

***Pharmakologische Eigenschaften natürlich vorkommender Varianten von h5-HT<sub>1A</sub>- und h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren***

***Dissertation***

***zur***

***Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat)***

***der***

***Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät***

***der***

***Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn***

**vorgelegt von**

**Arevat Kostanyan**

**aus Moskau**

**Bonn 2005**

1. Gutachter: Prof. Dr. Manfred Göthert

2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Mohr

Tag der Promotion: 2006

Erscheinungsjahr 2006

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Rezeptoren.....	1
1.2	Serotonin und serotonerges System.....	1
1.2.1	Biosynthese und Metabolismus.....	2
1.2.2	Funktionelle Bedeutung von Serotonin.....	5
1.2.3	Lokalisation serotonerger Neurone im Gehirn.....	5
1.2.4	Serotoninrezeptoren.....	7
1.3	Der h5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor.....	10
1.3.1	Molekularen Eigenschaften.....	10
1.3.2	Lokalisation.....	12
1.3.3	Transduktionsmechanismen.....	13
1.3.4	Pharmakologische Eigenschaften.....	13
1.3.5	Funktionelle Bedeutung.....	14
1.4	Der 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptor.....	16
1.4.1	Molekulare Eigenschaften.....	16
1.4.2	Verteilung im Gehirn.....	19
1.4.3	Funktionelle Bedeutung .....	19
1.5	Fragestellungen.....	20
2	Material und Methoden.....	23
2.1	Material und Geräte.....	23
2.2	Methoden.....	36
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	36
2.2.2	Zellkulturmethoden.....	45
2.2.3	Biochemische und pharmakologische Methoden.....	49
3	Ergebnisse.....	59
3.1	Der h5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor und seine Arg219Leu Variante.....	59
3.1.1	Subklonierung in den pcDNA3-Vektor und in-vitro Mutagenese.....	59
3.1.2	Expression in HEK293-Zellen.....	59
3.1.3	[ <sup>3</sup> H]8-OH-DPAT-Bindung.....	60
3.1.4	[ <sup>35</sup> S]GTPγS-Bindung .....	65
3.1.5	Inhibition der Forskolin-stimulierten cAMP-Akkumulation.....	67
3.2	h5HT <sub>3A</sub> -Rezeptor und seine Pro391Arg und Arg344His Varianten .....	70
3.2.1	In-vitro Mutagenese.....	70
3.2.2	Expression der Mutanten und des Wildtyps in HEK293-Zellen.....	70

3.2.3	[ <sup>3</sup> H]GR65630-Bindung .....	71
4	Diskussion.....	78
4.1	Die natürlich vorkommende Arg219Leu-Variante des h5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptors.....	78
4.2	Potentielle klinische Auswirkungen.....	83
4.3	Der h5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptor und seine Arg344His- und Pro391Arg-Varianten .....	85
4.4	Potentielle physiologische und pathogenetische Auswirkungen der Arg344His-Variante des h5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptors.....	93
5	Zusammenfassung.....	96
6	Anhang.....	99
6.1	Literaturverzeichnis.....	99
6.2	Strukturformeln der Serotonin-Rezeptor-Liganden.....	118
6.3	Abkürzungsverzeichnis.....	121
7	Danksagung.....	124
8	Lebenslauf.....	125

## 1 Einleitung

### 1.1 Rezeptoren

Die Wirkungen von zahlreichen biologisch aktiven Substanzen wie körpereigenen Stoffen und Pharmaka wird durch Rezeptoren vermittelt. Die Rezeptoren sind intrazelluläre oder membranständige Proteine, die nach Bindung eines Agonisten an eine spezifische Rezeptorbindungsstelle einen Effekt hervorrufen. Die Rezeptoren unterscheiden sich hinsichtlich ihrer chemischen Struktur, Lokalisation und Signaltransduktion. Die Entwicklung von modernen molekularbiologischen, molekulargenetischen, biochemisch-pharmakologischen und elektrophysiologischen Methoden hat zu erheblichen Fortschritten in der Rezeptorforschung in den zurückliegenden 25 Jahren geführt.

Dementsprechend konnte in diesem Zeitraum beispielsweise eine Fülle verschiedenartiger Serotonin (5-HT)-Rezeptoren identifiziert und charakterisiert werden. 5-HT-Rezeptoren sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Gegenwärtig werden 14 verschiedene 5-HT-Rezeptoren unterschieden, die sich sieben Rezeptorfamilien (5-HT<sub>1</sub>-5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren) zuordnen lassen. Die Heterogenität der Rezeptoren wird durch das Vorhandensein von genetischen Rezeptorvarianten sogar noch verstärkt.

5-HT-Rezeptoren im Gehirn werden durch Serotonin aktiviert, das aus serotonergen Nerven freigesetzt wird. Deren Zellkörper befinden sich in einer begrenzten Region des Hirnstamms und ihre Axone projizieren in praktisch alle Regionen des Gehirns (und in das Rückenmark). Daher ist es verständlich, daß das Serotoninsystem insgesamt und 5-HT-Rezeptoren im Speziellen in eine große Zahl von Verhaltensprozessen wie Schlaf, Appetit, Angst und Sexualität involviert sind und daß 5-HT-Rezeptoren wichtige Angriffspunkte für Pharmaka sind, zumal da Störungen im serotonergen System eine Reihe von Krankheiten auslösen können.

Die Heterogenität der Rezeptoren ermöglicht viele Einsatzmöglichkeiten für selektive Agonisten und Antagonisten. Andererseits können Abweichungen in der Rezeptorstruktur zu interindividuellen Unterschieden in der Wirkung von Pharmaka führen.

### 1.2 Serotonin und serotonerges System

Serotonin, das zum ersten Mal 1948 aus dem Blutserum als eine vasokonstriktorische Substanz isoliert wurde (Rapport et al., 1948), spielt eine wichtige Rolle als Neurotrans-

mitter im zentralen und peripheren Nervensystem. Außerhalb des ZNS beeinflusst Serotonin verschiedene Körperfunktionen wie Gefäßtonus, Darmmotilität und Thrombozytenaggregation. 90% des Serotonins im Organismus befinden sich in den enterochromaffinen Zellen der Darmschleimhaut. Das durch Zytostatika induzierte Erbrechen ist durch Freisetzung des Serotonins aus diesen Zellen bedingt. Beim Carcinoidsyndrom, einer neoplastischen Entartung der enterochromaffinen Zellen, kommt es zu einer periodischen Freisetzung von 5-HT und anderen Mediatoren wie Substanz P, was zu Diarrhoe, Tachykardie und Bronchospasmus führen kann.

Die restlichen 10% des Serotoningehaltes verteilen sich hauptsächlich auf die Thrombozyten, Mastzellen und das Gehirn. Die Thrombozyten reichern beim Passieren des Kapillarbetts im Darm eine erhebliche Serotoninmenge mit der Hilfe des in der Plasmamembran lokalisierten Transporters an. Dieses Serotonin wird granulär gespeichert und kann bei der rezeptorvermittelten Thrombozytenaktivierung durch Adrenalin, Thromboxan A<sub>2</sub> oder auch Serotonin selbst freigesetzt werden und eine Thrombozytenaktivierung hervorrufen.

### **1.2.1 Biosynthese und Metabolismus**

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) gehört zur Klasse der Monoamin-Neurotransmitter und wird in Cytoplasma aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan synthetisiert. Tryptophan wird zuerst durch die Tryptophan-5-Hydroxylase zu 5-Hydroxytryptophan hydroxyliert und anschließend durch die aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase zu 5-HT decarboxyliert (Abb. 1).

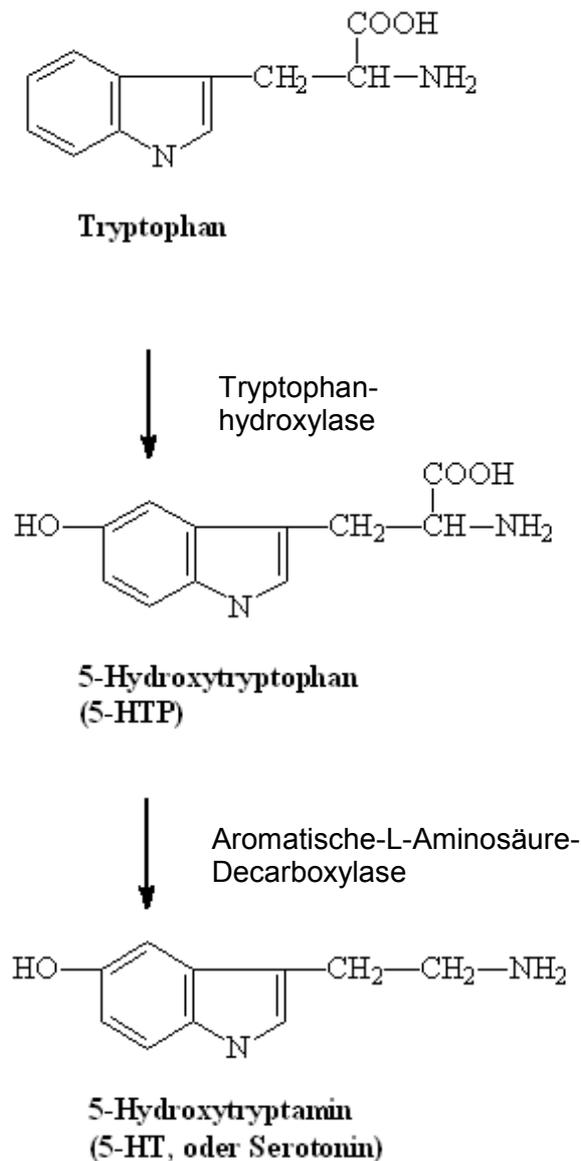


Abbildung 1: Biosynthese von Serotonin

Das so entstandene Serotonin wird durch einen reserpinempfindlichen Transporter in Speichervesikel der Neurone (oder enterochromaffiner Zellen) aufgenommen. Das vesikulär gespeicherte 5-HT wird durch ankommende Aktionspotentiale aus den Axonendigungen in die Synapse mit einer benachbarten Zelle exocytotisch freigesetzt. Aus dem synaptischen Spalt wird der grösste Teil des Serotonins durch den spezifischen 5-HT-Transporter, der mit dem bereits erwähnten Transporter in der Plasmamembran der Thrombozyten identisch ist, in die Axonendigung wiederaufgenommen. Dieser Transporter wird durch selektive und nichtselektive Serotoninrückaufnahme-Inhibitoren, die als Antide-

pressiva therapeutisch eingesetzt werden, blockiert. Innerhalb der Nervenzelle wird Serotonin entweder wieder in Vesikel aufgenommen oder enzymatisch abgebaut.

Der Abbau geschieht hauptsächlich durch die mitochondriale Monoaminoxidase A zu 5-Hydroxyindol-Acetaldehyd und weiter durch die Aldehyd-Dehydrogenase zu 5-Hydroxyindolessigsäure (Abb. 2) oder durch die Alkoholdehydrogenase zu 5-Hydroxytryptophol (Nebenweg). Die Metaboliten werden, auch an Glucuron- und Schwefelsäure gekoppelt, renal ausgeschieden. Außerdem dient Serotonin als Substrat für die Melatoninsynthese.

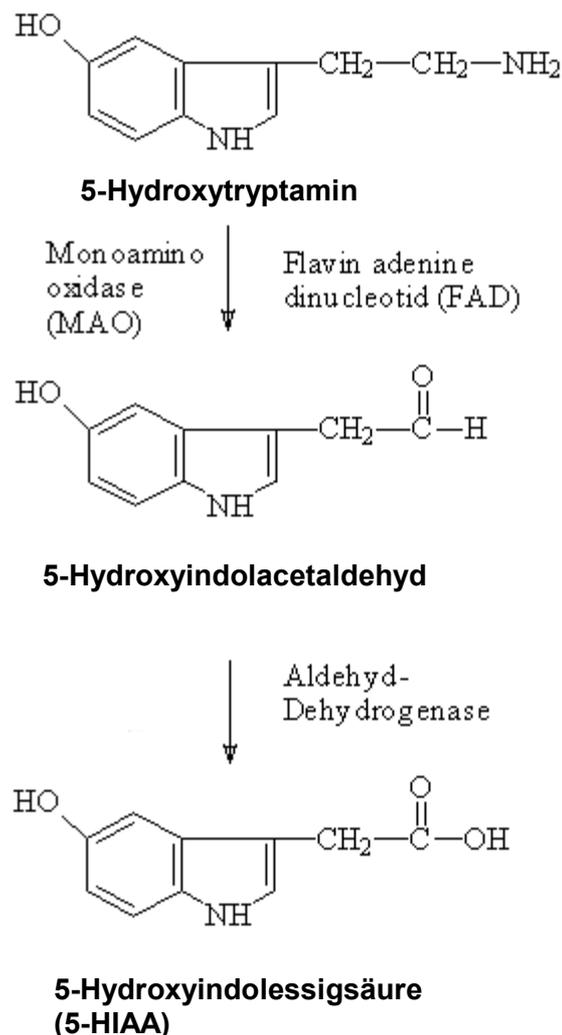


Abbildung 2: Synaptischer Abbau von Serotonin

### 1.2.2 Funktionelle Bedeutung von Serotonin

Im Zentralnervensystem fungiert Serotonin als Neurotransmitter und steuert eine Vielzahl physiologischer Prozesse wie Schlaf, Thermoregulation, Appetit, sexuelles Verhalten, Schmerzempfindlichkeit, Lern- und Gedächtnismechanismen. Serotonerge Neurone beeinflussen u.a. dopaminerge und noradrenerge Systeme sowie die Freisetzung von Hypophysenhormonen. Die veränderte Aktivität des serotonergen Systems spielt eine große Rolle in der Pathophysiologie psychiatrischer und neurologischer Erkrankungen wie Depression, Angst, Schizophrenie, Alkoholismus, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Migräne. Außerdem übt Serotonin verschiedene Wirkungen auf Herz und Kreislauf aus und steigert die Darmmotilität und die enterale Sekretion.

Zudem ist Serotonin in die pränatale Entwicklung des Gehirns involviert. Das serotonerge System entwickelt sich früh in der Embryogenese. In Tierversuchen haben biochemische und autoradiografische Studien gezeigt, dass Serotonin die Entwicklung sowohl von serotonergen Neuronen selbst als auch von serotonerg innervierten Hirnregionen beeinflusst (Lauder and Krebs, 1978; Whitaker-Azmitia und Azmitia, 1986; Lauder 1990; Shemer et al., 1991).

### 1.2.3 Lokalisation serotonerger Neurone im Gehirn

Die serotonen Neurone sind mit ihren somadendritischen Bereichen und Axonen im ZNS weit verbreitet. Vor allem in den Raphekernen (Abb 3). befinden sich die Zellkörper und die Dendriten, während die Axone in praktisch alle Teile des Zentralnervensystems projizieren. Zellkörper sind aber auch in der medianen und paramedianen *Formatio reticularis* des Mesencephalons, dem Tegmentum mesencephalon, dem Pons cerebri sowie der Medulla oblongata vorhanden. Die verschiedenen serotonergen Zellgruppen der Rapheregion wurden von Dahlström und Fuxe (1964) entsprechend ihrer Lage im Hirnstamm und ihrer Projektionsgebiete mit B1 bis B9 bezeichnet. Im einzelnen handelt es sich bei den rostralen Neuronengruppen um die Nuclei raphe pontis (B5), raphe dorsalis (B6, B7), centralis superior (B8) und tegmenti reticularis pontis (B9). Die Serotonin-Neurone der rostralen Raphe-Kerne projizieren aufsteigend in das Kleinhirn und das gesamte Vorderhirn. Die beiden wichtigsten Kerne der rostralen Gruppe sind die Nuclei raphe dorsalis und medianus (B6/7 und B5). Der dorsale Raphekern innerviert hauptsächlich Striatum, Frontalkortex, laterales Septum und den medianen Hippokampus, während Hypothalamus, me-

dianes Septum, dorsaler und ventraler Hippocampus vom Nucleus raphe medianus innerviert werden. Die caudalen Neurone bestehen aus den Nuclei raphe pallidus (B1, B4), obscurus (B2) und magnus (B3) (Jacobs und Azmitia, 1992; Rubinstein, 1998). Die caudalen Gruppen projizieren vor allem ins Vorderhorn des Rückenmarks, wo sie Synapsen mit den Motoneuronen bilden sowie in den Nucleus intermediolateralis und in das Hinterhorn. Manche dieser Neurone erhalten die Substanz P als Cotransmitter.

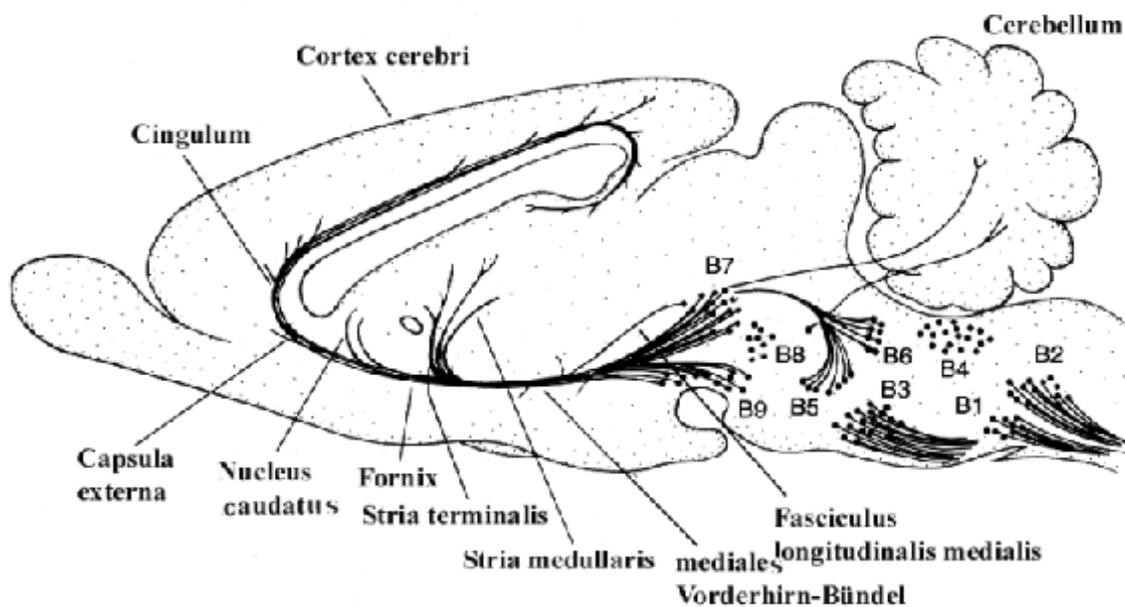


Abbildung 3: Serotonerge Neurone im Hirnstamm der adulten Ratte  
(nach Role und Kelly, 1991)

- B1 und B4: Nucleus raphe pallidus, B2: Nucleus raphe obscurus
- B3: Nucleus raphe magnus, B5: Nucleus raphe pontis
- B6 und B7: Nucleus raphe dorsalis, B8: Nucleus centralis superior
- B9: Nucleus tegmenti reticularis pontis.

### 1.2.4 Serotoninrezeptoren

In diesem Abschnitt soll ein kurzer Überblick über die Klassifikation sowie einige funktionelle und therapeutische Aspekte der 5-HT-Rezeptoren gegeben werden. Serotonin vermittelt seine Wirkungen über Serotonin-Rezeptoren. Sie unterscheiden sich strukturell, funktionell und pharmakologisch und wurden in 7 Familien eingeteilt (Abb. 4). Mit Ausnahme des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors, der zu den Ligand-gesteuerten Ionenkanälen gehört, sind Serotoninrezeptoren G-Protein gekoppelt und beeinflussen Adenylatcyclase, Phospholipase A und C und Kationenkanäle.

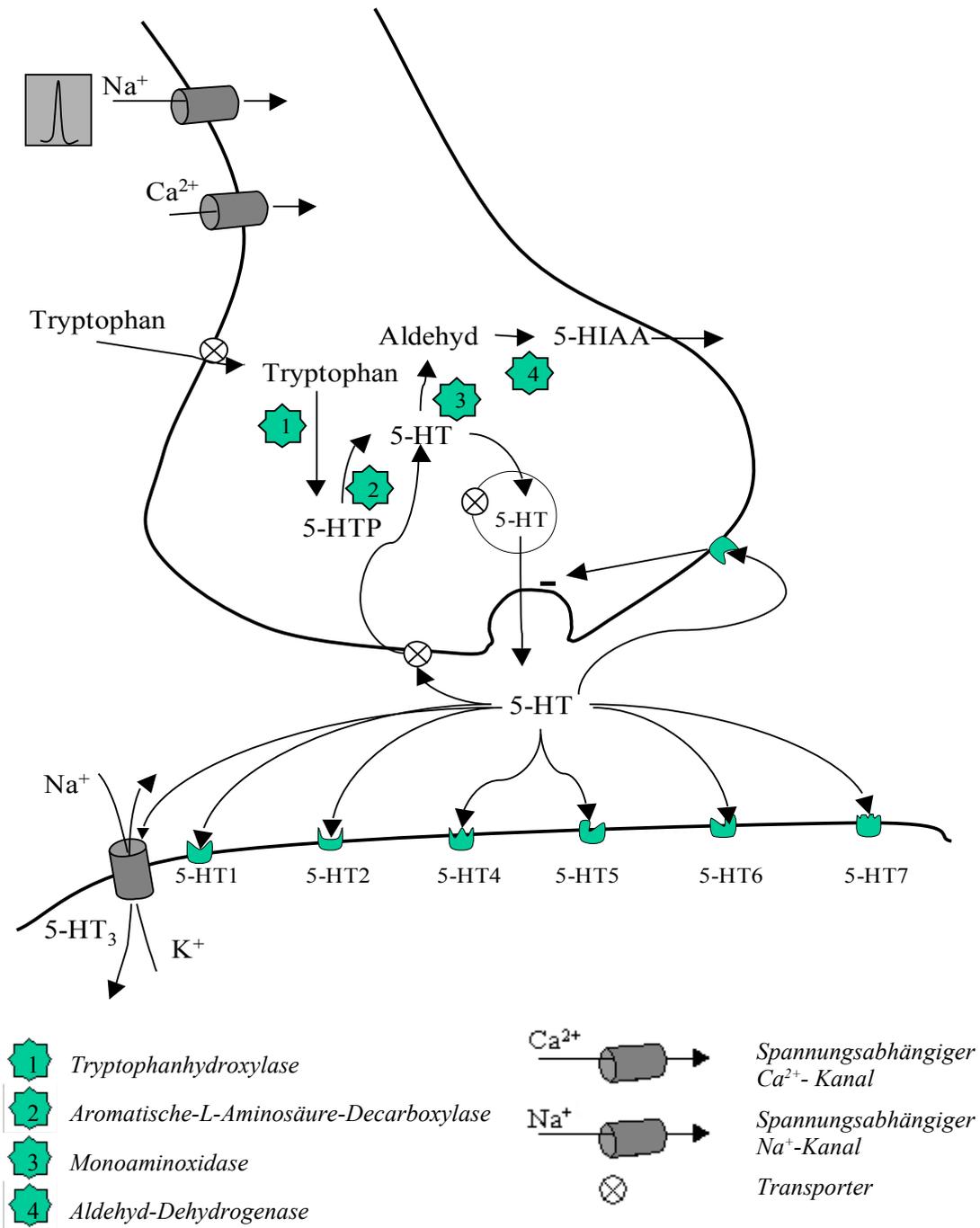


Abbildung 4: Synaptische Übertragung durch Serotonin (modifiziert nach Forth et al., 2001)

Die 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren bilden mit den 5 Subtypen A, B, D, E und F die größte Familie der 5-HT-Rezeptoren. Diese Rezeptoren sind über das G<sub>i/o</sub>-Proteine negativ an die Adenylatcyclase gekoppelt .

Die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind - wie weiter unten ausführlicher dargelegt - im ZNS sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert und u.a. für Lernvorgänge, die Regulierung der Körpertemperatur und die zentrale Blutdruckregulierung.

lation verantwortlich. Außerdem sind sie für die Behandlung von Angststörungen von pharmakologischem Interesse. So z.B. wird der partielle 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonist Buspiron als Anxiolytikum eingesetzt.

Zwei phylogenetisch sehr eng verwandte Rezeptoren, 5-HT<sub>1B</sub> und 5-HT<sub>1D</sub>, spielen in der Therapie akuter Migräneattacken eine wichtige Rolle: Eine Aktivierung der 5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptoren führt zur Kontraktion der bei Migräneattacken weitgestellten meningealen Blutgefäße. 5HT<sub>1D</sub>-Rezeptoren vermitteln eine Hemmung der Freisetzung von Neuropeptiden aus sensorischen Nervenendigungen in den Blutgefäßen der Hirnhäute; diese Peptide wirken vasodilatatorisch und rufen eine perivaskuläre Entzündung hervor. Auf dieser Grundlage werden nichtselektive oder selektive 5-HT<sub>1B/D</sub>-Rezeptor-Agonisten wie Ergotamin bzw. Triptane zur Beseitigung von Migräneattacken eingesetzt. Dem 5-HT<sub>1F</sub>-Rezeptor wird ebenso eine Rolle bei der Unterdrückung der neuronalen Entzündungsreaktion zugeschrieben und er wurde daher - bisher allerdings erfolglos - als neues Ziel zur Entwicklung von Migränemedikamenten geprüft.

Die 5-HT<sub>2A,B,C</sub>-Rezeptoren vermitteln ihre Effekte über G<sub>q/11</sub>-Proteine. 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren bringen glatte Muskel von Blutgefäßen zur Kontraktion, in Thrombozyten fördern sie deren Aktivierung. Durch die Aktivierung von 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren im Gehirn wirkt Lysergsäurediethylamid (LSD) halluzinogen. Die überwiegend in Blutgefäßen vorkommenden 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptoren bewirken eine NO-Freisetzung aus dem Endothel, was mit der Pathogenese der Migräne in Verbindung gebracht wird. Die 5-HT<sub>2A</sub>- und 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptorantagonisten Pizotifen, Lisurid und Methysergid werden zur Migräneprophylaxe eingesetzt. Atypische Neuroleptika wie Clozapin und Risperidon besitzen - abgesehen von ihrem Dopaminrezeptor-antagonistischen Effekt - auch eine antagonistische Wirkung an den 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren. Der 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptor kommt im Gegensatz zum 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptor fast ausschließlich im ZNS vor. Er besitzt einen Einfluss auf das Ess- und Sexualverhalten.

Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor ist, wie bereits erwähnt, im Unterschied zu den anderen 5-HT-Rezeptoren ein ligandgesteuerter Ionenkanal, der für Na<sup>+</sup>-, Ca<sup>2+</sup>- und K<sup>+</sup>-Ionen permeabel ist. Er kommt auf zentralen und peripheren Neuronen vor und vermittelt eine Depolarisation. 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren, die an den Endigungen afferenter Nervenfasern im Gastrointestinaltrakt lokalisiert sind sowie 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren im Brechzentrum des Hirnstamms und in der Chemorezeptor-Triggerzone der Area postrema sind für die Auslösung des Brechreflexes von Bedeutung.

Der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor ist G<sub>s</sub>-Protein-gekoppelt und stimuliert die Adenylatcyclase. Über die Freisetzung von Acetylcholin steigert er die Magen- und Darmmotilität. Aus diesem

Grund wirken selektive und nichtselektive 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoragonisten wie Cisaprid bzw. Metoclopramid prokinetisch.

Die 5-HT<sub>5</sub>- und 5-HT<sub>6</sub>-Rezeptoren sind bislang weniger detailliert untersucht worden. Der 5-HT<sub>5</sub>-Rezeptor inhibiert die Adenylatcyclase und ist möglicherweise an der circadianen Rhythmik beteiligt. Der 5-HT<sub>6</sub>-Rezeptor ist G<sub>s</sub>-Protein-gekoppelt und scheint möglicherweise bei Lernvorgängen eine Rolle zu spielen. Atypische Neuroleptika zeigen nicht nur zum 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor (s.o.), sondern auch zu diesem Rezeptor eine Affinität.

5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren sind wahrscheinlich an der Regulation des Tag-Nacht-Rhythmus, der Körpertemperatur und des Kreislauf beteiligt. Manche Neuroleptika haben eine hohe Affinität zu diesem Rezeptor.

Durch alternatives Spleißen und - wie bereits erwähnt - durch natürlich vorkommende Mutationen mit der Folge genetischer Variabilität wird die Heterogenität der Serotoninrezeptoren noch stärker ausgeprägt. Diese genetische Variabilität kann eine Rolle in der Entstehung psychiatrischer und neurologischer Erkrankungen spielen und für die individuellen Unterschiede in pharmakologischen Eigenschaften verantwortlich sein (Göthert et al., 1998).

### **1.3 Der h5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor**

Da es sich beim 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor um einen der beiden Serotoninrezeptoren handelt, die im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen, soll dieser im Folgenden ausführlicher beschrieben werden.

#### **1.3.1 Molekulare Eigenschaften**

5-HT<sub>1A</sub> ist einer der ersten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, dessen cDNA kloniert wurde (Kobilka et al., 1987; Fargin et al., 1989; Gnada et al., 1993). Wie alle 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren wird er durch ein intronloses Gen kodiert, das im Genom des Menschen auf dem Chromosom 5, Locus 5q11.2-q13 identifiziert wurde.

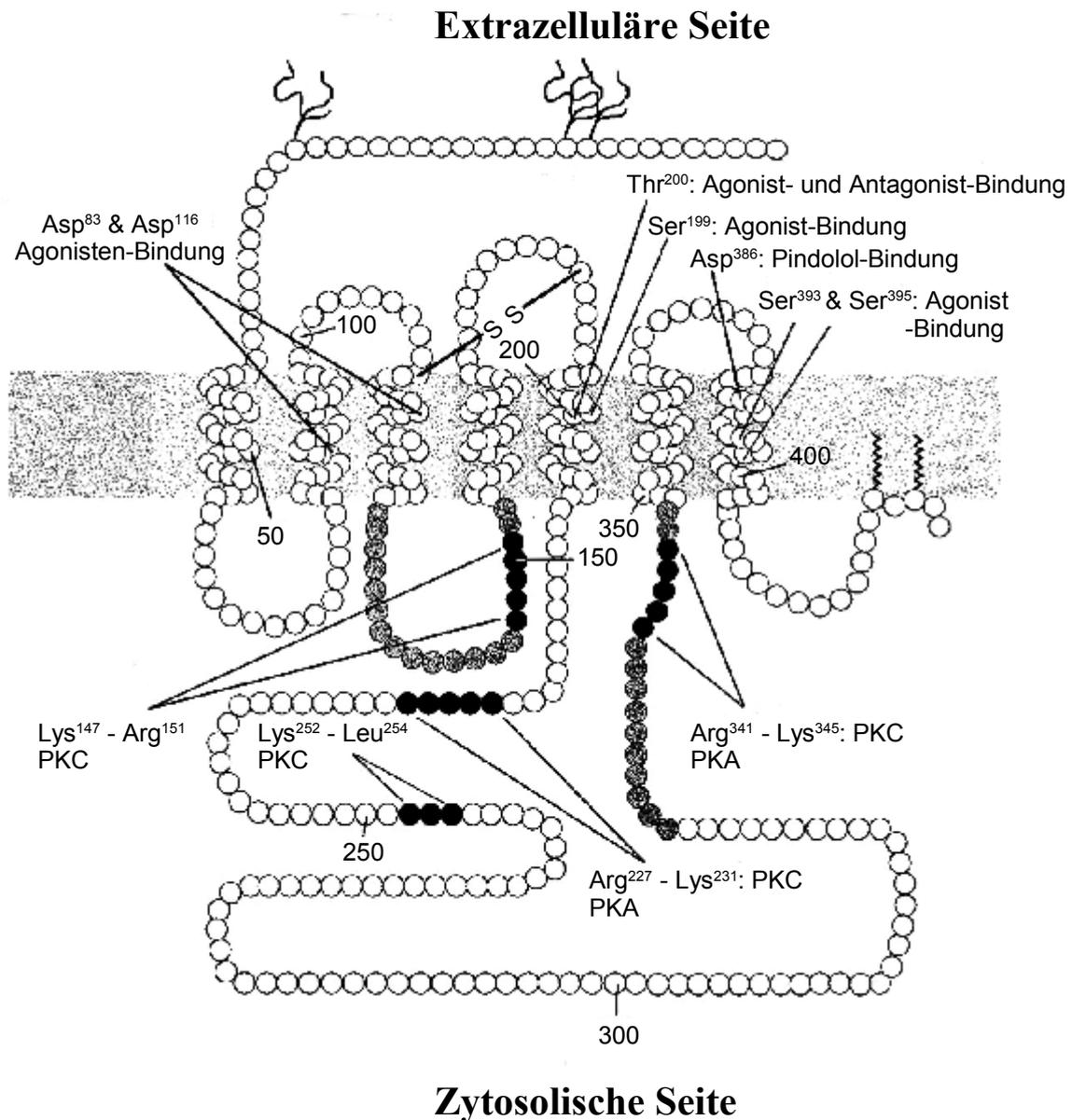


Abbildung 5: Schematische Darstellung des humanen 5HT<sub>1A</sub>-Rezeptors (nach Raymond et al., 1999, modifiziert). Jeder Kreis repräsentiert eine Aminosäure, die für die G-Protein-Kopplung wichtigen Rezeptorproteinabschnitte sind als grau ausgefüllte Kreise, die für eine Interaktion mit Proteinkinasen wichtigen Aminosäuren sind als schwarz ausgefüllte Kreise dargestellt.

Das Rezeptorprotein besteht aus 422 Aminosäuren und hat eine typische G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Struktur (Abb. 5). Es enthält sieben Transmembrandomänen, die aus 20 bis 26 hydrophoben Aminosäuren bestehen und durch drei intrazelluläre und drei

extrazelluläre Schleifen verbunden sind. Der extrazellulär orientierte Aminoterminus besitzt drei Asparagin-N-Glykosylierungsstellen. Das Cys in Position 186 der zweiten extrazellulären Schleife bildet eine Disulfidbrücke mit dem Cys 109, das sich an der Übergangsstelle zwischen der ersten extrazellulären Schleife und der dritten Transmembrandomäne befindet. Die Transmembrandomänen besitzen - im Vergleich zu den intra- und extrazellulären Schleifen - eine höhere Sequenzhomologie mit anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und interagieren mit spezifischen Liganden. Mittels gerichteter Mutagenese wurde gezeigt, dass die Aminosäuren Aspartat in Position 82 und 116 und Serin in den Positionen 199, 393 und 396 für die Agonistenbindung, ferner Threonin in Position 200 für die Bindung sowohl von Agonisten als auch von Antagonisten und schließlich Aspartat in der Position 386 für die Bindung der  $\beta$ -Adrenoblocker wie Pindolol notwendig sind (Ho et al., 1992; Guan et al., 1992; Chanda et al., 1993). Die zweite und dritte intrazelluläre Schleife sind für die G-Proteinkopplung wichtig und enthalten Erkennungssequenzen für die Phosphorylierung durch Proteinkinase C (Lys147-Arg151, Lys252-Leu254, Arg227-Lys231) und A (Arg227-Lys231, Arg341-Lys345; Abb. 5). Durch die Phosphorylierung der Aminosäuren Threonin und Serin in diesen Regionen wird die Aktivität des Rezeptors reguliert. Die dritte relativ lange, hydrophile intrazelluläre Schleife (132 Aminosäuren) weist große Unterschiede zu anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren auf.

### 1.3.2 Lokalisation

Mittels autoradiographischer Studien mit radioaktiv markierten selektiven Liganden, immunobiochemischen Untersuchungen und in situ-Hybridisierung wurde die Verteilung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren im zentralen Nervensystem untersucht. So haben verschiedene autoradiographische Studien mit den Radioliganden [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT und [<sup>3</sup>H]WAY100135 gezeigt, dass der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor in großer Zahl im Gyrus dentatus und in der CA1-Region des Hippocampus, im lateralen Septum, im entorhinalen und frontalen Cortex und im dorsalen Raphe nucleus vorkommt. Eine geringere Anzahl wurde im Thalamus und Hypothalamus, in der Amygdala, im dorsalen Horn des Rückenmarks und im lateralen Striatum gefunden, während sich im Globus pallidum, in der Substantia nigra und im Cerebellum keine oder nur wenige 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren nachweisen ließen (Marcinkiewicz et al., 1984; Pazos und Palacios, 1985; Verge et al., 1986; Radja et al., 1991; Hamon, 1997; Barnes und Sharp, 1999; Lanfumey and Hammon, 2000). Die Verteilung der 5-HT<sub>1A</sub>-RezeptormRNA, die durch in situ-Hybridisierung untersucht wurde, entspricht den Ergebnissen der

autoradiographischen Studien (Miquel et al., 1991; Pompeiano et al., 1992; Hamon, 1997). Die Verteilung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorproteins wurde auch immunobiochemisch bestätigt (Kia et al., 1996).

