

**Klonierung und pharmakologische Charakterisierung
des humanen 5-HT_{2C}-Rezeptors und seiner
5-HT_{2C}Cys23Ser-Variante**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Folkert Watze Werner Steinhagen
aus Köln

2008

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter : Prof. Dr. rer. nat. H. Bönisch
2. Gutachter : Prof. Dr. med. F. Stüber

Tag der Mündlichen Prüfung: 5.5.2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. A. Pfeifer

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	6
A. Einleitung	11
1. Serotonerges System.....	11
1.1 Serotonerge Neurotransmission	13
2. Serotoninrezeptorfamilie	15
2.1 5-HT ₂ -Rezeptoren.....	18
2.1.1 5-HT _{2C} -Rezeptor.....	19
3. Genetische Variabilität von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.....	22
4. Zielsetzung dieser Arbeit	24
B. Material und Methoden.....	25
1. Materialien.....	25
1.1 Arbeitsgeräte.....	25
1.2 Verbrauchsmaterial.....	26
1.3 Computersoftware und Datenbanken	26
1.4 Kits für die Molekularbiologie	27
1.5 Enzyme	27
1.6 Größenmarker, Vektoren und Nukleinsäuren.....	27
1.7 Chemikalien	27
1.8 Radiochemikalien und Standards	29
1.9 Strukturformeln der Liganden.....	29
1.10 Nährmedien für die Bakterienkultur.....	31
1.11 Puffer und Lösungen.....	31
2. Molekularbiologische Methoden	34
2.1 Isolierung von Plasmid-DNA	34
2.1.1 Plasmid Mini-Päräparation	34
2.1.2 Plasmid Mini-Präparation mit dem „Spin-Miniprep Kit“ (Qiagen)	34

2.1.3 Plasmid Mega-Präparation mit dem „Plasmid Mega Kit“ (Qiagen)	35
2.2 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	35
2.3 Agarose-Gelelektrophorese	36
2.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	36
2.5 cDNA-Synthese	36
2.6 DNA-Reinigung und Fällung	37
2.6.1 DNA-Extraktion mit Phenol/Chloroform	37
2.6.2 Ethanol-fällung von DNA	37
2.6.3 Isopropanol-fällung von DNA	38
2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	38
2.7.1 Auswahl der PCR-Primer	40
2.8 Mycoplasma PCR Primer Set (Stratagene).....	41
2.9 Klonierungstechniken.....	41
2.9.1 Klonierung von PCR-Produkten	41
2.9.2 Enzymatische Spaltung von DNA.....	42
2.9.3 Ligation von DNA-Enden.....	42
2.9.4 Transformation kompetenter Bakterien	43
2.9.5 Anlegen von Bakterien-Dauerkulturen als „Glycerol Stocks“	43
2.10 DNA-Sequenzierung	43
2.11 Gerichtete Mutagenese.....	44
3. Biochemische Methoden	46
3.1 Proteinbestimmung nach Lowry	46
3.2 Membranpräparation.....	46
3.3 Radioligandbindungsstudie	47
3.3.1 Allgemeine theoretische Grundlagen.....	47
3.3.2 Theoretische Grundlagen von Sättigungsexperimenten.....	48
3.3.3 Durchführung der Sättigungsexperimente	50
4. Zellkulturmethoden	52
4.1 Mediumwechsel	52
4.2 Auftauen von Zellen	52
4.3 Teilen von Zellen.....	52

4.4 Einfrieren von Zellen	53
4.5 Umsetzen von Zellkulturen.....	53
4.6 Transiente Transfektion von Zellen.....	53
5. Computerprogramme und Auswertung.....	54
C. Ergebnisse	56
1. Klonierung und molekularbiologische Charakterisierung des humanen 5-HT_{2C}-Rezeptors und seiner 5-HT_{2C}Cys23Ser-Variante.	56
1.1 Amplifikation und Klonierung des 5-HT _{2C} -Rezeptors	56
1.2 Generierung der kodierenden Sequenz der 5-HT _{2C} Cys23Ser-Variante...	63
1.3 Alternative Splicevariante.....	64
1.4 Umklonierung des 5-HT _{2C} -Rezeptors und seiner 5-HT _{2C} Cys23Ser- Variante in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3	64
1.5 Topologisches Modell des 5-HT _{2C} -Rezeptors	67
2. Ergebnisse der biochemisch-pharmakologischen Versuche.....	69
2.1 Sättigungsexperimente mit [³ H]Mesulergin am 5-HT _{2C} -Rezeptor und seiner 5-HT _{2C} Cys23Ser-Variante.....	69
D. Diskussion	73
1. 5-HT_{2C}Cys23Ser-Variante (SNP)	73
2. Alternatives Splicen	80
3. RNA-Editing	82
E. Zusammenfassung	84
F. Literaturverzeichnis	86
Danksagung.....	96

Abkürzungsverzeichnis

Nicht aufgeführt werden international gebräuchliche Einheiten, wie die SI-Einheiten, und die von diesen Einheiten abgeleiteten Maßeinheiten und Potenzen.

A

%	Gewichtsprozent pro Volumen (g / 100 ml)
A	Adenin
ADAR	RNA-abhängige Adenosindeaminase
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure

B

B _{max}	Anzahl der spezifischen Bindungsstellen
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum-Albumin

C

C	Cytosin
cDNA	<i>copy DNA</i>
COMT	Catechol-O-Methyltransferase

D

DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat (dGTP, dATP, dTTP oder dCTP)
DTT	Dithiothreitol
dpm	Zerfälle pro Minute

Abkürzungsverzeichnis

E

ECS	Extrazellulär
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Na-Salz
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)N,N,N',N'-tetraacetat, Na-Salz
ERK	Extrazellulär Signal-regulierte Kinasen
EtOH	Ethanol (absolut)

F

FKS	Fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer

G

G	Guanin
GABA	γ -Aminobuttersäure
GIT	Gastrointestinal
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guanylnukleotid-bindendes Protein

H

HEPES	N'-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIOMT	5-Hydroxyindol-O-Methyltransferase
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)

I

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat

K

kb	Kilobasenpaar
K _D	Gleichgewichtskonstante der Dissoziation
K _m	Michaelis-Konstante

Abkürzungsverzeichnis

KO Knockout

L

lacZ Gen für die β -Galactosidase

LB Luria-Bertani

M

MAO Monoaminoxidase

mRNA messenger-RNA

N

NAC Serotonin-N-Acetyltransferase

NaOAc Natriumacetat

O

ORF Offenes Leseraster („open reading frame“)

P

PBS *Phosphate Buffered Saline*

PCR Polymerase Kettenreaktion

PLA₂ Phospholipase A₂

PLC Phospholipase C

PLD Phospholipase D

PKC Proteinkinase C

P/S Penicillin (100 I.U./ml) / Streptomycin (100 μ g/ml)

R

RNA Ribonukleinsäure

RNase Ribonuklease

RT Raumtemperatur

Abkürzungsverzeichnis

S

SDS	Sodiumdodecylsulfat
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SERT	Serotonin-Transporter
SN	Substantia nigra
SNP	Einzelbasenaustausch („single nucleotide polymorphism“)
SpIV	Splice-Variante
SSNRI	selektiver Serotonin-/Noradrenalin-Rückaufnahme-Inhibitor
SSRI	selektiver Serotonin-Rückaufnahme-Inhibitor

T

T	Thymin
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
T _M	Schmelztemperatur
Tris	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-1,3-propandiol

U

U	<i>unit</i>
UV	Ultraviolett

V

VMAT	vesikulärer Monoamin-Transporter
VTA	Ventrales Tegmentum

X

X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
XIA	X-gal, IPTG, Ampicillin

Abkürzungsverzeichnis

Z

ZNS Zentralnervensystem

A. Einleitung

1. Serotonerges System

Nahezu 60 Jahre sind vergangen seitdem Rapport und Page (1948) das Indolamin 5-Hydroxytryptamin (5-HT) identifiziert haben. Dieses wurde initial nicht im ZNS sondern im Blut isoliert und erhielt die Bezeichnung Serotonin. Bereits seit Mitte des 19. Jahrhunderts war bekannt, dass das Blutserum eine Substanz enthält, die konstriktorisch auf glatte Muskulatur wirkt und somit Einfluss auf den Blutdruck nimmt. Brodie et al. (1955) vermutete, dass 5-HT eine Rolle als Neurotransmitter spielen könnte. Dies war die Geburtsstunde eines der bedeutendsten Forschungszweige in den Neurowissenschaften (Whitaker-Azmitia, 1999).

Serotonin ist eine der ältesten biologisch aktiven Substanzen der Erde. Sie ist bereits bei Avertebraten wie der Meeresschnecke *Aplysia* nachweisbar (Southall et al., 1997). Das Serotonin des ZNS stellt nur etwa 2% des Gesamtserotonins im Körper dar, der restliche Teil ist in der Peripherie vor allem in enterochromaffinen Zellen des Magen-Darm-Trakts, im enterischen Nervensystem und in Thrombozyten und Mastzellen zu finden. Somit unterscheidet man zwischen einer zentralen und einer peripheren Serotonin-Wirkung, die abhängig von den jeweiligen Rezeptoren ist. Zu den peripheren Effekten zählen u.a. die Beteiligung bei Verdauung und Stoffwechsel, die Wirkung auf Herz und Gefäßtonus sowie eine Beteiligung bei der Blutgerinnung. Der Symptomenkomplex eines Serotonin produzierenden Karzinoid-Tumors veranschaulicht eindrücklich diese peripheren Effekte (McCormick, 2002). Zu den zentralen Wirkungen gehören u.a. die Beteiligung an der Steuerung des zirkadianen Rhythmus, des Appetits, der Stimmung, der Angst, des Verhaltens, der Schmerzwahrnehmung, der Temperaturregulation und der endokrinen Funktionen. Somit haben zentrale Störungen im serotonergen System, wie Rezeptorpolymorphismen, eine Vielzahl möglicher pathologischer Konsequenzen.

Über 80% des zentralen Serotonins wird in den Hirnarealen B1 bis B9 gebildet, die bis auf B9 den Raphekernen entspricht. Diese werden in eine kaudale Gruppe (B1-B5), lokalisiert in der Medulla, sowie in eine rostrale Gruppe (B6-B8), lokalisiert in Pons und Mesencephalon, unterteilt. B9 ist Teil des ventrolateralen Tegmentums und wird deshalb

nicht zu den mittelständigen Raphekernen gezählt (Dahlström und Fuxe, 1964). Die Regionen B1 bis B9 sind jeweils mit spezifischen Hirnarealen verbunden. So empfängt z.B. der dorsale Hippocampus seine serotonerge Innervation von B8 (medianer Raphekern). Der dorsale Raphekern (B6 und B7) innerviert das Corpus Striatum, Pallidum und die Amygdala. Ferner bestehen Verschaltungen von serotonergen Bahnen mit dopaminergen Bahnen (Alex und Pehek, 2007; Van Bockstaele et al., 1994) und GABAergen Bahnen (Bubar und Cunningham, 2007), die u.a. so reguliert werden. Ausgangssubstanz der Serotoninsynthese ist die essentielle Aminosäure Tryptophan, die bevorzugt von serotonergen Neuronen aufgenommen wird. Wie in Abbildung 1 ersichtlich, entsteht durch Hydroylierung des Tryptophans 5-Hydroxytryptophan und durch weitere Decarboxylierung Serotonin.

