt: Mittelwert  $\pm$  SD) im Alter von P11 [n = 5 (Lc), n = 5 (Wt)], P14 [n = 9 (Lc), n = 10 (Wt)], 8Wo [n = 8 (Lc), n = 8 (Wt)] \* Statistisch signifikanter Unterschied zwischen Lc und Kontrollgruppe im Alter P14; zwischen Lc und Kontrollen im Alter von P11 und 8Wo wurden keine statistisch signifikanten Differenzen nachgewiesen.

### 3.3. mRNA Expression des GABA<sub>A</sub>-Rezeptor assoziierten Proteins

Die Expression der mRNA des GABARAP war vergleichbar mit derjenigen der  $\gamma$ 2-Untereinheit. Zum frühen Zeitpunkt P11 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Lc- und der Wt-Gruppe beobachtet werden [GABARAP/HPRT  $5,184 \pm 2,054$  SD (Lc, n=10) vs.  $4,336 \pm 2,929$  SD (Wt, n=8), P = 0,481]. In den Proben der Tiere im Alter von P14 wurde eine Herunterregulation von GABARAP um etwa 1/5 [GABARAP/HPRT  $2,682 \pm 0,69$  SD (Lc, n=11) vs.  $3,405 \pm 0,729$  SD (Wt, n = 12), P = 0,023] festgestellt. 8 Wochen alte Tiere lieferten wiederum keine signifikanten Differenzen in der Genexpression von GABARAP [GABARAP/HPRT  $0,859 \pm 0,764$  SD (Lc, n = 11), vs.  $0,963 \pm 0,831$  SD (Wt, n = 10), P = 0,767].

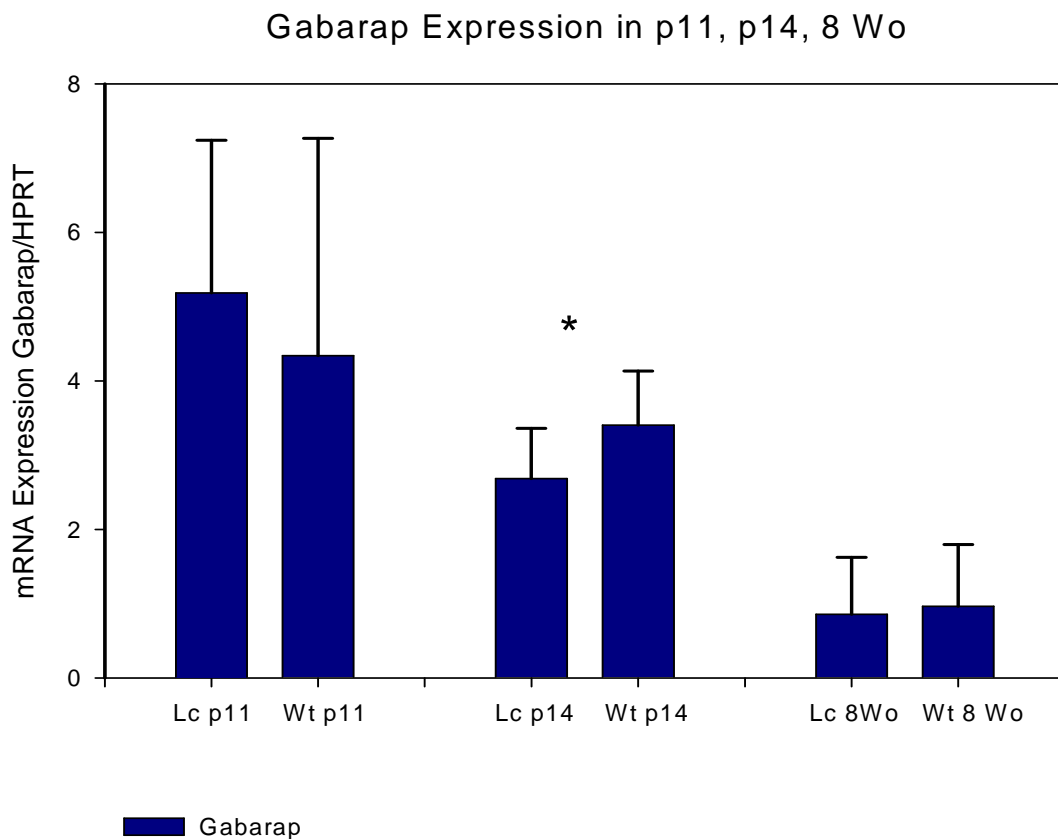


Abb. 3.4:  
mRNA Expression [mRNA Expression GABARAP/HPRT1] im Gewebe der DCN von Lc (Lc) und Wt- Mäusen (Mittelwert  $\pm$  SD) im Alter von 11 Tagen (P11), 14 Tagen (P14) und 8 Wochen (8Wo). \* Statistisch signifikante Differenz zum Zeitpunkt P14 (n=11 für Lc, n=12 für Wt; p=0,023). Keine statistisch signifikanten Unterschiede zu den Zeitpunkten P11 und 8Wo.

### **3.4. Untersuchungen zur Spezifität**

#### **3.4.1. Hippocampus und Vorderhirn**

Es interessierte nun, ob es sich um spezifische Veränderungen der denervierten DCN handelt oder ob diese Veränderungen auch in anderen Regionen des Gehirns nachzuweisen waren.

Dazu wurden CA1 Pyramidenzellen des Hippocampus und Koronarschnitte des Vorderhirns auf Höhe des Chiasmata optici untersucht. Es wurde keine Abnahme der Expression von  $\gamma$ 2-Untereinheiten in Lc zum Zeitpunkt P14 (jeweils n = 5) festgestellt. Dies deutet daraufhin, dass die Unterschiede in der Genexpression der GABAAR-Untereinheiten für die DCN spezifisch sind. Weiterhin konnten in hippocampalen



Schnitten von Mäusen im Alter von P15-18 keine Unterschiede in der GABAergen Überleitung festgestellt werden. In voltage-clamp Einzelzelleitungen von CA1 Pyramidenzellen konnten passend zu den Resultaten der Genexpression keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

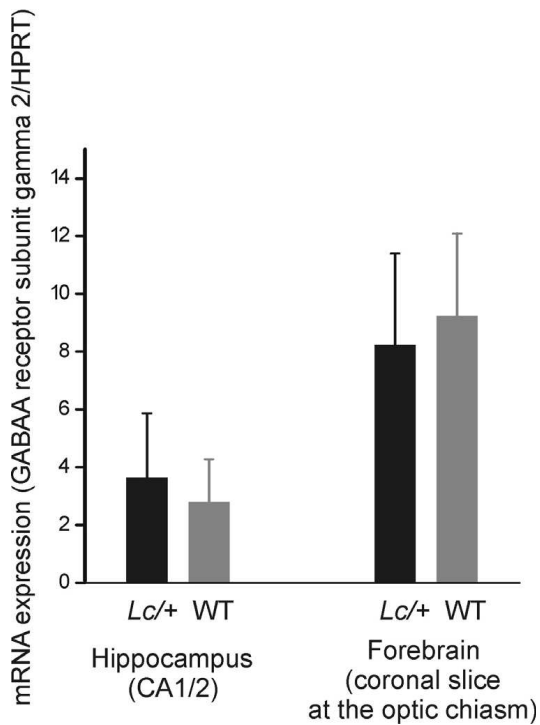


Abb. 3.5: mRNA Expression [GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheit  $\gamma$ 2/ HPRT1] in Hippocampus CA1/2 und in Koronarschnitten durch das Vorderhirn auf Höhe des Chiasmatis optici von Lc (schwarze Balken) und Wt (graue Balken, Mittelwert  $\pm$ SD) im Alter von P14. Es wurde keine statistisch signifikanten Differenzen für Gewebe aus dem Hippocampus oder Vorderhirn festgestellt.