5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren kommen in den Raphekernen an den Zellkörpern und Dendriten der serotonergen Neurone vor und sind als inhibitorische Autorezeptoren an der Regulation der Aktivität serotonergen Neurone beteiligt. Eine selektive Läsion der serotonergen Neurone durch eine Mikroinjektion des Neurotoxins 5,7-Dihydroxytryptamin führt zur Verminderung der 5-HT<sub>1A</sub>-Radioligandbindung in dieser Region, was auf eine somadendritische Lokalisation hindeutet (Verge et al., 1985, 1986). Postsynaptisch (als Heterorezeptoren an nicht-serotonergen Neuronen) sind 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren in den serotonerg innervierten Gebieten des ZNS wie Hippocampus, Septum und Cortex lokalisiert. 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren wurden auch an Gliazellen des Gehirns gefunden (Azmitia et al., 1996).

### 1.3.3 Transduktionsmechanismen

Die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren beeinflussen unterschiedliche Effektorsysteme: Vorwiegend inhibieren sie die Adenylatcyclase, jedoch aktivieren sie u.a. auch K<sup>+</sup>-Kanäle und inhibieren Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (Hamon et al., 1990; Haj-Dahmane et al., 1991).

Die Kopplung erfolgt über die G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>-Proteine (Raymond et al., 1993; Oleskevich, 1995; Doupnik et al., 1997). In unterschiedlichen Zelllinien, die mit der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-cDNA transfiziert wurden, konnte eine Aktivierung der Phospholipase C gezeigt werden (Fargin et al., 1989; Raymond et al., 1992; Boddeke et al., 1992).

### 1.3.4 Pharmakologische Eigenschaften

Der selektive 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoragonist 8-OH-DPAT (Hjorth et al., 1982) und dessen Verfügbarkeit als tritiummarkierter Radioligand trugen zur pharmakologischen Charakterisierung des Rezeptors entscheidend bei. Das Interesse an diesem Rezeptortyp wurde dadurch erhöht, dass Arylpiperazin-Derivaten, die als partielle Agonisten wirken, ein anxiolytisch-therapeutischer Effekt zugeschrieben wurde. Der erste Vertreter dieser Substanzgruppe, Buspiron, besitzt außer zu 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren auch eine Affinität zu den Dopamin D<sub>2</sub>-Rezeptoren.

Nach der Synthese und Charakterisierung verschiedener Agonisten bestand lange Zeit die Schwierigkeit, einen reinen und selektiven Antagonisten zu finden. Alle zunächst ge-

prüften Substanzen erwiesen sich als partielle Agonisten an diesem Rezeptorsubtyp. Diese Wirkung manifestierte sich im Sinne eines Antagonismus an postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren im Hippocampus, während sich an somadendritischen Rezeptoren in den Raphekernen agonistische Eigenschaften zeigten. Im Gegensatz hierzu ist WAY100135 ein reiner selektiver Antagonist sowohl an post- als auch an präsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren. Diese Substanz antagonisiert sowohl in vitro als auch in vivo sämtliche Wirkungen von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten, ohne stimulierende Wirkung auf den Rezeptor zu entfalten.

Auch Substanzen, die als Liganden an anderen Rezeptoren bekannt sind, besitzen eine Affinität zu den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren. Z.B. wirken bestimmte  $\beta$ -Adrenorezeptorantagonisten auch als Antagonisten an 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren. Der  $\alpha$ -Adrenorezeptorantagonist Urapidil ist ein Antihypertensivum, dessen klinische Wirkung nicht nur auf die Blockade der  $\alpha$ -Adrenorezeptoren, sondern auch auf die Stimulation der somadendritischen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren zurückzuführen ist.

### 1.3.5 Funktionelle Bedeutung

Bereits weiter oben wurde ausgeführt, daß im Gehirn zwei Gruppen von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren existieren, die unterschiedliche Rollen im ZNS spielen: Inhibitorische Autorezeptoren befinden sich an Dendriten und Zellkörper serotonerger Neurone in den Raphekernen. Diese Rezeptoren werden von manchen Autoren auch - allerdings nicht ganz korrekt - als „präsynaptisch“ bezeichnet, da sie sich stromaufwärts von der Synapse zwischen serotonerger Axon und innerviertem Neuron befinden (präsynaptische Rezeptoren im eigentlichen Sinne sind an den Axonendigungen lokalisiert). Die („präsynaptisch“) somadendritisch lokalisierten Rezeptoren regulieren die Aktivität des serotonerger Neurons, auf dem sie lokalisiert sind. Die postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren sind an vielen Neuronen in den serotonerg innervierten Regionen wie dem Hippocampus, dem Septum, dem Cortex und der Amygdala lokalisiert.

5-HT-Rezeptor-Agonisten vermitteln zahlreiche Effekte, an denen postsynaptische und „präsynaptische“ Rezeptoren beteiligt sind (Tab. 1). Bei der komplexen Verteilung im Gehirn und der Vielfalt der beeinflussten physiologischen Funktionen, ist eine genaue Zuordnung der ausgelösten Effekte zum „präsynaptischen“ oder postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor nicht immer möglich.

Ebene	Effekt	Lokalisation*
Zellulär	Adenylatcyclase (-)	Post
Elektrophysiologisch	Hyperpolarisation	„Prä“ / Post
Verhaltensbiologie	5-HT-Syndrom	Post
	Hypothermie	„Prä“ / Post
	Hyperphagie	„Prä“ / Post
	Anxiolyse	„Prä“ / <b>Post</b>
	Sexuelles Verhalten (+)	„Prä“ / Post
	Verändertes Schmerzverhalten	„Prä“ / Post
Neurochemisch	5-HT-Freisetzung (-)	„Pra“
	Noradrenalin Freisetzung (+)	Post
	Acetylcholin Freisetzung (+)	Post
	Glutamat Freisetzung (-)	?
Neuroendokrin	Prolactin (+)	Post

Tabelle 1: Die durch Aktivierung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren ausgelösten Effekte (nach Barnes und Scharp, 1999, modifiziert).+ Erhöhung, – Verminderung

\*Lokalisation in Bezug auf die Synapse zwischen serotonergerm Axon und serotonerg innerviertem Neuron. „Präsynaptische“ 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren sind präziser ausgedrückt somadendritische 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptoren, d.h. Rezeptoren auf Zellkörper und Dendriten von serotonergen Neuronen.

5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren beeinflussen mehrere Transmittersysteme. Somadendritische 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptoren hemmen die elektrische Aktivität der serotonergen Neurone und reduzieren somit die Synthese und die Freisetzung von Serotonin. Eine Aktivierung der postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren führt zu einer erhöhten Freisetzung von Acetylcholin im Cortex und im Hippocampus (Bianchi et al., 1990; Wilkinson et al., 1994; Consolo, 1996) und Noradrenalin im Hypothalamus, im Hippocampus, im frontalen Cortex und im ventralen Tegmentum (Done and Sharp, 1994; Chen and Reith, 1995; Suzuki et al., 1995).

Auf physiologischer und verhaltensbiologischer Ebene beeinflussen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten die Körpertemperatur und das Ess-, Sexual- und Schmerzverhalten (Green and Grahame-Smith, 1976; Millan et al., 1991; Lucki, 1992). Eine Aktivierung der postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren führt bei Ratten zu dem charakteristischen Serotonin-Syndrom, das durch flache Körperhaltung, Auf-der-Stelle-Treten mit den Vorderpfoten, Hypothermie und erhöhtes Angstverhalten gekennzeichnet ist. Eine Aktivierung der „präsynap-

tischen“ 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren ruft Hyperphagie und - im Gegensatz zum Serotonin-Syndrom - vermindertes Angstverhalten hervor.

Von besonderem Interesse sind in Anbetracht der möglichen klinisch-therapeutischen Bedeutung die anxiolytischen und antidepressiven Effekte der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoragonisten:

In Untersuchungen an 5-HT<sub>1A</sub>-Knockout- und Wildtyp-Mäusen, denen sowohl „prä“- als auch postsynaptische Rezeptoren fehlen, zeigten drei Arbeitsgruppen (Ramboz et al., 1998; Parks et al., 1998; Heisler et al., 1998), dass die Knockout-Tiere im Vergleich zum Wildtyp ein erhöhtes Angstverhalten aufweisen. Die Knockout-Mäuse versuchten in verschiedenen Verhaltenstests eine neue und angsterzeugende Umgebung zu vermeiden und stressvollen Situationen auszuweichen. In Verhaltensversuchen, die zur Charakterisierung von Antidepressiva verwendet werden, wiesen diese Tiere im Vergleich zum Wildtyp ein weniger depressives Verhalten auf. Experimente mit konditionellen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-KO-Mäusen ermöglichen es, das „Ausknocken“ des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors während der frühen postnatalen Periode gewebespezifisch im Hippocampus und Cortex zu verhindern (Cross et al., 2002). Durch die frühe postnatale Expression des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors im Hippocampus und Cortex konnte die Erhöhung des Angstverhaltens aufgehoben werden. Dieser Befund beweist die wichtige Rolle der Expression der postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren in diesen Hirnregionen während der frühen postnatalen Entwicklung für das Angstverhalten erwachsener Tiere.

Dem 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor wird eine neurotrophische Rolle in der prä- und postnatalen Entwicklung des Gehirns zugeschrieben. Azmitia und Whitaker-Azmitia (1995) zeigten, dass der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor die Sekretion eines Wachstumsfaktors in primären Astrozytenkulturen und neuronalen Kulturen fördern.

## **1.4 Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor**

### **1.4.1 Molekulare Eigenschaften**

Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor ist der einzige Ligand-gesteuerte Ionenkanal unter den 5-HT-Rezeptoren (Derkach et al., 1989). Er ist überwiegend für monovalente Kationen wie Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> aber auch für Ca<sup>2+</sup> permeabel und vermittelt den Kationen-Einstrom, der die Zellmembran depolarisiert. Die erste 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Untereinheit – als 5-HT<sub>3A</sub> bezeichnet - wurde aus Neuroblastomzellen der Maus kloniert (Maricq et al., 1991). Sie ist strukturell verwandt mit den  $\alpha 7$ - und  $\alpha 8$ -Untereinheiten des neuronalen nikotinischen Ach-Rezeptors. Die Analyse von Sequenz (Ortellis and Lunt, 1995) und Membrantopologie (Mukerji et

al., 1996; Spier et al., 1999) zeigte, dass der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor zu der cys-loop-Superfamilie gehört, die neben dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor und dem nikotinischen Ach-Rezeptor auch den GABA-Rezeptor Typ A und den Glycinrezeptor umfasst. Die humane 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoruntereinheit wurde aus Amygdala (Miyake et al., 1995), Hippocampus (Belelli et al., 1995) und Dünndarm (Brüss and Bönisch, 1998) kloniert.

Die humane 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoruntereinheit besteht aus 478 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 56 kDa. Sie besitzt eine 85-prozentige Homologie zur Maus- und eine 84-prozentige Homologie zur Ratten-5HT<sub>3A</sub>-Rezeptoruntereinheit (Isenberg et al., 1993; Miquel et al., 1995).

Wie andere Mitglieder der Rezeptorfamilie ist der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor aus fünf Untereinheiten zusammengesetzt (McKernan et al., 1990; Green et al., 1995). Jede Rezeptoruntereinheit besitzt einen großen extrazellulären N-Terminus mit Cys-Cys-Schleife, vier transmembranäre Domänen und einen extrazellulären C-Terminus (Abb. 6). Die Ligand-Bindungsstelle befindet sich im N-Terminus, während die transmembranäre Domäne M2 eine Kanalpore bildet. Die intrazelluläre Schleife zwischen M3 und M4 enthält eine Phosphorylierungsstelle.

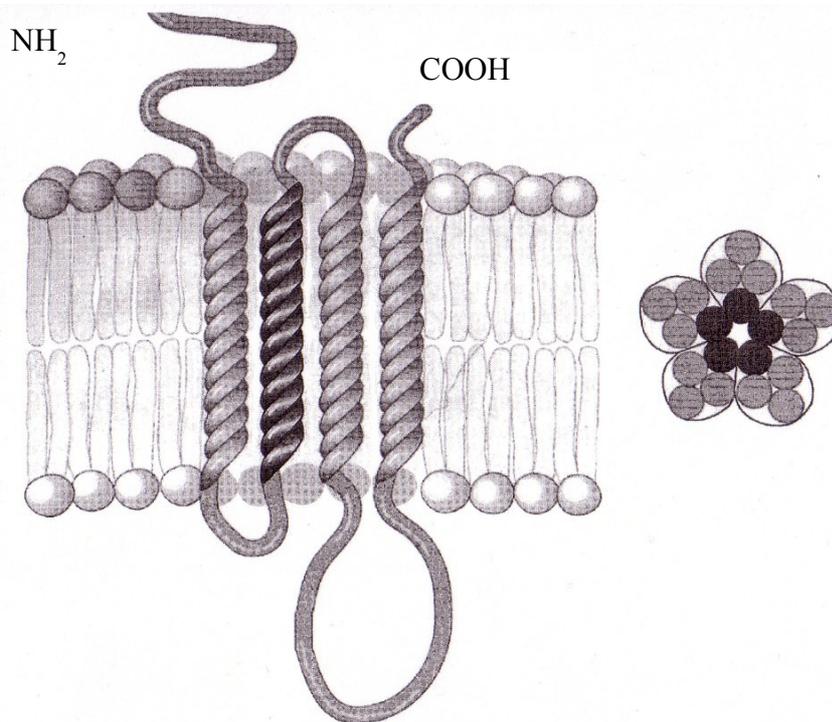


Abbildung 6: Schematische Darstellung des humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors

Es wurden Spleißvarianten der Maus- (Hope et al., 1993) und Meerschweinchen-5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoruntereinheiten (Lankiewicz et al., 1998) kloniert, die sich durch das Fehlen von sechs Aminosäuren im Bereich der dritten intrazellulären Schleife zwischen M3 und M4 unterscheiden. Auch von der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoruntereinheit der Ratte wurde eine Spleißvariante entdeckt, die sich durch das Fehlen von fünf Aminosäuren in diesem Bereich unterscheidet. Spleißvarianten wurden ebenfalls für die humane (h) 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoruntereinheit beschrieben, nämlich eine kurze trunkierte (h5-HT<sub>3AT</sub>) und eine lange (h5-HT<sub>3AL</sub>) Isoform (Brüss et al., 2000). Die kurze Spleißvariante besteht aus 238 Aminosäuren mit einer einzigen Transmembrandomäne (M1). Die lange Isoform enthält 32 zusätzliche Aminosäuren in der extrazellulären Schleife zwischen M2 und M3.

Die 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor-Untereinheit bildet in heterologen Expressionssystemen funktionelle homopentamere Komplexe. Inzwischen wurde eine zweite Rezeptoruntereinheit kloniert (5-HT<sub>3B</sub>), die aus 441 Aminosäuren besteht und zu 44% identisch mit der 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit ist. Die 5-HT<sub>3B</sub>-Rezeptoruntereinheit bildet alleine keinen funktionsfähigen Rezeptor, moduliert aber Kanaleigenschaften bei der Koexpression mit einer 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit. Der heteromere 5-HT<sub>3A/3B</sub>-Rezeptor besitzt eine höhere Einzelkanal-Leitfähigkeit und zudem eine geringere Leitfähigkeit für Ca<sup>2+</sup>-Ionen (Davies et al., 1999; Dubin et al., 1999). Die Gene für beide Rezeptoruntereinheiten sind auf dem Chromosom 11, Locus 23.1/23.2 lokalisiert (Weiss et al., 1995; Davies et al., 1999). Im Gehirn wurde nur die 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit gefunden, während in der Peripherie beide Untereinheiten exprimiert werden (Morales and Wang, 2002).

Die Aktivierung des Rezeptors führt zur einer Konformationsänderung des Rezeptorproteins, die die Öffnung des Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Ionen permeablen Kationenkanals bedingt (Jackson and Yakel, 1995; Brown et al., 1998). Der Agonist-induzierte Na<sup>+</sup>-Einstrom ruft eine schnelle Depolarization der neuronalen Membran hervor, mit darauf folgender schneller Rezeptordesensibilisierung.

Selektive 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten sind 2-Methyl-5HT und Biguanide, z.B. m-Chlorophenylbiguanid. Selektive Antagonisten der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren wurden inzwischen in großer Zahl synthetisiert; Beispiele sind Ondansetron, Tropisetron und MDL 72222.

Außer Bindungstellen für Agonisten und Antagonisten, besitzt der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor auch allosterische Bindungstellen, über die einige Substanzen wie z.B. Ethanol und Narkosemittel die Rezeptorfunktion modulieren können (Parker et al., 1996). Auch Liganden der Cannabinoidrezeptoren interagieren mit allosterischen Bindungstellen an 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren und inhibieren auf diese Weise den 5-HT-induzierten Einstrom (Barann et al., 2002).

### 1.4.2 Verteilung im Gehirn

Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor kommt im zentralen und peripheren Nervensystem vor. Periphere 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren befinden sich an sympathischen und parasympathischen Nerven und im enterischen Nervensystem. Im ZNS wurden sie im Vorderhirn (zerebraler Cortex, Hippocampus, Amygdala), im entorhinalen Cortex, in der Medulla oblongata (Nucleus tractus solitarii, Area postrema) sowie in geringerer Dichte im Nucleus accumbens, im Striatum und in der Substantia nigra gefunden (Laporte et al., 1992; Jackson und Yakel, 1995).

### 1.4.3 Funktionelle Bedeutung

5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren sind sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert. Postsynaptische 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren vermitteln die schnelle exzitatorische synaptische Übertragung. Präsynaptische 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren stimulieren oder modulieren die Freisetzung von anderen Transmittern im ZNS: Die Aktivierung der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren steigert die Freisetzung von Dopamin, Cholezystokinin, Glutamat und GABA, und inhibiert - möglicherweise durch Stimulation inhibitorischer Interneurone - die Azetylcholin-Freisetzung.

5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten werden gegen Cytostatika- oder Strahlen-induziertes Erbrechen klinisch eingesetzt (Blower, 1990; Viner et al., 1990; Aapro, 1991; Hasler, 1999; Lehoczky, 1999; Perez, 1999). Der Angriffspunkt dieser Stoffe liegt dabei hauptsächlich an afferenten Nerven im Darm und in der Leber, die durch 5-HT aus enterochromaffinen Zellen oder serotonergen Nerven des enterischen Nervensystem aktiviert werden. Diese Nervenfasern verlaufen mit dem Nervus vagus in den Hirnstamm, wo sie in den Brechreflex involviert sind. 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten werden auch als Mittel gegen Erbrechen in Zusammenhang mit Migräne erprobt (Dahlöf and Hargreaves, 1998) und – bisher nur vorübergehend – zur Behandlung des Reiz-Darm-Syndroms eingesetzt (Greenshaw and Silverstone, 1997; Farhing, 1999).

In Tierversuchen wurden Hinweise auf weitere potentielle therapeutische Wirkungen gewonnen: 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor-Antagonisten scheinen anxiolytische und antipsychotische Eigenschaften zu besitzen (Costall et al., 1988; Jones et al., 1988; Greenshaw and Silverstone, 1997; Tancer and Uhde, 1997) und sie können klinische Bedeutung bei Depression und in der Schmerzbehandlung erlangen. 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren spielen wahrscheinlich auch eine Rolle bei der Suchtentstehung und 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor-Antagonisten können dement-

sprechend Entzugssymptome von Alkohol, Nikotin, Cocain und Opiaten lindern (Costall und Naylor, 1992).

## 1.5 Fragestellungen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand vor allem in der Untersuchung der pharmakologischen Eigenschaften natürlich vorkommender Varianten der humanen (h) 5-HT<sub>1A</sub>- und homopentameren h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren im Vergleich zu den Wildtypen. Dementsprechend stand die Ermittlung der Ligand-Bindungseigenschaften beider Rezeptoren im Mittelpunkt der Untersuchungen. Dafür waren zunächst die Mutanten aus der jeweiligen Wildtypen-cDNA herzustellen und sowohl die Mutanten als auch die Wildtypen in einem geeigneten Zellsystem zu exprimieren. Nach Lösung dieser Teilprobleme galt es, die Dichte der jeweiligen Rezeptor-Isoformen in der Zellmembran mit Hilfe von Radioligand-Sättigungsexperimenten zu bestimmen und die Affinitäten von Agonisten und Antagonisten zu diesen Rezeptoren in Konkurrenzexperimenten des Radioliganden mit den Pharmaka zu ermitteln. Ergänzend hierzu sollten für die Variante des G-Protein-gekoppelten h5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors Hinweise auf ihre funktionelle Bedeutung durch Messung der G-Protein-Kopplung und des second messenger-Signals gewonnen werden. Für die Varianten des h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors sollten mit der Ermittlung der Rezeptor-Bindungseigenschaften für Agonisten und Antagonisten die Voraussetzungen für weiterführende funktionelle Untersuchungen geschaffen werden. Letztere bestanden in komplexen elektrophysiologischen Experimenten und der Erarbeitung neuer Meßmethoden der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorfunktion, die über den Rahmen dieser Arbeit hinausgingen und parallelen sowie nachfolgenden eigenständigen Untersuchungen vorbehalten blieben, deren Ergebnisse allerdings hier im Zusammenhang mit den Bindungseigenschaften der Rezeptoren diskutiert werden sollen.

Im Einzelnen handelte es sich um folgende Varianten der h5-HT<sub>1A</sub>- und h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren, die in folgenden Teilaspekten hier untersucht werden sollten:

1. Die natürlich vorkommende **Variante Arg219Leu des h5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors** wurde bei einem Patienten mit Tourette-Syndrom gefunden (Lam et al., 1996). Das Tourette-Syndrom ist eine genetisch bedingte neurologische Erkrankung, die vokale und motorische Ticks und Verhaltensstörungen hervorruft. Die Mutation befindet sich in der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptorproteins, die für die G-Protein-Kopplung wichtig ist.

Die vorliegende Untersuchung umfaßte folgende Details:

- ◆ Die cDNA der Variante sollte mittels gerichteter Mutagenese hergestellt und das Vorhandensein der Mutation mit Hilfe von Sequenzierung überprüft werden. Für weitere Untersuchungen sollten Arg219Leu und Wildtyp in HEK293-Zellen für die Bearbeitung der nachfolgend genannten Fragen stabil oder transient exprimiert werden.
- ◆ Beeinflusst die Mutation die Bindungseigenschaften des Rezeptors? Kompetitions-experimente mit dem Radioliganden [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT an Membranen von stabil transfizierten HEK293-Zellen, die entweder den Wildtyp oder die Arg219Leu-Variante des h5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors exprimieren, sollten klären, ob es Unterschiede in der Bindungsaffinität von Agonisten und/oder Antagonisten zwischen den beiden Isoformen gibt. Um herauszufinden, ob die Mutation das Ausmaß der Expression und den Einbau des Rezeptors in die Zellmembran beeinflusst, sollten Radioligand-Sättigungsversuche an transient mit der cDNA der Variante oder des Wildtyps transfizierten Zellen durchgeführt werden.
- ◆ Ist die G-Protein-Kopplung bei der Rezeptor-Variante im Vergleich zum Wildtyp verändert? Die G-Protein-Kopplung sollte mittels [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an Membranen von HEK293-Zellen, die entweder den Wildtyp oder die Mutante stabil exprimieren, gemessen werden.
- ◆ Ist der Arg219Leu-Aminosäureaustausch im Rezeptorprotein mit Änderungen im second-messenger-Signal verbunden? Dafür sollte an ganzen intakten Zellen, die den Wildtyp oder die Rezeptor-Variante stabil exprimieren, die Inhibition der Forskolin-stimulierten cAMP-Akkumulation durch 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten gemessen werden.

**2. Zwei natürlich vorkommende Varianten, Pro391Arg und Arg344His, des h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors** wurden bei zwei Patienten mit Schizophrenie gefunden (Niesler et al., 2000). Beide Mutationen befinden sich in der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptorproteins. Diese Region ist bei unterschiedlichen Spezies konserviert, was auf seine mögliche Bedeutung für die Rezeptorfunktion hinweist. Die vorliegende Untersuchung umfasste folgende Einzelschritte:

- ◆ Die cDNAs der beiden Rezeptorvarianten sollten mit Hilfe gerichteter Mutagenese hergestellt werden und nach der Sequenzierung in HEK293-Zellen stabil oder transient exprimiert werden.

- ◆ An Membranen von stabil transfizierten Zellen sollten Konkurrenzexperimente von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten und Antagonisten mit dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Radioliganden [<sup>3</sup>H]GR65630 durchgeführt werden, um Bindungsaffinitäten der Agonisten und Antagonisten zu beiden Varianten und zum Wildtyp-Rezeptor zu ermitteln.

Sättigungsversuche mit dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Radioliganden an transient mit der cDNA der Varianten oder des Wildtyps transfizierten Zellen sollten zeigen, ob die Mutationen einen Einfluss auf die Dichte der in der Zellmembran exprimierten Rezeptoren haben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material und Geräte

#### *Substanzen*

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Agar-Agar	Merck
Agarose	Serva
Ammoniumpersulfat	Merck
Ampicillin	Boehringer
Ascorbinsäure	Merck
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Merck
Buspiron	Sigma
Calciumchlorid-dihydrat	Merck
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva
Dimethylsulfoxid	Sigma
EDTA	Merck
Ethanol, abs.	Merck
Ethidiumbromid	Boehringer
FKS	Sigma
Forskolin	Sigma
Geneticin (G418)	Sigma
Glycerol	Sigma
HEPES	Roth
8-Hydroxy-DPAT-Hydrobromid	Sigma
5-Hydroxytryptamin	Sigma
IBMX	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Magnesiumchlorid-hexahydrat	Merck
meta-Chlorophenylbiguanid (mCPBG)	Sigma
MDL72222	RBI
2-Methyl-5-Hydroxytryptamin (2-Me-5-HT)	Sigma
β-Mercaptoethanol	Merck
Methiothepin-Maleat	Hoffmann LaRoche
Methysergid-Maleat	RBI
Natriumchlorid	Merck
Ondansetron-hydrochlorid	Glaxo
Pargylin-hydrochlorid	Sigma
Phenylbiguanid (PBG)	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Sigma
Perchlorsäure	Merck
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma
Phenolrot	Sigma
Polyethylenimin	Sigma
Poly-L-Ornithin	Sigma
Pulvermedien (HAM`s, DMEM)	Sigma
Quipazin	Sigma
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
Roxindol	Merck
Salzsäure	Merck
Sequenzierlösungen	MWG Biotech
Spiperon	RBI
Tris	Roth
Tropisetron	Glaxo
Trypanblau	Fluka
Urapidil	Sigma

### ***Puffer und Lösungen***

#### 0,8% Agarose-Gel

0.8 % (w/v) Agarose.

↪ in 1xTBE-Puffer in einem Mikrowellegerät aufkochen, kurz abkühlen.  
Mit 10mg/ml Ethidiumbromid versetzen

↪ die Lösung in eine Gelkammer gießen, 1 h polymerisieren lassen

#### Ammoniumperoxydsulfat (APS)

10 % (w/v) APS

↪ in Wasser lösen, portionieren und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lagern

#### Ampicillin

10 % (w/v) Ampicillin,

↪ in Wasser lösen

↪ sterilfiltrieren

↪ 2ml Aliquots bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lagern

#### 2xBBS

50 mM BES (N,N-Bis[2-hydroxi-ethyl]-2-aminoethan-sulfonsäure)

280 nM NaCl

1,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

↪ auf pH 6,95 mit 1M NaOH einstellen, sterilfiltrieren

↪ bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lagern

#### Boratpuffer (für Polyornithin)

0,15 M Borsäure

67 mM NaOH

↪ auf pH 8,4 mit HCl einstellen

↪ bei RT lagern

Bradford-Stammlösung

- 0,4 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250
- 10 % (v/v) Ethanol
- ↺ Coomassie Brilliant Blue G 250 in Ethanol lösen
- 34 % (v/v) Phosphorsäure zugeben
- ↺ Lösung 1 h rühren
- ↺ vor Gebrauch mind. 4 Wochen lagern (4°C)

CaCl<sub>2</sub>-Lösung (Transfektion)

- 0,25 M CaCl<sub>2</sub>
- ↺ sterilfiltrieren
- ↺ bei -20°C lagern

5xDNA-Auftragspuffer

- 15 % (w/v) Ficoll 400
- 5 x TBE
- 0,25 % (w/v) Bromphenolblau

Ethidiumbromidlösung

- 1 % (v/w) Ethidiumbromid
- ↺ in Aqua dest. lösen
- ↺ bei 4°C lagern

G418-Lösung

- 100 mg/ml G418-Sulfat
- 100 mM HEPES-Lösung pH 7,3
- ↺ sterilfiltrieren
- ↺ bei -20°C lagern

Glycerol-Lösung für Bakterien

- 50 % (v/v) Glycerol
- ↺ in Aqua dest. lösen
- ↺ autoklavieren

LB-Agar für Platten

100 % (v/v) LB-Medium

1,5 % (w/v) Agar

↺ autoklavieren

↺ Platten warm gießen

↺ bei 4°C lagern

Methansulfonsäure (Lösungsmittel für MDL7222)

1:1000 Methansulfonsäure in Aqua dest. lösen

5 µl/ml 1n NaOH zugeben

↺ bei 4°C lagern

PBS- Puffer

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

↺ autoklavieren

↺ bei 4°C lagern

Polyethylenimin-Lösung (Filterbeschichtung)

0,3 % (w/v) Polyethylenimin

↺ in Aqua dest. lösen

↺ bei 4°C lagern

Polyornithin-Lösung (Zellkultur)

5 mg Polyornithin

50 ml Boratpuffer

↺ sterilfiltrieren

↺ bei -20°C lagern

SOB-Medium

2	% (w/v) Caseinhydrolysat oder Bactotryptone
0,5	% (w/v) Hefeextrakt
10	mM NaCl
2,5	mM KCl
↙	autoklavieren
10	mM MgSO <sub>4</sub>
10	mM MgCl <sub>2</sub>
↙	MgSO <sub>4</sub> und MgCl <sub>2</sub> vor Gebrauch zugeben

10xTBE- Puffer

890	mM Tris
890	mM Borsäure
20	mM EDTA
↙	in Aqua dest. lösen

Trypanblaulösung

0,5	% (w/v) Trypanblau
↙	in 0,9% NaCl lösen

Puffer für Membranpräparation

5	mM Hepes
0,5	mM MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O
0,5	mM EGTA
0,1	mM Ascorbinsäure
0,3	mM Phenylmethylsulfonylfluorid
↙	pH 7,4 einstellen
↙	bei 4°C lagern

***Puffer für Bindungsexperimente***h5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Assay-Puffer

20	mM Hepes
0,1	mM EDTA
0,1	mM Ascorbinsäure
10	µM Pargylin
↪	pH 7,4 einstellen
↪	bei 4°C lagern

Waschpuffer

20	mM Hepes
↪	pH 7,4 einstellen
↪	bei 4°C lagern

h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor-Assay-PufferECS-Puffer

150	mM NaCl
1,8	mM CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O
1	mM MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O
10	mM Hepes
5,4	mM KOH

***Puffer und Lösungen für cAMP-Bestimmung***CSS-Puffer

120	mM NaCl
5,4	mM KCl
0,84	mM MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O
1,8	mM CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O
25	mM Tris
15	mM Glucose
15	mg/l Phenolrot

CSS-Puffer

- ↪ pH 7,4 einstellen (HCl rauchend)
- ↪ autoklavieren
- ↪ bei 4°C lagern

Perchlorsäure 0,5M

- 1 ml Perchlorsäure 72%
- 24 ml Aqua dest.
- ↪ bei RT lagern

KOH-Puffer

- 0,5 M  $K_2HPO_4$
- ↪ pH 7,5 mit Orthophosphatsäure einstellen
- 0,5 M KOH
- ↪ pH ist dann 11,7
- ↪ pH-Wert kontrollieren: 5ml CSS-Puffer, 500µl Perchlorsäure  
500µl KOH-Puffer: zweimaliger Farbumschlag

Forskolin-Stammlösung

- 1 mM Forskolin
- ↪ in DMSO lösen
- ↪ bei -20°C lagern

IBMX

- 22,2 mg/ml IBMX
- ↪ in Ethanol lösen
- ↪ 1l CSS-Puffer zusetzen

### ***Puffer und Lösungen für GTPyS-Bindung***

#### Assay-Puffer

- 50 mM Tris
- 300  $\mu$ M NaCl
- 3  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub> x6H<sub>2</sub>O
- 10  $\mu$ M GDP
- ↵ pH 7,4 einstellen
- ↵ bei 4°C lagern

#### Waschpuffer

- 50 mM Tris
- ↵ pH 7,4 einstellen
- ↵ bei 4°C lagern

#### GDP

- 1 mM GDP
- ↵ in Aqua dest. lösen
- ↵ bei -20°C lagern

#### GTPyS

- 1 mM GTPyS
- ↵ in Aqua dest. lösen
- ↵ bei -20°C lagern

### ***Radiochemikalien***

<b>Radiochemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
[ <sup>3</sup> H]-8OH-DPAT (220-240Ci/mmol)	Amersham
[ <sup>3</sup> H]-GR65630 (75 Ci/mmol)	NEN
[ <sup>35</sup> S]GTPS (1000 Ci/mmol)	Amersham
[ <sup>3</sup> H]cAMP (28 Ci/mmol)	Amersham

## Zelllinien

### HEK293

Humane embryonale Nierenzelllinie, transformiert mit Adenovirus Typ 5. Kultivierung erfolgte in DMEM/HAM'S +10%FKS +1%P/S

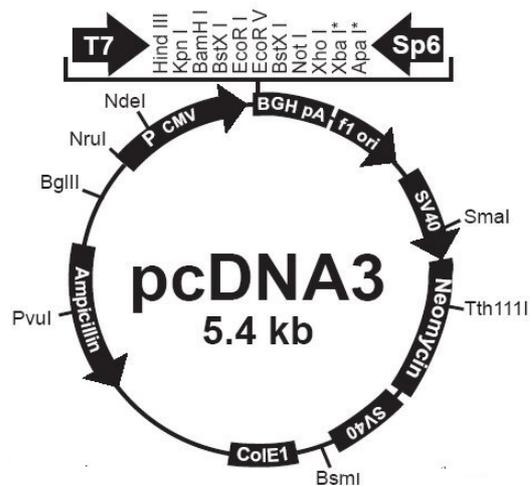


Abbildung 7: pcDNA<sub>3</sub> (5,446 kb)

**Vektor** (Abb.7) pcDNA<sub>3</sub>

**Kits**

<b>Kits</b>	<b>Hersteller</b>
[ <sup>3</sup> H]cAMP-Assay	Amersham
Plasmid Mega Kit	Quiagen
Plasmid Mini Kit	Quiagen
Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit	Amersham

**Enzyme**

<b>Enzyme</b>	<b>Hersteller</b>
Restriktionsendonukleasen EcoR1, Kpn1, BamH1	Boehringer (Roche)
T4 DNA Ligase	Boehringer (Roche)
T7 DNA Polymerase	Amersham

**Arbeitsgeräte**

<b>Arbeitsgeräte</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav, Bioclav KSK117	Schütt
Brutschrank BE 500	Memmert, Schwabach
Brutschrank B5060 EK/CO <sub>2</sub>	Heraeus, Hanau
Brutschrank IR 1500	Flow Laboratories
Cell Harvester Brandel M-24	Brandel
Druckbehälter SM1753	Sartorius
Einfrierbox	Nalgene
Elektrophoresekammern	Eigenbau der Institutswerkstatt
Gasbrenner	Wartewig Labor und Dental-technik
Geldokumentationssystem:	
Transilluminator (UV/VIS-Leuchttisch)	MWG Biotech, Ebersberg
TFP M/WL	

**Arbeitsgeräte**

Bildschirm IM400-E  
Kamera KP-M1U  
Thermoprinter und Video Kopieprocessor P66E  
Glasgeräte (Deckgläschen, Pipetten, Gefäße, Flaschen, Absaugflasche)  
Geiger-Müller-Zähler SB1210B  
Heizblock Thermostat 5320  
Homogenisator Polytron PT10/35  
Magnetrührer KMO2 ic  
Mikroskop  
Multipetten  
pH-Meter pH 522  
Photometer Gene Quant  
Photometer DU-64  
Pipetten  
Pipettenstopfautomat Typ P 500  
Pipettus  
Pumpe EKF 45  
  
Pumpe ME2C  
Sequenzierautomat Gene Reder 4200 Licor  
Sequenzierzubehör  
Sterilwerkbank Gelaire BSB-A LAF-System  
Sterilwerkbank LaminarAir HA 2448 GS  
Scintillationszähler LS 5000 TD  
Sterilisationstrockenschrank S40  
Thermocycler  
Ultraschallstab Labosonik 1510  
Vortexgerät Vibrax-VXR  
Vortexgerät VF2  
Vortexgerät Reax 2000  
Analysewaagen A 210 P und 2004 MP

**Hersteller**

Javelin Electronics  
Hitachi  
Mitsubishi  
Merck; Brandt  
  
Berthold  
Eppendorf  
Kinematika  
Janke+Kuntze  
Diavert-Leitz  
Eppendorf  
WTW  
Pharmacia Biotech  
Beckman  
Eppendorf  
Bachofer  
Flow-Laboratories  
Greiffenberger Antriebstechnik GmbH  
Vakuubrand  
MWG Biotech  
MWG Biotech  
Flow Laboratories  
Heraeus  
Beckman  
Memmert  
Biometra  
B. Braun  
Ika Combimag  
Jahnke und Kunkel  
Heidolph  
Sartorius

**Arbeitsgeräte**

Analysenwaage FA 3100-2iEC  
Analysenwaage Automat 20  
Laborwaagen L 610 und 200 MP  
Wasserbad WB10  
Tischzentrifugen 5415C, 5414 und 5402  
Tischzentrifugen 1K15 und 2K15  
Kühlzentrifuge CPKR

**Hersteller**

Faust  
Webeco  
Sartorius  
Mettler 1003 GFL  
Eppendorf  
Sigma  
Beckman

***Arbeitsmaterialien*****Arbeitsmaterialien**

Cloning cylinder  
Counting Vials  
Einfrierröhrchen  
Eppendorfggefäße 0,5; 1,5; 2ml  
Faltenfilter  
Glasfaserfilter GF/B  
Parafilm  
Pipettentips 10, 100, 1000µl  
Filtertips  
Reagenzgläser  
Zellkulturschalen, Multiwells 6, 12, 24 Zellkultur  
flaschen 25,75, 175cm<sup>2</sup>  
Zellschaber

**Hersteller**

Sigma  
Packard Bioscience  
Nunc  
Eppendorf  
Schleicher & Schuell  
Whatman  
Brand  
Eppendorf  
Fischer Scientific  
Greiner  
Nunc  
Merck

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **In vitro Mutagenese**

Mit der gerichteten Mutagenese kann durch eine Basensubstitution eine beliebige Aminosäure in einem Protein ausgetauscht werden. Eine gerichtete Mutagenese wird mit Hilfe chemisch synthetisierter Oligonucleotide unter Einsatz der PCR-Technik durchgeführt. Dabei ist das mutagene Oligonukleotid, mit Ausnahme eines Nucleotids, zu dem entsprechenden zu mutierenden Sequenzbereich der DNA komplementär. Die Fehlpaarung wird so gewählt, daß durch das falsche Nukleotid eine andere Aminosäure kodiert wird.

