

3 Ergebnisse

3.1 5-HT_{1A}-Rezeptor

3.1.1 Kartierung des genomischen Locus des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens

Mittels „Southern-Blot“-Analysen auf genomischer DNA der Maus und DNA des PAC_{1A} Klon wurden die Regionen, die den kodierenden Bereich flankieren, analysiert und kartiert. Zudem wurden aus dem PAC_{1A}-Klon verschiedene Subklone hergestellt und doppelsträngig sequenziert. Die ermittelten Sequenzdaten umfassen 5,5 kb des 5'-untranslatierten Bereichs, die kodierende Region sowie 2 kb des 3'-untranslatierten Bereichs (Genebank AY029704). Eine schematische Darstellung der genomischen Organisation des murinen 5-HT_{1A}-Rezeptorgens ist in Abbildung 3.1A wiedergegeben.

3.1.2 Sequenzanalyse des Promotorbereichs des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens

Es wurde eine detaillierte computergestützte Sequenzanalyse des 5,5 kb langen proximalen Promotorbereichs durchgeführt.

Ein Vergleich mit der publizierten 1256 bp langen Sequenz des 5'-Bereiches des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens der Maus vom Stamm C3H/An (Genbank U33820 (Parks und Shenk 1996)), die 1188 bp des proximalen Promotors umfasst, ergab eine Homologie mit 100% identischen Basen, das heißt einem Fehlen von singulären Nukleotidpolymorphismen (SNPs).

Ein Vergleich mit der publizierten 3610 bp langen Sequenz des 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotors der Ratte (Genbank AF087675, (Storring et al. 1999)) ergab für den Bereich bis -3263 bp eine Homologie mit 85,5% identischen Basen. Nur einige kurze Abschnitte ohne beschriebene oder ersichtliche Funktion, wie beispielsweise ein GT-reicher Sequenzabschnitt zwischen -1290 bp und -1247 bp der Sequenz der Ratte, fehlten vollständig in der Sequenz der Maus. Ab -3263 bp fällt die Homologie stark ab.

Vergleicht man die humane genomische Sequenz (Genbank NT 006431, gi|16158842:2456849-2610401) mit der ermittelten Sequenz des 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotors der Maus, so erhält man eine Homologie mit 54,9% identischen Basen, wobei die Homologie mit zunehmender Entfernung vom kodierenden Bereich in 5'-Richtung des kodierenden Stranges stark abnimmt. Analog zu dem Ergebnis aus dem Vergleich mit der Sequenz der Ratte, gibt es bei -3263 bp einen Bruch in der Homologie zur humanen Sequenz.

Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Abbildung 3.1B dargestellt.

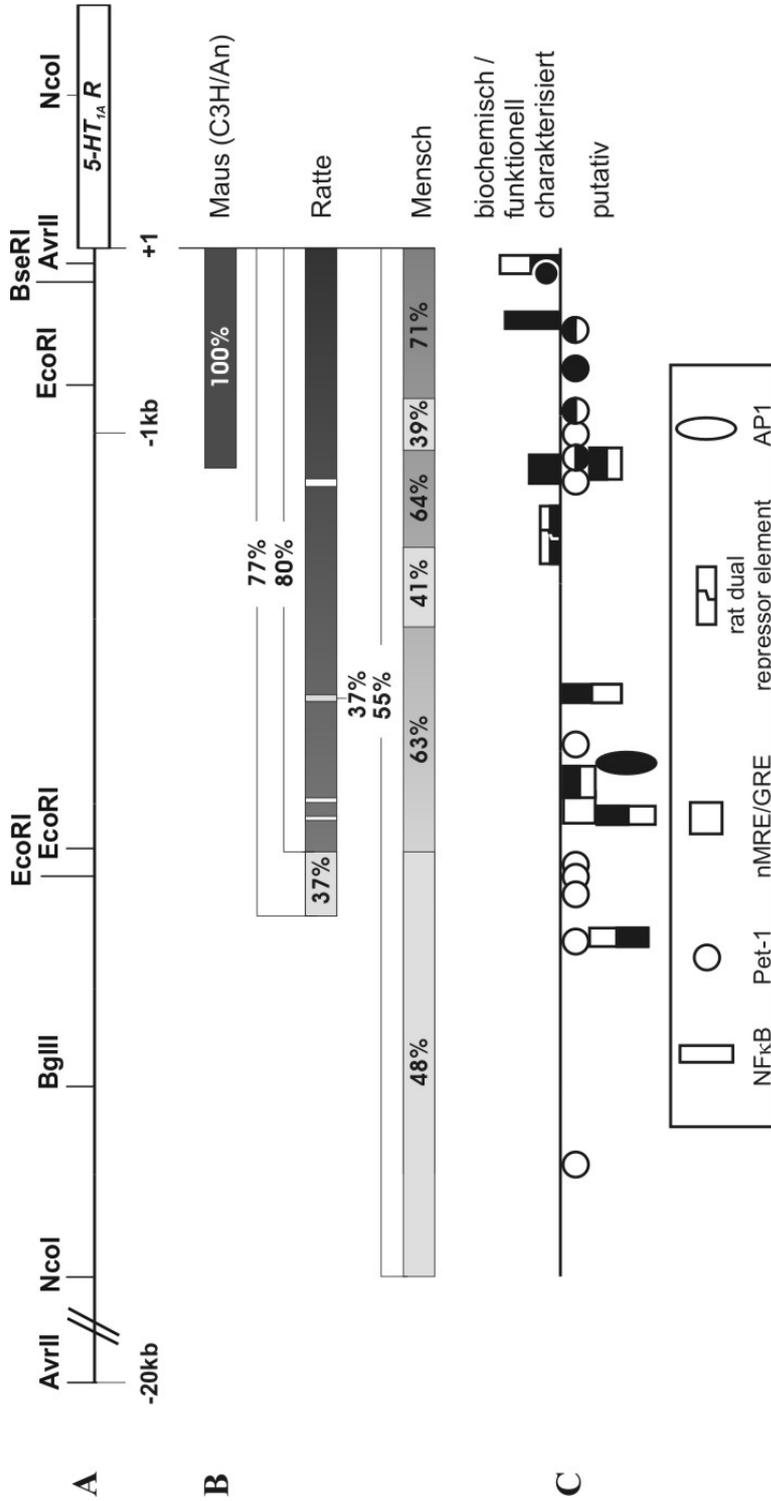


Abb. 3.1: Sequenzanalyse des 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotors. A: schematische Darstellung der kartierten Promotorregion (Linie) sowie der kodierenden Region des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens (Box, 5-HT_{1A}R); Restriktionsendonukleaschnittstellen, die zur Generierung der 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor-*LacZ*-Konstrukte verwendet wurden, sind wiedergegeben; die ermittelten Sequenzdaten reichen bis zur NcoI Schnittstelle in der 5'-Region des Promotors. B: Homologien zwischen der ermittelten Promotorsequenz (Maus, 129/Sv) und den publizierten Sequenzen von Maus (C3H/An, 1256 bp), Ratte (3610 bp) und Mensch (5830 bp); die Untersuchungen wurden mit frei verfügbarer Software durchgeführt (Multalin, MSA, LALIGN); die Analysen wurden unter den jeweiligen Grundeinstellungen der verschiedenen Programme durchgeführt; die dargestellten prozentualen Angaben der Homologien wurden auf ganze Zahlen gerundet; Graustufen indizieren den Homologiergrad. C: Schematische Darstellung der Organisation biochemisch und funktionell charakterisierter (oberhalb der Linie) sowie putativer (unterhalb der Linie) Cis-Elemente (Symbole, Legende) im 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor; zur Identifikation neuer putativer Cis-Elemente wurde TESS-Combined Search verwendet; Schwarze Füllungen geben Homologien wieder: proximal zur Linie gibt Homologie in der Ratte wieder, distal zur Linie gibt Homologie im Menschen wieder, bei voller Füllung wurde Homologie sowohl in der Ratte als auch im Menschen gefunden. Zur Analyse der Konservierung der dargestellten Cis-Elemente wurden TESS-Transfac Matrix Einträge sowie Daten aus den Originalpublikationen verwendet (siehe Text).

Zur weiteren Charakterisierung des murinen 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotors wurde die ermittelte Sequenz zum einen auf die Konservierung der bereits aus Ratte und/oder Mensch veröffentlichten und teilweise funktionell und biochemisch charakterisierten Transkriptionsfaktorbindungsstellen und zum anderen auf das Vorkommen bislang noch nicht beschriebener putativer Cis-Elemente mit Homologie in Ratte und/oder Mensch hin untersucht. Eine Zusammenfassung dieser im folgenden dargestellten Ergebnisse ist in Abbildung 3.1C wiedergegeben.

Es konnten insgesamt fünf konservierte NF-κB bindende Elemente identifiziert werden. Zwei von ihnen befinden sich in der proximalen Promotorregion an den homologen Positionen der von Wissink und Mitarbeitern (2000) beschrieben und funktionell charakterisierten, nicht-synergistisch wirkende NF-κB bindende Elemente der Ratte. Eins dieser Cis-Element ist zwischen Maus und Ratte konserviert und liegt bei der Maus bei -64 bp, das andere ist zwischen Maus, Ratte und Mensch konserviert und liegt bei der Maus bei -367 bp. Die drei weiteren putative NF-κB bindenden Elemente liegen in der Maus bei -2382 bp, -3016 bp und -3704 bp. Ersteres ist in der Rattensequenz vollständig und in der humanen Sequenz mit drei Variationen im Rahmen der Erkennungsmatrix konserviert. Das zweite ist in der Sequenz der Ratte mit zwei Variationen im Rahmen der Erkennungsmatrix konserviert, in der humanen Sequenz mit vier Variationen jedoch nicht. Letzteres liegt außerhalb des zur Verfügung stehenden Sequenzbereiches der Ratte und ist in der humanen Sequenz mit zwei Variationen im Rahmen der Erkennungsmatrix konserviert.

Ferner konnte das von Meijer und Mitarbeitern (2000) für die 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotorsequenz der Ratte beschriebene putative negative „Glukokortikoid Response Element“ (nGRE) mit drei Basenvariationen auch in der Sequenz der Maus identifiziert werden (-1149 bp/-1134 bp). Eine Analyse der humanen Sequenz ergab jedoch, dass es dort mit sieben Variationen nicht konserviert ist. Das von Ou und Mitarbeitern (2001) funktionell und biochemisch charakterisierte nMRE/GRE (-1169 bp/-1148 bp) konnte sowohl in der Maus als auch im Menschen identifiziert werden.

Über den distaleren Bereich des 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotors (ab -1500 bp in der Maus) liegen bislang keine publizierten Daten hinsichtlich Transkriptionsfaktorbindungsstellen vor. Durch Sequenzanalysen dieses Promotorbereichs konnten zwei weitere putative GREs (GREI: -2989 bp/-2974 bp und GREII: -2866 bp/-2851 bp) identifiziert werden. GREI liegt relativ isoliert vor. GREII überlappt über einen Bereich von fünf Basenpaaren mit einer putativen Oct-1-Bindungsstelle (Oct-1a) und besitzt im Vergleich mit der Konsensus-Matrix eine Basenvariation in einer Halbseitensequenz (Position 11). 16 Basenpaare weiter stromabwärts liegt eine zweite Oct-1-Bindungsstelle (Oct-1b), gefolgt von einer putativen AP1-Bindungsstelle und einer dritten Oct-1-Bindungsstelle (Oct-1c). Weder in der Ratte noch im Menschen ist GREI konserviert.

GRE II ist in der Ratte, jedoch nicht im Menschen konserviert. Oct-1a besitzt im Vergleich mit der Konsensus-Matrix (TESS: M00162) in Ratte und Mensch jeweils eine Basenvariation, Oct-1b (TESS: M00135) ist in Ratte und Mensch konserviert und Oct-1c (TESS: M00136) ist in Ratte konserviert, in Mensch jedoch nicht. Die putative AP-1-Bindungsstelle ist sowohl in der Ratte als auch im Menschen im Rahmen der Konsensus-Matrix (TESS: M00173) konserviert.

Weiterhin konnte die von Ou und Mitarbeitern (2000) im Genom der Ratte zwischen -1554 bp und -1531 bp identifizierte und funktionell charakterisierte duale Repressorregion in der Maus zwischen -1495 bp und -1472 bp lokalisiert werden. Sie besteht aus zwei überlappenden Repressorelementen. 20 der 23 Nukleotide der murinen Sequenz sind mit denen der Ratte identisch, in dem 14 bp-Element, das für die Repression der 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression in Rezeptor-positiven Zellen wichtig ist, findet sich eine Basenvariation, in dem 12 bp-Element, das für die Repression der 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression in nicht-neuronalen Zellen wichtig ist, finden sich drei Basenvariationen. Auch in der Sequenz des humanen Genoms konnte die homologe Region identifiziert werden. Hier fehlen jedoch im Bereich der 23 Nukleotide vier Nukleotide, zwei davon im 12 bp-Element und zwei im 14 bp-Element. Zudem finden sich im 14 bp-Element drei Basenvariationen und im 12 bp-Element vier.

Von Hendricks und Mitarbeitern (1999) wurde eine Arbeit zu dem ETS-Domänen-Transkriptionsfaktor Pet-1 und seiner Genexpression in zentralen serotonergen Neuronen während der frühen embryonalen Entwicklung veröffentlicht. Sie ermittelten die Consensus-Sequenz RRMAGGAARTR für die Pet-1 Bindung wobei für R = G oder A und für M = A oder C gilt. In der ermittelten 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotorsequenz der Maus fanden sich neben der von Hendricks und Mitarbeitern schon beschriebenen und funktionell und biochemisch charakterisierten einen Pet-1-Erkennungsstelle an Position -142 bp/-132 bp noch 11 weitere putative Cis-Elemente, die im Rahmen des oben dargestellten Musters höchstens eine Basenvariation aufweisen. Sie liegen über den gesamten sequenzierten Bereich verteilt. In dem Genom der Ratte sind die vier proximalsten putative Pet-1-Erkennungsstellen konserviert, im Genom des Menschen sind zwei dieser vier und eine etwas weiter distal liegende putative Pet-1-Erkennungsstelle konserviert.

3.1.3 *In vitro* Analysen der Promotorfragmente des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens

Wahl und Charakterisierung der verwendeten Zellkultursysteme

Für die *in vitro* Analysen der Promotorfragmente des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens wurden Zelllinien ausgewählt, die einerseits einen im Analysekontext sinnvollen spezifischen Zelltyp repräsentieren und andererseits unter den gewählten experimentellen Bedingungen transfizierbar sind. Wichtig war es in diesem Zusammenhang, eine Zelllinie zu finden, die der *in vivo*-Situation einer 5-HT_{1A}-

Rezeptorgen-exprimierenden Zelle nahe kommt, also eine Zelllinie, deren Repertoire an exprimierten aktiven und inaktiven Transkriptionsfaktoren die Expression des endogenen 5-HT_{1A}-Rezeptorgens erlaubt. Zu diesem Zweck wurden Expressionsstudien an diversen neuronalen Zelllinien durchgeführt. Es wurden NG108-15-, HT-22-, LAN-1-Zellen sowie differenzierte und undifferenzierte RN46A- und PC12-Zellen mittels RT-PCR auf die Expression des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens getestet. Nur in Zellen der interspezifischen Maus Neuroblastoma/Ratte Glioma Hybrid NG108-15-Zelllinie (Hamprecht 1977; Nirenberg 1978) und in differenzierten RN46A-Zellen, neuronale Raphezellen embryonalen Ursprungs der Ratte (White et al. 1994), konnte mit dieser Methode die Expression des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens der Ratte nachgewiesen werden (Abb. 3.2). Hierbei war die Expression in NG108-15-Zellen deutlich stärker, weswegen sie als 5-HT_{1A}-Rezeptorgen exprimierendes neuronales Testsystem eingesetzt wurden. Zudem konnten in NG108-15-Zellen GR und MR Transkripte nachgewiesen werden, deren Translationsprodukte - wie einleitend erwähnt - die 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression *in vitro* regulieren (Meijer et al. 2000; Wissink et al. 2000; Ou et al. 2001). Als differenzierte nicht 5-HT_{1A}-Rezeptorgen exprimierende neuronale Zelllinie wurden differenzierte PC12-Zellen, als undifferenzierte neuronale nicht-exprimierende Zelllinie wurden undifferenzierte PC12-Zellen verwendet. Als nicht neuronale und nicht-exprimierende Zelllinie wurden COS-7-Zellen gewählt. RN46A-Zellen ließen sich unter den gewählten experimentellen Bedingungen weder im differenzierten noch im undifferenzierten Zustand transfizieren, weswegen sie für die *in vitro* Untersuchungen nicht weiter eingesetzt wurden.

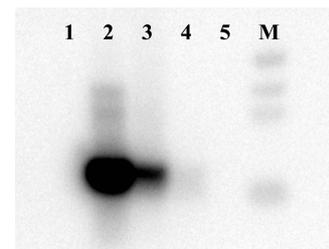


Abb. 3.2: Detektion von 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA in NG108-15- und RN46A-Zellen. RT-PCR mit spezifischen Primern für 5-HT_{1A}-Rezeptortranskripte der Ratte (1A-rat.f/ 1A-rat.r) wurde auf Gesamt-RNA von Rattengehirn (2), NG108-15-Zellen (3), differenzierten (4) und undifferenzierten (5) RN46A-Zellen und auf Wasser (1) als Negativ-Kontrolle durchgeführt (M: DNA-Marker). Die RT-PCR-Produkte wurden mit einer internen 5-HT_{1A}-Rezeptorgen spezifischen Sonde hybridisiert.

Klonierung verschiedener 5-HT_{1A}-Rezeptorgen

Promotorfragmente

Zur Analyse des Promotors wurde ein Expressionsvektor (pM2, Abb. 3.3) hergestellt, der folgende Eigenschaften hat:

- Als Reportergen trägt er das bakterielle β -Galactosidase Gen (*LacZ*) mit der SV40 *early region* polyA Sequenz

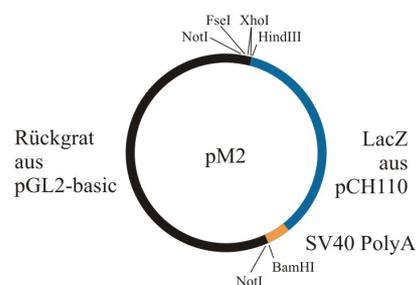


Abb. 3.3: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pM2.

- Er enthält Restriktionsenzymkennungsstellen, die zur Erzeugung kürzerer Promotorfragmente über 5'-Exonukleaseabbau erforderlich sind
- Er enthält zwei NotI-Erkennungsstellen, über die sich der zu untersuchende Promotorbereich mitsamt dem *LacZ* Gen aus dem Vektor herauschneiden lässt. Diese Eigenschaft ist auch wichtig für die Herstellung transgener Tiere.

