

4 Diskussion

4.1 Der 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor

Erste frühere Studien des 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotors der Maus aber vor allem der Ratte und des Menschen haben zu einem initialen Verständnis der *in vitro* Regulation dieses Gens auf transkriptioneller Ebene geführt. Es wurden Analysen zur transkriptionsvermittelnden Aktivität proximaler Promotorfragmente sowie zur Identifikation transkriptioneller Initiationsstellen durchgeführt (Albert et al. 1996; Parks und Shenk 1996; Wurch et al. 1996; Storrington et al. 1999; Meijer et al. 2000). Einige Transkriptionsfaktoren und deren funktionelle Mechanismen in Bezug auf transkriptionelle Aktivierung und Hemmung wurden identifiziert und charakterisiert (Parks und Shenk 1996; Meijer et al. 2000; Ou et al. 2000; Wissink et al. 2000). Ferner wurde der Mechanismus der hormonellen *in vitro* Regulation der Promotoraktivität dieses Rezeptorgens eingehend untersucht (Meijer et al. 2000; Wissink et al. 2000; Ou et al. 2001; Wissink et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde der murine 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor mittels *in vitro* und *in vivo* Ansätzen weitergehend funktionell - vor allem in Hinblick auf die Spezifität der transkriptionsvermittelnden Aktivität - analysiert.

In vitro wurde die Aktivität fünf unterschiedlich langer Promotorfragmente in insgesamt vier verschiedenen Zelltypen analysiert. Als Zelltypen wurden nicht-neuronale 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA-negative COS-7-Zellen, neuronale 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA-negative undifferenzierte und differenzierte PC12-Zellen und neuronale 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA-positive NG108-15-Zellen verwendet. Eine weitere neuronale 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA-positive Zelllinie, die RN46A-Zelllinie, wurde zudem initial charakterisiert. Diese Zelllinie wurde durch Transformation von E13 Raphezellen mittels des Temperatur sensitiven SV40 T Antigens generiert (White et al. 1994). Es wurde berichtet, dass sie im undifferenzierten Zustand geringe Mengen und im differenzierten postmitotischen Zustand hohe Mengen des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens exprimieren (White et al. 1994). Storrington et al. (1999) und Ou et al. (2000) verwendeten in ihren Versuchen undifferenzierte RN46A-Zellen als 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA-positives *in vitro* System und aus Gründen der Vergleichbarkeit wäre es wünschenswert gewesen, diese Zellen auch für unsere Assays zu verwenden. Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte in unserem Labor mit den zur Verfügung stehenden RN46A-Zellen im undifferenzierten Zustand jedoch keine 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA nachgewiesen werden. In differenzierten RN46A-Zellen war die detektierte

Mangel an 5-HT_{1A}-Rezeptortranskripten geringer als in NG108-15-Zellen. Zudem erwiesen sich differenzierte RN46A-Zellen aufgrund ihrer niedrigen Transfektionseffizienzen für die durchgeführten Versuche als nicht praktikabel. Diese Gründe haben uns dazu bewogen, auf die Verwendung von RN46A-Zellen zu verzichten.

Unsere *in vitro* Studien ergaben, dass das kürzeste analysierte Promotorfragment, das -183 bp Fragment, nur in NG108-15-Zellen signifikant ($p < 0,001$) aktiv war. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Parks und Shenk (1996), die gezeigt haben, dass ein -225 bp Fragment des humanen 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotors eine starke Aktivität in 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA-negativen Zellen, wie z.B. HeLa-Zellen, aufweist. Die Ergebnisse, die mit den zwei kurzen Promotorfragmenten (-183 bp und -740 bp) in 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA-negativen Zellen erhalten wurden, entsprechen eher denen von Storrington et al. (1999) in mit Ratten Promotorkonstrukten transfizierten L6-Zellen. Dort zeigte ein -426 bp/-117 bp Promotorfragment keine spezifische Aktivität, wohingegen ein -1174 bp/-117 bp Promotorfragment eine signifikant über dem Hintergrund liegende Aktivität aufwies. Bei Meijer et al. (2000) wurde nach Transfektion eines -275 bp und eines -967 bp Ratten Promotorfragment tragenden Reporterplasmids in CV1-b-Zellen ebenfalls eine Aktivitätszunahme mit dem längeren Konstrukt beobachtet. Ebenfalls in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Storrington et al. (1999) und Meijer et al. (2000), die gezeigt hatten, dass 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotorfragmente der Ratte mit 5'-Enden bei -1588 bp, -2719 bp und -3650 bp in 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA-negativen Zellen vollständig reprimiert sind, zeigten die drei langen Promotorfragmente (-4,5 kb, -5,5 kb und -20 kb) in COS-7-Zellen und differenzierten PC12-Zellen keine über dem Hintergrund liegende Aktivität. Einzig das -4,5 kb Fragment war in undifferenzierten PC12-Zellen schwach aktiv.

Das Aktivitätsprofil der Promotorfragmente unserer Studien in NG108-15-Zellen unterscheidet sich von denen, die Storrington et al. (2000) in 5-HT_{1A}-Rezeptorgen-exprimierenden Zelllinien beobachtet haben. Wir finden eine Repression der Aktivität mit dem -740 bp Fragment im Vergleich zu dem -183 bp Fragment und eine (Re)Aktivierung mit den längeren Fragmenten. Storrington et al. (1999) berichten von einer starken Aktivität verschiedener Fragmente mit 5'-Enden zwischen -426 bp und -1519 bp und einem 3'-Ende bei -117 bp. Die Aktivität eines -2719 bp/-117 bp Fragment ist im Vergleich dazu stark reprimiert. Gründe generellerer Art für diese Unterschiede können Spezies-spezifische Unterschiede (Ratte/Maus), die fehlenden proximalen 117 bp und dadurch die Deletion von Bindungsstellen für SP1, MAZ, einer NF-kB sowie mehrerer Transkriptionsinitiationsstellen in den Konstrukten von Storrington et al. (1999) oder einfach die Verwendung verschiedener Zelllinien sein. Die starke Repression des -740 bp Fragments könnte jedoch auch durch spezifische Repressorelemente zwischen Position -426 bp und -740 bp vermittelt werden. Die fehlende Repression der Aktivität der drei langen 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Pro-

motorfragmente, die von Storrington et al. (1999) mit dem -2719 bp/-117 bp Fragment beobachtet wird, und die wahrscheinlich durch das duale Repressorelement an Position -1554 bp/-1531 bp in der Ratte vermittelt wird (Ou et al. 2000), deutet darauf hin, dass das 14 bp-Repressorelement entweder in der Maus nicht funktional ist oder aber durch aktivierende Elemente zwischen Position -1495 bp und -4500 bp kompensiert werden. Beachtet man die Ergebnisse von Meijer et al. (2000), die eine komplette Repression eines -3650 bp Promotorfragmentes der Ratte in 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA-negativen CV1-b-Zellen beschreiben und in 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA-positiven H19-7-Zellen anmerken, lässt sich diese putative kompensatorische Region auf den Bereich zwischen dem Maushomolog der Position -3650 bp in der Ratte und -4500 bp einengen. Sequenzanalysen ergaben, dass in diesem Bereich eine putative, im menschlichen Genom konservierte, NF-κB-Bindungsstelle sowie mehrere putative CTF/NF1-Bindungsstellen, von denen eine im menschlichen Genom konserviert ist, liegen. Es ist möglich, dass diese putativen Cis-Elemente für den beschriebenen Effekt verantwortlich sind. Die komplette Elimination der Promotoraktivität in COS-7-Zellen und differenzierten PC12-Zellen von Fragmenten, die die homologe Region des dualen Repressorelements der Ratte tragen, deutet auf die Funktionalität dieser homologen Repressorregion in 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA-negativen Zellen hin.

