

**Molekulare und funktionelle Analyse der Promotoren des
murinen 5-HT_{1A}- und 5-HT₇-Rezeptorgens**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften

von

Mark Ansorge

eingereicht im

Fachbereich Biochemie
der Freien Universität Berlin

2002

1. Gutachter: Prof. Dr. Franz Theuring
2. Gutachter: Prof. Dr. Volker Erdmann

Tag der Disputation: 16. Januar 2003

Zusammenfassung

Frühere *in vitro* Studien des murinen 5-HT_{1A}-Rezeptorgens führten zu der Charakterisierung des proximalen Promotors. Er ist GC-reich und TATA-Box-frei und enthält mehrere funktionelle Transkriptionsfaktorbindungsstellen, einschließlich MAZ- und SP1-Erkennungsstellen. Zur weiteren Analyse des Promotors dieses Gens wurde zusätzliche Sequenzinformation bis -5,5 kb des murinen 5-HT_{1A}-Rezeptorgens ermittelt, und Promotorfragmente bis -20 kb wurden auf ihre Aktivität *in vitro* und *in vivo* analysiert.

In vitro waren zwei kurze Promotorfragmente (- 183 bp und -740 bp) zwar aktiv, jedoch nicht in der Lage, neuronale Spezifität zu vermitteln und wurden aus diesem Grund als Referenzen für basale Expression eingesetzt. Drei lange Fragmente (-4,5 kb, -5,5 kb und -20 kb) waren dem hingegen in der Lage, Spezifität für 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA-positive Zellen zu vermitteln.

Eine Promotorregion zwischen -1587 bp und -3160 bp, die zwei putative „Glukokortikoid Response Elemente“ enthält, wurde *in vitro* funktionell auf ihre Fähigkeit hin analysiert, Promotoraktivität-verändernde Effekte durch Aldosteron oder Dexamethason zu vermitteln. Die Funktionalität dieser Cis-Elemente konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Für die *in vivo* Analysen wurden transgene Tiere erzeugt die *LacZ* unter der Kontrolle der drei langen Promotorfragmente exprimieren. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die *in vitro* ermittelt wurden, vermittelten die drei langen Promotorfragmente *in vivo* eine ZNS spezifische Expression. Die *LacZ*-Expressionsmuster in den -4,5 kb und den -20 kb Linien gleichen dem typischen endogenen 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpressionsmuster, während das -5,5 kb Fragment ein stark eingeschränktes Expressionsmuster vermittelt.

Mittels Kolokalisationsstudien wurde die transgene *LacZ*-Expression und die endogene 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression auf zellulärer Ebene analysiert. Alle analysierten Linien wiesen Kolokalisation auf, wobei das -20 kb Fragment die höchste Kolokalisationsrate vermittelt. Demnach gibt dieses Fragment das endogene Expressionsmuster am vollständigsten wieder.

Ferner wurde die *LacZ* Expression in transgenen Embryonen und Mäusen während der frühen postnatalen Entwicklung analysiert. Insgesamt spiegeln die ermittelten Expressionsmuster die adulte β -Galactosidaseverteilung der entsprechenden Linien wider. In der Rapheregion setzte Expression zwischen E12,5 und E14,5 ein, war zwischen E14,5 und E18,5 relativ stark, sank um P1,5 ab und stieg in P7,5 und P14,5 wieder an. Die Expression im Vorderhirn setzt um E18,5 mit niedriger Aktivität ein und nimmt graduell bis zum Erreichen des adulten Niveaus zu.

Diese Ergebnisse bilden die Grundlage zur weiteren funktionellen Analyse dieses Promotors *in vitro* und *in vivo*. Sie erlauben die gezielte Klärung spezifischerer Fragen, beispielsweise bezüglich der Regulation der transkriptionellen Aktivität durch Pharmaka und Hormone. Zudem ermöglichen sie einen gezielten Einsatz der charakterisierten Promotorfragmente in transgenen Ansätzen.