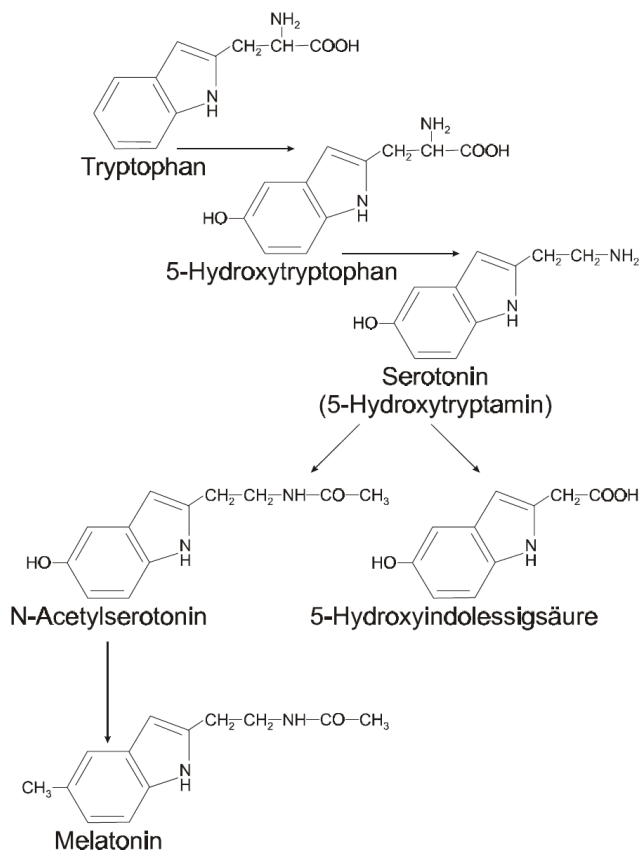


Abbildung 1: Synthese von Serotonin und Melatonin

Die Synthese beginnt mit der essentielle Aminosäure Tryptophan. Der Hauptabbauweg erfolgt in 5-Hydroxyindoleessigsäure. In der Zirbeldrüse entsteht aus Serotonin über einen Zwischenschritt Melatonin.

Das Schrittmacherenzym der 5-HT-Synthese ist die Tryptophanhydroxylase, die den ersten Syntheseschritt katalysiert. Da sie nur in serotoninproduzierenden Zellen vorkommt, ist Ihre Verteilung im ZNS mit der des Serotonins identisch. Tryptophanhydroxylase kann durch Parachlorophenylalanin kompetitiv gehemmt werden. Durch Glukokortikoide hingegen wird die Serotoninsynthese beschleunigt (Hamon et al., 1978). Da die Tryptophanhydroxylase unter physiologischen Bedingungen nicht gesättigt ist, kann die zerebrale Serotoninsynthese durch vermehrte orale Tryptophanzufuhr gesteigert werden.

Die in der Zirbeldrüse vorhandenen Enzyme Serotonin-N-Acetyltransferase (NAC) und 5-Hydroxyindol-O-Methyltransferase (HIOMT) katalysieren die Umwandlung von Serotonin zu Melatonin (siehe Abbildung 1). Des Weiteren erfolgt der Abbau im gesamten Gehirn durch die Monoaminoxidase (MAO) und eine Aldehydoxidase zu 5-Hydroxyindolessigsäure (siehe Abbildung 1), das im Urin nachgewiesen werden kann.

Tryptophan wird überwiegend in der Leber abgebaut. Hierbei spaltet das Schrittmacherenzym Tryptophan-Pyrrolase den Pyrrolring, woraus Formylkynurenin entsteht, das wiederum zu Kynurenin hydrolysiert wird. Kynurenin wird nach Oxydierung in Alanin und 3-Hydroxyanthranilsäure gespalten. Ein alternativer Stoffwechselweg ist der Abbau des 3-Hydroxykynurenins in Xanthurensäure, die im Harn nachweisbar ist.

1.1 Sertonerger Neurotransmission

Das Nervensystem dient der schnellen Übertragung von Informationen. In den einzelnen Neuronen erfolgt die Reizleitung durch fortgeleitete Aktionspotentiale elektrisch. Die Reizweiterleitung zu nachfolgenden Neuronen oder Erfolgsorganen erfolgt an speziellen Kontaktzonen, den Synapsen. Als Botenstoffe agieren chemische Verbindungen, die als Neurotransmitter bezeichnet werden. Zu dieser Gruppe gehören die Monoamine Serotonin, Noradrenalin und Dopamin. Ihre Freisetzung erfolgt durch das Verschmelzen von Speichervesikeln mit der Plasmamembran der entsprechenden Neurone. Auslösendes Moment für diesen als Exozytose bezeichneten Vorgang ist ein Aktionspotential, das zur Depolarisation und nachfolgendem Ca^{2+} -Einstrom führt. Die in den synaptischen Spalt gelangten Neurotransmitter interagieren mit post- und präsynaptischen Rezeptoren. Hierbei dient die Erregung postsynaptischer Rezeptoren der Auslösung von entsprechenden Signalkaskaden im Erfolgsorgan bzw. nachgeschalteten Neuron und

somit der Reizweiterleitung. Die Erregung präsynaptischer Rezeptoren vermag hingegen die Freisetzung weiterer Neurotransmitter im Sinne einer negativen oder positiven Rückkopplung zu modulieren. Um eine permanente Besetzung der Rezeptoren zu verhindern und die Weiterleitung nachfolgender Aktionspotentiale zu ermöglichen, müssen die freigesetzten Neurotransmitter schnell und effizient aus dem Spalt entfernt werden. Hierdurch wird zusätzlich die Diffusion des Neurotransmitters aus dem synaptischen Spalt in das umgebende Gewebe limitiert. Diese Aufgabe übernehmen in erster Linie membranständige Transporter. An den Synapsen der serotonergen Neurone werden entsprechend Serotonintransporter (SERT) exprimiert. Diese führen das Monoamin 5-HT dem Zytoplasma der postsynaptischen Neurone zu. Vesikuläre Monoamintransporter (VMAT) sind für den anschließenden Transport aus dem Zytoplasma in die Speichervesikel verantwortlich. Von diesem Transporter existieren zwei unterschiedliche Subtypen. Der VMAT1 wird in der Peripherie und der VMAT2 überwiegend im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert (Peter et al., 1995). Nur ein geringer Teil der rückaufgenommenen Monoamine wird von der Monoaminoxidase (MAO) inaktiviert. Serotonin unterliegt somit zum größten Teil einem Kreislauf, es wird sozusagen „recycelt“. Dieser Sachverhalt unterstreicht die physiologische Bedeutung der Neurotransmittertransporter für die Serotoninhomöostase. Eine veränderte Funktion der Transporter hat einen maßgeblichen Einfluss auf die Konzentration bzw. die Verweildauer von Serotonin im synaptischen Spalt. Aus diesem Grund ist der SERT ein wichtiges Target in der Pharmakologie und der Behandlung psychiatrischer Erkrankungen. Trizyklika wie z.B. Clomipramin oder Amitriptylin hemmen, neben anderen Effekten, unspezifisch diesen Transporter. Mit der Entwicklung selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI, z.B. Fluoxetin oder Paroxetin), sowie selektiver Serotonin-/Noradrenalin-Rückaufnahme-Inhibitoren (SSNRI, z.B. Venlafaxin) sind neuartige und hochwirksame Medikamente in der Behandlung von affektiven Störungen auf den Markt gekommen. Dieser Sachverhalt unterstreicht die Relevanz des serotonergen Systems sowohl in der Ursachenforschung als auch Behandlung neuronaler Erkrankungen wie z.B. der Depression.

2. Serotoninrezeptorfamilie

1957 haben Gaddum und Picarelli die ersten Hinweise für die Existenz verschiedener Subtypen von Serotonin-Rezeptoren (5-HT-Rezeptoren) geliefert (Gaddum und Picarelli, 1957). Sie unterschieden so genannte M- und D-Rezeptoren, die entweder durch Morphin (M) oder Dibenzylin (D) blockierbar waren. 1979 entwickelten Peroutka und Snyder eine neue Einteilung. Diejenigen, an die [³H]Serotonin mit subnanomolarer Affinität bindet, wurden 5-HT₁-, solche, an welche das Butyrophenon [³H]Spiperon mit hoher Affinität bindet, 5-HT₂-Rezeptoren genannt (Peroutka und Snyder, 1979). Ausgiebige Forschung und Charakterisierungen haben mittlerweile die Existenz von verschiedenen Subtypen nachgewiesen. Aktuell unterscheidet man zwischen sieben Hauptklassen (5-HT₁₋₇), mit insgesamt 15 verschiedenen Rezeptoren (Hoyer et al., 2002). Alle diese Rezeptoren befinden sich auf der Zelloberfläche. Ihre Einteilung erfolgte anhand von Ligandenbindungsverhalten, Gensequenzen und -organisation, Proteinstruktur sowie ihrer intrazellulären Signal-Transduktionswege. Mit Ausnahme des 5-HT₃-Rezeptors, welcher ein ligandengesteuerter Ionenkanal ist, gehören alle 5-HT-Rezeptoren zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), die eine Transmembranstruktur mit sieben Domänen aufweisen (Kroeze et al., 2002).

Die 5-HT₁-Rezeptorklasse enthält fünf Subtypen (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} und 5-HT_{1F}), welche beim Menschen eine 40-63%ige Gen-Sequenz-Identität aufweisen und v.a. an G-Proteine vom Typ G_{i/o} koppeln und somit eine Hemmung der Bindung von cAMP bedingen.

Die 5-HT₁-Rezeptoren sind v.a. im Hippocampus, Septum, Kerngebiet der Amygdala sowie im cerebralen Cortex lokalisiert. Darüber hinaus kommt der 5-HT_{1A}-Rezeptor in den Raphekernen in hoher Dichte vor. Dort dient er als somatodendritischer Autorezeptor, der die serotonerge Aktivität reguliert.

Pharmakologisch interagieren Migränetherapeutika wie Sumatriptan, Zolmitriptan oder Naratriptan als 5-HT₁-Rezeptoragonisten mit diesem Rezeptor. Durch direkte Interaktion mit dem vaskulären 5-HT_{1B}-Rezeptor kommt es zu einer intrakraniellen Vasokonstriktion. Darüber hinaus kommt es durch eine Aktivierung von 5-HT_{1D}-Rezeptoren auf meningealen Nervenendigungen des N. Trigemini einerseits und im Hirnstamm andererseits zur Blockade nozizeptiver Reize (Hargreaves und Shephard, 1999). Neben diesen

Mechanismen scheint auch eine 5-HT_{1F}-Blockade der Triptane therapeutisch bedeutsam zu sein.