Aus dem isolierten PAC-Klon, PAC_{1A}, wurden verschiedene Promotorbereiche subkloniert (siehe Klonierungen der DNA und Promotorfragmente unter Abschnitt 2.2.1). Die untersuchten Promotorfragmente reichen in ihrem 3'-Bereich bis 6 bp an den Translationstart des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens heran und variieren in der Länge des 5'-Bereiches. Es wurden drei große Promotorbereiche (-20 kb, -5.5 kb und -4.5 kb 5'untranslatierter Bereich) und zwei kurze Sequenzen (-183 bp und -740 bp vor dem ATG) vor das *LacZ* Gen des pM2 Vektors kloniert (Abb. 3.4). Das -183 bp Fragment trägt den basalen Promotor inklusive der proximalen Transkriptionsinitiationsstellen und der SP1- und MAZ-Bindungsstellen, die von Parks und Shenk (1996) biochemisch charakterisiert wurden. Zudem enthält es die beschriebene Pet-1-

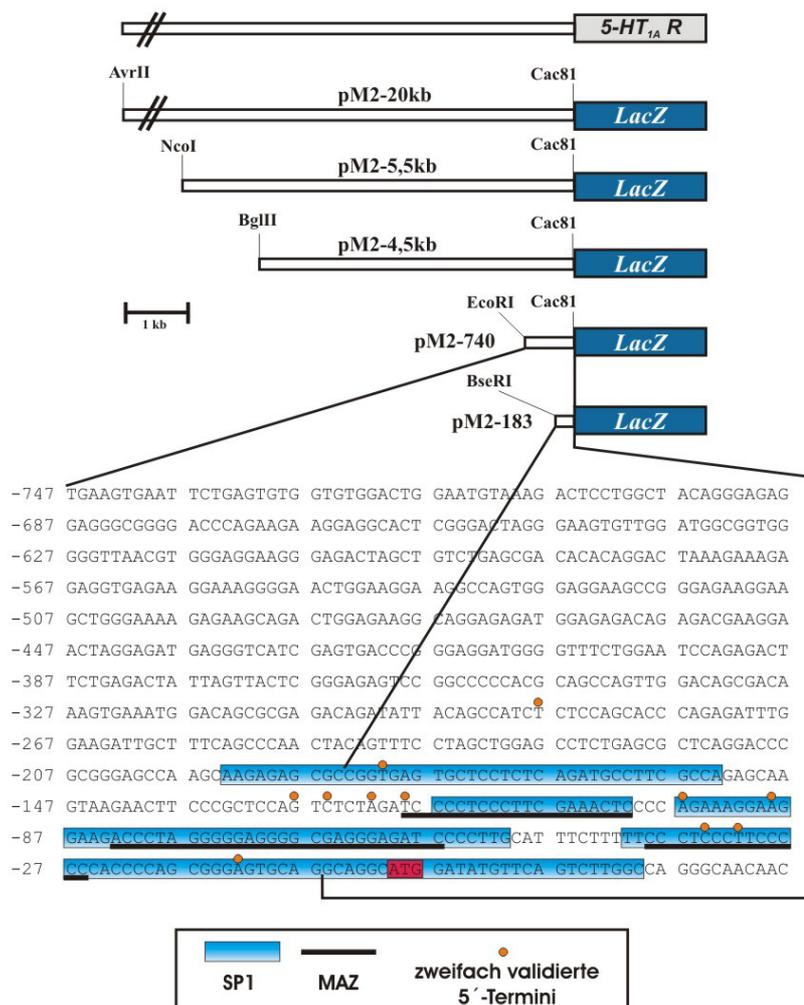


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor-*LacZ*-Konstrukte. Alle fünf Konstrukte tragen Promotorfragmente, die an ihren 3'-Enden bis -6 bp relativ zu ATG reichen. Die Promotorsequenz der zwei kurzen Konstrukte ist im unteren Teil der Abbildung wiedergegeben. Die dargestellten SP1- und MAZ-Bindungsstellen sowie die zweifach validierten 5'-Termini sind aus Parks und Shenk (1996). Die schmalen Kästen im oberen Teil der Abbildung repräsentieren die Promotorregion, die breiten Kästen (*5-HT_{1A}-R* und *LacZ*) repräsentieren kodierende Regionen.

Bindungsstelle (Hendricks et al. 1999) und eine der zwei von Wissink et al. (2000) charakterisierten NF- κ B-Bindungsstellen. Das -740 bp Fragment enthält alle für die Maus beschriebenen Transkriptionsinitiationsstellen mit Ausnahme der drei schwachen zwischen -740 bp und -760 bp (Parks und Shenk 1996), beide von Wissink et al. (2000) charakterisierten NF- κ B-Bindungsstellen sowie zwei zusätzliche putative Pet-1-Bindungsstellen. Die drei langen Fragmente umfassen alle bisher analysierten Sequenzbereiche und enthalten alle Regionen die in unseren Sequenzanalysen eine hohe Homologie zwischen Maus, Ratte und Mensch aufwiesen.

Analyse der 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotorfragmente

Die Aktivitäten der fünf 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotorfragmente in den transienten Transfektionsstudien sind in Abbildung 3.5 dargestellt. Für diese Versuche wurden die jeweiligen Reporterexpressionsplasmide mit pGL2-CMV in die entsprechenden Zellen kotransfiziert. Die Promotoraktivitäten wurden durch luminometrische Assays bestimmt. Die Transfektionseffizienz wurde mittels der Luciferaseaktivität normalisiert. Die transkriptionelle Aktivität der einzelnen Fragmente in COS-7- und NG108-15-Zellen wird relativ zu der des Promotor-losen pM2 Vektors angegeben. In PC12-Zellen (sowohl differenzierten als auch nicht-differenzierten) zeigten die Promotorfragmente insgesamt eine wesentlich niedrigere Aktivität, was eine relativ stärkere Auswirkung der durch das gewählte Versuchssystem bedingten Fehler auf die Messwerte zur Folge hatte. Die Messwerte dieser Versuchsreihe sind entgegen denen aus

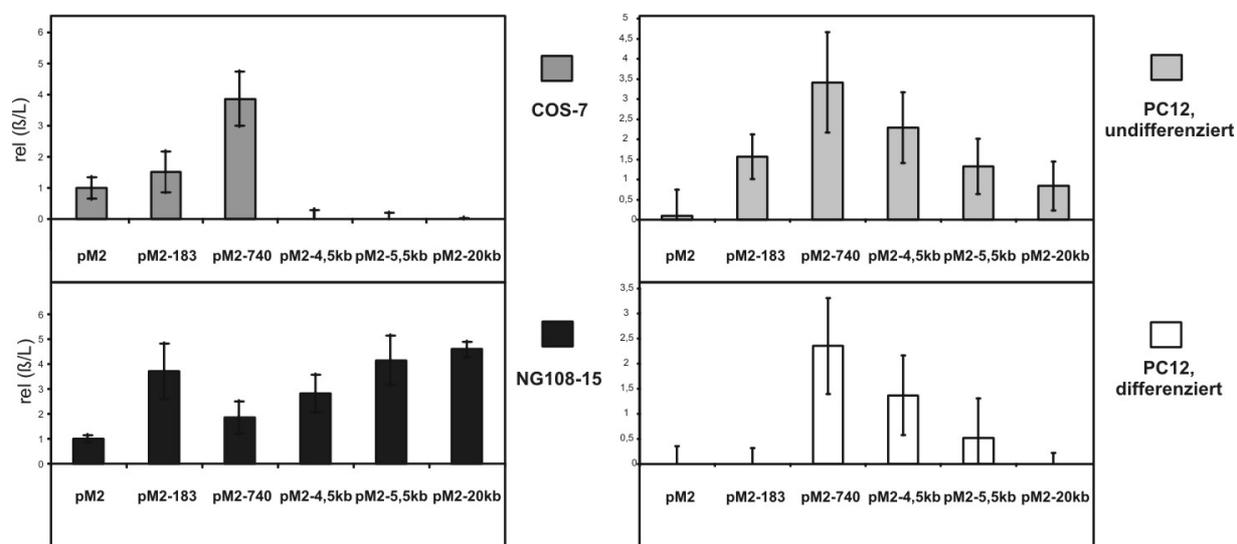


Abb. 3.5: Aktivität der 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor-*LacZ*-Konstrukte *in vitro*. COS-7-, NG108-15- und PC12-Zellen wurden in transienten Transfektionsstudien mit pGL2-CMV und den verschiedenen 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor-*LacZ*-Konstrukten kotransfiziert und nach 48 h vermessen. Daten sind wiedergegeben als Mittelwerte der β -Galactosidaseaktivität zu Luciferaseaktivität (β/L) abgeglichen gegen die Konstrukt-spezifischen Transfektionseffizienzen (rel) von mindestens drei verschiedenen Experimenten \pm Standardabweichung. Die Werte aus COS-7- und NG108-15-Zellen wurden auf die Aktivität des promotorlosen pM2-Vektors normalisiert.

NG108-15- und COS-7-Zellen aufgrund der nicht vorhandenen Hintergrundaktivität des pM2 Vektors nicht auf die pM2-Aktivität normalisiert.

Das -183 bp Fragment wies in NG108-15-Zellen eine 4-fach über dem Hintergrund (Aktivität des Promotor-losen pM2 Vektors) liegende Aktivität auf. Im Vergleich dazu war die Aktivität des -740 bp Fragments um etwa 66% reduziert und unterschied sich nicht mehr signifikant von der Aktivität des Promotor-losen pM2 Vektors. Im Gegensatz dazu war in COS-7 und differenzierten und undifferenzierten PC12-Zellen von den zwei kurzen 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotorfragmenten nur das -740 bp Fragment statistisch signifikant ($P < 0,001$) aktiv. In COS-7-Zellen lag die Aktivität etwa 4-fach über der des Promotor-losen pM2 Vektors. Mit den drei langen Fragmenten lag die Aktivität in NG108-15-Zellen wieder signifikant über der des Promotor-losen pM2 Vektors (pM2-4,5kb: $P < 0,01$; pM2-5,5kb & pM2-20kb: $P < 0,001$) und stieg mit zunehmender Länge an. Das -20 kb Fragment war das aktivste und lag 4,5-fach über dem Hintergrund. In den nicht-neuronalen COS-7-Zellen war die Aktivität der drei langen Promotorfragmente vollkommen reprimiert. Ihre Aktivitäten lagen unter der des Promotor-losen pM2 Vektors, was darauf hindeutet, dass die undichte Expression von pM2 durch in den Promotorfragmenten enthaltene Repressorelemente unterdrückt wurde. In PC12-Zellen war von den drei langen Promotorfragmenten nur das -4,5 kb Konstrukt signifikant (undifferenzierte PC12-Zellen: $P < 0,01$; differenzierte PC12-Zellen: $P < 0,05$) aber schwach aktiv.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die zwei kurzen Promotorfragmente den basalen Promotor enthalten, der Transkription ermöglicht, jedoch nicht spezifiziert. In den drei langen Promotorfragmenten (also ab Base -740 stromaufwärts) scheinen Repressorelemente vorhanden zu sein, die in NG108-15-Zellen nicht aktiv sind und somit die Transkription spezifizieren. Die Transkription wird durch diese Repressorelemente in PC12-Zellen jedoch nicht schon wie in COS-7-Zellen ab Fragment -4,5 kb vollständig unterdrückt, sondern erst ab Fragment -5,5 kb Fragment. Im Bereich zwischen -4,5 kb und -5,5 kb und zwischen -5,5 kb und -20 kb scheinen weitere Transkriptionsfaktorbindungsstellen zu liegen, die die Expression des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens in neuronalen nicht-exprimierenden Zellen reprimieren und in neuronalen exprimierenden Zellen aktivieren.

Aufgrund dieser Daten erfolgte die Auswahl der in den *in vivo* Untersuchungen zu verwendenden 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotorfragmente.

In vitro Untersuchungen zum Einfluss von Glukokortikoiden und Mineralokortikoiden auf die 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression

Basierend auf Literaturdaten (siehe 1.2.1 Die Regulation des 5-HT_{1A}-Rezeptors) wurde untersucht, ob die Expression, die durch die verschiedenen Promotorfragmente vermittelt wird, durch Glukokortikoide bzw. Mineralokortikoide beeinflusst wird. In ersten Experimenten wurde analysiert, ob sich das NG108-15 Zellkultur-system für solche Untersuchungen eignet. Hierzu wurden RT-PCR-

Untersuchungen durchgeführt, mit deren Hilfe die Existenz von Glukokortikoid- und Mineralokortikoidrezeptortranskripten nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.6). Im Zuge dieser Experimente wurden Mineralokortikoidrezeptortranskripte auch in differenzierten und undifferenzierten RN46A-Zellen sowie Glukokortikoidrezeptortranskripte in differenzierten RN46A-Zellen nachgewiesen. (Ferner wurden Transkripte des der *early growth response* Familie zugehörigen Transkriptionsfaktors NGF1-A in NG108-15-Zellen und in differenzierten und undifferenzierten RN46A-Zellen nachgewiesen.) Werden NG108-15-Zellen in Serum-freiem Medium gehalten, so sind nach 2 Tagen alle Zellen tot. Dieser drastische Effekt konnte sowohl durch Zugabe von Dexamethason (500 ng/ml) als auch Aldosteron (10 µg/ml) verhindert werden, wobei sich Aldosteron als protektiver erwies (visuelle Beobachtung). Dies deutet auf eine funktionelle Aktivität sowohl des Mineralokortikoidrezeptors als auch

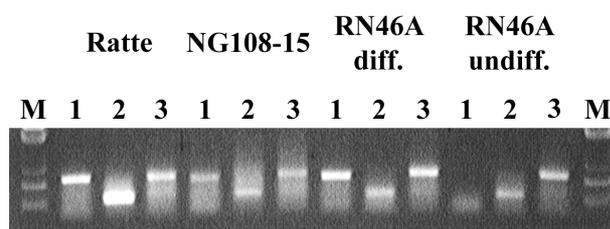


Abb. 3.6: Detektion von GR und MR mRNA in NG108-15- und RN46A-Zellen. RT-PCR mit spezifischen Primern für GR (1), MR (2) und NGF1-A (3) Transkripte der Ratte (GR-rat.f/GR-rat.r, MR-rat.f/MR-rat.r bzw. NGF1-A-rat.f/NGF1-A-rat.r) wurde auf Gesamt-RNA von Rattengehirn, NG108-15-Zellen und differenzierten und undifferenzierten RN46A-Zellen durchgeführt (M: DNA-Marker).

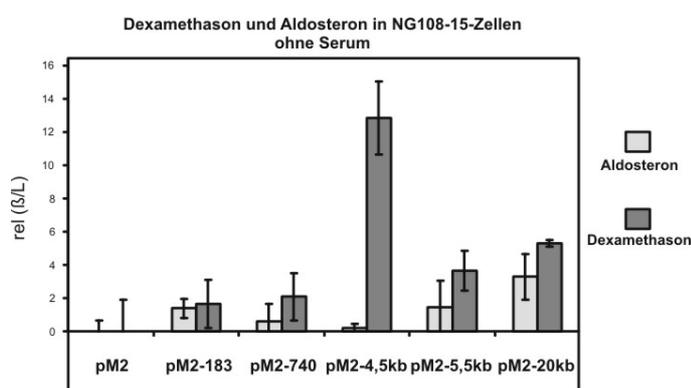


Abb. 3.7: Aktivität der 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor-LacZ-Konstrukte in NG108-15-Zellen nach Gabe von Dexamethason bzw. Aldosteron. Zellen wurden in Serum-freiem Medium versetzt mit Dexamethason (500 ng/ml) bzw. Aldosteron (10 µg/ml) kultiviert, nach 24 h transient mit pGL2-CMV und den verschiedenen 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor-LacZ-Konstrukten kotransfiziert und nach weiteren 48 h vermessen. Daten sind wiedergegeben als Mittelwerte der β-Galactosidaseaktivität zu Luciferaseaktivität (β/L) abgeglichen gegen die Konstrukt-spezifischen Transfektionseffizienzen (rel) von mindestens drei verschiedenen Experimenten +/- Standardabweichung.

des Glukokortikoidrezeptors hin.

Unter diesen Bedingungen wurden die ersten transienten Transfektionsstudien durchgeführt. Hierbei wurde ein Aktivitätsunterschied des 4,5 kb Promotorfragments nachgewiesen und zwar eine 10-fache Erhöhung der Aktivität nach Zugabe von Dexamethason im Vergleich zu Aldosteron (Abb. 3.7). Da diese Ergebnisse nicht in Bezug zur Situation ohne Hormonzugabe gesetzt werden konnten, konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich dabei um eine Steigerung der Aktivität durch Dexamethason oder um eine Inhibierung der Aktivität durch Aldosteron handelt.

Es wurden im folgenden mehrere verschiedene Steroidhormon-freie Zellkultursysteme ausprobiert. Wir haben uns schließlich für die Verwendung von mit Aktivkohle behandeltem Serum entschlossen (Vgl.: Meijer et al. 2000). Parallel dazu wurden Deletions- und Mutationskonstrukte des 5-HT_{1A} Promotors kloniert (Abb. 3.8) und schließlich wieder *in vitro* Analysen mit den alten (nicht mutierten) und neuen Konstrukten durchgeführt. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen sind in Abbildung 3.9 zusammengefasst.

Der ursprünglich beobachtete Aktivitätsunterschied des 4,5 kb Promotorkonstruktes war nicht mehr zu erkennen. Vielmehr zeigte sich unter diesen Bedingungen bei allen verwendeten Konstrukten ein Aktivitätssteigerungstrend sowohl für Aldosteron als auch für Dexamethason (letzterer stärker als ersterer). Für das 20 kb Konstrukt lag diese Aktivitätssteigerung im statistisch signifikanten Bereich ($p < 0,01$ für Aldosteron und $p < 0,001$ für Dexamethason). Verglichen mit den Werten aus 3.1.3.3 war die Aktivität des -183er Fragments niedriger ($p < 0,01$ für Hormon-freie Messung, sonst nicht statistisch signifikant). Das Aktivitätsprofil der anderen Konstrukte entsprach nach Gabe von Aldosteron oder Dexamethason in etwa den Ergebnissen aus 3.1.3.3, wohingegen die Aktivitäten der drei langen Konstrukte ohne Gabe von Aldosteron oder Dexamethason im Vergleich zu den Werten aus 3.1.3.3 schwächer waren. Für das 5,5 kb Konstrukt und das 20 kb Konstrukt lag der Aktivitäts-

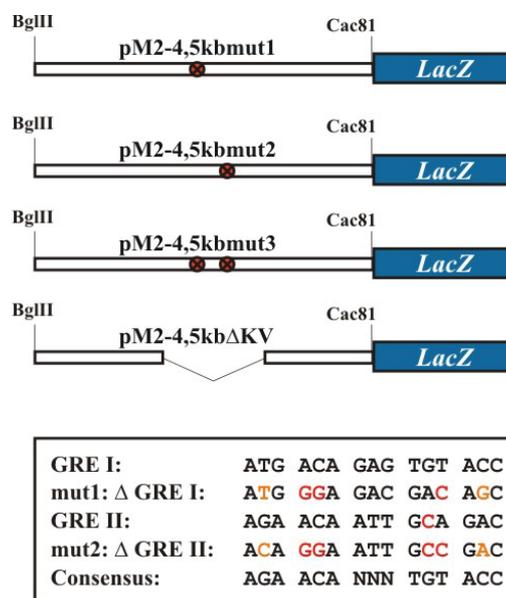


Abb. 3.8: Schematische Darstellung der 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor-*LacZ*-Deletionskonstrukte. Kreuze markieren die mutagenisierten Positionen, die dünne Linie kennzeichnet den deletierten Bereich. Im Kasten sind die unmutagenisierten und mutagenisierten GRE-Sequenzen sowie die GRE-Konsensus-Sequenz wiedergegeben (rot: nie in GREs gefunden, orange: nie zusammen in GREs gefunden).

unterschied im statistisch signifikanten Bereich ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$). Für die Deletions- und Mutationskonstrukte konnten keine statistisch signifikanten ($p < 0,01$) Effekte beobachtet werden.