Die zunehmende Promotoraktivität, die beim Vergleich des -4,5 kb, des -5,5 kb und des -20 kb Promotorfragments in NG108-15-Zellen auftritt, deutet auf das Vorhandensein von Cis-Elementen auf dem -5,5 kb und dem -20 kb Fragment hin, die die Transkription in 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA-positiven Neuronen spezifisch aktivieren.

Insgesamt deuten die *in vitro* Ergebnisse auf eine hohe Spezifität der durch die drei langen Promotorfragmente hervorgerufene transkriptionelle Aktivität hin, weswegen diese Fragmente zur weiteren Analyse der Vermittlung gewebespezifischer Expression *in vivo* eingesetzt wurden.

Hierfür wurden transgene Mauslinien etabliert, die das Reporter-gen *LacZ* unter der Kontrolle des 4,5 kb, des 5,5 kb und des 20 kb langen 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotors exprimieren.

In etwa 40% der transgenen Linien lies sich β-Galactosidaseaktivität nachweisen. Die Rate der Transgen-exprimierenden Tiere kann in Abhängigkeit vom verwendetem Transgen stark variieren. Von sechs transgenen Linien, die *LacZ* unter der Kontrolle eines 3,6 kb langen Promotorfragmentes des Gens der aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase trugen, exprimierte beispielsweise nur eine Linie d.h. ca. 17% das Transgen (Chatelin et al. 2001). Andererseits betrug in transgenen Mauslinien, die mit einem Konstrukt erzeugt wurden, welches *LacZ* und ein 3,0 kb langes Promotorfragment des humanen *tissue-type plasminogen activator* Gens (*t-PA*) trug, die Reporter-genexpressionsrate 100% (Theuring et al. 1995). In den meisten Studien exprimieren

durchschnittlich etwa die Hälfte der transgenen Linien das Transgen. Für dieses Phänomen werden grundsätzlich zwei Effekte verantwortlich gemacht. Zum Einen der sogenannte chromosomale Positionseffekt und zum Anderen der „Repeat“-induzierte Gen „silencing“ (RIGS) Effekt. Ersterer basiert auf der Tatsache, dass bei additiver Transgenesis eine Integration des Transgens an einem mehr oder weniger zufälligen Ort im Genom des injizierten Embryos eintritt und somit die nicht vorhersagbare Konstitution der chromosomalen Umgebung Einfluss auf die Expression des Transgens nimmt (Clark et al. 1994). Letzterer bezieht sich auf den Schutzmechanismus eukaryotischer Genome gegen vermeintlich bedrohende (repetitive) Sequenzelemente wie Transposons aber auch auf den generellen Mechanismus der Heterochromatin Bildung (Henikoff 1998). Da durch additive Transgenesis meist mehrere, in einigen Fällen > 100 Kopien des Transgens tandemartig an einer Stelle des Zielgenoms integrieren, kann eine Heterochromatisierung dieses Bereiches induziert werden, wodurch dessen transkriptionelle Aktivität unterdrückt wird; dieses Phänomen erklärt den beobachteten reziproken Zusammenhang zwischen der Anzahl integrierter Kopien und Expressionsstärke des Transgens (Garrick et al. 1998). In unserem Fall wurde die Anzahl integrierter Kopien in den einzelnen transgenen Linien nicht quantifiziert. „Southern-Blot“-Analysen weisen jedoch darauf hin, dass die Anzahl integrierter Kopien in Transgen-exprimierenden Tieren relativ niedrig war.

Chromosomale Positionseffekte werden zudem für ektopische Expression des Transgens und Variationen der Expression des Transgens zwischen verschiedenen Linien des gleichen transgenen Konstrukts verantwortlich gemacht. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Konstrukte scheinen nicht anfällig für ektopische Expression zu sein – nur eine 4,5 kb Linie zeigte starke Transgenexpression außerhalb der endogenen 5-HT_{1A}-Rezeptorgen-exprimierenden Gebiete. Jedoch lies sich eine gewisse Variabilität sowohl in Bezug auf die Expressionsstärke als auch in Bezug auf das Expressionsmuster zwischen transgenen Linien des gleichen Konstrukts beobachten. Diese Variabilität scheint jedoch mit der Länge des verwendeten Konstrukts abzunehmen, was darauf hindeutet, dass kurze Fragmente anfälliger für chromosomale Positionseffekte sind als lange. Dieser Befund wird durch die Tatsache gestützt, dass sehr lange DNA-Fragmente (100 kb – 450 kb)- wie YACs, BACs und PACs- relativ unanfällig für chromosomale Positionseffekte sind (Hogan et al. 1994).

Alle exprimierenden transgenen 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor-*LacZ*-Mäuse zeigen ausschließlich im ZNS β -Galactosidaseaktivität. Diese ZNS-Spezifität ist erstaunlich, da der endogene 5-HT_{1A}-Rezeptor bzw. dessen mRNA auch in Darm, Pankreas und B- und T-Lymphozyten nachgewiesen werden konnte (Iken et al. 1995; Kirchgessner et al. 1996; Abdouh et al. 2001). Im Darm wird das 5-HT_{1A}-Rezeptorgen sowohl von der Mehrheit der Neuronen des

Plexus submucosus und des Plexus myentericus als auch von einigen 5-HT enthaltenden enterochromaffinen Zellen exprimiert. Im Pankreas findet sich 5-HT_{1A}-Rezeptorimmunoreaktivität in Ganglien, azinösen Nerven und Glucagon immunoreaktiven Inselzellen (Kirchgessner et al. 1996). In unstimulierten B und T Lymphozyten finden sich geringe Mengen an 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA, nach Stimulation wird die Expression des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens aktiviert (Abdouh et al. 2001). Das Fehlen der Transgenexpression in diesen Gebieten deutet auf einen modularen Aufbau des 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotors hin. Die spezifischen Module, die eine Expression in den oben genannten Gebieten zulassen, scheinen auf dem 20 kb Fragment nicht enthalten zu sein, das heißt sie scheinen entweder weiter 5' oder (/und) aber auch 3' der kodierenden Region zu liegen. Es kann jedoch auch sein, dass Zellen dieser hoch spezialisierten Gebiete einer stärkeren Heterochromatisierung unterliegen und somit die Expression des Transgens in diesen Gebieten spezifisch unterbunden wird.