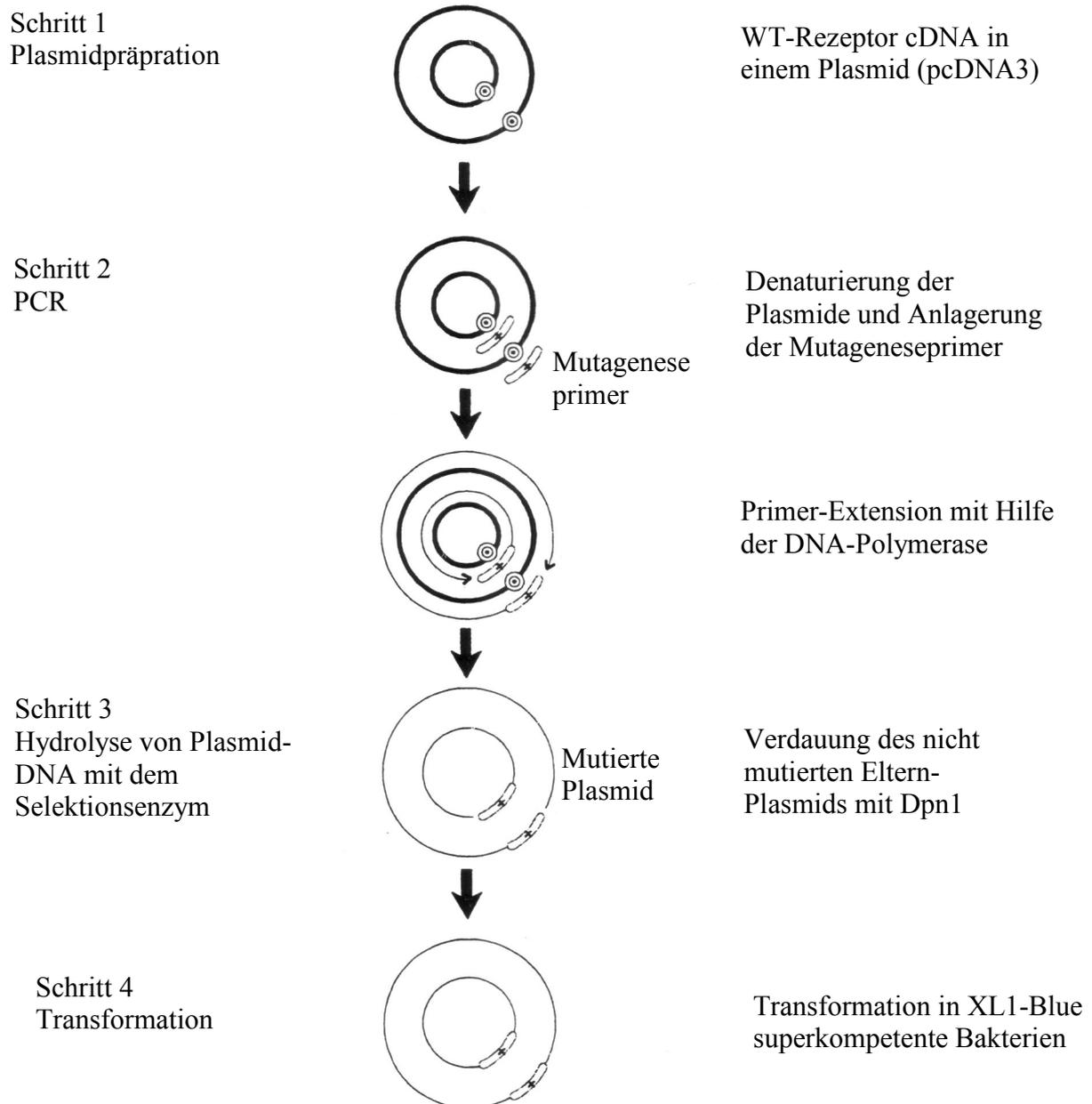


Abbildung 8: In vitro Mutagenese

Die natürlich vorkommenden Varianten der h5-HT<sub>1A</sub> und h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren wurden mit Hilfe des Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) hergestellt (Abb. 8).

Nach Angaben des Herstellers wurden Oligonukleotide bestellt, die die folgenden Bedingungen erfüllen:

Beide Mutageneseprimer sollten die gewünschte Mutation haben.

- ◆ Die Primer sollten 25-45 Basen lang sein und eine Annealing-Temperatur von 78°C oder höher aufweisen.
- ◆ Der gewünschte Basenaustausch sollte in der Mitte des Oligonukleotids liegen.
- ◆ Der Gehalt der Basen G und C sollte minimal 40 % betragen, und die Primer sollten mit einer oder mehreren G- oder C-Basen enden.

Folgender Reaktionsansatz wurde in einem 0,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen auf Eis pipetiert:

- ◆ 5µl Reaktionspuffer
- ◆ 5ng Wildtyp-cDNA im pcDNA3-Vektor
- ◆ 125ng Mutageneseprimer
- ◆ 1µl dNTP-Mix
- ◆ ad 50µl Aqua dest.
- ◆ 1µl DNA-Polymerase

Der Reaktionsansatz wurde mit 30µl Mineralöl beschichtet und einer PCR mit folgenden Parametern unterworfen:

95°	30s	Denaturierung	} 12 Zyklen:
55°	60s	Annealing	
68°	14 min	Elongation	

Zur Verdauung der nicht mutierten cDNA wurde 1µl des Restriktionsenzym Dpn 1 zugegeben und der Reaktionsansatz 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden 50µl kompetente XL1-Blue-Bakterien mit 1µl des Restriktionsansatzes gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden wurde der Ansatz zwei min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml des vorgewärmten SOC-Mediums wurde der Ansatz bei 37°C eine Stunde geschüttelt und anschließend auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Die einzelnen Kolonien wurden gepickt, in ein 3ml LB-Amp-Medium überführt und zwölf Stunden bei 37°C geschüttelt. Die Plasmid-DNA wurde durch eine Minipräparation isoliert und die Mutation mittels einer Restriktionsanalyse und Sequenzierung bestätigt.

## Plasmid-DNA Minipräparation

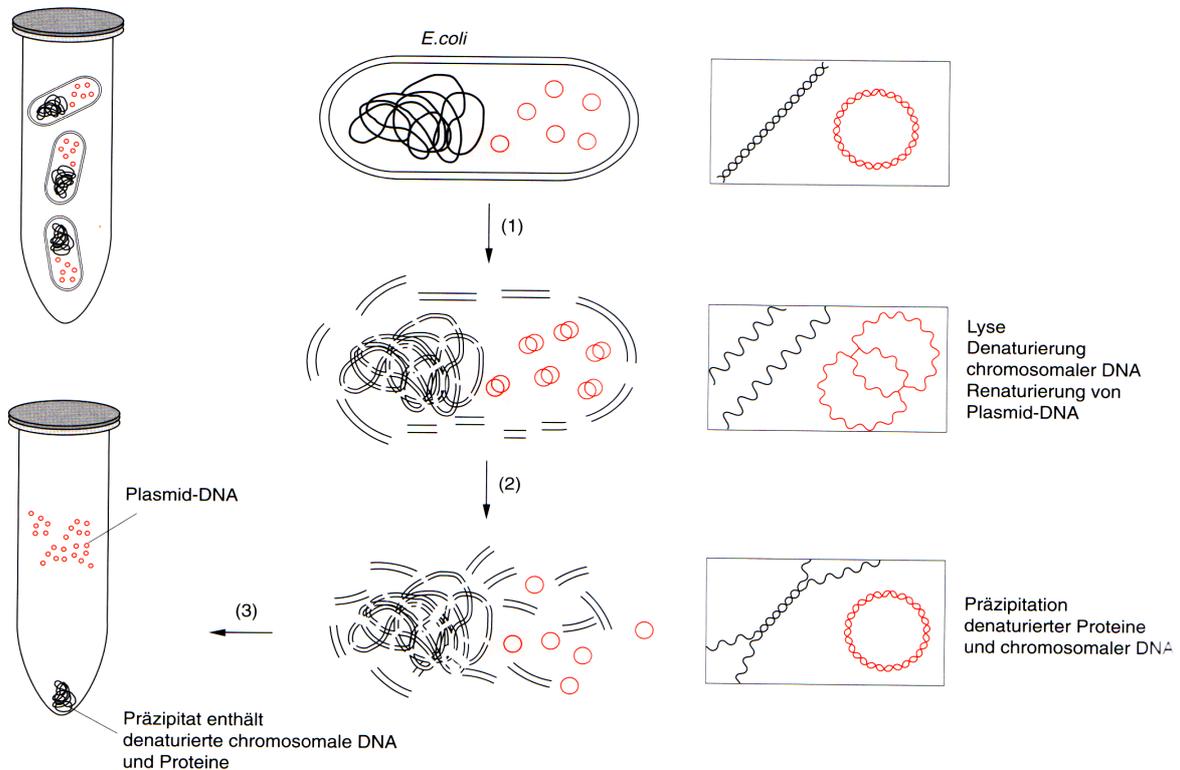


Abbildung 9: Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterien zur Isolierung der Plasmid-DNA.

(1) Im ersten Schritt werden die Bakterien mit Hilfe von SDS lysiert und die DNA durch Natriumhydroxid denaturiert.

(2) Zugabe von Kaliumazetat neutralisiert die Lösung. Die denaturierten Proteine und die chromosomale DNA präzipitieren mit dem Kaliumsalz des Dodecylsulfats. Die niedermolekulare Plasmid-DNA bleibt in Lösung und kann renaturieren.

(3) Die unlöslichen Komplexe werden abgetrennt und die Plasmid-DNA kann isoliert werden.

Die Plasmid-DNA Minipräparation wurde, wie im Abb.9 schematisch dargestellt, mit Hilfe des QIAprep Miniprep Kits (Qiagen) durchgeführt.

Es wurden 2ml einer Bakteriensuspensionskultur zwei Minuten zentrifugiert und das Sediment in 250µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Dem Resuspensionspuffer wurde RNase zugesetzt, um die bakterielle RNA zu degradieren. Nach der Zugabe von 250µl NaOH/SDS-Puffer wurden die Bakterien lysiert. SDS löst die Phospholipide und die Proteinkomponenten der Zellwände. NaOH denaturiert die DNA und Proteine. Die Dauer der Inkubation ist so gewählt, dass möglichst viel Plasmid-DNA freigesetzt wird, ohne die chromosomale DNA freizusetzen. Das Lysat wird mit 350µl saurem Kaliumacetat-Puffer 3 neutralisiert. Denaturierte Proteine, denaturierte chromosomale DNA und bakterielle Zelldebris bilden in Anwesenheit von Kaliumdodecylsulfat unlösliche Komplexe und werden zusammen mit dem Salz präzipitiert, während die Plasmid-DNA in der Lösung bleibt (Abb. 9). Das Sediment wurde mittels Zentrifugation (10 Minuten, 10.000xg) abgetrennt. Der klare Überstand wurde auf eine Silikagel-Spin Säule aufgetragen, gereinigt und zweimal mit 35µl Aqua dest. eluiert. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt.

### **Plasmid-Megapräparation (Qiagen)**

500ml einer Bakterienübernachtkultur wurden 15 Minuten bei 4°C und 6000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50ml Resuspensionspuffer P1 vollständig gelöst. Nach der Zugabe von 50ml Lysispuffer P2 wurde der Ansatz vorsichtig durchmischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 50ml eiskalter Puffer P3 zugegeben, sofort vorsichtig durchmischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es bildete sich ein weißes Sediment, das denaturierte Proteine, genomische DNA, Zellfragmente und SDS enthält. Die Suspension wurde in einen 40ml Beckman-Zentrifugenbecher überführt und zwanzig Minuten bei 4°C und 20.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen neuen Zentrifugenbecher dekantiert und fünfzehn Minuten erneut bei 4°C und 20.000xg zentrifugiert. Der klare Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, wurde rasch entfernt und auf eine Quiagen-Säule aufgetragen, die vorher mit 35ml QBT-Puffer equilibriert wurde. Nach dem Durchlauf wurde die Säule viermal mit 50ml QC-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA zweimal mit 17,5ml QF-Puffer eluiert, wobei die Lösung direkt in einem Beckman-Zentrifugebecher aufgefangen wurde. Zur DNA-Fällung wurde 0,7 Volumen Isopropanol zugegeben und nach zehn Minuten Inkubation bei Raumtemperatur dreißig Minuten bei 4°C und 15.000xg zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 7ml eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Nach 15min Zentrifugation bei 4°C und 5.000xg wurde der

Überstand vorsichtig dekantiert, das DNA-Pellet luftgetrocknet und in 500µl Aqua dest. aufgenommen.

### Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA

Die Restriktionsanalyse wurde zur Identifizierung und Klonierung eingesetzt. Diese Analyse basiert auf der Aktivität von Restriktionsenzymen, die in der Lage sind, doppelsträngige DNA-Moleküle an spezifischen Erkennungstellen zu binden und zu spalten. Die entstehenden Restriktionsfragmente haben eine definierte Länge und können durch Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt werden.

Der Ansatz, der 1U Enzym/µg Plasmid-DNA, eine entsprechende Menge an Restriktionspuffer und Wasser bis zum Endvolumen von 20-30µl enthält, wurde ein bis zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

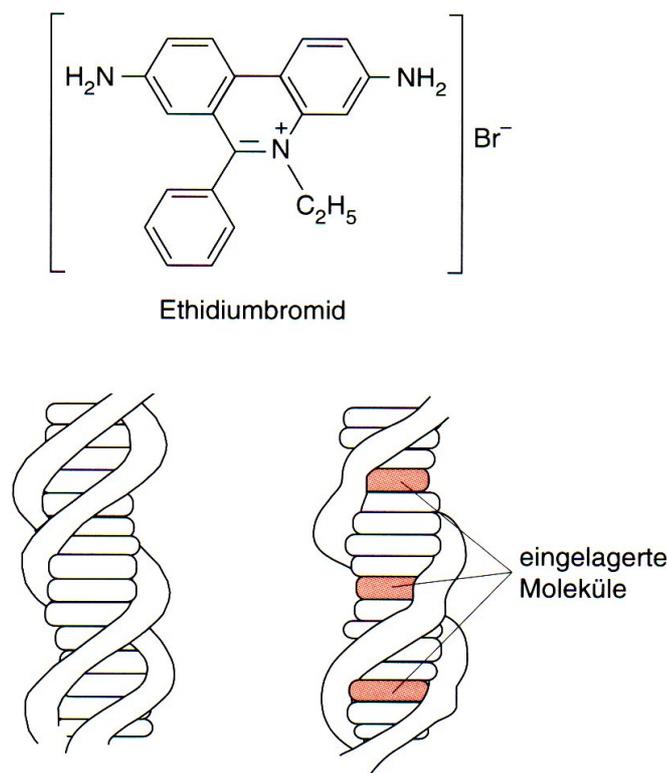


Abbildung 10: Reaktion von Ethidiumbromid mit DNA Aufgrund seiner Struktur kann Ethidiumbromid in die DNA interkalieren. Dabei interagieren seine aromatischen Ringe mit den heteroaromatischen Ringen der Basen der Nukleinsäuren

### **Agarose-Gelelektrophorese**

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 0,8% Agarosegele in 1xTBE-Puffer verwendet. Das Gel wurde mit einer Ethidiumbromid-Lösung versetzt, die in DNA interkaliert und so die DNA-Fragmente in UV-Licht sichtbar macht (Abb.10).

Das Agarosegel wurde nach der Polymerisierung in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen des DNA-Auftragepuffers versetzt und auf das Gel aufgetragen. Der Auftragepuffer dient dazu, mit Hilfe von Ficoll die Dichte der DNA-Lösung zu erhöhen, so daß die Lösung beim Auftragen in die Taschen des Gels absinkt und nicht in den Laufpuffer diffundiert; zusätzlich enthält er den Farbstoff Bromphenolblau, der während der Elektrophorese mit der DNA wandert. Als Größenstandard wurde 1µg 1kb DNA-Ladder, der die Fragmente mit genau definierten Größen enthält, in einer separaten Spur aufgetragen. Anhand dieses Größenstandards erfolgte dann die Größenbestimmung der DNA-Fragmente. Die Elektrophorese erfolgte bei 40-80mA. Dabei wandern die DNA-Polyanionen zur Anode mit einer Geschwindigkeit, die von der Größe der Moleküle abhängig ist. Nachdem der Blaumarker die Unterkante des Gels erreicht hatte, wurden die DNA-Fragmente in UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert.

### **Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA**

Die Konzentrationsbestimmung von DNA basiert auf dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260nm. Die Absorption wird photometrisch gemessen. Eine 50µg/ml doppelsträngige DNA-Lösung besitzt einen Absorptionwert von eins (optische Dichte). Dieser Wert dient zur Bestimmung der Konzentration der unbekanntes DNA-Lösung.

Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt, basierend auf der Absorption der aromatischen Aminosäurereste, bei 280nm. Durch die Bestimmung des Verhältnisses der Absorption bei 260 und 280nm lässt sich die Reinheit einer Plasmid-DNA-Lösung abschätzen.



werden. Die Reaktion wird in einem Thermocycler durchgeführt. Der fluoreszent markierte Sequenzprimer und die zu sequenzierende DNA wurden mit den dNTPs, ddNTPs und dem Enzym zusammen pipetiert und unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

95°C	2min	} 30 Zyklen	Denaturierung
95°C	30sec		Denaturierung
60°C	30sec		Anlagerung des Sequenzprimers
70°C	30sec		Kettenverlängerung

Die DNA-Fragmente wurden mittels Elektrophorese getrennt, die mittels Polyacrylamidgel, das zwischen zwei Glasplatten gegossen wird, durchgeführt wird. Die Sequenzierung erfolgte mit einem automatischen Sequenziergerät, das zur Detektierung des markierten DNA-Fragments einen Laserstrahl verwendet. Die Daten wurden auf den Computer übertragen und ausgewertet.

### Ligation

Die linearisierte Vektor-DNA und das Insert wurden mittels Verdau mit Restriktionsenzymen erhalten und durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden in UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend eluiert.

0,5µl Vektor-DNA wurden mit 3,5 µl Insert und 1µl T4-DNA-Ligase in Ligase-Puffer über Nacht bei 14°C inkubiert. 1-2µl des Ligationsansatzes wurden für die Transformation von kompetenten Bakterien eingesetzt.

### Transformation kompetenter Bakterien

Die Transformation kompetenter Bakterien wurde mit Hilfe eines Original TA Kloning Kits (Invitrogen) durchgeführt. Dabei wurden 100µl kompetente Bakterien vorsichtig mit 2µl 0,5M β-Merkaptoethanol gemischt. 1-2µl des Ligationsansatzes wurden zugegeben und die Mischung 30 min lang auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden. Danach wurde der Ansatz noch 2 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 250µl vorgewärmtem SOC-Medium versetzt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C im Schüttler wurden die Bakterien auf LB-Amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde aus einzelnen Kolonien mittels Minipräparation isoliert und durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung analysiert.

### **Einfrieren von Bakterien**

700µl einer Bakteriensuspension wurden in Kryoröhrchen überführt, mit 300µl 50% Glycerol gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2.2 Zellkulturmethoden**

#### **Sterilisationsverfahren**

Das Material aus Metall, Gummi, Kunststoff und thermostabile Lösungen wurden autoklaviert, Glaswaren durch trockene Hitze sterilisiert. Thermolabile Lösungen wurden sterilfiltriert. Arbeitsgeräte wurden vor Gebrauch mit Freka<sup>®</sup> Nol besprüht und unter die Sterilbank gestellt, die 20 min vor Arbeitsbeginn in Betrieb genommen worden war.

#### **Herstellung von sterilem Medium**

Nach Angaben des Herstellers wurde eine vorportionierte Menge an lyophilisiertem Pulvermedium mit einer entsprechenden Menge  $\text{NaHCO}_3$  in 10 Liter Aqua dest. gelöst und der pH-Wert auf 7,3 mit NaOH eingestellt. Das Medium wurde durch eine Sterilfiltrationsanlage gefiltert und in sterile Glasflaschen gefüllt. Das Medium wurde bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Vor dem Gebrauch wurde das Medium mit hitzeinaktiviertem Serum (FKS) und Antibiotika (Penicillin 10000U/ml, Streptomycin 10mg/ml) versetzt. Zur Herstellung stabiler Klone wurden dem Medium zusätzlich  $8\mu\text{g/ml}$  G418 zugesetzt.

#### **Hitzeinaktivierung von FKS**

Die Hitzeinaktivierung erfolgte durch Erwärmung des Serums auf  $56^{\circ}\text{C}$  für 30min im Wasserbad und diente zur Verminderung von störenden Einflüssen aus dem Serum.

#### **Kultivierung von HEK293-Zellen**

Die Zellen wurden im DMEM/HAM's F12 Medium unter Zusatz von fötalem Kälberserum (10%), Penicillin (100U/ml) und Streptomycin ( $10\mu\text{g/ml}$ ) kultiviert. Diese Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  und 100% Luftfeuchtigkeit. Stabile Zelllinien wurden zusätzlich mit  $8\mu\text{g/ml}$  G418 kultiviert. Das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt. Nachdem die Zellen 80-90% Konfluenz erreicht hatten, wurden sie umgesetzt. Zum Passagieren wurde das Medium abgesaugt, und die Zellen wurden mit sterilem PBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe einer Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen fünf Mi-

nuten bei 37° inkubiert. Danach wurden 10ml Medium pro Flasche zugegeben, die Zellsuspension in 50ml Falkon-Röhrchen überführt und fünf Minuten bei 250xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und auf frische Zellkulturflaschen verteilt.

### **Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen**

Zur dauerhaften Lagerung werden von den Zellen Dauerkulturen angelegt, die tiefgefroren und bei Bedarf wieder aufgetaut und kultiviert werden können.

Zum Einfrieren wurden Zellen in konfluenten 175cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, abzentrifugiert und in 5ml frischem Medium resuspendiert. Es wurden 500µl DMSO zugegeben, die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und sofort in einer Einfrierbox eingefroren. Die Lagerung erfolgte in einem Stickstofftank.

Um die Zellen in Kultur zu nehmen, wurden zwei Kryoröhrchen bei 37°C aufgetaut und in 50ml Zellkulturöhrchen mit frischem Medium überführt. Nach fünf Minuten Zentrifugation bei 250xg wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in 175cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt.

### **Zellzahlbestimmung**

Zur Bestimmung der Zellzahl sowie zur Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen wurde die Färbung mit Trypanblau verwendet. Während lebende Zellen in der Lage sind, den Farbstoff auszuschließen und unter dem Mikroskop hell zu erscheinen, nehmen die toten Zellen Trypanblau auf und sind tiefblau gefärbt.

Es wurden 50µl der Zellsuspension mit 50µl Trypanblau vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Mindestens vier große Quadrate wurden gezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{Zahl der Quadrate}} \times 2 \times 10000$$

### **Transfektion**

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA in eine Zelle. Dabei unterscheidet man zwischen transienter und stabiler Transfektion. Bei der transienten Transfektion werden die Proteine bis zum Abbau der Plasmide nur wenige Tage exprimiert. Dagegen wird bei stabiler Transfektion die DNA in das Zellgenom eingebaut und das Protein dauerhaft exprimiert. Stabile Transfektion kann durch einen Selektionsdruck erreicht werden.

Es wurden unterschiedliche Methoden entwickelt, um die Barriere, die die Zellmembran für die Transfektion darstellt, zu überwinden. In dieser Arbeit wurde die Calcium-Phosphat-Technik und die Lipofectamintransfektion angewandt.

### Transfektion mit der Calciumphosphat-Methode

Bei dieser Methode wird die DNA mit  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gemischt und langsam, tropfenweise mit dem Phosphatpuffer versetzt. Die gebildeten DNA-Calciumphosphat-Copräzipitate werden, in das Medium gegeben, auf der Zelloberfläche adsorbiert und durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen (Abb.12)

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in  $60\text{cm}^2$  Zellkulturschalen ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion 20-50% konfluent sind. Es wurde  $24\mu\text{g}$  Plasmid-DNA mit  $600\mu\text{l}$   $0,25\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ -Lösung gemischt und  $600\mu\text{l}$  BBS tropfenweise zugegeben. Das Transfektionsgemisch wurde fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung tropfenweise auf die Zellen gegeben und die Schalen wurden leicht geschwenkt. Die Zellen wurden zwanzig Stunden bei  $35^\circ\text{C}$  und  $3\%$   $\text{CO}_2$  inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit sterilem PBS-Puffer gewaschen und bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\%\text{CO}_2$  weiter kultiviert.

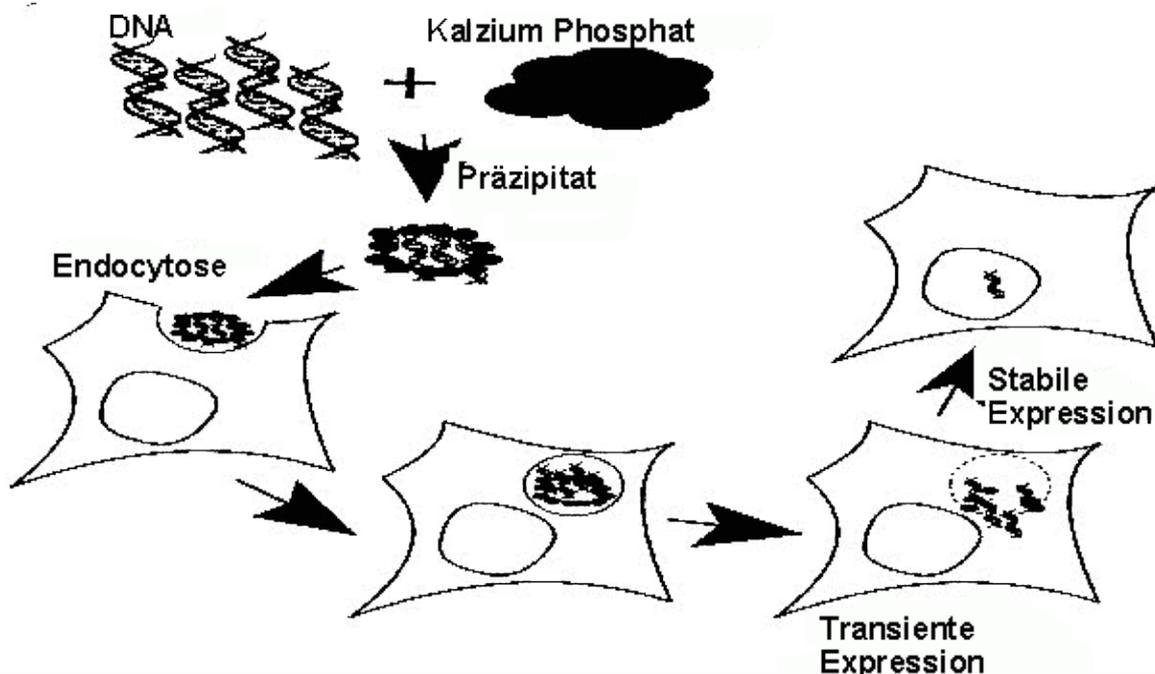


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Calciumphosphat-Transfektionsmethode

### Transfektion mit Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen)

Bei dieser Methode verwendet man kationische Lipide, um die Plasmid-DNA zu binden und in die Zellen einzuschleusen. Das Verhältnis von kationischem Lipid und DNA wird so gewählt, dass eine positive Nettoladung resultiert. Die Komplexe werden wahrscheinlich an negativ geladene Sialinsäurereste auf der Zelloberfläche gebunden und durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen (Abb. 13).

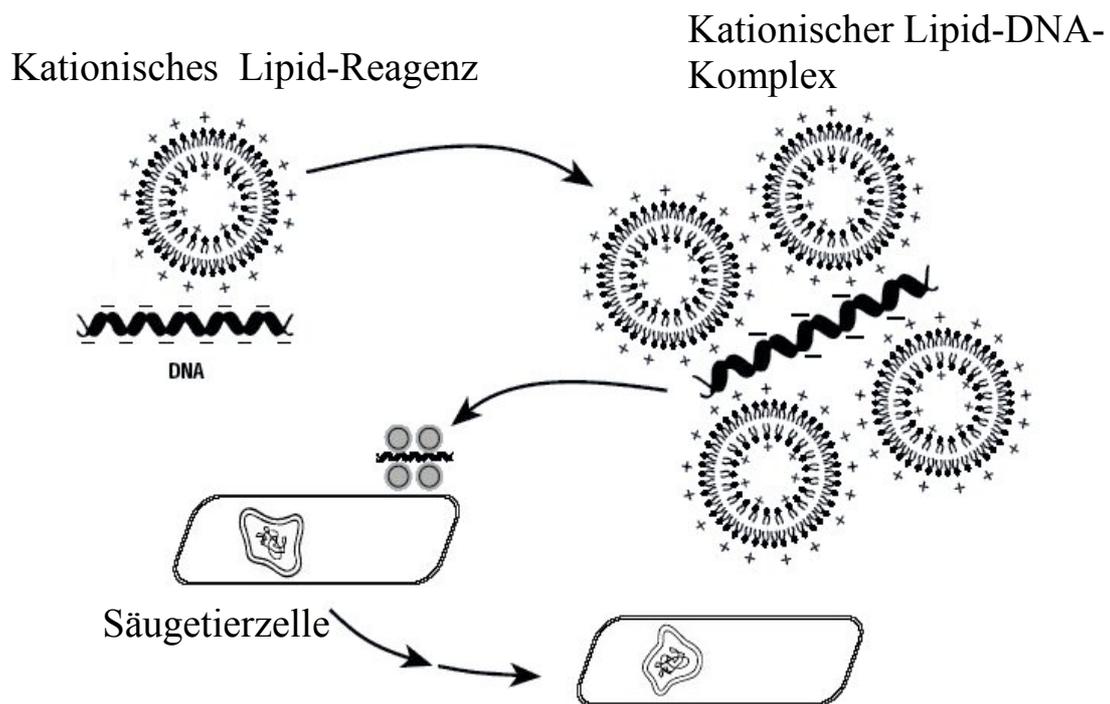


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Transfektion mit Lipofectamin

Entsprechend den Angaben des Herstellers wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion in antibiotikafreiem Medium ausgesät, so dass sie am nächsten Tag 50-70% konfluent waren.

Es wurden 70µg Plasmid-DNA in 5ml Medium ohne weitere Zusätze verdünnt. Die Lipofectamin-Lösung wurde leicht geschüttelt und 170ml wurden mit 5ml Medium ohne Zusätze verdünnt. Nach fünf Minuten Inkubation wurde die verdünnte DNA mit Lipofectamin gemischt, leicht geschüttelt und zwanzig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf die Zellen gegeben; nach fünf Stunden wurde das Medium durch ein normales Kulturmedium ersetzt.

Die transient transfizierten Zellen wurden nach 48-72 Stunden für Sättigungsversuche verwendet oder zur Herstellung stabiler Zelllinien weiterverarbeitet.

### **Herstellung stabiler Zelllinien**

Die Herstellung stabiler Zelllinien erfolgte unter Einsatz des Aminoglycosidantibiotikums Geneticin (G418).

Zwei Tage nach der Transfektion wurde das Medium durch ein selektierendes Medium mit 8µg/ml Geneticin ersetzt und die Zellen wurden 14 Tage lang unter Selektionsdruck gehalten. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen eingesetzt. Nach dem Absterben der Kontrollzellen wurden die einzelnen resistenten Klone markiert, mit Hilfe von Cloning-Zylindern unter Verwendung einer Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und auf eine 12-Multiwellplatte überführt. Die Zellen wurden unter Selektionsdruck kultiviert, bis eine für die Membranpräparation ausreichende Menge vorhanden war. Positive Klone wurden durch die Radioligandbindung ermittelt, in größeren Mengen kultiviert und entweder für die Membranpräparation oder für die Bestimmung der Adenylatzyklase-Hemmung an ganzen Zellen eingesetzt.

## **2.2.3 Biochemische und pharmakologische Methoden**

### **Membranpräparation**

Die Zellen aus einer konfluenten 175cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche wurden mit dem kalten PBS-Puffer gewaschen und nach der Zugabe von 5ml Membran-Puffer (5mM HEPES; 0,5mM EGTA; 0,1mM Ascorbinsäure; 0,3mM PMSF; pH7,4) abgeschabt. Die Zellen wurden 3x dreißig Sekunden mit dem Polytron-Homogenisierer auf Eis zerstört, und die Suspension 5 Minuten bei 1.000xg, 4°C zentrifugiert. Das Pellet enthält Zellkerne und unaufgebrochene Zellen und wird verworfen. Der Überstand, der die gewünschten Zellmembranbestandteile mit h5-HT-Rezeptoren enthielt, wurde gesammelt, auf 40ml verdünnt und 25 Minuten bei 40.000xg, 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal gewaschen (in 40ml Puffer resuspendiert und anschließend 25 Minuten bei 40.000xg, 4°C zentrifugiert) und in 1ml Puffer aufgenommen. Die Membranen wurden bei -80°C gelagert.

### **Bindungsstudien**

Die Charakterisierung membranständiger Rezeptoren mit Hilfe von Radioliganden basiert auf dem Massenwirkungsgesetz. Zwischen dem Rezeptor und dem Liganden ent-

steht eine spezifische und reversible Rezeptor-Ligand-Interaktion. Das Ausmaß dieser Interaktion ist von der Rezeptormenge und der Ligandkonzentration abhängig.

Nach einer ausreichend langen Inkubationszeit stellt sich ein Gleichgewicht zwischen dem Ligand-Rezeptor-Komplex und dem freien Ligand bzw. dem Rezeptor ein. Die Inkubationsreaktion wird dann durch Abtrennung des freien Radioliganden beendet. Die gebräuchlichste Methode ist die Vakuum-Filtration. Nach der Filtration enthalten die Filter die Rezeptoren mit gebundenen Radioligandmolekülen. Anschließend kann die Bindung des radioaktiven Liganden an die Membrane durch Detektion der Radioaktivität quantifiziert werden.

