2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Falls nicht gesondert angemerkt, wurden alle Chemikalien von den folgenden Firmen bezogen: Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D), Serva (Heidelberg, D), Sigma (Taufkirchen, D) und Biorad (München, D).

Radioaktiv markierte Nukleotide wurden von Amersham-Pharmacia (Freiburg, D), Hormone für die Zellkulturversuche von Sigma, PCR-assoziierte Chemikalien von Promega (Mannheim, D), Invitec (Berlin, D) und Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH (Hamburg, D) und spezifische *in situ* Hybridisierung-assoziierte Chemikalien von Boehringer Mannheim (Mannheim, D) gekauft.

Substrate für die ß-Galactosidase zum Nachweis der Enzymaktivität in Zellen und Geweben von Mäusen wurden von Roth (X-Gal), Gibco/Invitrogen (Groningen, NL) (Bluo-Gal) und Apollo Scientific Ltd. (Whaley Bridge, GB) (Salmon-Gal) bezogen.

2.1.2 DNA und RNA Größenstandards

100 bp DNA ladder	New England Biolabs (Frankfurt, D)
1kb DNA ladder	New England Biolabs, MBI Fermentas (St.Leon-Rot, D)
Lambda DNA/HindIII	Promega

2.1.3 Enzyme und Antikörper

Restriktionsenzyme	Boehringer Mannheim, New England Biolabs, MBI Fermentas
DNA modifizierende Enzyme	New England Biolabs, MBI Fermentas
Taq Polymerasen und PCR assoziierte Enzymprodukte	Gibco/Invitrogen, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Invitec, Roche Molecular Biochemicals (Basel, CH)
DNA Polymerasen	New England Biolabs
RNA Polymerasen	Boehringer Mannheim
DNasen	Promega
RNasen	Gibco/Invitrogen, Qiagen (Hilden, D)
Proteinase K	Promega; Qiagen
Anti-Digoxigenin-AP Antikörper	Boehringer Mannheim

2.1.4 Vektoren

pLitmus28	New England Biolabs
pBlueskriptII KS +/-	Stratagene (LaJolla, USA)
pCR2.1-TOPO	Gibco/Invitrogen
pGL2-Basic	Promega
pCH110	Amersham-Pharmacia
pEGFP-N1	BD Biosciences Clontech (Heidelberg, D)
pM2	wurde wie unter 2.2.1 beschrieben selber hergestellt

2.1.5 Kits

DNeasy™ Tissue Kit	Qiagen
Kits des QIAquick® DNA Cleanup Systems	Qiagen
QIAGEN Plasmid Midi und Maxi Kit	Qiagen
Effectene™ Transfection Kit	Qiagen
Luciferase Reportergene Assay System™	Tropix/PE Biosystems (Weiterstadt, D)
Galacto-Star™	Tropix/PE Biosystems
Superscript II Preamplification System	Gibco/Invitrogen
TOPO TA Cloning® Kit	Gibco/Invitrogen
Rediprime II DNA Labelling System	Amersham-Pharmacia
Megaprime DNA Labelling System	Amersham-Pharmacia
Chameleon site directed mutagenese Kit	Stratagene
Access RT-PCR System	Promega
SequiTherm Exel II DNA Sequencing Kit	Biozym (Oldendorf, D)
ABI PRISM® BigDye™ Terminators v3.0 Cycle Sequencing Kit	PE Biosystems
NucleoSpin Plus Plasmid Kit	BD Biosciences Clontech

2.1.6 Puffer und Lösungen

Puffer und Medien für gängige molekularbiologische Techniken und zur Kultivierung von Bakterien wurden wie von Sambrook et al. (1989) beschrieben hergestellt. Falls nicht gesondert erwähnt wurde hierfür gereinigtes Wasser (Millipore) verwendet.

Puffer und Lösungen für die Erzeugung transgener Mäuse:

M2-Medium, 50 ml:

0,825 g	M2 (Sigma, modified powder)	
233 µl	Na-bicarbonat 7,5%	
0,217 g	Lactic acid	
0,25 ml	Penicillin/Streptomycin	(Stock: 12 mg/ml Pen.; 10 mg/ml Strept.)

pH 7,2 – 7,3

steril filtrieren, aufbewahren bei 4 °C

M16-Medium, 50 ml:

0,576 g	M16 (Sigma, modified powder)	
1,4 ml	Na-bicarbonat 7,5%	
0,217 g	Lactic acid	
0,25 ml	Penicillin/Streptomycin	(Stock: 12 mg/ml Pen.; 10 mg/ml Strept.)

pH 7,2 – 7,3

steril filtrieren, aufbewahren bei 4 °C

Narkosemittel für Mäuse (40 – 50 µl/10 g Körpergewicht):

125 µl	Rampun
1 ml	Ketavet
2000 µl	PBS-steril

Hormone:

PMSG (=Intergonan) 1000 U/5 ml

Verd. 1/8: 5 ml PMSG-Lösung + 35 ml PBS (--> 5 U/200 µl)

Injektionsvolumen: 200 µl

Aliquots bei –20 °C

HCG (=Predalon) 500 U/ml

Verd. 1/20: 1 ml HCG-Lösung + 19 ml PBS (-->5 U/200 µl)

Injektionsvolumen: 200 µl

Aliquots bei –20 °C

DNA-Mikroinjektionspuffer:

10 mM Tris-HCl (pH 7,4); 0,25 mM EDTA

Puffer und Lösungen für den histochemischen Nachweis der ß-Galactosidaseaktivität:

Fixierungspuffer:	1% Formaldehyd; 0,2% Glutaraldehyd; 0,02% Nonident P-40; 1x PBS
Waschpuffer:	0,02% Nonident P-40; 1x PBS
Färbepuffer (Bluo-Gal):	0,43 mg/ml Bluo-Gal; 3,1 mM $K_3Fe(CN)_6$; 3.1 mM $K_4Fe(CN)_6$; 1 mM $MgCl_2$; 0,02% Nonident P-40; 1x PBS
Färbepuffer (X-Gal):	1 mg/ml X-Gal; 5 mM $K_3Fe(CN)_6$; 5 mM $K_4Fe(CN)_6$; 2 mM $MgCl_2$; 0,02% Nonident P-40; 5 mM EGTA; 1x PBS
Färbepuffer (Salmon-Gal):	0,4 mg/ml Salmon Gal; 3,1 mM $K_3Fe(CN)_6$; 3.1 mM $K_4Fe(CN)_6$; 1 mM $MgCl_2$; 0,02% Nonident P-40; 0,2% Paraformaldehyd; 1x PBS

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Neben den Standardverbrauchsmaterialien (Reaktionsgefäße, Glaswaren usw.) wurden folgende Materialien verwandt:

Hybond-N und Hybond-N+	Amersham-Pharmacia
3MM-Filterpapier	Whatmann Paper (Maidstone, GB)
Farbdiafilm Elite Crome 100	Kodak (Rochester, USA)
Farbdiafilm für Kunstlicht Elite Chrome 160T Tungsten	Kodak
X-Omat AR und BioMax MR Röntgenfilme	Kodak
Rotilabo®-Sterilfilter steril, 0.22 µm, PVDF	Roth
Fotochemikalien	Kodak
Storage Phosphor Screen GP	Kodak
Elektroporationsküvetten	Biorad
Spritzen	Braun (Melsungen, D)
NAP und NICK Columns	Amersham-Pharmacia

2.1.8 Bakterielle Stämme

XL1-Blue	F´xTn10 proA+B+lacI^q Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nalr) thi hsdR17 (rK-mK+)supE44relA1 lac	Stratagene
DH5α	F´/endA1 hsdR17(rK-rK+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nalr) relA1 Δ(lacZYA-argF)U169 (Φ80dlacΔ(lacZ)M15)	Gibco/Invitrogen
TOP10	endA1 hsdR1 lacZΔM15 ΔlacZX74 recA1	Gibco/Invitrogen

2.1.9 Zelllinien und Zellkulturmedien

Zelllinien:

NG108-15-Zellen	Interspezifische Maus Neuroblastoma/Ratte Glioma Hybrid Zelllinie (Hamprecht 1977; Nirenberg 1978); erhalten von Prof. Hörtnagl, Charité, Berlin
HT-22-Zellen	Neuronale Zellen der Maus hippocampalen Ursprungs; erhalten von Prof. Hörtnagl, Charité, Berlin
LAN-1-Zellen	Humane Neuroblastoma-Zellen; erhalten von Prof. Hörtnagl, Charité, Berlin
RN46-A-Zellen	Neuronale differenzierbare Ratten-Zellen etabliert aus serotonergen Raphe-Zellen (White et al. 1994); erhalten von Dr. Whittemore, University of Louisville School of Medicine, Louisville, Kentucky
PC12-Zellen	Neuronale differenzierbare Pheochromocytoma Ratten-Zellen etabliert aus adrenalen Medulla-Zellen; erhalten von Dr. Sers, Charité, Berlin
COS-7-Zellen	Fibroblasten-ähnliche Affen (green african monkey)-Zellen etabliert aus Gewebe der Niere; erhalten von Prof. Hörtnagl, Charité, Berlin

Sämtliche Zellkulturmedien wurden von Gibco/Invitrogen und Biochrom KG Seromed (Berlin, D) bezogen. DMSO wurde von Sigma gekauft. Gewebekulturgefäße wurde von Biochrom KG Seromed und Greiner Labortechnik GmbH (Solingen, D) bestellt.

2.1.10 Versuchstiere

Für die durchgeführten Tierversuche wurden Mäuse des Inzuchtstammes NMRI (Harlan-Winkelmann, Paderborn) verwendet. Im Allgemeinen wurden männliche und weibliche Tiere getrennt in Gruppen von vier bis sechs pro Käfig in einem Hell-Dunkel Zyklus von zwölf Stunden, kontrollierter Temperatur von 20-22 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-70% gehalten. Futter und Wasser waren *ad libitum* vorhanden. Die Tiere wurden über cervikale Dislokation getötet. Alle durchgeführten Tierexperimente erfolgten entsprechend dem Deutschen Tierschutzgesetz.

2.1.11 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, wurden von TIBMolBiol, Berlin synthetisiert