Die Analyse der β -Galactosidaseaktivität im ZNS der transgenen Linien ergab, dass das 4,5 kb Fragment eine Expression vermittelt, die in der Summe der beobachteten Expressionsmuster der verschiedenen transgenen Linien der endogenen 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression nahe kommt (Abb. 6.1, Lanfumey und Hamon 2000). Im Gegensatz dazu vermittelt das 5,5 kb Fragment eine sehr eingeschränkte Expression, sowohl in Bezug auf die Expressionsstärke (geringe β -Galactosidaseaktivität) als auch in Bezug auf das Expressionsmuster (hauptsächlich im Hippocampus, periaquaeductalem Grau und okzipitalen Cortex). Die Spezifität für Gebiete mit endogener 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression ist dabei jedoch nicht eingeschränkt. Die 20 kb Linien weisen eine Transgenexpression auf, die vom Muster her dem der 4,5 kb Linien ähnelt. Innerhalb der unabhängigen 20 kb Linien ist das Muster der Transgenexpression jedoch weiter und zwischen ihnen konsistenter. Die Stärke der Transgenexpression ist zudem höher. Demnach scheint der 4,5 kb lange proximale Bereich des 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotors die grundlegenden Cis-Elemente, die die Expression des endogenen 5-HT_{1A}-Rezeptorgens in Bezug auf die neuronale gewebsspezifische Verteilung determinieren, bereits zu beinhalten. Die Expressionsstärke in den β -Galactosidase-positiven Gebieten entspricht jedoch nicht der endogenen 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression. Ferner ist die Konsistenz des vermittelten Expressionsmusters relativ niedrig. Der DNA Abschnitt zwischen der Position -4,5 kb und -5,5 kb im Promotor des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens vermittelt eine starke Repression der Transgenexpression sowohl in Bezug auf die Expressionsstärke aber vor allem in Bezug auf das Expressionsmuster. Zwischen -5,5 kb und -20 kb liegen Cis-Elemente, die diese Repression wieder aufheben und zu einer gegenüber dem -4,5 kb Konstrukt stärkeren und konsistenteren Expression des Transgens führen. Während das -4,5 kb Konstrukt zu einer konsistenten Expression im Cortex, CA1 des Hippocampus, dorsomedialen und lateralen Septum,

spezifischen thalamischen Kernen, Colliculus und periaquaeductalen Grau führt, weisen die Linien des -20 kb Konstruktes zusätzlich zu diesen Gebieten eine konsistente Expression in CA2, CA3, dem Gyrus Dentatus und dem Subiculum des Hippocampus, verschiedenen Gebieten der Amygdala, des Hypothalamus posterioris, der medianen Raphe (schwache aber konsistente Expression), dem Nucleus reticularis ponti und dem Nucleus mesencephalicus auf.

Die Kolokalisationsstudien brachten deutliche Unterschiede für die drei verwendeten Konstrukte zum Vorschein. Mit dem 4,5 kb Konstrukt wiesen ca. 10% - 30% und mit dem 5,5 kb Konstrukt etwa 10% - 20% der 5-HT_{1A}-Rezeptorgen-exprimierenden Zellen in β -Galactosidase-positiven Gebieten Kolokalisation von 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA und β -Galactosidaseaktivität auf. Im Gegensatz dazu waren mit dem 20 kb Konstrukt in β -Galactosidase-positiven Gebieten 90% - 100% der 5-HT_{1A}-Rezeptorgen-exprimierenden Zellen auch positiv für die β -Galactosidase. Ferner waren mit allen drei Konstrukten etwa 80% - 100% der β -Galactosidase-positiven Zellen auch positiv für 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA. Das heißt, dass die starke Expression, die mit dem -20 kb Konstrukt beobachtet wird, nicht zu einer Expression außerhalb des Bereichs endogener 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression, sondern vielmehr zu einer Expression in nahezu allen endogen 5-HT_{1A}-Rezeptorgen-exprimierenden Zellen führt.

Ein wichtiger Punkt, den es bei der Interpretation dieser Ergebnisse zu beachten gilt, ist die Detektionsgrenze für die 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA mittels nrISH sowie für die β -Galactosidase durch den Nachweis ihrer enzymatischen Aktivität in fixiertem Gewebe. Es ist davon auszugehen, dass sowohl für die endogene 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression als auch für die Expression des Transgens der Nachweis der Expression mit den verwendeten Methoden nur erbracht wurde, wenn eine bestimmte Expressionsrate überschritten wurde. Aus dem Vergleich der ermittelten Daten mit den bereits veröffentlichten Daten zur Verteilung des 5-HT_{1A}-Rezeptors, dessen mRNA und dessen Bindungsstellen wird jedoch ersichtlich, dass die Detektionsgrenze der zwei eingesetzten Methoden sehr niedrig ist. In Gebieten, die nur schwach positiv für entweder 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA oder β -Galactosidaseaktivität waren, könnten die angesprochenen Detektionsgrenzen jedoch für den fehlenden Nachweis der Kolokalisation verantwortlich sein.

Insgesamt lässt sich aus den *in vivo* Ergebnissen schlussfolgern, dass zwischen -4,5 kb und -20 kb zwei Promotoreigenschaften kodiert werden. Zum einen eine neuronale Repression zwischen -4,5 kb und -5,5 kb und zum anderen eine (Re)Aktivierung zwischen -5,5 kb und -20 kb, die stark zur Spezifität der vermittelten Expression in Bezug auf die endogene 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression beiträgt. Während also 4,5 kb Konstrukt und 5,5 kb Konstrukt vermittelte Expression in Gebieten mit β -Galactosidaseaktivität nur einen Teil der endogenen 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression widerspiegelt, führt diese spezifische Reaktivierung mit dem 20

kb Konstrukt zu einer nahezu vollständigen Expression in der 5-HT_{1A}-Rezeptor-positiven Zellpopulation in β -Galactosidase-positiven Gebieten.

Interessanter Weise wurde die neuronale Repression des 5,5 kb Konstruktes nicht in den *in vitro* Versuchen mit NG108-15-Zellen beobachtet. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit der Komplementierung von *in vitro* Studien durch *in vivo* Studien. Da Sequenzhomologie ein guter Marker für die Funktionalität putativer Cis-Elemente ist (Abb. 3.1), analysierten wir den Sequenzbereich zwischen -4,5 kb und -5,5 kb der Maus und des Menschen auf putative homologe Repressorelemente. Es konnten keine offensichtlichen Sequenzmotive identifiziert werden, was darauf hindeutet, dass komplexe Mechanismen, die sekundäre und/oder tertiäre DNA Strukturen beinhalten, und/oder noch nicht identifizierte Transkriptionsfaktorbindungsstellen dieser Eigenschaft zugrunde liegen.

Ein wichtiger Punkt, der aus der bisherigen Diskussion ausgeklammert wurde, ist die Tatsache, dass nur relativ wenige der transgenen Linien β -Galactosidaseaktivität in den Raphekernen aufweisen. Die Raphekerne, vor allem der dorsale und der mediane Raphekern, sind die Hauptgebiete der präsynaptischen Lokalisation der 5-HT_{1A}-Rezeptoren, die dort die serotonerge Innervation und somit Konnektivität weiter Gebiete des ZNS regulieren. Die serotonergen Zellen der dorsalen Raphe innervieren weite Bereiche des Vorderhirns und enthalten etwa die Hälfte der serotonergen Neuronen des ZNS (Stamford et al. 2000). Wenig ist bisher über die Regulation der Genexpression in der Raphe bekannt, jedoch scheint der ETS-Domänen Transkriptionsfaktor Pet-1 ein spezifischer Marker für serotonerge Neuronen der Raphe zu sein (Hendricks et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Transkriptionsfaktor im Promotor des Gens des Serotonintransporters, der Tryptophan-5-Hydroxylase, der aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase und auch des 5-HT_{1A}-Rezeptors bindet (Hendricks et al. 1999). Obwohl elf weitere putative Pet-1-Bindungsstellen identifiziert wurden, die über den gesamten analysierten 5,5 kb langen 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotorbereich verteilt liegen und von denen einige in Ratte und/oder Mensch konserviert sind, deutet das Fehlen einer ausgeprägten *LacZ*-Expression darauf hin, dass die Regulation der Genexpression in der Raphe bedeutend komplizierter ist und nicht ausschließlich durch das Vorhandensein von Pet-1-Bindungsstellen determiniert wird. Dieser Befund unterstreicht auf ein Neues die Wichtigkeit von *in vivo* Studien zur Komplementierung von Ergebnissen aus Sequenzanalysen und *in vitro* Studien und deutet auf die Existenz von DNA-Elementen außerhalb des analysierten 20 kb Bereiches hin, die eine gewebsspezifische Expression, vor allem in Hinblick auf Rapheexpression und, wie oben erwähnt, Expression in der Peripherie, vermitteln.