Das neuartige Anxiolytikum Buspiron ist ein Agonist am 5-HT_{1A}-Rezeptor. Momentan ist jedoch unklar, ob die anxiolytische Wirkung durch die postsynaptische Wirkung und die dadurch erhöhte serotonerge Neurotransmission oder die Aktivierung des Autorezeptors und der damit verbundenen Hemmung, entscheidend für den pharmakologischen Effekt ist.

Der 5-HT₃-Rezeptor ist der am längsten bekannte Serotonin-Rezeptor. Er ist ein ligandengesteuerter Ionenkanal mit Permeabilität für Na⁺, K⁺ und Ca²⁺ und er gehört zur gleichen Superfamilie wie der GABA-Rezeptor. Der 5-HT₃-Rezeptor ist ein Pentamer bestehend aus fünf Untereinheiten, die sich durch vier putative Transmembrandomänen auszeichnen. Mittlerweile sind fünf verschiedene Untereinheiten bekannt (5-HT_{3A/3B/3C/3D/3E}). Nur die A-Untereinheit ist in der Lage einen funktionstüchtigen homopentameren Rezeptor zu bilden. Die anderen benötigen die A-Untereinheit, um einen funktionstüchtigen heteropentameren Rezeptor zu bilden (Niesler et al., 2007). Im Gehirn werden nur die 5-HT_{3A/3B/3C}-Untereinheiten exprimiert (Niesler et al., 2003). Dort findet man eine hohe Dichte von 5-HT₃-Untereinheiten in der Area Postrema, im cerebralen Cortex und im limbischen System.

Pharmakologisch ist der 5-HT_{3A}-Rezeptor v.a. in der antiemetischen Therapie von besonderer Bedeutung. Wirkstoffe wie Ondansetron oder Granisetron antagonisieren den Rezeptor und vermitteln so ihre Wirkung. Entgegengesetzt kann man emetische Nebenwirkung bei Medikamenten mit agonistischer Wirkung am 5-HT_{3A}-Rezeptor feststellen, wie z.B. bei Tramadol (Barann et al., 2006).

Die 5-HT₄-, 5-HT₆- und 5-HT₇-Rezeptoren koppeln v.a. an G-Proteine vom Typ G_s und bedingen somit eine vermehrte Bildung von cAMP. Das wissenschaftliche Interesse an diesen Rezeptoren hat sich in den letzten Jahren verstärkt, da gezeigt werden konnte, dass verschiedene typische und atypische Neuroleptika wie Clozapin, Risperidon oder Olanzapin signifikante Affinitäten zu diesen Rezeptoren aufweisen (Roth et al., 1994). So bilden diese Rezeptoren neue Targets in der Arzneimittelforschung. Selektive Agonisten und Antagonisten werden entwickelt, um spezifische Effekte zu erforschen. So ist z.B. mit der Substanz 8-OH-DPAT ein hochselektiver 5-HT₇- und 5-HT_{1A}-Rezeptoragonist entwickelt worden, der auf verschiedenste Indikationen untersucht wird.

So scheint diese Substanz eine Induktion lokomotorischer Bewegungen bei querschnittsgelähmten Mäusen hervorzurufen (Landry et al., 2006), einer Opioid-induzierten Atemdepression entgegenzuwirken (Meyer et al., 2006) oder einen antinozizeptiven Effekt zu bewirken (Harte et al., 2005).

Die Rezeptoren 5-HT_{5A} und 5-HT_{5B} haben eine bis zu 70% identische Gen-Sequenz; allerdings ist nur ein funktioneller 5-HT_{5A}-Rezeptor im Mensch gefunden worden (Matthes et al., 1993). Der 5-HT_{5A}-Rezeptor koppelt v.a. mit dem G-Protein vom Typ G_{i/o}, das eine Inhibition der Bildung von cAMP bedingt (Thomas et al., 2004). Über die Funktion dieses Rezeptors ist wenig bekannt, so dass über den potentiellen pharmakologischen Nutzen derzeit nur spekuliert werden kann (Thomas, 2006). Das 5-HT_{5B}-Rezeptor-Gen erzeugt beim Menschen kein funktionales Protein, da es durch zwei Stop-Kodons gekennzeichnet ist. Der 5-HT_{5B}-Rezeptor ist damit ein Beispiel für ein gehirnspezifisches Protein, das nicht beim Menschen gefunden wird.

2.1 5-HT₂-Rezeptoren

Die 5-HT₂-Rezeptoren gehören zu den GPCRs und zeigen damit alle den typischen heptahelikalen Aufbau des Membranproteins (siehe C.1.5). Man unterscheidet 5-HT_{2A}-, 5-HT_{2B}- und 5-HT_{2C}-Rezeptoren basierend auf ihrer Strukturähnlichkeit, ihren pharmakologischen Eigenschaften, ihrer intrazellulären Signalkaskaden (siehe Tabelle 1) und ihrer Lokalisation im Gehirn (Barnes und Sharp, 1999; Hoyer et al., 2002). Diese Rezeptorgruppe hat in den letzten Jahren großes wissenschaftliches Interesse erregt, da sie neue wichtige Targets in der Behandlung von psychiatrischen Erkrankungen darstellen. Atypische Neuroleptika, Antidepressiva und Anxiolytika haben einen antagonistischen Effekt auf 5-HT₂-Rezeptoren. Viele psychoaktive Substanzen und Halluzinogene haben einen agonistischen Effekt auf diese Rezeptoren (Meltzer et al., 1989; Roth et al., 1998). Weiterhin wurde gezeigt, dass die 5-HT₂-Rezeptoren relevant sowohl in der Gehirnentwicklung (Choi et al., 1997; Li et al., 2004) als auch in der Plastizität des visuellen Cortex (Kojic et al., 2000) sind. Eine weitere Besonderheit ist die atypische Regulation der Aktivität dieser Rezeptorgruppe. Nicht nur chronische Behandlung mit agonistischen Substanzen sondern paradoxerweise auch mit antagonistischen Medikamenten wie Neuroleptika, führen zu einer funktionellen Downregulation der Rezeptoren (Van Oekelen et al., 2003).

Rezeptor	Signal-Transduktion	Rezeptor-Verteilung
5-HT _{2A}	PLC, PKC, c-fos	Cortex > Basal-Ganglien > Hippocampus
5-HT _{2B}	Ras-Aktivierung, Ca ²⁺ -Influx	Peripherie: Blutgefäße, GIT
5-HT _{2C}	PLC, PLA ₂ , PLD, ERK-1,-2	Plexus choroideus > Hippocampus > Striatum

Tabelle 1: Zusammenstellung der 5-HT₂-Rezeptor-Subgruppen mit Signaltransduktionswegen und Rezeptorverteilung.

Dargestellt sind die 5-HT₂-Rezeptoren und die durch sie aktivierten Effektorproteine. Neben der Aktivierung von Phospholipase C (PLC) via G-Protein G_{q/11} werden bei den 5-HT_{2A/C}-Rezeptoren auch zu einem geringeren Maß Phospholipase A₂ (PLA₂) und Phospholipase D (PLD) über alternative Signalwege aktiviert. Der 5-HT_{2C}-Rezeptor aktiviert ferner die Extrazellulär Signal-

regulierte Kinasen -1 und -2" (ERK-1,-2). Der, im Gegensatz zu den anderen beiden 5-HT₂-Rezeptoren, nur in der Peripherie vorkommende 5-HT_{2B}-Rezeptor aktiviert auch RAS-Proteine.

2.1.1 5-HT_{2C}-Rezeptor

Pazos et al. waren die ersten, die den 5-HT_{2C}-Rezeptor mittels Radioligandbindung in Zellen des Plexus choroideus entdeckt haben. Aufgrund der hohen Affinität zu [³H]5-HT nannten sie den Rezeptor zunächst 5-HT_{1C} (Pazos et al., 1984). Nachdem das Gen identifiziert und entschlüsselt war, und pharmakologischen Eigenschaften des Rezeptors bekannt wurden erfolgte die Umgruppierung in die Gruppe der 5-HT₂-Rezeptoren. So hat der 5-HT_{2C}-Rezeptor viele Gemeinsamkeiten mit dem 5-HT_{2A}-Rezeptor. Aufgrund ähnlicher Gen- Sequenzen ist es nicht verwunderlich, dass sie vergleichbare pharmakologische Profile und nahezu gleiche intrazelluläre Signal-Transduktionswege besitzen (siehe Tabelle 1). Nach Bindung eines Agonisten kommt es hauptsächlich zur Aktivierung von Phospholipase (PLC) via G-Protein G_{q/11}. Die PLC katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG). IP3 fungiert als second Messenger und bedingt u.a. eine Ca²⁺-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, während das membranassoziierte DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert (Chang et al., 2000).

Ferner besitzt der 5-HT_{2C}-Rezeptor noch andere alternative Signal-Transduktionswege. Einige Agonisten vermögen nach Bindung am Rezeptor die Phospholipase A2 (PLA₂) zu aktivieren, was zur Freisetzung von Arachidonsäure führt (Berg et al., 1998). Darüber hinaus können 5-HT_{2C}-Rezeptoren auch die Phospholipase D (PLD) stimulieren (McGrew et al., 2002). Dies geschieht durch Aktivierung des G-Proteins vom Typ G_{α13} und freie G_{β-γ}-Untereinheiten. Auch eine Stimulation der „extrazellulären Signal-regulierten Kinasen“ (ERK) 1 und 2 ist beschrieben worden (Werry et al., 2005). Interessanterweise stimulieren verschiedene Agonisten im unterschiedlichen Ausmaß die einzelnen Signal-Transduktionswege. Des Weiteren vermag der 5-HT_{2C}-Rezeptor diese verschiedenen Signalkaskaden auch ohne Bindung eines Agonisten zu aktivieren (Barker et al., 1994). Diese Eigenschaft, das Vorliegen einer so genannten konstitutiven Aktivität, ist ein wichtiges Steuerungselement im neuronalen Netzwerk. So kommt es durch die enge Vernetzung von 5-HT_{2C}-Rezeptoren mit dopaminergen Neuronen v.a. im

vorderen Tegmentum (VTA), Striatum und der Substantia nigra (SN) zur Regulierung des zentralen Dopamin-Tonus (De Deurwaerdere et al., 2004). Hier besteht auch eine enge Vernetzung mit GABAergen Neuronen, die wiederum inhibitorisch auf die dopaminerge Aktivität wirken, so dass dem 5-HT_{2C}-Rezeptor eine wichtige Rolle in der Regulation der gesamten neuronalen Transmission zukommt (Bubar und Cunningham, 2007).

Rezeptorspezifische Eigenschaften lassen sich mit der Entwicklung von KO-Mäusen analysieren. 5-HT_{2C}-Rezeptor KO-Mäuse entwickeln ein enormes Übergewicht als Folge eines gestörten Ernährungsverhaltens, so dass dieser Rezeptor eine große Rolle in der serotonergen Kontrolle des Appetits spielt (Tecott et al., 1995). Des Weiteren sterben die Mutanten früher infolge starker Krampfanfälle, was den inhibitorischen Einfluss des Rezeptors auf die neuronale Erregbarkeit unterstreicht. Auch zeigen die KO-Mäuse ein gestörtes Schlafverhalten, im Sinne einer verlängerten Wachheit sowie veränderter REM-Phasen (Frank et al., 2002).