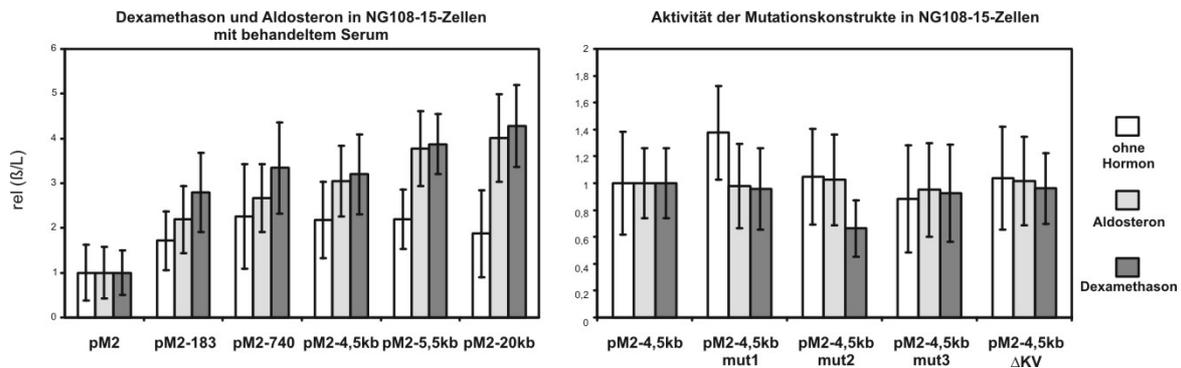


Abb. 3.9: Aktivität der 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor-*LacZ*-Konstrukte und –Deletionskonstrukte in NG108-15-Zellen nach Gabe von Dexamethason bzw. Aldosteron und ohne Hormonzusatz. Zellen wurden in mit Aktivkohle behandeltem FKS enthaltendem Medium versetzt mit Dexamethason (500 ng/ml), Aldosteron (10 µg/ml) bzw. ohne Zusatz von Hormonen kultiviert, nach 24 h transient mit pGL2-CMV und den verschiedenen 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor-*LacZ*-Konstrukten und –Deletionskonstrukten kotransfiziert und nach weiteren 48 h vermessen. Daten sind wiedergegeben als Mittelwerte der β -Galactosidaseaktivität zu Luciferaseaktivität (β/L) abgeglichen gegen die Konstrukt-spezifischen Transfektionseffizienzen (rel) von mindestens drei verschiedenen Experimenten \pm Standardabweichung. Die Werte links wurden auf die Aktivität des promotorlosen pM2-Vektors normalisiert, die Werte rechts auf die Aktivität des pM2-4,5kb Konstrukts.

3.1.4 *In vivo* Analysen der Promotorfragmente des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens

Übersicht

Es wurden transgene Mauslinien (NMRI-Auszuchtstamm) erzeugt, die das *LacZ* Reporter gen unter der Kontrolle der drei längeren Promotor-Reporter gen Konstrukte (4,5, 5,5 und 20 kb) exprimieren. Die potentiellen „Founder“-Tiere, Tiere der sogenannten F0 Generation, wurden mittels PCR auf eine Integration des Transgens ins Genom untersucht. Über „Southern-Blot“-Analysen wurden die Transgen-Integrationen der positiven F0 Tiere auf Mehrfachintegration untersucht. Tiere der F1 und F2 Generation wurden auf eine Expression des *LacZ* Reporter gens hin untersucht, zuerst an sogenannten Gesamtgewebepreparaten des Gehirns, dann an Gesamtgewebepreparaten verschiedener anderer Gewebe. Nach dieser Grundcharakterisierung wurden detaillierte Expressionsanalysen im Gehirn der Transgen-exprimierenden Tiere durchgeführt. Ferner wurde die Expression des Transgens während der Embryonalentwicklung analysiert.

Grundcharakterisierung der transgenen Mauslinien

Zur Erzeugung transgener Mäuse mit dem 4,5 kb Promotorkonstrukt wurden 1534 injizierte Oozyten in insgesamt 54 Leihmuttertiere retransferiert. 31 dieser Leihmütter wurden schwanger und gebaren 84 Mäusejunge, von denen 57 die frühe postnatale Zeit überlebten. 12 dieser 57 Tiere trugen das Transgen und wurden zur Etablierung permanenter transgener Linien verpaart. Von den 12 unabhängigen Linien konnte schließlich für 4 Linien eine Expression des Transgens nachgewiesen werden. Diese Werte sowie die entsprechenden Werte zur Erzeugung der anderen transgenen Linien sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Von 10 Linien, die das 5,5 kb Konstrukt im Genom trugen, exprimierten 7. Für zwei dieser 7 Linien konnten jedoch nur transiente Expressionsdaten ermittelt werden, da die „Founder“-Tiere (F0) zwei Tage nach der Geburt starben. Eine der 7 Linien zeigte ZNS-spezifische ektopische Expression. Für das 20 kb Promotorkonstrukt wurden 9 unabhängige Linien erzeugt, von denen für 3 eine Expression des Transgens nachgewiesen werden konnte. Beispielhafte Gesamtgewebepräparat-Expressionsergebnisse sind in Abbildung 3.10 wiedergegeben.

Promotor-fragmente	retr. Oocyten	Leihmütter	schwängere Leihmütter	Nachkommen	Überlebende	Transgene	exprimierende Transgene
4,5 kb	1534	54	31	84	57	12	4
5,5 kb	2948	129	45	118	73	8 + 2†	5 + 2†
20 kb	856	34	21	70	49	9	3

Tab. 3.1: Kennzahlen zur Erzeugung der transgenen Linien. Zwei der als transgen identifizierten Nachkommen, die mit dem 5,5 kb Konstrukt erzeugt wurden, überlebten zwar die Geburt, starben (†) jedoch zwei Tage nach der Geburt. Nichtsdestotrotz konnte für sie eine Transgenexpression nachgewiesen werden.

Mittels „Southern-Blot“-Analysen konnten für transgene Tiere, die mit dem 5,5 kb Konstrukt erzeugt wurden, vier Linien mit Mehrfachintegrationen identifiziert werden. Eine dieser Linien ließ sich nicht verpaaren, die drei anderen wiesen für keine der Integrationen eine Expression des Transgens auf. Die Integrationen ließen sich zwar nach Verpaarung in der F1 Generation trennen, wegen der fehlenden Expression wurden diese Sublinien jedoch nicht weiter gezüchtet und treten in den Statistiken nicht separat auf.

In der Peripherie (Milz, Leber, Niere, Herz, Darm, Lunge, Hoden, Muskel, Rückenmark) konnte bei keiner der Linien eine Expression des Transgens nachgewiesen werden.

In allen analysierten Transgen-exprimierenden Tieren, die mit den drei verschiedenen Promotorkonstrukten erhalten wurden, findet sich eine ZNS-spezifische Expression. Dies legt den Schluss nahe, dass bemerkenswerterweise den drei analysierten Promotorfragmenten die Cis-Elemente fehlen, die die Expression des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens außerhalb des ZNS im adulten Tier determinieren und/oder regulieren.

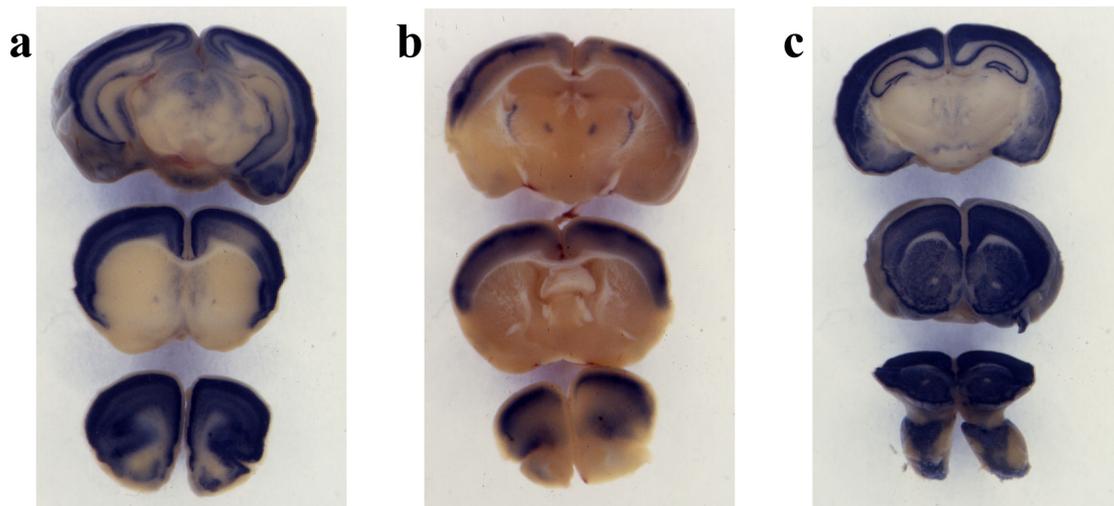


Abb. 3.10: Bilder von Bluo-Gal gefärbten Gesamtgewebepreparaten einiger adulter transgener Mäuse. Gehirne wurden fixiert, coronal geteilt, erneut fixiert und anschliessend über Nacht gefärbt. Dargestellt sind eine 4,5 kb Linie (b) und zwei 20 kb Linien (a, c).

Analysen der Transgenexpression im adulten Gehirn der transgenen Mäuse

Die Analyse der Aktivitätsverteilung der β -Galactosidase (Genprodukt des *LacZ*) wurde an 15 bis 20 μ m dicken Gefrierschnitten von Gehirnen 2 bis 4 Monate alter transgener Mäuse mit Bluo-Gal durchgeführt. In Abbildung 3.11 sind typische Expressionsmuster in Gehirnschnitten verschiedener Linien dargestellt. Eine Zusammenfassung der Expressionsdaten von Gehirnen adulter Tiere ist in Tabelle 3.2 wiedergegeben. Die Daten aus den beiden transienten Linien sowie der einen ektopisch exprimierenden Linie wurden nicht berücksichtigt. Alle analysierten Linien exprimieren *LacZ* ausschließlich in neuronalem Gewebe des ZNS. Es konnten histologisch keine Oligodendroglia, Mikroglia oder Astrozyten identifiziert werden, die das Transgen exprimieren. Die Expression findet sich durchweg in Bereichen, die als reich an 5-HT_{1A}-Rezeptoren beschrieben wurden, wie beispielsweise Hippocampus, Cortex, Septum, Amygdala und Raphe (Gross et al. 2000; Lanfumey und Hamon 2000).

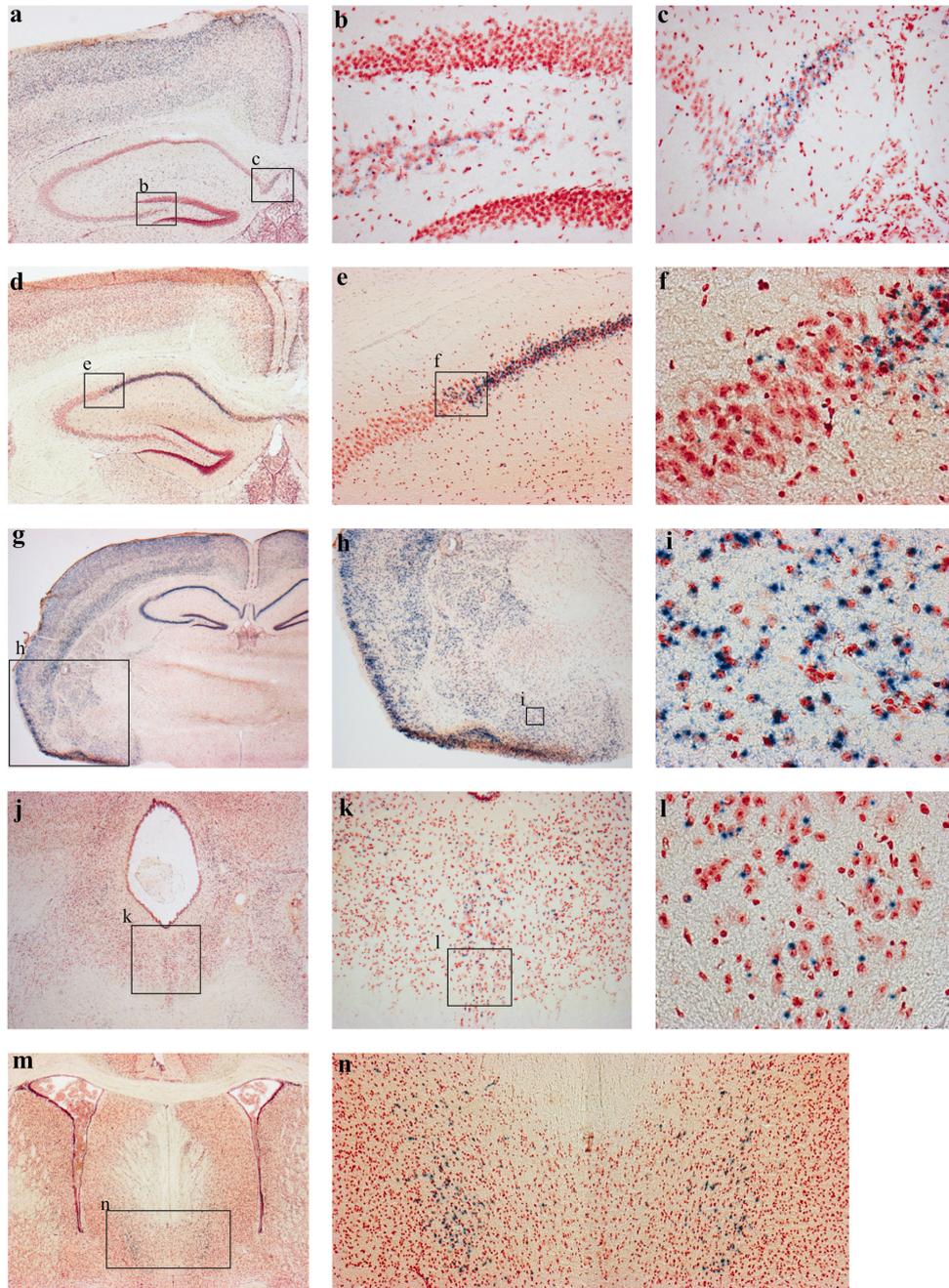


Abb. 3.11: β -Galactosidaseaktivität im Gehirn einiger adulter transgener Mäuse. Alle Schnitte dieser Abbildung sind coronal, wurden mit Neutral-Rot gegengefärbt und zeigen typische Ergebnisse, die die Grundlage für die in Tabelle 3.2 wiedergegebene Gesamtauswertung bildeten. Tiere einer 20 kb Linie exprimieren das Transgen stark im Cortex und schwach im Hippocampus (a-c). Eine stärkere Vergrößerung des Gyrus Dentatus und des Subiculum sind in b und c zu sehen. Tiere einer 5,5 kb Linie zeigen starke Transgenexpression ausschliesslich in der CA1-Region des Hippocampus (d-f). Tiere einer weiteren 20 kb Linie wiesen β -Galactosidaseaktivität in Cortex, Hippocampus und Amygdala auf (g-i). Innerhalb der Amygdala war die Transgenexpression im basolateralen Kern am niedrigsten (g,h). Tiere einer 4,5 kb Linie wiesen Transgenexpression in der Raphe (j-l) und im Septum (m, n) auf.

Gehirnregionen	4,5 kb	5,5 kb	~20kb
Cortikale Gebiete			
frontal	4/4, +++	0/4	3/3, +++++
cingulär	3/4, ++	0/4	3/3, +++++
entorhinal	3/4, ++	0/4	3/3, +++
piriform	4/4, +++	0/4	3/3, +++
parietal	3/4, ++	1/4, +	3/3, +++
ectorhinal	3/4, ++	1/4, +	3/3, +++
perirhinal	3/4, ++	1/4, +	3/3, +++
okzipital	3/4, +	3/4, +	3/3, +++
Hippocampus			
CA1	3/4, +	2/4, ++	2/3, +++
CA2	1/4, ++	2/4, (+)	2/3, ++
CA3	1/4, ++	1/4, +	2/3, +++
CA4	1/4, +++	1/4, +	1/3, ++
Gyrus Dentatus	2/4, ++	2/4, +	3/3, ++
Subiculum	2/4, ++	2/4, +	2/3, +++
dorsaler endopiriformer Nucleus	3/4, ++	0/4	1/3, +++
Corpus Striatum (dorsomedial)	3/4, ++	0/4	2/3, ++
Amygdala			
Cortex-Amygdala transition-zone	2/4, +++	0/4	2/3, ++
Amygdala-Hippocampus Feld	0/4	0/4	2/3, ++
Nucleus medialis	2/4, +++	0/4	1/3, +++
Nucleus corticalis	1/4, ++	0/4	2/3, ++
Nucleus centralis	2/4, ++	0/4	1/3, +++
Nucleus lateralis	2/4, ++	0/4	1/3, +++
Nucleus basolateralis	1/4, +	0/4	1/3, +
Nucleus basomedialis	1/4, ++	0/4	1/3, +++
Nucleus intercalatus der Amygdala	1/4, ++	0/4	1/3, +++
<i>Bed Nucleus</i> der Stria terminalis	1/4, +	0/4	1/3, +++
amygdalostriatale transition-zone	1/4, +	0/4	1/3, +++
Nucleus olfactorius anterior	3/4, +++	0/4	3/3, +++

Gehirnregionen	4,5 kb	5,5 kb	~20kb
Septum			
lateral	4/4, ++	0/4	3/3, ++
medial	2/4, +++	0/4	1/3, +++
ventrales diagonales Band (diagonal band of Broca)	2/4, +++	0/4	1/3, ++
horizontales diagonales Band	2/4, ++	0/4	1/3, ++
Nucleus präopticus	2/4, ++	0/4	0/3
Diencephalon			
Nucleus medialis habenulae	1/4, ++	1/4, +	1/3, ++
Nucleus lateralis habenulae	1/4, ++	0/4	1/3, ++
Thalamus			
mediale Nuclei (Nuclei der Mittellinie)	1/4, +	1/4, (+)	1/3, ++
intralaminäre Nuclei	1/4, +	0/4	1/3, ++
dorsale Nuclei	4/4, ++	0/4	0/3
anteriothalamische Nuclei	1/4, +++	0/4	1/3, ++
ventrale Nuclei	3/4, ++	0/4	2/3, ++
posteriothalamische Nuclei	3/4, +	0/4	2/3, ++
Nucleus parafascicularis thalami	1/4, ++	0/4	1/3, +
laterale Nuclei	3/4, +	0/4	0/3
Nucleus reticularis thalami	2/4, ++	0/4	3/3, ++
Hypothalamus			
anterior	2/4, +++	0/4	1/3, ++
posterior	1/4, +++	0/4	2/3, ++
lateral	1/4, +++	0/4	0/3
Regio praeoptica	1/4, ++	0/4	1/3, +
Hirnstamm			
rostral linear nucleus raphe	2/4, ++	0/4	0/3
dorsale Raphe	2/4, ++	0/4	1/3, ++
mediane Raphe	2/4, ++	1/4, +	2/3, +
paramedianer Raphe Nucleus	0/4	0/4	1/3, +++
Colliculus superiores	3/4, ++	0/4	3/3, ++
Colliculus inferiores	3/4, ++	0/4	1/3, +++
periaquaeductales Grau	3/4, +	3/4, +	2/3, ++
Nucleus reticularis ponti, oral	2/4, +	0/4	2/3, +
Nucleus mesencephalicus	2/4, +	0/4	2/3, ++

Tab. 3.2: Räumliche Verteilung der β -Galactosidaseaktivität im adulten Gehirn der transgenen 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor-*LacZ*-Mäuse. Die Ergebnisse aus den Analysen der vier 4,5 kb, vier 5,5 kb und drei 20 kb Linien wurden zusammengefasst: Die Expression je Konstrukt ist angegeben als Quotient aus der Anzahl der exprimierenden Linie und der Anzahl der analysierter Linien; die Expressionsstärke in den einzelnen Gebieten ist über die exprimierenden Linien eines Konstruktes gemittelt und entsprechend der Skala (+), +, ++, +++, +++++ angegeben. Gebiete in denen schwache Aktivität (~, +) nur in einer der insgesamt 11 transgenen Linien nachgewiesen werden konnte sind in der Tabelle nicht mit aufgeführt.