### 3.4.2. Hormonelle Beeinflussung

Um die Möglichkeit der Beeinflussung der Ergebnisse durch unterschiedliche Corticosteronkonzentrationen zu untersuchen, wurden die Serumcorticosteronspiegel in Lc und Wt im Alter von P14 bestimmt. Um geschlechtsabhängige Unterschiede zu berücksichtigen, untersuchten wurden Männchen und Weibchen separat untersucht. Die Corticosteronspiegel im Serum wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. (Siehe Abb.3.6).

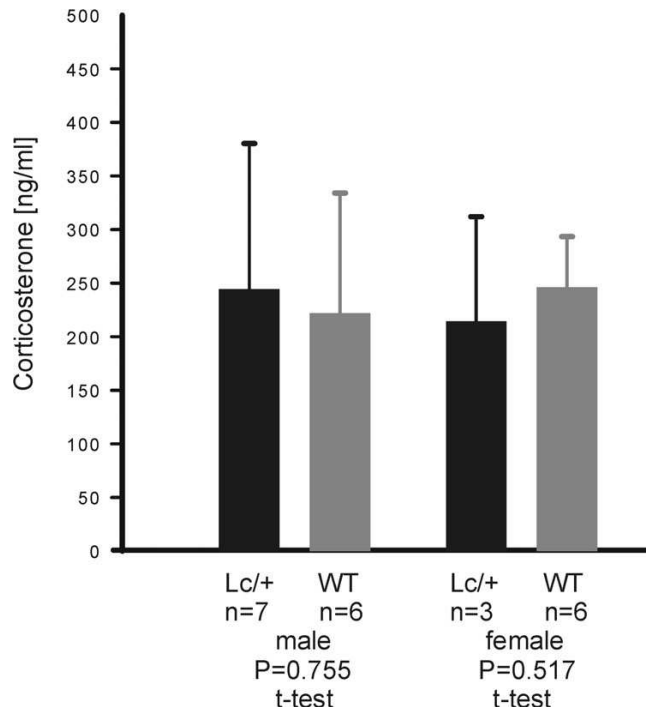


Abb. 3.6: Corticosteronspiegel in Lc- und Wt-Mäusen im Alter von P14: Es wurden keine signifikanten Unterschiede der Corticosteronspiegel in Lc- und Wt-Mäusen im Alter von P14 festgestellt.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Spatiotemporale Korrelation, Spezifität und Normierung**

#### **4.1.1. Zeitliche Korrelation**

Um die Mechanismen der Adaptation der DCN an den progressiven PC-Verlust zu untersuchen, ist es notwendig die Experimente zu geeigneten Zeitpunkten durchzuführen. Es kommen nur Mechanismen in Frage, die in einem engen zeitlichen Zusammenhang zum Untergang der PC stehen und für die DCN spezifisch sind. Daher wurden zur Untersuchung der DCN folgende Zeitpunkte gewählt: P11 vor Beginn der Degeneration, P14 währenddessen und 8Wo nach stattgefundenem Zelluntergang. Zum Zeitpunkt P14 konnten (Linnemann et al. 2004) eine verstärkte synaptische Transmission nachweisen. Die Herunterregulation der  $\gamma 2$ -Untereinheit und des GABARAP fand sich zum selben Zeitpunkt P14, steht also in direktem zeitlichem Zusammenhang zur PC-Degeneration und zu den elektrophysiologischen Veränderungen.

#### **4.1.2. Spezifität**

Weiterhin ist es notwendig zu untersuchen, ob es sich um spezifische Veränderungen der DCN handelt. Dazu wurden weitere Hirnareale, die Region CA1/2 des Hippocampus sowie Vorderhirngewebe in Höhe des Chiasmatis optici analysiert. Die Abwesenheit signifikanter Unterschiede in der  $\gamma 2$ -Expression zwischen Lc und Wt sprechen für DCN-spezifische Mechanismen.

Lc weisen eine erhöhte Empfindlichkeit der Hypophysen-Nebennieren-Achse auf. Unter Stress zeigen Lc stärkere Anstiege des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) und der Cortisolspiegel im Serum im Vergleich zu Wt-Tieren (Frederic et al. 1997; Hilber et al. 2004). Unterschiedliche Corticosteronspiegel haben eine modulatorische Wirkung auf die GABAAR-vermittelte synaptische Überleitung (Teschemacher et al. 1995; Teschemacher et al. 1996; Zeise 1992). Corticosteron beeinflusst auch die Expression der verschiedenen Rezeptoruntereinheiten (Orchinik et al. 2001; Orchinik et al. 1995; Sanger et al. 1977; Stone et al. 2001).

Bei der Analyse der Corticosteronspiegel nach Geschlechtern getrennt wurden keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen des untersuchten Alters und unter

unseren Versuchsbedingungen festgestellt. Die Ergebnisse können somit nicht auf veränderten Corticosteronspiegeln beruhen.

#### **4.1.3. DCN und Normierung mittels Housekeeping-Gen**

Die Degeneration der PC in der Lc führt einerseits zu einer sekundären retrograden Degeneration derer Afferenzen (Caddy and Biscoe 1979), andererseits tritt eine anterograde transneuronal Degeneration der DCN als Hauptefferenz der PC-Axone auf. Obwohl diese Degeneration verhältnismäßig schwach ausgeprägt ist und sich die Zahl der Neurone kaum (20-30 %) reduziert (Heckroth 1994; Sultan et al. 2002), nimmt das Volumen der DCN in der Lc um 56-60 % ab (Heckroth 1994; Sultan et al. 2002). Hieraus resultiert eine erhöhte Neuronendichte in den DCN der Lc. Sultan et al. (2002) identifizierten  $15,4 \times 10^4$  Neurone pro  $\text{mm}^3$  bei Lc im Vergleich zu  $9,46 \times 10^4$  Neurone pro  $\text{mm}^3$  bei Wt. Um unter diesen Voraussetzungen mRNA-Konzentrationen beider Versuchsgruppen vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse in Relation zur Expression der mRNA eines Housekeeping-Gens, des HPRT1 betrachtet. HPRT1 eignet sich als Referenzgen (Brosh et al. 1990; Meldgaard et al. 2006). Weiterhin wurden nur Tiere desselben Alters verglichen, so dass die Ergebnisse unabhängig von unterschiedlichen Spiegeln des HPRT1 während der postnatalen Entwicklung sind (Brosh et al. 1990). Die unterschiedlichen Volumina und Zelldichten der DCN in Lc können den Konflikt unserer Ergebnisse mit denjenigen von (Luntz-Leybman et al. 1993) erklären. Dort war eine erhöhte  $\gamma 2$ -mRNA-Expression in Lc im Alter von P108 beschrieben worden. Jene Ergebnisse stammen aus in situ Hybridisierungen, basierend auf der autoradiographischen Analyse der Körner-Dichte. Vor allem die höhere Neuronendichte in den DCN bei Lc kann diese scheinbar erhöhte Körnerdichte erklären und kleinere Änderungen der Genexpression überlagern. Es ist daher schwierig, zuverlässig die Genexpression der DCN auf Proteinbasis zu ermitteln. Die DCN beider Kleinhirnhemisphären zusammen haben nur eine geschätzte Neuronenzahl von etwa 22500 (Sultan et al. 2002).

Ein weiterer Punkt, der die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt, ist die Tatsache, dass von den analysierten Untereinheiten lediglich die  $\gamma 2$ -Untereinheit und GABARAP eine signifikant unterschiedliche Expression in Lc zeigte. Ein systematischer Fehler müsste alle oder zumindest einige Untereinheiten betreffen.

## **4.2. *transiente Herunterregulation der $\gamma$ 2-Untereinheit und von GABARAP***

Während die GABAAR-Untereinheiten  $\alpha$ 1-5,  $\beta$ 1-2,  $\gamma$ 1+3 und  $\delta$  keine signifikanten Unterschiede ihrer Expressionslevels in den untersuchten Altersstufen zeigten, konnte eine passagere Herunterregulation der  $\gamma$ 2-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors (Linnemann et al. 2006) und des GABARAP an P14 beobachtet werden. Diese steht in zeitlicher Korrelation zur Degeneration der PC mit konsekutiv verminderter GABAerger Afferenzen und zur Potenzierung der IPSCs (Linnemann et al. 2006; Linnemann et al. 2004).