Primername	Primersequenz	Schmelz-temperatur
Spl1.f	5'-CCA gCC CTg ggg CCg gCT gCC ggA gC	66 °C
Spl2.f	5'-Cgg CgC TCg gCA CgA TgA Tgg ACg	66 °C
Spl2-rat.f	5'-CCA gCC CCg ggg CCg gCT gCC ggA gCg	66 °C
Spl1.r	5'-ggC gAT gAA gAC gTT gCA gAA gAA gTg g	66 °C
Spl2.r	5'-ggC CAg ACC gAC AgA ATC ATT Tgg CC	66 °C
Spl2-rat.r	5'-gCC AgA CCg ACA gAA TCA TTT Tgg CC	66 °C
Spl3.r	5'-gAA gAg Agg Agg TAA ggT gAT ggA ggC	66 °C
Spl1.rrc	5'-CCA CTT CTT CTg CAA CgT CTT CAT CgC C	66 °C
7-3´.fwd	5'-CAA AAC TgT gAC CAC Tgt ggg AAA	56 °C
7-3´.rwd	5'-CCA AgT TCT gTT gTg CAg TCT CAg	56 °C
Mut S-N	5'-Ph-CAT gTC Tgg ATC Cgg Cgg CCg CTg CCC TTg AgA gCC	86 °C
Mut –NFX	5'-Ph-gCA TTT TTT TCA CTg Cgg CCg CgT TgT ggC Cgg CCC AAA CTC gAg AAT gTA TCT TAT gg	88 °C
GRE1-S+	5'-Ph-CTT ggA ATg TgA CAC gCT gTC gAC TCC CAT ATT AAg ATA TAA AAT C	72 °C
GRE2-B-	5'-Ph-CCg AAT TCg gAT CgA gtA CAC AAA CAg gAA TTg CCg ACT gAC ATg TTT CC	81 °C
Xho-Selector	5'-Ph-CCT gCA ggA ATT CCT CgT gAC gTA Cgg TgC gCg CgA TgC	85 °C
7-adapt.fwd	5'-gAT CTC gTg CCg AgC gCC gCT gCC	77 °C
7-adapt.rwd	5'-Ph-CAT ggg CAg Cgg CgC TCg gCA CgA	80 °C
PEX1	5'-gAg CgC CgC TgC CCA Tgg AgC Cgg CgC CCC Cg	90 °C
PEX2	5'-CAT ggg gTC Cgg CgC Tgg CCA CTg ggg ggC g	88 °C
PEX3	5'-gTg gCC gAA gTT gCg gAg TgC gCC CCg CCC C	87 °C
PEX4	5'-ggC CTC AgC ACT gTA gCA AAT gAC AAg Cgg ggT g	78 °C
S1	5'-gAg CgC CgC TgC CCA Tgg AG	70 °C
S2	5'-CAT ggg gTC Cgg CgC Tgg CCA CTg	78 °C
S3	5'-gTg gCC gAA gTT gCg gAg TG	65 °C
S4	5'-ggC CTC AgC ACT gTA gCA AAT g	61 °C
1A-Prom.fwd	5'-ggA gAg ACA gAg ACg AAg gAA CTA gg	62 °C
LacZ.rwd	5'-CgA ggg gAA AAT Agg TTg CgC gAg	62 °C
P1.r	5'-CgT CCA TCA TCg TgC CgA gCg CCg	64 °C
P1	5'-gTg gTC AAA ATg ggA AAC ggA ACT ATC	64 °C
P2	5'-gAT gCT TgA TgT AgT gCT CAA AAA gg	64 °C
P3	5'-gTC ATT TgC TAC AgT gCT gAg gCC	64 °C
1A.f	5'-AgA AgA Agg Agg CAC TCg ggA cTA	58 °C
1A.r	5'-gCT CAg Agg CTC CAg CTA ggA AA	58 °C
1A-rat.f	5'-ACA gCg TCC CAg gAg CCC TTT	60 °C
1A-rat.r	5'-TAg AgA ACC AgC ATg AgC AAC	60 °C

Primername	Primersequenz	Schmelz-temperatur
MR-rat.f	5'-gTg gAC AgT CCT TTC ACT ACC g	58 °C
MR-rat.r	5'-TgA CAC CCA gAA gCC TCA TCT C	58 °C
GR-rat.f	5'-CCA CAA gCA ATg TgC AgC AgC gAC	66 °C
GR-rat.r	5'-CTC CCg CCA AAg gAg AAA gCA AG	66 °C
NGF1-A-rat.f	5'-CCT TCg CTC ACT CCA CTA TCC ACT ATC	66 °C
NGF1-A-rat.r	5'-ggC ACT ggg gAT ggA AAT gAg gTg gTG	66 °C

2.1.12 Computerprogramme, Server und Datenbanken

Zur Analyse der Sequenzdaten wurden folgende Computerprogramme benutzt:

- Wisconsin Package der Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin, USA
- Programme, die über den ExPASy (Expert Protein Analysis System, http://www.expasy.ch) zugänglich sind (Multalin, MSA, LALIGN)

Zur Analyse der Sequenzdaten wurden ferner folgende Datenbanken durchsucht:

- Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)
- Datenbanken, die über den ExPASy (Expert Protein Analysis System, http://www.expasy.ch) zugänglich sind (MIPS, Blocks, ProDom)
- Die Database of protein families and domains (PROSITE, http://us.expasy.org/prosite/)
- die Eucaryotic Promoter Database (EPD, http://www.epd.isb-sib.ch/)
- die Datenbanken des Transcription Element Search System (TESS, http://www.cbil.upenn.edu/tess/)
- die Gene Expression Database (GXD) des Jackson Labors (http://www.informatics.jax.org/)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologie

Falls nicht gesondert angemerkt wurden die gängigen molekularbiologischen Methoden - wie Agarose Gelelektrophorese, Restriktionsverdau von DNA, „Southern"-Hybridisierung, Transformation und Kultivierung von *E. coli* - entsprechend den Protokollen aus Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

Isolierung und Aufreinigung von linearen DNA-Fragmenten, Plasmid DNA und PAC und DNA und genomischer DNA wurde mit den jeweiligen Kits nach Herstellerangaben

durchgeführt. Sämtliche weiteren eingesetzten Kits wurden ebenfalls, sofern nicht gesondert angemerkt, entsprechend den Herstellerangaben verwendet. DNA Sequenzierungen wurden, falls nicht gesondert beschrieben, von MWG-Biotech (Ebersberg, D) durchgeführt.