Zur Validierung und zum besseren Vergleich der Ergebnisse wurden in unserem Labor von Dr. Heike Kusserow und Frau Nelleke Schillings Versuche zur Bestimmung der endogenen Expression des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens in Gehirnen 2 bis 4 Monate alter NMRI Mäuse durchgeführt. Die ermittelte Verteilung der 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA (mittels *in situ* Hybridisierung) sowie der spezifischen 5-HT_{1A}-Rezeptorligandenbindungsstellen (mittels Rezeptorautoradiographie mit [3H]-8-OH-DPAT) ist in Abbildung 6.1 dargestellt.

Starke endogene Expression findet sich im Septum, im ventralen diagonalen Band, in der CA1-Region des Hippocampus und im dorsalen Raphekern. Mittlere endogene Expression findet sich in den tiefen und oberen Schichten des Cortex, im Gyrus Dentatus und der CA3-Region des Hippocampus und im Amygdala-Hippocampus Feld. Niedrige endogene Expression findet sich in der CA2-Region des Hippocampus, in den mittleren Schichten des Cortex, im *Bed Nucleus* der Stria terminalis, im periaquaeductalen Grau, im Colliculus inferiores und superiores, im Nucleus parabrachialis, im medianen Raphekern, in den Gebieten der Amygdala mit Ausnahme des basolateralen Kerns und in diversen hypothalamischen Kernen.

Im Vergleich mit der Expression des *LacZ* Reportergens in Gehirnen der transgenen Mäuse zeigt sich, dass keines der drei Konstrukte konsistent und vollständig dieses endogene Expressionsmuster rekapituliert. Die *LacZ* Expression in den 4,5 kb und 20 kb Linien spiegelt das endogene 5-HT_{1A}-Rezeptorverteilungsmuster am besten wider (in Übereinstimmung mit den Zellkulturergebnissen erstere insgesamt intensitätsschwächer als letztere), wohingegen die 5,5 kb Linien eine stark reprimierte und sehr selektive Expression des Transgens aufweisen.

Im folgenden sind einige der Tabelle 3.2 zu entnehmenden Expressionsdaten zu Vergleichszwecken näher dargestellt.

Im Hippocampus findet sich bei allen drei Konstrukten starke Expression präferenziell in der CA1-Region und im Subiculum. Der deutliche im endogenen 5-HT_{1A}-Rezeptorgens-expressionsmuster vorhandene Intensitätsabfall im Übergang von CA1 zu CA2 ist in allen bis auf einer Linie, die in CA1 exprimieren, vorhanden. Expression im Septum ist in allen exprimierenden 4,5 kb und 20 kb Linien deutlich ausgeprägt, mit Präferenz für den lateralen Kern. In den 5,5 kb Linien ist diese Expression vollständig reprimiert. Die Expression in der dorsalen Raphe der 5,5 kb Linien ist vollständig unterdrückt und in etwa 50% der 4,5 und 20 kb Linien mit mittlerer Intensität vorhanden. Die *LacZ*-Expression in der medianen Raphe, mit mittlerer Intensität und Vorkommen in Linien aller drei 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor-konstrukte, spiegelt das endogene Bild besser wider. Die Expression im Colliculus superiores und inferiores ist in den 4,5 kb und 20 kb Linien mit mittlerer Intensität ausgeprägt und in den 5,5 kb Linien nicht nachzuweisen. Im periaquaeductalen Grau exprimieren etwa 70% der Linien aller drei Konstrukte mit schwacher Intensität. In der Amygdala findet sich nur in einigen 4,5 kb und

20 kb Linien Expression mittlerer Intensität mit deutlicher Unterrepräsentanz des basolateralen Kerns. Im ventralen diagonalen Band exprimieren Tiere der 4,5 kb und 20 kb Linien, im Nucleus parabrachialis nur eine der 20 kb Linien. Cortikale Expression findet sich in allen 4,5 kb und 20 kb Linien und in drei von vier 5,5 kb Linien. Die Expression in den 4,5 kb und 20 kb Linien erstreckt sich über weite Teile des Cortex mit schwacher Intensität in mittleren und hoher Intensität in oberen und tieferen Schichten und stärkster Intensität im frontalen Cortex. Die 5,5 kb Linie zeigt hingegen eine sehr selektive und schwache Expression in Bereichen des parietalen, ectorhinalen, perirhinalen und okzipitalen Cortex. Ein Bereich des Thalamus, in dem keine endogene 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression nachzuweisen ist, ist der Nucleus geniculatus medialis. Hier findet sich schwache *LacZ*-Expression in Tieren der 4,5 kb Linien.

Insgesamt scheint das 4,5 kb Fragment bereits die entscheidenden Promotorelemente zu beinhalten, die die räumliche Verteilung der 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression im ZNS festlegen. Positionseffekte haben jedoch einen starken Einfluss auf die Expression und führen zu einer inkonsistenten variablen Expression. Es kommt zu Expressionsmustern, die nur einen Teil des endogenen 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpressionsspektrums widerspiegeln und in einzelnen Fällen auch zu einer Expression in Gebieten ohne endogener 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression. Dies ist im Prinzip auch noch bei dem 20 kb Fragment der Fall, wobei die Konsistenz zunimmt bzw. die Variabilität abnimmt und die Expression im Thalamus spezifischer ist. Betrachtet man die Expressionsintensitäten der einzelnen Linien, so erkennt man starke Repression, die durch den Promotorbereich zwischen -4,5 kb und -5,5 kb vermittelt wird und eine (Re-) Aktivierung, die durch DNA Sequenzbereiche zwischen -5,5 kb und -20 kb vermittelt werden.

Kolokalisationsstudien zur Analyse der Transgenexpression im ZNS auf zellulärer Ebene

Zur genaueren Bestimmung der Zelltypen, die das *LacZ* Gen unter der Kontrolle der drei verschiedenen 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotorfragmente exprimieren, wurden an Gefrierschnitten von Gehirnen 2 bis 4 Monate alter transgener Mäuse Kolokalisationsstudien durchgeführt. Die Transgenexpression wurde hierbei mit der endogenen Expression des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens verglichen. Da das *LacZ* Gen in den verwendeten Konstrukten kein Signalsequenz für Kernlokalisierung enthält und sich die β -Galactosidase somit vorwiegend im Soma der Transgen-exprimierenden Zellen befindet, wurde als Nachweis der 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression die Detektion der entsprechenden mRNA, die sich ebenfalls vorwiegend im Soma der 5-HT_{1A}-Rezeptorgen-exprimierenden Zellen befindet, mittels nicht-radioaktiver *in situ* Hybridisierung (nrISH) gewählt. Als Sonde wurde für diese Reaktion ein durchgängig mit Digoxigenin markiertes „antisense“ RNA-Fragment verwendet, welches über *in vitro* Transkription aus einem AvrII Fragment, das die gesamte kodierende Region des 5-HT_{1A}-

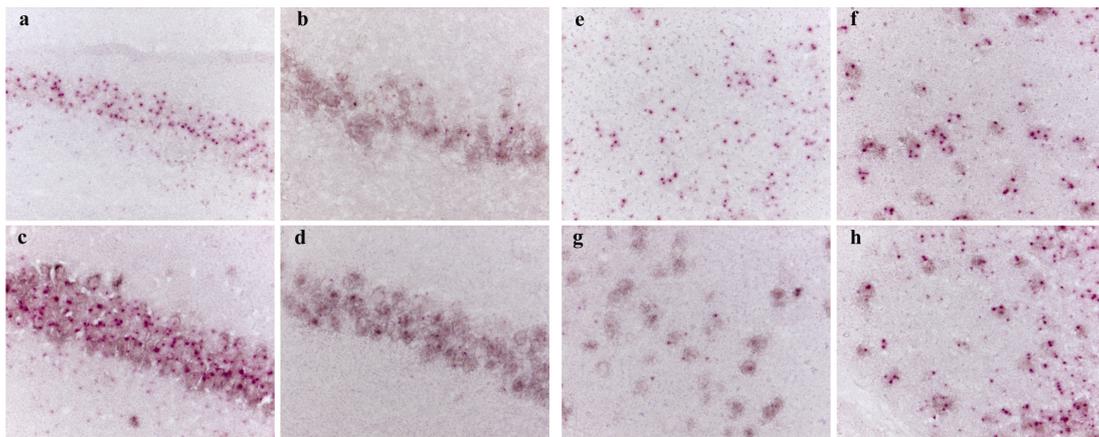


Abb. 3.12: Kolokalisation von β -Galactosidaseaktivität und 5-HT_{1A}-Rezeptortranskripten in adulten Gehirnen transgener 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor-*LacZ*-Mäuse. Doppelfärbungen transgener Mausgehirne wurden an Gefrierschnitten mit Salmon-Gal zum Nachweis der β -Galactosidaseaktivität (rosa Färbung) und nrISH zum Nachweis der 5-HT_{1A}-Rezeptortranskripte (lila Färbung) durchgeführt. Dargestellt sind Ergebnisse der CA1-Region des Hippocampus (a-d) und der oberen Schichten des piriformen Cortex (e-h) von Mäusen, die mit dem 4,5 kb Konstrukt (d, g), dem 5,5 kb Konstrukt (b) und dem 20 kb Konstrukt (a, c, e, f, h) generiert wurden. Die nrISH wurde mit einer 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA spezifischen „antisense“ Ribonucleinsäuresonde (b-d, f-h) und einer „sense“ Ribonucleinsäuresonde (a, e) als Negativ-Kontrolle durchgeführt.

Rezeptorgens beinhaltet, hergestellt wurde. Die Negativ-Kontrolle der nrISH wurde mit einem entsprechenden „sense“ RNA-Fragment durchgeführt. Der Nachweis der β -Galactosidaseaktivität erfolgte hier über die enzymatische Umsetzung des Substrates *Salmon-Gal*, welches einen rosaroten Niederschlag bildet und in den doppelt gefärbten Gefrierschnitten einen höheren Kontrast gegenüber dem lilafarbenen Niederschlag aus der nrISH aufweist.

Es wurden eine 4,5 kb Linie (B57), eine 5,5 kb Linie (7) und zwei 20 kb Linien (A2320 und A2379) untersucht. Für alle dieser Linien wurde Kolokalisation von β -Galactosidaseaktivität und 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA gefunden. In der Negativ-Kontrolle für die nrISH Reaktion wurde kein entsprechendes Signal detektiert. Beispielhafte Bilder sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Eine zusammengefasste Darstellung der Ergebnisse ist in Abbildung 3.13 dargestellt.

Im Detail lassen sich zwei Parameter weiter differenzieren: zum einen die Rate der Kolokalisation bezogen auf die β -Galactosidase-positiven Zellen (K_{β}), zum anderen die Rate der Kolokalisation bezogen auf die 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA-positiven Zellen (K_{1A}). Es wurden die unter Tabelle 3.2 aufgeführten Regionen untersucht, in denen die jeweilige transgene Linie *LacZ*-Expression bzw. β -Galactosidaseaktivität aufwies. Für das 4,5 kb Konstrukt liegt K_{1A} bei 10% bis 30%, d. h. 10% bis 30% der 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA-positiven Zellen in Gebieten mit *LacZ*-Expression sind auch positiv für β -Galactosidase. Vier Bereiche fallen aus diesem Rahmen heraus; in den striatalen Bereichen liegt K_{1A} bei 50% bis 95%, im medialen und zentralen Kern der Amygdala liegt K_{1A} bei 50% und in der Regio praeoptica des Hypothalamus liegt K_{1A} bei

50%. In der Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus liegt K_{1A} bei unter 5%. K_{β} liegt für das 4,5 kb Konstrukt bei 80% bis 100%, d.h. 80% bis 100% der β -Galactosidase-positiven Zellen sind auch positiv für 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA oder anders, 0% bis 20% der β -Galactosidase-positiven Zellen exprimieren den 5-HT_{1A}-Rezeptor in den untersuchten Gehirnen nicht. Eine Ausnahme bildet die dorsale Raphe, hier liegt K_{β} bei 60%. Für das 5,5 kb Konstrukt liegt K_{1A} bei 15% und K_{β} bei 90% bis 100%. Für das 20 kb Konstrukt liegt K_{1A} bei 90% bis 100%. Ausnahmen fanden sich in Linie A2320 im Bereich der polymorphen Schicht des Gyrus Dentatus ($K_{1A} = 30\%$), im periaquaeductalen Grau ($K_{1A} = 20\%$ bis 90%), in der medianen Raphe ($K_{1A} = 10\%$) und im Nucleus magnus der Raphe ($K_{1A} = 80\%$). K_{β} lag für A2320 zwischen 90% und 100% und für A2379 zwischen 80% und 100%. Ausnahmen bildeten hier für A2320 die mediane Raphe ($K_{\beta} = 50\%$) und der Nucleus magnus der Raphe ($K_{\beta} = 75\%$) und für A2379 das Stratum Radiatum des Hippocampus ($K_{\beta} = 20\%$).

Insgesamt wird aus diesen Ergebnissen ersichtlich, dass das 4,5 kb Konstrukt und das 5,5 kb Konstrukt in den 5-HT_{1A}-Rezeptorgen-exprimierenden Bereichen des Gehirns der Maus nur in einem Teil der endogen 5-HT_{1A}-Rezeptorgen-exprimierenden Zellen die Expression des Transgens ermöglichen. Das 20 kb Konstrukt hingegen führt zu einer Transgenexpression in fast allen 5-HT_{1A}-Rezeptorgen-exprimierenden Zellen des ZNS.

Konstrukt	Kolokalisation	K_{1A}	K_{β}
4.5 kb (1 Linie)	generell	10-30%	80-100%
	Ausnahmen	CpU: 50-95%, MeA & CeA: 50%, PA: 50%, GrDG: 50%	DR: 60%
5.5 kb (1 Linie)	generell	10-20%	90-100%
	Ausnahmen	-	-
20 kb (2 Linien)	generell	90-100%	85-100%
	Ausnahmen Linie 1	DG: 30%, PAG: 20-90%, MR: 10%, RMg: 80%	MR: 50%, RMg: 75%
	Ausnahmen Linie 2	-	Rad: 20%

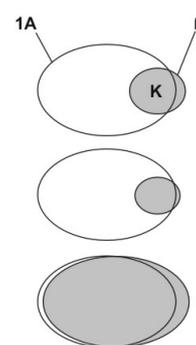


Abb. 3.13: Analyse der Kolokalisationsraten der β -Galactosidaseaktivität und der 5-HT_{1A}-Rezeptortranskripte in adulten Gehirnen transgener 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor-*LacZ*-Mäuse. Es wurden eine 4,5 kb Linie, eine 5,5 kb Linie und zwei 20 kb Linien analysiert. Die Anzahl an Zellen positiv für β -Galactosidaseaktivität (β), positiv für 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA (1A) und positiv für beides (K) wurde ermittelt. Gebiete die negativ für β -Galactosidaseaktivität waren wurden nicht analysiert. Aus den ermittelten Daten wurden die dargestellten prozentualen Werte berechnet: $K_{1A} = K/1A$, $K_{\beta} = K/\beta$. Die Abbildungen auf der rechten Seite geben schematisch die Größe der ermittelten Mengen (1A, β und K) wieder, die für die drei Konstrukte im allgemeinen gefunden wurden. Abkürzungen: CpU: striatale Gebiete, MeA: Nucleus medialis der Amygdala, CeA: Nucleus centralis der Amygdala, PA: präoptisches Gebiet des Hypothalamus, GrDG: Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus, DR: dorsale Raphe, PoDG: polymorphe Schicht des Gyrus Dentatus, PAG: periaquaeductales Grau, MR: mediane Raphe, RMg: Nucleus magnus der Raphe, Rad: Stratum Radiatum des Hippocampus.

Analyse der *LacZ*-Expression im Embryo und während der frühen postnatalen Entwicklung

Bislang liegen relativ wenig Daten zur Expression des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens im Embryo vor (siehe Diskussion). Dies gilt vor allem für Daten aus der Maus. Um festzustellen, wann die 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression in den von uns verwendeten Mäusen des NMRI-Auszuchtstamms einsetzt, wurden von Dr. Heike Kusserow RT-PCR-Analysen mit dem Primerpaar 1A.f/1A.r durchgeführt. Eine schwache Expression ließ sich an Tag E12,5 nachweisen, starke Expression fand sich ab Tag E13,5 (persönliche Mitteilung von Dr. Heike Kusserow).

Zur Analyse der *LacZ*-Expression in verschiedenen pränatalen Entwicklungsstadien der transgenen Tiere wurden je Konstrukt drei exprimierende Linien ausgewählt und heterozygote sowie Wildtyp-Embryonen der Altersstufen E12,5, E14,5 und E18,5 entnommen. Es wurden Analysen an Gesamtgewebepreparaten, Kryoschnitten und Paraffinschnitten durchgeführt. In einzelnen Fällen wurde dieses Schema auf zusätzliche embryonale Entwicklungsstadien bzw. transgene Linien erweitert. Beispielhafte Bilder sind in Abbildung 3.14 dargestellt. Eine Zusammenfassung dieser Analyseergebnisse ist in Tabelle 3.3 wiedergegeben.