In einem maximal 2-wöchigen Abstand lässt sich immunhistochemisch bei Lc in der 4. postnatalen Woche eine 40 % ige Zunahme kleiner GABA- und glycinerge Neurone feststellen (Sultan et al. 2002). Diesen am ehesten als Interneurone fungierenden Nervenzellen könnte in der Lc-Maus eine besondere Bedeutung in der Kompensation der inhibitorischen Erregungsübertragung zukommen. Die GABAergen Synapsen in der Lc-Mutante sind um etwa 30%, also verhältnismäßig wenig reduziert (Sultan et al. 2002). Zudem konnte eine Größenzunahme der Durchmesser der GABA-immunomarkierten Endknöpfchen an den Zellkörpern um 57 % nachgewiesen werden (Sultan et al. 2002). Die Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle wird von der Synapsengröße beeinflusst (Auger and Marty 1997; Nusser et al. 1997), so dass die vergrößerten Endknöpfchen in Lc mit einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit einhergehen können. Diese immunhistochemischen Besonderheiten können auf eine erhöhte postsynaptische Rezeptordichte oder einen vermehrten Vesikelpool hinweisen und so mit verstärkter inhibitorischer Transmission einhergehen.

Die Herunterregulation der  $\gamma$ 2-Untereinheit und des GABARAP ist transient und könnte mit der Zunahme o.g. Neuronenpopulation und Endknöpfchengröße vergesellschaftet oder ihr vorangestellt sein. Sie kann als Antwort auf den PC-Verlust fungieren.

Zu diskutieren ist, ob und inwiefern ein kausaler Zusammenhang besteht, also die veränderte Zusammensetzung der Untereinheiten zu Modulationen der synaptischen Überleitung in der Lc führen kann.

### Herunterregulation der $\gamma$ 2-Untereinheit:

Wesentliche Ansatzpunkte zur Erklärung veränderter Erregungsüberleitung durch die transiente Herunterregulation in diesem Zusammenhang sind:

1. veränderte Kanaleigenschaften
2. die Erhöhung der Rezeptorzahl über eine Modulation der Endozytoserate.

1. Die Expression der  $\gamma$ 2-Untereinheit kann Einzelkanaleigenschaften und die Zahl der verfügbaren Rezeptoren beeinflussen. Eine Herunterregulation der  $\gamma$ 2-Untereinheit als Modulator für eine veränderte Einzelkanalüberleitung lässt eine relative Abnahme  $\gamma$ 2-enthaltender Rezeptoren zugunsten von Rezeptoren aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Einheiten vermuten.  $\gamma$ 2-enthaltende geclusterte Rezeptoren zeigen eine höhere Leitfähigkeit und eine längere mittlere Öffnungsdauer (Everitt et al. 2004; Lorez et al. 2000; Verdoorn et al. 1990). Die Rezeptoren aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Einheiten öffnen im Gegensatz zu den  $\gamma$ 2-enthaltenden Rezeptoren kürzer (Angelotti and Macdonald 1993; Fisher and Macdonald 1997) und zeigen eine geringere durchschnittliche Anzahl von offenen Kanälen. Außerdem zeichnet die  $\alpha\beta$ -enthaltenden Rezeptoren eine höhere Sensitivität für GABA aus. Im Vergleich zu  $\alpha\gamma$ 2-GABAAR desensibilisieren sie schneller und bei niedrigeren GABA-Konzentrationen (Verdoorn et al. 1990). Das Fehlen der  $\gamma$ 2-Untereinheit führt zu höheren scheinbaren Agonistaffinitäten (Gunther et al. 1995; Moss and Smart 2001). Die gezeigte Herunterregulation der Expression der  $\gamma$ 2-Untereinheit könnte eine höhere Affinität für GABA begünstigen und folglich das Öffnen bei geringeren GABA-Konzentrationen. Es könnten GABAAR favorisiert werden, welche rascher für ein erneutes Öffnen zur Verfügung stehen. Dies könnte ein Versuch der kurzfristigen Kompensation geringerer Transmitterkonzentration durch den Verlust an GABAergen Terminalen der PC darstellen.

2. Durch die Herunterregulation der  $\gamma$ 2-Untereinheit, welche zwei Bindungsstellen für den AP2-Komplex enthält, sinken die möglichen Andockstellen für die endozytosevermittelnden Proteine. Dies kann in einer verminderten Endozytoserate und damit erhöhter Rezeptorzahl an der Oberfläche resultieren. Eine erhöhte Rezeptoranzahl

kann die verstärkte inhibitorische Übertragung und eine Zunahme der Endknöpfchendurchmesser erklären.

Die gezeigte Herunterregulation der  $\gamma 2$ -Untereinheit kann zudem die Komposition von Rezeptoren wie diejenigen aus  $\alpha 1\beta 2$  begünstigen, welche nicht der konstitutiven Endozytose unterliegen und dadurch ebenfalls zur erhöhten Rezeptorzahl beitragen.

Die  $\gamma 2$ -Untereinheit wird außerdem für die Verstärkung der Endozytoserate durch die PKC-Aktivierung benötigt, welche in eine Abnahme der  $\gamma 2$ -enthaltenden Rezeptoren und der Strömungsamplitude mündet (Chapell et al. 1998; Connolly et al. 1999a; Filippova et al. 2000; Herring et al. 2005). Die Herunterregulation dieser Untereinheit könnte zu verminderten Regulationsmöglichkeiten der PKC führen und auch hierdurch eine erhöhte Rezeptorzahl begünstigen, auch wenn die Blockierung der PKC allein die Endozytoserate oder Ströme nicht zu vermindern mag (Herring et al. 2005; Herring et al. 2003).

Bei den adulten 8 Wochen alten Tieren ist eine verminderte Expression der  $\gamma 2$ -Untereinheit nicht mehr nachzuweisen. Diese Herunterregulation an P14 ist transient, was gegen eine alleinige Basis für die permanent verhältnismäßig gering ausgeprägte Ataxie und erhaltene motorische Lernfähigkeit in Lc spricht. Die veränderte Genexpression an P14 scheint eine frühe und verhältnismäßig schnelle Antwort auf die Reduktion inhibitorischer Afferenzen zu sein. Für langfristige Kompensationsvorgänge scheinen andere Mechanismen eine Rolle zu spielen.

### Herunterregulation von GABARAP:

Die gezeigte transiente Herunterregulation von GABARAP kann gut mit der Herunterregulation der  $\gamma 2$ -Untereinheit vereinbart werden. GABARAP wird vor allem eine modulatorische Funktion in der Begünstigung des Transportes von GABAAR zur Plasmamembran und in der dortigen Vermittlung des Clusterings zugeschrieben. Das Clustern der Rezeptoren beeinflusst die elektrophysiologischen Kanaleigenschaften. GABARAP-deprivierte Zellen haben analog zu  $\gamma 2$ -deprivierten eine höhere scheinbare Affinität für GABA, deaktivieren später und desensibilisieren schneller bei einer gegebenen Transmitterkonzentration (Chen et al. 2000). In Zellen ohne GABARAP-Expression findet sich auch eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit.

Die Herunterregulation beider Proteine begünstigt dieselben elektrophysiologischen Eigenschaften welche zur besseren Verwertung reduzierter inhibitorischer Afferenzen beitragen können.