Das bislang zuletzt identifizierte 5-HT-Rezeptorgen ist das des 5-HT₇-Rezeptors, welches evolutionsbiologisch auch eines der ältesten 5-HT-Rezeptorgene zu sein scheint. Obwohl Spleißvorgänge in der 3'-Region dieses Gens sowie die Verteilung der 5-HT₇-Rezeptoren und ihrer mRNAs eingehend untersucht wurden, liegen bisher keine Daten zur Charakterisierung oder Funktion des 5-HT₇-Rezeptorgen Promotors vor. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieser Promotor identifiziert und initial charakterisiert. Ferner wurden neue 5-HT₇-Rezeptorgen Spleißvarianten identifiziert, die durch Spleißvorgänge der 5'-Region des Gens generiert werden.

5,3 kb des 5-HT₇-Rezeptorgen Promotors der Maus wurden kloniert und sequenziert. Durch computergestützte Sequenzanalysen wurden zwischen -635 bp und -667 bp drei putative TATA-Boxen identifiziert. Zudem ist die proximale Promotorregion CCAAT-Box-frei, bis -550 bp sehr GC-reich (81,5 %) und enthält mehrere putative Bindungsstellen für SP1 und MAZ.

In der GC-reichen Region konnten mehrere Transkriptionsinitiationsstellen identifiziert werden, von denen sich eine im Bereich einer Initiator-Consensus-Sequenz befindet. Weiter stromaufwärts wurde bei -627 bp eine weitere Transkriptionsinitiationsstelle gefunden, die sich 21 bp, 35 bp und 49 bp stromabwärts der drei putativen TATA-Boxen befindet.

Die Aktivität von Promotorfragmenten, die in ihrem 5'-Ende bis -4,2 kb, -3,5 kb, -2,1 kb und -1,2 kb reichen, wurden *in vitro* unter Verwendung von Zellen mit und ohne endogener 5-HT₇-Rezeptorgenexpression analysiert. In keiner der gewählten Zelllinien konnte für die verwendeten Konstrukte eine spezifische Aktivität nachgewiesen werden. Es wurde ein Bereich zwischen -22 bp und -107 bp identifiziert, der diese unspezifische Repression vermittelt. Konstrukte denen diese Region fehlte, weisen in Zellen mit endogener 5-HT₇-Rezeptorgenexpression die stärkste Aktivität auf. Ferner wurden weitere aktivierende und reprimierende Regionen identifiziert.

Der Promotor des 5-HT₇-Rezeptorgens besitzt demnach einen dualen Aufbau in Bezug auf die Region und den Mechanismen der Initiation der Transkription: Sie wird von einer GC-reichen Region an mehreren Stellen und von TATA-Boxen an einer distinkten Stelle vermittelt. Eine die Transkription blockierende Region, scheint sich auf beide Formen der Transkriptionsinitiation auszuwirken. Wahrscheinlich kann dieser Block durch spezifische Cis-Elemente außerhalb der analysierten 4,2 kb und/oder Trans-Elemente, die in den analysierten Zellen nicht vorhanden sind, aufgehoben werden, wodurch spezifische Expression erreicht wird.

Es wurden sechs neue Spleißvorgänge im 5'-Bereich des 5-HT₇-Rezeptorgens identifiziert. Einer involviert ein neues alternatives Exon in Intron 1. Fünf treten innerhalb von Exon 1 an internen Spleiß-Donor und -Akzeptor Stellen auf und führen allesamt zu „in frame“-Deletionen. Falls translatiert besitzen zwei Varianten sieben Transmembrandomänen (TMs), drei besitzen fünf TMs und eine besitzt drei TMs. Weitergehende Untersuchungen müssen durchgeführt werden, um die funktionelle Relevanz und die Konsequenzen dieser Ergebnisse aufzuklären.

Abstract

Previous *in vitro* studies of the murine 5-HT_{1A} receptor gene characterized its proximal promoter as being GC rich and TATA-less and have revealed the presence of several functional transcription factor binding sites, including MAZ and SP1 recognition sequences. To further analyze the promoter of this receptor gene, additional upstream sequence information extending to -5.5 kb of the murine 5-HT_{1A} receptor gene was generated and promoter fragments extending to -20 kb were analyzed for activity *in vitro* and *in vivo*.

In vitro, two short promoter fragments (-183 bp and -740 bp) were unable to confer neuronal specificity and served as references for basal expression. Specificity was however conferred by longer fragments (-4.5 bp, -5.5 bp and -20 kb), which were active in 5-HT_{1A} receptor mRNA positive cells and inactive in 5-HT_{1A} receptor mRNA negative cells.