Betrachtet man die rezeptorspezifischen Eigenschaften und die Einbindung in die Regulation der zentralen Neurotransmission, insbesondere des dopaminergen Systems, so wird klar, dass dieser Rezeptor sowohl in der Pathogenese zentraler Erkrankungen, als auch als pharmakologisches Target in der Behandlung dieser Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Zu den assoziierten Erkrankungen zählen Essstörungen, Schizophrenie, affektive Störungen, Epilepsie, Suchterkrankungen, M. Parkinson und M. Alzheimer.

Neben Aktivierung oder Blockierung des Rezeptors durch Agonisten und Antagonisten, können inverse Agonisten durch eine Verminderung der konstitutiven Aktivität den Rezeptor inhibieren. Dieser Effekt eröffnet differenzierte pharmakologische Möglichkeiten, so dass atypische Neuroleptika wie z.B. Clozapin inverse Agonisten an diesem Rezeptor sind (Navailles et al., 2006). Die Entwicklung neuer inverser Agonisten hat einen großen Stellenwert in der Erforschung von Psychopharmaka. Selektive 5-HT_{2C}-Agonisten vermögen den Appetit zu vermindern, so dass mit neuartigen Substanzen wie ADP 356 (Arena) oder BVT 933 (Biovitrum/GSK) große Hoffnung in die Behandlung von Fettleibigkeit gesetzt wird. In der Tabelle 2 werden weitere Medikamente mit Wirkung am 5-HT_{2C}-Rezeptor aufgelistet.

Substanzen	Wirkung/Indikation	Beschreibung
Agonisten		
ADP356	Appetitregulator	neuartig, selektiv, Phase-III
BVT933	Appetitregulator	neuartig, selektiv Phase-IIb
m-CPP	halluzinogen / psychoaktiv	Desingerdroge, unselektiv
LSD (Partial-Agonist)	halluzinogen / psychoaktiv	Droge, unselektiv
DOI (Partial-Agonist)	halluzinogen / psychoaktiv	Desingerdroge, unselektiv
Antagonisten		
FR 260010	Anxiolytikum	neuartig, selektiv
Agomelatin	Antidepressivum	Melatonin Rezeptor-Agonist, unselektiv
Amitryptilin	Antidepressivum	trizyklisches Antidepressivum, unselektiv
Fluoxetin	Antidepressivum	SSRI, unselektiv
Citalopram	Antidepressivum	SSRI, unselektiv
Inverse Agonisten		
Clozapin	Neuroleptikum	atypisches Neuroleptikum, unselektiv
Risperidon	Neuroleptikum	atypisches Neuroleptikum, unselektiv
Ketanserin	Antihypertensivum, Thrombozytenfunktionshemmer	selektiv, in Deutschland nicht auf dem Markt
Mianserin	Antidepressivum	tetrazyklisches Antidepressivum, unselektiv
Methysergid	Migräne/Cluster Kopfschmerz	aufgrund der Triptane nur noch zweite Wahl, unselektiv

Tabelle 2: Substanzen mit Wirkung am 5-HT_{2C}-Rezeptor

Aufgelistet ist eine Auswahl von Substanzen, die am 5-HT_{2C}-Rezeptor binden. Selektive Agonisten werden für die Therapie von Fettleibigkeit entwickelt. Eine Antagonisierung des Rezeptors scheint einen antidepressiven Effekt zu haben. Selektive Antagonisten spielen eine Rolle in der Entwicklung neuer Anxiolytika. In der Gruppe der inversen Agonisten sind v.a. die atypischen Neuroleptika mit unselektiver Bindung am Rezeptor hervorzuheben.

3. Genetische Variabilität von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Die häufigste genetische Variation ist der „single nucleotide polymorphism“ (SNP) mit einem Auftreten von > 1% (Wang et al., 1998), welcher sowohl in der Kodierungsregion (ORF) als auch in den nicht-transkribierten Abschnitten des Gens lokalisiert sein kann. SNPs können z.B. einen Aminosäureaustausch eines GPCRs bedingen mit Auswirkung u.a. auf die Proteinstruktur, Ligandenbindung, Expression oder Interaktion mit anderen G-Proteinen (Rana et al., 2001). Lander (Lander, 1996) äußerte eine wichtige Hypothese, die den signifikanten Zusammenhang von häufigen genetischen Veränderungen und häufigen Erkrankungen hervorhebt. Welche Auswirkung ein SNP im Einzelnen hat, ob er eine Relevanz hat oder klinisch stumm bleibt, kann man nicht voraussagen. So sind neben Assoziationsstudien, die statistische Zusammenhänge von SNPs und Erkrankungen untersuchen, v.a. kausale Untersuchungen wie pharmakologische Bindungsstudien von zentraler Bedeutung. Einer der bedeutendsten identifizierten SNPs ist die Mutation C1473G im Tryptophanhydroxylase 2 (Tph2)-Gen, die zu einer Verminderung der Serotoninproduktion führt (Zhang et al., 2004). Somit spielt dieser SNP eine wichtige Rolle in der endogenen Serotoninproduktion und folglich in der Pathogenese affektiver Störungen. Vergleicht man bereits pharmakologisch charakterisierte SNPs in 5-HT-Rezeptoren so ergeben sich unterschiedliche Bilder. Der SNP Pro391Arg im 5-HT_{3A}-Rezeptor zeigte keine Veränderung im Ligandenbindungsverhalten (Kurzweily et al., 2004). Der SNP Arg219Leu im 5-HT_{1A}-Rezeptor zeigte ebenfalls keine Veränderung in der Ligandenbindung allerdings einen Unterschied in der Signaltransduktion (Brüss et al., 2005b), aus der Rückschlüsse auf assoziierte Krankheiten gezogen werden können. Der SNP Thr92Lys im 5-HT_{7A}-Rezeptor zeigte eine veränderte Affinität zu Agonisten (Brüss et al., 2005a), so dass auch hier pathologische Konsequenzen denkbar sind.

Im Gegensatz zu den beschriebenen genomischen Rezeptorvarianten können Rezeptorvarianten auch durch alternatives Splicen entstehen. Unter Splicen versteht man eine Modifikation der genetischen Information nach der Transkription, wobei die Introns der pre-mRNA beseitigt werden und die Exons miteinander verbunden werden. Daraus bildet sich die mRNA. Neben den determinierten Splice-Vorgängen sind auch so genannte Splice-Varianten denkbar. Diese entstehen durch einen, als alternatives Splicing bezeichneten Vorgang, wobei es zu einer unterschiedlichen Zusammenführung

von Exons oder inkompletten Entfernung von Introns kommt. Somit handelt es sich um einen wichtigen Mechanismus in der Gestaltung der genetischen Vielfalt (Brett et al., 2002). Damit z.B. GPCRs diesen alternativen Prozess unterlaufen können, müssen entsprechend Introns im offenen Leseraster (open reading frame (ORF)) des Gens vorhanden sein. Dies ist bei GPCRs oftmals nicht der Fall. Der 5-HT_{2C}-Rezeptor besitzt allerdings mehrere Introns im ORF (siehe C.1.5), eine Voraussetzung für die Bildung alternativer Isoformen via alternativem Splicen.

Ein weiterer Mechanismus, der zur Bildung von alternativen Proteinstrukturen führt ist das RNA-Editing. Unter allen bekannten GPCRs ist der 5-HT_{2C} Rezeptor der einzig bekannte, der diesem Prozess unterliegt. Hierbei kommt es zur posttranskriptionalen Modifikation von Adenosin zu Inosin bestimmter Nukleotide (Burns et al., 1997). Inosin ist ein seltenes Nucleosid der RNA. Es handelt sich dabei um ein Purinnucleosid, welches als Zwischenprodukt des Purinstoffwechsels entsteht. Dieser Prozess geschieht unter dem Einfluss von ADARs (adenosine deaminase that act on RNA) und führt zu verschiedenen Isoformen des Rezeptors, deren Funktion noch nicht eindeutig erklärt ist. Denkbar ist, dass es sich hierbei um einen Steuerungsmechanismus handelt, der die Funktion des Rezeptors durch Veränderung z.B. der konstitutiven Aktivität, der Signaltransduktion oder des Ligandenbindungsverhaltens modifiziert.

4. Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen eines Projektes innerhalb des SFB 400 (Molekulare Grundlagen zentralnervöser Erkrankungen) der Universität Bonn, sollte in dieser Arbeit der humane 5-HT_{2C}-Rezeptor und die natürlich vorkommende Variante 5-HT_{2C}Cys23Ser mit Hilfe molekularbiologischer Methoden erstellt und auf funktionelle Unterschiede hin untersucht werden. Der Cys23Ser-Polymorphismus ist durch einen AS-Austausch von Cystein zu Serin am 23. Kodon des 5-HT_{2C}-Rezeptors gekennzeichnet. Die Häufigkeit dieses Ser-23 Allels wird mit 13% in der kaukasischen Normalbevölkerung angegeben (Lappalainen et al., 1995). Der 5-HT_{2C}-Rezeptor ist in viele neuronale Prozesse eingebunden und stellt ein wichtiges Target in der pharmakologischen Behandlung von zentralnervösen Erkrankungen dar (siehe Tabelle 2). Aufgrund der spezifischen Funktionen des Rezeptors (siehe A.2.1.1) sind durch den vorliegenden Rezeptorpolymorphismus (SNP) pathologische Veränderungen denkbar. So wurden zu diesem Polymorphismus viele Assoziationsstudien durchgeführt. Diese haben ihn in Verbindung mit psychiatrischen Erkrankungen wie Schizophrenie, Depression, Essstörungen, Suchterkrankungen oder M. Alzheimer gebracht. Pharmakologische Untersuchungen von Rezeptorpolymorphismen eröffnen die Möglichkeit diese statistischen Zusammenhänge auf molekularer Ebene zu verifizieren.

In der vorliegenden Arbeit sollte zuerst die cDNA des 5-HT_{2C}-Wildtyp-Rezeptors kloniert werden und hiermit sollte durch gerichtete Mutagenese seine 5-HT_{2C}Cys23Ser-Variante hergestellt werden. Unter weiterem Einsatz molekularbiologischer Methoden sollten diese cDNAs zur Transfektion humaner embryonaler Nierenzellen (HEK293) eingesetzt werden. Mittels pharmakologischer Radioligand-Bindungsstudien sollten dann an den exprimierten Rezeptoren Versuche zur Charakterisierung des Wildtyp-Rezeptors und seiner Variante durchgeführt werden. Schließlich sollten diese Ergebnisse in Bezug auf vorliegende Assoziationsstudien gesetzt werden. Die vorliegende Arbeit stellt somit einen Beitrag zur Aufklärung der pathologischen Bedeutung der Cys23Ser-Variante des 5-HT_{2C}-Rezeptors dar.

