

1. Einleitung

Die Signalverarbeitung im Zentralnervensystem (ZNS) beruht auf einer räumlich und zeitlich kontrollierten Verschränkung von erregenden und hemmenden Signaleingängen an Nervenzellen (Prange et al., 2004). Die Erregbarkeit von Nervenzellen kann u.a. über phasisch-synaptische und tonische Signaleingänge modifiziert werden. Es werden erregende von hemmenden Neurotransmittern gemäß ihren Eigenschaften, das Membranpotential zu positivieren oder zu negativieren, unterschieden. Als erregende Neurotransmitter werden u.a. Acetylcholin (ACh) und Glutamat betrachtet, während Glyzin und die nach Abspaltung der Karboxylgruppe von Glutamat entstehende γ -Aminobuttersäure (GABA) als hemmende Neurotransmitter anzusehen sind. Glyzin und GABA können ihre hemmende, d.h. hyperpolarisierende Wirkung allerdings erst nach der entwicklungsbedingten Aufregulierung des Kaliumchlorid-Co-Transporters (KCC2) entfalten (Rivera et al., 1999). Im Gehirn der Ratte findet diese Umstellung in der Funktionsweise der Chloridkanäle im Laufe der zweiten postnatalen Woche statt (Hübner et al., 2001). Störungen des Gleichgewichts zwischen Erregung und Hemmung haben schwerwiegende ZNS-assoziierte Erkrankungen zur Folge. So äußern sich Fehlfunktionen des glyzinerger/GABAergen Systems in neurologischen Hypererregbarkeitserkrankungen, wie beispielsweise erhöhter Muskeltonus, starre Körperhaltung, Myoklonus bis hin zu epileptischen Anfällen (Beemer et al., 1985; Bamforth et al., 1990).

Das Verständnis der neuronalen Kommunikation stellt die Grundlage für die Entwicklung von Therapien im Einsatz gegen ZNS-assoziierte Krankheiten dar. Hierfür ist es erforderlich, Einblicke in die morphologische Struktur chemischer Synapsen zu gewinnen, eine detaillierte Kenntnis des Zusammenspiels der molekularen Bausteine während der Synapsenneubildung (Synaptogenese) sowie im Zuge von Reorganisationsprozessen zu erlangen und, nicht zuletzt, die elektrophysiologische Charakterisierung der synaptischen Ströme durchzuführen. Nachdem die ersten elektrophysiologischen Untersuchungen die Beschreibung der chemischen Signalübertragung an neuronalen Synapsen ermöglichte, konnte die Molekularbiologie in den vergangenen 30 Jahren einen immensen Erkenntniszuwachs hinsichtlich der molekularen Struktur glutaminerger sowie glyzinerger und GABAerger Synapsen liefern (Shepherd & Erulkar, 1997). Wäh-

rend eine Vielzahl der molekularen Bausteine der glutaminergen Synapsen heutzutage bekannt sind (Dresbach et al., 2001; Garner et al., 2002; Kim & Sheng, 2004), können diejenigen glyzinerger/GABAerger Synapsen an einer Hand abgezählt werden. Es sind dies Gephyrin, Collybistin, *receptor for activated C-kinase* (RACK1), *rapamycin and FKBP12 target 1* (RAFT1) und Profilin (Moss & Smart, 2001; Fritschy & Brunig, 2003). Die Entschlüsselung der molekularen Identität der synaptischen Bausteine konnte jedoch zunächst keinen Einblick in deren funktionelles Zusammenspiel gewähren. Sie stellte aber die Grundlage für die gezielte funktionelle Manipulation ausgewählter Bausteine dar. Das sogenannte *gene targeting* (gezieltes Ausschalten der Synthese bestimmter Gene *in vivo*) ermöglichte die Bestimmung der Funktion ausgewählter Bausteine innerhalb des molekularen Netzwerkes. Einen weiteren entscheidenden Durchbruch im Verständnis der Funktionsweise der molekularen Bausteine bedeutete die Entwicklung des *epitope tagging*. Durch Einfügen bestimmter Proteinsequenzen in ein Zielgen wurde die selektive und ausschließliche Sichtbarmachung ausgewählter synaptischer Komponenten möglich. In diesem Zusammenhang ist die Isolierung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aus der Qualle *Aequorea Victoria* sowie des rot fluoreszierenden Proteins *Discosoma Red* (DsRed) aus der Koralle *Discosoma* zu erwähnen. Beide Proteine ermöglichen nämlich die Darstellung eines bestimmten Zielgens im lebenden Organismus. Das Einfügen derart großer Proteinsequenzen kann jedoch zum Verlust der biologischen Aktivität des Zielgens führen. In solchen Fällen wird die Anwendung kurzer Proteinsequenzen (z.B. c-myc als Bruchstück des gleichnamigen Onkogens und HA als Teil des Glykoproteins Hämagglutinin aus dem Influenza Virus) in Erwägung gezogen. Die Erfordernis der Anwendung immunzytochemischer Techniken zur Sichtbarmachung solcher kurzen *epitope tags* macht sich dabei jedoch insofern nachteilig bemerkbar, als diese Proteine nicht mehr im lebenden Organismus dargestellt werden können. Schließlich nimmt die Studie der morphologischen und molekularen Reorganisationsprozesse, die sich infolge von gezielt gesetzten Läsionen im ZNS ergeben, einen ganz besonderen Stellenwert in der Suche nach Erkenntnissen ein (Kirov et al., 1999; Meier et al., 2003; Kirov et al., 2004). Diese Vorgehensweise gewährte vielseitige Einblicke in die Struktur-Funktion-Beziehungen komplexer molekularer Systeme im ZNS.