PCR/RT-PCR

PCR-und RT-PCR-Versuche wurden entsprechend den Angaben der Hersteller der verwendeten Kits bzw. Reagenzien durchgeführt. Die Primerpaar-spezifischen Annealing-Temperaturen sind Abschnitt 2.1.11 zu entnehmen. Die RT-PCR-Reaktion wurde ausgehend von isolierter RNA entweder in einem Schritt mit dem Access RT-PCR System (Promega) durchgeführt oder verlief alternativ dazu über die getrennte Synthese von cDNA mit dem Superscript II Preamplification System (Gibco/Invitrogen) und anschließender PCR. PCRs wurden mit Reagenzien verschiedener unter 2.3.1 aufgeführter Hersteller durchgeführt.

Klonierungen der DNA und Promotorfragmente:

PAC_{1A}:

Ein PAC-Klon mit ca. 100 kb Insertgröße, der aus einer genomischen 129/Sv Maus PAC Bibliothek (Genome Systems, St-Louis, USA) isoliert wurde und das Gen für den 5-HT_{1A}-Rezeptor und dessen regulatorische Sequenzen beinhaltet (PAC_{1A}), wurde mir von Dr. Heike Kusserow zur Verfügung gestellt.

Isolierung von PAC_7:

Mittels PCR (Primer Spl2.f/Spl1.r) wurde aus genomischer DNA der Maus (C57bl/6) ein Fragment des ExonI des 5-HT_7-Rezeptorgens amplifiziert, isoliert und mittels dem TOPO TA Cloning® Kit (Gibco/Invitrogen) kloniert. Nach Sequenzierung des klonierten DNA-Fragments wurde aus diesem Fragment eine radioaktiv markierte Sonde hergestellt (Megaprime DNA Labellling System, Amersham-Pharmacia), mit der Filter, die eine genomische 129/Sv Maus PAC Bibliothek (Recourcencenter: RPCI21 Mouse PAC) repräsentieren, unter stringenten Bedingungen hybridisiert wurden. Positive Klone wurden bestellt und mittels PCR (7-3´.fwd/7-3´.rwd) auf das Vorkommen des Exons3 des 5-HT_7-Rezeptorgens hin durchmustert. Es wurde mit einem von vier positiven Klonen weitergearbeitet (PAC_{1A}).

Konstruktion des *LacZ*-Expressionsplasmids pM2:

Das Luciferasegen (*Luc*) des pGL2-Basic Vektors (Promega) wurde über BamHI/HindIII gegen das lacz Gen des pCH110 Vektors (Pharmacia) ersetzt. Eine NotI, eine FseI und eine XhoI Schnittstelle wurden 40 bp stromaufwärts des Polylinkers eingefügt; eine SalI Schnittstelle

10 bp stromabwärts der BamHI Schnittstelle wurde gegen eine weitere NotI Schnittstelle ausgetauscht (Chameleon site directed mutagenese Kit, Stratagene; Mutageneseprimer: Mut - NFX, Selektionsprimer: Mut S-N). (siehe Abb. 3.3)

Konstruktion der 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor - *LacZ*-Konstrukte:

Für die Subklonierung verschiedener Promotorfragmente des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens wurde ein 5832 bp langes DNA-Fragment (-5567 bp bis +265 bp relativ zum ATG) aus PAC_{1A} in den pLitmus28 (New England Biolabs) kloniert (pLitN1). Ein 734 bp EcoRI/Cac81 Fragment des 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotors (-6 bp bis -740 bp stromaufwärts vom ATG) wurde aus pLitN1 über NsiI/EcoRI in den pLitmus28 (New England Biolabs) kloniert und weiter in den pM2 über SacI (partiell für pM2)/BglII subkloniert. Das resultierende Vektorderivat wurde **pM2-740** genannt. Ein 557 bp langes BseRI/NcoI Fragment wurde aus diesem Vektor herausgeschnitten. Das religierte Vektorderivat enthält ein 177 bp Fragment des 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotors (-6 bp bis -183 bp stromaufwärts vom ATG) und wurde **pM2-183** genannt. Ein partiell verdautes NcoI/EcoRI Fragment des pLitN1 wurde über NcoI/EcoRI in den pM2-740 kloniert. Der resultierende Vektor enthält 5561 bp des proximalen 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotors (-6 bp bis -5567 bp stromaufwärts vom ATG) und wurde **pM2-5,5kb** genannt. Ein internes BglII Fragment dieses Vektors wurde ungerichtet in pM2 subkloniert. Der resultierende Vektor mit der korrekten Orientierung des BglII Fragments enthält ein 4545 bp langes Promotorfragment (-6 bp bis -551 bp stromaufwärts vom ATG) und wurde **pM2-4,5kb** genannt. Ein ca. 20 kb langes AvrII Fragment des 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotors wurde aus PAC_{1A} in pM2-740 subkloniert. Die Transformation des Ligationsansatzes dieser Klonierung erfolgte hierbei entgegen der sonst durchgeführten Hitzeschock Transformationen über Elektroporation (Sambrook et al. 1989). Das Vektorderivat mit der korrekten Orientierung des AvrII Fragments wurde **pM2-20kb** genannt. (siehe Abb. 3.4)

Die Sequenz des Inserts des pLitN1 wurde über Zyklus Sequenzierung beider Stränge ermittelt (ABI Cycle Sequencer, PE Biosystems).