B. Material und Methoden

1. Materialien

1.1 Arbeitsgeräte

Analysenwaage	A 210 P, Sartorius FA 3100-2iEC, Faust
Beleuchtungstisch	Just-Normlicht
Heizrührer	Ikamag RH, Ika
Kryostat	Jung CM 3000, Leica
Membranpumpe	Typ EKF45, Greiffenberger Antriebstechnik GmbH
pH-Meter	pH 522, WTW
Fotodokumentation Umfasst: UV/VIS Leuchttisch Kamera Thermoprinter Bildschirm	MWG Biotech TFP-M/WL KP-M1U, Hitachi P66E, Mitsubishi IM400-E, Javelin
Photometer	Gene Quant II, Pharmacia UVmini 1240, Shimadzu
Pipetten	Research, Eppendorf PreCision, Finpipett Pipetman, Gilson
Rotationsmischer	Vibrax-VXR, Vortex Genie 2, Bender & Holbein
Rotor-Stator-Homogenisatoren	Ultra Turrax TP 18/10, IKA-Labortechnik Polytron PT 10/35, Kinematic Littau
Schüttelinkubator	TR-125, Infors AG
Sequenzer	LI-COR 4200 und 4200L, MWG
Spannungsgeräte	Modell 493, ISCO 2303 Multidrive XL, Pharmacia LKB

	ECPS 3000/150 Pharmacia LKB P25, Biometra
Sterilarbeitsbank	HA 2448 GS, Heraeus
Szintillationszähler	LS 5000 TD, Beckmann
Thermocycler	Trioblock (mit Deckelheizung), Biometra
Wasseraufbereitung (Bidestille)	Aquatron A400D, Bibby
Wasserbad	Hartenstein
Zellharvester	Brandel
Zellhomogenisator	Wheaton Potter
Zentrifugen	5114 und 5402, Eppendorf 1K15 und 2K15, Sigma CPKR (Rotor: GH-3.7) Beckmann JS-21 (Rotor: JA-20) Beckmann

1.2 Verbrauchsmaterial

Filmrolle für Thermoprinter	K65HM, Mitsubishi
Kanülen	Braun
Glasfaserfilter	GF/B/C Filter, Whatman
Pipettenspitzen	Eppendorf/ Saarestedt safe seal-Tips, Biozym
Reaktionsgefäße	Safelock 0,5 ml und 2 ml, Eppendorf 1,5 ml Saarestedt
Spritzen, Insulinspritzen, 26G Kanülen	Braun
Sterilfilter	Typ GVPP, 0,22 µm, Millipore
UV-Küvette (Einweg)	UVette, Eppendorf
Zählröhrchen	Mini POLY-Q Vials, Beckmann
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml, Nunc und Falcon

1.3 Computersoftware und Datenbanken

BLAST at NCBI	www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
Entrez at NCBI	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/

Graph Pad Prism, Instat	GraphPad Software
OligoAnalyzer 3.0	Integrated DNA Technologies (IDT)
Office 2000 (Excel, Word, Access)	Microsoft

1.4 Kits für die Molekularbiologie

Gene Elute Agarose Spin Columns	Sigma
Original TA Cloning Kit	Invitrogen
PCR-Reagent System	Invitrogen
Plasmid Mega Kit	Qiagen
Qiaquick	Qiagen
Spin Miniprep Kit	Qiagen
Superscript II RNase H ⁻ Reverse Transkriptase	Invitrogen
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham

1.5 Enzyme

RNasin RNase Inhibitor	Promega, MBI
Restriktionsendonukleasen	MBI, Roche
Oligonukleotide	MWG

1.6 Größenmarker, Vektoren und Nukleinsäuren

1Kb DNA Ladder	Invitrogen
dNTPs	MBI
NTPs	MBI
pCR 2.1	Invitrogen
pcDNA 3	Invitrogen

1.7 Chemikalien

Agar-Agar	Merck
Agarose (for electrophoresis)	Serva
Ammoniumperoxodisulfat	Merck und BioRad

Material und Methoden

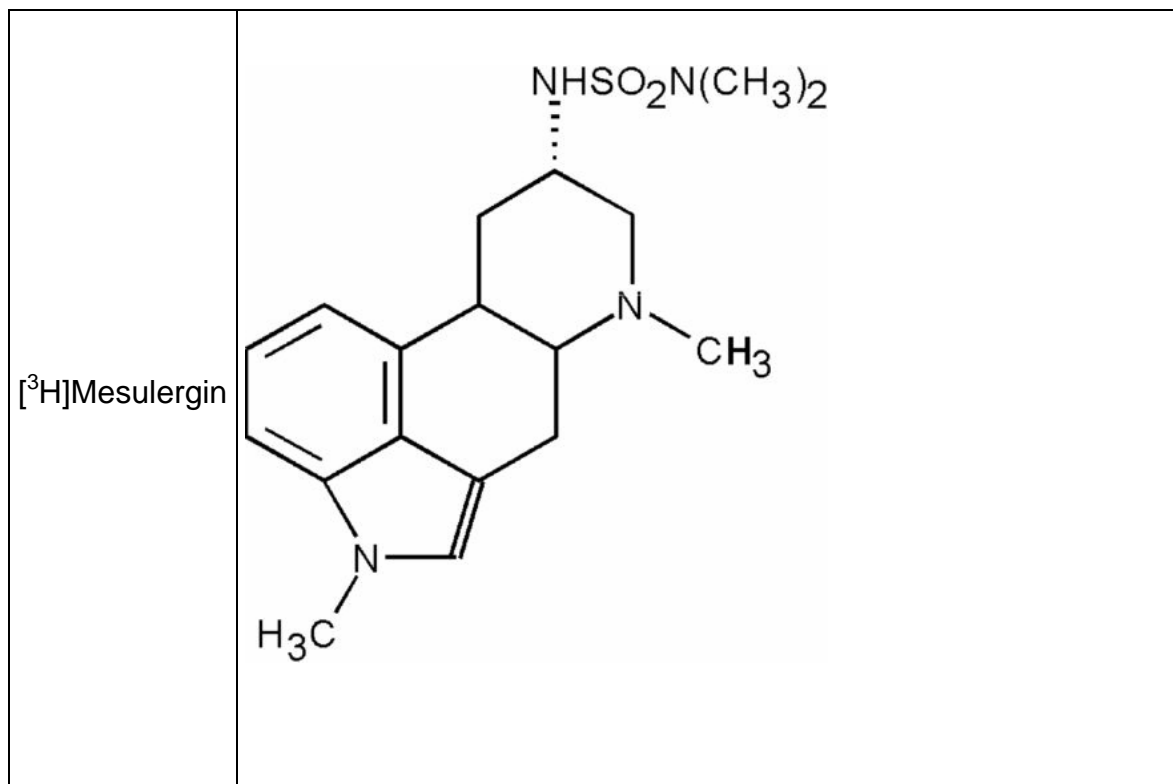
Ampicillin	Roche
Bactotrypton	Life Technologies
Beta-Mercaptoethanol	Sigma
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	BioRad
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma
Caseinhydrolysat	Life Technologies
Chloroform	Merck, Roth
Clozapin	Sigma
Destilliertes Wasser (Zellkulturgrad)	Life Technologies
Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether) N, N, N', N'-tetraacetat, Na-Salz (EGTA)	Sigma
Ethanol absolut	Merck
Ethidiumbromid	Roche
Ethylendiamintetraacetat, Na-Salz (EDTA)	Sigma
Ficoll 400	Sigma
Gelatine	Merck, Sigma
Glycerol (87 %)	Merck
Hefeextrakt	Life Technologies
Isopropanol	Merck
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roche
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Ketanserin-Tartrat	Sigma
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
Methanol	Merck
Mineralöl	Sigma
Natriumacetat (NaAc)	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck

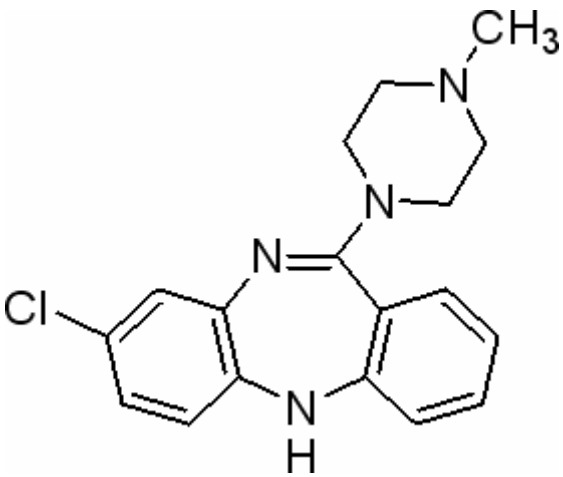
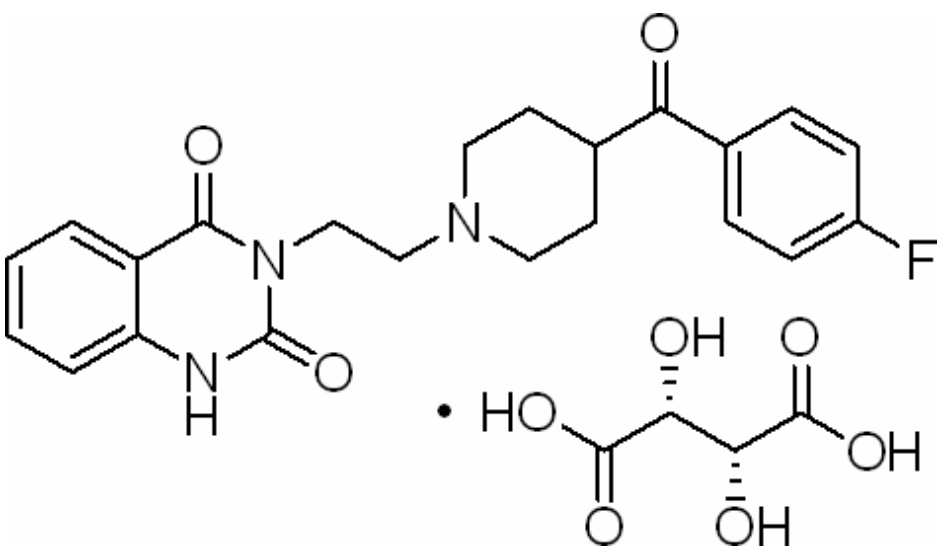
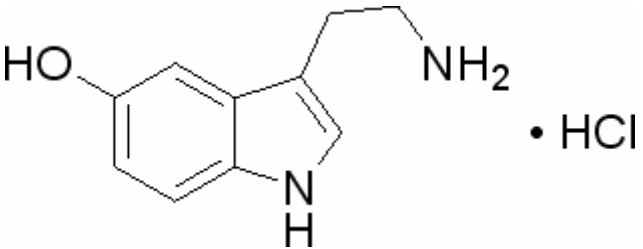
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Roth
Octansulfonsäure	Sigma
Salzsäure (37 %)	Merck
Scintillator 199 TM	Packard
Serotonin	Sigma
Sequagel XR	Biozym
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth/Merck
X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid)	Roche bzw. Roth