Überraschend sind die Ergebnisse gewissermaßen. Eine GABARAP-Überexpression erhöht die Zahl  $\gamma 2$ -enthaltender GABAAR an der Zelloberfläche über die Bindung an  $\gamma 2$  (Chen et al. 2005; Leil et al. 2004) und hätte eine konsekutiv verstärkte Erregungsübertragung ebenfalls erklären können. Die Modulation inhibitorischer synaptischer Erregungsübertragung ist sehr komplex. GABARAP-knockout-Mäuse zeigen sogar einen normalen Phänotyp ohne Verlust der synaptischen Lokalisation von GABAAR und einer konstanten Gesamtzeptoranzahl (O'Sullivan et al. 2005). Dies deutet darauf hin, dass GABARAP langfristig nicht essentiell für die synaptische Lokalisation ist oder sein Ausfall kompensiert werden kann. Vielmehr scheint es Transport und Clustering voranzutreiben. GABARAP könnte als kurzfristig wirkender Modulator transient veränderter Inhibition fungieren.

Eine verstärkte GABAerge Inhibition durch die Herunterregulation der  $\gamma 2$ -Untereinheit und des GABARAP ist bisher nicht beschrieben worden und es fällt schwer, die elektrophysiologischen Veränderungen allein hierdurch zu erklären. Die Untersuchung weiterer Proteine ist für ein besseres Verständnis unerlässlich.

Die gezeigte Herunterregulation der beiden Proteine weist auf eine Modulation von Endozytoseraten und Clustering als Hebel für die Veränderung GABAerger Überleitung



hin. Die Untersuchung von weiteren Proteinen, die in diese Vorgänge stärker involviert sind, wäre von besonderem Interesse.

Die Begünstigung ungeclusterter Rezeptoren könnte sich in veränderter Gephyrin-Expression darstellen. Gephyrin ist maßgeblich am Clusteringprozess beteiligt. Es interagiert mit GABARAP (Kneussel et al. 1999) und bindet Tubulin (Essrich et al. 1998; Jacob et al. 2005; Kneussel and Betz 2000). Die verminderte Expression dieses Proteins führt zu einer Abnahme der GABAAR-Cluster (Fischer et al. 2000; Yu et al. 2007), während die Gesamtzahl an GABAAR konstant bleibt (Jacob et al. 2005; Kneussel and Betz 2000; Kneussel et al. 1999). Während der Mangel an Gephyrin oder GABARAP die Expression des jeweils anderen Proteins nicht beeinflusst, führt das Fehlen der  $\gamma 2$ -Untereinheit zu einer Reduktion des Gephyrins (Essrich et al. 1998; Schweizer et al. 2003). Eine solche könnte transient im Rahmen der  $\gamma 2$ -Herunterregulation auftreten und zusätzlich zu vermindertem Clustering beitragen.

PRIP1+2, denen eine Rolle im Transport der  $\gamma 2$ -Untereinheit-enthaltenden GABAAR zugeschrieben wird, können ebenfalls involviert sein. Knock-out derselben geht mit verringerter Expression von  $\gamma 2$ -Untereinheit an GABARAP und herabgesetzter Assoziation zwischen GABAAR und GABARAP einher (Mizokami et al. 2007).

Auch posttranslationale Modifikationen können eine Rolle spielen. Die PKC-Aktivität ist verantwortlich für die Phosphorylierung der  $\beta 1+2$  und  $\gamma 2$  Untereinheit, welche die GABAAR-Funktion verstärkt oder inhibiert (Brandon et al. 2001; Brandon et al. 2000; Connolly et al. 1999a; Krishek et al. 1994; McDonald et al. 1998; Moss et al. 1995; Moss and Smart 2001; Moss et al. 1992). Die Aktivierung der PKC beeinflusst auch die Zahl der Rezeptoren an der Zelloberfläche (Connolly et al. 1999a). Ob sie einen Teil zu den Vorgängen um P14 in der Lc beiträgt, ist eine interessante Fragestellung.

Zuletzt wäre es spannend zu wissen, ob es sich bei den beobachteten Veränderungen um P14 um ein Lc-spezifisches Phänomen handelt oder in anderen Mutanten mit ähnlicher Pathologie ebenfalls nachweisen lässt und somit ein übergreifendes modulatorisches Konzept darstellen könnte.

Die Identifikation von Modulatoren und Modulationswegen der inhibitorischen synaptischen Erregungsübertragung im Tiermodell der spinocerebellären Ataxie trägt

zum besseren Verständnis neuronaler Kompensationsmechanismen und zur Entdeckung möglicher Therapieansatzpunkte bei.

## 5. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde die Genexpression potentieller Modulatoren der inhibitorischen synaptischen Erregungsüberleitung in der Maus-Mutante Lurcher, einem Tiermodell für die Spinocerebelläre Ataxie, untersucht.

Parallel zur verstärkten inhibitorischen synaptischen Erregungsübertragung während des PC-Untergangs konnte eine Herunterregulation der Genexpression des GABARAP und der  $\gamma 2$ -Untereinheit nachgewiesen werden. Immunhistochemisch findet sich in vier Wochen alten Lc eine Zunahme kleiner GABA- oder glycinerge Neurone und eine Größenzunahme der Endknöpfchen bei relativ schwach ausgeprägtem Verlust GABAerger Synapsen (Sultan et al. 2002). Dies deutet auf einen erhöhten Transmittervesikelpool hin. Größere Synapsen sind mit erhöhter Öffnungswahrscheinlichkeit vergesellschaftet, was ebenfalls verstärkte inhibitorische Ströme begünstigt. Die Herunterregulation beider Proteine kann zur Zunahme von postsynaptischen ungeclusterten Rezeptoren mit höherer GABA-Affinität und schnellerer Wiederöffnungszeit beitragen. Dies könnte eine bessere Verwertung herabgesetzter GABA-Konzentrationen ermöglichen. Durch eine verringerte Anzahl von Bindungsstellen an  $\gamma 2$  und eine relative Zunahme von Rezeptoren, welche nicht der konstitutiven Endozytose unterliegen, könnte die Endozytoserate sinken und die Rezeptorzahl konsekutiv steigen, was wiederum eine verstärkte Inhibition zur Folge haben kann. Die Herunterregulation der  $\gamma 2$ -Untereinheit könnte weiterhin zu verminderter Regulation durch die PKC führen und auch hierdurch eine erhöhte Rezeptorzahl begünstigen. Die beobachtete Herunterregulation ist transient.

Die Verringerung der Endozytoserate und/oder die Reduktion der Anzahl geclusterter Rezeptoren können zwei Wege zur kurzfristigen Verstärkung der GABAergen Erregungsüberleitung darstellen und die Reaktion auf den Verlust GABAergen Afferenzen repräsentieren.

Die Herunterregulation der beiden Proteine zur Verstärkung der inhibitorischen Überleitung wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Sie könnte der besonderen Situation in der Lc geschuldet sein. Außerdem sind in der GABAergen Inhibition einige weitere Proteine involviert. Die Untersuchung derselben könnte weitere Einblicke in die Vorgänge ermöglichen und die Rolle von  $\gamma 2$  und GABARAP weiter präzisieren.

Die Aufklärung stattfindender Kompensationsmechanismen und -wege führt zur Vertiefung des Verständnisses für neurodegenerative Erkrankungen und kann neue Ansatzpunkte zur Therapie enthüllen.