Die Gesamtbindung des Radioliganden umfasst außer der spezifischen Ligand-Rezeptor-Interaktion auch eine unspezifische Bindung. Ursachen dieser unspezifischen Bindung sind unter anderem Wechselwirkungen mit anderen Membranproteinen, Membranlipiden und mit verwendeten Materialien (Filter). Die spezifische Bindung erreicht bei zunehmender Konzentration des Radioliganden einen Maximalwert, während die unspezifische Bindung nicht sättigbar ist. Um den Anteil der spezifischen Bindung zu quantifizieren, bestimmt man die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung in parallelen Reaktionsansätzen. Die unspezifische Bindung wird mit Hilfe eines zweiten, nicht radioaktiven Liganden ermittelt, der im Überschuss (mindestens  $100 \times K_D$ ) eingesetzt wird. Unter dieser Bedingung besetzt der nicht radioaktive Ligand die spezifischen Bindungsstellen durch Verdrängung des radioaktiven Liganden, während der radioaktiv markierte Ligand an den unspezifischen Bindungsstellen gebunden bleibt. Die Bindung, die in diesem Ansatz noch detektierbar ist, stellt eine unspezifische Bindung dar. Der Anteil der spezifischen Rezeptorbindung wird aus der Differenz von Gesamtbindung und unspezifischer Bindung ermittelt (Abb.14).

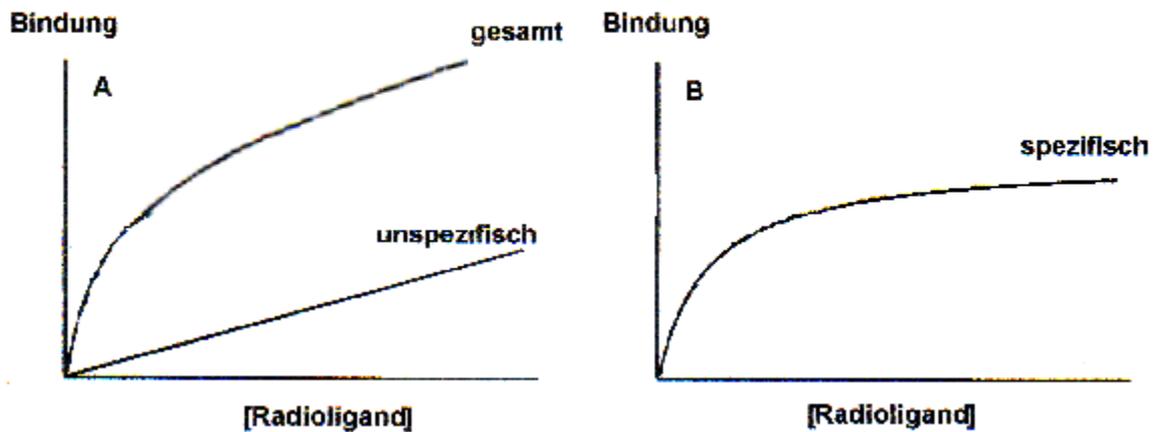


Abbildung 14: Gesamtbindung, unspezifische Bindung und spezifische Bindung. Im Unterschied zur spezifischen Bindung ist die unspezifische Bindung nicht sättigbar. B.: Aus Differenz zwischen der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung ergibt sich die spezifische Bindung

Zur Charakterisierung der Ligand-Rezeptor-Interaktion wurden zwei experimentelle Verfahren angewandt. In Sättigungsversuchen erfolgt die Inkubation bei konstanter Rezeptormenge mit steigenden Radioligandkonzentrationen. Aus dem Sättigungsverlauf der spezifischen Bindung lassen sich die Rezeptordichte  $B_{\max}$  und die Dissoziationskonstante  $K_D$  der Ligand-Rezeptor-Bindung bestimmen. Inhibitions- oder Verdrängungsverfahren ermöglichen die Bestimmung der Affinität eines weiteren nicht radioaktiv markierten Liganden zum Rezeptor. Der Radioligand wird dabei durch steigende Konzentrationen des nicht radioaktiv markierten Liganden aus seiner spezifischen Bindung an den Rezeptor verdrängt.

### Inhibitionsexperimente

In Inhibitionsexperimenten wird der Effekt von Agonisten und Antagonisten auf die Gleichgewichtsbindung des Radioliganden untersucht. Dabei wird die Membransuspension mit einer konstanten Konzentration des Radioliganden und mit steigenden Konzentrationen von Testsubstanzen inkubiert. Als Radioligand an dem 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor wurde der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonist [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT (8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, spezifische Aktivität 240Ci/mmol) verwendet. Für die Inhibitionsversuche an 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren

wurde der radioaktiv markierte Antagonist [<sup>3</sup>H]GR65630 (3-(5-Methyl-1H-imidazol-4-yl)-1-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1-propanon, spezifische Aktivität 75 Ci/mmol) eingesetzt. Die Konzentration des jeweiligen Radioligandes betrug 1nM.

Die Membranen wurden im Assay-Puffer verdünnt. Folgender Reaktionsansatz wurde eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert:

- ◆ 50µl Radioligandlösung, Endkonzentration 1nM
- ◆ 50 µl Lösung des nichtmarkierten Kompetitors in steigenden Konzentrationen
- ◆ 400µl Membransuspension (20µg Protein)

Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgte in Gegenwart von 10µM Methysergid (5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor) oder 100µM MDL72222 (5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor).

Anschließend wurde die gebundene Radioaktivität von der freien Radioaktivität durch eine Vakuumfiltration getrennt. Für die Filtration wurden PE-beschichtete GF/B-Filter verwendet. Die Filter wurden mit kaltem Waschpuffer gespült, in die Szintillationsvials überführt und mit 4ml Szintillator versetzt. Die Szintillationsflüssigkeit diente zur Auflösung der Proteinbestandteile der Membransuspension und zur Erzeugung des radioaktiven Zerfallssignals. Die Vials wurden über Nacht geschüttelt und anschließend gemessen. Für jede Konzentration eines konkurrierenden nicht markierten Liganden wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

### Sättigungsexperimente

In Sättigungsexperimenten wurden die maximale Bindungskapazität  $B_{max}$  und die Affinität des eingesetzten Radioliganden  $K_D$  ermittelt. Als radioaktiv markierter 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonist ist [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT (8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, mit spezifischer Aktivität 240Ci/mmol) in acht Konzentrationen (0,15-8,48 nM) verwendet worden. Für die Bindungsversuche an 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren kam der radioaktiv markierte selektive Antagonist [<sup>3</sup>H]GR65630 (3-(5-Methyl-1H-imidazol-4-yl)-1-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1-propanon mit spezifischer Aktivität 75 Ci/mmol) in Konzentrationen von 0,07 bis 4,8 nM zum Einsatz.

Die Membranen wurden in Anwesenheit eines entsprechenden Radioliganden in steigenden Konzentrationen eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Das Inkubationsvolumen betrug 500µl mit folgender Zusammensetzung:

- 50 µl Inkubationspuffer (mM: 5 HEPES, 0,5 MgCl<sub>2</sub>, 0,5 EGTA, 0,1 Ascorbinsäure)
- 50 µl Lösung des Radioliganden (in steigender Konzentration).
- 400µl Membransuspension (20µg Protein)

Die unspezifische Bindung wurde für den h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor in Gegenwart von 100µM MDL-72222, für den h5HT<sub>1A</sub>-Rezeptor in Gegenwart von 10µM Methysergid, bestimmt. Für jede Konzentration des jeweiligen Radioliganden wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die gebundene Radiolaktivität wurde, wie oben beschrieben, durch Vakuumfiltration von der freien Radioaktivität getrennt und gemessen.

### **[<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung**

Das Ausmaß der G-Proteinkopplung wurde mittels [<sup>35</sup>S]GTPγS-Assay bestimmt. [<sup>35</sup>S]GTPγS ist ein schwer hydrolysierbares radioaktiv markiertes GTP-Analogon, das nach Aktivierung des Rezeptors durch einen Agonisten irreversibel an die α-Untereinheit des membranständigen G-Proteins gebunden wird. Auch die konstitutive Aktivität des Rezeptors kann mit dieser Methode erfaßt werden. Dieses Verfahren erlaubt es, das Ausmaß der G-Protein-Kopplung des Rezeptors durch die einfache Messung der Radioaktivität in Membranpräparaten der betreffenden Zellen mit Hilfe des Szintillationszählers zu bestimmen.

Für die [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsversuche wurden Membranen von HEK293-Zellen, die entweder den Wildtyp oder die Arg219Leu Variante des h5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors stabil exprimieren, im Assay-Puffer auf 100mg/ml verdünnt. Die basale Bindung wurde in Abwesenheit des Agonisten ermittelt. Die unspezifische Bindung wurde in einem dritten Ansatz durch Zugabe von nicht radioaktiv markierten GTPγS im Überschuss bestimmt.

Folgender Ansatz wurde 30 Minuten bei 30°C inkubiert:

- ◆ 50µl Assay-Puffer (basale Bindung), oder 50µl 10µM GTPγS (unspezifische Bindung), oder 50µl der zu testenden Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen
- ◆ 50µl [<sup>35</sup>S]GTPγS, Endkonzentration 0,08nM
- ◆ 400µl Membransuspension

Jeder unter den einzelnen Bedingungen gemessene Wert wurde durch Dreifachbestimmung gesichert. Die Reaktion wurde durch Filtration über GF/B Filter gestoppt. Die Filter wurden schnell mit dem kalten Puffer gewaschen und die gebundene Radioaktivität wie oben beschrieben gemessen.

### Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Diese Methode beruht auf einer Farbreaktion des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue mit Seitenketten des Proteins in saurem Milieu. Die Intensität des Farbstoffes korreliert direkt mit der Proteinkonzentration und kann in einem Spektralphotometer gemessen werden.

0,1g Coomassie Brilliant Blue G250 wurden in 50ml 5% Ethanol gelöst und nach der Zugabe von 100ml 85% Phosphorsäure mit Aqua dest. auf 250 ml aufgefüllt. Die Stammlösung wurde vier Wochen vor Gebrauch hergestellt. Vor dem Gebrauch wurde die so erzeugte Stammlösung 1:16 verdünnt und durch einen Faltenfilter filtriert.

200µl der zu analysierenden Proteinverdünnung (5-100µg) oder Standard-Proteinverdünnung (Rinderserumalbumin) wurden mit 1,8ml Bradford-Lösung gemischt, fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und bei 595nm im Spektralphotometer gemessen. Mittels einer Standardkurve (Absorption gegen Standard-Proteinmengen) konnte die Proteinmenge bestimmt werden.

### cAMP-Bestimmung

Zyklisches Adenosinmonophosphat ist ein second messenger und wird an der cis-Seite der Zellmembran durch das Enzym Adenylatzyklase gebildet. Eine Aktivierung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors führt über die Kopplung an ein G<sub>i/o</sub>-Protein zur Inhibition der Adenylatzyklase. Der aus der Pflanze *Coleus forskolii* stammende Forskolin aktiviert die Adenylatzyklase direkt durch die Bindung an die zytoplasmatischen Domänen des Enzyms. Das cAMP wird durch Phosphodiesterasen hydrolysiert.

Der Einfluß der Arg219Leu-Mutation auf die Agonist-induzierte Inhibition der Forskolin-stimulierten Adenylatzyklase wurde an intakten HEK293-Zellen untersucht. Die Bestimmung der intrazellulären cAMP Konzentration erfolgte nach Inkubation mit einem Agonisten im Gegenwart von Forskolin. Der Abbau des cAMP durch die Phosphodiesterasen wurde verhindert, indem dem Reaktionsansatz der Phosphodiesteraseinhibitor Isobutyl-Methyl-Xanthin (IBMX) beigemischt wurde.

Im einzelnen wurden zwei Tage vor der eigentlichen cAMP-Bestimmung 10<sup>6</sup> HEK293-Zellen in die Vertiefungen von 24-Multiwellplatten ausgesät. Die Platten waren vorher mit 10% Polyornithin-Lösung beschichtet worden, um das Ablösen der Zellen von der Oberfläche der Platten zu verhindern. Eine solche Beschichtung wurde dadurch gewährleistet, daß die Polyornithin-Lösung zwanzig Minuten auf den Platten belassen wurde und letztere anschließend zweimal mit PBS-Puffer gewaschen wurden. Vierundzwanzig Stunden nach

dem Aussäen der Zellen wurde das Medium mit 10% FKS auf den Platten durch ein Medium mit 1% FKS ersetzt.

Am Versuchstag wurden die Zellen zweimal mit 1ml vorgewärmtem CSS-Puffer gewaschen. Die Agonisten-Verdünnungen wurden in CSS-Puffer in Anwesenheit von 5mM IBMX und 10 $\mu$ M Forskolin angesetzt. Die Zellen wurden fünf Minuten mit unterschiedlichen Konzentrationen von Agonisten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde dann mit 50 $\mu$ l Perchlorsäure gestoppt. Nach der anschließenden Neutralisation mit 50 $\mu$ l KOH-Puffer wurden 50 $\mu$ l des Überstandes entnommen.

Die Bestimmung der cAMP Konzentration erfolgte mit Hilfe des cAMP-Radiorezeptor-Assay-Kit der Firma Amersham. Der Kit basiert auf dem Vergleich zwischen nichtmarkiertem cAMP und einer konstanten Menge von [ $^3$ H]cAMP, das an ein definiertes Bindeprotein gebunden ist. Das Protein besitzt eine hohe Spezifität und Affinität zu cAMP. Die Konzentration des [ $^3$ H]cAMP-Protein-Komplexes ist umgekehrt proportional zur Konzentration des unmarkierten cAMP in den Proben.

Es wurde folgender Ansatz pipettiert:

- ◆ 50 $\mu$ l Probe
- ◆ 50 $\mu$ l [ $^3$ H]cAMP-Lösung (entsprechend 0,9pmol [ $^3$ H]cAMP )
- ◆ 100 $\mu$ l Bindeprotein-Lösung (entsprechend 80 $\mu$ g Bindeprotein)

Zur Erstellung der Eichgeraden wurde eine cAMP-Standardlösung verwendet. Der Ansatz wurde gemischt und zwei Stunden auf Eis bei 4°C inkubiert.

Die gebundene Radioaktivität wurde durch Zentrifugation (zehn Minuten bei 4°C) mit einer kalten Aktivkohle-Suspension von dem freien [ $^3$ H]cAMP getrennt. 200 $\mu$ l des Überstandes wurden in Szintillationsvials überführt, mit 5ml Szintillationsflüssigkeit versetzt, geschüttelt und gemessen.

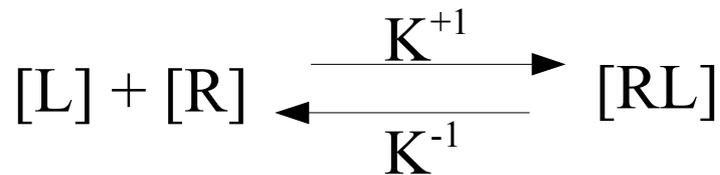
## Statistik und Berechnungen

### Bindungsstudien

#### Sättigungsversuche

Die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand kann durch die Bestimmung der Bindungsparameter  $K_d$  und  $B_{max}$  ermittelt werden. Die Dissoziationskonstante  $K_d$  ist ein Maß für die Affinität des Liganden zu dem Rezeptor. Die maximale Rezeptorzahl  $B_{max}$

charakterisiert die Menge der exprimierten Rezeptoren. Eine reversible Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand kann durch die folgende Gleichung beschrieben werden:



Die Bindung der Liganden an den Rezeptor steht in Beziehung zur freien Ligand- und Rezeptorkonzentration und ist von den Geschwindigkeitskonstanten für die Bindung und den Zerfall des Ligand-Rezeptor-Komplexes abhängig. Befindet sich die Reaktion im Gleichgewicht, kann die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante  $K_d$  folgendermaßen definiert werden:

$$K_d = \frac{K^{-1}}{K^{+1}} = \frac{[R] \times [L]}{[RL]}$$

Die Dissoziationskonstante  $K_d$  ist umgekehrt proportional zur Affinität des Liganden zu einem bestimmten Rezeptor.

Die Gesamtzahl aller Rezeptoren ergibt sich aus der Summe von freien und besetzten Rezeptoren:

$$B_{max} = [R] + [RL]$$

Durch die Kombination beider Gleichungen ergibt sich

$$[RL] = \frac{B_{max} \times [L]}{K_d + [L]}$$

Wird die spezifische Bindung, die sich als Unterschied zwischen Gesamtbindung und unspezifischer Bindung ergibt, gegen die freie Radioligandkonzentration aufgetragen, zeigt sich ein hyperbolischer Kurvenverlauf. Die computerunterstützte nicht-lineare Regressionsanalyse ermöglicht die Berechnung der Dissoziationskonstanten  $K_d$  sowie die maximale Rezeptordichte  $B_{max}$ .

### Inhibitionsversuche

In den Inhibitionsexperimenten wird die Membranpräparation mit der konstanter Konzentration des Radioliganden und unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz inkubiert. Die spezifische Bindung reduziert sich mit steigender Konzentration eines Kompetitors. Die  $IC_{50}$  ist diejenige Konzentration des nicht-markierten Kompetitors, welche eine 50%ige Abnahme der spezifischen Ligandbindung bewirkt.

Zur Auswertung eines Inhibitionsexperimentes wird die gebundene Menge des Radioliganden gegen den Logarithmus der molaren Konzentration des Kompetitors aufgetragen. An diese Datenpunkte wird eine computergestützte Kurvenanpassung vorgenommen. Die nichtlineare Regressionsanalyse der Datenpunkte liefert eine sigmoide Kompetitionskurve, aus deren Wendepunkt sich der  $pIC_{50}$ -Wert ergibt.

### CAMP-Bestimmung

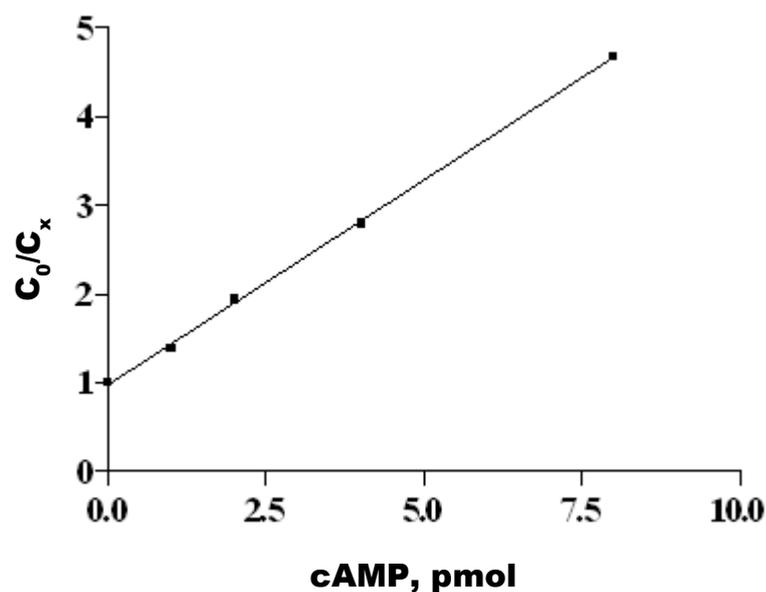


Abbildung 15: Standard Eichgerade der cAMP Bestimmung.  $C_0$  (dpm) ist der Wert in Abwesenheit von unmarkierten cAMP,  $C_x$  (dpm) der Wert in Anwesenheit des cAMP-Standards oder der Probe.

Zur Berechnung der Eichgeraden wurden die Werte von  $C_0$  (Bindung in Abwesenheit von unmarkiertem cAMP) und der cAMP-Standardwerte mit dem Nullwert (50  $\mu$ l (0,9 pmol)  $[^3H]cAMP$  + 150  $\mu$ l Tris-Puffer) korrigiert. Der Quotient  $C_0/C_x$  ( $C_x$ -Bindung in Anwesenheit

des cAMP-Standards oder der Probe) wurde nun gegen den cAMP-Wert aufgetragen (Abb.15).

Mittels Regressionsanalyse wurde der cAMP-Gehalt in den Proben ermittelt, als Prozent der maximalen Stimulation (cAMP-Gehalt in Gegenwart von Forskolin und Abwesenheit von Agonisten) ausgedrückt und gegen den Logarithmus der molaren Agonistenkonzentration aufgetragen. Durch computerunterstützte nichtlineare Regressionsanalyse wurde an die Daten eine Kurve angepasst und die  $pIC_{50}$  und  $I_{max}$ -Werte erhalten ( $pIC_{50}$  =negativer Logarithmus der Agonistenkonzentration, die eine 50%ige Hemmung hervorruft;  $I_{max}$ =maximale Inhibition).

### **Statistische Auswertung**

Bei den in dieser Arbeit angegebenen Resultaten handelt es sich um Mittelwerte aus Doppelt- oder Dreifachbestimmungen, als Streuungsmaß ist der Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Der Vergleich der Mittelwerte erfolgte mit der Hilfe des t-Tests, dabei wurde  $p < 0,05$  als statistisch signifikant angesehen. Um festzustellen, ob eine Korrelation zwischen  $IC_{50}$ -Werten der 5-HT-Rezeptor Liganden besteht, wurde eine lineare Regressionsanalyse vorgenommen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Der h5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor und seine Arg219Leu Variante

##### 3.1.1 Subklonierung in den pcDNA3-Vektor und in-vitro Mutagenese

Die cDNA des humanen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors wurde in den pcDNA3 Expressionsvektor subkloniert. Die cDNA wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme Bam H1 und Kpn 1 aus dem pSG5-Expressionsvektor hydrolisiert und mit dem pcDNA3-Vektor ligiert, der vorher mit den Enzymen Bam H1 und Kpn 1 linearisiert wurde. Der Expressionsvektor pcDNA3 besitzt im Unterschied zu dem Expressionsvektor pSG5 ein Antibiotika-Resistenzgen. Das ermöglicht bei der Herstellung von stabilen Zelllinien eine Selektion mit G418, einem für den Einsatz in Eukaryoten modifizierten Aminoglykosidantibiotikum. Das Ergebnis der Klonierung wurde mittels Restriktionsanalyse bestätigt.

Die natürlich vorkommende Variante Arg219Leu des humanen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors wurde durch eine in vitro Mutagenese mit Hilfe des Quicq Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) hergestellt. Folgende Mutageneseprimer wurden verwendet:

```
s      5'-ggg cgc ata ttc cta gct gcg cgc ttc-3
as     5'-gaa gcg cgc agc tag gaa tat gcg ccc-3
```

Der Austausch von Guanin gegen Thymin in Position 657 der cDNA führte zu einer Substitution von Arginin durch Leucin in Position 219 des Rezeptorproteins.

Die Mutation wurde durch eine mehrmalig angewandte Sequenzierung in beiden Richtungen mit Sp6, T7 und sequenzspezifischen Primern bestätigt.

##### 3.1.2 Expression in HEK293-Zellen

Der Wildtyp und die mutierte cDNA wurden in HEK293-Zellen stabil oder transient transfiziert. Zur Herstellung stabiler Klone wurde eine Selektion mit G418 über 14 Tage verwendet. Nach dem Absterben der als Kontrolle eingesetzten nichttransfizierten HEK293-Zellen wurden stabile Klone hochgezüchtet und mittels [<sup>3</sup>H]-8OH-DPAT-Bindung

untersucht. Die Klone, die die größte spezifische Bindung zeigten, wurden für Bindungsstudien oder funktionelle Tests eingesetzt.

### 3.1.3 [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT-Bindung

Die transient transfizierten Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion für Radioligand-Sättigungsversuche verwendet, um den Einfluß der Mutation auf das Ausmaß der Expression der Arg219Leu-Rezeptorvariante in der Zellmembranen zu ermitteln. An den Membranen stabil transfizierter HEK293-Zellen sollte in Konkurrenzexperimenten mit dem Radioliganden untersucht werden, ob es Unterschiede in der Affinität verschiedener Agonisten und Antagonisten zur Rezeptor-Variante im Vergleich zum Wildtyp gibt.

#### Sättigungsexperimente

Sättigungsexperimente mit [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT an Membranen von HEK293-Zellen, die mit der cDNA des Wildtyps oder Arg219Leu-Variante des h5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors transfiziert worden waren, ergaben, dass die Bindung des Radioliganden an eine einzige Bindungsstelle erfolgt. Der Radioligand wurde in einer Konzentration von 0,1 bis 8,5nM eingesetzt; die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10µM Methysergid bestimmt und betrug weniger als 10% der Gesamtbindung. Weder der B<sub>max</sub>-Wert (1546 ± 243 fmol/mg Protein) noch der pK<sub>D</sub>-Wert (8,21 ± 1,0) der Rezeptorvariante unterschied sich signifikant von den entsprechenden Werten des Wildtyp-Rezeptors (B<sub>max</sub>: 1542 ± 140 fmol/mg Protein; pK<sub>D</sub>: 8,33 ± 0,53; Abbildung 16).

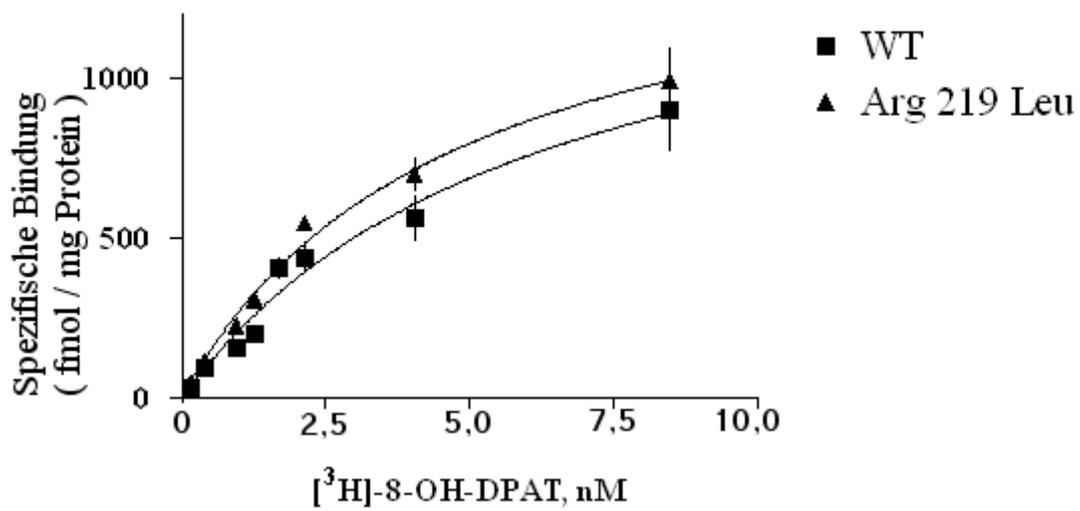


Abbildung 16: Sättigung der spezifischen [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT-Bindung an Membranen von HEK293-Zellen, die transient entweder mit dem Wildtyp oder der Arg219Leu-Variante der h5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-cDNA transfiziert worden waren. Die Daten sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimente in Dreifachbestimmung.

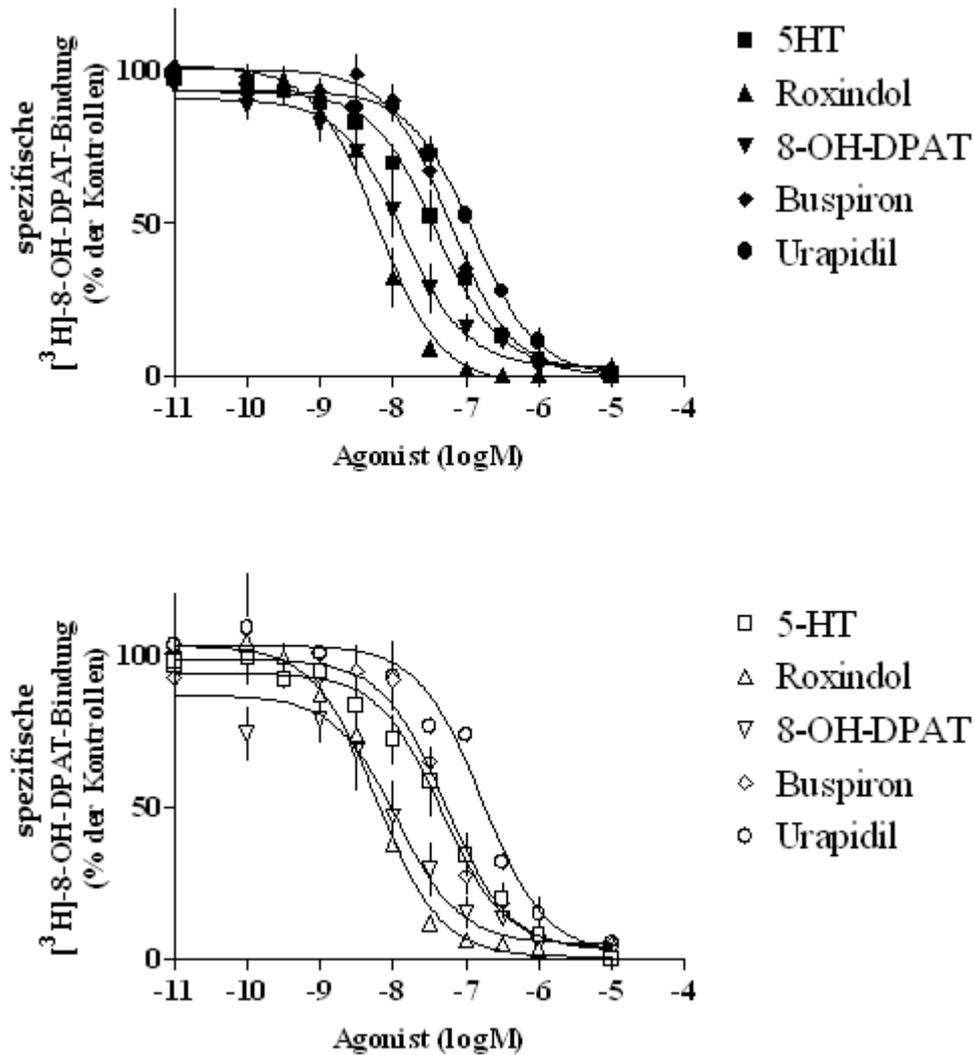


Abbildung 17: Inhibition der spezifischen [<sup>3</sup>H]-8OH-DPAT (1nM) Bindung durch 5-HT-Rezeptor-Agonisten an Membranen stabil transfizierter HEK293-Zellen, die den Wildtyp-Rezeptor (gefüllte Symbole) oder die Arg219Leu-Variante (offene Symbole) des h5HT<sub>1A</sub>-Rezeptors exprimieren. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. 100% entspricht 974,3 ± 31,84 fmol/mg Protein bzw. 914,5 ± 63,71 fmol/mg Protein in den Experimenten am Wildtyp-Rezeptor bzw. der Variante; n=12. Die unspezifische Bindung war geringer als 10%. Nicht transfizierte HEK293-Zellen wiesen keine spezifische Bindung von [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT auf.

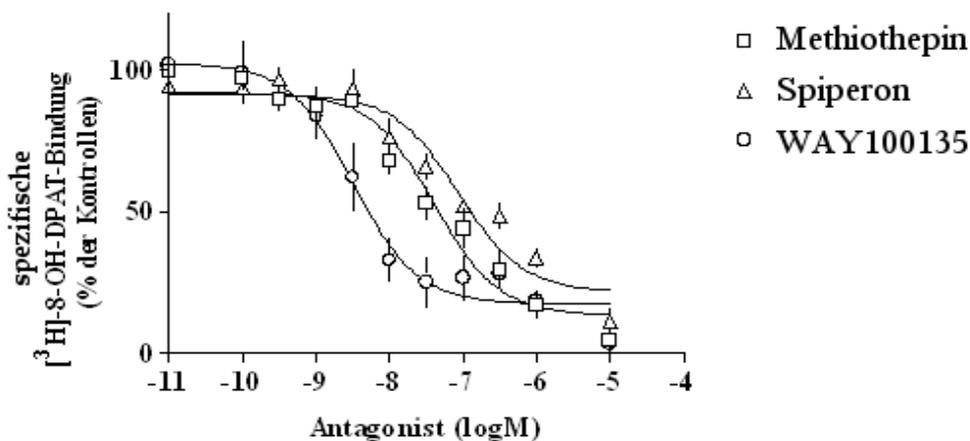
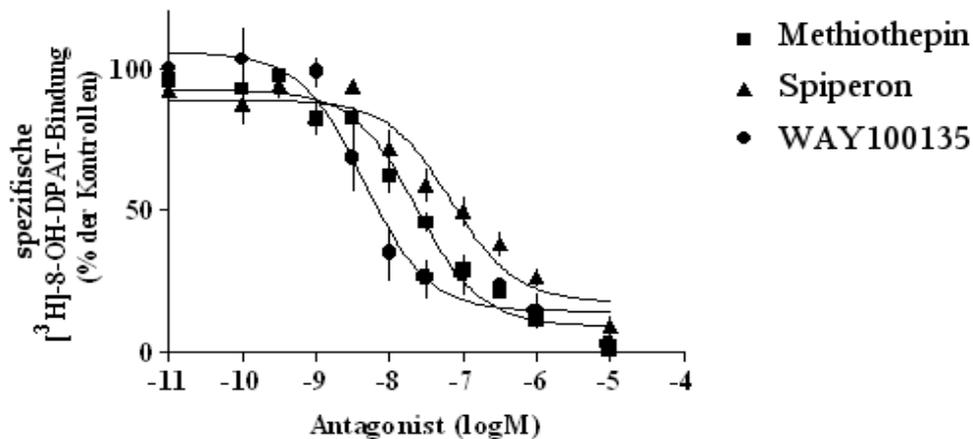


Abbildung 18: Inhibition der spezifischen [<sup>3</sup>H]-8OH-DPAT (1nM) Bindung durch 5-HT-Rezeptor-Antagonisten an Membranen stabil transfizierter HEK-293 Zellen, die den Wildtyp-Rezeptor (gefüllte Symbole) oder die Arg219Leu-Variante (offene Symbole) des h5HT<sub>1A</sub>-Rezeptors exprimieren. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. 100% entspricht 974,3 ± 31,84 fmol/mg Protein bzw. 914,5 ± 63,71 fmol/mg Protein in den Experimenten am Wildtyp-Rezeptor bzw. der Variante; n=12. Die unspezifische Bindung war geringer als 10%. Nicht transfizierte HEK293-Zellen wiesen keine spezifische Bindung von [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT auf.

## Kompetitionsexperimente

In Kompetitionsexperimenten von 1nM [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT mit 5-HT-Rezeptorliganden an Membranen von HEK293-Zellen, die den Wildtyp oder die Arg219Leu-Variante des h5-HT<sub>1A</sub> Rezeptors stabil exprimieren, wurden die Potenzen der Liganden als Inhibitoren der Radioligandbindung an die h5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorisoformen bestimmt. Unter Kontrollbedingungen werden gleiche Mengen [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT an die Membranen der Zellen, die mit der cDNA des Wildtyps bzw. der Variante transfiziert wurden, spezifisch gebunden (siehe Legende zu Abb.17 und 18); daher lässt sich schließen, dass die beiden stabilen Klone, die auch für die Analyse der G-Proteinkopplung und des second messenger Signals verwendet wurden, den Rezeptor in etwa gleicher Dichte exprimieren. Sowohl die 5-HT-Rezeptoragonisten 5-HT, Roxindol, 8-OH-DPAT, Buspiron und Urapidil (Abb.17) als auch die 5-HT-Rezeptorantagonisten Methiothepin, Spiperon und WAY100135 (Abb. 18) verursachten bei zunehmender Konzentration eine monophasische Hemmung der spezifischen [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT-Bindung an beide Rezeptorisoformen. Die Agonisten bewirkten eine vollständige Hemmung der spezifischen Radioligandbindung. In Experimenten mit den Antagonisten wurde die spezifische [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT-Bindung bei der höchsten Inhibitor-Konzentration um 80-90% reduziert. Die Potenzen (pIC<sub>50</sub>-Werte) der 5-HT Rezeptoragonisten und -antagonisten an der Rezeptorvariante unterschieden sich nicht signifikant von denen am Wildtyprezeptor (Tab. 2). Dementsprechend bestand eine hochsignifikante Korrelation zwischen den pIC<sub>50</sub>-Werten der 5-HT-Rezeptorliganden an beiden Rezeptorisoformen mit einem Steigungsmaß der Regressionslinie (Regressionskoeffizient) nahe 1 (Abb. 19).