Konstruktion der 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor - *LacZ*-Deletionskonstrukte:

Ein 1570 bp langes KpnI/EcoRV Promotorfragment wurde aus pM2-4,5kb in pLitmus28 (New England Biolabs) subkloniert. Der resultierende Vektor wurde **pLit-KV** genannt.

pLit-KV wurde mittels dem Chameleon site directed mutagenesis Kit (Stratagene) mutagenisiert. Zur Herstellung von **pLit-KVmut1** wurde als Mutageneseprimer GRE1-S+ verwendet und zur Herstellung von **pLit-KVmut2** GRE2-B-. GRE1-S+ führt neben der Mutagenisierung des „Glukokortikoid Response Elements“ 1 (GRE1) zu einer Einführung einer

SalI Schnittstelle und GRE2-B- neben der Mutagenisierung des „Glukokortikoid Response Elements“ 2 (GRE2) zu einer Eliminierung einer BamHI Schnittstelle. Der Selektionsprimer Xho-Selector eliminiert die XhoI Schnittstelle des Polylinkers von pLit-KV. pLit-KVmut1 wurde mit GRE2-B- mutagenisiert (BamHI diente der Selektion), der resultierende Vektor wurde **pLit-KVmut3** genannt.

Die KpnI Schnittstelle des pLitmus28 wurde deletiert und somit **pLit28ΔK** hergestellt. Dieser Vektor wurde für die folgenden Klonierungschritte eingesetzt. Ein ~4,5 kb langes 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotorfragment wurde über XhoI/AvrII aus pM2-4,5kb in pLit28ΔK kloniert Aus diesem Plasmid, pLit28ΔK-AX, wurde das KpnI/EcoRV 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotorfragment gegen die drei mutagenisierten KpnI/EcoRV Promotorfragmente ausgetauscht, wodurch die drei Plasmide pLit28ΔK-AXmut1, pLit28ΔK-AXmut2 und pLit28ΔK-AXmut3 generiert wurden. Ferner wurde der KpnI/EcoRV geschnittene pLit28ΔK-AX Vektor geglättet und religiert, wodurch pLit28ΔK-AXΔKV hergestellt wurde. Die vier mutagenisierten Promotorfragmente wurden über XhoI/AvrII zurück in den pM2-4,5kb Vektor kloniert. Die vier resultierenden Vektoren wurden **pM2-4,5kbmut1**, **pM2-4,5kbmut2**, **pM2-4,5kbmut3** bzw. **pM2-4,5kbΔKV** genannt. (siehe Abb. 3.8)

Konstruktion des Referenzplasmids pGL2-CMV

pGL2-CMV exprimiert *Luc* unter der Kontrolle des CMV-Promotors und wurde hergestellt durch Klonierung des CMV-Promotors aus pEGFP-N1 (BD Biosciences Clontech) über AseI (geglättet)/XhoI in pGL2-basic (Promega) welcher zuvor SmaI/XhoI Verdaut wurde. Dieses Plasmid wurde als interne Kontrolle zur Berechnung von Transfektionseffizienzen verwendet.

Konstruktion der 5-HT_7-Rezeptorgen Promotor - *LacZ*-Konstrukte

Für die Subklonierung verschiedener Promotorfragmente des 5-HT_7-Rezeptorgens wurden diverse DNA-Fragment aus dem Bereich von –5303 bp bis etwa +10 kb relativ zum ATG aus PAC_7 in pLitmus28 (New England Biolabs) oder pBlueskriptII KS +/- (Stratagene) kloniert. **pLit7-24** enthält ein 5,7 kb langes EcoRI Insert (-4224 bp bis +1485 bp relativ zum ATG) dessen Sequenz über Zyklus Sequenzierung beider Stränge ermittelt wurde (ABI Cycle Sequencer, PE Biosystems). Durch weitere doppelsträngige Sequenzierung diverser Subklone wurde insgesamt die Sequenz des Bereiches zwischen -5305 bp und +2141 bp ermittelt.

pLitmus28 (New England Biolabs) wurde mit BglII/NcoI geschnitten und mit einem Adapter ligiert (7-adapt.fwd/7-adapt.rwd), der relativ zum ATG des 5-HT_7-Rezeptorgens von +1 bp bis –23 bp reicht. Hierbei ging die BglII Schnittstelle verloren. Der resultierende Vektor wurde **pLit-Adapt** genannt. Aus pLit7-24 wurden drei 5-HT_7-Rezeptorgen Promotorfragmente in den

AvrII(geglättet)/NcoI geschnittenen pLit-Adapt kloniert: EcoRI(geglättet)/NcoI, BamHI(geglättet)/NcoI und XhoI(geglättet)/NcoI. Aus den drei resultierenden Vektoren wurden die Promotorfragmente über KpnI(geglättet)/BglII in den SmaI/BglII geschnittenen pM2 umkloniert. Die drei pM2-Vektorderivate wurden **pM2-4,2kbΔ**, **pM2-3,5kbΔ** und **pM2-2,1kbΔ** genannt. Durch Schneiden von pM2-2,1kbΔ mit XhoI/PstI und anschließendes Glätten und Religieren wurde **pM2-1,2kbΔ** erzeugt. Δ kennzeichnet das fehlende 86 bp lange NcoI/NcoI Fragment des proximalen Promotorbereichs (–22 bp bis –107 bp relativ zum ATG). Dieses Fragment wurde im letzten Klonierungsschritt über NcoI ungerichtet eingefügt. Über Sequenzierungen der resultierenden Vektorderivate wurden diejenigen mit der korrekten Orientierung des NcoI Fragments identifiziert: **pM2-4,2kb**, **pM2-3,5kb**, **pM2-2,1kb** und **pM2-1,2kb**. (siehe Abb. 3.26 und 3.28)

Primerextension

Die Primer PEX1, PEX2, PEX3 und PEX4 (50 pmol) wurden mit [γ-^{32}P]ATP mit Hilfe der Polynukleotidkinase PNK (New England Biolabs) entsprechend den Herstellerangaben endmarkiert und mit dem QIAquick® DNA Cleanup Systems (Qiagen) gereinigt.