1.8 Radiochemikalien und Standards

[³ H]-Mesulergin, 84 Ci/mmol	Amersham
--	----------

1.9 Strukturformeln der Liganden



<p>Clozapin</p>	
<p>Ketanserin-Tartrat</p>	
<p>Serotonin-Hydrochlorid</p>	

1.10 Nährmedien für die Bakterienkultur

LB-Medium, pH 7,0	1 % Bactotrypton oder Caseinhydrolysat 0,5 % Hefeextrakt 1 % NaCl
LB/Amp-Medium	LB-Medium mit 200µg/ ml Ampicillin
SOC-Medium (pH 7,0)	2 % Caseinhydrolysat 0,5 % Hefeextrakt 0,05 % NaCl 2,5 mM KCl Zugabe nach dem Autoklavieren: 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 0,2 % Glukose, sterilfiltriert
XIA-Platten	LB-Medium mit X-Gal (40 µg/ml), IPTG (50 µg/ml) und Ampicillin (200 µg/ml), 1,5 % Agar-Agar

1.11 Puffer und Lösungen

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	10 %, frisch oder gelagert bei -20 °C
Ampicillin	10 %, aliquotiert, gelagert bei -20 °C
Bindungspuffer (ECS)	150 mM NaCl 1,8 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O 1 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O 10mM Hepes 5,4 mM KOH, einstellen auf pH 7,4
Chloroform/Isoamylalkohol	Chloroform:Isoamylalkohol 24:1
Coomassie-Blau Lösung	0,5% Coomassie-Blau n H ₂ O
DTT-Stammlösung	1 mM Dithiothreitol (DTT) in H ₂ O
Erststrang-Puffer	250 mM Tris HCl pH 8,3

Material und Methoden

	375 mM KCl 15 mM MgCl ₂
Ethidiumbromid-Lösung	1 % in H ₂ O, lichtgeschützt bei 4 °C
Filtrationspuffer	25 mM Glycylglycine, pH 7,6
Glycerol (50 %)	in H ₂ O, autoklaviert
Hepes-Puffer	11,92 g/l HEPES in H ₂ O lösen pH 7,4 mit 2M NaOH einstellen
Ligationspuffer	60 mM Tris HCl pH 7,5 60 mM MgCl ₂ 50 mM NaCl 1 mg/ml BSA 70 mM β-Mercaptoethanol 1 mM ATP 20 mM DTT 10 mM Spermidine
Lowry-Lösung A	8% Na ₂ CO ₃ in 0,2 N NaOH, frisch angesetzt 1,6% (v/v) Lösung B ₂ 0,4% (v/v) Lösung B ₁
Lowry-Lösung B ₁	2% CuSO ₄ x5H ₂ O
Lowry-Lösung B ₂	2,5% Na-K-Tartrat x4H ₂ O
Lowry-Puffer C	8% (w/v) Na ₂ CO ₃ 0,8% (w/v) NaOH) 0,04% (w/v) Na-K-Tartrat 0,008% (w/v) CuSO ₄
Phenol/Chloroform	Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) gesättigt mit 10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, pH 8

Material und Methoden

Sequenziergel-Lösung	6-8% Acrylamid-Bisacrylamid (19:1) 1 x TBE 7 M Harnstoff 0,04% TEMED 0,6% APS
TE-Puffer (pH 8)	10 mM Tris HCl 1 mM EDTA, pH 8,0
Tris-HCl pH 6,8	1 M Tris-HCl, pH 6,8
Tris-HCl pH 8,8	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Wasser	Bidestilliertes Wasser

2. Molekularbiologische Methoden

2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

2.1.1 Plasmid Mini-Päraparation

Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse, modifiziert nach Birnboim und Doly (1979)

Nachdem eine einzelne Bakterienkolonie von einer LB/Amp-Agarplatte abgepickt worden war, wurde diese über Nacht in einem Reagenzglas in 3 ml LB/Amp- Medium bei 37°C und 225rpm inkubiert. Von dieser Bakterien suspension wurden im Folgenden 2 ml für 1 min mit 10.000 upm pelletiert, der Überstand dekantiert und anschließend in 150 µl *E. coli* Resuspensionspuffer aufgenommen. Nach weiteren 5 min erfolgte dann die Lyse durch Zugabe von 300 µl Denaturierungslösung unter vorsichtigem Mischen und anschließender Kühlung für 3 min auf Eis. Hierzu wurden dann 250 µl Neutralisierungslösung vorsichtig beigemischt und das ganze für weitere 10 min auf Eis gekühlt. Die Lösung wurde 2 min bei ≥ 12.000 upm zentrifugiert und der Überstand 1-2x mit Phenol/Chloroform und 1x mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Die Plasmid-DNA wurde im Folgenden durch die Zugabe von 1 Vol Isopropanol gefällt, 5 min auf Eis inkubiert und 2 min bei ≥ 12.000 upm zentrifugiert. Das Pellet wurde 2x mit 70% EtOH gewaschen, im „Speed-Vac-Concentrator“ getrocknet und in 30 µl Aqua dest. gelöst. In der Regel betrug die Ausbeute bei dieser Methode 2-5 µg Plasmid-DNA/ ml Bakterienkultur.

2.1.2 Plasmid Mini-Präparation mit dem „Spin-Miniprep Kit“ (Qiagen)

Diese Methode beruht ebenfalls auf dem Prinzip der alkalischen Lyse, benötigt allerdings kein Phenol/Chloroform zur DNA-Isolierung. Dies geschieht mittels einer Silicagel-Matrix Säule, welche Nukleinsäuren reversibel, pH- und salzabhängig bindet. Eingesetzt wurden 1-2 ml einer Bakterien-Übernachtskultur, die anschließende Plasmid-Präparation erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Ausbeute betrug etwa 6 µg Plasmid-DNA bei der Verwendung von 2 ml Bakteriensuspension. Die erhaltenen Plasmide können ohne weitere Aufreinigung für Sequenzierungen verwendet werden.

2.1.3 Plasmid Mega-Präparation mit dem „Plasmid Mega Kit“ (Qiagen)

Diese Methode der DNA-Isolierung wird zur Gewinnung größerer Mengen DNA herangezogen und beruht auf dem gleichen Prinzip wie die Plasmid Mini-Präparation. 500 ml LB/Amp-Medium wurden mit einer Bakterienkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 upm geschüttelt. Die Plasmid-Präparation wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Ausbeute an DNA lag bei 1,5 - 2 mg/500 ml Bakterienkultur. Die erhaltenen Plasmide konnten ohne weitere Aufreinigung für Transfektionen und Sequenzierungen verwendet werden.

2.2 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die photometrische Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Photometer Gene-Quant II (Pharmacia). Bei der Bestimmung wird die Absorption von Purin- und Pyrimidinbasen bei einem Maximum von 260 nm genutzt. Es ist aber auch die Bestimmung von Proteinen bei 280 nm möglich. Nach Kalibrierung des Gerätes mit derselben Lösung, in der die DNA gelöst war, wurde je 100 µl einer 1:20 Verdünnung der DNA-Proben gemessen. Dieser Konzentrationsbestimmung liegt das Lambert-Beersche Gesetz zugrunde, welches die Zusammenhänge zwischen Absorption und Konzentration angibt:

$$E = c \times d \times e$$

E = Extinktion (Absorption)

c = Konzentration (mol/l)

d = Schichtdicke der Küvette (cm)

e = molarer Extinktionskoeffizient (l/mol x cm)

Eine Konzentration von 50 µg/µl doppelsträngiger DNA, beziehungsweise eine Konzentration von 33 µg/µl einzelsträngiger DNA weist bei einer Wellenlänge von 260 nm näherungsweise einen Extinktionswert von 1 auf. Die DNA-Konzentration errechnet sich folgendermaßen: DNA-Konzentration (µg/µl) = $OD_{260} \times 50 \times 10^{-3} \times$ Verdünnungsfaktor

Der Quotient der Messung bei 260 nm und 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) gibt Auskunft über den Reinheitsgrad der DNA.

2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese stellt ein analytisches Trennverfahren dar, bei dem die unterschiedliche Größe der Moleküle zu deren Trennung in einem Molekularsieb in einem elektrischen Feld ausgenutzt wird. Die Geschwindigkeit, mit der DNA-Fragmente durch Agarosegele wandern, ist abhängig von der Größe der DNA (lineare, doppelsträngige DNA bewegt sich mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist; superhelikale DNA bewegt sich aufgrund ihrer Konformation schneller durch die Agarose-Matrix). Gele mit geringer Agarose-Konzentration (0,5 - 0,6%) eignen sich zur Trennung von großen DNA-Fragmenten (1 - 20 kb), hochkonzentrierte Gele (0,7 - 1,5%) trennen kleine Fragmente (0,1 - 2 kb) gut auf. Die DNA kann in einem Agarosegel durch Zugabe von Ethidiumbromid (5 µl auf 100 ml einer 1%-igen Lösung), welches zwischen die Basenpaare der DNA interkaliert, im UV-Licht sichtbar gemacht werden.

2.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit „GenElute Agarose Spin Columns“ (Sigma) nach Angaben des Herstellers. Die gewünschte DNA-Bande wurde mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel exakt ausgeschnitten. Das Gelfragment wurde dann auf die mit 100 µl TE (pH 8,0) equilibrierte Säule gegeben und für 10 min bei 12000 g und RT zentrifugiert. Die so erhaltene DNA konnte mit Phenol/Chloroform und anschließender Ethanol- bzw. Isopropanolfällung aufgereinigt (siehe B.2.6) oder ohne weitere Aufreinigung eingesetzt werden.

2.5 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit der Superscript II RNase H⁻ Reverse Transkriptase (Life Technologies) nach dem Protokoll des Herstellers. 1-5 µg Gesamt-RNA und 1 µl Oligo(dT)₁₈-Primer (500 µg/ml) wurden mit sterilem, RNase freiem H₂O auf 12 µl aufgefüllt, für 10 min auf 70°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis abgeschreckt. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden folgende Komponenten addiert:

- 4 µl 5 x Erststrang Puffer
- 2 µl 0,1 M DTT
- 1 µl 10 mM dNTP-Mix
- 1 µl (200 Units) Reverse Transkriptase

Nach einer Inkubation von 50 min bei 42°C erfolgte das Abstoppen der Reaktion für 15 min bei 70°C. Die RNA kann mit 2 Units RNase H bei 37°C (30 min) verdaut werden.