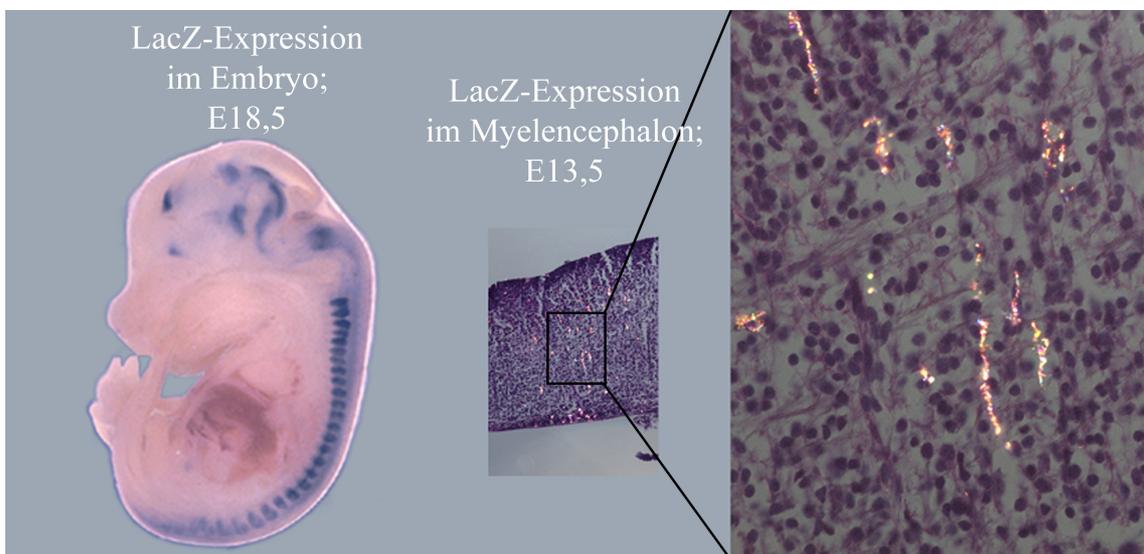


Abb. 3.14: Beispielhafte Ergebnisse der Analyse der Transgenexpression in 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor-*LacZ*-Mausembryonen. Links: Gesamtgewebepreparat eines transgenen Embryos einer 4,5 kb Linie 18,5 Tage nach der Befruchtung. Mitte: Hämatoxylin/Eosin gegengefärbter Paraffinschnitt des Myelencephalons eines transgenen Embryos einer 4,5 kb Linie 13,5 Tage nach der Befruchtung. Die Visualisierung der präzipitierten Bluo-Gal-Umsatzprodukte (gelbliches Leuchten) erfolgte unter polarisiertem Licht. Rechts: Vergrößerter Bereich aus dem mittleren Bild.

LacZ Expression in Embryonen											
E	Region	B1	B7	B18	B57	7	37	57	A2311	A2320	A2379
10,5	ZNS		n.d.	n.d.		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
12,5	ZNS	+									++
14,5	ZNS	+++			+						+++
18,5	ZNS	+++	n.d.		+				+	++	+++
10,5	Medulla oblongata		n.d.	n.d.		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
12,5	Medulla oblongata			+							++
14,5	Medulla oblongata	+		+							++
18,5	Medulla oblongata	+	n.d.	+	+					+	+++
10,5	craniales Ganglion		n.d.	n.d.		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
12,5	craniales Ganglion										
14,5	craniales Ganglion				+						
18,5	craniales Ganglion		n.d.		+						
10,5	dorsale Wurzelganglien		n.d.	n.d.		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
12,5	dorsale Wurzelganglien										
14,5	dorsale Wurzelganglien				++						
18,5	dorsale Wurzelganglien		n.d.		++						

Tab. 3.3: Räumliche Verteilung der β -Galactosidaseaktivität in transgenen 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor-*LacZ*-Mausembryonen. Es wurden vier 4,5 kb (B1, B7, B18, B57), drei 5,5 kb (7, 37, 57) und drei 20 kbLinien (A2311, A2320, A2379) untersucht. Vier Expressionsgebiete (Regionen) wurden unterteilt: ZNS, Medulla oblongata, craniales Ganglion und dorsale Wurzelganglien. Die Expressionsstärke in den einzelnen Gebieten ist entsprechend der Skala +, ++, +++ angegeben. Falls keine Expression gefunden wurde ist das entsprechende Feld leer. Nicht durchgeführte Analysen sind mit n.d. gekennzeichnet.

Expression wurde vorwiegend im Gehirn und Rückenmark gefunden. In den Linien B1, B57 und A2379 setzte zwischen E12,5 und E14,5 β -Galactosidaseaktivität in Gebieten der sich entwickelnden Raphekerne ein. Diese drei Linien sind auch die einzigen Linien, bei denen sich im adulten Gehirn Transgenexpression in der dorsalen Raphe nachweisen ließ. Transgenexpression im Vorderhirn war mit einer Ausnahme (A2379) erst ab Tag 18,5 zu erkennen. Eine Linie des 4,5 kb Konstrukts zeigte Transgenexpression in den dorsalen Wurzelganglien und im cranialen Ganglion. Ferner wurde β -Galactosidaseaktivität in Bereichen der Zahnanlagen sowie des craniofacialen Mesenchyms gefunden. Diesen Befunden wurde jedoch nicht weiter systematisch nachgegangen.

Zur weiteren Analyse der *LacZ*-Expression im sich entwickelnden ZNS wurden Gehirne heterozygoter transgener Tiere der frühen postnatalen Entwicklung untersucht (P1,5, P7,5 und P14,5). Hierfür wurden je Konstrukt zwei transgene Linien ausgewählt, die im adulten Tier einen großen Teil des Konstrukt-vermittelten Expressionsspektrums abdecken. Die Analyse fand an Kryoschnitten einer Dicke von 10 μ M statt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Generell ließ sich beobachten, dass Linien, die im adulten Stadium eine starke Transgenexpression aufweisen, im frühen postnatalen Stadium eher detektierbare Mengen an β -Galactosidase bilden, als Linien die im adulten Stadium das Transgen nur schwach exprimieren. Im Verlauf der postnatalen Entwicklung steigt die Stärke der Expression im allgemeinen in allen exprimierenden Gebieten gleichmäßig an.

Interessanterweise konnte in den Raphegebieten zum Zeitpunkt P1,5 in keiner der analysierten Linien Transgenexpression nachgewiesen werden. Linie B57 wies jedoch zu den Zeitpunkten E 12,5, E14,5 und E18,5 Transgenexpression in den Raphegebieten auf. Auch im adulten Gehirn findet sich β -Galactosidaseaktivität sowohl in der dorsalen als auch in der medianen Raphe. Das heißt, dass die Transgenexpression im Gebiet der Raphe um P1,5 zumindest in Linie B57 stark reprimiert wird. Ein weiterer auffälliger Befund ist die zeitlich frühere Aktivierung der Transgenexpression im rostralen Bereich des Hippocampus (P1,5) im Vergleich zum ventralen Bereich (P7,5).

Eine schematische Darstellung des allgemeinen Verlaufs der Transgenexpressionsstärke in Bereichen des Vorderhirns und der Raphe ist in Abbildung 3.15 wiedergegeben.

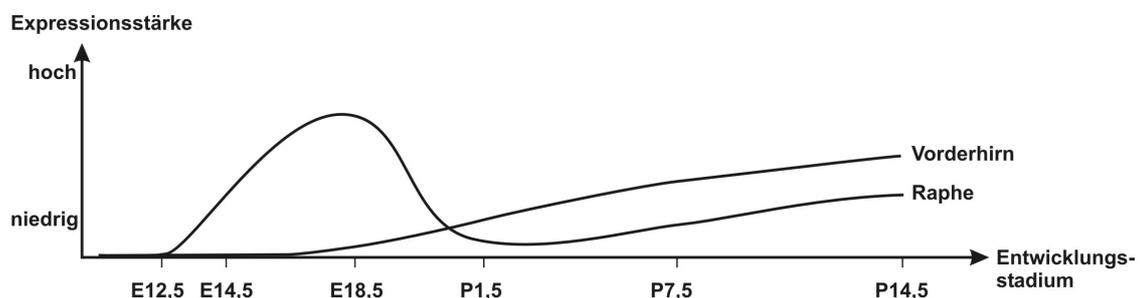


Abb. 3.15: Zeitlicher Verlauf der Transgenexpression während der pränatalen und frühen postnatalen Entwicklung in transgenen 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor-*LacZ*-Mäusen. Schematische Darstellung der Expressionsstärke des Transgens im Vorderhirn und in Gebieten der Raphe in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der analysierten transgenen Tiere.

LacZ Expression in der frühen postnatalen Entwicklung							
P	Gehirnregion	B7	B57	7	37	A2311	A2320
P1.5	CA1		++ (r)	(+)			++ (r)
P7.5	CA1		++	(+)			+++
P14.5	CA1		++	+	(+)		++
P1.5	CA2						++ (r)
P7.5	CA2						+++
P14.5	CA2						++
P1.5	CA3						++ (r)
P7.5	CA3			(+)			+++
P14.5	CA3		++	+	(+)		++
P1.5	Gyrus Dentatus						
P7.5	Gyrus Dentatus			(+)			+++
P14.5	Gyrus Dentatus		++	(+)			+++
P1.5	Amygdala						
P7.5	Amygdala					+	
P14.5	Amygdala					+	
P1.5	Cortex						++
P7.5	Cortex		++				+++
P14.5	Cortex	(+)	++			+	+++
P1.5	Septum		++				
P7.5	Septum		++				
P14.5	Septum		+++				
P1.5	Striatum		++				
P7.5	Striatum		++				
P14.5	Striatum		+++				
P1.5	Thalamus	(+)	+++				
P7.5	Thalamus	(+)	++				
P14.5	Thalamus	+	++			(+)	
P1.5	Hypothalamus						++
P7.5	Hypothalamus					+	++
P14.5	Hypothalamus						++
P1.5	d Raphe						
P7.5	d Raphe		(+)				
P14.5	d Raphe		+				
P1.5	m Raphe						
P7.5	m Raphe		(+)				+
P14.5	m Raphe		+	(+)			+

Tab. 3.4: Räumliche Verteilung der β -Galactosidaseaktivität im Gehirn transgener 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor-*LacZ*-Mäuse während der frühen postnatalen Entwicklung. Es wurden zwei 4,5 kb (B7, B57), zwei 5,5 kb (7, 37) und zwei 20 kbLinien (A2311, A2320) untersucht. Die Expressionsstärke in den einzelnen Gebieten ist entsprechend der Skala (+), +, ++, +++ angegeben. Falls keine Expression gefunden wurde ist das entsprechende Feld leer. In Regionen des Hippocampus fand sich teilweise Expression ausschliesslich im rostralen (r) Bereich.

3.2 5-HT₇-Rezeptor

3.2.1 Klonierung und Kartierung des genomischen Locus des 5-HT₇-Rezeptorgens

Zur molekularen Analyse des 5-HT₇-Rezeptorgens sowie seiner 5'-flankierenden Region wurde zunächst über PCR ein 559 bp langes Fragment aus genomischer DNA der Maus (C57bl/6) amplifiziert, subkloniert und sequenziert. Die Sequenz zur Wahl der Primer stammt aus der Genbank (accession: Z23107), die Primer liegen in Exon1 (Spl2.f/Spl1.r). Die ermittelte Sequenz stimmte mit der Genbank-Sequenz überein. Mit diesem klonierten Fragment wurde eine genomische PAC Bank der Maus (Resourcencenter: RPCI21 Mouse PAC) nach Klonen, die das Exon 1 des 5-HT₇-Rezeptorgens beinhalten, durchmustert. Es wurden 33 positive Klone identifiziert. Mittels einer zweiten PCR wurde untersucht, welche dieser Klone den 3' Bereich des 5-HT₇-Rezeptorgens beinhalten. Die Sequenz zur Wahl der Primer war dieselbe, wie bei der ersten Durchmusterung, die Primer liegen in Exon 3 (7-3'.fwd/7-3'.rwd). Vier der 33 Klone waren auch in diesem zweiten Screen positiv. Mittels „Southern-Blot“-Analysen wurden diese vier Klone auf ihre genomische Organisation hin untersucht. Es wurden diverse Subklone hergestellt und doppelsträngig sequenziert (siehe 6.2). Die ermittelten Sequenzdaten umfassen einen Bereich von 7478 bp: 5337 bp 5'-flankierende Region, das 549 bp lange Exon1 und 1592 bp des Intron 1. Eine schematische Darstellung dieser Ergebnisse ist in Abbildung 3.16 dargestellt. Zum Vergleich ist in dieser Abbildung auch die genomische Organisation des humanen 5-HT₇-Rezeptorgens wiedergegeben, die mittels der von Heidmann und Mitarbeitern (1997) veröffentlichten Daten sowie neuerer Daten aus der Sequenzierung des humanen Genoms zusammengestellt wurde.

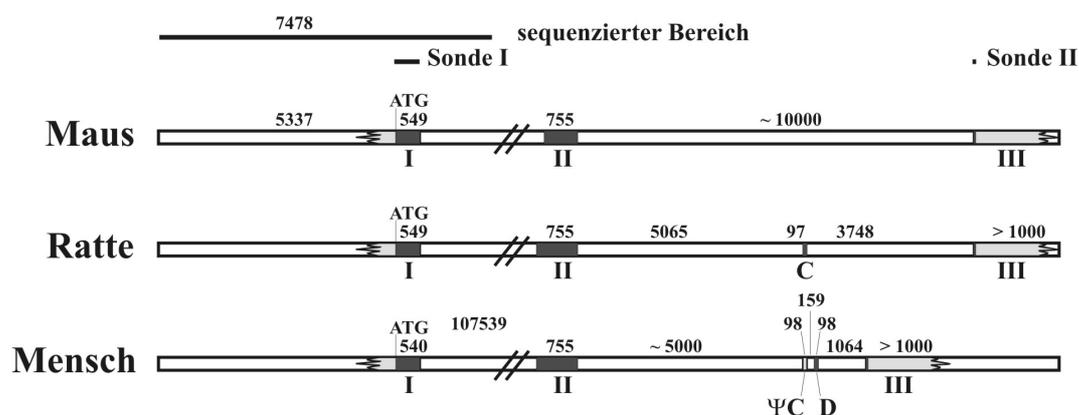


Abb. 3.16: Genomische Organisation des 5-HT₇-Rezeptorgens. Exons sind mit römischen Ziffern (I, II und III) sowie den Buchstaben C, Ψ C und D gekennzeichnet. Zahlen kennzeichnen die Länge der DNA-Abschnitte in bp. Die Länge des Bereiches zwischen Exon II und III in der Maus wurde mittels PCR mit den Primern Spl1.rrc/Spl2.r ermittelt. Sonde I und Sonde II dienen der Durchmusterung der PAC Bank. Daten für die Ratte und den Menschen stammen aus Heidmann et al. (1997) sowie aus öffentlichen Datenbanken.

3.2.2 Sequenzanalyse des Promotorbereichs des 5-HT₇-Rezeptorgens

Es wurde eine computergestützte Sequenzanalyse des gesamten sequenzierten 7478 bp langen Bereiches des murinen 5-HT₇-Rezeptorgens durchgeführt. Eine Zusammenfassung dieser im folgenden dargestellten Ergebnisse ist in Abbildung 3.17 wiedergegeben

Die kodierende Region des Exon 1 weist zu der veröffentlichten cDNA Sequenz der Maus (house mouse, accession: Z23107) eine Homologie mit 99,63% identischen Basen, zu der cDNA Sequenz der Ratte (Wistar rat, accession: X69663) eine Homologie mit 96,53% identischen Basen und zu der genomischen Sequenz des Menschen (accession: NT_008769.6) eine Homologie mit 91,04% identischen Basen auf. Bei den zwei Basenvariationen, die im Vergleich zu der veröffentlichten Mausequenz auftreten, handelt es sich entweder um frühere Sequenzierungsfehler oder um SNPs. Sie führen zu zwei Veränderungen in der Aminosäuresequenz des murinen 5-HT₇-Rezeptors: N113K und V114L. Beide Aminosäurereste befinden sich in der ersten intrazellulären Schleife des 5-HT₇-Rezeptors. In der Sequenz der Ratte, des Meerschweinchens sowie des Menschen befindet sich an den jeweils homologen Positionen ebenfalls ein Lysin- bzw. ein Leucin-Rest. Die 90 bp lange proximale 5'-untranslatierte Sequenz der Maus (house mouse, accession: Z23107) ist ab Base 23 zu 100% mit der ermittelten Sequenz identisch (die ersten 22 Basenpaare scheinen Klonierungsartefakte zu sein). Die 300 bp lange proximale 5'-untranslatierte Sequenz der Ratte weist eine Homologie mit 96% identischen Basen (12 Basenvariationen) auf.

Im Zuge der Sequenzierung des humanen Genoms ist mittlerweile der gesamte 5' Bereich des 5-HT₇-Rezeptorgens veröffentlicht worden (accession: NT_008769). Mit den gängigen Programmen zur Homologieanalyse mehrerer Sequenzen (Multalin, MSA, LALIGN; „default“ Einstellungen) lässt sich der Bereich bis -3375 bp konsistent mit der humanen Sequenz homolog anreihen. Innerhalb dieses Bereiches gibt es 4 Abschnitte mit relativ hoher Homologie, die von drei Abschnitten niedriger Homologie durchbrochen werden. Der Bereich von -3375 bp bis -2677 bp enthält 70,5% identische Basen, der Bereich von -2454 bp bis -1937 bp enthält 64,4% identische Basen, der Bereich von -1361 bp bis -624 bp enthält 63% identische Basen und der Bereich von -486 bp bis -1 bp enthält 75,9% identische Basen.

Der proximale Promotorbereich des 5-HT₇-Rezeptorgens ist G/C reich. Die ersten 550 Basen des murinen Promotors weisen einen G/C Anteil von 81,5% auf (durchschnittlich liegt der G/C Gehalt im Vertebratengenom bei 47%). In diesem Bereich finden sich mehrere putative Bindungsstellen für SP1, eine CTF/NF1 und eine MAZ1 sowie unter anderem eine NGF1A/NGF1C/WT1-, eine IF1-, eine GCF-, eine NF-κB-, eine NF-GMa- und drei AP-2-Bindungsstellen. Diese Bindungsstellen sind sowohl in Ratte (falls im Bereich der proximalen 300 bp gelegen) als auch im Menschen konserviert (eine Basenvariation erlaubt).