Markierte DNA Primer (10^4-10^5 cpm) und 30 µg Gesamt-RNA wurden zusammen gefällt und in 30 µl 40 Hybridisierungspuffer (mM PIPES (pH 6,4), 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,4 M NaCl und 80% Formamid) resuspendiert und denaturiert (10 min bei 80 °C). Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 30 °C durchgeführt. Anschließend wurden die RNA-DNA Hybride gefällt.

Die Reverse-Transkriptase-Reaktion wurde mit dem Superscript II Preamplification System (Gibco/Invitrogen) entsprechend den Herstellerangaben unter Zugabe von 1 U/µl RNasin (Promega) durchgeführt. Im Anschluss wurde ein RNase Verdau (5 µg/ml) durchgeführt. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die DNA gefällt und in 4 µl TE/6 µl Formamid-Ladepuffer resuspendiert. Die Primerextension-Produkte wurden auf einem 6%igem Polyacrylamid/Harnstoff-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Parallel dazu wurden mit den Primern S1, S2, S3 und S4 Sequenzreaktionen mit dem SequiTherm EXCEL™ II DNA Sequenzierungskit (Biozym) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Als Matrize wurde pLit7-24 verwendet. Die Sequenzreaktionsprodukte wurden mit dem QIAquick® DNA Cleanup Systems (Qiagen) gereinigt und zusammen mit den Primerextension-Produkten wie oben beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt. Ein X-Omat AR Röntgenfilm (Kodak) wurde anschließend mit dem getrockneten Polyacrylamidgel exponiert.

2.2.2 Zellkultur

NG108-15-Zellen wurden kultiviert in:

Dulbecco´s minimal essential medium, DMEM, (Gibco/Invitrogen) versetzt mit 10% (vol/vol) Hitze-inaktiviertem fötalem Kälberserum, FKS, (Biochrom KG Seromed), 2% (vol/vol) HAT-supplement (Biochrom KG Seromed), 2 mM Glutamin (Biochrom KG Seromed) und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom KG Seromed) bei 37 °C und 5% CO_2.

Konfluente Kulturen wurden 1:4 bis 1:6 geteilt. Hierbei wurden die Zellen nicht trypsinisiert sondern durch leichtes Klopfen der Kulturgefäße vom Boden gelöst.

Die Zellen wurden eingefroren in:

DMEM, 20% (vol/vol) FKS, 2% (vol/vol) HAT-Supplement, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin und 20% (vol/vol) DMSO (Sigma).

Für Versuche mit definierten Mengen an Steroidhormonen wurde das verwendete FKS zuvor mit Aktivkohle behandelt um im FKS enthaltene Steroidhormone zu entfernen: 100 ml FKS wurden mit 5 mg Dextran-Coated Charcoal (Sigma) versetzt, 1 h bei RT gerührt, ÜN bei 4 °C inkubiert, anschließend zentrifugiert (10k U/min, 4 °C, 30 min), steril filtriert und aliquotiert.

COS-7-Zellen wurden kultiviert in:

DMEM versetzt mit 10% (vol/vol) FKS, 2 mM Glutamin und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5% CO_2.

Konfluente Kulturen wurden trypsinisiert und 1:4 bis 1:6 geteilt.

Die Zellen wurden eingefroren in:

DMEM versetzt mit 20% (vol/vol) FKS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin und 20% (vol/vol) DMSO.

PC12-Zellen wurden kultiviert in:

RPMI 1640 Medium (Biochrom KG Seromed) versetzt mit 10% (vol/vol) Hitze-inaktiviertem Pferdeserum, HS, (Biochrom KG Seromed), 5% (vol/vol) FKS, 2 mM Glutamin und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5% CO_2. Die Zellen wuchsen auf unbehandeltem Gewebekulturgefäßböden.

Konfluente Kulturen wurden 1:4 bis 1:6 geteilt. Hierbei wurden die Zellen nicht trypsinisiert sondern durch Klopfen der Kulturgefäße vom Boden gelöst.

Die Zellen wurden eingefroren in:

RPMI 1640 Medium versetzt mit 10% (vol/vol) HS, 10% (vol/vol) FKS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin und 20% (vol/vol) DMSO.

Zum Differenzieren wurden die Zellen durch Trypsinieren und anschließendes Dissoziieren (fünfmaliges auf- und ab-ziehen durch eine sterile Kanüle (22G)) vereinzelt und danach auf mit Collagen G (Biochrom KG Seromed) beschichteten Gewebekulturgefäßböden in RPMI 1640 Medium versetzt mit 4% (vol/vol) HS, 2% (vol/vol) FKS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin und 100 ng/ml 7S-NGF (Promega) ausgesät und bei 37 °C und 5% CO_2 kultiviert. Die Zellen beginnen sich nach ca. 24 h abzuflachen, nach zwei Tagen ist deutliches Neuritenwachstum zu beobachten und nach vier bis fünf Tagen sind die Zellen stark ausdifferenziert und besitzen langen Neuriten.