A promoter region between -1587 bp and -3160 bp containing two putative glucocorticoid response elements was functionally analyzed *in vitro* with respect to its responsiveness to dexamethasone and aldosterone. Under the chosen conditions the functionality of these cis elements could not be satisfactorily shown.

In agreement with the results obtained *in vitro*, using additive transgenesis to drive *LacZ* expression *in vivo*, CNS specific reporter gene expression was found with all three long constructs. Transgene expression in the -4.5 kb and -20 kb mouse lines resembled the typical endogenous 5-HT_{1A} receptor gene expression pattern, whereas the -5.5 kb mouse lines revealed strongly reduced expression.

Using colocalization studies the rate of concurrence of transgenic and endogenous 5-HT_{1A} receptor gene expression brought about by the three different constructs was analyzed. All analyzed lines exhibit cellular colocalization. The highest rates of colocalization were observed in mice carrying the 20 kb construct, suggesting a large promoter fragment is required to faithfully direct transgene expression in a 5-HT_{1A} receptor like pattern.

LacZ expression was furthermore assessed in transgenic embryos and in mice during early postnatal development. In general expression patterns mirrored the respective adult expression patterns. Expression in the raphe region initiated between E12.5 and E14.5, reached high levels between E14.5 and E18.5, became weaker at P1.5 and gradually became stronger at P7.5 and P14.5. Expression in the forebrain initiated at around E18.5 and gradually became stronger until the adult levels were reached.

These results establish a sound basis to further analyze this promoter *in vitro* and *in vivo* functionally, allowing more specific questions concerning, for example, the regulation of its activity by drugs and hormones to be addressed. The promoter fragments may also be of considerable use for directing gene expression specifically to 5-HT_{1A} expressing neurons and subsets thereof.

The 5-HT₇ receptor gene is the most recently identified serotonin receptor gene in mammals and is believed to be one of the oldest evolutionary. Although splicing events in the 3'-region of the 5-HT₇ receptor gene and the distribution of 5-HT₇ receptors and their mRNA have been intensively investigated, nothing has been reported on the characteristics or the function of its promoter until now. In this study we identified the 5-HT₇ receptor gene promoter and initially characterized its properties. Furthermore we identified novel 5-HT₇ receptor gene splice variants resulting from splice events in the 5'-region of the gene.

5.3 kb of the mouse 5-HT₇ receptor promoter were cloned and sequenced. By computer based sequence analysis three putative TATA-boxes have been identified at 635 bp to 667 bp upstream of the receptor coding sequence. The 550 bp region upstream of the coding sequence is G/C rich (81.5 %) and contains multiple putative SP1 and MAZ binding sites.

Several transcription initiation sites could be identified in the G/C rich region and one further upstream at -627 bp. This latter is located 21 bp, 35 bp and 49 bp downstream of the three putative TATA-boxes. One transcription initiation site in the G/C rich region at -124 bp lies within an initiator consensus sequence. No CCAAT-boxes were identified.

To further analyze the promoter of this receptor gene, fragments extending to -4.2 kb, -3.5 kb, -2.1 kb and -1.2 kb were analyzed for activity *in vitro* using cells with and without endogenous 5-HT₇ receptor gene expression. None of the promoter fragments were active in the cells used. A repressor element located at -22 bp to -107 bp was identified conferring this complete repression of transcription. When deleted, expression was strongest in cells endogenously expressing the 5-HT₇ receptor gene, regardless of the construct used. In these cells the region between -2080 bp and -1159 bp acts repressory and the region between -4224 bp and -3454 bp activates transcription.

From these results we conclude that the 5-HT₇ receptor gene promoter initiates transcription from two regions through two different mechanisms. One mechanism involves G/C rich sequences and gives rise to multiple transcription initiation sites, the other involves TATA-boxes which define only one transcription initiation site. The very proximal region of the promoter contains an element blocking or stopping transcription, acting on both described activation modes. Cis elements not contained on the 4.2 kb fragment and/or trans elements not expressed by the cells used, presumably abrogate this block, thus conferring specific expression.

By cDNA cloning and sequencing six new splice events in the 5'-area of the 5-HT₇ receptor gene were detected. One splice event involves a new alternative exon residing in intron I. The other five all occurred in Exon I at internal splice donor and acceptor sites leading to in frame-deletions. If translated, two variants are predicted to retain the seven transmembrane (TM) structure, three to have a five TM structure and one to have a three TM structure. Further experiments are needed to elucidate the functional relevance and consequences of these results.