Auch für die Verteilung der β -Galactosidaseaktivität in der pränatalen und frühen postnatalen Entwicklung wurden für die Linien der drei verschiedenen Konstrukte, aber auch für die verschiedenen unabhängigen Linien eines Konstruktes, unterschiedliche Muster gefunden. Es konnten jedoch die folgende Regeln beobachtet werden, die der 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression im Wildtyp entsprechen (Hellendall et al. 1992; Hillion et al. 1993; Hery et al. 1999; Gross et al. 2002). Linien mit starker Expression in der Raphe im adulten Tier, vor allem des dorsalen Raphekerns, wiesen auch β -Galactosidaseaktivität in den Gebieten der embryonalen Raphe auf. Hierbei lies sich beobachten, dass die Transgenexpression dem von Hillion et al. (1993) in der Ratte beobachteten temporalem Verlauf der 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression entsprach. Expression setzte zwischen E12,5 und E14,5 ein, war zwischen E14,5 und E18,5 relativ stark, sank um P1,5 ab und stieg in P7,5 und P14,5 wieder an. Die Expression im Vorderhirn entsprach mit einer Ausnahme (Linie A2379) ebenfalls der kürzlich veröffentlichten endogenen 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression der Maus (Gross et al. 2002). Die Transgenexpression setzt um E18,5 mit niedriger Aktivität ein und nimmt graduell bis zum Erreichen des adulten Expressionsmuster und dessen Intensität zu. Eine interessante Beobachtung ist die zeitlich versetzte Aktivierung der Transgenexpression im rostralen und kaudalen Bereich des Hippocampus, was auf einer differenziellen Innervierung durch verschiedene Bereiche der Raphe beruhen könnte, wie sie für den ventralen und dorsalen Bereich des Hippocampus beschrieben wurde (McQuade und Sharp 1997).

Obwohl in Bezug auf das Vorkommen bzw. die Lokalisation des 5-HT_{1A}-Rezeptors im embryonalen Rückenmark relativ wenig bekannt ist erscheint es nicht unwahrscheinlich, dass die gefundene Transgenexpression der Wildtyp-Situation entspricht (Zhang et al. 1997). Auch die beobachtete, jedoch nicht systematisch charakterisierte Expression in Bereichen der Zahnanlagen sowie des craniofacialen Mesenchyms wurde für die endogene 5-HT_{1A}-Rezeptorlokalisierung bzw. 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression beschrieben (Lauder et al. 1994; Moiseiwitsch und Lauder 1995; Moiseiwitsch et al. 1998). Die in einer der -4,5 kb Linien beobachtete Expression in den dorsalen Wurzelganglien stellt unserer Ansicht nach ein nicht gesichert spezifisches Ergebnis dar, da Promotor-*LacZ* Konstrukte in einigen Fällen dazu neigen, in transgenen Ansätzen Expression in dieser Region, nicht in erster Linie abhängig von der Wahl des Promotors, zu vermitteln (eigene Beobachtungen; persönliche Mitteilung: Dr. Annette Damert, Dr. Ben Davies).

Nach der Ermittlung der Funktionalität und Charakterisierung dieser Promotorfragmente *in vivo*, ist eine wichtige Erwägung der mögliche Einsatz dieser Fragmente zur funktionellen Analyse des serotonergen Systems. Die Promotorfragmente könnten in Studien zur Überexpression spezifischer Transgene, wie beispielsweise Serotonin-Rezeptorgenen, verwendet werden. Je nach

Fragestellung könnten transgene Linien erzeugt werden, die in einem weiten Bereich 5-HT_{1A}-Rezeptor-positiver Neuronen oder aber nur in einem bestimmten Untergebiet exprimieren. Das Fehlen einer starken und konsistenten Expression in den Raphekernen kann hierfür sowohl von Nachteil als auch von Vorteil sein. Es ermöglicht beispielsweise ein Rettungsexperiment des existierenden 5-HT_{1A}-Rezeptor „knockouts“ in postsynaptischen Gebieten ohne das Auftreten ektopischer Expression (vgl.: Gross et al. 2002).

Es wurden erste funktionelle Analysen in Bezug auf die spezifische Regulation der Aktivität der verschiedenen 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotorfragmente *in vitro* durch Hormone durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass das -4,5 kb Konstrukt in NG108-15-Zellen in Serum-freiem Medium eine differenzielle Aktivität nach Gabe von Aldosteron (10 µg/ml) bzw. Dexamethason (500 ng/ml) aufweist. Die Aktivität unter Dexamethason war etwa 10-fach erhöht im Vergleich zu der Aktivität unter Aldosteron. Der Vergleich zu den Messwerten der anderen Konstrukte lässt vermuten, dass es sich bei dem beobachteten Effekt sowohl um eine Aktivierung durch Dexamethason als auch um eine Inhibierung durch Aldosteron handelt. Eine gesicherte Aussage über die Ursprünge dieses Effektes lässt sich jedoch nicht treffen, da es uns nicht möglich war Referenzmesswerte von unbehandelten Zellen, denen das Serum aus dem Medium entzogen wurde, zu erhalten. Zudem ist der totale Serumentzug zwar ein definierter jedoch äußerst unspezifischer Eingriff in die Kulturbedingungen, was eine Aussage über den zugrunde liegenden Mechanismus des beobachteten Effekts weiter erschwert. Ein nicht so definierter, jedoch weitaus spezifischerer Eingriff ist die Behandlung des verwendeten Serums mit Aktivkohle. Diese Methode wird gängiger Weise eingesetzt, um Steroidhormone aus dem Serum zu entfernen (s. 2.2.2). In Transfektionsstudien mit auf diese Weise behandeltem Serum ließ sich der ursprünglich beobachtete Effekt jedoch nicht reproduzieren. Vielmehr zeigte sich ein transkriptionsaktivierender Trend durch Aldosteron- und Dexamethason-Gabe, der für das -20 kb Konstrukt statistisch signifikant war ($p < 0,01$ für Aldosteron und $p < 0,001$ für Dexamethason). Ferner waren die Aktivitäten der drei langen Konstrukte ohne Gabe von Aldosteron oder Dexamethason im Vergleich zu den Werten aus den Messungen mit unbehandeltem Serum schwächer (-4,5 kb Konstrukt: nicht signifikanter Trend; -5,5 kb Konstrukt: $p < 0,01$; -20 kb Konstrukt: $p < 0,001$). Um diese zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse zu erklären, sind die folgende Überlegungen zu beachten. Bei der Regulation der Aktivität der Promotorfragmente, vor allem der drei langen, handelt es sich um eine multifaktorielle Regulation. Viele Transkriptionsfaktoren, generelle und nicht-generelle, sowie Proteine, die mit Transkriptionsfaktoren wechselwirken, bestimmen in der Summe, der durch sie vermittelten Effekte, die Transkriptionsrate der untersuchten Promotorfragmente. Das *in vitro* System ist immer ein semi-