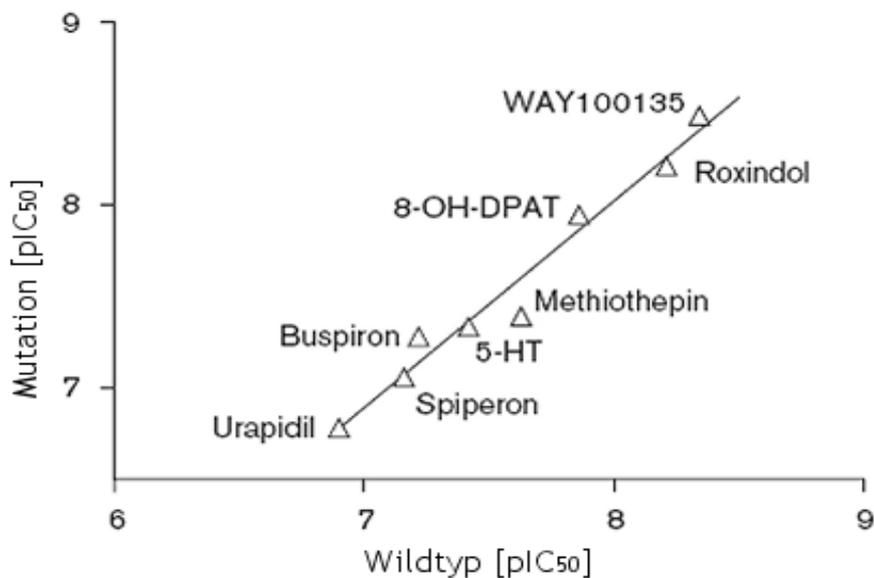


Abbildung 19: Vergleich der pIC<sub>50</sub>-Werte des Wildtyps und der Arg219Leu-Variante des h5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors in Membranen von HEK293-Zellen, die in den Konkurrenzexperimenten mit [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT ermittelt wurden. Steigungsmaß: 1,13; Korrelationskoeffizient (r): 0,983, P<0,0001

### 3.1.4 [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung

An Membranen der HEK293-Zellen, die den h5-HT<sub>1A</sub>-Wildtyp-Rezeptor stabil exprimieren, stimuliert 5-HT konzentrationsabhängig die [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung (Abb. 20). Die maximale Stimulation betrug  $150,4 \pm 3,2\%$  der basalen [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung. Im Gegensatz dazu zeigte 5-HT fast gar keinen stimulierenden Effekt auf die [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an Membranen von Zellen, die die Arg219Leu Variante exprimieren. Die 5-HT-induzierte Stimulation der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an den mutierten Rezeptor war so schwach, dass die Potenz (EC<sub>50</sub>-Wert) nicht zuverlässig bestimmt werden konnte.

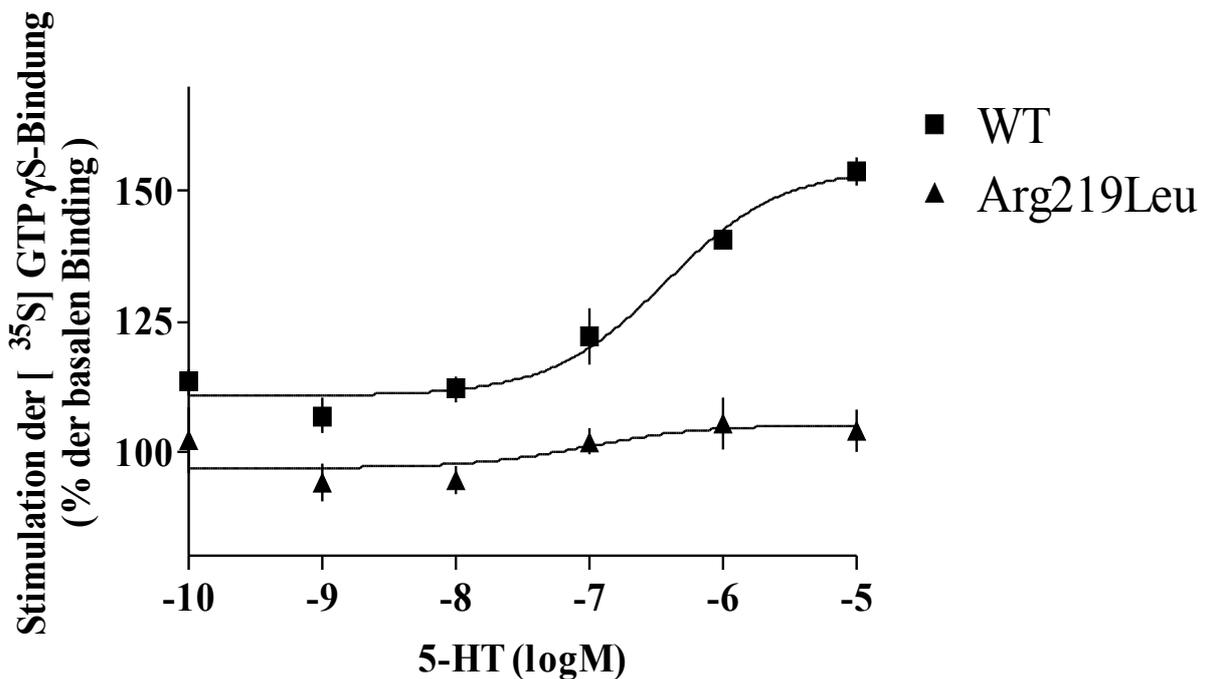


Abbildung 20: Stimulation der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an Membranen stabil transfi-zierter HEK293-Zellen, die entweder den h5-HT<sub>1A</sub>-Wildtyp-Rezeptor oder die Arg219Leu-Rezeptor-Variante exprimieren. Die Werte sind als Prozent der basalen [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung dargestellt; die basale Bindung an Membranen, die den Wildtyp bzw. die Variante des Rezeptors exprimieren, betrug  $41,5 \pm 10,1$  bzw.  $35,6 \pm 5,0$  fmol/mg Protein. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung. Die intrinsische Aktivität von 5-HT ( $E_{max}$ ) als Stimulator der

[<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an Membranen von Zellen, die den Wildtyp- bzw. Arg219Leu-Rezeptor exprimieren betrug  $150,2 \pm 3,2$  bzw.  $105,1 \pm 3,4\%$  der basalen Bindung; der Unterschied der  $E_{max}$ -Werte war signifikant.

### 3.1.5 Inhibition der Forskolin-stimulierten cAMP-Akkumulation

An intakten Zellen, die entweder den Wildtyp oder die Arg219Leu-Variante des  $h5\text{-HT}_{1A}$ -Rezeptors stabil exprimieren, wurde die Hemmung der Forskolin-stimulierten cAMP-Akkumulation gemessen. An Wildtyp-Rezeptoren bewirkten die Agonisten 5-HT, Urapidil und Buspiron konzentrationsabhängig eine Hemmung der Forskolin ( $10\mu\text{M}$ ) -stimulierten cAMP-Bildung; die maximale Inhibition der Forskolin-stimulierten cAMP-Akkumulation lag für die drei Agonisten etwa in der gleichen Größenordnung (Hemmung um 72-85%; Abb. 21, Tab.2). Auch in Zellen, die die Arg219Leu-Rezeptor-Variante exprimieren, inhibierten diese Agonisten konzentrationsabhängig die Forskolin-stimulierte cAMP-Akkumulation. Die maximalen Effekte betrug aber nur 17 bis 39% der Werte für den Wildtyp. (Abb. 21, Tab 2). Die Konzentrations-Wirkung-Kurven für den mutierten Rezeptor waren so flach, dass die  $\text{IC}_{50}$ -Werte nicht zuverlässig bestimmt werden konnten.

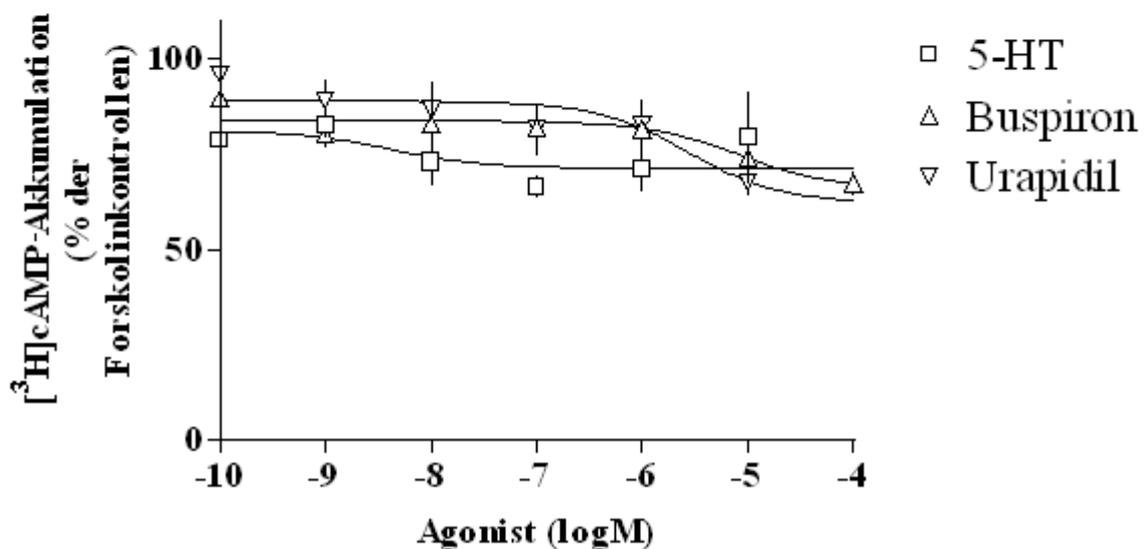
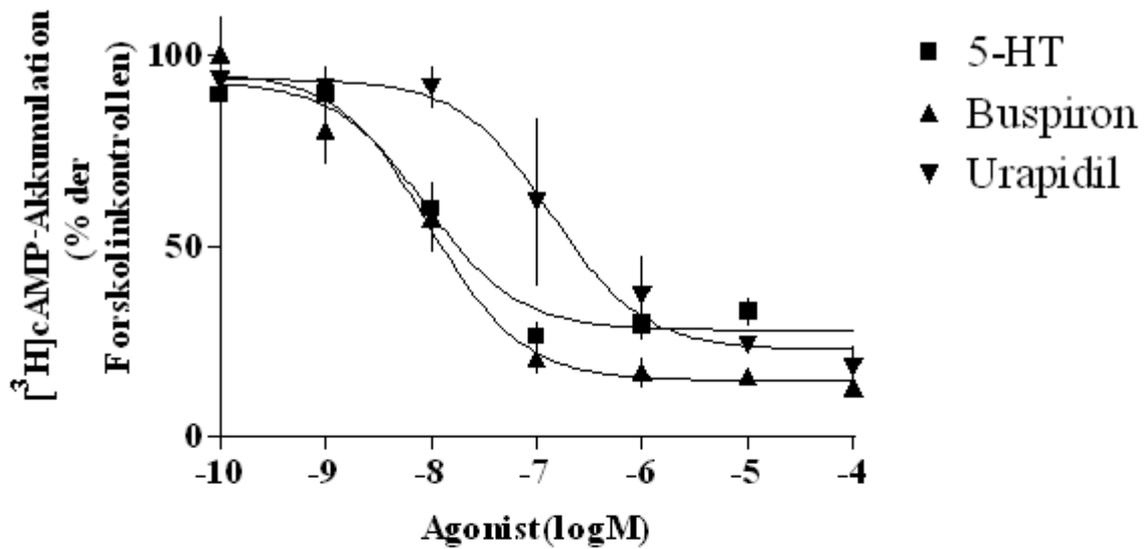


Abbildung 21: Hemmeffekte von 5-HT, Buspiron und Urapidil auf die Forskolin-stimulierte  $[^3\text{H}]$ cAMP-Akkumulation in HEK293-Zellen, die entweder mit der cDNA des h5-HT<sub>1A</sub>-Wildtyp-Rezeptors oder mit der cDNA der Arg219Leu-Variante stabil transfiziert wurden. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei bis fünf unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung. Die „Efficacies“ ( $I_{\text{max}}$ ) der 5-HT-Rezeptoragonisten als Inhibitoren der cAMP-Akkumulation waren bei den Zellen, die die Rezeptorvariante exprimieren, signifikant geringer als bei den Zellen, die den Rezeptorwildtyp exprimieren ( $P < 0,0001$ )

Tabelle 2: Potenzen von 5-HT-Rezeptorliganden als Inhibitoren der [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT-Bindung an Membranen von HEK293-Zellen, die den h5-HT<sub>1A</sub>-Wildtyp-Rezeptor WTR oder die Arg219Leu-Variante VR stabil exprimieren und deren Potenzen als Inhibitoren der Forskolin-stimulierter cAMP-Akkumulation an derartigen intakten Zellen.

	h5-HT <sub>1A</sub> WTR			h5-HT <sub>1A</sub> VR	
	[ <sup>3</sup> H]-8-OH-DPAT - Bindung	cAMP-Akkumulation		[ <sup>3</sup> H]-8-OH-DPAT - Bindung	cAMP-Akkumulation <sup>a</sup>
	pIC <sub>50</sub> <sup>b</sup>	pIC <sub>50</sub> <sup>c</sup>	I <sub>max</sub> <sup>d</sup>	pIC <sub>50</sub> <sup>b</sup>	I <sub>max</sub> <sup>d</sup>
<b>Agonisten</b>					
Roxindol	8,21 ± 0,07	Nb	Nb	8,21 ± 0,05	Nb
8-OH-DPAT	7,86 ± 0,09	Nb	Nb	7,95 ± 0,01	Nb
5-HT	7,42 ± 0,08	8,05 ± 0,20	72,0 ± 3,9	7,33 ± 0,10	12,2 ± 03,4 *
Buspiron	7,22 ± 0,07	8,01 ± 0,13	85,2 ± 2,8	7,28 ± 0,08	21,2 ± 06,4 *
Urapidil	6,90 ± 0,06	6,68 ± 0,26	77,1 ± 7,2	6,78 ± 0,14	30,1 ± 13,4 *
<b>Antagonisten</b>					
WAY 1000635	8,34 ± 0,13			8,49 ± 0,14	
Methiothepin	7,63 ± 0,07			7,39 ± 0,11	
Spiperon	7,16 ± 0,12			7,06 ± 0,14	

Die Ergebnisse sind Mittelwerte ± SEM von 3-8 unabhängigen Experimenten, die in Doppel- oder Dreifachbestimmung ermittelt wurden. \*Signifikant unterschiedlich von den entsprechenden I<sub>max</sub>-Werten am h5-HT<sub>1A</sub>-Wildtyprezeptor (P<0,0001)

a) Die maximale Hemmung der cAMP-Akkumulation in Zellen, die die Arg219Leu-Variante exprimieren, war so gering, dass der pIC<sub>50</sub>-Wert nicht zuverlässig bestimmt werden konnte

b) Affinitäten (pIC<sub>50</sub>-Werte) von 5-HT-Rezeptor Liganden wurden in Inhibitionsversuchen mit 1nM [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT bestimmt

c) Potenzen (pIC<sub>50</sub>-Werte) von 5-HT-Rezeptor Agonisten als Inhibitoren der Forskolin-stimulierten cAMP-Akkumulation

d) Maximale Inhibition (I<sub>max</sub>) von 5-HT-Rezeptor-Agonisten als Inhibitoren der Forskolin-stimulierten cAMP-Akkumulation (ausgedrückt als Prozentwert der Forskolin-Kontrolle)

Nb, nicht bestimmt

## 3.2 h5HT<sub>3A</sub>-Rezeptor und seine Pro391Arg und Arg344His Varianten

### 3.2.1 In-vitro Mutagenese

Die natürlich vorkommenden Pro391Arg- und Arg344His-Varianten des homopentameren humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors wurden durch in vitro Mutagenese mit Hilfe des Quique Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) hergestellt. Die cDNA der h5HT<sub>3A</sub>-Rezeptoruntereinheit befand sich im pcDNA3 Expressionsvektor, der direkt für die Mutagenese eingesetzt werden konnte. Folgende Mutageneseprimer wurden für die Herstellung der Mutanten verwendet:

s 5'-cac atg gga gga **cgc** cag gac ttc gag-3'  
as 5'-ctc gag gtc ctg **gcg** tcc tcc cat gtg-3'

Der Austausch von C gegen G in Position 1173 der cDNA resultiert im Aminosäureaustausch Pro 391 zu Arg in der Rezeptoruntereinheit.

s 5'-cct gct tgg ctg **cat** cac ctg gtt ctg-3'  
as 5'-cag aac cag gtg **atg** cag cca agc agg-3'

Die Substitution des Guanins in Position 1032 der cDNA durch Adenin führt zum Austausch von Arg344His in der Rezeptoruntereinheit.

### 3.2.2 Expression der Mutanten und des Wildtyps in HEK293-Zellen

Für Sättigungsversuche mit dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Radioliganden wurden HEK293-Zellen verwendet, die mit der cDNA der Wildtyp-h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoruntereinheit oder seiner Mutanten (Pro291Arg, Arg344His) im pcDNA3-Vektor transfiziert worden waren. Die Transfektion wurde mit Hilfe der Lipofektamin-Methode durchgeführt, da mit der üblichen Calciumphosphat-Methode keine befriedigende Expression der Rezeptoren erzielt wurde. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und für die Membranpräparation verwendet.

Für Zellen, die den jeweiligen Rezeptor stabil exprimieren, wurde die Transfektion der HEK293-Zellen mit einer modifizierten Calciumphosphat-Methode vorgenommen. Danach

wurden die Zellen zwei Wochen unter Selektionsdruck kultiviert und einzelne Klone hochgezogen. Die zur Kontrolle eingesetzten nichttransfizierten HEK293-Zellen starben unter G418-Selektionsdruck nach 8-10 Tagen. Positive Zellklone wurden durch Bindung von [<sup>3</sup>H]GR65630 (s. unten) an Membranpräparate der Klone identifiziert. Nachdem jeweils ein Zellklon durch die Bindung ausgewählt worden war, wurden die Zellen kultiviert, bis ausreichend Material vorhanden war, um für [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindungstudien Membranen zu präparieren.

In der Plasmamembran der HEK293-Zellen werden die Rezeptoruntereinheiten wahrscheinlich als homopentamere h5HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren exprimiert, denn aus der Literatur ist bekannt, dass diese Konfiguration Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit der Rezeptoren ist; es konnte in parallel durchgeführten Experimenten mit elektrophysiologischer und luminometrischer Methodik gezeigt werden, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit transfizierten Zellen in der Tat funktionsfähige Rezeptoren exprimieren (s. unten „Diskussion“).

### 3.2.3 [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung

In Bindungsexperimenten mit dem radioaktiv markierten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor Antagonist [<sup>3</sup>H]GR65630 (spezifische Aktivität 75Ci/mmol) sollte ermittelt werden, ob es Unterschiede in der Rezeptordichte und / oder der Affinität verschiedener Liganden zu der Rezeptor-Variante im Vergleich zum Wildtyp gibt. Die Membranen der nicht transfizierten HEK293-Zellen, die als Kontrolle eingesetzt wurden, zeigten keine spezifische Bindung.

#### Sättigungsexperimente

Für Sättigungsversuche wurde [<sup>3</sup>H]GR65630 sowohl an den transient als auch an den stabil transfizierten Zellen in Konzentrationen von 0,1 bis 4,8 nM eingesetzt. Die spezifische Bindung war sättigbar und monophasisch an allen drei Rezeptorisoformen. Beide Rezeptorvarianten unterscheiden sich nicht vom Wildtyp in bezug auf die Dissoziationskonstante  $K_D$  (Tab. 3).

Die maximale Rezeptordichte  $B_{max}$  der Pro391Arg-Variante war sowohl an stabil als auch an transient transfizierten Zellen nicht signifikant unterschiedlich vom Wildtyp (Abb. 22, 23; Tab. 3). Dagegen betrug  $B_{max}$  der Arg344His-Rezeptorvariante nur 56% des Wildtyps an transient transfizierten Zellen und sogar nur 7% des Wildtyps an den stabil transfizierten Zellen (Abb. 22, 23 ; Tab. 3).

Tabelle 3 Dissoziationskonstanten  $K_D$  und maximale Rezeptordichten  $B_{max}$  aus Sättigungsversuchen mit [ $^3$ H]GR65630 an HEK293-Zellen, die entweder den Wildtyp oder die Pro391Arg- und Arg344His-Varianten h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor transient oder stabil exprimieren.

	Transiente Transfektion		Stabile Transfektion	
	$K_D$ , nM	$B_{max}$ pmol/mg Protein	$K_D$ , nM	$B_{max}$ pmol/mg Protein
Wildtyp	$0,25 \pm 0,04$	$4,68 \pm 0,17$	$0,50 \pm 0,07$	$9,76 \pm 0,46$
Pro391Arg	$0,57 \pm 0,22$	$4,95 \pm 0,52$	$0,57 \pm 0,20$	$10,30 \pm 1,05$
Arg344His	$0,31 \pm 0,09$	$2,62^* \pm 0,16$	$0,22 \pm 0,07$	$0,68^* \pm 0,05$

Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung.

\* Signifikant unterschiedlich vom  $B_{max}$ -Wert am jeweiligen Wildtyp des h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors ( $P < 0,0001$ )

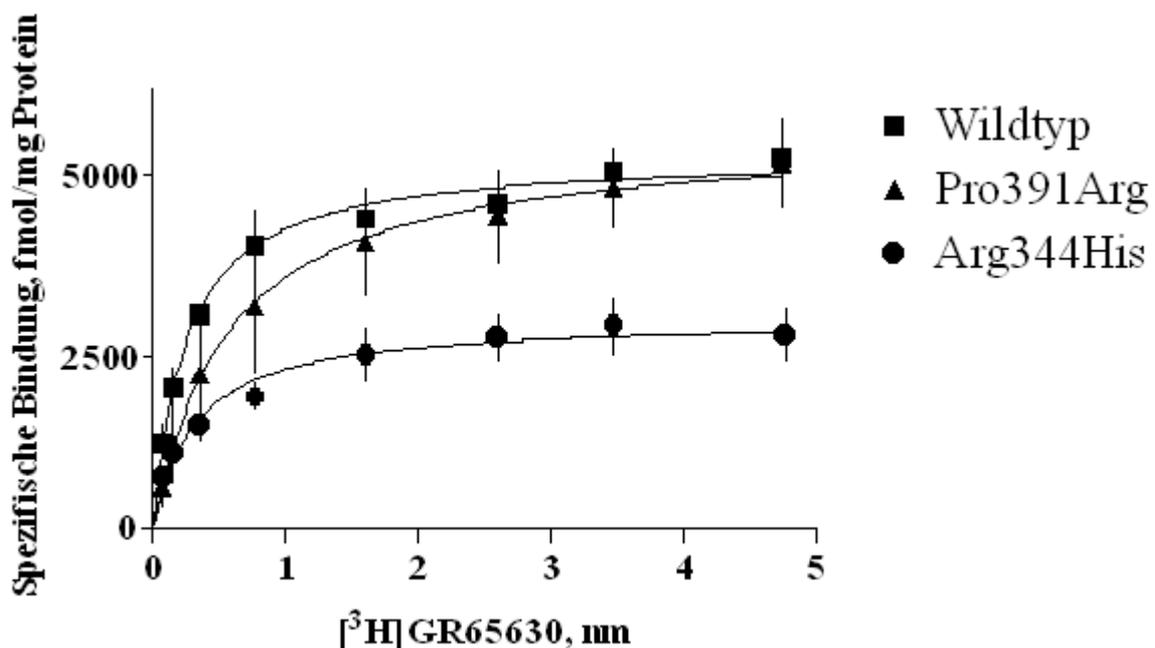


Abbildung 22: Sättigung der spezifischen Bindung von [ $^3$ H]GR65630 an Membranen transient transfizierter HEK293-Zellen, die entweder den Wildtyp oder die Pro391Arg- bzw. Arg344His-Variante des h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors exprimieren. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung.

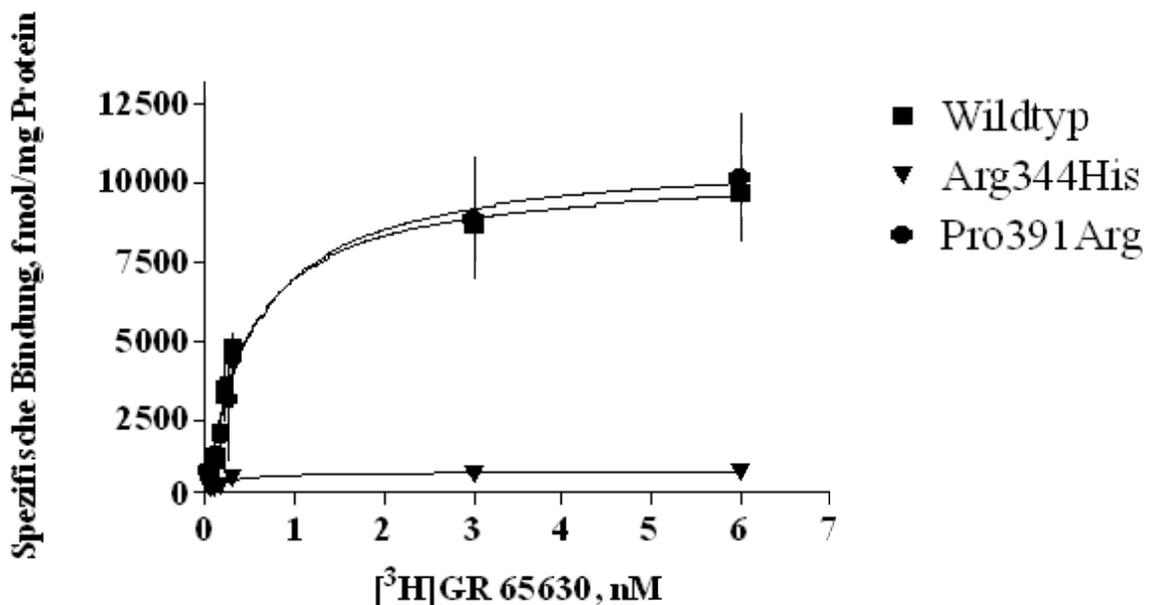


Abbildung 23: Sättigung der spezifischen Bindung von [<sup>3</sup>H]GR65630 an Membranen stabil transfizierter HEK293-Zellen, die entweder den Wildtyp oder die Pro391Arg- bzw. Arg344His-Variante des h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors exprimieren. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung.

### Kompetitionsexperimente

In Kompetitionsexperimenten mit [<sup>3</sup>H]GR65630 (1nM) an den stabil transfizierten Zellen wurden Affinitäten des Wildtyp-Rezeptors und beiden Rezeptorvarianten zu den Agonisten und Antagonisten ermittelt. Die Agonisten 5-HT, 2Me-5-HT, mCPBG, PBG, Quipazin und Antagonisten Ondansetron, Tropisetron, Y25130, Tubocurarin wurden in Konzentrationen von 0,1nM bis 1mM eingesetzt. Alle Substanzen bewirkten eine vollständige monophasische Hemmung der Bindung des Radioliganden. Potenzen und damit auch die Potenz-Reihenfolge der Agonisten (Quipazin > mCPBG=5-HT > 2-Me-5-HT > PBG) und Antagonisten (Tropisetron=Y25130 =Ondansetron > Tubocurarin) als Inhibitoren der [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung waren an allen drei Rezeptorisoformen gleich (Abb. 24, 25, Tab 4). Dementsprechend zeigten die Regressionsanalysen signifikante Korrelationen zwischen den pIC<sub>50</sub>-Werten am Wildtyp-Rezeptor und den beiden jeweiligen Varianten. Die Regressionskoeffizienten und Korrelationskoeffizienten waren in der Größenordnung von 1 (Abb. 26).

Tabelle 4: pIC<sub>50</sub>-Werte aus Inhibitionsversuchen an Membranen von HEK293-Zellen, die entweder Wildtyp oder Pro391Arg- bzw. die Arg344His-Variante des h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors stabil exprimieren.

<b>Inhibitor</b>	<b>Wildtyp pIC<sub>50</sub></b>	<b>Arg344His, pIC<sub>50</sub></b>	<b>Pro391Arg, pIC<sub>50</sub></b>
<b>Agonisten</b>			
<b>Quipazin</b>	7,14 ± 0,10	7,12 ± 0,14	7,27 ± 0,10
<b>mCPBG</b>	6,08 ± 0,078	6,05 ± 0,10	6,06 ± 0,05
<b>5-HT</b>	6,00 ± 0,08	6,03 ± 0,08	6,06 ± 0,04
<b>2Me-5HT</b>	5,05 ± 0,11	5,53 ± 0,08	5,50 ± 0,12
<b>PBG</b>	4,55 ± 0,13	4,52 ± 0,10	4,42 ± 0,11
<b>Antagonisten</b>			
<b>Tropisetron</b>	8,00 ± 0,13	8,04 ± 0,10	7,82 ± 0,05
<b>Y25130</b>	7,91 ± 0,12	7,87 ± 0,09	7,66 ± 0,08
<b>Ondansetron</b>	7,79 ± 0,08	7,83 ± 0,10	7,61 ± 0,04
<b>Tubocurarin</b>	3,87 ± 0,11	3,82 ± 0,13	3,57 ± 0,10

Die Daten sind Mittelwerte ± SEM aus 4-7 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die Werte wurden aus den in Abb.24 und 25 gezeigten Kurven berechnet.

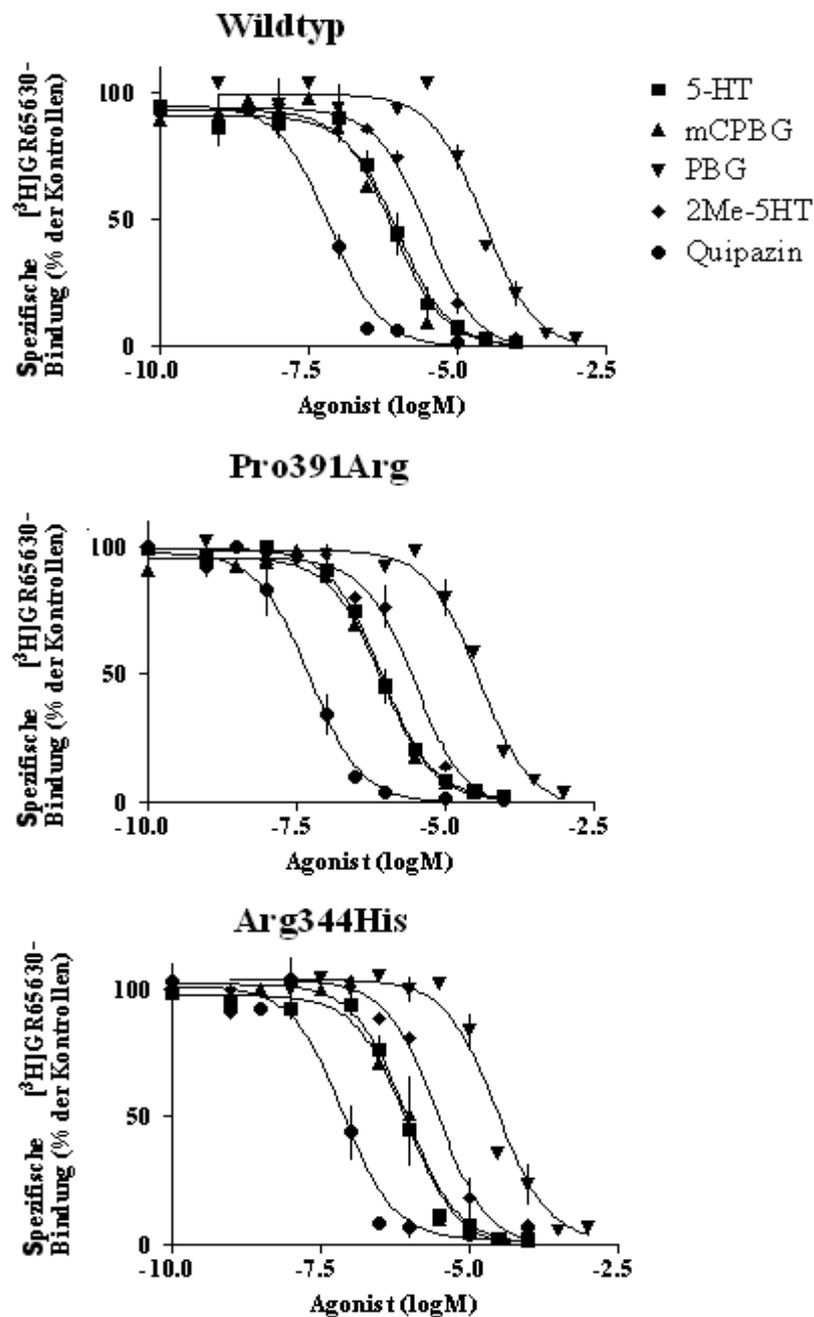


Abbildung 24: 5-HT-Rezeptor-Agonist-induzierte Hemmung der spezifischen [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung an Membranen stabil transfizierter HEK293-Zellen, die entweder den Wildtyp oder die Pro391Arg- bzw. Arg344His-Variante des h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors exprimieren. Die unspezifische Bindung in Gegenwart von 100µM MDL72222 war geringer als 10%. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung.

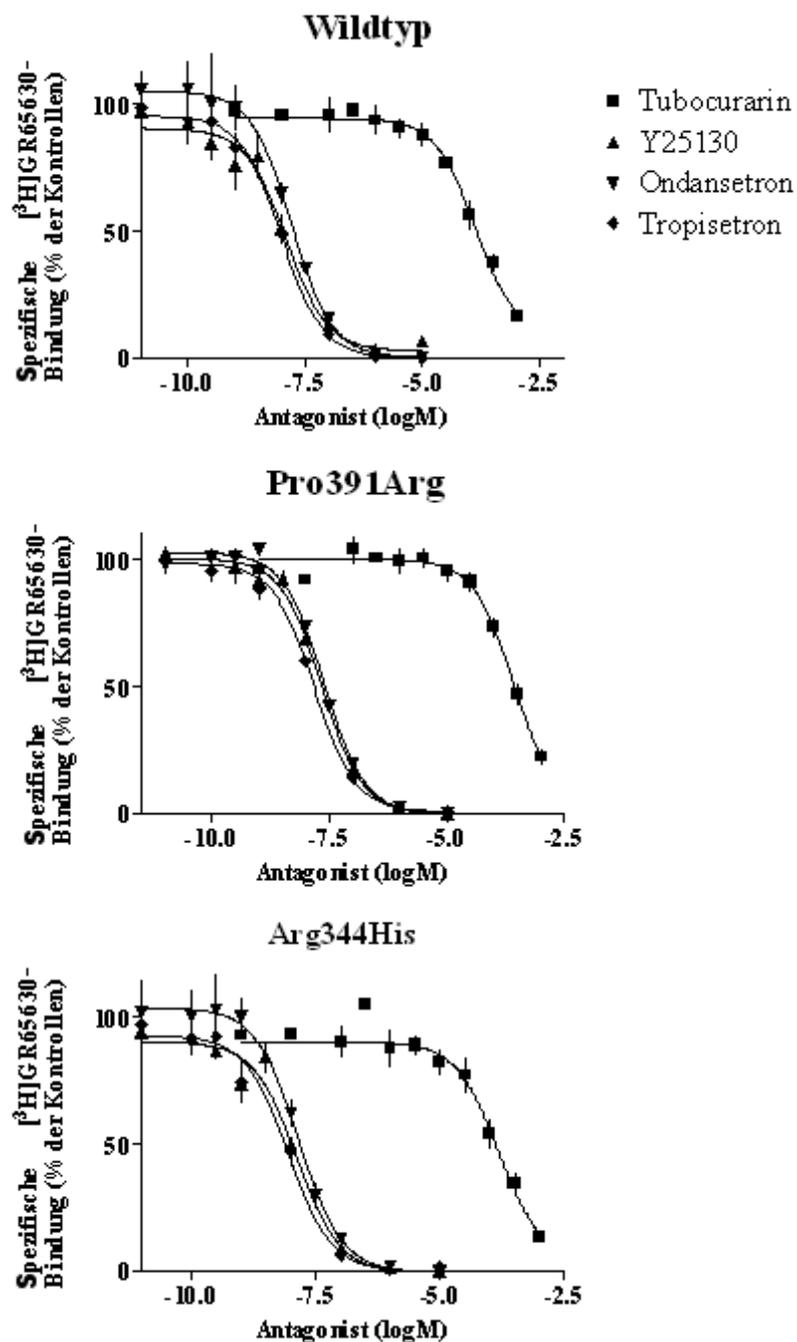


Abbildung 25: 5-HT-Rezeptor-Antagonist-induzierte Hemmung der spezifischen [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung an Membranen stabil transfizierter HEK293-Zellen, die entweder den Wildtyp oder die Pro391Arg- bzw. Arg344His-Variante des h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors exprimieren. Die unspezifische Bindung in Gegenwart von 100µM MDL72222 war geringer als 10%. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung.