2.6 DNA-Reinigung und Fällung

2.6.1 DNA-Extraktion mit Phenol/Chloroform

Es handelt sich hierbei um eine Methode zur Aufreinigung von DNA. Die entsprechende DNA-Lösung wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt (30 s). Anschließend wurde das Gemisch für 2-5 min bei 13000 upm und RT zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, welche die Nukleinsäure enthielt, wurde in ein neues Gefäß überführt und zur Entfernung des Phenols mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) durch Schütteln vermischt. Diesem Schritt folgte eine erneute Zentrifugation für 2 min bei 13000 upm und RT. Nach Trennung der Phasen wurde der wässrige Überstand mit 1 Volumen Natriumacetat (3M, pH 5,2) und 2-3 Volumen Ethanol (96%) versetzt und 20 min bei -20°C inkubiert. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, im Speedvac-Concentrator getrocknet und anschließend in H₂O gelöst.

2.6.2 Ethanolfällung von DNA

Durch Zugabe von Ethanol und monovalenten Kationen (Ansäuern) kann DNA aus einer wässrigen Lösung gefällt werden. Dazu wurde die DNA-Lösung unter vorsichtigem Mischen mit 2,5 Vol eiskaltem 96% EtOH und 1/10 Vol 3 M NaAc versetzt. Die Fällung erfolgte bei minus 20°C für 20 min (bei Oligonukleotiden eventuell über Nacht). Nach 20minütiger Zentrifugation (Oligonukleotiden bis zu 45 min) bei 13.000 g und 4°C, wurde der Überstand vorsichtig dekantiert. Um das Pellet von Salzresten zu befreien wurde es mit 2 Vol eiskaltem 70% EtOH versetzt. Die Lösung wurde gut durchmischt (Vortex) und erneut für 5 min bei 13.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder

vorsichtig abgeschüttet und das Pellet für 5-15 min in der Speedvac getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in Aqua dest. oder TE (10-20 µl) gelöst.

2.6.3 Isopropanolfällung von DNA

Die Proben wurden entsprechend der in der Probe enthaltenen Mg^{2+} - Ionen äquimolar mit EDTA, anschließend mit 1/10 Vol 3 M NaOAc pH 6,0 und 0,6 Vol 100% Isopropanol versetzt. Die Proben wurden 1 h bei RT inkubiert und 30 min bei 12.000 g und RT zentrifugiert. Dabei bleiben kleinere Fragmente in Lösung. Anschließend wurde, wie oben beschrieben, mit eiskaltem 70% EtOH gewaschen.

2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der in vitro Amplifikation spezifischer Sequenzbereiche (Mullis and Faloona, 1987). Aufgrund des exponentiellen Charakters der Reaktion ist es möglich, wenige Kopien der Zielsequenz stark zu amplifizieren. Die verschiedenen Schritte der Reaktion werden zyklisch, temperaturabhängig durchlaufen. Die doppelsträngige DNA wird in Einzelstränge aufgeschmolzen (Denaturierung). Beim darauf folgenden Abkühlen hybridisieren als Primer bezeichnete Oligonukleotide mit den komplementären Abschnitten der Einzelstränge (Annealing). Im letzten Schritt verlängert die eingesetzte hitzestabile DNA-Polymerase die Primer von 5' nach 3' komplementär zum jeweiligen Einzelstrang (Elongation). Dieser Zyklus wird mehrfach durchlaufen, wobei es zur Akkumulation der Reaktionsprodukte kommt. Mathematisch entspricht dies der Gleichung 1. Wobei N_n die Kopienzahl vor und N_{n+1} die Anzahl der Kopien nach einem Zyklus angibt. Der Faktor X ($0 \leq X \leq 1$) entspricht dem Anteil der Kopien, die während des Zyklus verdoppelt werden.

$$N_{n+1} = (1 + X) \times N_n \quad \text{Gleichung 1}$$

Die Summe aus 1 und dem Faktor X wird üblicherweise als Effizienz E ($1 \leq E \leq 2$) der Reaktion definiert. Unter Annahme einer konstanten Effizienz E_{const} in jedem Zyklus der Reaktion wird die Akkumulation der PCR-Produkte durch die Gleichung 2 beschrieben.

$$N_n = N_0 \times E^n \quad \text{Gleichung 2}$$

N_0 = initiale Kopienzahl der spezifischen Matrizen-DNA

N_n = Produktmenge nach n Zyklen

Diese exponentielle Beziehung gilt jedoch nur in der frühen Phase der PCR. Aus diesem Grund wird diese auch als exponentielle Phase bezeichnet. Im späteren Verlauf sinkt die Effizienz bis zum Erreichen der Plateauphase gegen 1. In dieser Phase werden keine weiteren PCR-Produkte gebildet. Die Ursachen werden z.B. von Morrison und Gannon (1994) diskutiert.

Die Reaktion wurde in 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Es wurde das "PCR Reagent System" der Firma Invitrogen verwendet. Ein Ansatz bestand aus 10x Reaktionspuffer, 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM dNTPs, 0,3 - 1 μM sense- und antisense-Primer, Template-DNA im pg- μg Bereich und 2,5-5 Units Taq-DNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 20 - 50 μl .

Die Schmelztemperatur der Primer sowie die Länge und Basenzusammensetzung der Template-DNA bestimmten das Temperaturprofil. Die Annealing-Temperatur (T_A) lag normalerweise 5 - 10 $^{\circ}C$ unter der Schmelztemperatur (T_m) der Primer. Ein typisches PCR-Temperaturprogramm setzte sich folgendermaßen zusammen:

1. Denaturierung:	94 $^{\circ}C$	4 min
2. Denaturierung:	94 $^{\circ}C$	30 - 60 s
3. Annealing:	50-70 $^{\circ}C$	15 - 60 s
4. Kettenverlängerung (Elongation):	72 $^{\circ}C$	1 min/k b

Die Schritte 2 - 4 werden 30 - 40x wiederholt.

Sollten die PCR-Produkte sequenziert werden, wurde ein Hot-Start durchgeführt, um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen. Hierzu wurde die Taq-Polymerase erst nach dem ersten Denaturierungsschritt zugegeben. Dadurch wurde die Bildung unspezifischer DNA-Fragmente bei niedrigen Temperaturen verhindert.

2.7.1 Auswahl der PCR-Primer

Die Auswahl von Primerpaaren für die PCR erfolgte anhand von Referenzsequenzen aus der Sequenzdatenbank (GenBank). Das wichtigste Kriterium bei der Auswahl von Primern ist ihre ausschließliche Sequenzidentität zur Zielsequenz. Zur Überprüfung wurde das Programm BLAST verwendet. Die weiteren angegebenen Kriterien wurden soweit erfüllt, wie es die Zielsequenz ermöglichte.

1) Die Schmelztemperatur (T_M) gibt die Temperatur an bei der die Hälfte der gebundenen Oligonukleotide vom komplementären Strang abdissoziieren. Sie sollte paarweise möglichst identisch sein und theoretisch 5 - 8 °C oberhalb der gewählten Annealing-Temperatur der PCR liegen. Aus der Literatur sind zahlreiche Methoden zur Bestimmung der Schmelztemperatur bekannt, deren Ergebnisse um bis zu 5 °C differieren. Die in dieser Arbeit angegebenen Werte beziehen sich auf die von der Firma MWG-Biotech angegebene Näherungsformel:

$$T_M = 69,3 + 41 \times \frac{(nC/G)}{s} - \frac{650}{s} \quad \text{Gleichung 3}$$

nC/G: Anzahl der Guanosin- und Cytosin-Basen innerhalb der Sequenz
s: Gesamtzahl der Nukleotide

2) Der G/C-Gehalt sollte zwischen 40 und 60 % betragen.

3) Die Primer sollten keine Sekundärstrukturen (Palindrome) aufweisen, die unter den PCR-Reaktionsbedingungen stabil sind ($T_M > 45$ °C). Zur Überprüfung wurde das Programm mFold (Zuker, 2003) eingesetzt.

4) Zur Vermeidung von Primerdimeren sollten im 3'-Bereich der Primer keine selbst und paarweise komplementären Basenfolgen auftreten. Dies wurde mit dem Programm OligoAnalyzer 3.0 verifiziert.

5) Innerhalb der Primersequenz sollten insbesondere sich direkt wiederholende Abfolgen der Nukleotide Guanosin und Cytosin vermieden werden. Ferner sollten keine repetitiven Sequenzen vorkommen. Die Primer wurden von der Firma MWG bezogen.

2.8 Mycoplasma PCR Primer Set (Stratagene)

Es handelt sich hierbei um einen PCR-gestützten Mycoplasmentest, der die Möglichkeit bietet, Zellkulturen oder verwendete Zellkulturmedien auf eine Mycoplasmenkontamination hin zu überprüfen.

Das Set enthält PCR-Primer sowie ein Template für eine Positiv-Kontrolle und für eine Innere-Kontrolle.

Auf diese Weise kann ein möglicher Mycoplasmenbefall der zu testenden Zellen mit einer Positiv-Kontrolle verglichen werden, wobei die Positiv-Kontrolle genomische DNA von *Mycoplasma orale* enthält.

Der Sinn der so genannten Inneren-Kontrolle besteht darin, dass bei einer schwachen Infektion nur eine schwache positive Bande in den Bereichen der Testreihen ohne die Innere-Kontrolle erscheint. Bei einer starken Infektion hingegen wird auch im Bereich der inneren Kontrolle eine positive Bande erscheinen, deren Intensität in Konkurrenz zur Inneren-Kontrollbande steht. Neben dem Hinweis auf eine Mycoplasmeninfektion kann somit auch auf die Stärke derselben geschlossen werden. Die Lokalisation der Bande (*fingerprint*) hängt vom Stamm der Mycoplasmen ab, der anhand einer mitgelieferten Übersicht auch differenziert werden kann. Die Mycoplasmen-spezifischen PCR-Produkte haben im Allgemeinen eine Größe von 70-80 bp. Die PCR – Produkte wurden mittels einer Gelelektrophorese analysiert.

2.9 Klonierungstechniken

2.9.1 Klonierung von PCR-Produkten

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde das „Original TA-Cloning Kit“ (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. Der in dem Kit verwendete lineare Klonierungsvektor pCR2.1 ermöglicht eine direkte Klonierung von PCR-Produkten, da er am 3'-Ende einen Thymidinüberhang besitzt. Die in dieser Arbeit verwendeten, nativen, Taq-Polymerasen hängen an das 3'-Ende des amplifizierten Fragments einen zusätzlichen Adenosinrest an. Diese überlappenden Enden können sich komplementär anlagern und

werden mittels der im Kit enthaltenen T4-DNA-Ligase verbunden. Die anschließende Transformation wurde unter Verwendung eines Teils des Ligationsansatzes und der im Kit enthaltenen kompetenten Bakterien (INV α F') nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Ansatz wurde auf XIA-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelkolonien wurden zum Anlegen von Bakterien-Dauerkulturen verwendet. Eine „blau-weiß“ Selektion (durch Klonierung in den ORF des lacZ-Gens und Zugabe von IPTG und X-Gal) erleichterte die Suche nach positiven Klonen.