artifizielles System, das der *in vivo*-Situation sehr nahe kommen kann, es jedoch in den seltensten Fällen vollständig repräsentiert. Abhängig vom Zustand dieser Systeme, d.h. in erster Linie von dem Komplex an exprimierten und aktivierten Transkriptionsfaktoren, kann eine spezifische Regulation analysiert werden. In unserem Fall ist bekannt, dass *in vivo* in der Ratte eine Repression der Expression des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens durch Kortikosteron vermittelt wird (Chalmers et al. 1993; Zhong und Ciaranello 1995). Diese Repression ist Zell-Typ-spezifisch und scheint sich auf die CA1-, CA3- und Gyrus Dentatus-Region des Hippocampus zu beschränken (Meijer und de Kloet 1994; Tejani-Butt und Labow 1994), obwohl auch andere Gebiete des Gehirns der Ratte eine Kolo-kalisation von 5-HT_{1A}-Rezeptor und GR bzw. MR aufweisen. In den analysierten NG108-15-Zellen konnte zwar eine Koexpression von dem 5-HT_{1A}-Rezeptorgen, dem GR-Gen und dem MR-Gen nachgewiesen werden, dies allein scheint jedoch nicht die Aldosteron bzw. Dexamethason vermittelte Regulation der 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression zu determinieren. Aus *in vitro* Studien ist beispielsweise bekannt, dass die p65/Sp1, jedoch nicht p65 stimulierte Transkription durch MR und beide durch GR inhibiert werden (Meijer et al. 2000). Im Falle der beobachteten transkriptionsaktivierenden Wirkung von Aldosteron und Dexamethason könnte es sich um eine Überlagerung verschiedener Effekte handeln: Aktivkohle behandeltes Serum könnte in NG108-15-Zellen zu einer niedrigeren Expression bzw. Aktivität von SP1 und NF-kB im Vergleich zu unbehandeltem Serum führen und so die beobachtete Verringerung der transkriptionellen Aktivität der drei langen Promotorfragmente erklären. Gabe von Dexamethason oder Aldosteron könnte die Expression bzw. Aktivität von SP1 und NF-kB erhöhen und somit zu einer Erhöhung der Aktivität der drei langen Promotorfragmente führen. Gleichzeitig könnte über GR bzw. MR zwar beispielsweise eine direkte Inhibition der SP1 und NF-kB vermittelten Expression wie oben beschrieben stattfinden, in der Summe der Effekte liegt die Aktivität jedoch noch über der der nicht mit Hormonen versetzten Zellen. Aus diesen Überlegungen wird deutlich, dass die Wahl und Charakterisierung des zu verwendenden *in vitro* Systems für derartige Analysen von nicht zu überschätzender Bedeutung ist. Vor allem in Bezug auf die Charakterisierung werden die neueren Methoden zur Transkriptom- und Proteomanalyse einen großen Beitrag leisten.

Aus den Ergebnissen zur Analyse des 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotorbereichs zwischen Position -1587 bp und -3160 bp mittels Deletions- und Mutationskonstrukten lässt sich schlussfolgern, dass dieser Bereich keine funktionellen Cis-Elemente enthält, die die Aktivität des 4,5 kb Konstruktes unter den gewählten Bedingungen in NG108-15-Zellen signifikant beeinflussen.

Praktischer Ausblick für die Arbeiten auf dem 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse zum 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor haben die Grundlagen für weitergehende detaillierte Analysen geschaffen. Zum einen werden die charakterisierten Promotorfragmente momentan im transgenen Ansatz auf die *in vivo* Regulation ihrer Aktivität hin untersucht. Von besonderem Interesse ist hierbei die Regulation durch 5-HT_{1A}-Rezeptoragonisten und -antagonisten sowie durch die serotonerge Neurotransmission verändernde Pharmaka, wie Fluoxetin (die entsprechenden Arbeiten werden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Theuring von Dr. Heike Kusserow und Frau Cornelia Tanneberger durchgeführt). Erste Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine differentielle Regulation der untersuchten Promotorfragmente in verschiedenen Gehirnregionen stattfindet. Zum anderen werden die Promotorfragmente in *in vitro* Ansätzen zur Identifikation und Charakterisierung von spezifischen Promotorelementen eingesetzt (die entsprechenden Arbeiten werden in der Arbeitsgruppe von Dr. Patel Paresh durchgeführt).

Ein weiteres Einsatzgebiet für die charakterisierten Promotorfragmente ist die Verwendung in transgenen Ansätzen. Das 4,5 kb Promotorfragment wurde bereits erfolgreich zur Überexpression des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens in transgenen Mäusen und Ratten eingesetzt (die entsprechenden Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Theuring von Dr. Heike Kusserow durchgeführt). Ferner werden die Promotorfragmente momentan eingesetzt, um transgene Mäuse zu etablieren, die das Gen des reversen Tetracyclin Transaktivators rtTA und der bakteriellen DNA Rekombinase CRE in spezifischen Gehirnregionen exprimieren (die entsprechenden Arbeiten werden in der Arbeitsgruppe von Dr. Hen durchgeführt).

4.2 Der 5-HT₇-Rezeptorgen Promotor

Der 5-HT₇-Rezeptor scheint evolutionsbiologisch einer der ältesten 5-HT-Rezeptoren zu sein (Peroutka und Howell 1994). Die Klonierung und funktionelle Charakterisierung des 5-HT₇-Rezeptors führten in den letzten Jahren zur der Entwicklung spezifischer Oligonukleotide, Ribonukleinsäuresonden, Liganden und Antikörper, mit deren Hilfe die Verteilung und in einigen Fällen auch die Regulation des 5-HT₇-Rezeptors bzw. dessen mRNA untersucht wurde (s. 1.2.2). Die molekularen Prozesse, die die zellspezifische Expression des 5-HT₇-Rezeptorgens determinieren und regulieren, sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit präsentierten Analysen zur Identifikation und initialen Charakterisierung des 5-HT₇-Rezeptorgen Promotors liefern erste Ergebnisse zur Klärung dieser molekularen Prozesse.

Der Promotor des murinen 5-HT₇-Rezeptorgens wurde identifiziert, kloniert und sequenziert. Es konnten mehrere Transkriptionsstartpunkte im GC-reichen proximalen Promotorbereich

zwischen -89 bp und -192 bp sowie ein Transkriptionsstartpunkt weiter stromaufwärts bei -627 bp identifiziert werden. In ersten Versuchen zur Analyse der Transkriptionsstartpunkte im proximalen Promotorbereich (-1 bp bis -300 bp) wurde neben RNA der Maus auch RNA der Ratte (Sprague-Dawley-Auszuchtstamm) und RNA aus NG108-15-Zellen untersucht. Das Muster der Primerextension-Versuche stimmte in den RNA-Spezies überein (Daten nicht gezeigt), was auf eine Konservierung der Transkriptionsstartpunkte in Maus und Ratte hindeutet. Der Transkriptionsstartpunkt bei -627 bp liegt außerhalb des GC-reichen Bereichs, 21, 35 bzw. 49 Basenpaare stromabwärts dreier putativer TATA-Boxen. In der humanen Sequenz finden sich an der homologen Stelle zwei putative TATA-Boxen. Sequenzinformationen der Ratte standen nicht zur Verfügung. Ein Transkriptionsstartpunkt an Position -124 bp wird von einer Initiator-Consensus-Sequenz (Inr) umgeben. Es konnten im analysierten Promotorbereich keine konservierten CCAAT-Boxen identifiziert werden.