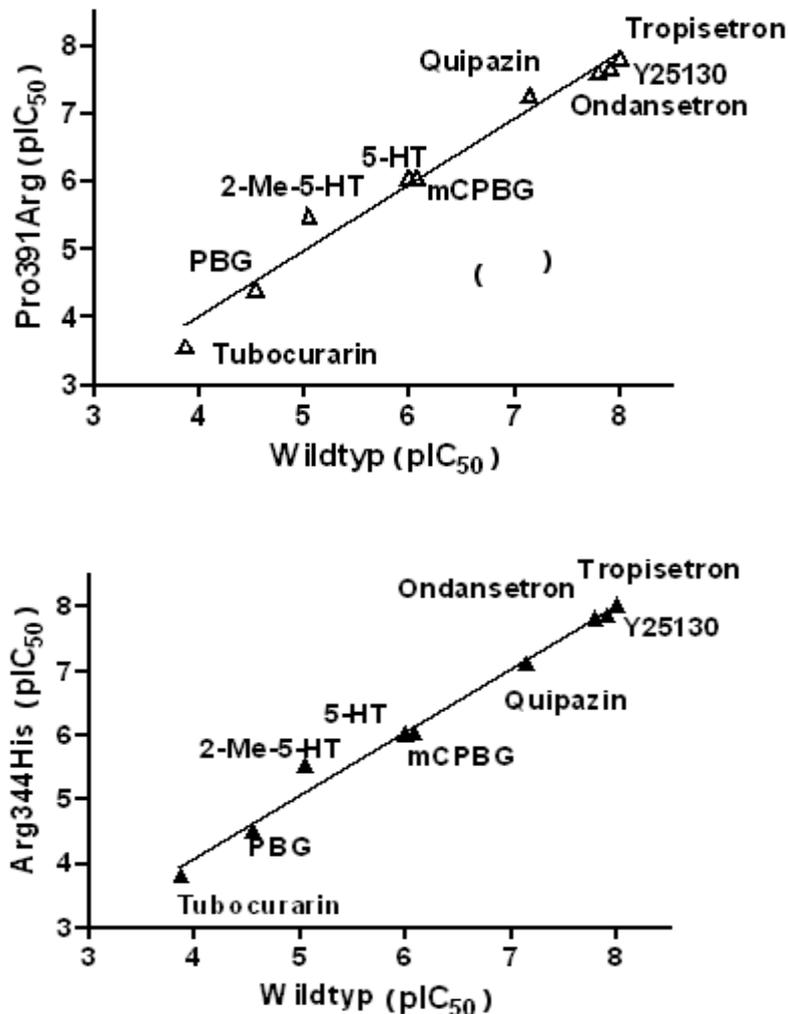


Abbildung 26: Vergleich der pIC<sub>50</sub>-Werte der 5-HT-Rezeptoragonisten und -antagonisten als Inhibitoren der [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung an Wildtyp- und Pro391Arg-(oben) oder Arg344His-h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren (unten) in Membranen von HEK293-Zellen. Die pIC<sub>50</sub>-Werte stammen aus Tab. 4 und wurden aus den in Abb. 24 und 25 gezeigten Kurven berechnet. Pro391Arg-Variante: Steigungsmaß: 0,97, Korrelationskoeffizient: 0,98; Arg344His-Variante: Steigungsmaß 0,98, Korrelationskoeffizient: 0,99 (p<0,0001)

## 4 Diskussion

### 4.1 Die natürlich vorkommende Arg219Leu-Variante des h5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors

Im Mittelpunkt der vorliegenden Untersuchung stand die natürlich vorkommende Variante Arg219Leu des humanen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors. Das Ziel war es festzustellen, ob der mutierte Rezeptor veränderte pharmakologische und/oder funktionelle Eigenschaften im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor aufweist.

Mehrere Mutagenesestudien des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors haben gezeigt, dass der Austausch nur einer Aminosäure zu Änderungen der Rezeptor-Ligand-Interaktion führen kann. Ziel solcher Untersuchungen war es, diejenigen Aminosäuren zu identifizieren, die für die Bindung von Agonisten und Antagonisten an den Wildtyp des Rezeptors bedeutungsvoll sind. So fanden Guan et al. (1992), dass Asp 386 in der siebten transmembranären Domäne für die Bindung von Pindolol, eines  $\beta$ -Adrenorezeptorblockers mit antagonistischen Eigenschaften am 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor, wichtig ist. Der mutierte Rezeptor, in dem Asp386 durch Valin ersetzt wurde, besitzt eine circa hundertfach verminderte Affinität zu Pindolol und anderen Aryloxyalkylaminen während die Affinität zu anderen Agonisten und Antagonisten unverändert blieb. Ho et al. (1992) untersuchten die Effekte von unterschiedlichen Mutationen in der zweiten, dritten und vierten transmembranären Domäne des Rezeptors in transient transfizierten COS-7-Zellen: Drei Mutationen (Asp82Asn, Asp116Asn bzw. Ser199Ala) resultierten in einer sechzig- bis hundertfachen Verminderung der Affinität zu 5-HT, ohne die Affinität zu dem Antagonist Pindolol zu beeinflussen. Die vierte Mutation (Thr200Ala) zeigte keine messbare Agonistenbindung.

Der Austausch des konservierten Asparagins 386 in der siebten transmembranären Domäne durch Alanin, Phenylalanin oder Valin führte zu einem Rezeptor, der den Agonisten 8-OH-DPAT nicht bindet, während der Austausch durch Glutamin keinen Effekt auf die Agonistenbindung hatte (Chanda et al., 1992); der Austausch des konservierten Serins in der Position 393 durch Alanin vermindert die Ligandbindung um 86% während der Austausch des weniger konservierten Serins 391 die Bindung nicht beeinflusst. Wird die konservierte Asparaginsäure in der Position 82 der zweiten transmembranen Domäne durch Alanin ersetzt, zeigt der mutierte Rezeptor ebenfalls keine messbare Agonistenbindung (Chanda et al., 1992).

Um potentielle G-Protein-Interaktionsstellen des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorproteins zu identifizieren, konstruierten Varrault et al. (1992) modifizierte von der zweiten oder dritten intra-

zellulären Schleife abgeleitete Peptide und untersuchten deren Einfluß sowie den des Wildtyps auf die [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung und die cAMP-Akkumulation. Das Peptid, das die ganze zweite intrazelluläre Schleife enthält (Asp133-Arg153) und den Ala331-Leu347-Abschnitt der dritten intrazellulären Schleife enthält, inhibierten die Forskolin-stimulierte cAMP-Akkumulation in NIH-3T3- und S49-Zellen und im Rattenhippocampus. Zudem stimulierten sie die [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung am G<sub>i</sub>/G<sub>0</sub>-Protein im Rinderhirn. Diese Ergebnisse zeigten, dass die zweite und dritte intrazelluläre Schleife des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors eine wichtige Rolle bei der G-Proteinkopplung spielen.

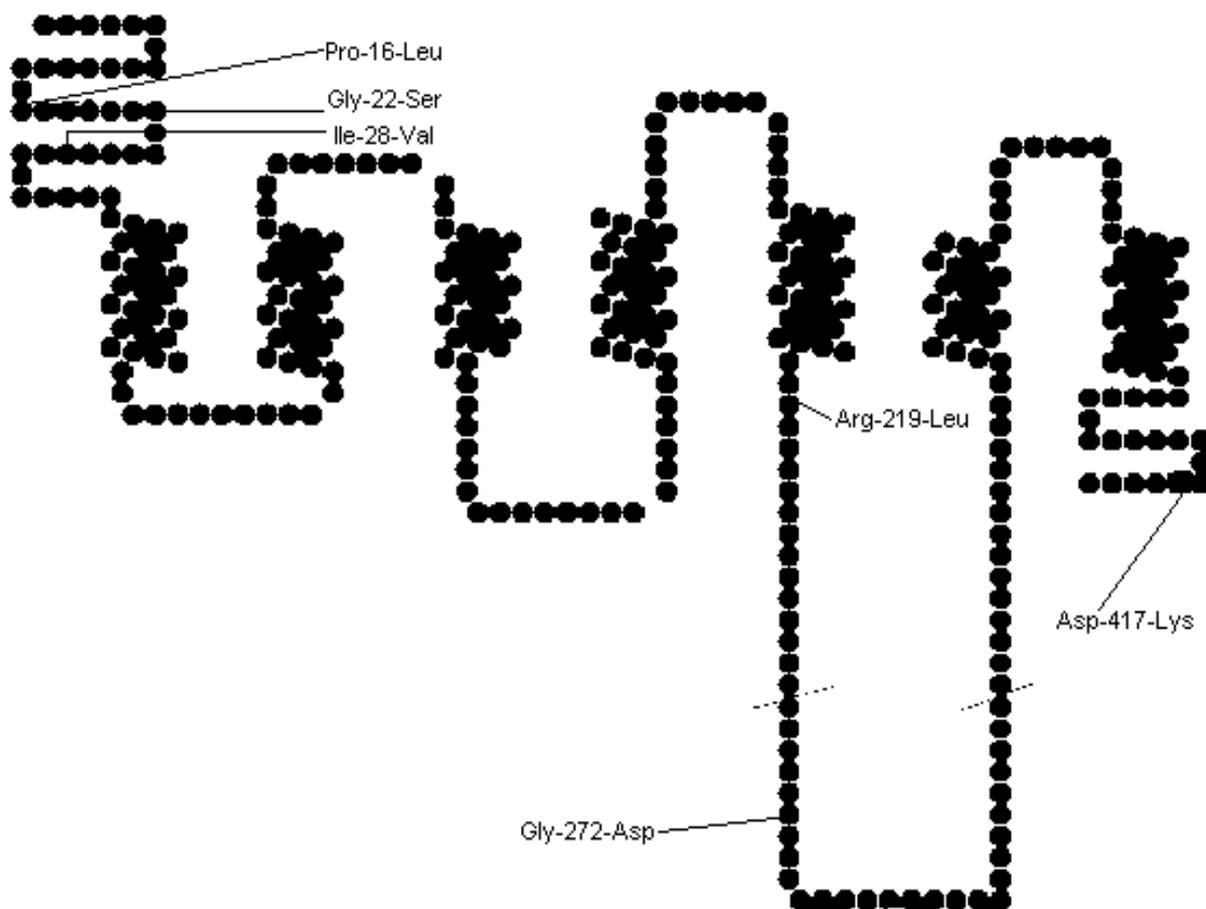


Abbildung 27: Schematische Darstellung des h5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors mit natürlich vorkommenden Mutationen

Abgesehen von diesen (zur Identifizierung wichtiger Rezeptordomänen für die Ligandbindung und G-Proteinkopplung) künstlich hergestellten Rezeptormutanten, wurden mehrere natürlich vorkommende Varianten des h5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorgens gefunden. Manche Mutationen des Gens führen zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz, in anderen

Fällen resultiert ein Austausch eines Basenpaares in einem Aminosäureaustausch (Abb 27).

Nakhai et al. (1995) entdeckten bei einem Mutationsscreening unter drei Bevölkerungsgruppen (weißen Amerikanern, Indianern und Finnen) zwei natürlich vorkommende Varianten des h5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors: Gly22Ser und Ile28Val. Beide Mutationen befinden sich im extrazellulären N-Terminus. Bei einem systematischen Screening von Patienten, die an Schizophrenie, bipolarer affektiver Erkrankung oder Tourette-Syndrom litten, fanden Erdmann et al. (1994) keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Häufigkeit der Ile28Val-Variante zwischen den Patienten und den Kontrollpersonen. Brüss et al. (1995) untersuchten den Einfluss dieser Mutation auf die Bindungseigenschaften des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors in transient transfizierten COS-7-Zellen. In Konkurrenzexperimenten mit [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Rezeptorvariante und dem Wildtyp im bezug auf ihre Affinität zu den Agonisten 5-HT, 8-OH-DPAT und Roxindol sowie zu den Antagonisten Methiothepin und Spiperon. Diese Ergebnisse wurden in Untersuchungen von Rotondo et al. (1997) bestätigt und um Befunde zur Gly22Ser-Variante erweitert: Radioligand-Konkurrenzexperimente zeigten, dass nicht nur die Ile28Val- sondern auch die Gly22Ser-Variante die gleiche Affinität zu Agonisten und Antagonisten besitzen wie der Wildtyp-Rezeptor. Es wurde jedoch ein Unterschied in der Agonist-induzierten Rezeptor-Herabregulation und Desensibilisierung gefunden: Nach vierundzwanzigstündiger Einwirkung von 100µM L-8-OH-DPAT wurde bei der Gly22Ser-Variante eine schnellere Herabregulierung der Rezeptordichte festgestellt als bei dem Wildtyp-Rezeptor. Die 5-HT-induzierte Inhibition der cAMP-Akkumulation war nach 24 Stunden Einwirkungszeit von 100µM 8-OH-DPAT bei der Gly22Ser-Variante signifikant geringer als beim Wildtyp. Eine analoge Beteiligung von N-terminalen Aminosäuren an der Herabregulation der Rezeptordichte war vorher auch für den mit 5-HT Rezeptoren verwandten β<sub>2</sub>-Adrenorezeptor nachgewiesen worden (Green et al., 1994).

Bei der Suche nach Mutationen, die mit Alkoholismus assoziiert sind, fanden Harada et al. (1996) eine Pro16Ser-Variante des h5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors. Da diese Mutation jedoch genauso häufig bei Alkoholikern wie bei gesunden Kontrollpersonen vorkam, konnte kein Zusammenhang zwischen der Mutation und dem Alkoholismus festgestellt werden. Dieselbe Mutation wurde auch beim Mutationsscreening unter schizophrenen Patienten gefunden (Kawanishi et al., 1998). Außerdem wurden - neben einer weiteren Variante im kodierenden Bereich, die zum Gly272Asp Austausch führt - fünf Polymorphismen im nicht kodierenden Bereich entdeckt. Bei keiner dieser Mutationen wurde eine signifikante Assoziation zur Schizophrenie gefunden.

Lam et al. (1996) beschrieben zwei natürlich vorkommende Varianten des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors: Arg219Leu und Asn417Lys. Die Variante Arg219Leu wurde bei einem Patienten mit Tourette-Syndrom gefunden. Es ist denkbar, daß diese Mutation des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors an der Pathogenese dieser Krankheit beteiligt sein könnte. Da sich diese Mutation in der dritten intrazellulären Schleife, d.h. in einem für die G-Proteinkopplung wichtigen Abschnitt, befindet, untersuchten die Autoren die funktionellen Eigenschaften des mutierten Rezeptors. Der Wildtyp und die Arg219Leu-Rezeptor-Variante wurden in RAT-1 Fibroblasten exprimiert und deren Eigenschaften mittels R-SAT-Assay (Receptor Selection and Amplification Technology) verglichen. Diese Methode beruht auf der Fähigkeit der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, eine Zellproliferation zu stimulieren. Die Rezeptoren werden zusammen mit dem Marker-Enzym  $\beta$ -Galaktosidase koexprimiert. Rezeptoragonisten stimulieren konzentrationsabhängig die Proliferation von Zellen, die funktionsfähige Rezeptoren exprimieren. Diese Zellen exprimieren auch ein Reportergen, wodurch die Rezeptorfunktion durch Enzymaktivität quantifiziert werden kann (Messier et al., 1995; Burstein et al., 1995). Obwohl mittels dieser Assays kein Unterschied in der G-Proteinkopplung zwischen dem Wildtyp und der Arg219Leu 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorvariante gefunden wurde, räumten Lam et al. (1996) ein, dass nicht alle Unterschiede in der Rezeptorfunktion durch das R-SAT-Assay aufgedeckt werden können.

In Anbetracht dieser Unsicherheit, ferner der Tatsache, daß das System von Lam et al. (1996) in vielerlei Hinsicht höchst artefiziell ist (u.a. muß bei dem verwendeten Test ein normalerweise nicht mit dem 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor koppelndes G<sub>q</sub>-Protein kotransfiziert werden) und schließlich wegen des Fehlens jeglicher Daten zur Bindung von Agonisten und Antagonisten an den mutierten Rezeptor, bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit darin, den Einfluss der Arg219Leu-Mutation auf pharmakologische und funktionelle Eigenschaften des Rezeptors genauer und mit geeigneterer Methodik als bisher zu untersuchen.

Dieser Aminosäureaustausch befindet sich - wie bereits erwähnt - in der dritten intrazellulären Schleife, die an der Rezeptor-Ligand-Bindung nicht direkt beteiligt ist. Die Bindungsstelle der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren für Liganden wie Monoamine befindet sich in der von den hydrophoben transmembranären Domänen gebildeten Tasche. Dabei sind speziell die transmembranären Domänen 3, 5 und 7 von Bedeutung (Kobilka et al., 1988; Strader et al., 1994; siehe auch oben: Mutageneseversuche). Dementsprechend sollten Mutationen in den intrazellulären Abschnitten des Rezeptorproteins keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften des Rezeptors haben. Tatsächlich zeigten Bindungsexperimente mit dem spezifischen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT

an Membranen von HEK293-Zellen, welche die Arg219Leu-Variante stabil exprimieren, die gleichen Bindungseigenschaften wie Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor. In Konkurrenzexperimenten mit den Agonisten 5-HT, 8-OH-DPAT, Roxindol, Buspiron und Urapidil und mit den Antagonisten Methiothepin, Spiperon und WAY100135 wurde kein signifikanter Affinitätsunterschied zwischen dem Wildtyp und der Rezeptorvariante gefunden. Auch die Rezeptordichte, die in Sättigungsversuchen an transient transfizierten Zellen ermittelt wurde, war bei beiden Rezeptorisoformen gleich.

Es wurde bereits ausgeführt, daß die dritte intrazelluläre Schleife der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren für die Interaktion mit dem G-Protein wichtig ist (Ostrowski et al., 1992; Strader et al., 1994). Der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor ist vorwiegend an das G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>-Protein gekoppelt. Eine Aktivierung des Rezeptors durch Agonisten führt zu einer Inhibition der Adenylatzyklase (Emerit et al., 1990; Hamon, 1997). Es stellte sich daher die Frage, ob nicht die Arg219Leu-Mutation im Bereich der dritten intrazellulären Schleife des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors – anders als im R-SAT-Assay von Lam et al. (1996) – doch zu Änderungen der funktionellen Eigenschaften führen könnte. In der vorliegenden Arbeit wurden dementsprechend die G-Proteinkopplung und die Inhibition der Forskolin-stimulierten cAMP-Akkumulation untersucht. Die Agonist-stimulierte Bindung des nicht hydrolysierbaren GTP-Analogen [<sup>35</sup>S]GTPγS als Maß für die G-Proteinkopplung lag beim Wildtyp Rezeptor um 55%, beim mutierten Rezeptor aber nur um 5% über der Basalbindung. In Übereinstimmung hiermit war die Inhibition der Forskolin-stimulierten cAMP-Akkumulation in Zellen, die die Arg219Leu-Variante exprimieren, um 61-83% geringer als in Zellen, welche den Wildtyp exprimieren. Insgesamt gesehen war der Effekt von Agonisten auf die G-Proteinkopplung und die Forskolin-stimulierte cAMP-Akkumulation bei Expression der Arg219Leu-Rezeptor-Variante so schwach, dass die IC<sub>50</sub>-Werte nicht zuverlässig bestimmt werden konnten. Offensichtlich beeinträchtigt der Austausch des Arginin gegen Leucin in der Position 219 die G-Protein Kopplung, was zu einer verminderten Adenylatzyklase-Inhibition führt.

Warum wurden in den hier angewandten [<sup>35</sup>S]-GTPγS-Bindungsversuchen und Messungen der Forskolin-stimulierten cAMP-Akkumulation andere Ergebnisse erzielt als in den Experimenten von Lam et al. (1996) und Del Tredici et al. (2004), mit Hilfe des R-SAT-Assay? Eine wahrscheinliche Erklärung dafür besteht darin, dass für eine Kopplung an verschiedene G-Proteine unterschiedliche Rezeptorproteinabschnitte von Bedeutung sind. So kann Arginin in Position 219 für die Kopplung am G<sub>i</sub>-Protein, jedoch nicht an anderen G-Proteinen wichtig sein. Eine Voraussetzung für die Anwendbarkeit des R-SAT-Assays zur Charakterisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist entweder die

Kopplung am  $G\alpha_q$ -Protein oder die Kotransfektion dieser Untereinheit mit dem zu untersuchenden Rezeptor. Lam et al. und Del Tredici et al. untersuchten mittels R-SAT-Assay den durch die Kopplung an der kotransfizierten  $G\alpha_q$ -Untereinheit vermittelten Effekt. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch die 5-HT-stimulierte [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S Bindung an  $G\alpha_i$ - und die Inhibition der cAMP-Akkumulation gemessen, die durch das (wahrscheinlich die  $G\alpha_i$ -Untereinheit enthaltende)  $G_i$ -Protein vermittelt wird. Wahrscheinlich wird durch die Arg219Leu-Mutation die Kopplung am  $G\alpha_q$ -Protein nicht beeinflusst (offensichtlich werden die Arg219Leu-Mutante und der Wildtyp in gleichem Maße an das kotransfizierte für 5-HT $_{1A}$ -Rezeptor-vermittelte Effekte nicht relevante  $G\alpha_q$  gekoppelt), während die physiologische Kopplung am  $G_i$ -Protein stark reduziert wird.

Als wichtige Schlußfolgerung aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich feststellen, daß für die  $G_i$ -Protein-Kopplung an den 5-HT $_{1A}$ -Rezeptor nicht nur – wie bisher bekannt – dessen Ala331-Leu347-Abschnitt in der dritten intrazellulären Schleife (Varrault et al., 1992) sondern auch die Aminosäure 219 in derselben dritten intrazellulären Schleife von Bedeutung ist.

## 4.2 Potentielle klinische Auswirkungen

Der 5HT $_{1A}$ -Rezeptor ist in eine Vielzahl physiologischer Funktionen involviert. Daher könnte eine Mutation im Rezeptorprotein, die zu einer Veränderung der funktionellen Eigenschaften des Rezeptors führt, zum Auftreten von psychiatrischen Erkrankungen beitragen. Die Arg219Leu-Mutation wurde bei einem Patienten mit dem Tourette-Syndrom gefunden. Dieses Syndrom ist eine psycho-neurologische Erkrankung, die sich in multiplen motorischen und verbalen Ticks (z.B. Zucken und Herumschleudern des Kopfes sowie stereotypen Lautäußerungen) und weiteren Verhaltensstörungen manifestiert. Die Ursache der Krankheit ist noch nicht genau erklärt, aber Störungen des Stoffwechsels der Neurotransmitter Dopamin und Serotonin im Gehirn spielen dabei wahrscheinlich eine wichtige Rolle. Ob etwa die Arg219Leu-Mutation an der Entstehung der Erkrankung beteiligt ist, diese Frage läßt sich ansatzweise erst durch Mutations-Screening an einer großen Anzahl von am Tourette-Syndrom erkrankten Patienten beantworten. Das von Lam et al. (1996) untersuchte Kollektiv von 21 derartigen Patienten, unter denen die Mutation einmal nachgewiesen wurde, ist für eine solche Aussage zu klein.

Pathologische Zustände, die mit Störungen des 5-HT-Stoffwechsels einhergehen, wie Depression und Angststörungen, sind häufige Erkrankungen. So gibt es Schätzungen, wonach etwa drei bis fünf Prozent der Weltbevölkerung an Behandlungs-bedürftigen De-

pressionen leiden. Bei dieser Erkrankung sind psychische und körperliche Funktionen gestört. Neben depressiver Stimmungslage und Antriebshemmung treten auch Schlafstörung, Appetitstörung, leichte Ermüdbarkeit und Verdauungsstörung auf. Die Rolle des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors in der Pathophysiologie von Angst und Depression läßt sich unter anderem auch aus Untersuchungen an transgenen Mäusen ableiten (Heisler et al., 1998; Parks et al., 1998; Ramboz et al., 1998). 5-HT<sub>1A</sub>-Knock-out-Tiere zeigten ein erhöhtes Angstverhalten und eine verstärkte Reaktion auf Stress. In anderen Tests wiesen diese Tiere ein ähnliches Verhalten wie Wildtypmäuse nach der Behandlung mit Antidepressiva auf. Die Autoren erklären diese Effekte durch das Fehlen der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor vermittelten Autoinhibition der serotonergen Neurone. Da 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren im limbischen System, dem anatomischen Substrat seelischer Vorgänge, in relativ hoher Dichte vorkommen, liegt es nahe, sie als mögliche Zielstrukturen von Anxiolytika und Antidepressiva anzusehen. In der Tat wird der partielle 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonist Buspiron bereits als Anxiolytikum eingesetzt (Taylor and Moon, 1991). Im Gegensatz zu Benzodiazepinen wirkt Buspiron nicht sedierend, hat keine muskelrelaxierende Eigenschaften und potenziert nicht die Wirkung von Alkohol. Es ist möglich, daß die therapeutische Wirkung von Buspiron bei Patienten, die Träger der Arg219Leu-Variante des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors sind, abgeschwächt ist.

Buspiron-analoga Substanzen wurden – bisher allerdings ohne befriedigenden Erfolg – als Antidepressiva geprüft. Im Wirkungsmechanismus der selektiven Serotonin-Rückaufnahme-Inhibitoren (SSRI), die als Antidepressiva verwendet werden, scheint jedoch die Regulation des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors eine Rolle zu spielen. SSRI hemmen primär die neuronale 5HT-Wiederaufnahme. Dieser Effekt ist aber nicht allein für die Wirkung verantwortlich, weil der maximale antidepressive Effekt erst nach Wochen erreicht wird und die Transporterblockade in vivo bereits nach wenigen Minuten eintritt. Es wird angenommen, dass SSRI durch die Steigerung der extrazellulären 5-HT-Konzentration eine andauernde, aus der Transporterblockade resultierende Aktivierung der präsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren hervorrufen, was zur einer Rezeptor-Desensibilisierung führt (Artigas et al., 1994; Blier and Bergeron, 1995).

Auch einige Eigenschaften von atypischen Neuroleptika wie z.B. die Wirksamkeit gegen Negativsymptome der Schizophrenie und ein Fehlen extrapyramidaler Nebenwirkungen verbindet man mit einer Interaktion mit Serotonin-Rezeptoren, unter anderem indirekt auch mit den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren.

Zentrale 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren sind an der Blutdruckregulation beteiligt. Im Wirkungsmechanismus des Antihypertensivums Urapidil, das gegen Hypertonie eingesetzt wird, spielt neben der Blockade der  $\alpha_1$ -Adrenorezeptoren eine Aktivierung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren

eine Rolle. Wie im Falle von Buspiron bei Angststörungen ist es denkbar, daß die antihypertensive Wirkung von Urapidil bei Patienten, die die Arg219Leu-Variante exprimieren, abgeschwächt ist.

Auch für die Schmerzwahrnehmung scheinen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren bedeutsam zu sein. Bei Ratten antagonisieren 5HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten die antinocizeptive Wirkung von Morphin (Millan and Colpaert, 1991). Im Gegensatz zu Agonisten könnten daher 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Antagonisten die analgetische Wirkung von Morphin verstärken. Überdies scheint eine veränderte serotonerge Transmission an der Pathogenese des Alkoholismus beteiligt zu sein. Svensson et al. (1993) haben festgestellt, dass 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten die Alkoholaufnahme von Ratten in Abhängigkeit von der verabreichten Dosis reduzieren.

Klinische Bedeutung hat der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor auch bei Eßstörungen. Der Agonist 8-OH-DPAT stimuliert bei lokaler Applikation in die Raphe-Kerne das Ernährungs- und Sexualverhalten (Fletcher et al., 1995) und ruft bei systemischer Gabe eine Hyperphagie hervor (Dourish et al., 1985).

Wie bereits in der Einleitung erwähnt spielt der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor in der pränatalen Entwicklung des Gehirns eine bedeutende Rolle. 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren modulieren die Differenzierung von neokortikalen und serotonergen Neuronen über eine Stimulation der Freisetzung des Wachstumsfaktors S-100b (Whitaker-Azmitia, 1991).

Die genannten Beispiele illustrieren die physiologische, pathogenetische und therapeutische Bedeutung des 5HT<sub>1A</sub>-Rezeptors. Die Arg219Leu-Variante des h5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors, die mit einer Beeinträchtigung der Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion einhergeht, kann bei Trägern dieser Mutation zu Störungen der Funktionen führen, in die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor involviert ist und kann pharmakogenetische Unterschiede in der Wirkung von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten verursachen.

### **4.3 Der h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor und seine Arg344His- und Pro391Arg-Varianten**

Abgesehen von der bisher besprochenen Eigenschaften der natürlich vorkommenden Arg219Leu-Variante des h5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors und ihrer möglichen klinischen und therapeutischen Auswirkungen, bestand ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit in der Ermittlung der pharmakologischen Eigenschaften von zwei natürlich vorkommenden Varianten – Arg344His und Pro391Arg – des humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors. Diese Eigenschaften sollen auf der Grundlage hierfür relevanter, im folgenden kurz dargestellter grundlegender Befunde anderer Autoren diskutiert werden.

Zwischen den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren von Mensch, Maus, Ratte und Meerschweinchen, die sich in ihrer Aminosäuresequenz in begrenztem Maße unterscheiden, bestehen Unterschiede in ihren pharmakologischen und funktionellen Eigenschaften. Dieses fanden beispielsweise Lankiewicz et al. (1998), die die Eigenschaften von in HEK293-Zellen exprimierten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren des Meerschweinchen, des Menschen und der Maus untersuchten. Diese Unterschiede bestehen, obwohl die Sequenzhomologie zwischen diesen Spezien mehr als 80 % beträgt. So aktiviert 1-Phenylbiguanid, ein selektiver Agonist am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor von Mensch und Maus, den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor des Meerschweinchens nicht. Der Agonist mCPBG und die Antagonisten Tropicsetron und Metoclopramid haben eine viel geringere Affinität zum Meerschweinchenrezeptor als zum humanen oder Mausrezeptor.

Niemeyer und Lummis (1998) untersuchten eine Spleißvariante des Maus-5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors, die sich vom „Wildtyp“ durch das Fehlen von sechs Aminosäuren in der zweiten intrazellulären Schleife unterscheidet. Bindungsstudien ergaben keinen Unterschied in den Affinitäten der Agonisten und Antagonisten zu beiden in HEK293-Zellen stabil exprimierten Rezeptorisoformen. Aus elektrophysiologischen Versuchen ergab sich jedoch ein funktioneller Unterschied zwischen den Agonisten 2-Me-5HT und mCPBG. Der maximale Kationen-Einstrom, der durch mCPBG induziert wurde, war an der kurzen Isoform des Rezeptors deutlich geringer, während 2-Me-5-HT an dieser 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Variante einen größeren Maximaleffekt bewirkte. Vergleichbare Ergebnisse wurden für 2-Me-5-HT von Downie et al. (1994) erhoben.

Zwei Spleißvarianten des h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors wurden von Brüss et al. (1998, 2000) identifiziert und funktionell untersucht. Wie bereits oben beschrieben, besteht die kurze trunkierte Variante insgesamt nur aus 238 Aminosäuren, die nur eine einzige transmembranäre Domäne bilden. Die lange Variante des Rezeptorproteins enthält 32 zusätzliche Aminosäuren in der extrazellulären Schleife zwischen der zweiten und dritten transmembranären Domäne. Beide Varianten der h5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit bilden allein exprimiert keinen funktionsfähigen Rezeptor, bei Koexpression mit der „normalen“ h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor-Untereinheit wird jedoch die Funktion im Vergleich zum homopentameren h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor moduliert.

Niesler et al. (2001) fanden eine Assoziation zwischen der natürlich vorkommenden Pro16Ser-Mutation des h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors und der bipolar affektiven Erkrankung. Mit Hilfe des Luciferase-Reporter-Assay wurde eine um 145% höhere Genexpression der Pro16Ser-Variante als des Wildtyp-Rezeptors ermittelt. Melke et al. (2003) beobachteten

einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieser Pro16Ser Mutation und Veränderungen in bestimmten Verhaltenstests bei Frauen.

Im Zusammenhang mit einer der hier analysierten Varianten sollen einige Befunde diskutiert werden, die darauf hinweisen, daß die Aminosäure Prolin eine wichtige Rolle für die Proteinkonformation spielt (MacArthur and Thornton, 1991). Prolin unterscheidet sich von anderen Aminosäuren dadurch, dass das Stickstoffatom ein Teil des starren Pyrrolidinrings ist. Somit ist keine Bildung von Wasserstoffbrücken möglich. Ohne stabilisierende Wasserstoffbrücken ist die Proteinstruktur flexibler, was eine Ligand-induzierte Konformationsänderungen ermöglicht. Deswegen kann ein Austausch von Prolin gegen andere Aminosäure zu Veränderungen in der Rezeptoreigenschaften führen. Dang et al. (2000) führte Mutagenese-Versuche zur Analyse der Bedeutung des Prolins für die Funktion der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors durch. An dem mutierten 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor, in dem Pro256 in der ersten transmembranären Domäne durch Alanin, Glycin oder Leucin ersetzt wurde, konnte kein 5-HT-induzierter Strom registriert werden, obwohl die Bindungsversuche eine normale Rezeptordichte gezeigt haben. Eine Substitution des Prolins 256 durch andere Iminosäuren oder das  $\alpha$ -Hydroxy-Analogon des Leucins, das statt einer Amid- eine Esterbindung eingeht und somit auch kein Proton für die Wasserstoffbrücke zur Verfügung stellt, führte zu einem funktionsfähigen Rezeptor, dessen Kanaleigenschaften mit denen des Wildtyp-Rezeptors vergleichbar waren. Zusätzlich wurde die Bedeutung des Prolins 256 für Konformationsänderungen dadurch bestätigt, dass die Kombination des Austauschs Pro256Gly mit der Mutation Val290Ser in einem permanent geöffneten Ionenkanal resultiert.

Deane und Lummis (2001) ersetzen Prolin in den Positionen 56, 104, 123, 170, 257 und 301 des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptorproteins durch Alanin und untersuchten alle sechs Mutationen, die in HEK293-Zellen exprimiert wurden, mit Hilfe von Radioligandbindungsstudien, elektrophysiologischen und immunochemischen Methoden. Die Mutationen Pro56Ala, Pro104Ala, Pro123Ala und Pro170Ala zeigten keine spezifische Bindung. Die immunologischen Studien zeigten, dass diese Mutanten zwar in entsprechende Proteine translatiert wurden, die Zellmembran aber nicht erreichten. Die Bindungseigenschaften der Pro257Ala- und Pro301Ala-Mutanten unterschieden sich nicht vom Wildtyp-Rezeptor, jedoch ging aus den Patch-Clamp-Versuchen hervor, dass beide mutierten Rezeptoren inaktiv sind.

Die Bedeutung von intrazellulären Rezeptorabschnitten für die Rezeptorfunktion wurde in weiteren Mutagenesestudien bestätigt. Kelley et al. (2003) konstruierten einen chimären Rezeptor, in dem drei Abschnitte der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoruntereinheit innerhalb der zweiten

(langen) intrazellulären Schleife durch äquivalente Abschnitte der 5-HT<sub>3B</sub>-Rezeptor-Untereinheit ersetzt wurden. Diese Substitution führte zur einer Erhöhung der Einzelkanal-Leitfähigkeit.

Die zweite intrazelluläre Schleife enthält eine Erkennungssequenz für die Proteinkinase C. Die mit Aminosäureaustausch verbundene Strukturänderung kann die Phosphorylierung durch die Proteinkinase C beeinflussen. Die Untersuchungen an Maus-5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren haben gezeigt, dass die Ionenkanalleitfähigkeit durch die Proteinkinase C moduliert wird und dass die Phosphorylierung die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Funktion beeinflusst (van Hooft and Vijverberg, 1995; Zhang, 1995).

Sieben natürlich vorkommenden Sequenzvarianten des humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptorgens fanden Niesler et al. (2000) beim systematischen Mutationsscreening von Patienten mit Schizophrenie, bipolar affektiver Erkrankung und, zum Vergleich, gesunden Kontrollpersonen. Fünf dieser Mutationen waren stumm, d.h. sie führten nicht zu einem Aminosäureaustausch, und sie wurden nicht bei den Patienten mit Schizophrenie oder bipolarer affektiver Erkrankung festgestellt. Die Mutationen Arg344His und Pro391Arg wurden bei zwei Schizophrenen, jedoch bei keinem Gesunden gefunden. Beide Mutationen befinden sich in der zweiten intrazellulären Schleife (Abb. 28), die bei Mensch, Maus, Ratte und Meerschweinchen konserviert ist.