Differenzierte PC12-Zellen wurden 52 h nach Beginn der Differenzierung transfiziert (s.u.).

RN46A-Zellen wurden gehalten, gezüchtet und differenziert entsprechend den publizierten Angaben (Rudge et al. 1996).

Analyse der RNA

Mittels RT-PCR wurden die verschiedenen Zelllinien auf die Expression verschiedener Gene hin untersucht. Hierfür wurde die RNA mit Hilfe des Trizol-Reagenzes (Gibco/Invitrogen) entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert. Die RT-PCR wurde mit dem Access RT-PCR System (Promega) ebenfalls entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde je Reaktion 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die spezifischen Annealing-Temperaturen für die entsprechenden PCR-Reaktionen sind Abschnitt 2.1.11 zu entnehmen. Die RNA von Lan-1-Zellen und HT-22-Zellen wurde mir von Dr. Heike Kusserow zur Verfügung gestellt.

Transfektionen

Die Transfektionen der verschiedenen Zelllinien wurde mit Effectene™ (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt und optimiert: Die Zellen wurden in Platten mit sechs Kammern (Greiner) mit 0,2 µg pGL2-CMV, 0,2 µg pM2 oder pM2-Derivat, 3,2 µl Enhancer und 10 µl Effectene (Verhältnis von DNA zu Effectene Reagenz: 1/25) transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion geerntet und analysiert. Das ß-Galactosidase/Luciferase-Aktivitätsverhältnis wurde in Dreifachbestimmungen ermittelt. Die Werte für die pM2-Derivate wurden gegen die Werte für pM2 normalisiert, falls eine unspezifische Aktivität von pM2 gemessen wurde. Alle dargestellten Daten entsprechen ermittelten Mittelwerten +/- Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. P-Werte zur Evaluierung der statistischen Signifikanz wurden mittels ANOVA und dem Tukey post-test errechnet.

Luciferase- und ß-Galactosidase Assays

Die in Gewebekulturplatten mit sechs Kammern kultivierten und transfizierten Zellen wurden ein Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl (NG108-15-Zellen) oder 200 µl (COS-7-, PC12- und RN46A-Zellen) Lysis-Puffer (Tropix/PE Biosystems) lysiert. Zelllysate wurden gesammelt und zentrifugiert (13000 rpm, 5 min, 4 °C). Überstände wurden gesammelt und mittels Luciferase Reportergene Assay System™ und Galacto-Star™ (beides von Tropix/PE Biosystems) entsprechend den Herstellerangaben auf Luciferase- bzw. ß-Galactosidaseaktivität hin analysiert.

Lumineszenz wurde mit dem MiniLumat™ (Berthold Technologies, Bad Wildbad, D) gemessen. Falls notwendig wurden die zu vermessenden Überstände mit Lysis-Puffer verdünnt, um Ergebnisse im linearen Bereich der Assays zu erhalten. Um die Transfektionseffizienzen der verschiedenen pM2-Derivate zu berechnen, wurden transfizierte Zellen wie unter 2.2.4 kurz dargestellt mit Bluo-Gal (Gibco/Invitrogen) gefärbt (Aguzzi und Theuring 1994), und die relative Anzahl an gefärbten Zellen wurde ermittelt.

2.2.3 Transgene Tiere

Die Herstellung der transgenen Tiere folgte den Standardprozeduren (Hogan et al. 1994) und wird im folgenden nur kurz beschrieben. Die Konstrukte zur Erzeugung der transgenen Mäuse wurden über NotI Verdau aus den entsprechenden Vektoren (pM2-4,5kb, pM2-5,5kb und pM2-20kb) herausgeschnitten und über Gelelektrophorese von den Vektorsequenzen getrennt. Die Promotor-*LacZ*-Fragmente wurden mit dem QIAquick® Gel Extraktions Kit (Qiagen) aufgereinigt und mit DNA-Mikroinjektionspuffer eluiert. Die DNA wurde auf eine Konzentration von 1,5-3 µg/ml in DNA-Mikroinjektionspuffer verdünnt. Die Quantifizierung der DNA erfolgte spektrophotometrisch und durch Vergleich zu DNA Standards. Die DNA wurde in männliche Vorkerne befruchteter Eizellen von NMRI Mäusen injiziert. Typischer Weise wurden je Injektionstag 100 bis 300 Eizellen injiziert. Im Prinzip wird die Effizienz der Mikroinjektion in Bezug auf die Ausbeute an transgenen „Founder"-Tieren durch zwei Faktoren beeinflusst: zum einen steigt die Integrationsrate mit steigender DNA Konzentration, zum anderen nimmt jedoch die Überlebensrate injizierter Eizellen mit steigender DNA Konzentration ab. Zur Ermittlung der optimalen Konstrukt-spezifischen DNA-Konzentration wurden deswegen zu Beginn der Injektion eines Konstruktes verschiedene DNA-Konzentrationen verwendet und die entsprechenden Überlebensraten am folgenden Tag ermittelt. Zellen, die sich im Zwei-Zell-Stadium befanden, wurden in Ovidukte pseudoschwangerer weiblicher NMRI-Mäuse retransferiert. Im weiteren Verlauf der Mikroinjektion eines Konstruktes wurde ausschließlich die optimale DNA Konzentration injiziert. Je nach Ausbeute an injizierten Eizellen

und pseudoschwangeren weiblichen NMRI-Mäusen wurden die injizierten Eizellen im Ein-Zell-Stadium am Tag der Mikroinjektion oder im Zwei-Zell-Stadium am folgenden Tag retransferiert.