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1: Histologischer Aufbau der Hühner-Kleinhirnrinde
- Abb. 1.2: Schaltkreis des Kleinhirns.
- Abb. 1.3: Struktur und Unterschiede von inhibitorischen ligandenkontrollierten Ionenkanälen
- Abb. 1.4: Zyklus der GABAAR zwischen Organellen und Plasmamembran
- Abb. 1.5: Dynamische Kontrolle der GABAAR Expression an der Zelloberfläche
- Abb. 1.6: Strukturmodelle für GABARAP
- Abb. 1.7: Ein Modell für den intrazellulären Verkehr und Lokalisation von GABAAR und für die Rolle von GABARAP.
- Abb.2.1: Amplifikationskurven der Duplikate von 5 Standardverdünnungen von GABARAP in linearer Darstellung
- Abb. 2.2: Dissoziationskurven von GABARAP und HPRT1.
- Abb. 2.3: 2 % Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte der Proben 77-83
- Abb. 2.4: Chromatogrammausschnitt einer Lc-Probe
- Abb. 3.1: mRNA Expression [GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheit/Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT1)] in DCN Gewebe von Lc und Wt zum Zeitpunkt P11
- Abb.3.2: mRNA Expression [GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheit/HPRT1] in DCN Gewebe von Lc und Wt an p14
- Abb. 3.3: mRNA Expression [GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheit  $\gamma$ 2/HPRT1] in DCN Gewebe von Lc im Verhältnis zu Wt im Alter von P11
- Abb. 3.4: mRNA Expression [mRNA Expression GABARAP/HPRT1] im Gewebe der DCN von Lc und Wt- Mäusen im Alter von 11 Tagen
- Abb. 3.5: mRNA Expression [GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheit  $\gamma$ 2/ HPRT1] in Hippocampus CA1/2 und in Koronarschnitten durch das Vorderhirn auf Höhe des Chiasmatis optici von Lc und Wt im Alter von p14
- Abb. 3.6: Corticosteronspiegel in Lc- und Wt-Mäusen im Alter von p14

## 6. Literaturverzeichnis

- Angelotti TP and Macdonald RL.** Assembly of GABAA receptor subunits: alpha 1 beta 1 and alpha 1 beta 1 gamma 2S subunits produce unique ion channels with dissimilar single-channel properties. *J Neurosci* 13: 1429-1440, 1993.
- Araki K, Meguro H, Kushiya E, Takayama C, Inoue Y, and Mishina M.** Selective expression of the glutamate receptor channel delta 2 subunit in cerebellar Purkinje cells. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 1267-1276, 1993.
- Auger C and Marty A.** Heterogeneity of functional synaptic parameters among single release sites. *Neuron* 19: 139-150, 1997.
- Barnes EM, Jr.** Use-dependent regulation of GABAA receptors. *Int Rev Neurobiol* 39: 53-76, 1996.
- Birney E, Andrews TD, Bevan P, Caccamo M, Chen Y, Clarke L, Coates G, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Down T, Eyraas E, Fernandez-Suarez XM, Gane P, Gibbins B, Gilbert J, Hammond M, Hotz HR, Iyer V, Jekosch K, Kahari A, Kasprzyk A, Keefe D, Keenan S, Lehvaslaiho H, McVicker G, Melsopp C, Meidl P, Mongin E, Pettett R, Potter S, Proctor G, Rae M, Searle S, Slater G, Smedley D, Smith J, Spooner W, Stabenau A, Stalker J, Storey R, Ureta-Vidal A, Woodwark KC, Cameron G, Durbin R, Cox A, Hubbard T, and Clamp M.** An overview of Ensembl. *Genome Res* 14: 925-928, 2004.
- Bollan K, King D, Robertson LA, Brown K, Taylor PM, Moss SJ, and Connolly CN.** GABA(A) receptor composition is determined by distinct assembly signals within alpha and beta subunits. *J Biol Chem* 278: 4747-4755, 2003.
- Brandon NJ, Delmas P, Hill J, Smart TG, and Moss SJ.** Constitutive tyrosine phosphorylation of the GABA(A) receptor gamma 2 subunit in rat brain. *Neuropharmacology* 41: 745-752, 2001.
- Brandon NJ, Delmas P, Kittler JT, McDonald BJ, Sieghart W, Brown DA, Smart TG, and Moss SJ.** GABAA receptor phosphorylation and functional modulation in cortical neurons by a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem* 275: 38856-38862, 2000.
- Brosh S, Sperling O, Bromberg Y, and Sidi Y.** Developmental changes in the activity of enzymes of purine metabolism in rat neuronal cells in culture and in whole brain. *J Neurochem* 54: 1776-1781, 1990.
- Bustin SA and Nolan T.** Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 15: 155-166, 2004.
- Caddy KW and Biscoe TJ.** Structural and quantitative studies on the normal C3H and Lurcher mutant mouse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 287: 167-201, 1979.
- Caston J, Vasseur F, Delhaye-Bouchaud N, and Mariani J.** Delayed spontaneous alternation in intact and cerebellectomized control and lurcher mutant mice: differential role of cerebellar cortex and deep cerebellar nuclei. *Behav Neurosci* 111: 214-218, 1997.
- Caston J, Vasseur F, Stelz T, Chianale C, Delhaye-Bouchaud N, and Mariani J.** Differential roles of cerebellar cortex and deep cerebellar nuclei in the learning of the equilibrium behavior: studies in intact and cerebellectomized lurcher mutant mice. *Brain Res Dev Brain Res* 86: 311-316, 1995.
- Chang Y, Wang R, Barot S, and Weiss DS.** Stoichiometry of a recombinant GABAA receptor. *J Neurosci* 16: 5415-5424, 1996.

- Chapell R, Bueno OF, Alvarez-Hernandez X, Robinson LC, and Leidenheimer NJ.** Activation of protein kinase C induces gamma-aminobutyric acid type A receptor internalization in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 273: 32595-32601, 1998.
- Chen L, Wang H, Vicini S, and Olsen RW.** The gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor-associated protein (GABARAP) promotes GABAA receptor clustering and modulates the channel kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11557-11562, 2000.
- Chen ZW, Chang CS, Leil TA, Olcese R, and Olsen RW.** GABAA receptor-associated protein regulates GABAA receptor cell-surface number in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Pharmacol* 68: 152-159, 2005.
- Chen ZW, Chang CS, Leil TA, and Olsen RW.** C-terminal modification is required for GABARAP-mediated GABA(A) receptor trafficking. *J Neurosci* 27: 6655-6663, 2007.
- Chen ZW and Olsen RW.** GABAA receptor associated proteins: a key factor regulating GABAA receptor function. *J Neurochem* 100: 279-294, 2007.
- Connolly CN, Kittler JT, Thomas P, Uren JM, Brandon NJ, Smart TG, and Moss SJ.** Cell surface stability of gamma-aminobutyric acid type A receptors. Dependence on protein kinase C activity and subunit composition. *J Biol Chem* 274: 36565-36572, 1999a.
- Connolly CN, Uren JM, Thomas P, Gorrie GH, Gibson A, Smart TG, and Moss SJ.** Subcellular localization and endocytosis of homomeric gamma2 subunit splice variants of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Mol Cell Neurosci* 13: 259-271, 1999b.
- Connolly CN, Woollorton JR, Smart TG, and Moss SJ.** Subcellular localization of gamma-aminobutyric acid type A receptors is determined by receptor beta subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9899-9904, 1996.
- Coyle JE and Nikolov DB.** GABARAP: lessons for synaptogenesis. *Neuroscientist* 9: 205-216, 2003.
- Coyle JE, Qamar S, Rajashankar KR, and Nikolov DB.** Structure of GABARAP in two conformations: implications for GABA(A) receptor localization and tubulin binding. *Neuron* 33: 63-74, 2002.
- Czubayko U, Sultan F, Thier P, and Schwarz C.** Two types of neurons in the rat cerebellar nuclei as distinguished by membrane potentials and intracellular fillings. *J Neurophysiol* 85: 2017-2029, 2001.
- de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW, and Span PN.** Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest* 85: 154-159, 2005.
- de Zeeuw CI and Berrebi AS.** Individual Purkinje cell axons terminate on both inhibitory and excitatory neurons in the cerebellar and vestibular nuclei. *Ann N Y Acad Sci* 781: 607-610, 1996.
- De Zeeuw CI and Berrebi AS.** Postsynaptic targets of Purkinje cell terminals in the cerebellar and vestibular nuclei of the rat. *Eur J Neurosci* 7: 2322-2333, 1995.
- Dumesnil-Bousez N and Sotelo C.** Early development of the Lurcher cerebellum: Purkinje cell alterations and impairment of synaptogenesis. *J Neurocytol* 21: 506-529, 1992.

**Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM, and Luscher B.** Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* 1: 563-571, 1998.