Verzeichnis der verwendeten Zeichenformate, Namen, Schreibweisen und Abkürzungen

Zeichenformate

Für anatomische Begriffe und Namen wurden in den meisten Fällen die lateinischen Bezeichnungen verwendet. Sie wurden im normalen Zeichenformat dargestellt. Alle weiteren verwendeten lateinischen Bezeichnungen - mit Ausnahme der Abkürzung et al. - wurden in kursivem Zeichenformat dargestellt.

Englische Begriffe wurden im normalen Zeichenformat dargestellt und in Anführungsstriche gesetzt.

Falls für die Bezeichnung spezifischer Gene Abkürzungen verwendet wurden, so wurden diese in kursivem Zeichenformat dargestellt.

Namen und Schreibweisen

Die Schreibweise der vorliegenden Arbeit richtet sich nach den Regeln der neuen deutschen Rechtschreibung.

Die Schreibweise biochemischer Begriffe und Namen erfolgte entsprechend der Schreibweise in biochemischen Standardlehrbüchern (Darnell et al. 1990; Stryer 1990; Alberts et al. 1995). Falls die Lehrbücher einzelne Genprodukte nicht erwähnten, wurde die Schreibweise der Namen entsprechend der Schreibweise in der GeneCards™ Datenbank gewählt.

Die Schreibweise anatomischer Begriffe und Namen erfolgte entsprechend der Schreibweise des Taschenatlas der Anatomie des Thieme Verlags (Kahle und Frotscher 2001).

Die Namen der Restriktionsenzyme wurden entsprechend den Bezeichnungen der jeweiligen Hersteller gewählt.

Die Schreibweise der Namen von Zelllinien wurde entsprechend der Schreibweise der nationalen und internationalen Gewebe- und Zellkulturbanken (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, European Collection of Animal Cell Cultures, American Type Culture Collection) gewählt. Die Bezeichnung *in vitro* wird im gesamten Text zur Bezeichnung von in Zellkultur durchgeführten Studien verwendet.

Abkürzungen und Symbole:

Symbole für chemische Elemente wurden entsprechend des Periodensystems der Elemente verwendet.

Symbole für SI-Einheiten und SI-Präfixe entsprechen den internationalen Konventionen.

Falls Abkürzungen ausschließlich in Abbildungen verwendet wurden, so sind sie in der entsprechenden Legende erklärt.

| | |
|----------------|---|
| °C | Grad Celsius |
| 5-CT | 5-Carboxamido-Tryptamin |
| 5-HT | Serotonin bzw. 5-Hydroxytryptamin |
| 8-OH-DPAT | (+/-)8-Hydroxy-2-(di-n-Propylamino)Tetralin |
| A | Adenosin |
| Abb. | Abbildung |
| AC | Adenylatcyclase |
| ANOVA | „Analysis of Variance“ |
| AP | alkalische Phosphatase |
| BAC | „bacterial artificial chromosome“ |
| BDNF | „brain-derived neurotrophic factor“ |
| bluo-Gal | 5-Bromo-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid |
| bp | Basenpaare |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytosin |
| cAMP | „cyclic“ Adenosin Monophosphat |
| cDNA | „copy“-DNA |
| cM | centi Morgan |
| CMV | Cytomegalievirus |
| cpm | „counts“ pro Minute |
| DMEM | „Dulbecco´s minimal essential medium“ |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraazetat |
| EGFP | „enhanced green fluorescent protein“ |
| FKS | fötales Kälberserum |
| G | Guanosin |
| GR | Glukokortikoidrezeptor |
| GRE | „Glukokortikoid Response Element“ |
| GRK | G-Protein gekoppelten Rezeptorkinase |
| h | Stunde |
| HAT | Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin |
| HCG | „human chronic gonadotropine“ |
| HHN-Achse | Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse |
| hnRNA | heteronukleäre Ribonukleinsäure |
| Inr-Sequenz | Initiator-Consensus-Sequenz |
| l | Liter |
| M | molar |
| MAO-B | Monoaminoxidase-B |
| MR | Mineralokortikoidrezeptor |
| mRNA | „Messenger“ Ribonukleinsäure |
| NGF | „Nerve Growth Factor“ |
| nGRE | negatives „Glukokortikoid Response Element“ |
| PAC | „P1-derived artificial chromosome“ |
| PBS | „phosphate buffered saline“ |
| PCR | „Polymerase Chain Reaction“ |
| PIPES | Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfon-säure) |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKC | Proteinkinase C |
| PMSG | „pregnant mares serum gonadotropine“ |