Genetisch-bedingte Krankheiten sind auf Nukleotidsubstitutionen im Genom zurückzuführen. Demnach leistet die kausale Verknüpfung zwischen Nukleotidpolymorphismen auf Genomebene und den dadurch verursachten Erkrankungen einen wesentlichen Beitrag zur klinischen Früherkennung und Diagnostik. Eine Vielzahl von Krankheiten kann jedoch nicht einem bestimmten Genotyp zugeordnet werden, da zelluläre Editierungsprozesse die Vervielfältigung der im Genom kodierten Informationen verursachen. Das mRNA-Spleißen beispielsweise leistet einen entscheidenden Beitrag zur Diversifizierung der im Genom kodierten Informationen. Alternatives Spleißen der mRNA des postsynaptischen Ankerproteins Gephyrin beispielsweise trägt zur Unterscheidung zwischen Glyzin-Rezeptoren (GlyR) und TypA-GABA-Rezeptoren (GABA_AR) hinsichtlich ihrer postsynaptischen Verankerung bei (Meier et al., 2000a; Meier & Grantyn, 2004a; Meier & Grantyn, 2004b).

Eine weitere Möglichkeit, die vorgegebene genetische Information zu diversifizieren, besteht darin, Nukleotide nachträglich zu verändern (RNA-Editierung). Die RNA-Editierung unterbricht die strikte klinische Genotyp - Phänotyp - Zuordnung insofern, als sie eine funktionelle Vielfalt über das genomisch mögliche Maß hinaus generiert. Bei Säugetieren sind bislang nur wenige Fälle der RNA-Editierung bekannt; diese jedoch beeinflussen hauptsächlich die Informationsverarbeitung im ZNS (Seeburg & Hartner, 2003; Bhalla et al., 2004; Meier et al., 2005). Mit der Entdeckung editierter Glutamat-Rezeptor- (GluR)-Untereinheiten erfuhr die Thematik der RNA-Editierung einen spürbaren Popularitätszuwachs. Es sind dies die Pionierarbeiten der Arbeitsgruppe um Peter Seeburg, die vor rund 15 Jahren zeigten, daß die Aminosäure Glutamin (Q) innerhalb der GluR-B-Untereinheit durch RNA-Editierung in ein Arginin (R) umgewandelt wird. Dabei stellte sich heraus, daß diese Aminosäuresubstitution weitreichende physiologische Konsequenzen hat. Liegen GluR in ihrer nicht-editierten Form (Q) vor, weisen sie eine geringfügige Durchlässigkeit für Kalzium-Ionen auf. Dagegen haben Kanäle, welche die (R)-Form beinhalten, eine deutlich größere Permeabilität für Kalzium-Ionen (Kohler et al., 1993). Die Editierung von Serotonin-Rezeptor- bzw. Kaliumkanal-spezifischen mRNAs verursachen Änderungen in der G-Protein-Aktivierung (Gurevich et al., 2002) bzw. in der Kaliumkanal-Inaktivierungskinetik (Bhalla et al., 2004). Die Liste der aufgeführten Beispiele, die auf einer Adenosin-zu-Inosin (A-zu-I) RNA-Editierung

beruhen, kann um all diejenigen Proteine, die aus einer Cytosin-zu-Uracil (C-zu-U) RNA-Editierung hervorgehen, erweitert werden. So werden beispielsweise auch Apolipoprotein B- bzw. Neurofilament-spezifische mRNAs C-zu-U editiert (Powell et al., 1987; Skuse et al., 1996). Die C-zu-U-Editierung Neurotransmitter-Rezeptor-spezifischer mRNAs wurde von uns nachgewiesen (Meier et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Struktur-Funktion-Beziehungen an glyziner-gen/GABAergen Synapsen mit Hilfe von *gene targeting*, *epitope tagging*, *restriction fragment length polymorphism (RFLP)-polymerase chain reaction (PCR)*, zielgerichteter Mutagenese und morphometrischer Analyse nach gezielt gesetzter Hirnläsion untersucht.