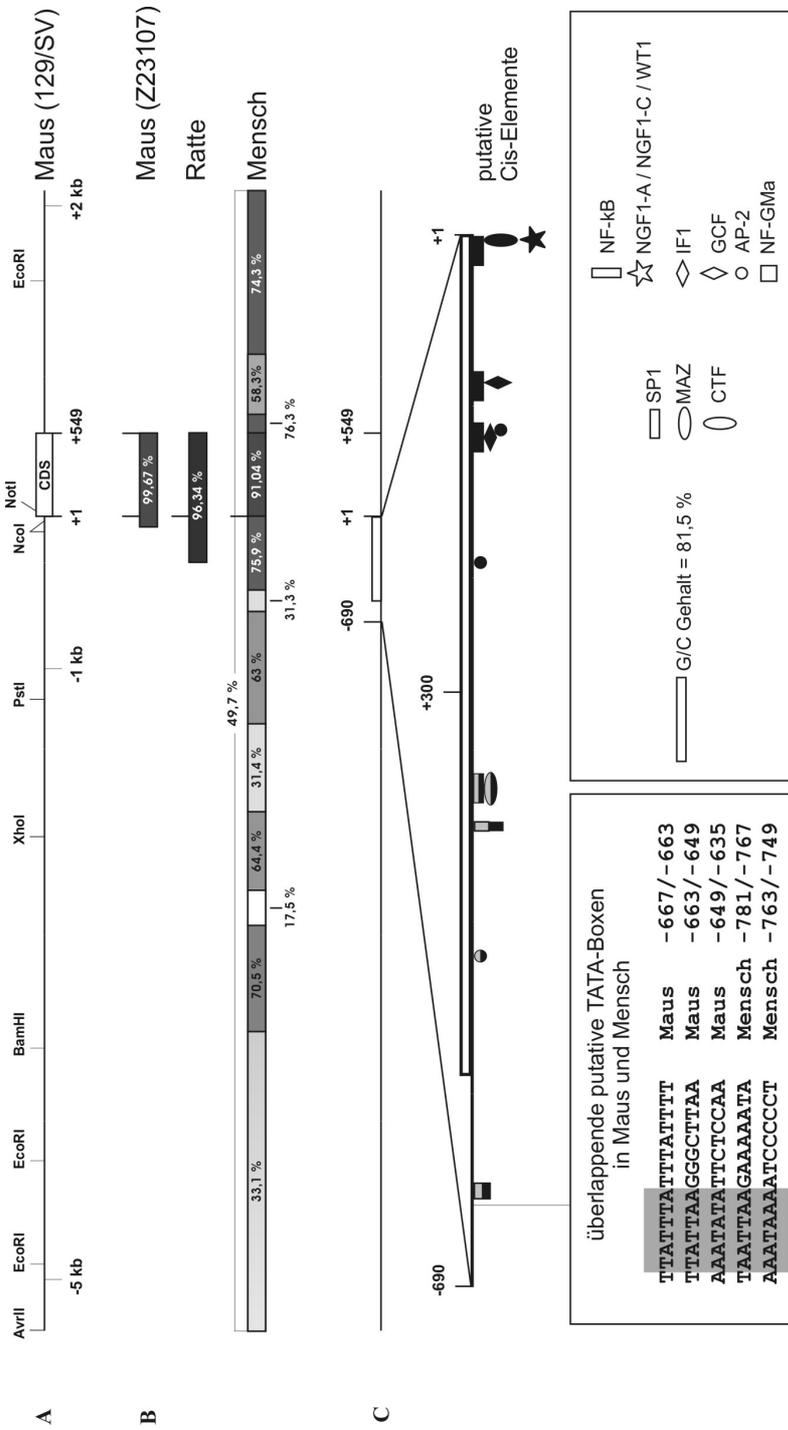


Abb. 3.17: Sequenzanalyse des 5-HT₇-Rezeptorgen Promotors. A: Schematische Darstellung der kartierten und sequenzierten Promotorregion (Linie) sowie der kodierenden Region des Exon I des 5-HT₇-Rezeptorgens (Box); Restriktionsendonukleaschnittstellen, die zur Generierung der 5-HT₇-Rezeptorgen Promotor-*LacZ*-Konstrukte und anderer Subklone verwendet wurden, sind wiedergegeben. Homologien zwischen der ermittelten Promotorsequenz (Maus, 129/Sv) und den publizierten Sequenzen von Maus, Ratte und Mensch; die Untersuchungen wurden mit frei verfügbarer Software durchgeführt (Multalin, MSA, LALIGN); die Analysen wurden unter den jeweiligen Grundeinstellungen der verschiedenen Programme durchgeführt; die dargestellten prozentualen Angaben der Homologien wurden auf ganze Zahlen gerundet; Graustufen indizieren den Homologegrad. C: Schematische Darstellung der Organisation putativer Cis-Elemente (Symbole, Legende) sowie des G/C-reichen Bereichs (offene Box, Legende) und der identifizierten TATA-Boxen im 5-HT₇-Rezeptorgen Promotor; zur Identifikation der putativen Cis-Elemente wurde TESS-Combined Search verwendet; Voll schwarz gefüllte Symbole geben die Konservierung der putativen Cis-Elemente in Ratte und Menschen wieder. Schwarz-graue Füllung gibt die Konservierung der putativen Cis-Elemente in Menschen wieder, für die vergleichende Analyse in der Ratte stand keine Sequenzinformation zur Verfügung. Zur Analyse der Konservierung der dargestellten Cis-Elemente wurden TESS-Transfac Matrix Einträge sowie Daten aus den Originalpublikationen verwendet (siehe Text). Im linken Fenster sind die Sequenzen der drei TATA-Boxen der Maus sowie der zwei TATA-Boxen des Menschen wiedergegeben. Grau unterlegt ist das Kernelement der jeweiligen TATA-Boxen.

Beim Vergleich der ermittelten murinen Sequenz mit der Sequenz-Matrix für zelluläre und virale TATA-Box-Elemente (TBP-Bindungsstellen) der TESS Datenbank (accession: M00252), die aus den Sequenzen von 502 Promotorregionen der „Eucaryotic Promoter Database“ (EPD) ermittelt wurde, finden sich drei putative TATA-Box-Elemente an den Positionen -635 bp/-649 bp, -649 bp/-663 bp und -663 bp/-667 bp. Im humanen Genom finden sich zwei dieser drei putativen TATA-Box-Elemente an Position -749 bp/-763 bp und -767 bp/-781 bp. Eine schematische Darstellung der proximalen Promotorregion des 5-HT₇-Rezeptorgens inklusive der putativen Cis-Elemente sowie ein Sequenzvergleich der putativen TATA-Box-Elemente ist in Abbildung 3.17C dargestellt.

3.2.3 Analyse der Transkriptionsstartpunkte des 5-HT₇-Rezeptorgens

Zur Identifikation von Transkriptionsstartpunkten wurde RNA aus Gehirnen der Maus mittels RT-PCR-Versuchen und Primerextension-Versuchen analysiert. Die RT-PCR-Versuche wurden mit einem 3'-„antisense“ Primer, der den Bereich der Translationsinitiationsstelle beinhaltet, und unterschiedlich weit entfernten 5'-„sense“ Primern durchgeführt (Abb. 3.18). Es konnte nur mit P3 ein PCR-Produkt erhalten werden (Abb. 3.19). Als Kontrolle wurde die PCR-Reaktion auf RNA ohne vorherige RT-Reaktion durchgeführt. Das Fehlen eines PCR-Produktes in dieser Kontrollreaktion weist darauf hin, dass die erhaltenen PCR-Produkte aus einer Amplifikation von 5-HT₇-Rezeptor cDNA resultieren und nicht auf eine Kontamination mit genomischer DNA

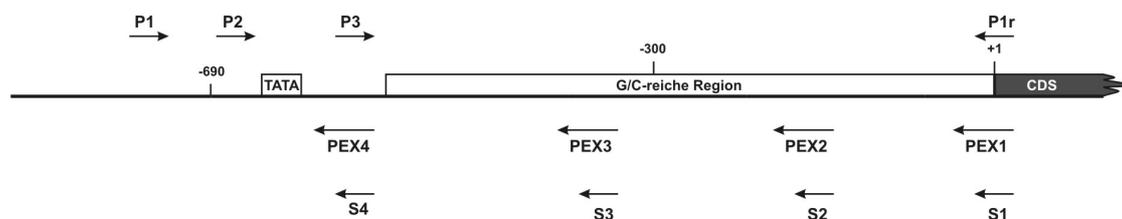


Abb. 3.18: Positionen der Primer zur Analyse der Transkriptionsstartpunkte im Promotor des 5-HT₇-Rezeptorgens. Die Primer P1, P2, P3 und P1r wurden für RT-PCR-Versuche eingesetzt. Die Primer PEX1, PEX2, PEX3 und PEX4 wurden in den Primerextensionversuchen verwendet. Mit den Primern S1, S2, S3 und S4 wurden Sequenzreaktionen durchgeführt.

zurückzuführen sind. Das PCR-Produkt hat die anhand der Sequenzinformationen vorhersagbare Größe von 586 bp und läuft im Gel auf der gleichen Höhe wie die PCR-Produkte aus den Kontrollversuchen mit genomischer DNA und Plasmid DNA eines Klons, der den 1,1 kb langen proximalen Promotorbereich des 5-HT₇-Rezeptorgens trägt. Anhand dieser Versuche konnte der Bereich des am weitesten 5' liegenden Transkriptionsstarts für Transkripte, die den bislang

einzigem nachgewiesenen Translationsstartpunkt des 5-HT₇-Rezeptorgens beinhalten, auf den Sequenzabschnitt zwischen -723 bp und -565 bp eingeeignet werden.

Zur genaueren Bestimmung dieses Transkriptionsstartpunktes sowie zur Identifikation möglicher weiterer in Richtung des Translationsstartpunktes liegender Transkriptionsstartpunkte wurden Primerextension-Versuche durchgeführt. Beispielhafte Ergebnisse sind in Abbildung 3.20 wiedergegeben. Wie in Abbildung 3.18 dargestellt, wurden für diese Versuche vier verschiedene Primer verwendet. Mit Primer PEX 1 wurden mehrere Transkriptionsstartpunkte innerhalb der proximalen GC-reichen Promotorregion des 5-HT₇-Rezeptorgens identifiziert, wobei das Cytosin an Position -89 bp das stärkste Signal lieferte. Der Transkriptionsstartpunkt an Position -124 bp wird von einer Initiator-Consensus-Sequenz umgeben. Mit PEX 2 und PEX 3 konnten keine weiteren Transkriptionsstartpunkte identifiziert werden. Mit PEX 4 wurde eine weitere Transkriptionsinitiationsstelle identifiziert. Sie liegt in dem im Rahmen der RT-PCR-Versuche ermittelten Bereich an Position -627 bp bis -630 bp. Aus der Auswertung mehrerer Wiederholungen der Primerextension-Reaktion mit PEX 4 wurde ersichtlich, dass die Hauptinitiationsstelle der Transkription in diesem Bereich des 5-HT₇-Rezeptorgens Promotors das Thymin an Position -627 bp ist. Dieses Thymin liegt 21, 35 bzw. 49 Basenpaare stromabwärts der drei putativen TATA-Boxen (s. Abb. 3.21).

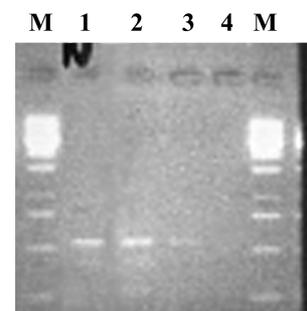


Abb. 3.19: Identifikation von 5-HT₇-Rezeptorgen-transkripten mit einer 5'-untranslatierten Region von mindestens 565 bp. RT-PCR mit den Primern P3/P1r wurde auf Gesamtgehirn-RNA der Maus (1) und als Positiv-Kontrolle auf genomischer DNA der Maus (2) und DNA eines die Promotorregion enthaltenden Plasmids (3) durchgeführt. Als Negativ-Kontrolle wurde eine PCR auf der isolierten RNA durchgeführt (4).

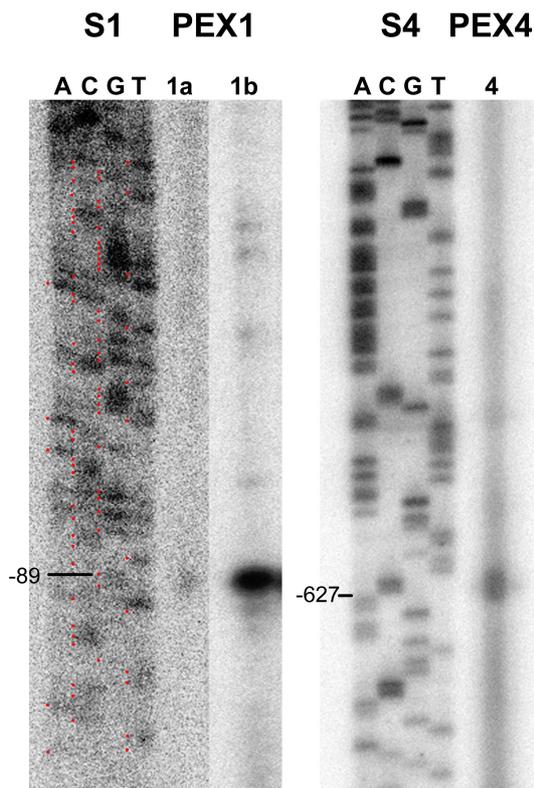


Abb. 3.20 Transkriptionsstartpunkte des 5-HT₇-Rezeptorgens der Maus. Für die dargestellten Primerextensionversuche wurden 30 µg Gesamtgehirn-RNA und die Primer PEX1 (Spur 1a und 1b) und PEX 4 (Spur 4) eingesetzt. Die dargestellten Sequenzreaktionen erfolgten mit den Primern S1 und S4. Die Lage der Primer ist Abb. 3.18 zu entnehmen. In Spur 1a und 1b sind Ergebnisse unabhängiger Versuche dargestellt. Rote Punkte heben die positiven Banden der Sequenzreaktion mit S1 hervor. Das Cytosin an Position -89 bp und das Thymin an Position -627 bp sind markiert.

-687	TCCCTTTAAT	TTTTATTTAT	TTATTTTTTAT	TAAGGGCTTA	AAATATATTC
-637	TCCAACA AGG	T TCTTCACCG	GTTCATGCAG	TGACCCCCGA	GTCTTCTTGA
-587	AAAGCAAACC	GCTCCCACCC	CGCTTGTCAT	TTGCTACAGT	GCTGAGGCCA
-537	GGGGGTCTGC	GGCAGGGCGA	GCCAGGGCTG	GGCATTGCA	CGGTGCGCAG
-487	CGGCGGGGCT	GCCCAGCAGG	GGAAGCCCGT	CCCGGAGCGC	GCGGGGCGCT
-437	GGCGGCTGCC	GGAGGCGGTG	GCTGGGACGC	GGCGCGGCTG	CCGCAGGGGA
-387	GCGGCGGCGG	CGGGCGCGAG	GGGCGGGGCG	CACTCCGCAA	CTTCGGCCAC
-337	GGCGGCCGGG	CGCTCTCGGC	CCCGGCGCGC	GTCGCTGCGG	GGCTGCGGTG
-287	CGGCC GCCC	GGCCGGGCTC	GGCTCGCCAC	CCTGCGCCTC	CCCCGTGCCC
-237	GTCGGGGACC	GCTGGCGCCT	CCCGCGGGGA	GTCCTCGCCC	ACGCGT CACC
-187	CGCAGCGTCT	GGGGACCCT	GGGACGTGCG	GGGTCGCGAG	GCCGAG CCGG
-137	GCGCCCCCCA	GTGGCCAGCG	CCGACCCCA	TGGCTGG GCC	GCGCG AGCC
-87	GAGCGGGCAA	GGTGAATCCA	GCCCTGGGGC	CGGCTGCCGG	AGCGCTTGCC
-37	GGGGGCGCCG	GCTCCATGGG	CAGCGGCGCT	CGGCAC ATG	ATGGACGTTA

Abb. 3.21: Identifizierte Transkriptionsstartpunkte im Promotor des 5-HT₇-Rezeptorgens. Dargestellt ist die proximale Promotorsequenz des 5-HT₇-Rezeptorgens. Hervorgehoben ist das Translationsstartkodon ATG (rot), die über Primerextensioversuche identifizierten Transkriptionsstartpunkte (gelb) sowie die drei identifizierten TATA-Boxen (grau).

3.2.4 Identifikation von Spleißvarianten im 5'-Bereich des 5-HT₇-Rezeptorgens

Die Komplexität des serotonergen Systems wird durch die Existenz mehrerer Isoformen einzelner 5-HT-Rezeptoren noch erhöht. Bisher wurden für den 5-HT₃, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₄, 5-HT₆, und den 5-HT₇-Rezeptor die Generation von Isoformen durch RNA-„Editing“ und/oder alternatives RNA-Spleißen beschrieben. Die vier bekannten Isoformen des 5-HT₇-Rezeptors in Ratte und Mensch werden durch alternatives Spleißen im Bereich Exon 2-Intron 2/3-Exon 3 gebildet, welches sich in einer Variation des cytosolischen C-Terminus niederschlägt. Zur Analyse des Bereiches Exon 1-Intron 1-Exon 2 auf potentielle alternative Spleißvorgänge sowie zur initialen Charakterisierung ausgewählter *in vitro* Systeme (s. 3.2.5) auf die Expression des 5-HT₇-Rezeptorgens wurden RT-PCR-Versuche mit Gesamt-RNA aus dem Gehirn von Maus (NMRI-Auszuchtstamm) und Ratte (Spague-Dawley-Auszuchtstamm) sowie auf Gesamt-RNA von NG108-15-Zellen und differenzierten und undifferenzierten RN46A-Zellen durchgeführt. Die Lage der Primer ist Abbildung 3.22 zu entnehmen.

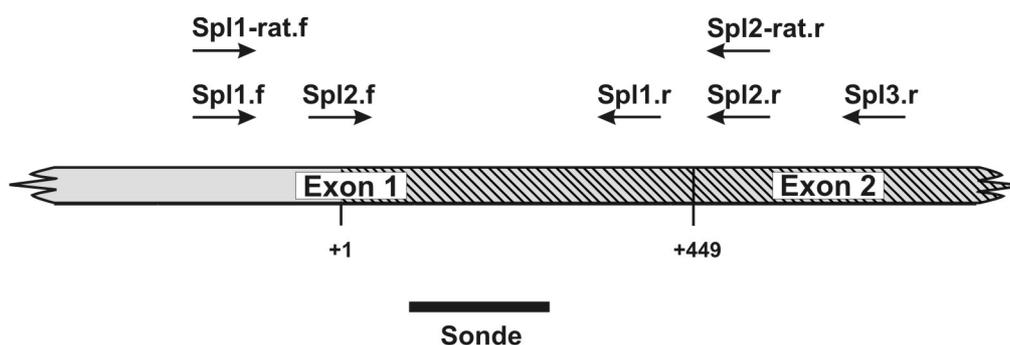


Abb. 3.22: Positionen der Primer zur Analyse der Splicevorgänge im 5'-Bereich des 5-HT₇-Rezeptorgens. Schematisch dargestellt ist die 5-HT_{7(a)}-Rezeptor mRNA (grauer Kasten) inklusive 5'-UTR (grau ohne Muster) und kodierender Region (grau-schwarz gestreift). Der Übergang zwischen Exon 1 und Exon 2 liegt bei +449. Die im Verlauf der Analyse der Splicevorgänge eingesetzte Sonde ist als schwarzer Balken dargestellt und bindet unter den gewählten Bedingungen sowohl die Sequenz der Maus, als auch die der Ratte. Die Primer Spl2.f, Spl1.r und Spl3.r sind spezifisch für die Sequenz der Ratte und der Maus, Spl1.f und Spl2.r sind spezifisch für die Sequenz der Maus und Spl1-rat.f und Spl2-rat.r sind spezifisch für die Sequenz der Ratte.

Undifferenzierte RN46A-Zellen exprimierten das 5-HT₇-Rezeptorgen nicht, differenzierte RN46A-Zellen nur sehr schwach. In den anderen RNA Proben konnten mit den diversen Primerpaaren jeweils mehrere Transkripte nachgewiesen werden, deren Spezifität über „Southern-Blot“-Analysen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.23). Als Sonde wurde für diese Untersuchungen ein 471 bp langes NotI/NcoI Fragment aus der kodierenden Region des Exon 1 verwendet. Da mittels „Southern-Blot“-Analysen auf genomischer DNA der Maus keine Hinweise auf die Existenz von Pseudogenen oder Genen hoher Homologie gefunden wurden

(Plassat et al. 1993) deutet der Nachweis mehrerer spezifischer RT-PCR-Produkte mit jeweils einem Primerpaar auf das Vorhandensein mehrerer verschiedener Spleißvarianten im Transkriptom der untersuchten Proben hin.