Die Mehrzahl der bislang analysierten Promotoren besitzen *einen* Bereich, von dem aus die Transkription initiiert wird. TATA-Box initiierte Transkriptionsinitiation weist meist einen distinkten Transkriptionsstartpunkt auf, der im Bereich einer Inr liegen kann (TATA+ Inr+) aber nicht muss (TATA+ Inr-) (Novina und Roy 1996; Stargell und Struhl 1996; Tjian 1996; Buratowski 1997). GC-reiche Sequenzen hingegen vermitteln Transkriptionsinitiation in der Regel ausgehend von mehreren Transkriptionsstartpunkten (Blake et al. 1990; Hapgood et al. 2001). Nicht zuletzt wegen der Homologie der TATA-Box der Eukaryoten zu der Pribnow-Box in Prokaryoten, wegen des häufigen Vorkommens der TATA-Box in viralen Promotoren und wegen seines stringenten Transkriptionsinitiations-vermittelnden Mechanismus ist die TATA-Box das bislang best charakterisierteste Promotorelement. Lange Zeit wurde angenommen, dass die TATA-Box in der großen Mehrzahl von Promotoren eukaryotischer Gene vorhanden ist, die von der RNA Polymerase II transkribiert werden und dass GC-Boxen lediglich die Transkriptionsinitiation von „Housekeeping“ Genen und einigen anderen speziellen Genen vermitteln (Darnell et al. 1990; Stryer 1990). Vor allem ausgelöst durch die Fortschritte in der Genomforschung verdichten sich jedoch die Hinweise, dass GC-reiche Sequenzen in der Mehrzahl eukaryotischer Promotoren vorhanden sind und dort die Transkription der betroffenen Gene initiieren. Eine Studie zur Identifikation und Charakterisierung potentieller Promotorregionen von 1031 humanen Genen ergab beispielsweise, dass nur 32% der potentieller Promotorregionen TATA-Boxen enthielten, 85% enthielten Inr Sequenzen und 97% enthielten GC-Boxen; 48% der potentieller Promotorregionen befanden sich in CpG Inseln – DNA Bereichen mit hohem Anteil an CpG-Dinukleotiden (Suzuki et al. 2001).

Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse weisen darauf hin, dass der 5-HT₇-Rezeptorgen Promotor dual aufgebaut ist und die Expression des 5-HT₇-Rezeptorgens tatsächlich von zwei

distinkten Promotoren reguliert wird. Zum einen von einem von einem typischen TATA⁺ Inr⁻ Promotor, der die Transkriptionsinitiation ausgehend von einem Startpunkt vermittelt und zum anderen von einem TATA⁻ GC-reichen Promotor, der multiple Transkriptionsstartpunkte enthält. Diese Separation in zwei Promotoren muss jedoch noch durch den Nachweis einer unabhängigen Regulation der Transkription ausgehend von den zwei Transkriptionsstartbereichen bewiesen werden. Einige Beispiele für Promotoren mit derartigem Aufbau lassen sich in der Literatur finden. Hierzu zählen unter anderem der humane *Mucin4*-Promotor (Perrais et al. 2001), der humane *gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit*-Promotor (Mulcahy und Gipp 1995), der humane *furin*-Promotor (Ayoubi et al. 1994) und der murine *carbonic anhydrase II*-Promotor (Marino 1993). Für das *furin* Gen konnte gezeigt werden, dass dessen Transkription durch drei distinkte Promotoren initiiert und differentiell reguliert werden kann (Ayoubi et al. 1994).

Die 550 bp lange GC-reiche Region des murinen 5-HT₇-Rezeptorgen Promotors enthält u.a. mehrere putative Bindungsstellen für SP1, eine putative MAZ- und eine putative CTF/NF1-Bindungsstelle, die in der Sequenz des Menschen und der Ratte (sofern die homologe Sequenzinformation zur Verfügung stand) konserviert sind, was auf eine funktionelle Relevanz dieser Sequenzelemente hindeutet. Zwei der putativen SP1-Bindungsstellen liegen im Bereich mehrerer Transkriptionsstartpunkte und könnten maßgeblich für die Transkriptionsinitiation in diesem Bereich verantwortlich sein. Eine analoge Situation wurde für mehrere GC-reiche Promotoren - z.B. dem 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor (Parks und Shenk 1996)– beschrieben. Zur Überprüfung dieser Hypothese müssten diese putativen Bindungsstellen weitergehend biochemisch und funktionell charakterisiert werden. Auch MAZ und CTF/NF1 spielen in vielen Promotoren eine zentrale Rolle (Azizkhan et al. 1993; Gronostajski 2000). Die Position ihrer putativen Bindungsstellen im 5-HT₇-Rezeptorgen Promotor relativ zu den Transkriptionsstartpunkten lässt vermuten, dass sie – falls funktionell – eher transkriptionsaktivierend/-regulierend wirken, als direkt an der Transkriptionsinitiation beteiligt zu sein. GC-reiche Sequenzen können mit einer relativ großen Anzahl weiterer DNA bindender Proteine interagieren (Azizkhan et al. 1993), die an der Rekrutierung und Zusammenstellung des aktiven Transkriptionskomplexes teilnehmen könnten, was eine exklusive Rolle von SP1 in diesem Prozess unwahrscheinlich erscheinen lässt, eine zentrale Rolle jedoch nicht ausschließt.

Vor allem *max* und *sp1* werden in den meisten, wenn nicht allen, Geweben einschließlich dem Gehirn exprimiert (Saffer et al. 1991; Bossone et al. 1992) und sind demnach eher Kandidaten für Transkriptionsfaktoren, die eine basale konstitutive Expression vermitteln. Gewebsspezifische Expression wird vermutlich durch eine Vielzahl weiterer Transkriptionsfaktoren vermittelt.