**Everitt AB, Luu T, Cromer B, Tierney ML, Birnir B, Olsen RW, and Gage PW.** Conductance of recombinant GABA (A) channels is increased in cells co-expressing GABA(A) receptor-associated protein. *J Biol Chem* 279: 21701-21706, 2004.

**Fang C, Deng L, Keller CA, Fukata M, Fukata Y, Chen G, and Luscher B.** GODZ-mediated palmitoylation of GABA(A) receptors is required for normal assembly and function of GABAergic inhibitory synapses. *J Neurosci* 26: 12758-12768, 2006.

**Filippova N, Sedelnikova A, Zong Y, Fortinberry H, and Weiss DS.** Regulation of recombinant gamma-aminobutyric acid (GABA)(A) and GABA(C) receptors by protein kinase C. *Mol Pharmacol* 57: 847-856, 2000.

**Fischer F, Kneussel M, Tintrup H, Haverkamp S, Rauen T, Betz H, and Wassle H.** Reduced synaptic clustering of GABA and glycine receptors in the retina of the gephyrin null mutant mouse. *J Comp Neurol* 427: 634-648, 2000.

**Fisher JL and Macdonald RL.** Single channel properties of recombinant GABAA receptors containing gamma 2 or delta subtypes expressed with alpha 1 and beta 3 subtypes in mouse L929 cells. *J Physiol* 505 ( Pt 2): 283-297, 1997.

**Frederic F, Chautard T, Brochard R, Chianale C, Wollman E, Oliver C, Delhaye-Bouchaud N, and Mariani J.** Enhanced endocrine response to novel environment stress and endotoxin in Lurcher mutant mice. *Neuroendocrinology* 66: 341-347, 1997.

**Fredette BJ and Mugnaini E.** The GABAergic cerebello-olivary projection in the rat. *Anat Embryol (Berl)* 184: 225-243, 1991.

**Frerking M, Borges S, and Wilson M.** Variation in GABA mini amplitude is the consequence of variation in transmitter concentration. *Neuron* 15: 885-895, 1995.

**Fritschy JM and Mohler H.** GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol* 359: 154-194, 1995.

**Fritschy JM, Paysan J, Enna A, and Mohler H.** Switch in the expression of rat GABAA-receptor subtypes during postnatal development: an immunohistochemical study. *J Neurosci* 14: 5302-5324, 1994.

**Garin N, Hornung JP, and Escher G.** Distribution of postsynaptic GABA(A) receptor aggregates in the deep cerebellar nuclei of normal and mutant mice. *J Comp Neurol* 447: 210-217, 2002.

**Gunther U, Benson J, Benke D, Fritschy JM, Reyes G, Knoflach F, Crestani F, Aguzzi A, Arigoni M, Lang Y, and et al.** Benzodiazepine-insensitive mice generated by targeted disruption of the gamma 2 subunit gene of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7749-7753, 1995.

**Gutensohn W and Guroff G.** [Hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase from rat brain]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 353: 711-712, 1972.

**Hajos N, Nusser Z, Rancz EA, Freund TF, and Mody I.** Cell type- and synapse-specific variability in synaptic GABAA receptor occupancy. *Eur J Neurosci* 12: 810-818, 2000.

**Hawkins LM, Prybylowski K, Chang K, Moussan C, Stephenson FA, and Wenthold RJ.** Export from the endoplasmic reticulum of assembled N-methyl-d-aspartic acid receptors is controlled by a motif in the c terminus of the NR2 subunit. *J Biol Chem* 279: 28903-28910, 2004.



- Heckroth JA.** Quantitative morphological analysis of the cerebellar nuclei in normal and lurcher mutant mice. I. Morphology and cell number. *J Comp Neurol* 343: 173-182, 1994.
- Herring D, Huang R, Singh M, Dillon GH, and Leidenheimer NJ.** PKC modulation of GABAA receptor endocytosis and function is inhibited by mutation of a dileucine motif within the receptor beta 2 subunit. *Neuropharmacology* 48: 181-194, 2005.
- Herring D, Huang R, Singh M, Robinson LC, Dillon GH, and Leidenheimer NJ.** Constitutive GABAA receptor endocytosis is dynamin-mediated and dependent on a dileucine AP2 adaptor-binding motif within the beta 2 subunit of the receptor. *J Biol Chem* 278: 24046-24052, 2003.
- Hevers W and Luddens H.** The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Mol Neurobiol* 18: 35-86, 1998.
- Hilber P, Jouen F, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J, and Caston J.** Differential roles of cerebellar cortex and deep cerebellar nuclei in learning and retention of a spatial task: studies in intact and cerebellectomized lurcher mutant mice. *Behav Genet* 28: 299-308, 1998.
- Hilber P, Lorivel T, Delarue C, and Caston J.** Stress and anxious-related behaviors in Lurcher mutant mice. *Brain Res* 1003: 108-112, 2004.
- Hoche F, Baliko L, den Dunnen W, Steinecker K, Bartos L, Safrany E, Auburger G, Deller T, Korf HW, Klockgether T, Rub U, and Melegh B.** Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2): identification of early brain degeneration in one monozygous twin in the initial disease stage. *Cerebellum* 10: 245-253.
- Huganir RL and Greengard P.** Regulation of neurotransmitter receptor desensitization by protein phosphorylation. *Neuron* 5: 555-567, 1990.
- Jacob TC, Bogdanov YD, Magnus C, Saliba RS, Kittler JT, Haydon PG, and Moss SJ.** Gephyrin regulates the cell surface dynamics of synaptic GABAA receptors. *J Neurosci* 25: 10469-10478, 2005.
- Jovanovic JN, Thomas P, Kittler JT, Smart TG, and Moss SJ.** Brain-derived neurotrophic factor modulates fast synaptic inhibition by regulating GABA(A) receptor phosphorylation, activity, and cell-surface stability. *J Neurosci* 24: 522-530, 2004.
- Kanematsu T, Jang IS, Yamaguchi T, Nagahama H, Yoshimura K, Hidaka K, Matsuda M, Takeuchi H, Misumi Y, Nakayama K, Yamamoto T, Akaike N, and Hirata M.** Role of the PLC-related, catalytically inactive protein p130 in GABA(A) receptor function. *Embo J* 21: 1004-1011, 2002.
- Kanematsu T, Mizokami A, Watanabe K, and Hirata M.** Regulation of GABA(A)-receptor surface expression with special reference to the involvement of GABARAP (GABA(A) receptor-associated protein) and PRIP (phospholipase C-related, but catalytically inactive protein). *J Pharmacol Sci* 104: 285-292, 2007.
- Khakh BS, Zhou X, Sydes J, Galligan JJ, and Lester HA.** State-dependent cross-inhibition between transmitter-gated cation channels. *Nature* 406: 405-410, 2000.
- Kirschuk S and Grantyn R.** Intraterminal Ca<sup>2+</sup> concentration and asynchronous transmitter release at single GABAergic boutons in rat collicular cultures. *J Physiol* 548: 753-764, 2003.
- Kittler JT, Chen G, Honing S, Bogdanov Y, McAinsh K, Arancibia-Carcamo IL, Jovanovic JN, Pangalos MN, Haucke V, Yan Z, and Moss SJ.** Phospho-dependent binding of the clathrin AP2 adaptor complex to GABAA receptors regulates the efficacy of inhibitory synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14871-14876, 2005.