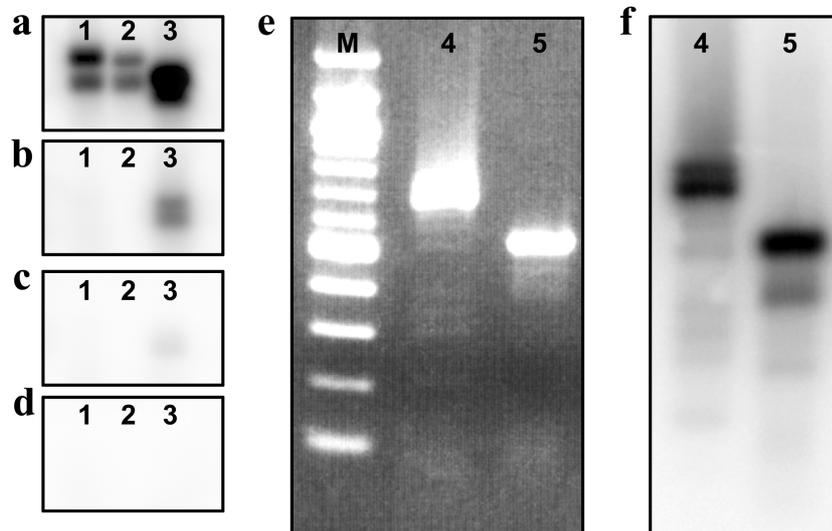


Abb. 3.23: Detektion von 5-HT₇-Rezeptor mRNA Splicevarianten. RT-PCR mit spezifischen Primern für 5-HT₇-Rezeptortranskripte der Ratte (a-d) und der Maus (e, f) wurde auf Gesamt-RNA von Rattengehirn (a), NG108-15-Zellen (b), differenzierten (c) und undifferenzierten (d) RN46A-Zellen durchgeführt. Die RT-PCR-Produkte in a-d und f wurden mit einer internen 5-HT₇-Rezeptorgen spezifischen Sonde hybridisiert (M: DNA-Marker). Verwendete Primer: 1: Spl1-rat.f/Spl3.r, 2: Spl1-rat.f/Spl2-rat.r, 3: Spl1-rat.f/Spl1.r, 4: Spl1.f/Spl2.r, 5: Spl1.f/Spl1.r. Die Lage der Primer ist Abb. 3.22 zu entnehmen.

Zur näheren Charakterisierung dieser potentiellen Spleißvarianten wurden die RT-PCR-Produkte aus Gesamtgehirn-RNA der Maus kloniert und sequenziert. Es wurden fünf unterschiedliche Klone identifiziert, die insgesamt sechs verschiedene Spleißvorgänge aufwiesen. Fünf dieser Spleißvorgänge traten innerhalb Exon 1 an internen Spleiß-Donor und Spleiß-Akzeptor Stellen auf, ein Spleißvorgang trat zwischen Exon1 und Exon 2 auf und involviert ein neu identifiziertes alternatives Exon (Exon E), dessen homologe Region in dem 107539 bp langen Intron1 des humanen 5-HT₇-Rezeptorgens identifiziert werden konnte. Die Spleißvorgänge an den internen Donor- und Akzeptorstellen führen allesamt zu „in frame“-Deletionen. Die im folgenden verwendete Bezeichnung der verschiedenen Spleißvarianten orientiert sich an der Anzahl der deletierten Basentriplets. In Abbildung 3.24 sind die verschiedenen identifizierten Spleißvorgänge dargestellt.

$\Delta 45$ führt zu einer Deletion von 45 Aminosäureresten aus dem Bereich der N-terminalen extrazellulären Domäne. $\Delta 119$ führt zu einer Deletion von 119 Aminosäureresten aus dem Bereich der N-terminalen extrazellulären Domäne sowie der ersten transmembranären (TM)

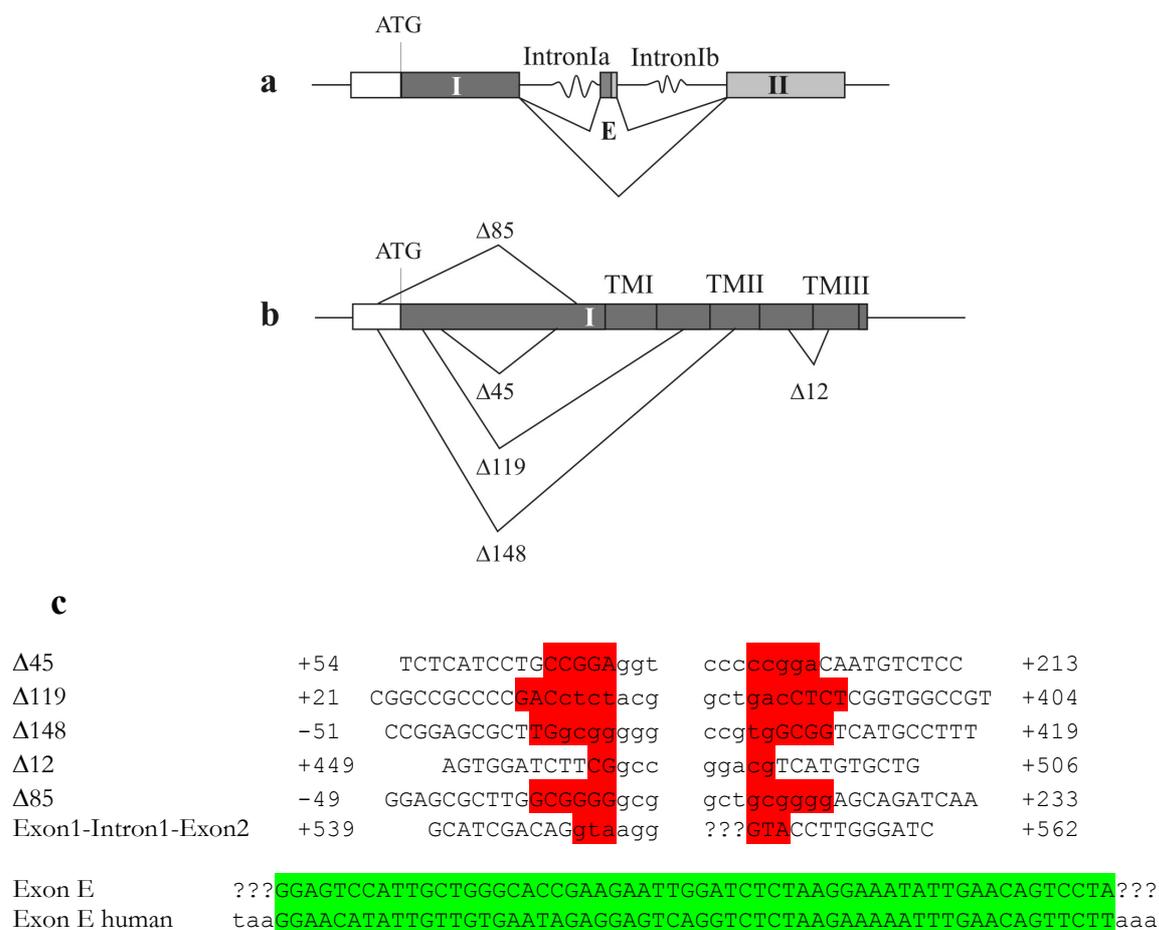


Abb. 3.24: Identifizierte Splicevorgänge im 5'-Bereich des 5-HT₇-Rezeptorgens der Maus. a und b geben eine schematische Darstellung der identifizierten Splicevorgänge wieder. a stellt den alternativen Splicevorgang des Exons E dar, b stellt die Splicevorgänge an den internen Donor- und Akzeptorstellen dar. Die Exons in a und b sind als Kästen dargestellt (weisse Füllung: 5'-UTR, dunkelgraue Füllung: kodierende Region, hellgraue Füllung: nichtkodierende Region, falls Exon E enthalten ist). In c sind die Sequenzen im Bereich der identifizierten Splicevorgänge sowie des Splicevorgangs Exon1-Intron1-Exon2 wiedergegeben. Rot markiert sind sich wiederholende Sequenzen, die an den Splicestellen vorhanden sind und von denen im Zuge des Splicevorgangs jeweils eine Seite eliminiert wird. Große Buchstaben repräsentieren Basen, die nach dem Splicevorgang in der Sequenz des resultierenden Transkriptes enthalten sind, kleine Buchstaben repräsentieren Basen, die eliminiert werden. Der grün markierte Bereich gibt die Sequenz des Exons E der Maus, sowie des homologen Bereichs im humanen Genom wieder.

Helix, der ersten intrazellulären Schleife sowie einem Teil der zweiten TM Helix. Δ148 und Δ85 führen zu einer Deletion des Start-Kodons. Der Translationsbeginn ab dem nächstmöglichen Start-Kodon (M138) resultiert in einer Deletion der ersten (N-terminalen)137 Aminosäurereste. M138 liegt in der zweiten TM Helix des 5-HT_{7(a)}-Rezeptors. Untersucht man die Proteinsequenzen aus Δ119, Δ148 und Δ85 hinsichtlich ihrer Topologie so werden fünf-TM Modelle mit extrazellulärem N-Terminus vorhergesagt (Impred, TopoPred 2). Δ12 führt zu einer Deletion von 12 Aminosäureresten im Bereich der zweiten intrazellulären Schleife und der dritten

TM Helix. Topologieuntersuchungen zu $\Delta 45$ und $\Delta 12$ führen zum klassischen sieben-TM Aufbau. Exon E enthält in dem kodierenden Leserahmen ein Stop-Kodon und führt zu einem Abruch des ORFs an Position 199 der abgeleiteten Aminosäuresequenz. In Abbildung 3.25 sind abgeleitete Aminosäuresequenzen sowie schematische Darstellung des murinen 5-HT_{7(a)}-Rezeptors sowie der identifizierten Spleißvarianten dargestellt. Eine Analyse der abgeleiteten Proteinsequenzdaten mit Hilfe der PROSITE Datenbank (Release 16.51, *Swiss Institute of Bioinformatics*) führte zu keinen Hinweisen auf das Vorhandensein neuer konservierter Domänen.

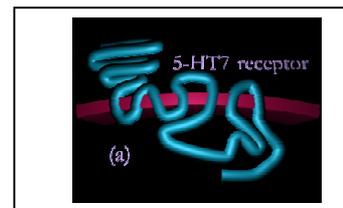
Mit Primern, die spezifisch für die einzelnen Spleißereignisse sind, d.h. im Falle des Exon E auf diesem liegen und im Falle der Deletionen über diesen liegen, ließen sich RT-PCR-Produkte der erwarteten Größen aus Gesamtgehirn RNA der Maus amplifizieren, was die Validität der Ergebnisse untermauert. Die Existenz von zusätzlichen Banden bei einigen dieser Ergebnisse deutet auf die Möglichkeit von Kombinationen verschiedener Spleißvorgänge hin, wie sie bei einem der analysierten Klone ja auch ursprünglich gefunden wurde.

Geht man davon aus, dass die sechs identifizierten verschiedenen Spleißvorgänge alle unabhängig voneinander ablaufen, d. h. sich gegenseitig nicht bedingen bzw. ausschließen (abgesehen von überlappenden Ereignissen), so kommt man auf eine theoretische Anzahl von 19 verschiedenen Spleißvarianten in dem untersuchten Bereich.

```

1  EFGTRRTERAR*IQPWGRLLPERLAGAPAPWAAALGT*MDVNSSGRPDLYG
51  HLRSLILPEVGRRLQDLSPDGGAHSVSVSWMPHLLSGFPEVTASPAPTWD
101 APPDNVSGCGEQINYGRVEKVVIGSILTLITLLTIAGNCLVVISVCFVKN
151 VRQPSNYLIVSLALADLSVAVAVMPFVSVTDLIGGKWI FGHFFCNVFIAM
201 DVMCCTASIMTLCVISIDRYLGI TRPLTYPVRQNGKCMAKMILSVWPLSA
251 SITLPPFLFGWAQNVNDDKVCLISQDFGYTIYSTAVAFYIPMSVLMFYMQ
301 TYKAARKSAAKHKFSGFPRVQPESEVSLNGVVKLQKEVEECANLSRLK
351 ERKNISSFKREQKAATTLGIIVGAFTVCWLPFFLLSTARPFICGTSCSCI
401 PLWVERTCLWLGYANSLINPFYISFFNRDLRRTYRSLQCYRNINRKL
451 AAGMHEALKLAERPERSEFVLQNCDHCGKKGHDT*

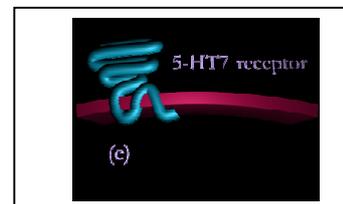
```



```

1  EFGTRRTERAR*IQPWGRLLPERLAGAPAPWAAALGT*MDVNSSGRPDLYG
51  HLRSLILPEVGRRLQDLSPDGGAHSVSVSWMPHLLSGFPEVTASPAPTWD
101 APPDNVSGCGEQINYGRVEKVVIGSILTLITLLTIAGNCLVVISVCFVKN
151 VRQPSNYLIVSLALADLSVAVAVMPFVSVTDLIGGKWI FGHFFCNVFIAM
201 DVMCCTASIMTLCVISIDRESIAGHRRIGSLRKY*

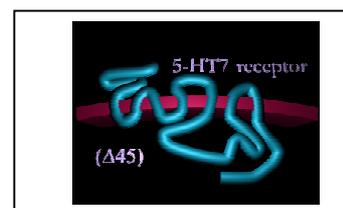
```



```

1  EFGTRRTERAR*IQPWGRLLPERLAGAPAPWAAALGT*MDVNSSGRPDLYG
51  HLRSLILPE-Δ45-DNVSGCGEQINYGRVEKVVIGSILTLITLLTIAGNCL
146 VVISVCFVKN
156 VRQPSNYLIVSLALADLSVAVAVMPFVSVTDLIGGKWI FGHFFCNVFIAM
206 DVMCCTASIMTLCVISIDRYLGI TRPLTYPVRQNGKCMAKMILSVWPLSA
256 SITLPPFLFGWAQNVNDDKVCLISQDFGYTIYSTAVAFYIPMSVLMFYMQ
306 TYKAARKSAAKHKFSGFPRVQPESEVSLNGVVKLQKEVEECANLSRLK
356 ERKNISSFKREQKAATTLGIIVGAFTVCWLPFFLLSTARPFICGTSCSCI
406 PLWVERTCLWLGYANSLINPFYISFFNRDLRRTYRSLQCYRNINRKL
456 AAGMHEALKLAERPERSEFVLQNCDHCGKKGHDT*

```



```

1  EFGTRRTERAR*IQPWGRLLPERLAGAPAPWAAALGT*MDVNSSGRPD
48  L-Δ119-SVAVAVMPFVSVTDLIGGKWI FGHFFCNVFIAM
82  DVMCCTASIMTLCVISIDRYLGI TRPLTYPVRQNGKCMAKMILSVWPLSA
132 SITLPPFLFGWAQNVNDDKVCLISQDFGYTIYSTAVAFYIPMSVLMFYMQ
182 TYKAARKSAAKHKFSGFPRVQPESEVSLNGVVKLQKEVEECANLSRLK
232 ERKNISSFKREQKAATTLGIIVGAFTVCWLPFFLLSTARPFICGTSCSCI
282 PLWVERTCLWLGYANSLINPFYISFFNRDLRRTYRSLQCYRNINRKL
332 AAGMHEALKLAERPERSEFVLQNCDHCGKKGHDT*

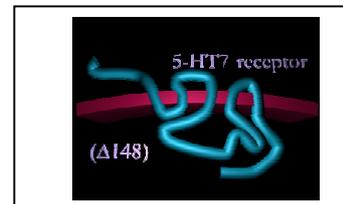
```



```

1  EFGTRRTERAR*IQPWGRLLPERLA-Δ148-VMPFVSVTDLIGGKWI FGHF
45  FCNVFIAM
53  DVMCCTASIMTLCVISIDRYLGI TRPLTYPVRQNGKCMAKMILSVWPLSA
103 SITLPPFLFGWAQNVNDDKVCLISQDFGYTIYSTAVAFYIPMSVLMFYMQ
153 TYKAARKSAAKHKFSGFPRVQPESEVSLNGVVKLQKEVEECANLSRLK
203 ERKNISSFKREQKAATTLGIIVGAFTVCWLPFFLLSTARPFICGTSCSCI
253 PLWVERTCLWLGYANSLINPFYISFFNRDLRRTYRSLQCYRNINRKL
303 AAGMHEALKLAERPERSEFVLQNCDHCGKKGHDT*

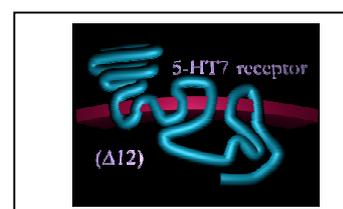
```



```

1  EFGTRRTERAR*IQPWGRLLPERLAGAPAPWAAALGT*MDVNSSGRPDLYG
51  HLRSLILPEVGRRLQDLSPDGGAHSVSVSWMPHLLSGFPEVTASPAPTWD
101 APPDNVSGCGEQINYGRVEKVVIGSILTLITLLTIAGNCLVVISVCFVKN
151 VRQPSNYLIVSLALADLSVAVAVMPFVSVTDLIGGKWI F-Δ12-V
191 MCTASIMTLCVISIDRYLGI TRPLTYPVRQNGKCMARKMILSVWPLSA
239 SITLPPFLFGWAQNVNDDKVCLISQDFGYTIYSTAVAFYIPMSVLMFYMQ
289 TYKAARKSAAKHKFSGFPRVQPESEVSLNGVVKLQKEVEECANLSRLK
339 ERKNISSFKREQKAATTLGIIVGAFTVCWLPFFLLSTARPFICGTSCSCI
389 PLWVERTCLWLGYANSLINPFYISFFNRDLRRTYRSLQCYRNINRKL
439 AAGMHEALKLAERPERSEFVLQNCDHCGKKGHDT*

```



```

1  EFGTRRTERAR*IQPWGRLLPERLAG-Δ85-EQINYGRVEKVVIGSILTLI
46  TLLTIAGNCLVVISVCFVKN
66  VRQPSNYLIVSLALADLSVAVAVMPFVSVTDLIGGKWI FGHFFCNVFIAM
116 DVMCCTASIMTLCVISIDRYLGI TRPLTYPVRQNGKCMAKMILSVWPLSA
166 SITLPPFLFGWAQNVNDDKVCLISQDFGYTIYSTAVAFYIPMSVLMFYMQ
216 TYKAARKSAAKHKFSGFPRVQPESEVSLNGVVKLQKEVEECANLSRLK
266 ERKNISSFKREQKAATTLGIIVGAFTVCWLPFFLLSTARPFICGTSCSCI
316 PLWVERTCLWLGYANSLINPFYISFFNRDLRRTYRSLQCYRNINRKL
366 AAGMHEALKLAERPERSEFVLQNCDHCGKKGHDT*

```

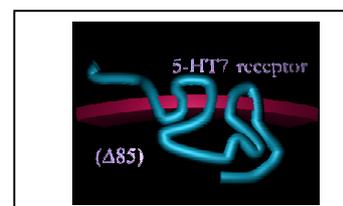


Abb. 3.25: Abgeleitete Aminosäuresequenzen und Strukturen der identifizierten Splicevarianten des 5-HT₇-Rezeptors der Maus. Rot markiert ist das vorhergesagte Start-Methionin, grau unterlegt sind die im 5-HT_{7(a)}-Rezeptor vorhergesagten Transmembrandomänen, türkis markiert sind die Positionen, an denen Splicevorgänge beobachtet wurden, grün unterlegt ist die abgeleitete Aminosäuresequenz des Exon E. Sternchen markieren Stopkodons. Die verwendeten Methoden zum ableiten der Struktur sind im Text beschrieben.