Zur besseren Charakterisierung des 5-HT₇-Rezeptorgen Promotors wurden vier unterschiedlich langer Promotorfragmente in insgesamt vier verschiedenen Zelltypen analysiert. Wie für die *in vitro* Analysen des 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotors wurden hierfür COS-7-Zellen, differenzierte und undifferenzierte PC12-Zellen und NG108-15-Zellen verwendet, wobei NG108-15-Zellen das 5-HT₇-Rezeptorgen endogen exprimieren. In keiner der gewählten Zelllinien konnte mit den verwendeten Konstrukten eine spezifische Aktivität nachgewiesen werden. Deletionsstudien ergaben, dass diese unspezifische Repression der Promotoraktivität zumindest zum Teil durch einen Bereich zwischen -22 bp und -107 bp vermittelt wird. Die analysierten Promotorfragmente, denen dieser Bereich fehlt, weisen allesamt in NG108-15- im Vergleich zu COS-7- und PC12-Zellen die stärkste Aktivität auf. Nichtsdestotrotz waren sie auch in COS-7- und PC12-Zellen aktiv (mit der Ausnahme des -4,2 kb Fragments in undifferenzierten PC12-Zellen). Die identifizierte repressorische Region ist demnach sowohl in 5-HT₇-Rezeptor mRNA-positiven als auch in 5-HT₇-Rezeptor mRNA-negativen Zellen aktiv. Elemente, die die Expression des in 5-HT₇-Rezeptorgen aktivieren, sind auf dem -1,2 kb Fragment lokalisiert und wirken sich in 5-HT₇-Rezeptor mRNA-positiven Zellen stärker aus als in 5-HT₇-Rezeptor mRNA-negativen Zellen. Signifikante Aktivitätsunterschiede zwischen den verschiedenen Deletionsfragmenten konnten nur in NG108-15-Zellen detektiert werden; das -1,2 kb Fragment wies die stärkste Aktivität auf, die Aktivität des -2,1 kb und -3,5 kb Fragments war im Vergleich zu der des -1,2 kb Fragments um etwa 40% reprimiert, die des -4,2 kb Fragments um etwa 20%. Neben den aktivierenden Cis-Elementen des -1,2 kb Fragments scheinen demnach zwischen -1,2 kb und -2,1 kb repressorische Aktivitäten kodiert zu sein und zwischen -3,5 kb und -4,2 kb (re)aktivierende. Das Fehlen signifikanter Aktivitätsunterschiede in 5-HT₇-Rezeptor mRNA-negative Zellen deutet darauf hin, dass diese beobachteten Eigenschaften für die Regulation in 5-HT₇-Rezeptor mRNA-positiven Zellen verantwortlich sind und somit die „Feinregulation“ der 5-HT₇-Rezeptorgenexpression determinieren bzw. regulieren. Zusammengefasst lässt sich das in Abbildung 3.30 wiedergegebene Modell aufstellen. Hierbei ist zu beachten, dass sich der Transkriptionsblock auf beide Bereiche der Transkriptionsinitiation auswirkt und sowohl in 5-HT₇-Rezeptor mRNA-positiven als auch -negativen Zellen aktiv ist. Die spezifische Expression des endogenen 5-HT₇-Rezeptorgen wird hiernach durch eine spezifische Aufhebung des Transkriptionsblocks durch noch nicht identifizierte Bereiche außerhalb des analysierten -4,2 kb Bereiches des 5-HT₇-Rezeptorgen Promotors ermöglicht bzw. determiniert.

Der 86 bp lange deletierte Bereich enthält putative Bindungsstellen für die Repressoren GCF und WT1 und die transkriptionellen Regulatoren der *early growth response* Familie (NGF1-A/NGF1-C) sowie für CTF/NF1 und zwei für SP1, wobei die Bindungsstelle für GCF mit einer für SP1 überlappt und die für WT1, NGF1-A/NGF1-C, CTF/NF1 und die zweite SP1

überlappen. Ob diese Transkriptionsfaktoren an der funktionellen Regulation des 5-HT₇-Rezeptorgen Promotors im Bereich der deletierten Stelle beteiligt sind und wenn ja, welche, müsste über weitergehende biochemische Analysen ermittelt werden. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse sowie die Repression in NG108-15-Zellen deutet jedoch an, dass die beobachtete Repression nicht durch einen einzelnen bekannten starken Repressor vermittelt wird, der das komplementäre Expressionsmuster des 5-HT₇-Rezeptorgens aufweist, wie dies für mehrere Gene mit pan-neuronaler Expression berichtet wurde (Chong et al. 1995; Schoenherr und Anderson 1995; Schoenherr und Anderson 1995). Vielmehr scheint eine Kombination aus verschiedenen repressorischen und (re)aktivierenden Elementen notwendig zu sein, um das spezifische begrenzte Expressionsmuster des 5-HT₇-Rezeptorgen zu determinieren. Der TATA GC-reichen Promotor des D2-Dopamin-Rezeptorgens (*D2*) enthält ebenfalls einen Bereich, von dem eine starke inhibitorische Aktivität ausgeht. Ähnlich dem identifizierten Bereich des 5-HT₇-Rezeptorgens ist dieser Bereich GC-reich und enthält überlappende Bindungsstellen, in diesem Fall für SP1, SP3 und den Dopamin-Rezeptor regulierenden Faktor DRRF (Minowa et al. 1994; Yajima et al. 1998; Hwang et al. 2001). In transienten Transfektionsstudien aktiviert SP1 den *D2*-Promoter, für SP3 konnten dagegen keine direkten aktivitätsmodulierenden Eigenschaften nachgewiesen werden (Yajima et al. 1998). DRRF inhibiert die *D2*-Promotoraktivität in spezifischen neuronalen Populationen (Hwang et al. 2001). Diese Region des *D2*-Promotors weist zwar keine absolute funktionelle Analogie zu der des 5-HT₇-Rezeptorgen Promotors auf, sie verdeutlicht aber die komplexe mechanistische Funktionsweise und Regulation, die von der identifizierten inhibitorischen Region im 5-HT₇-Rezeptorgen Promotor ausgehen kann.

Im weiteren Verlauf der Analyse der Transkription des 5-HT₇-Rezeptorgens wurden diverse neue Spleißvarianten identifiziert, kloniert und sequenziert. Das Hauptaugenmerk wurde in bisherigen Analysen auf die Identifikation und Charakterisierung von 5-HT₇-Rezeptorgen Spleißvarianten im Bereich des Introns 2 und damit des cytosolischen C-terminalen Bereichs gelegt (z.B.: Heidmann et al. 1997; Heidmann et al. 1998 - s. Einleitung). Shen und Mitarbeiter beschrieben jedoch schon 1993 in der Ratte eine Spleißvariante im Bereich von Intron 1, die zu einem Abbruch der vorhergesagten Aminosäuresequenz in der zweiten intrazellulären Schleife führt. Eine Analyse der 5-HT₇-Rezeptor mRNAs mittels RT-PCR ergab, dass sowohl in Maus als auch in Ratte mehrere unterschiedliche 5-HT₇-Rezeptor mRNAs vorkommen, die sich in ihrer Länge des 3'-Bereichs des ersten Exons unterscheiden. Durch Klonierung und Sequenzierung der Mausvarianten konnten insgesamt sechs verschiedene Spleißvorgänge identifiziert werden. Nur einer dieser Spleißvorgänge involvierte ein neues alternatives Exon, Exon E, in Intron 1. Diese Variante ist wahrscheinlich das Maus-Homolog zu der von Shen und Mitarbeitern (1993)

in der Ratte beschriebenen 5-HT₇-Rezeptorspleißvariante. Die restlichen fünf Spleißvorgänge traten innerhalb von Exon 1 an internen Spleiß-Donor und Spleiß-Akzeptor Stellen auf und führten allesamt zu „in frame“-Deletionen. Keine der Spleiß-Donor/Spleiß-Akzeptor Paare folgte den herkömmlichen Spleiß-Regeln (GT-AG, GC-AG oder AT-AC). Drei Spleiß-Donorstellen enthalten jedoch ein GC-Dinukleotid und eine Spleiß-Akzeptorstelle enthält ein AC-Dinukleotid. Vier der fünf Spleißstellen bestehen aus fünf bis sieben Basenpaar langen „direct repeats“, von denen jedoch keins zuvor im Zusammenhang mit Spleißvorgängen beschrieben wurde. Die Wahrscheinlichkeit eines zufälligen/fehlerhaften Spleißvorgangs eine Deletion hervorzurufen, die den Leserahmen nicht verschiebt, ist $p_{if} = 0,33$. Die Wahrscheinlichkeit, dass keiner von fünf unabhängigen zufälligen/fehlerhaften Spleißvorgängen den Leserahmen verschiebt ist $p_{if}^5 = 0,0041$. Allein diese Überlegung deutet darauf hin, dass die identifizierten 5-HT₇-Rezeptorspleißvarianten eine funktionelle Relevanz besitzen und nicht Produkt fehlerhaften Spleißens sind, was durch das > 100 kb lange folgende Intron I nahegelegt werden könnte.