Die Identifikation transgener Mäuse erfolgte mittels PCR (1A-Prom.fwd/LacZ.rwd) auf genomischer DNA von Schwanz-Biopsien. Hierfür wurden die Mäuse nach dem Absetzen von der Mutter markiert (Ohrmarken der Firma Hauptner/Herberholz, Solingen, D) und ein 1-3 mm langes Stück des Schwanzes wurde abgeschnitten und die DNA isoliert (López-Revilla et al. 1999). Die PCR wurde wie aus Abschnitt 2.1.11 ersichtlich durchgeführt.

Zur Ermittlung der Kopienzahl sowie zur Identifizierung der Anzahl der Integrationsorte wurden „Southern-Blot"-Analysen (Sambrook et al. 1989) durchgeführt. Hierfür wurden Schwanzbiopsien von Tieren der F1 Generation verwendet. Die DNA wurde in diesem Fall mit Hilfe des DNeasy™ Tissue Kit (Qiagen) den Herstellerangaben folgend isoliert. Als ^{32}P-markierte Sonde wurde die kodierende Region des *LacZ*s verwendet. Die Markierung wurde mit dem Megaprime oder dem Rediprime II DNA Labelling System (Amersham-Pharmacia) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.4 Histochemische Nachweismethoden

Färbungen zum Nachweis von ß-Galactosidaseaktivität

Die Färbungen mit Bluo-Gal wurden im wesentlichen wie von Aguzzi und Theuring (1994) beschrieben durchgeführt und werden im folgenden nur kurz dargestellt.

- Färbungen von Geweben und Gewebeschnitten transgener Tiere wurden je transgener Linie für mindesten drei Tiere durchgeführt. Gewebe wurde entnommen, direkt auf Trockeneis tiefgefroren und bei –80 °C gelagert. Mit einem Kryostat wurden bei –20 °C 20 µm dicke Gefrierschnitten angefertigt und mit Bluo-Gal gefärbt
- Zellen wurden in Gewebekulturgefäßen gefärbt: Die Zellen wurden auf Eis gekühlt, ein Mal mit PBS gewaschen, für 5 min in Fixierungspuffer fixiert, zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend für 24 h bei 32 °C in Färbepuffer (Bluo-Gal) oder alternativ in Färbepuffer (X-Gal) gefärbt.
- Färbungen von Gesamtgewebepräparaten wurden von diversen Geweben inklusive Gehirnen und Embryonen durchgeführt. Gewebeproben wurden entnommen und direkt in PBS (4 °C) transferiert. Anschließend wurden sie je nach Größe 10 min bis 2 h in Fixierungspuffer bei 4 °C fixiert. Embryonen bis Tag E12,5 wurden für 10-30 min fixiert, größere Embryonen und adulte Gehirne wurden 45-60 min fixiert, dann sagital oder horizontal mit einer Rasierklinge in der Mitte geteilt und anschließen erneut für 45-60 min fixiert. Die Proben wurden zwei Mal mit Waschpuffer je 45-60 min

gewaschen. Die Färbung erfolgte bei 32 °C, 12-24 h in Färbepuffer (Bluo-Gal). Die Proben wurden anschließend 1-2 h in PBS gewaschen und in Fixierungspuffer bei 4 °C gelagert.

In einigen Fällen wurden gefärbte Proben durch Ethanol dehydriert und in Paraffin eingebettet, um anschließend Mikrotomschnitte anfertigen zu können.

Teilweise wurden gefärbte Gesamtgewebepräparate durch Glycerolbehandlung (aufsteigende Reihe: 10-70% (vol/vol) Glycerol in PBS bei 4 °C; Glycerollösungen wurden gewechselt wurde sobald die Proben abgesunken waren) aufgehellt und in ihrer Transparenz erhöht.

Färbung zum kombinierten Nachweis von ß-Galactosidaseaktivität und 5-HT_{1A}-Rezeptortranskripten

Mit einem Kryostat wurden bei –20 °C 8 µm dicke Gefrierschnitten angefertigt. Die Schnitte wurden fixiert wie beschrieben und mit Färbepuffer (Salmon-Gal) für 16 h bei 32 °C gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte zwei mal mit PBS gewaschen und 10 min in 4% Paraformaldehyd nachfixiert.

Der Nachweis der 5-HT_{1A}-Rezeptortranskripte erfolgte mittel nicht-radioaktiver *in situ* Hybridisierung: Für die Synthese der Sonde wurde das auch zur radioaktive *in situ* Hybridisierung eingesetzte AvrII Fragment *in vitro* unter der Verwendung von DIG-UTP (Roche) transkribiert. Die Schnitte wurden für mindestens 4 h vorhybridisiert (50% Formamid, 5 x SSC, 5 x Denhardt´s, 200 µg/ml Hefe-tRNA, 100 µg/ml Lachssperma-DNA). Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 72 °C nach Zugabe der denaturierten Sonde (200 ng/ml) durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte mit 5 x SSC gewaschen, mit RNase behandelt (40 µg/ml RNase in 0,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH8,0, 1 mM EDTA, 10 mM DTT) und erneut unter stringenteren Bedingungen mit 0,2 x SSC bei 72 °C gewaschen. Die immunohistochemische Detektion der DIG-markierten Nukleotide erfolgte entsprechen den Angaben des Herstellers (Roche). Die Schnitte wurden mit Hydromount™ (National Diagnostics, Oldendorf, D) versiegelt und mikroskopisch analysiert.