3.2.5 *In vitro* Analysen zur Charakterisierung des 5-HT₇-Rezeptorgen Promotors

Wahl und Charakterisierung der verwendeten Zellkultursysteme

Analog zu 3.1.3 wurden für die *in vitro* Analysen Zelllinien ausgewählt, die einerseits einen im Analysekontext sinnvollen spezifischen Zelltyp repräsentieren und andererseits unter den gewählten experimentellen Bedingungen transfizierbar sind. Wie unter 3.2.4 dargestellt, exprimierten NG108-15-Zellen und differenzierte RN46A-Zellen das 5-HT₇-Rezeptorgen (letztere nur sehr schwach). In differenzierten und undifferenzierten PC12-Zellen konnten keine 5-HT₇-Rezeptortranskripte nachgewiesen werden. Für die *in vitro* Analysen wurden NG108-15-Zellen als 5-HT₇-Rezeptorgen exprimierende neuronale Zelllinie eingesetzt. Als differenzierte nicht-exprimierende neuronale Zelllinie wurden differenzierte PC12-Zellen, als undifferenzierte nicht-exprimierende neuronale Zelllinie wurden undifferenzierte PC12-Zellen und als nicht-neuronale nicht-exprimierende Zelllinie wurden COS-7-Zellen gewählt. RN46A-Zellen ließen sich unter den gewählten experimentellen Bedingungen weder im differenzierten noch im undifferenzierten Zustand transfizieren und wurden deshalb für diese Experimente nicht eingesetzt.

Klonierung verschiedener 5-HT₇-Rezeptorgen Promotorfragmente

Als Expressionsvektor wurde der unter 3.1.3.2 beschriebene pM2 Vektor verwendet. Aus dem isolierten PAC-Klon, PAC₇, wurden verschiedene Promotorbereiche in pM2 subkloniert. Die untersuchten Promotorfragmente reichen in ihrem 3'-Bereich genau an den Translationsstart des 5-HT₇-Rezeptorgens heran und variieren in der Länge des 5'-Bereiches. Es wurden vier Promotorbereiche (-4,2 kb, -3,5 kb, -2,1 kb und -1,2 kb 5'untranslatierter Bereich) vor das *LacZ* Gen des pM2 Vektors kloniert (Abb. 3.26).

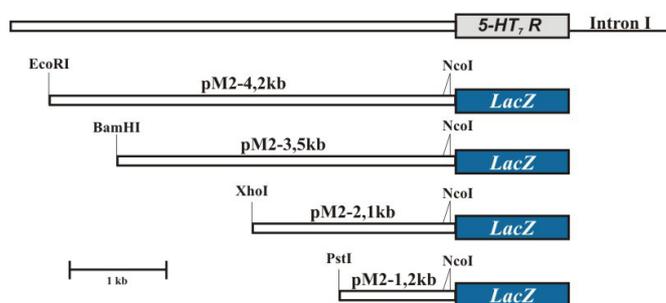


Abb. 3.26: Schematische Darstellung der 5-HT₇-Rezeptorgen Promotor-*LacZ*-Konstrukte.

Schmale offene Kästen stellen Promotorbereiche dar, gefüllte Kästen stellen kodierende Regionen dar. Eingezeichnete Restriktionsschnittstellen wurden im Rahmen der Klonierung der Konstrukte verwendet.

In vitro Analyse der 5-HT₇-Rezeptorgen Promotorfragmente

Die Aktivitäten der vier 5-HT₇-Rezeptorgen Promotorfragmente in den transienten Transfektionsstudien sind in Abbildung 3.27 dargestellt. In keiner der gewählten Zelllinien konnte mit den verwendeten Konstrukten eine spezifische Aktivität nachgewiesen werden. Die Aktivität des -1,2 kb Fragments lag in den nicht-neuronalen COS-7-Zellen unter der des Promotor-losen pM2 Vektors, was darauf hindeutet, dass die undichte Expression von pM2 durch in diesem Promotorfragment enthaltene Repressorelemente unterdrückt wurde. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der proximale 1,2 kb lange Promotorbereich Cis-Elemente enthält, die sowohl in endogen 5-HT₇-Rezeptorgen-exprimierenden Zellen als auch in nicht-exprimierenden Zellen die Transkription von diesem Promotorfragment aus vollständig reprimieren. Zwischen -1,2 kb und -4,2 kb scheinen keine Cis-Elemente lokalisiert zu sein, die diese Repression unspezifisch in COS-7- oder PC12-Zellen oder spezifisch in endogen 5-HT₇-Rezeptorgen-exprimierenden Zellen aufheben. Eine zellspezifische Transkription wird somit durch das -4,2 kb Konstrukt nicht zugelassen bzw. ermöglicht sondern vollständig unterdrückt.

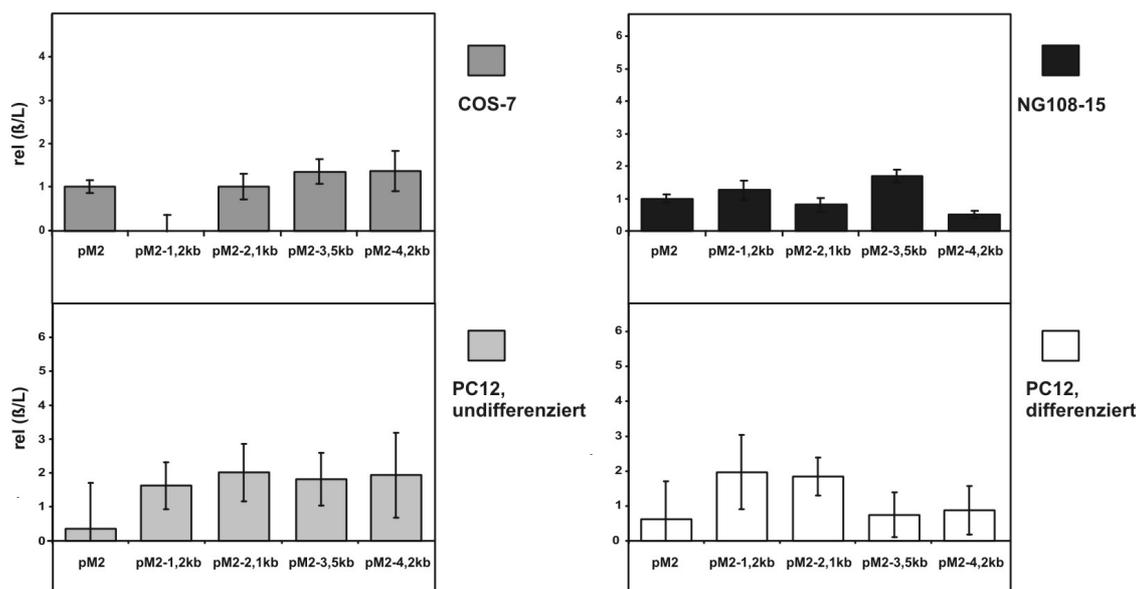


Abb. 3.27: Aktivität der 5-HT₇-Rezeptorgen Promotor-*LacZ*-Konstrukte *in vitro*. COS-7-, NG108-15- und PC12-Zellen wurden in transienten Transfektionsstudien mit pGL2-CMV und den verschiedenen 5-HT₇-Rezeptorgen Promotor-*LacZ*-Konstrukten kotransfiziert und nach 48 h vermessen. Daten sind wiedergegeben als Mittelwerte der β -Galactosidaseaktivität zu Luciferaseaktivität (β/L) abgeglichen gegen die Konstruktspezifischen Transfektionseffizienzen (rel) von mindestens drei verschiedenen Experimenten \pm Standardabweichung. Die Werte aus COS-7- und NG108-15-Zellen wurden auf die Aktivität des promotorlosen pM2-Vektors normalisiert.

Die Sequenz des 5-HT₇-Rezeptorgen Promotors ist im Bereich zwischen -1361 bp und -624 bp sowie zwischen -486 bp und -1 bp stark konserviert (s. 3.2.2). Im distaleren Homologiebereich fanden sich keine auffälligen Konsensussequenzen für die Bindung von transkriptionellen

Repressoren. Der proximale Homologiebereich enthält putative Bindungsstellen für die repressiv wirkenden Transkriptionsfaktoren IF1, GCF und WT1 sowie für die transkriptionellen Regulatoren der *early growth response* Familie (NGFI-a, NGFI-c und EGR2), wobei WT1 jedoch nicht im Gehirn exprimiert wird und somit nicht für die starke beobachtete Repression in den neuronalen Zelllinien verantwortlich sein kann (Gene Expression Database (GXD), 12/2001). Der duale Aufbau des Promotors im Sinne des Mechanismus der Transkriptionsinitiation, einerseits über TATA-Boxen im Bereich -635 bp bis -667 bp und andererseits über GC-reiche Sequenzen im Bereich -85 bp bis -190 bp, lässt vermuten, dass es einen Regelmechanismus gibt, der die Transkription ausgehend von den verschiedenen Transkriptionsstartpunkten insgesamt unterdrückt. Die putativen repressorischen Cis-Elemente des proximalen Homologiebereiches könnten diese Funktion über eine Blockierung der Transkription übernehmen.

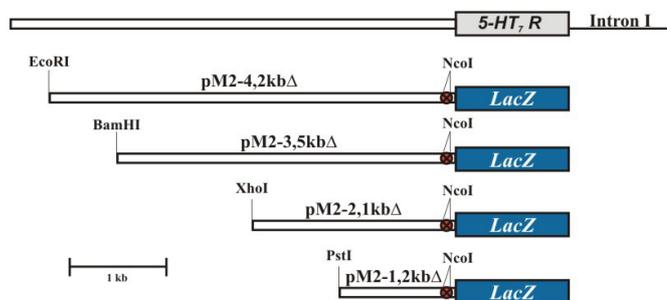


Abb. 3.28: Schematische Darstellung der 5-HT₇-Rezeptorgen Promotor-*LacZ*-Deletionskonstrukte. Analog zu Abb. 3.26. Kreuze markieren den deletierten Bereich.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Deletionskonstrukte hergestellt, denen der 86 bp lange Bereich zwischen -22 bp und -107 bp fehlt (Abb. 3.28). Dieser Bereich beinhaltet die putative Bindungsstellen für GCF, WT1 und die transkriptionellen Regulatoren der *early growth response* Familie sowie für SP1 und CTF/NF1. Einer der Haupttranskriptionsstartpunkte, das Cytosin an Position -89 bp, befindet sich ebenfalls in diesem Bereich. Die Ergebnisse aus den transient transfizierten NG108-15-Zellen, COS-7-Zellen und differenzierten und undifferenzierten PC12-Zellen ist in Abbildung 3.29 dargestellt. Alle vier Konstrukte waren in COS-7-Zellen und differenzierten PC12-Zellen schwach aktiv. In undifferenzierten PC12-Zellen waren das -1,2 kb Fragment, das -2,1 kb Fragment und das -3,5 kb Fragment schwach aktiv. In endogen 5-HT₇-Rezeptorgen-exprimierenden NG108-15-Zellen waren alle vier Konstrukte aktiv. Hier ließen sich zudem statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Aktivitäten der einzelnen Konstrukte nachweisen. Das -1,2 kb Fragment wies die stärkste Aktivität auf (6- bis 7-fach über der Hintergrundaktivität), das -2,1 kb und das -3,5 kb Fragment wiesen eine reprimierte Aktivität (3- bis 4-fach über dem Hintergrund) auf. Das -4,2 kb Fragment wies eine intermediäre Aktivität (4- bis 5-fach über dem Hintergrund) auf.

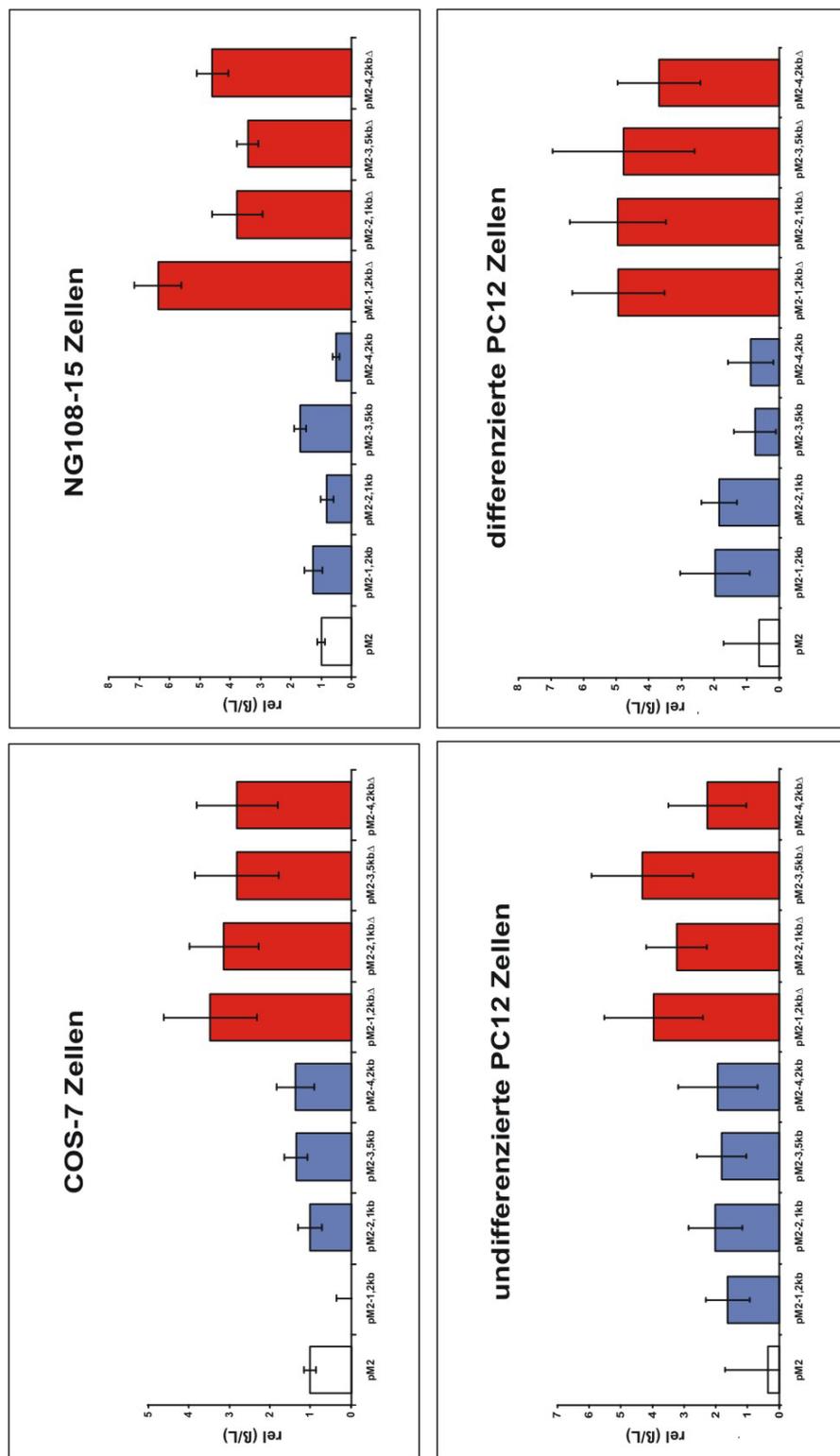


Abb. 3.29: Aktivität der 5-HT₇-Rezeptorgen Promotor-LacZ-Konstrukte und -Deletionskonstrukte *in vitro*. COS-7-, NG108-15- und PC12-Zellen wurden in transienten Transfektionsstudien mit pGL2-CMV und den verschiedenen 5-HT₇-Rezeptorgen Promotor-LacZ-Konstrukten und -Deletionskonstrukten kotransfiziert und nach 48 h vermessen. Daten sind wiedergegeben als Mittelwerte der β-Galactosidaseaktivität zu Luciferaseaktivität (β/L) abgeglichen gegen die Konstrukt-spezifischen Transfektionseffizienzen (rel) von mindestens drei verschiedenen Experimenten +/- Standardabweichung. Die Werte aus COS-7- und NG108-15-Zellen wurden auf die Aktivität des promotorlosen pM2-Vektors normalisiert.

Der Bereich zwischen -22 bp und -107 bp scheint repressorisch wirkende Cis-Elemente zu beinhalten, die die Transkription ausgehend von dem $1,2$ kb langen proximalen Promotorfragment des 5-HT_7 -Rezeptorgens sowohl in endogen 5-HT_7 -Rezeptorgen-exprimierenden Zellen als auch in endogen nicht-exprimierenden Zellen verhindern. Weder in 5-HT_7 -Rezeptorgen-exprimierenden noch in nicht-exprimierenden Zellen konnte ein Promotorbereich identifiziert werden, der diesen Transkriptionsblock aufhebt. Bereiche zwischen -1159 bp und -2080 bp und zwischen -3454 bp und -4224 bp scheinen weitere repressorisch bzw. aktivierend wirkende Cis-Elemente zu beinhalten, die im Kontext der Trans-Elemente der NG108-15-Zellen wirksam sind. In Abbildung 3.30 ist eine schematische Darstellung des 5-HT_7 -Rezeptorgen Promotors und seiner funktionellen Bereiche wiedergegeben.

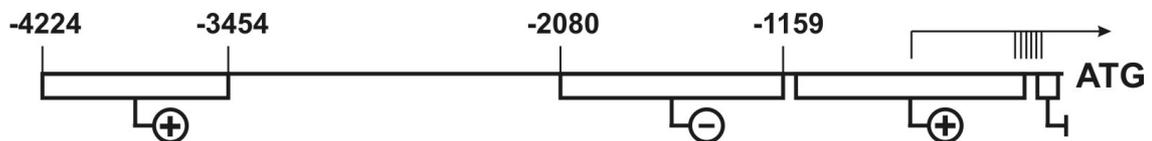


Abb. 3.30: Schematische Darstellung des 5-HT_7 -Rezeptorgen Promotors. Der Promotor des 5-HT_7 -Rezeptorgens (dicke Linie) besitzt mehrere Transkriptionsinitiationsstellen (oberer Pfeil mit vertikalen Strichen). In vitro wurden zwei transkriptionsaktivierende (+), eine transkriptionsinhibierende Region (-) und ein Transkriptionsblock-vermittelnder Bereich (horizontale Linien mit einer vertikalen Linie am rechten Ende) beschrieben (weisse Kästen).