Da noch keine weiterführenden Untersuchungen zu den Auswirkungen dieses Aminosäureaustausches vorlagen, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob diese zwei natürlich vorkommenden Mutationen die pharmakologischen Eigenschaften des Rezeptors beeinflussen. Die Ergebnisse dieser Radioligand-Bindungsexperimente sollten mit Befunden von gleichzeitig im hiesigen Institut durchgeführten funktionellen Studien verglichen werden.

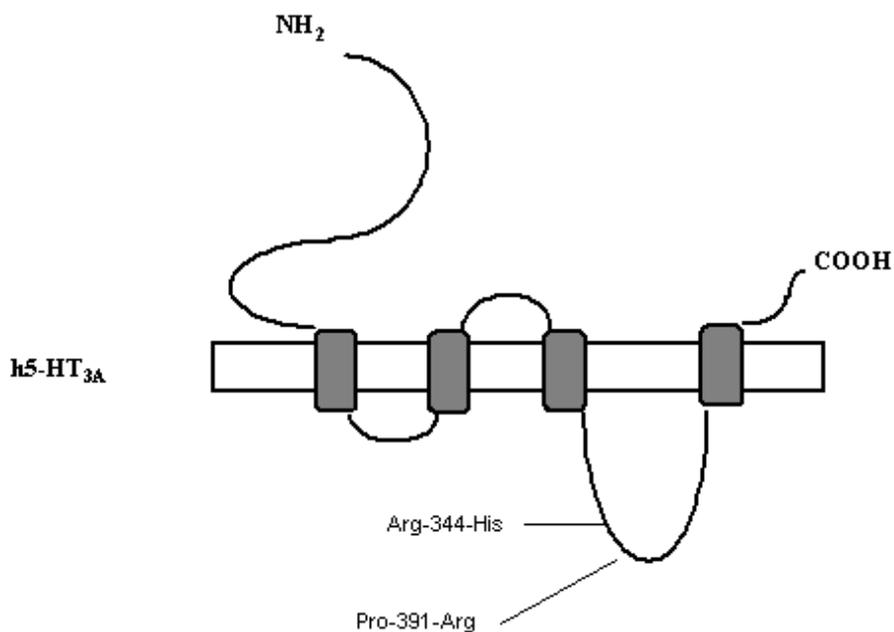


Abbildung 28: Schematische Darstellung des h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors: Lokalisation der zwei natürlich vorkommenden Mutationen in der zweiten intrazellulären Schleife.

HEK293-Zellen wurden mit den mittels gerichteter Mutagenese hergestellten cDNAs der Pro391Arg- oder Arg344His-Varianten der h-5HT<sub>3A</sub>-Rezeptor-Untereinheit oder der Wildtyp-Rezeptor-Untereinheit stabil oder transient transfiziert. Die Affinitäten von Agonisten und Antagonisten zu den drei Isoformen des homopentameren h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors, die in Wettbewerbsversuchen ermittelt wurden, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Die Potenzreihenfolge der Agonisten Quipazin > mCPBG=5-HT > 2-Me-5-HT > PBG und der Antagonisten Tropisetron=Y25130 =Ondansetron > Tubocurarin war gleich an allen drei Rezeptortypen.

Die maximale Rezeptorbindung wurde in Radioligand-Sättigungsexperimenten ermittelt, die sowohl an stabil, als auch an transient transfizierten Zellen durchgeführt wurden. Radioligand-Sättigungsexperimente an transient transfizierten Zellen wurden bei den drei unterschiedlichen Kollektiven an Membranen jeweils mehrerer Zellpopulationen durchgeführt. Bei diesen war die Transfektion unter gleichen Bedingungen mit derselben Menge cDNA des Wildtyps oder der Varianten des Rezeptors erfolgt. Diese Experimente geben Auskunft darüber, ob die Mutation zu einem verminderten oder erhöhten Einbau des Rezeptors in die Zellmembran führt oder ob die Dichte des Rezeptors unbeeinflusst bleibt. Stabil transfizierte Zellen dagegen werden nach der Transfektion einer Selektion in dem Sinne unterzogen, daß die Zellklone mit der höchsten Rezeptorzahl für bestimmte

Experimente (beispielweise Radioligand-Kompetitionsexperimente) als am besten geeignet ausgewählt werden; Radioligand-Sättigungsexperimente an solchen Zellen sagen also nichts über den Einfluß von Mutationen auf den Einbau in die Zellmembran aus. Die natürlich vorkommende Variante Pro391Arg unterscheidet sich vom Wildtyp-Rezeptor bei transienter und stabiler Expression nicht in bezug auf die maximale Bindungskapazität. In anderen Worten, die Variante wird in gleichem Maße in die Zellmembran eingebaut wie der Wildtyp, und die stabil transfizierten Zellen mit beiden Rezeptorisoformen können für funktionelle Experimente herangezogen werden: Da die Dichte der Rezeptorvariante in beiden stabilen Zelllinien gleich ist würde eine Abnahme des maximalen Kationeninflux durch die mutierten 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptorkanäle auf eine Reduzierung der Leitfähigkeit der Einzelkanäle hindeuten. Dagegen betrug die maximale Rezeptor-Bindung der Arg344His-Variante nur 56 % des Wildtyps Rezeptor an transient transfizierten und sogar nur 7 % an stabil transfizierten Zellen. Dies bedeutet, daß die Expression der Rezeptorvariante in der Zellmembran als Folge der Mutation um etwa die Hälfte reduziert ist. Bei der Variante war trotz der um 90% reduzierten  $B_{max}$  die Bindungskapazität noch hoch genug, um Kompetitionsexperimente mit 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten und Antagonisten zu ermöglichen. Allerdings mußte der Kationen-Influx durch die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanäle an transient transfizierten Zellen gemessen werden, um statistisch sicherbar zu ermitteln, ob sich die Abnahme der Zahl der Rezeptorkanäle in einer entsprechenden Reduktion der Funktion widerspiegelt.

Die funktionellen Eigenschaften der Pro391Arg-Rezeptor-Variante wurden in einer parallelen Studie mittels der sehr aufwendigen Patch-Clamp-Methode an „excised outside-out patches“ der stabil transfizierten HEK293-Zellen untersucht (Kurzweily et al., 2004). Diese Technik ermöglicht die Untersuchung der Leitfähigkeit, Kinetik und Pharmakologie von membranständigen Ionenkanälen. Dabei wird mit der Spitze einer fein ausgezogenen Glaspipette ein kleines Membranstück aus einer Zelle herausgerissen. Die Pipettenöffnung wird durch das Membranstück verschlossen und bildet dort eine elektrische Barriere. Bei der hier verwendeten Konfiguration ist die extrazelluläre Seite der Zellmembran nach außen gewandt. Der Ionenfluss durch die membranständigen Ionenkanäle wird mittels einer mit der Pipette verbundenen Verstärker-Apparatur registriert. Eine wesentliche Komponente des Meßstandes bestand in einem mehrkanaligen Lösungswechsel-System, das den Wechsel zwischen zwei Lösungen innerhalb von zwei Millisekunden ermöglicht.

An den HEK293-Zellen, die entweder den Wildtyp oder die Pro391Arg -Variante des h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors stabil exprimieren, wurden die Rezeptor-vermittelten Effekte von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten gemessen. Die Applikation von 1-100µM 5-HT, mCPBG oder 2-Me-

5-HT induzierte einen konzentrationsabhängigen Kationen-Einstrom. Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp Rezeptor und der Pro391Arg-Variante bezüglich der  $pEC_{50}$ -Werte oder der Maximaleffekt für die Agonisten. Anschließend wurde die Wirkung von zwei Antagonisten, Tubocurarin und Y-25130, auf den 5-HT-induzierten Einstrom untersucht. Beide Antagonisten inhibierten konzentrationsabhängig den Einwärtsstrom, der durch  $30\mu\text{M}$  5-HT hervorgerufen wurde und in der maximalen Konzentration wurde der Kationenstrom völlig aufgehoben. Die  $pIC_{50}$ -Werte beider Antagonisten als Inhibitoren des 5-HT-induzierten Stroms waren für beiden Rezeptorisoformen nicht signifikant unterschiedlich.

Eine charakteristische Eigenschaft von ligandgesteuerten Ionenkanälen besteht in der schnellen Desensibilisierung bei protrahierter oder wiederholter Applikation. Es handelt sich dabei um eine Konformationsänderung eines aktivierten Rezeptors, die mit dem Verschluss des Kanals und einer Unempfindlichkeit gegenüber Agonisten verbunden ist. Die Resensibilisierung ist der Übergang der desensibilisierten Kanäle zurück in einen aktivierbaren Zustand. Diese Mechanismen dienen der Kurzzeit-Regulation der synaptischen Übertragung. Um die Resensibilisierung der beiden Rezeptorisoformen miteinander zu vergleichen, wurde  $60\mu\text{M}$  5-HT in Doppelpulsen mit unterschiedlichen Zeitintervallen appliziert. Dabei zeigte sich, dass die Resensibilisierungszeit an beiden Rezeptorisoformen ungefähr 60 Sekunden dauert, dass also auch in bezug auf diesen Parameter kein Unterschied zwischen der Rezeptorvariante und dem Wildtyp bestand.

Zusammenfassend lässt sich daher aus den Bindungsversuchen und den elektrophysiologischen Experimenten schließen, dass die Mutation Pro391Arg keinen Einfluss auf pharmakologische und funktionelle Eigenschaften des  $h5\text{-HT}_{3A}$ -Rezeptors ausübt und damit auch in vivo keine Auswirkungen auf physiologische  $5\text{-HT}_3$ -Rezeptorvermittelte Funktionen sowie therapeutische Effekte von  $5\text{-HT}_3$ -Rezeptorantagonisten hat. Ein anderes Ergebnis mußte durchaus in Erwägung gezogen werden, da entsprechend den oben zitierten Mutageneseexperimenten der Ersatz von Prolin durch eine andere Aminosäure bei der Bedeutung von Prolin für die Rezeptor-Konformation zu einer Modifikation der Rezeptoreigenschaften hätte führen können. In der Position 391 in der zweiten intrazellulären Schleife kommt dem Prolin jedoch offensichtlich keine solche Bedeutung zu.

Im Gegensatz dazu führt die Mutation Arg3244His – wie bereits oben ausführlich beschrieben – zu einer etwa 50%igen Abnahme der Rezeptordichte in der Zellmembran transient transfizierter HEK293-Zellen. Um zu prüfen, ob diese Veränderung mit funktionellen Auswirkungen verbunden ist, wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn in einer parallel zu den Bindungsexperimenten durchge-

fürten Untersuchungsreihe zunächst eine weniger aufwendige Methode zur Messung des Kationeninflux durch den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal entwickelt. Diese beruht auf der Messung des Agonist-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms in intakte transient transfizierte Zellen, denn der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor leitet nicht nur Na<sup>+</sup>-Ionen sondern auch dieses Kation.

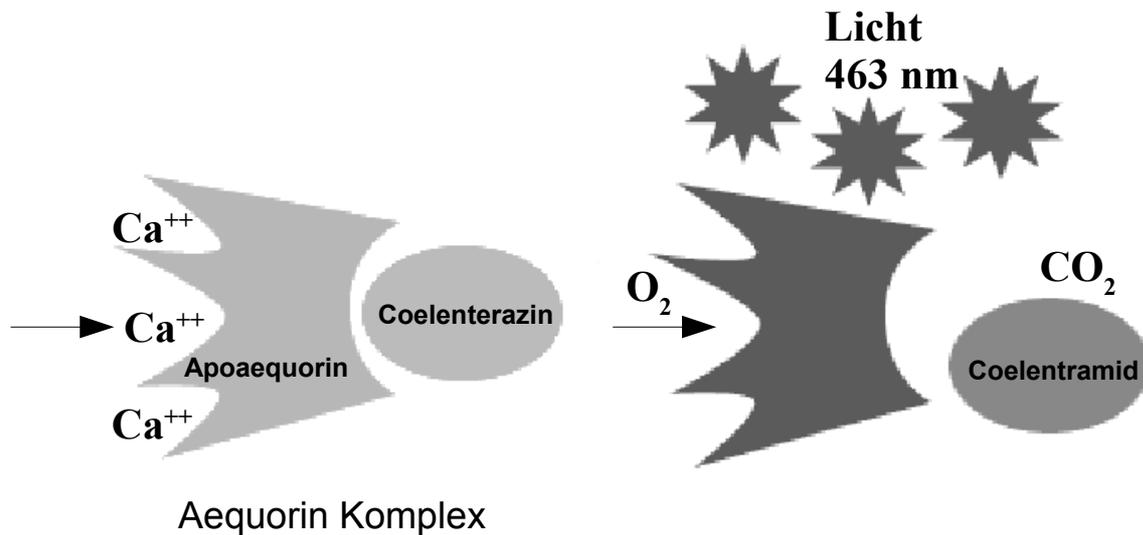


Abbildung 29: Schema der Interaktion von Aequorin mit Ca<sup>2+</sup>-Ionen

Die Methode nutzt den ionenselektiven und -sensitiven Farbstoff Aequorin, der in der Qualle *Aequorea* vorkommt. Er besteht aus einem Apoprotein von ca. 22 kDa, an das in Gegenwart von molekularem Sauerstoff eine hydrophobe prosthetische Gruppe, das Coelenterazin, kovalent gebunden wird. Das Protein enthält drei Ca<sup>2+</sup>-Bindungsstellen. Durch die Bindung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen wird eine sehr schnelle autokatalytische Reaktion eingeleitet: das Äquorin wird gespalten, wobei Apoäquorin, Coelenteramid, CO<sub>2</sub> und Licht von 463nm Wellenlänge freigesetzt wird (Abb 29). Da die Lichtemission zur Ca<sup>2+</sup> Konzentration proportional ist, kann Aequorin als Ca<sup>2+</sup> Detektor verwendet werden.

Im Einzelnen wurden die HEK293-Zellen mit Apoaequorin-cDNA und cDNA der Wildtyp- bzw. der Arg344His-Variante des h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors transient kotransfiziert. Für die Bildung des Holoaequorins wurde Coelenterazin in einem Puffer zugegeben und die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> Konzentration luminometrisch bestimmt.

Die Agonisten 5-HT und mCPBG induzierten einen konzentrationsabhängigen Ca<sup>2+</sup> Einstrom durch beide Rezeptorisoformen. Die pEC<sub>50</sub> -Werte des Wildtyps waren vergleichbar mit denen der Arg344His-Variante des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors. Der maximale Ca<sup>2+</sup>-Einstrom, der durch 10µM 5-HT hervorgerufen wurde, lag bei der Arg344His-Rezeptorvari-

ante nur etwa halb so hoch wie beim Wildtyp-Rezeptor. Die Antagonisten Ondansetron und Azasetron inhibierten den durch  $10\mu\text{M}$  5-HT induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in Zellen, die die Rezeptorvariante exprimieren mit gleicher Potenz wie in Zellen, die den Wildtyp exprimieren.

Somit lässt sich zusammenfassend feststellen, daß die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen mit den Resultaten der Radioligand-Bindungsversuche im Einklang stehen: Die Mutation Arg344His hat keinen Einfluss auf die Affinität von Agonisten und Antagonisten zu den h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptorkanälen, vermindert aber deren Dichte in der Zellmembran, was mit einer Verminderung des maximal möglichen Kationen-Influx in die Zelle verbunden ist.

#### **4.4 Potentielle physiologische und pathogenetische Auswirkungen der Arg344His-Variante des h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors**

Mögliche Auswirkungen der Arg344His-Mutation lassen sich aus der physiologischen, pathogenetischen und therapeutischen Bedeutung der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren ableiten.

Zentrale und periphere 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren sind an der Auslösung des Erbrechens beteiligt. Im einzelnen führt die Aktivierung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren an den Endigungen afferenter Neurone im Gastrointestinaltrakt (diese Neurone ziehen mit dem Nervus vagus ins ZNS), ferner von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren in der Area postrema und im Nucleus tractus solitarii zum Erbrechen. Dem Brechreflex kommt eine physiologische Bedeutung zu, denn oral aufgenommene Gifte gelangen infolge der Auslösung dieses Reflexes nicht in den Darm, und es wird so ihre enterale Resorption verhindert. Erbrechen durch oral aufgenommenes Gift oder durch therapeutische Maßnahmen wie Zytostatika und Bestrahlung kommt dadurch zustande, dass diese Noxen die enterochromaffinen Zellen des Darms schädigen und dass aus diesen vermehrt freigesetztes Serotonin die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren aktiviert. Die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten verhindern das akute Erbrechen, indem sie die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren an den peripheren Endigungen der afferenten Neurone sowie in der Area postrema und im Nucleus tractus solitarii blockieren. Die Einführung dieser Substanzen war ein Fortschritt in der supportiven Therapie von Tumoren, aber bei 20 bis 30 % der Patienten bleiben sie wirkungslos. Ein möglicher Grund dafür könnten individuelle Varianten in der Rezeptor-Struktur sein. Ein Ausbleiben der Wirkung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten lässt sich jedoch nicht mit einer verminderten Expression der Arg344His-Variante der h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoruntereinheit in Verbindung bringen, andererseits könnte aber die reduzierte

Expression dieser Mutante dazu führen, dass die Auslösung des Brechreflexes durch emetogene Pharmaka oder durch oral aufgenommene Gifte vermindert wird. Damit könnte bei solchen Individuen die emetogene Wirkung von Zytostatika – die am meisten gefürchtete Nebenwirkung dieser Substanzen – herabgesetzt sein, andererseits aber der physiologische Schutzreflex „Erbrechen“ abgeschwächt sein.

Tierversuche haben gezeigt, dass zentrale und periphere 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren an der Schmerzperzeption beteiligt sind. Intrathekal verabreichtes Serotonin reduziert die Schmerzreaktion auf thermische Reize - ein Effekt, der durch 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten aufgehoben wird (Glaum et al., 1988). Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonist 2-Methyl-5-HT ahmt bei der intrathekalen Gabe den antinozizeptiven Effekt von Serotonin nach; auch diese Wirkung wird durch die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten inhibiert (Glaum et al., 1990; Giordano, 1997). Umgekehrt können nach subkutaner Capsaicingabe (Giordano et al., 1998) oder anderen chemischen Reizen auftretende nozizeptive Effekte („Schmerzreaktionen“) durch 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten inhibiert werden (Giordano and Dyche, 1989; Moser, 1995). Hierzu passt, daß durch 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten die Freisetzung von Neuropeptiden aus den zentralen Endigungen der primär sensorischen Neurone inhibiert wird (Saria et al., 1990). Alle diese Befunde sprechen dafür, dass 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren in der Schmerzmodulation eine Rolle spielen.

5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren im ZNS modulieren die Freisetzung von Dopamin ( Blandina et al., 1989; Campbell et al., 1996; Allan et al., 2001), Noradrenalin (Blandina et al., 1991; Matsumoto et al., 1995), Acetylcholin (Consolo et al., 1994; Giovanni et al., 1997), GABA (Ropert and Guy, 1991; McMahon and Kauer 1997) und Cholecystokinin (Paudice and Raiteri, 1991). Da das Gleichgewicht dieser Transmittersysteme als Voraussetzung für die normale Funktion des ZNS anzusehen ist, kann eine 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-vermittelte Störung dieses Gleichgewichts an der Pathogenese psychiatrischer Erkrankungen beteiligt sein. Diese Hypothese wird durch Tierexperimente mit pharmakologischen Werkzeugen oder an transgenen Tieren bestätigt. So besitzen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten anxiolytische Eigenschaften ( Costall and Naylor, 1991; Costall et al., 1989,1993), und es wurden Hinweise darauf gefunden, daß eine Blockade von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren schizophrene Symptome günstig beeinflussen kann (Moran and Moser 1992; Hagan et al.,1993). 5-HT<sub>3A</sub> knock-out-Mäuse zeigten ein vermindertes Angstverhalten im Vergleich mit dem Wildtyp (Kelley et al., 2003).

Die Expression von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren in Hirnregionen wie Hippocampus und Amygdala steht mit der Vermutung in Einklang, dass diese Rezeptoren in Lern- und Gedächtnismechanismen involviert sind. Da die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten in Tierversuchen kogni-

tive Fähigkeiten verbessern (Barnes et al., 1990; Domenev et al., 1991; Staubli and Xu, 1995; Reznic and Staubli, 1997; Harrel and Allan, 2003), muß man davon ausgehen, daß die Aktivierung der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren eher mit einer Beeinträchtigung von Lern- und Gedächtnisleistungen einhergehen.

Umgekehrt scheint sich die Aktivierung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren durch Stimulation der Dopaminfreisetzung in der mesolimbischen Belohnungsbahn fördernd auf die Suchtentwicklung auszuwirken (Grant, 1995). Dementsprechend fanden Hui et al. (1993), dass Ondansetron und Tropisetron die Morphinaufnahme in Ratten hemmt.

Welche Konsequenzen für die geschilderten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-vermittelten physiologischen und pathogenetischen Effekte könnten sich aus der Expression der Arg344His-Variante ergeben? Da diese Mutation mit einer verminderten Dichte der Rezeptoren einhergeht, könnten die resultierenden Effekte diejenigen einer partiellen Blockade des Wildtyprezeptors durch die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten imitieren. Daher könnte sich die Expression der Variante im Vergleich zum Wildtyp auf der Ebene des ZNS eher fördernd, auf der Ebene der primären sensorischen Afferenzen aber eher hemmend auf die Schmerzsignale auswirken. Auch ist es nicht auszuschließen, dass die verminderte Expression des mutierten Rezeptors an einer Imbalance der Transmittersysteme im Gehirn und damit der Auslösung von Psychosen beteiligt sein kann, zumal da diese Mutation bei einem schizophrenen Patienten nachgewiesen wurde. Schließlich kann man spekulieren, dass die mit der Mutation verbundene verminderte Expression des Rezeptors mit einer Verbesserung der kognitiven Leistungen und geringerer Suchtdisposition einhergehen könnte.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden pharmakologische und funktionelle Eigenschaften der natürlich vorkommenden Varianten von h5-HT<sub>1A</sub> und h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp-Rezeptor untersucht. Es wurden dabei molekularbiologische, zellbiologische und biochemische Methoden verwendet:

- ◆ Die cDNA der natürlich vorkommenden Varianten Arg219Leu des h5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors (bei einem Patienten mit Tourette-Syndrom) sowie Pro391Arg und Arg344His des h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors (bei zwei schizophrenen Patienten) wurden mittels gerichteter Mutagenese hergestellt.
- ◆ Die cDNA der Rezeptorvariante und des jeweiligen Wildtyps wurden in HEK293-Zellen stabil oder transient transfiziert.
- ◆ Mittels [<sup>3</sup>H]-Radioligandbindungsstudien wurden pharmakologische Eigenschaften der Rezeptorvarianten charakterisiert: Mittels Wettbewerbsversuchen an Membranen von stabil transfizierten Zellen wurden die (zu den Affinitäten proportionalen) Potenzen der verschiedenen Agonisten und Antagonisten als Inhibitoren der jeweiligen Radioliganden ermittelt. Als Radioligand für den h5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor, einen prototypischen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, wurde [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT eingesetzt, und für den h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor, einen prototypischen ligandgesteuerten Ionenkanal, wurde [<sup>3</sup>H]GR65630 verwendet. Die maximale Rezeptordichte B<sub>max</sub> wurde in Sättigungsversuchen an Membranen von transient transfizierten Zellen bestimmt.
- ◆ Um die G-Protein-Kopplung der Arg219Leu Variante des h5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors im Vergleich zum Wildtyp zu untersuchen, wurde die Stimulation der [<sup>35</sup>S]-GTPγS-Bindung an Membranen von stabil transfizierten Zellen durch den natürlichen Agonisten 5-HT bestimmt.
- ◆ Als weitere Komponente der Signaltransduktionskaskade des G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>-gekoppelten h5-HT<sub>1A</sub> Rezeptors wurde die Inhibition der Forskolin-stimulierten Akkumulation des Second messengers cAMP in intakten Zellen, die entweder den Wildtyp oder die Variante exprimieren, untersucht.
- ◆ Die pharmakologischen Eigenschaften der Pro391Arg- und Arg344His-Varianten des h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors wurden ebenfalls zu den funktionellen Eigenschaften dieser mutierten Rezeptorkanäle in Beziehung gesetzt. Als Maß für die Funktion des Rezeptorkanals wurde der Agonist-induzierte Flux der Kationen Na<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup> von der extra- zur intrazellulären Seite der Zellmembran mit elektrophysiologischer oder

neu entwickelter luminometrischer Methode im Rahmen paralleler Experimente am hiesigen Institut untersucht.

1. Der Wildtyp und die **Arg219Leu-Variante des h5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors** sind in praktisch identischer Dichte in den Membranpräparaten nachweisbar. Die Variante und der Wildtyp unterscheiden sich auch nicht in bezug auf die Affinitäten von fünf 5-HT-Rezeptoragonisten und drei 5-HT-Rezeptorantagonisten.

Die stimulierende Potenz von 5-HT auf die [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung an Membranen mit der Arg219Leu-Variante des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors und die inhibitorischen Potenzen der Agonisten 5-HT, Buspiron und Urapidil auf die Forskolin-stimulierte cAMP-Akkumulation in intakten HEK293-Zellen mit der Arg219Leu-Variante liegen um 60-90 % niedriger als in Membranen bzw. Zellen, die den Wildtyprezeptor exprimieren.

Es lässt sich schließen, dass die Arg219Leu-Variante des humanen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors dessen Bindungseigenschaften nicht verändert, aber dass die Expression dieser Variante eine drastische Beeinträchtigung der Signaltransduktion verursacht. Bei Patienten, die diese Variante exprimieren, können Störungen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-vermittelter Funktionen auftreten und die Effekte von Pharmaka wie des Anxiolytikums Buspiron und des Antihypertensivums Urapidil, die über diesen Rezeptor wirken, können abgeschwächt sein.

2. Verglichen mit dem Wildtyp des h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors, ist die Pro391Arg-Variante in gleicher Dichte in den Membranpräparaten nachweisbar. In bezug auf die Affinität von neun repräsentativen Liganden (fünf Agonisten und vier Antagonisten) zu den Rezeptorisoformen bestehen ebenfalls keine Unterschiede zwischen der Variante und dem Wildtyp.

Auch in den funktionellen Eigenschaften der Rezeptoren (elektrophysiologische Experimente) unterscheiden sich die beiden Isoformen nicht, sowohl was die stimulatorische Potenz und intrinsische Aktivität von Agonisten auf den Ionenstrom durch den Kanal betrifft als auch bezüglich der Potenz von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten als Blocker des 5-HT-induzierten Stroms.

Als Schlussfolgerung ergibt sich, dass die Mutation Pro391Arg keinen Einfluß auf pharmakologische und funktionelle Eigenschaften des h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors ausübt und damit auch in vivo keine Auswirkungen auf physiologische 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-vermittelte Funktionen sowie die therapeutischen Effekte von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten hat.

3. **Die Arg344His-Variante des h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors** wird in Membranen von HEK293-Zellen in einer um 44 % gegenüber dem Rezeptorwildtyp verminderten Dichte exprimiert, während sich beide Rezeptorisoformen nicht bezüglich der Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) des Radioliganden unterscheiden. Keine Unterschiede in der Affinität zwischen der Rezeptormutante und dem Wildtyp fanden sich auch in den Radioligand-Kompetitionsexperimenten mit fünf 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten und vier 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten.

Die gegenüber dem Wildtyp reduzierte Expression der Rezeptorvariante spiegelt sich funktionell in einem verminderten durch 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms durch die Rezeptorkanalvariante wider (luminometrische Aequorin-basierte Messung).

Über mögliche Auswirkungen der Arg344His-Mutation der h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoruntereinheit in vivo lässt sich nur spekulieren. Solche Auswirkungen lassen sich mit aller Vorsicht aus der physiologischen und pathogenetischen Bedeutung der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren ableiten. Diese Rezeptoren sind u.a. in den Brechreflex, die Schmerzperzeption, kognitive Leistungen sowie die Modulation verschiedener Transmittersysteme im Gehirn involviert. Es ist nicht auszuschließen, dass die Expression der Arg344His-Variante zu Änderungen der genannten Funktionen beiträgt.

## 6 Anhang

### 6.1 Literaturverzeichnis

Aapro MS. 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists. An overview of their present status and future potential in cancer therapy-induced emesis. *Drugs* 1991; 42: 551-68

Artigas F, Perez V, Alvares E. Pindolol induces a rapid improvement of patients with depression treated with serotonin reuptake inhibitors. *Arch Gen Psychiatry* 1994; 51:248-51

Azmitia EC, Whitaker-Azmitia PM, Kheck N, Gannon P. The cellular localization of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in primate cortex, hippocampus and brainstem neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacology* 1996; 14:35-46

Barann M, Molderings G, Bruss M, Bonisch H, Urban BW, Gothert M. Direct inhibition by cannabinoids of human 5-HT<sub>3A</sub> receptors probable involvement of an allosteric modulatory site. *Br J Pharmacol* 2002; 137:589-96

Barnes JM, Costall B, Coughlan J, Domeney AM, Gerrard PA, Kelly ME, Naylor RJ, Onaivi ES, Tomkins DM, Tyers MB. The effects of ondansetron, a 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, on cognition in rodents and primates. *Pharmacol Biochem Behav* 1990; 35:955-62

Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 1999;38:1083-1152

Belelli D, Balcarek JM, Hope AG, Peters JA, Lambert JJ, Blackburn TP. Cloning and functional expression of a human 5-hydroxytryptamine type 3As receptor subunit. *Mol Pharmacol* 1995; 48:1054-62

Bianchi C, Siniscalchi A, Beani L. 5-HT<sub>1A</sub> agonists increase and 5-HT<sub>3</sub> agonists decrease acetylcholine efflux from the cerebral cortex of freely-moving guinea-pigs. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 448-52

Blandina P, Goldfarb J, Craddock-Poyal B, Green JP. Release of endogenous dopamine

by stimulation of 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptors in rat striatum. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 251:803-9

Blandina P, Goldfarb J, Walcott J, Green JP. Serotonergic modulation of the release of endogenous norepinephrine from rat hypothalamic slices. *J Pharmacol Exp Ther*; 256:341-47

Blier P, Bergeron R. Effectiveness of pindolol with selected antidepressant drugs in the treatment of major depression. *J Clin Psychopharmacol* 1995; 15:217-22

Blower PR. The role of specific 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonism in the control of cytostatic drug-induced emesis. *Eur J Cancer* 1990; 26: 8-11

Boddeke HWGM, Fargin A, Raymond JP, Schoeffer P, Hoyer D. Agonist/Antagonist interactions with cloned human 5-HT<sub>1A</sub> receptors: variations in intrinsic activity studied in transfected HeLa cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1992; 345:257-63

Bradford M A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254

Brown AM, Hope AG, Lambert JJ, Peters JA. Ion permeation and conduction in a human recombinant 5-HT<sub>3</sub> receptor subunit (h5-HT<sub>3A</sub>). *J Physiol* 1998; 507:653-65

Brüss M and Bönisch H Anticancer therapy-induced emesis: existence of an intestinal subtype of the 5-HT<sub>3</sub> receptor? *Gastroenterologie* 1998; 115: 1606-7

Brüss M, Bühlen M, Erdmann J, Göthert M, Bönisch H. Binding properties of the naturally occurring human 5-HT<sub>1A</sub> receptor variant with the Ile28Val substitution in the extracellular domain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1995; 352:455-58

Burstein ES, Spalding TA, Hill-Eubanks D, Brann MR. Structure-function of muscarinic receptor coupling to G proteins. *J Biol Chem* 1995; 270:3141-46

Campbell AD, Kohl RR, McBride WJ. Serotonin-3 receptor and ethanol-stimulated somatodendritic dopamine release. *Alcohol* 1996; 13:569-74

Chen NH, Reith ME. Monoamine interactions measured by microdialysis in the ventral tegmental area of rats treated systemically with (+/-)-8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin. *J Neurochem* 1995; 64:1585-97

Cnanda PK, Minchin MCW, Davis AR, Greenberg L, Reilly Y, McGregor WH, Bhat R, Lubbeck MD, Mizutani S, Hung PP. Identification of residues important for ligand binding to the human 5-hydroxytryptamine <sub>1A</sub> serotonin receptor. *Mol Pharmacol* 1993; 43: 516-20

Consolo S, Bertorelli R, Russi G, Zampbelli M, Ladinsky H. Serotonergic facilitation of acetylcholine release in vivo from rat dorsal Hippocampus via serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptors. *J Neurochem* 1994; 62:2254-61

Consolo S, Rampioni S, Ladinski H, Baldi G. A critical role for D1 receptors in the 5-HT<sub>1A</sub>-mediated facilitation of in vivo acetylcholine release in rat frontal cortex. *Brain Res* 1996; 707:320-3

Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Oakley NR, Onaivi ES, Tyers MB. The effects of ondansetron (GR38032F) in rats and mice treated subchronically with diazepam. *Pharmacol Biochem Behav* 1989; 34:769-78

Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Onaivi ES, Tyers MB. Sites of action of ondansetron to inhibit withdrawal from drug of abuse. *Pharmacol Biochem Behav* 1990; 36:97-104

Costall B, Naylor RJ. Anxiolytic potential of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists. *Pharmacol Toxicol* 1992; 70:157-62

Costall B, Domeney AM, Kelly ME, Tomkins DM, Naylor RJ, Wong EH, Smith WL, Whiting RL, Eglen RM. The effect of the 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, RS-42358-197, in animal models of anxiety. *Eur J Pharmacol* 1993; 234:91-9

Costall B, Domeney AM, Kelly ME, Naylor RJ. The effects of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists in models of dependency and withdrawal. *Alcohol Alcohol Suppl* 1993; 2:269-73

Gross C, Zhuang XX, Stark K, Ramboz S, Oosting R, Kirby L, Santarelli L, Beck S, Hen R. Serotonin<sub>1A</sub> receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* 2002; 416:396-400

Dahlof CG, Hargreaves RJ. Pathophysiology and pharmacology of migraine. Is there a place for antiemetics in future treatment strategies? *Cephalalgia* 1998; 18:593-604

Dahlström A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand.* 1964; 62, Suppl 232:1-55

Dang H, England PM, Fariar SS, Dougherty DA, Lester HA. Probing the role of a conserved m1 proline residue in 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptor gating. *Mol Pharmacol* 2000; 57:1114-1122

Davies PA, Pistis M, Hanna MC, Peters JA, Lambert JJ, Hales TG. The 5-HT<sub>3B</sub> subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* 1999; 397:359-63

Della Rossa GJ, Mukhin YV, Garnovskaya MN, Daaka Y, Clark GJ, Luttrell LM, Lefkowitz RJ, Raymond JR. Serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor-mediated Erk activation requires calcium/calmodulin-dependent receptor endocytosis. *J Biol Chem* 1999; 274: 4749-53

Del Tredici AL, Schiffler HH, Burstein ES, Lameh J, Mohell N, Hacksell U, Brann MR, Weiner DM. Pharmacology of polymorphic variants of the human 5-HT<sub>1A</sub> receptor. *Biochem Pharmacol* 2004; 67:479-90

Deane MC and Lummis SCR. The role and predicted propensity of conserved proline residues in the 5-HT<sub>3</sub> receptor. *J Biol Chem* 2001; 276:37962-66

Derkach V, Surprenant A, North RA. 5-HT<sub>3</sub> receptors are membrane ion channels. *Nature* 1989; 339:706-709

Domeney AM, Costall B, Gerrard PA, Jones DN, Naylor RJ, Tyers MB. The effect of ondansetron on cognitive performance in the marmoset. *Pharmacol Biochem Behav* 1991; 38:169-75

Done CJ, Sharp T. Biochemical evidence for the regulation of central noradrenergic activity by 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors: microdialysis studies in the awake and anaesthetized rat. *Neuropharmacology* 1991; 33: 411-21

Doupnik CA, Dawidson N, Lester HA, Kofuji P. RGS proteins reconstitute the rapid gating kinetics of Gbetagamma-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94:10461-6

Dourish CT, Hutson PH, Curzon G. Characteristics of feeding induced by the serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT). *Brain Res Bull* 1985; 15:377-84

Downie DL, Hope AG, Lambert JJ, Peters JA, Blackburn TP, Jones BJ. Pharmacological characterization of the apparent splice variant of the murine 5-HT<sub>3A</sub> subunit expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Neuropharmacology* 1994; 33:473-82

Dubin AE, Huvar R, D'Andrea MR, Pyati J, Zhu JY, Joy KC, Wilson SJ, Galindo JE, Glass CA, Luo L, Jackson MR, Lovenberg TW, Erlander MG. The pharmacological and functional characteristics of the serotonin 5-HT<sub>3A</sub> receptor are specifically modified by a 5-HT<sub>3B</sub> receptor subunit. *J Biol Chem* 1999; 274:307999-810

Erdmann J, Shimron-Abarbanell D, Cichon S, Albus M, Maier W, Lichtermann D, Minges J, Reuner U, Franzek E, Ertl MA, et al. Systematic screening for mutations in the promoter and coding region of the 5-HT<sub>1A</sub> gene. *Am J Med Genet* 1995; 60:393-9

Fargin A, Raymond JR, Regan JW, Cotecchia S, Lefkowitz RJ, Caron MG. Effector coupling mechanism of the cloned 5-HT<sub>1A</sub> receptor. *J Biol Chem* 1989; 264: 14848-52

Forth W, Henschler D, Rummel W, Försterman U, Starke K. (Hrsg) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban & Fischer Verlag, 2001.