- Kittler JT, Chen G, Kukhtina V, Vahedi-Faridi A, Gu Z, Tretter V, Smith KR, McAinsh K, Arancibia-Carcamo IL, Saenger W, Haucke V, Yan Z, and Moss SJ.** Regulation of synaptic inhibition by phospho-dependent binding of the AP2 complex to a YECL motif in the GABAA receptor gamma2 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3616-3621, 2008.
- Kittler JT, Delmas P, Jovanovic JN, Brown DA, Smart TG, and Moss SJ.** Constitutive endocytosis of GABAA receptors by an association with the adaptin AP2 complex modulates inhibitory synaptic currents in hippocampal neurons. *J Neurosci* 20: 7972-7977, 2000.
- Kittler JT, McAinsh K, and Moss SJ.** Mechanisms of GABAA receptor assembly and trafficking: implications for the modulation of inhibitory neurotransmission. *Mol Neurobiol* 26: 251-268, 2002.
- Kittler JT and Moss SJ.** Modulation of GABAA receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking: implications for the efficacy of synaptic inhibition. *Curr Opin Neurobiol* 13: 341-347, 2003.
- Kittler JT, Rostaing P, Schiavo G, Fritschy JM, Olsen R, Triller A, and Moss SJ.** The subcellular distribution of GABARAP and its ability to interact with NSF suggest a role for this protein in the intracellular transport of GABA(A) receptors. *Mol Cell Neurosci* 18: 13-25, 2001.
- Kneussel M and Betz H.** Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. *Trends Neurosci* 23: 429-435, 2000.
- Kneussel M, Brandstatter JH, Laube B, Stahl S, Muller U, and Betz H.** Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice. *J Neurosci* 19: 9289-9297, 1999.
- Kneussel M, Haverkamp S, Fuhrmann JC, Wang H, Wassle H, Olsen RW, and Betz H.** The gamma-aminobutyric acid type A receptor (GABAAR)-associated protein GABARAP interacts with gephyrin but is not involved in receptor anchoring at the synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8594-8599, 2000.
- Kneussel M and Loeblich S.** Trafficking and synaptic anchoring of ionotropic inhibitory neurotransmitter receptors. *Biol Cell* 99: 297-309, 2007.
- Krishek BJ, Xie X, Blackstone C, Huganir RL, Moss SJ, and Smart TG.** Regulation of GABAA receptor function by protein kinase C phosphorylation. *Neuron* 12: 1081-1095, 1994.
- Lalonde R.** Motor learning in lurcher mutant mice. *Brain Res* 639: 351-353, 1994.
- Lalonde R, Filali M, Bensoula AN, and Lestienne F.** Sensorimotor learning in three cerebellar mutant mice. *Neurobiol Learn Mem* 65: 113-120, 1996.
- Lalonde R and Thifault S.** Absence of an association between motor coordination and spatial orientation in lurcher mutant mice. *Behav Genet* 24: 497-501, 1994.
- Laurie DJ, Seeburg PH, and Wisden W.** The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. *J Neurosci* 12: 1063-1076, 1992.
- Leil TA, Chen ZW, Chang CS, and Olsen RW.** GABAA receptor-associated protein traffics GABAA receptors to the plasma membrane in neurons. *J Neurosci* 24: 11429-11438, 2004.
- Linnemann C, Schmeih I, Thier P, and Schwarz C.** Transient change in GABA(A) receptor subunit mRNA expression in Lurcher cerebellar nuclei during Purkinje cell degeneration. *BMC Neurosci* 7: 59, 2006.

**Linnemann C, Sultan F, Pedroarena CM, Schwarz C, and Thier P.** Lurcher mice exhibit potentiation of GABA(A)-receptor-mediated conductance in cerebellar nuclei neurons in close temporal relationship to Purkinje cell death. *J Neurophysiol* 91: 1102-1107, 2004.

**Liu F, Wan Q, Pristupa ZB, Yu XM, Wang YT, and Niznik HB.** Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and gamma-aminobutyric acid A receptors. *Nature* 403: 274-280, 2000.

**Lomeli H, Sprengel R, Laurie DJ, Kohr G, Herb A, Seeburg PH, and Wisden W.** The rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family. *FEBS Lett* 315: 318-322, 1993.

**Lorez M, Benke D, Luscher B, Mohler H, and Benson JA.** Single-channel properties of neuronal GABAA receptors from mice lacking the 2 subunit. *J Physiol* 527 Pt 1: 11-31, 2000.

**Luntz-Leybman V, Frosthalm A, Fernando L, De Blas A, and Rotter A.** GABAA/benzodiazepine receptor gamma 2 subunit gene expression in developing normal and mutant mouse cerebellum. *Brain Res Mol Brain Res* 19: 9-21, 1993.

**Maas C, Tagnaouti N, Loeblich S, Behrend B, Lappe-Siefke C, and Kneussel M.** Neuronal cotransport of glycine receptor and the scaffold protein gephyrin. *J Cell Biol* 172: 441-451, 2006.

**Macdonald RL and Olsen RW.** GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 17: 569-602, 1994.

**Mansuy-Schlick V, Tolle F, Delage-Mourroux R, Fraichard A, Risold PY, and Jouvenot M.** Specific distribution of gabarap, gec1/gabarap Like 1, gate16/gabarap Like 2, lc3 messenger RNAs in rat brain areas by quantitative real-time PCR. *Brain Res* 1073-1074: 83-87, 2006.

**McDonald BJ, Amato A, Connolly CN, Benke D, Moss SJ, and Smart TG.** Adjacent phosphorylation sites on GABAA receptor beta subunits determine regulation by cAMP-dependent protein kinase. *Nat Neurosci* 1: 23-28, 1998.

**McKernan RM and Whiting PJ.** Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* 19: 139-143, 1996.

**Meldgaard M, Fenger C, Lambertsen KL, Pedersen MD, Ladeby R, and Finsen B.** Validation of two reference genes for mRNA level studies of murine disease models in neurobiology. *J Neurosci Methods* 156: 101-110, 2006.

**Meyer DK, Olenik C, Hofmann F, Barth H, Leemhuis J, Brunig I, Aktories K, and Norenberg W.** Regulation of somatodendritic GABAA receptor channels in rat hippocampal neurons: evidence for a role of the small GTPase Rac1. *J Neurosci* 20: 6743-6751, 2000.

**Mizokami A, Kanematsu T, Ishibashi H, Yamaguchi T, Tanida I, Takenaka K, Nakayama KI, Fukami K, Takenawa T, Kominami E, Moss SJ, Yamamoto T, Nabekura J, and Hirata M.** Phospholipase C-related inactive protein is involved in trafficking of gamma2 subunit-containing GABA(A) receptors to the cell surface. *J Neurosci* 27: 1692-1701, 2007.

**Moss SJ, Gorrie GH, Amato A, and Smart TG.** Modulation of GABAA receptors by tyrosine phosphorylation. *Nature* 377: 344-348, 1995.

**Moss SJ and Smart TG.** Constructing inhibitory synapses. *Nat Rev Neurosci* 2: 240-250, 2001.

**Moss SJ, Smart TG, Blackstone CD, and Haganir RL.** Functional modulation of GABAA receptors by cAMP-dependent protein phosphorylation. *Science* 257: 661-665, 1992.

**Neelands TR and Macdonald RL.** Incorporation of the pi subunit into functional gamma-aminobutyric Acid(A) receptors. *Mol Pharmacol* 56: 598-610, 1999.

**Nusser Z, Cull-Candy S, and Farrant M.** Differences in synaptic GABA(A) receptor number underlie variation in GABA mini amplitude. *Neuron* 19: 697-709, 1997.

**Nusser Z, Hajos N, Somogyi P, and Mody I.** Increased number of synaptic GABA(A) receptors underlies potentiation at hippocampal inhibitory synapses. *Nature* 395: 172-177, 1998.

**Nymann-Andersen J, Wang H, Chen L, Kittler JT, Moss SJ, and Olsen RW.** Subunit specificity and interaction domain between GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) and GABA(A) receptors. *J Neurochem* 80: 815-823, 2002.

**Ohyama T, Nores WL, Medina JF, Riusech FA, and Mauk MD.** Learning-induced plasticity in deep cerebellar nucleus. *J Neurosci* 26: 12656-12663, 2006.

**Orchinik M, Carroll SS, Li YH, McEwen BS, and Weiland NG.** Heterogeneity of hippocampal GABA(A) receptors: regulation by corticosterone. *J Neurosci* 21: 330-339, 2001.

**Orchinik M, Weiland NG, and McEwen BS.** Chronic exposure to stress levels of corticosterone alters GABAA receptor subunit mRNA levels in rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 34: 29-37, 1995.