Eine Sequenzanalyse der identifizierten Spleißvarianten ergab, dass nur zwei der sechs Varianten nach Translation ein Protein bilden, das die klassische 7TM Struktur besitzt ($\Delta 45$ und $\Delta 12$). Für drei Varianten wird eine 5TM Struktur vorhergesagt ($\Delta 85$, $\Delta 119$ und $\Delta 148$) und die Spleißvariante, die durch Verwendung des alternativen Exons E gebildet wird, bricht, wie von Shen und Mitarbeiter (1993) für die Spleißvariante der Ratte beschrieben, in der vorhergesagten Aminosäuresequenz in der zweiten intrazellulären Schleife ab. Die bislang beschriebenen Neurotransmitter- bzw. Hormonrezeptorspleißvarianten der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, für die vollständige Funktionalität, d.h. Lokalisation in der Plasmamembran, Bindung von Neurotransmittern bzw. Hormonen und Kopplung an Signaltransduktionsketten bzw. -netze, nachgewiesen werden konnte, besitzen eine vorhergesagte 7TM Struktur (Kilpatrick et al. 1999). Sie unterscheiden sich durch eine veränderte Lokalisation innerhalb der Plasmamembran, durch ein verändertes Bindungsverhalten endogener Liganden oder spezifischer Pharmaka und/oder durch eine veränderte Signaltransduktion (Gudermann et al. 1996; Kilpatrick et al. 1999). Spleißvarianten mit einem Verlust der 7TM Struktur verlieren hingegen wahrscheinlich immer zumindest eine der drei genannten Funktionalitäten. Eine 5-HT₆-Rezeptorspleißvariante mit einem Abbruch der Polypeptidsequenz innerhalb der zweiten intrazellulären Schleife befindet sich zwar beispielsweise in der Plasmamembran, verliert jedoch die Fähigkeit Serotonin zu binden und an G-Proteine zu koppeln (Olsen et al. 1999). Auch eine Spleißvariante des 5-HT_{2C}-Rezeptors, die nur noch die ersten zwei Transmembrandomänen besitzt, findet sich in Zellmembran-Homogenaten transient transfizierter Fibroblasten, bindet jedoch keine 5-HT_{2C}-Rezeptor-spezifischen Liganden mehr (Canton et al. 1996). Für den D3-

Dopamin-Rezeptor wurden ähnliche Spleißvarianten beschrieben (Giros et al. 1991; Snyder et al. 1991; Fishburn et al. 1993). Die Lokalisation der verkürzten Rezeptormoleküle legt nahe, dass sie zumindest eine regulierende/modulierende Funktion besitzen, die über Protein-Protein Interaktionen vermittelt wird, wodurch sie in die Signaltransduktion der 7TM-Rezeptoren eingreifen können. Für eine GABA_BR1-Isoform, GABA_BR1e, die ihre 7TM Struktur völlig verloren hat und löslich ist, konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sie nach wie vor mit GABA_BR2 dimerisieren kann (Schwarz et al. 2000). Die Bindungsaffinität ist hierbei stark genug, um die „normale“ GABA_BR1/GABA_BR2 Assoziation zu lösen, was den Schluss nahe legt, dass GABA_BR1e ein wichtiger Regulator für die Bildung eines funktionalen GABA_B-Rezeptorkomplexes ist. Welche funktionalen Eigenschaften die identifizierten 5-HT₇-Rezeptorspleißvariante besitzen, muss in weitergehenden Analysen ermittelt werden. Vor allem ist es wichtig zu ermitteln, ob die verschiedenen 5-HT₇-Rezeptor mRNAs translatiert werden. Weiterhin ist ihr relatives Vorkommen in Bezug auf die 5-HT₇-Rezeptorspleißvariante mit 7TM Struktur aufzuklären. Erste Hinweise lassen sich hierfür aus der relativen Stärke der Hybridisierungssignale der RT-PCR-Versuche ableiten. Danach finden sich im Gehirn der Maus vorwiegend Transkripte der 5-HT_{7(a)}- (und evtl. 5-HT_{7(b)}, (c), (d)-) Rezeptoren sowie der 5-HT_{7(e)}-Rezeptoren. Das Vorkommen der Transkripte der Spleißvarianten mit „in frame“-Deletionen ist geringer. Da für diese Versuche Gesamtgehirn-RNA verwendet wurde, lässt sich keine Aussage über die relative Verteilung der RNA-Spezies in einzelnen Bereichen des Gehirns treffen. Versuche zur Analyse der relativen gewebsspezifischen Verteilung der identifizierten 5-HT₇-Rezeptortranskripte werden klären, ob die angedeuteten relativen Häufigkeiten homogen in allen endogen 5-HT₇-Rezeptorgen-exprimierenden Gebieten aufzufinden sind, oder ob die Daten der RT-PCR-Versuche Mittelwerte mit bislang verborgenen Region-spezifischen Unterschieden widerspiegeln.

Praktischer Ausblick für die Arbeiten auf dem 5-HT₇-Rezeptorgen Promotor

Mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnissen zum 5-HT₇-Rezeptorgen Promotor wurden die Voraussetzungen geschaffen, sowohl weitergehende molekulare Analysen durchführen zu können - beispielsweise zur Identifikation des Cis- und Trans-Elements welche für den Transkriptionsblock verantwortlich sind - als auch analog zu den Versuchen zum 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotor *in vivo* Projekte zu initiieren. Zur Analyse der identifizierten Spleißvarianten sind Arbeiten zur Ermittlung der Expressionsprofile in Planung (die entsprechenden Arbeiten sollen in der Arbeitsgruppe von Dr. Gingrich durchgeführt werden). Ferner konnte mit den Ergebnissen der Analyse des 5-HT₇-Rezeptorgen Promotors eine „knockout“-Strategie entwickelt werden, die mit großer Wahrscheinlichkeit zu einem totalen

Ausschalten der Transkription aller Spleißvarianten führt. Mäuse, die diesen „knockout“ tragen werden momentan etabliert (die entsprechenden Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Theuring initiiert und werden in der Arbeitsgruppe von Dr. Gingrich weitergeführt).

Allgemeiner Ausblick für die Arbeiten auf dem 5-HT_{1A}- und dem 5-HT₇-Rezeptorgen Promotor

Im Kontext der derzeitigen Bemühungen der molekularen Medizin, die zum einen durch die technologischen Möglichkeiten und zum anderen durch die zur Verfügung stehenden (vor allem genetischen) Informationen bedingt werden, bildet die Erforschung der Regulation der Genexpression ein Kerngebiet. Es wird vermutet, dass sich eine große Anzahl der interindividuellen genetischen Variationen auf die Funktion von Promotoren auswirkt. Ferner wird vermutet, dass diese Polymorphismen oftmals ursächlich für Prädispositionen zur Ausprägung von Krankheiten verantwortlich sind. Um die Auswirkungen genetischer Variationen in nicht-kodierenden Regionen des Genoms verstehen und vorhersagen zu können, ist es unerlässlich, die Funktion dieser Regionen zu ermitteln. Auch aus pharmakogenetischer und genterapeutischer Sicht ist die Erforschung von Promotoren von fundamentaler Bedeutung. Wir hoffen aus diesem Grund mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnissen aus der Grundlagenforschung einen Beitrag für die molekulare Medizin leisten zu können.