| | |
|------------|--|
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| RPMI | „Rapid Prototyping & Manufacturing Institute“ |
| rRNA | ribosomale Ribonukleinsäure |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-„Polymerase Chain Reaction“ |
| s. | siehe |
| s.u. | siehe unten |
| sAHP | „slow afterhyperpolarization“ |
| salmon-Gal | 6-Chloro-3-Indolyl- β -D-galactosid |
| SCN | „suprachiasmatic nucleus“ |
| SSC | „saline-sodium citrate“ |
| SSRI | „Selective Serotonin Reuptake Inhibitor“ |
| T | Thymin |
| Tab. | Tabelle |
| TM | Transmembrandomäne |
| TPH | Tryptophan-5-Hydroxylase bzw. Tryptophan-5-Monooxygenase |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan |
| tRNA | transfer-Ribonukleinsäure |
| U | biologische Einheit „Unit“ |
| u.a. | unter anderem |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| UTP | Uracil Triphosphat |
| X-Gal | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid |
| YAC | „yeast artificial chromosome“ |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Das serotonerge System | 1 |
| | Die Entdeckung des Serotonins | 1 |
| | Die Biosynthese und der Abbau des Serotonins | 1 |
| | Die Verteilung serotonerger Neuronen im zentralen Nervensystem | 2 |
| | Die physiologischen Wechselwirkungen und Funktionen des serotonergen Systems | 3 |
| 1.2 | Die Serotonin-Rezeptoren | 4 |
| | Die molekulare Eigenschaften der Serotonin-Rezeptoren | 4 |
| | Die Verteilung der Serotonin-Rezeptoren im zentralen Nervensystem und funktionelle Implikationen | 5 |
| 1.2.1 | Der 5-HT _{1A} -Rezeptor | 7 |
| | Die molekularen Eigenschaften des 5-HT _{1A} -Rezeptors | 7 |
| | Die Verteilung des 5-HT _{1A} -Rezeptors im zentralen Nervensystem | 8 |
| | Die Signalwege des 5-HT _{1A} -Rezeptors | 9 |
| | Die funktionellen Eigenschaften des 5-HT _{1A} -Rezeptors auf physiologischer Ebene | 9 |
| | Die Regulation des 5-HT _{1A} -Rezeptors | 11 |
| | Der Promotor des 5-HT _{1A} -Rezeptorgens | 15 |
| 1.2.2 | Der 5-HT ₇ -Rezeptor | 17 |
| | Die molekularen Eigenschaften des 5-HT ₇ -Rezeptors | 17 |
| | Die Verteilung der 5-HT ₇ -Rezeptoren im zentralen Nervensystem | 19 |
| | Die Signalwege des 5-HT ₇ -Rezeptors | 20 |
| | Die funktionellen Eigenschaften des 5-HT ₇ -Rezeptors auf physiologischer Ebene | 21 |
| | Die Regulation des 5-HT ₇ -Rezeptors | 23 |
| 1.3 | Zielsetzung | 26 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 28 |
| 2.1 | Material | 28 |
| 2.1.1 | Chemikalien | 28 |
| 2.1.2 | DNA und RNA Größenstandards | 28 |
| 2.1.3 | Enzyme und Antikörper | 28 |
| 2.1.4 | Vektoren | 29 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.1.5 | Kits | 29 |
| 2.1.6 | Puffer und Lösungen | 29 |
| 2.1.7 | Verbrauchsmaterialien | 31 |
| 2.1.8 | Bakterielle Stämme | 31 |
| 2.1.9 | Zelllinien und Zellkulturmedien | 32 |
| 2.1.10 | Versuchstiere | 32 |
| 2.1.11 | Oligonukleotide | 33 |
| 2.1.12 | Computerprogramme, Server und Datenbanken | 34 |
| 2.2 | Methoden | 34 |
| 2.2.1 | Molekularbiologie | 34 |
| | PCR/RT-PCR | 35 |
| | Klonierungen der DNA und Promotorfragmente: | 35 |
| | Primerextension | 38 |
| 2.2.2 | Zellkultur | 39 |
| | NG108-15-Zellen | 39 |
| | COS-7-Zellen | 39 |
| | PC12-Zellen | 39 |
| | RN46A-Zellen | 40 |
| | Analyse der RNA | 40 |
| | Transfektionen | 40 |
| | Luciferase- und β -Galactosidase Assays | 41 |
| 2.2.3 | Transgene Tiere | 41 |
| 2.2.4 | Histochemische Nachweismethoden | 42 |
| | Färbungen zum Nachweis von β -Galactosidaseaktivität | 42 |
| | Färbung zum kombinierten Nachweis von β -Galactosidaseaktivität und 5-HT _{1A} -Rezeptortranskripten | 43 |
| 3 | ERGEBNISSE | 44 |
| 3.1 | 5-HT _{1A} -Rezeptor | 44 |
| 3.1.1 | Kartierung des genomischen Locus des 5-HT _{1A} -Rezeptorgens | 44 |
| 3.1.2 | Sequenzanalyse des Promotorbereichs des 5-HT _{1A} -Rezeptorgens | 44 |
| 3.1.3 | <i>In vitro</i> Analysen der Promotorfragmente des 5-HT _{1A} -Rezeptorgens | 47 |
| | Wahl und Charakterisierung der verwendeten Zellkultursysteme | 47 |
| | Klonierung verschiedener 5-HT _{1A} -Rezeptorgen Promotorfragmente | 48 |