Giordano J. Antinociceptive effects of intrathecally administered 2-methylserotonin in the developing rats. *Brain Res Dev Brain Res*. 1997; 98:142-4

Giordano J, Daleo C, Sacks SM. Topical ondansetron attenuates nociceptive and inflammatory effects of intradermal capsaicin in humans. *Eur J Pharmacol* 1998; 354:13-4

Giordano J, Dyche J. Differential analgesic actions of serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists in the mouse. *Neuropharmacology* 1989; 28:423-7

Giovannini MG, Ceccarelli I, Molinari B, Cecchi M, Goldfarb J, Blandina P. Serotonergic modulation of Acetylcholine release from Cortex of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 285:1219-1225

Glaum SR, Proudfit HK, Anderson EG. Reversal of the antinociceptive effects of intrathecally administered serotonin in the rat by selective 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist. *Neurosci Lett*. 1988; 95:313-7

Glaum SR, Proudfit HK, Anderson EG. 5-HT<sub>3</sub> receptors modulate spinal nociceptive reflexes. *Brain Res* 1990; 510:12-6

Göthert M, Propping P, Bönisch H, Brüss M, Nöthen MM. Genetic variation in human 5-HT receptors: potential pathogenetic and pharmacological role. *Ann NY Acad Sci* 1998; 861:26-30.

Grant KA. The role of 5-HT<sub>3</sub> receptors in drug dependence. *Drug Alcohol Depend* 1995; 38:155-71

Green AR, Grahame-Smith DG. (-)-Propranolol inhibits the behavioural responses of rats to increased 5-hydroxytryptamine in the central nervous system. *Nature* 1976; 262:594-6

Green AR, Heal DJ, Goodwin GM. The effects of electroconvulsive therapy and antidepressant drugs on monoamine receptors in rodent brain-similarities and differences. *Ciba Found Symp*. 1986; 123:246-67

Green SA, Ligett SB. A proline-rich region of the third intracellular loop imparts phenotypic beta 1- versus beta 2-adrenergic receptor coupling and sequestration. *J Biol Chem* 1994; 269:26215-9

Green T, Stauffer KA, Lummis SC. Expression of recombinant homo-oligomeric 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptors provides new insights into their maturation and structure. *J Biol Chem* 1995; 270:6056-61

Greenshaw AJ. Behavioral pharmacology of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists: a critical update on therapeutic potential. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14:265-70

Guan XM, Peroutka SJ, Kobilka BK. Identification of a single amino acid residue responsible for the binding of a class of beta-adrenergic receptor antagonists to 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptors. *Mol Pharmacol* 1992; 41: 695-8

Hagan RM, Kilpatrick GJ, Tyers MB. Interactions between 5-HT<sub>3</sub> receptors and cerebral dopamine function: implications for the treatment of schizophrenia and psychoactive substance abuse. *Psychopharmacology* 1993; 112:68-75

Haj-Dahmane S, Hamon M, Lanfumey L. K<sup>+</sup> channel and 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> autoreceptor interactions in the rat dorsal nucleus: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience* 41:495-505

Hamon M, Gozlan H, El Mestikawy S, Emerit MB, Bola-os F, Schechter L. The central 5-HT<sub>1A</sub> receptors: pharmacological, biochemical, functional and regulatory properties. *Ann NY Acad Sci* 1990; 600:114-31

Harada S, Okubo T, Tsutsumi M, Takase S, Muramatsu T. Investigation of genetic risk factors associated with alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20:293A-296A

Harrel AV, Allan AM. Improvements in hippocampal-dependent learning and decremental attention in 5-HT<sub>3</sub> receptor overexpressing mice. *Learning & Memory* 2003; 10:410-19

Heisler LK, Chu H-M, Brennan TJ, Danao JA, Bajwa P, Parsons LH, Tecott LH. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor mutant mice. *Neurobiology* 1998; 95: 15049-15054

Hasler WL. Serotonin receptor physiology: relation to emesis. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 108-

113

Hjorth S, Carlsson A, Lindberg P, Sanchez D, Wirkström H, Arvidsson L-E, Hacksell U, Nilsson JLG. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin. 8-OH-DPAT, a potent and selective simplified ergot congener with central 5-HT-receptor stimulating activity. *J Neural Transm* 1982;55:169-188

Hope AG, Downie DL, Sutherland L, Lambert JJ, Peters JA, Burchell B. Cloning and functional expression of an apparent splice variant of the murine 5-HT<sub>3</sub> receptor A subunit. *Eur J Pharmacol* 1993; 245:187-92

Ho BY, Karschin A, Ranchek T, Davidson N, Lester HA. The role of conserved aspartate and serine residues in ligand binding and function of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor : a site directed mutation study. *FEBS Lett* 1992; 312:259-62

Hui SC, Sevilla EL, Ogle CW. 5-HT<sub>3</sub> antagonists reduce morphine self-administration in rats. *Br J Pharmacol* 1993; 110:1341-6

Isenberg KE, Ukhun IA, Holstad SG, Jafri S, Uchida U, Zorumski CF, Yang J. Partial cDNA cloning and NGF regulation of rat 5-HT<sub>3</sub> receptor subunit. *Neuroreport* 1993; 5: 121-4

Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.* 1992; 72:165-229

Jackson MB and Yakel JL. The 5-HT<sub>3</sub> receptor channel. *Annu Rev Physiol* 1995; 57:447-68

Jones BJ, Costall B, Domeney AM, Kelly ME, Naylor RJ, Oakley NR, Tyers MB. The potential anxiolytic activity of GR38032F, a 5-HT<sub>3</sub>-receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 1988; 93: 985-93

Kawanishi Y, Harada S, Tachikawa H, Okubo T, Shiraishi H. Novel mutations in the promoter and coding region of the h5-HT<sub>1A</sub> receptor gene and association analysis in schizophrenia. *Am J Med Genet* 1998; 81: 434-9

Kelley SP, Bratt AM, Hodge CW. Targeted gene deletion of the 5-HT<sub>3A</sub> receptor subunit produces an anxiolytic phenotype in mice. *Eur J Pharmacol* 2003; 461:19-25

Kia HK, Brisorgueil MJ, Hamon M, Calas A, Verge D . Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine <sub>1A</sub> receptors in the rat brain. *J Neurosci Res* 1996; 46 :697-708

Kobilka BK, Frielle T, Collins S, Yang-Feng T, Kobilka TS, Francke U, Lefkowitz RJ, Caron MG. An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature* 1987; 329: 75-9

Kobilka BK, Kobilka TS, Daniel K, Regan JW, Caron MG, Lefkowitz . Chimeric alpha 2-, beta 2-adrenergic receptors: delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity. *Science* 1988; 240:1310-6.

Kurzwelly D, Barann M, Kostanian A, Combrink S, Bonisch H, Gothert M, Bruss M. Pharmacological and electrophysiological properties of the naturally occurring Pro391Arg variant of the human 5-HT<sub>3A</sub> receptor *Pharmacogenetics* 2004; 14:165-172

Lam S, Shen Y, Nguyen T, Messier TL, Brann M, Comings D, George SR, O'Dowd BF. A serotonin receptor gene (5HT<sub>1A</sub>) variant found in a Tourette`s syndrome patient. *Biochem Biophys Rs Commun* 1996; 219:853-8

Lanfumeu L, Hamon M. Central 5-HT<sub>(1A)</sub> receptors: regional distribution and functional characteristics. *Nucl Med Biol* 2000; 27: 429-35

Lankiewicz S, Lobitz N, Wetzel CH, Rupprecht R, Gisselmann G, Hatt H. Molecular cloning, functional expression, and pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptor cDNA and its splice variants from guinea pig. *Mol Pharmacol* 1998; 53: 202-12

Laporte AM, Koscielniak T, Ponchant M, Verge D, Hamon M, Gozlan H. Quantitative autoradiographic mapping of 5-HT<sub>3</sub> receptors in the rat CNS using (3H)zacopride as radioligands. *Synapse* 1992; 10: 271-81

Lauder JM. Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 600:297-313

Lauder JM, Krebs H. Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis. *Dev Neurosci* 1978; 1:15-30

Lauder JM, Wallace JA, Krebs H. Roles for serotonin in neuroembryogenesis. *Adv Exp Med Biol* 1981; 133:477-506

Lehoczky O. About the antiemetic effectivity of granisetron in chemotherapy-induced acute emesis: a comparison of results with intravenous und oral dosing. *Neoplasma* 1999; 46: 73-9

Lucki I. 5-HT<sub>1</sub> receptors and behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 1992; 16: 83-93

MacArthur MW, Thornton JM. Influence of proline residues on protein conformation. *J Mol Biol* 1991; 218:397-412

Marcinkiewicz M, Verge D, Gozlan H, Pichat L, Hamon M. Autoradiographic evidence for the heterogeneity of 5-HT<sub>1</sub> sites in the rat brain. *Brain Res* 1984; 291: 159-63

Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D. Primary structure and functional expression of the 5-HT<sub>3</sub> receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 1991; 254:432-37

Matsumoto M, Yoshioka M, Togashi H, Toshihara M, Ikeda T, Saito H. Modulation of norepinephrine release by serotonergic receptors in the rat hippocampus as measured by in vivo microdialysis. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272:1044-51

Mazer C, Muneyyirci J, Taheny K, Raio N, Borella A, Whitaker-Azmitia P. Serotonin depletion during synaptogenesis lead to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: a possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. *Brain Res* 1997; 760:68-73

McMahon LL, Kauer JA. Hippocampal interneurons are excited via serotonin-gated ion

channels. *J Neurophysiol* 1997; 78:2493-502

McKernan RM, Gillard NP, Quirk K, Kneen CO, Stevenson GI, Swain CJ, Ragan CI. Purification of the 5-hydroxytryptamine 5-HT<sub>3</sub> receptor from NCB20 cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 13572-7

Melke J, Westberg L, Nilsson S, Landen M, Soderstrom H, Bagahaei F, Rosmond R, Holm G, Bjornorp P, Nilsson LG, Adolfsson R, Eriksson E. A polymorphism in the serotonin receptor 3A (HTR3A) gene and its association with harm avoidance in women. *Arch Gen Psychiatry* 2003; 60:1017-23

Messier TL, Dorman CM, Brauner-Osborne H, Eubanks D, Brann MR. High throughput assays of cloned adrenergic, muscarinic, neurokinin and neurotrophin receptors in living mammalian cells. *Pharmacol Toxicol* 1995; 76: 308-11

Miquel MC, Emerit MB, Gingrich JA, Nosjean A, Hamon M, El Mestikawy S. Developmental changes in the differential expression of two serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptor splice variants in the rat. *J Neurochem* 1995; 65: 475-83

Millan MJ, Bertvoets K, Colpaert FC. 5-hydroxytryptamine (5-HT)<sub>1A</sub> receptors and the tail-flick response. 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin Hbr-induced spontaneous tail-flicks in the rat as in vivo model of 5-HT<sub>1A</sub> receptor-mediated activity. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 256:973-82

Millan MJ. Improving the treatment of schizophrenia: focus on serotonin (5-HT)<sub>(1A)</sub> receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295:853-61.

Millan MJ and Colpaert FC 5-Hydroxytryptamine(HT)<sub>1A</sub> receptors and the tail-flick response. High efficacy 5-HT<sub>1A</sub> agonists attenuate morphine-induced antinociception in mice in a competitive-like manner. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 256:983-92

Miquel MC, Doucet E, Riad M, Adrien J, Verge D, Hamon M. Effect of the selective lesion of serotonergic neurons on the regional distribution of 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA in the rat brain. *Mol Brain Res* 1992; 14: 357-362

Miyake A, Mochizuki S, Takemoto Y, Akuzawa S. Molecular cloning of human 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptor: heterogeneity in distribution and function among species. *Mol Pharmacol* 1995; 48: 407-16

Morales M and Wang SD. Differential composition of 5-Hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptors synthesized in the rat CNS and peripheral nervous system. *J Neurosci* 2002; 22:6732-41

Moran PM, Moser PC. MDL73,147EF, a 5-HT<sub>3</sub> antagonist, facilitates latent inhibition in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1992; 42:519-22

Moser PC. The effect of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists on the writhing response in mice. *Gen Pharmacol* 1995; 26:1301-6

Mukerji J, Haghghi A, Seguela P. Immunological characterization and transmembrane topology of 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptors by functional epitope tagging. *J Neurochem* 1996; 66:1027-32

Nakhai B, Nielsen DA, Linnoila M, Coldman D. Two naturally occurring amino acid substitutions in the human 5-HT<sub>1A</sub> receptor: glycine 22 to serine 22 and isoleucine 28 to valine 28. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210:530-536

Nayak SV, Ronde P, Spier AD, Lummis SC, Nichols RA. Calcium changes induced by presynaptic 5-hydroxytryptamine-3 serotonin receptors on isolated terminals from various regions of the rat brain. *Neuroscience* 1999; 91:107-17

Niemeyer MI and Lummis SCR. Different efficacy of specific agonists at 5-HT<sub>3</sub> receptor splice variants: the role of extra six amino acid segment. *Br J Pharmacol* 1998; 123:661-6

Niesler B, Weiss B, Fischer C, Nöten M, Propping P, Bondy B, Rietschel M, Maier W, Albus M, Franzek E, Rappold G. Serotonin receptor gene HTR<sub>3A</sub> variants in schizophrenic and bipolar affective patients. *Pharmacogenetics* 2000; 10:1-7

Niesler B, Flohr T, Nothen MM, Fischer C, Rietschel M, Franzek E, Albus M, Propping P, Rappold GA. Association between the 5'UTP variant C178T of the serotonin receptor gene HTR<sub>3A</sub> and bipolar affective disorder. *Pharmacogenetics* 2001; 11:471-5

- Oleskevich S.  $G_{\alpha o1}$  decapeptide modulates the hippocampal 5-HT<sub>1A</sub> potassium current. *J Neurophysiol* 1995; 74:2189-93
- Ortells MO and Lunt GG. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci* 1995; 18:121-7
- Ostrowski J, Kjelsberg MA, Caron MG, Lefkowitz RJ. Mutagenesis of the beta 2-adrenergic receptor: how structure elucidates function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992; 32:167-83
- Parker RM, Bentley KR, Barnes NM. Allosteric modulation of 5-HT<sub>3</sub> receptors: focus on alcohols and anaesthetic agents. *Trends Pharmacol Sci* 1996; 17:95-9
- Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M. Increased anxiety of mice lacking the serotonin<sub>1A</sub> receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 10734-9
- Pazos A, Palacios M. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res* 1985; 346:205-230
- Perez EA, Tiemeier T, Solberg LA. Antiemetic therapy for high-dose chemotherapy with transplantation: report of a retrospective analysis of a 5-HT<sub>(3)</sub> regimen and literature review. *Support Care Cancer* 1999; 7: 413-24
- Peroutka SJ, Howell TA. The molecular evolution of G protein-coupled receptors: focus on 5-hydroxytryptamine receptors. *Neuropharmacology* 1994; 33:319-24
- Paudice P and Raiteri M. Cholecystokinin release mediated by 5-HT<sub>3</sub> receptors in rat cerebral cortex and nucleus accumbens. *Br J Pharmacol* 1991; 103:1790-4
- Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci* 1992;12:440-453
- Radja F, Daval G, Hamon M, Verge D. Pharmacological and physicochemical properties

of pre-versus postsynaptic 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor binding sites in the rat brain: a quantitative autoradiographic study. *J neurochem* 1992; 58:1338-46

Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, Blier P, Mendelsohn M, Mann JJ, Brunner D, Hen R. Serotonin receptor <sub>1A</sub> knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95:14476-81.

Rapport MM, Green AA, Page IH. Crystalline serotonin *Science* 1948; 108:329-330

Raymond JR, Alberts FJ, Middleton JP. Functional expression of human 5-HT<sub>1A</sub> receptors and differential coupling to second messengers in CHO cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1992; 346:127-137

Raymond JR, Olsen CL, Gettys TW. Cell-specific physical and functional coupling of human 5-HT<sub>1A</sub> receptors to inhibitory G protein alpha-subunits and lack of coupling to Gs alpha. *Biochemistry* 1993; 32: 11064-73

Raymond JR, Mukhin YV, Gettys TW, Garnovskaya MN. The recombinant 5-HT<sub>1A</sub> receptor: G protein coupling and signalling pathways. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 1751-64

Reznic J, Staubli U. Effects of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonism on hippocampal cellular activity in the freely moving rat. *J Neurophysiol* 1997; 77:517-21

Role LW, Kelly JP (1991). The Brain Stem: Cranial Nerve Nuclei and the Monoaminergic Systems. In: Kandel ER, Schwartz J, Jessell (Eds.) *Principles of neural science*. Prentice-Hall International Inc. East Norwalk, USA. pp. 693-699

Ropert N, Guy N. Serotonin facilitates GABAergic transmission in the CA1 region of rat hippocampus in vitro. *J Physiol* 1991; 441:121-36

Rotondo A, Nielsen DA, Nakhai B, Hulihan-Giblin B, Bolos A, Goldman D. Agonist-promoted down-regulation and functional desensitization in two naturally occurring variants of the human serotonin <sub>1A</sub> receptor. *Neuropsychopharmacology* 1997; 17:18-26.

Rubenstein JLR. Development of Serotonergic Neurons and Their Projections. *Biol.*

Psychiatry 1998; 44:145-150

Saria A, Javorsky F, Humpel C, Gamse R. 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists inhibit sensory neuropeptide release from the rat spinal cord. *Neuroreport* 1990; 1:104-6

Sellers EM, Toneatto T, Romach MK, Somer GR, Sobell LC, Sobell MB. Clinical efficacy of the 5-HT<sub>3</sub> antagonist ondansetron in alcohol abuse and dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 1994; 18:879-85

Shemer AV, Azmitia EC, Whitaker-Azmitia PM. Dose-related effects of prenatal 5-methoxytryptamine (5-MT) on development of serotonin terminal density and behavior. *Brain Res Dev Brain Res* 1991; 18:59-63

Spier AD, Wotherspoon G, Nayak SV, Nichols RA, Priestley JV, Lummis SC. Antibodies against the extracellular domain of the 5-HT<sub>3</sub> receptor label both native and recombinant receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 67:221-230

Staubli U, Xu FB. Effects of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonism on hippocampal theta rhythm, memory, and LTP induction in the freely moving rat. *J Neurosci* 1995; 15:2445-52

Strader CD, Sigal IS, Dixon RA. Structural basis of beta-adrenergic receptor function. *FASEB J* 1989; 3:1825-32

Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RA. Structure and function of G-protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem* 1994; 63:101-32

Suzuki M, Matsuda T, Asano S, Somboonthum P, Takuma K, Baba A. Increase of noradrenaline release in the hypothalamus of freely moving rat by postsynaptic 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor activation. *Br J Pharmacol* 1995; 115: 703-11

Svensson L, Fahlke C, Hard E, Engel JA. Involvement of the serotonergic system in ethanol intake in the rat. *Alcohol* 1993; 10: 219-24

Tancer ME, Uhde TW. Role of serotonin drugs in the treatment of social phobia. *J Clin Psychiatry* 1997; 58:50-4

Taylor DP, Moon SL. Buspirone and related compounds as alternative anxiolytics. *Neuropeptides* 1991; 19:15-9.

Van Hooft JA, Vijverberg hP. Phosphorylation controls conductance of 5-HT<sub>3</sub> receptor ligand-gated ion channels. *Receptors Channels* 1995; 3:7-12

Varrault A, Le Nguyen D, McClue S, Harris B, Jouin P, Bockaert J. 5-Hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor synthetic peptides. Mechanisms of adenyl cyclase inhibition. *J Biol Chem* 1994; 269: 16720-5

Verge D, Daval G, Patey A, Gozlan H, el Mestikawy S, Hamon M. Presynaptic 5-HT auto-receptors on serotonergic cell bodies and/or dendrites but not terminals are of the 5-HT<sub>1A</sub> subtype. *Eur J Pharmacol* 1985; 113:463-464

Verge D, Daval G, Marcinkiewicz M, Patey A, el Mestikawy S, Gozlan H, Hamon M. Quantitative autoradiography of multiple 5-HT<sub>1</sub> receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *J Neurosci* 1986; 6: 3474-82

Viner CV, Selby PJ, Zulian GB, Gore MF, Butcher ME, Wootton CM, McElwain TJ. Ondansetron- a new safe and effective antiemetic in patients receiving high-dose melphalan. *Cancer Chemother Pharmacol* 1990; 25; 449-53

Weiss B, Mertz A, Schrock E, Koenen M, Rappold G. Assignment of a human homolog of the mouse HT<sub>3</sub> receptor gene to chromosome 11q23.1-q23.2. *Genomics* 1995; 29: 304-5

Whitaker-Azmitia PM. Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: basis for developmental pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 553-61

Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC. Autoregulation of fetalserotonergic neuronal development: role of high affinity serotonin receptors. *Neurosci Lett* 1986; 67: 307-12

Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC. Astroglial 5-HT<sub>1A</sub> receptors and s-100 beta in development and plasticity. *Perspect Dev Neurobiol* 1994; 2:233-8

---

Wilkinson Lo, Middlemiss dN, Hutson PH. 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation increases hippocampal acetylcholine efflux and motor activity in the guinea pig: agonist efficacy influences functional activity in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270:656-64

## Eigene Veröffentlichungen

\*Brüss M, \*Kostanian A, Bönisch H, Göthert M. The naturally occurring Arg<sup>219</sup>Leu variant of the human 5-HT<sub>1A</sub> receptor: impairment of signal transduction. *Pharmacogenetics and Genomics* 2005; 15(4): 257-264

\* geteilte Autorschaft

Kurzwelly D, Barann M, Kostanian A, Combrink S, Bönisch H, Göthert M, Brüss M. Pharmacological and electrophysiological properties of the naturally occurring Pro<sup>391</sup>Arg variant of the human 5-HT<sub>3A</sub> receptor. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 165-172

Brüss M, Kiel S, Bönisch H, Kostanian A, Göthert M. Decreased agonist, but not antagonist, binding to the naturally occurring Thr92Lys variant of the h5-HT<sub>7A</sub> receptor. *Neurochem Int.* 2005; 47(3):196-203.

Brüss M, Kurzwelly D, Kostanian A, Bönisch H, Göthert M, Barann M. Functional characterization of the naturally occurring P-391-R h5-HT<sub>3A</sub>-receptor variant. XIVth World Congress of Pharmacology, San Francisco, July 7-12, 2002; *Pharmacologist* 2002; 44: A125

Göthert M, Brüss M, Kurzwelly D, Kostanian A, Barann M, Bönisch H. Pharmacological and functional characteristics of naturally occurring 5-HT receptor variants. Fifth IUPHAR Satellite Meeting on Serotonin, Acapulco, Mexico, July 3-5, 2002; Abstract Book S8.4

Kostanian A, Bönisch H, Göthert M, Brüss M. Loss of function of the naturally occurring Arg219Leu variant of the human 5-HT<sub>1A</sub> receptor. Gemeinsame Herbstagung der GBM und DGPT, Halle, Sept. 7-10 2002; Abstract Viewer 4.5

Kostanian A, Göthert M, Bönisch H, Brüss M. Loss of function of the naturally occurring Arg219Leu variant of the human 5-HT<sub>1A</sub> receptor. International Neuroscience Symposium, Bonn, Feb 20-21, 2003; Poster Presentation P20

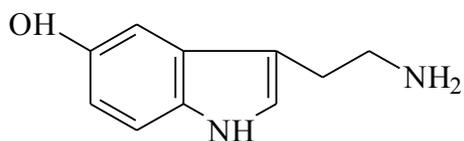
Göthert M, Kostanian A, Bönisch H, Brüss M. Severe restriction of signal transduction properties of naturally occurring Arg219Leu variant of the human 5-HT<sub>1A</sub> receptor. Annual

Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans Nov 8-12, 2003; SFN Abstract Viewer 576.6

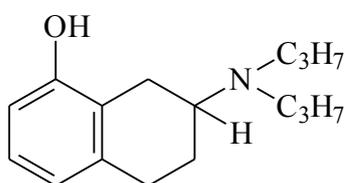
Combrink S, Kostanian A, Barann M, Bönisch H, Göthert M, Brüss M. Functional characterization of the naturally occurring arg<sup>344</sup>his variant of the human 5-HT<sub>3A</sub> receptor. Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, Oct 23-27, 2004; SFN Abstract Viewer 626.6

Combrink S, Kostanian A, Barann M, Bönisch H, Göthert M, Brüss M. Pharmacological investigation of the arg<sup>344</sup>his variant of the human 5-HT<sub>3A</sub> receptor by radioligand-binding and aequorin-based calcium-influx measurement. 46. Frühjahrstagung der DGPT, Mainz March 15-17, 2005, Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 2005; 371 Suppl 1: R30

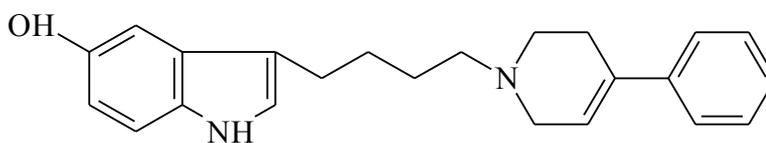
## 6.2 Strukturformeln der Serotonin-Rezeptor-Liganden



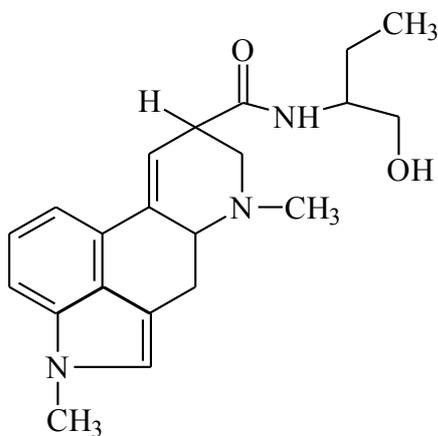
**5-HT**



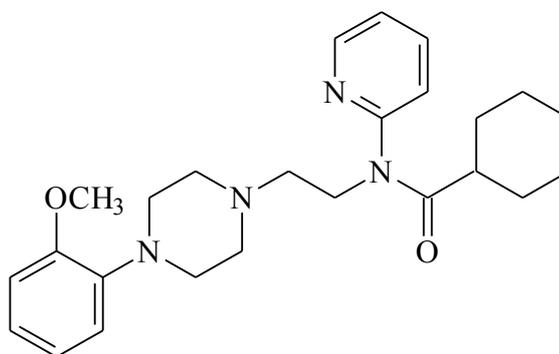
**8-OH-DPAT**



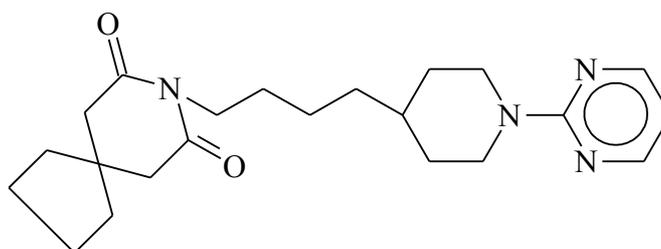
**Roxindol**



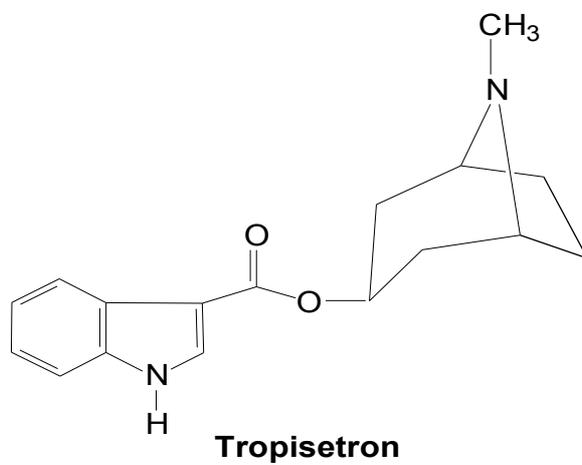
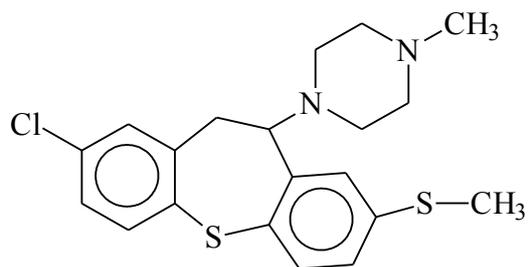
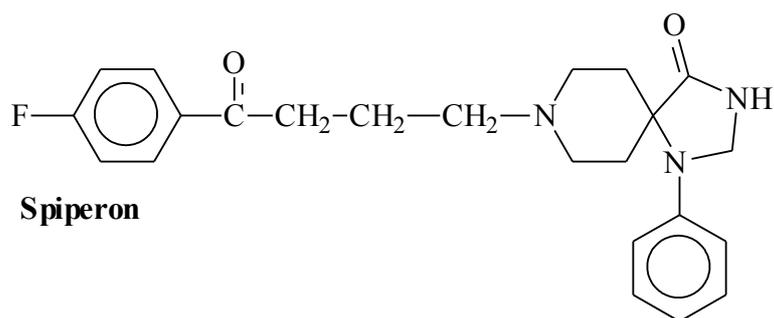
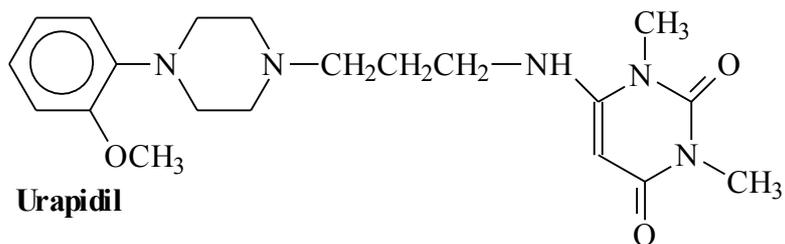
**Methylsergid**

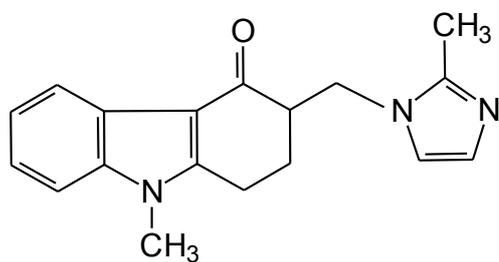
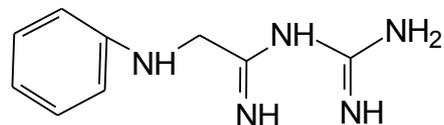
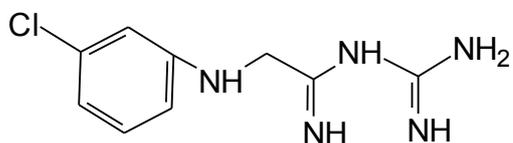
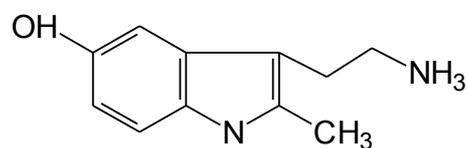
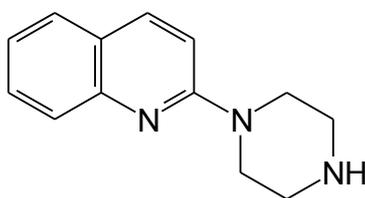
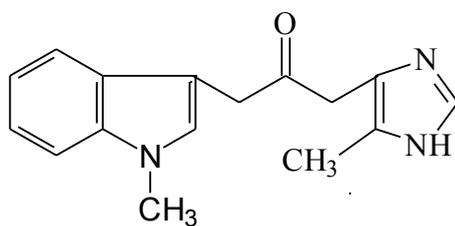


**WAY100635**



**Buspiron**



**Ondansetron****Phenylbiguanid****m-Clorphenylbiguanid****2Me-5-HT****Quipazin****GR 65630**

### 6.3 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Ach	Acetylcholin
Aqua dest.	Destilliertes Wasser (Aqua destillata)
Ala	Alanin
APS	Ammoniumperoxidisulfat
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosin-5`-Triphosphat
BBS	BES gepufferte Salzlösung (BES buffered saline)
BES	2[bis(2-Hydroxyethyl)amino]-ethanesulfonic acid
B <sub>max</sub>	Maximale Rezeptorbindung
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
C	Cytosin
CA	Ammonshorn (Cornu ammonis)
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat (cyclic adenosine monophosphate)
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
Ci	Curie
COS	Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze
CSS	Kontrollierte Salzlösung (controlled salt solution)
Cys	Cystein
ddNTP	Didesoxynucleotid-5`-triphosphat
dATP	Desoxyadenosin-5`-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5`-triphosphat
dGTP	Desoxyguanin-5`-triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleotid-5`-triphosphat
dpm	radioaktive Zerfälle pro Minute (decays per minute)
EC <sub>50</sub>	Konzentration, die den halbmaximalen Effekt hervorruft
E.coli	Escherichia coli
ECS	Extracellular solution

---

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis (aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
et.al.	und andere (et alii)
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
G	Guanin
G418	Geneticin
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GDP	Guanosindiphosphat
GF/B	Glasfaserfilter der Größe B
Gly	Glycin
G-Protein	Guanylnukleotid bindendes Protein
GR65630	(3-(5-Methyl-1H-Imidazol-4-yl)-1-(1-Methyl-1H-Indol-3-yl)-1-Propanon
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HAM'S	Nutrient Mixture f12
HEK	menschliche embrionale Nierenzellen (human embryonal kidney cells)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
His	Histidin
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthine
IC <sub>50</sub>	halbmaximale inhibitorische Konzentration
Ile	Isoleuzin
kb	Kilobasenpaare
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
LB	Luria Bertoni
Leu	Leuzin
Lys	Lysin
M	Molarität
MAO	Monoaminoxidase
mCPBG	meta-Chlorophenylbiguanid
MDL72222	3-tropanyl-3,5-dichlorobenzoat
2-Me-5-HT	2-Methyl-5-Hydroxytryptamin
mRNA	Botenribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
n	Anzahl unabhängiger Experimente

---

8OH-DPAT	8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PBG	Phenylbiguanid
PKA, PKC	Proteinkinase A, Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pro	Prolin
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
R-SAT	Receptor Selection and Amplification Technology
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
SEM	mittlerer Fehler der Mittelwerte (standard error of the mean)
Ser	Serin
SSRI	Serotonin-Rückaufnahme-Inhibitoren
T	Thymin
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Thr	Threonin
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
Val	Valin
WAY100135	N-tert-butyl-3-4-(2-methoxyphenyl) piperazin-1-yl)-2-phenylpropionamid dihydrochlorid
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 7 Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. M. Göthert, meinem Doktorvater und Institutsleiter für die Überlassung eines interessanten Themas und wertvolle fachliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. K. Mohr danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. H. Bönisch und Herrn PD Dr. M. Brüss danke ich für vielseitigen fachlichen Rat und hilfreiche Unterstützung bei allen durchgeführten Arbeiten.

Allen Mitarbeitern des AK Bönisch danke ich für die freundliche Hilfe bei der Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten.

Frau R. Müller danke ich für die technische Assistenz bei der Kultivierung der Zellen und der Durchführung der Bindungsstudien.

Meiner Vorgängerin Frau S. Kiel danke ich für die vielfältige Unterstützung in der Einarbeitungszeit und viele anregende Gespräche.

Allen Mitarbeitern des Instituts gilt mein besonderer Dank für freundliche und hilfsbereite Arbeitsklima.

Meinem lieben Duschka danke ich dafür, dass er mir bei der Arbeit sehr geholfen hat und sich um unseren Sohn Sascha gekümmert hat, während ich diese Arbeit verfasst habe.