**O'Sullivan GA, Kneussel M, Elazar Z, and Betz H.** GABARAP is not essential for GABA receptor targeting to the synapse. *Eur J Neurosci* 22: 2644-2648, 2005.

**Palkovits M, Mezey E, Hamori J, and Szentagothai J.** Quantitative histological analysis of the cerebellar nuclei in the cat. I. Numerical data on cells and on synapses. *Exp Brain Res* 28: 189-209, 1977.

**Persohn E, Malherbe P, and Richards JG.** Comparative molecular neuroanatomy of cloned GABAA receptor subunits in the rat CNS. *J Comp Neurol* 326: 193-216, 1992.

**Phillips WD and Froehner SC.** GABARAP and GABA(A) receptor clustering. *Neuron* 33: 4-6, 2002.

**Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, and Sperk G.** GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 101: 815-850, 2000.

**Rabow LE, Russek SJ, and Farb DH.** From ion currents to genomic analysis: recent advances in GABAA receptor research. *Synapse* 21: 189-274, 1995.

**Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, and Smith M.** Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265: 687-695, 1977.

**Scherzed W, Brunt ER, Heinsen H, de Vos RA, Seidel K, Burk K, Schols L, Auburger G, Del Turco D, Deller T, Korf HW, den Dunnen WF, and Rub U.** Pathoanatomy of Cerebellar Degeneration in Spinocerebellar Ataxia Type 2 (SCA2) and Type 3 (SCA3). *Cerebellum*.

**Schweizer C, Balsiger S, Bluethmann H, Mansuy IM, Fritschy JM, Mohler H, and Luscher B.** The gamma 2 subunit of GABA(A) receptors is required for maintenance of receptors at mature synapses. *Mol Cell Neurosci* 24: 442-450, 2003.

**Sieghart W and Sperk G.** Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem* 2: 795-816, 2002.

- Sigel E.** Functional modulation of ligand-gated GABAA and NMDA receptor channels by phosphorylation. *J Recept Signal Transduct Res* 15: 325-332, 1995.
- Smith KR, McAinsh K, Chen G, Arancibia-Carcamo IL, Haucke V, Yan Z, Moss SJ, and Kittler JT.** Regulation of inhibitory synaptic transmission by a conserved atypical interaction of GABA(A) receptor beta- and gamma-subunits with the clathrin AP2 adaptor. *Neuropharmacology* 55: 844-850, 2008.
- Stone DJ, Walsh JP, Sebro R, Stevens R, Pantazopolous H, and Benes FM.** Effects of pre- and postnatal corticosterone exposure on the rat hippocampal GABA system. *Hippocampus* 11: 492-507, 2001.
- Sultan F, Konig T, Mock M, and Thier P.** Quantitative organization of neurotransmitters in the deep cerebellar nuclei of the Lurcher mutant. *J Comp Neurol* 452: 311-323, 2002.
- Swisher DA and Wilson DB.** Cerebellar histogenesis in the lurcher (Lc) mutant mouse. *J Comp Neurol* 173: 205-218, 1977.
- Tang BL.** Protein trafficking mechanisms associated with neurite outgrowth and polarized sorting in neurons. *J Neurochem* 79: 923-930, 2001.
- Teschemacher A, Zeise ML, Holsboer F, and Zieglgansberger W.** The neuroactive steroid 5 alpha-tetrahydrodeoxycorticosterone increases GABAergic postsynaptic inhibition in rat neocortical neurons in vitro. *J Neuroendocrinol* 7: 233-240, 1995.
- Teschemacher A, Zeise ML, and Zieglgansberger W.** Corticosterone-induced decrease of inhibitory postsynaptic potentials in rat hippocampal pyramidal neurons in vitro depends on cytosolic factors. *Neurosci Lett* 215: 83-86, 1996.
- Thifault S, Girouard N, and Lalonde R.** Climbing sensorimotor skills in Lurcher mutant mice. *Brain Res Bull* 41: 385-390, 1996.
- Tretter V, Ehya N, Fuchs K, and Sieghart W.** Stoichiometry and assembly of a recombinant GABAA receptor subtype. *J Neurosci* 17: 2728-2737, 1997.
- Verdoorn TA, Draguhn A, Ymer S, Seeburg PH, and Sakmann B.** Functional properties of recombinant rat GABAA receptors depend upon subunit composition. *Neuron* 4: 919-928, 1990.
- Vogel MW, Caston J, Yuzaki M, and Mariani J.** The Lurcher mouse: fresh insights from an old mutant. *Brain Res* 1140: 4-18, 2007.
- Wan Q, Xiong ZG, Man HY, Ackerley CA, Braunton J, Lu WY, Becker LE, MacDonald JF, and Wang YT.** Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature* 388: 686-690, 1997.
- Wang H, Bedford FK, Brandon NJ, Moss SJ, and Olsen RW.** GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* 397: 69-72, 1999.
- Wang H and Olsen RW.** Binding of the GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) to microtubules and microfilaments suggests involvement of the cytoskeleton in GABARAPGABA(A) receptor interaction. *J Neurochem* 75: 644-655, 2000.
- Wetts R and Herrup K.** Interaction of granule, Purkinje and inferior olivary neurons in lurcher chimaeric mice. I. Qualitative studies. *J Embryol Exp Morphol* 68: 87-98, 1982a.
- Wetts R and Herrup K.** Interaction of granule, Purkinje and inferior olivary neurons in lurcher chimeric mice. II. Granule cell death. *Brain Res* 250: 358-362, 1982b.
- Williams DB.** A novel, rapid, inhibitory effect of insulin on alpha(1)beta(2)gamma(2s) gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Neurosci Lett* 443: 27-31, 2008.

- Wisden W, Laurie DJ, Monyer H, and Seeburg PH.** The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J Neurosci* 12: 1040-1062, 1992.
- Yatsushiro S, Hayashi M, Morita M, Yamamoto A, and Moriyama Y.** Glutamate receptor subunit delta2 is highly expressed in a novel population of glial-like cells in rat pineal glands in culture. *J Neurochem* 75: 1115-1122, 2000.
- Yu W, Jiang M, Miralles CP, Li RW, Chen G, and de Blas AL.** Gephyrin clustering is required for the stability of GABAergic synapses. *Mol Cell Neurosci* 36: 484-500, 2007.
- Zanjani HS, McFarland R, Cavelier P, Blokhin A, Gautheron V, Levenes C, Bambrick LL, Mariani J, and Vogel MW.** Death and survival of heterozygous Lurcher Purkinje cells in vitro. *Dev Neurobiol* 69: 505-517, 2009.
- Zdilar D, Rotter A, and Frosthalm A.** Expression of GABAA/benzodiazepine receptor alpha 1-subunit mRNA and [3H]flunitrazepam binding sites during postnatal development of the mouse cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 61: 63-71, 1991.
- Zeise ML, Teschemacher, A., Arriagada, J. and Zieglgänsberger, W.** Corticosterone Reduces Synaptic Inhibition in Rat Hippocampal and Neocortical Neurons in vitro. *J Neuroendocrinol* 4: 107-112, 1992.
- Zuo J, De Jager PL, Takahashi KA, Jiang W, Linden DJ, and Heintz N.** Neurodegeneration in Lurcher mice caused by mutation in delta2 glutamate receptor gene. *Nature* 388: 769-773, 1997.

## 7. Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

**Linnemann C, Schmeh I, Thier P, and Schwarz C.** Transient change in GABA(A) receptor subunit mRNA expression in Lurcher cerebellar nuclei during Purkinje cell degeneration. *BMC Neurosci* 7: 59, 2006.

**Danksagung:**

Ich danke herzlichst meinem Betreuer Dr. med. Christoph Linnemann und meinem Doktorvater Prof. Cornelius Schwarz, für die hervorragende Betreuung in allen Aspekten. Des Weiteren danke ich Dr. rer. nat. Konstantin Tziridis und Ute Großhennig für die technische und organisatorische Unterstützung.