| | |
|--|------------|
| Analyse der 5-HT _{1A} -Rezeptorgen Promotorfragmente | 50 |
| <i>In vitro</i> Untersuchungen zum Einfluss von Glukokortikoiden und Mineralokortikoiden auf die 5-HT _{1A} -Rezeptorgenexpression | 52 |
| 3.1.4 <i>In vivo</i> Analysen der Promotorfragmente des 5-HT _{1A} -Rezeptorgens | 54 |
| Übersicht | 54 |
| Grundcharakterisierung der transgenen Mauslinien | 55 |
| Analysen der Transgenexpression im adulten Gehirn der transgenen Mäuse | 56 |
| Kokolisationsstudien zur Analyse der Transgenexpression im ZNS auf zellulärer Ebene | 61 |
| Analyse der <i>LacZ</i> -Expression im Embryo und während der frühen postnatalen Entwicklung | 64 |
| 3.2 5-HT₇-Rezeptor | 68 |
| 3.2.1 Klonierung und Kartierung des genomischen Locus des 5-HT ₇ -Rezeptorgens | 68 |
| 3.2.2 Sequenzanalyse des Promotorbereichs des 5-HT ₇ -Rezeptorgens | 69 |
| 3.2.3 Analyse der Transkriptionsstartpunkte des 5-HT ₇ -Rezeptorgens | 71 |
| 3.2.4 Identifikation von Spleißvarianten im 5'-Bereich des 5-HT ₇ -Rezeptorgens | 74 |
| 3.2.5 <i>In vitro</i> Analysen zur Charakterisierung des 5-HT ₇ -Rezeptorgen Promotors | 79 |
| Wahl und Charakterisierung der verwendeten Zellkultursysteme | 79 |
| Klonierung verschiedener 5-HT ₇ -Rezeptorgen Promotorfragmente | 79 |
| <i>In vitro</i> Analyse der 5-HT ₇ -Rezeptorgen Promotorfragmente | 80 |
| 4 DISKUSSION | 84 |
| 4.1 Der 5-HT _{1A} -Rezeptorgen Promotor | 84 |
| 4.2 Der 5-HT ₇ -Rezeptorgen Promotor | 94 |
| 5 LITERATUR | 102 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 6 | ANHANG | 121 |
| 6.1 | Endogene 5-HT _{1A} -Rezeptor und 5-HT _{1A} -Rezeptor mRNA Verteilung | 121 |
| 6.2 | Sequenz des murinen 5-HT ₇ -Rezeptorgens | 122 |
| 6.3 | Danksagung | 125 |
| 6.4 | Curriculum Vitae | 126 |