2.9.2 Enzymatische Spaltung von DNA

Restriktionsenzyme haben die Eigenschaft, DNA an spezifischen Erkennungssequenzen zu spalten. Dabei können Fragmente mit einzelsträngigen Überhängen („sticky ends“) oder überhangslose Fragmente („blunt ends“) entstehen. Nachfolgend wird ein Restriktionsverdau mit einem 20 μ l Standardansatz beschrieben: 0,5-1 μ g DNA, 2 μ l Restriktionspuffer (10x), 1 μ l Restriktionsenzym(e) (5-10 Units/ μ l), fehlendes Volumen wird mit destilliertem H₂O ergänzt. Die Restriktionspuffer unterscheiden sich je nach verwendetem Enzym. Beim Erwerb eines Enzyms wird der jeweils optimale Restriktionspuffer mitgeliefert (z.B. Roche, Stratagene). Sollen größere Mengen DNA gespalten werden, so muss der Restriktionsansatz entsprechend verändert werden.

2.9.3 Ligation von DNA-Enden

Die Bildung einer Phosphodiesterbrücke zwischen einer 3'-Hydroxylgruppe und einer 5'-Phosphatgruppe wird unter Spaltung von ATP durch das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert. Um ein „DNA-Insert“ in einen Vektor zu ligieren, wurden 0,5-1 μ g Spender- und Empfängervektor mit gleichen oder kompatiblen Restriktionsenzymen verdaut. Mindestens eines der beiden Enzyme sollte „sticky ends“ liefern. Geöffneter Vektor und ausgeschnittenes „Insert“ wurden über ein Agarosegel und anschließende Elution isoliert. Im anschließenden Ligationsansatz (10 μ l) wurden Vektor und „Insert“ (je 10-100ng) im molaren Verhältnis 1:1 bis 1:10, 10x Ligationspuffer und 1 μ l Ligase (1 Unit/ μ l) über Nacht bei 14°C ligiert. Im Falle von „blunt ends“ Ligationen könnte auch über Nacht bei 22°C inkubiert werden.

2.9.4 Transformation kompetenter Bakterien

Die kompetenten Bakterien (INV α F') wurden nach Vorschrift des „Original TA-Cloning Kit“ (Invitrogen) transformiert, welche auf einem modifizierten Protokoll von Hanahan (1983) basiert. Zu 100 μ l kompetenter Zellen wurden 2 μ l beta-Mercaptoethanol zugegeben, nach vorsichtigem Mischen wurden 1-2 μ l der Ligation in den Ansatz pipettiert. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen einem Hitzeschock (30 s, 42°C) ausgesetzt und anschließend wieder 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 250 μ l SOC Medium zugegeben und 1h bei 37°C mit 225 upm geschüttelt, die Zellen wurden auf XIA-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.9.5 Anlegen von Bakterien-Dauerkulturen als „Glycerol Stocks“

Eine Einzelkolonie von einer XIA-Platte wurde über Nacht in 3 ml LB/Amp Medium inkubiert. In einem Einfrierröhrchen wurden 300 μ l 50 % Glycerol und 700 μ l Bakterien-Suspension vermischt und 15 min bei 20 °C inkubiert. Anschließend wurde die Mischung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.10 DNA-Sequenzierung

Direkte Sequenzierungen von PCR-Produkten wurden von den Firmen MWG und Qiagen durchgeführt. Gereinigte PCR-Produkte und ein passender, unmarkierter Primer wurden an die entsprechende Firma geschickt. Die Sequenzierung erfolgte dort mit farbstoffmarkierten Dideoxynukleotiden (Camacho et al., 1998) in der Kettennabbruchsequenzierung nach Sanger et al. (1977).

Subklonierte Plasmid-DNA wurde mit farbstoffmarkierten Primern (IRD 800) sequenziert. Es wurde das „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (Amersham) verwendet. Die DNA (1 μ g), 2 pmol fluoreszenzmarkierter Primer (IRD 800) und 0,7 μ l DMSO wurden auf 21 μ l Gesamtvolumen mit Wasser aufgefüllt.

Jeweils 4,5 μ l dieses DNA/Primer-Master-Mix wurden zu 1,5 μ l des jeweiligen A- (Mischung aus d-ATP und dd-ATP), G- (Mischung aus d-GTP und dd-GTP), C- (Mischung aus d-CTP und dd-CTP) oder T-Reagenz (Mischung aus d-TTP und dd-TTP)

pipettiert und mit Mineralöl überschichtet. Die Reaktionsbedingungen wurden den Schmelztemperaturen der Primer angepasst:

1. Denaturierung: 2 min, 95 °C
2. Denaturierung: 15 s, 95 °C
3. Annealing: 15 s, bei einer Temperatur die 3 °C höher liegt als die Schmelztemperatur des Primers
4. Extension: 15 s, 70 °C

Die Schritte 2 - 4 wurden 30x wiederholt.

Die mit 4 µl Stopppuffer versetzten Proben wurden durch Pipettieren auf Parafilm vom Mineralöl befreit und auf das nach der Vorschrift von MWG hergestellte Sequenzgel (Sequagel XR, Biozym) aufgetragen. Hier werden bei RT 6 ml Sequagel-Puffer, 24 ml Acrylamid und 240 µl frisch angesetztes 10% APS vermischt und daraus anschließend das Gel gegossen.

Die Trennung durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese und die Detektion der markierten Fragmente erfolgte im LI-COR DNA Sequenzer 4200 bzw. 4200L (MWG) nach der Vorschrift von MWG.

2.11 Gerichtete Mutagenese

Zur Erstellung der in dieser Arbeit beschriebenen Mutation (Cys23Ser), wurde das „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) angewendet. Dabei wurde nach der Instruktion des Herstellers verfahren.

In dem Kit kommt die so genannte PfuTurbo™-DNA-Polymerase zur Anwendung, welche laut Hersteller 6-fach genauer ist, als die üblicherweise genutzte Taq-DNA-Polymerase. Auf diese Weise kommt es zu einer deutlichen Zeitersparnis. Bei der „zirkulären“ PCR dient ein in einen Vektor kloniertes cDNA-Insert als Template. Die synthetisierten Oligonukleotid-Primer (Sense- und Antisense-Primer) mit den gewünschten Mutationen, werden komplementär zueinander ausgesucht.

Nach der Denaturierung des zirkulären Plasmids in der PCR, lagern sich die Oligonukleotid-Primer an denselben Stellen jeweils auf dem komplementären Template-Einzelstrang an. Im Folgenden kommt es dann zur Kettenverlängerung bei der ein

doppelsträngiges Plasmid generiert wird. Allerdings katalysiert die PufTurbo™-DNA-Polymerase nur eine Kettenverlängerung, nicht jedoch einen Lückenschluss. Somit bleibt auch nach vollständiger „Replikation“ des Plasmids ein Einzelstrangbruch am Übergang von neu-polymerisiertem Zweitstrang zum 5´-Ende des Primers, von dem aus die Polymerisation beginnt.

Am Ende dieser Prozedur wird das Replikations-Produkt mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut. Dieses Enzym schneidet nur methylierte beziehungsweise hemimethylierte Erkennungsstellen und verdaut somit nur die parentale Plasmid-DNA. Die neusynthetisierte DNA weist keine solche Methylierungen auf. Anschließend werden die Plasmide mit der gewünschten Mutation in Epicurian Coli® XL1-Blue transformiert. In den Bakterien werden die Einzelstrangbrüche geschlossen. Die Konstrukte wurden durch eine anschließende Sequenzierung verifiziert.

3. Biochemische Methoden

3.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Der Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951). liegt die Farbreaktion eines Kupfer-Proteinkomplexes mit Folin-Reagenz zugrunde. Die Farbintensität der Reaktion ist abhängig von der Menge an Protein.

Alle verwendeten Lösungen (siehe B.1.11) hatten Raumtemperatur (RT). Lösung A wurde frisch hergestellt. Zu 100 ml Lösung A wurden 1,6 ml Lösung B2 und 0,4 ml Lösung B1 gegeben (Reihenfolge beachten!). Es entstand Lösung C. Die Probenansätze, Proteinstandards und Leerwerte wurden folgendermaßen vorbereitet:

- 1) Leerwerte: 900 μ l H₂O+100 μ l Lösungsmittel (ohne Proteine)
- 2) 5 Proteinstandards: je 800 μ l H₂O+100 μ l BSA-Standard (50/ 100/ 300/ 500/ 700 μ g/ml)+100 μ l Lösungsmittel
- 3) Proben: 900 μ l H₂O+100 μ l zu bestimmendes Protein.

Zu 1), 2) und 3) wurden jeweils 2 ml Lösung C gegeben, gemischt (Vortex) und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 0,2 ml Folin-Reagenz zugegeben, gemischt und 50 min bei RT inkubiert. Die Mengenbestimmung der Proteine erfolgte nach photometrischer Vermessung der Proben bei einer Wellenlänge von 750 nm, mit Hilfe einer Eichgeraden aus Proteinstandards.

3.2 Membranpräparation

Alle folgenden Schritte der Membranpräparation wurden auf Eis durchgeführt. Nach Abklopfen der Zellen von der Zellkulturflasche wurden diese in einen Plastik-Zentrifugenröhrchen (Falcon) übertragen und bei 4°C 5min mit 300g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 2ml HEPES-Puffer (pH 7,4) resuspendiert und wieder 5 min zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine erneute Suspendierung in 2ml Hepes-Puffer, wobei die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Ultra-Turrax-Homogenators (2x 5s; 100W) homogenisiert und 20 min bei 40000 g pelletiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2ml Puffer gewaschen und erneut für 20 min zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Suspendierung des Pellets in 0,5 ml Bindungs-Puffer, wobei zur besseren Homogenisierung die Suspension langsam durch

eine Injektionsnadel gespritzt wurde. Der Proteingehalt wurde nach Lowry et al. (1951) (siehe B.3.1) bestimmt und ein Gehalt von 1 mg/ml eingestellt. Die Membranen wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

3.3 Radioligandbindungsstudie

3.3.1 Allgemeine theoretische Grundlagen

Die reversible Interaktion eines Liganden mit einem Rezeptor folgt gemäß Clark (1937) dem Massenwirkungsgesetz und kann durch folgendes Reaktionsschema beschrieben werden:



[L]; [R]: Konzentration des Rezeptors, bzw. des Liganden

k_{+1} ; k_{-1} : Geschwindigkeitskonstante der Assoziation, bzw. der Dissoziation

[RL]: Konzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe

Für die Geschwindigkeit der Bildung des Ligand-Rezeptor-Komplexes v_{hin} gilt:

$$v_{\text{hin}} = k_{+1} \cdot [L] \cdot [R] \quad \text{Gleichung 5}$$

Die Geschwindigkeit der Dissoziation eines Ligand-Rezeptor-Komplexes $v_{\text{rück}}$ ist darstellbar durch:

$$v_{\text{rück}} = k_{-1} \cdot [RL] \quad \text{Gleichung 6}$$

Laufen Hin- und Rückreaktion mit gleicher Geschwindigkeit ab, so befindet sich die Bindungsreaktion im Gleichgewicht. In dieser Situation bleibt [RL] unverändert und es gilt:

$$v_{\text{hin}} = v_{\text{rück}} = k_{+1} \cdot [L] \cdot [R] = k_{-1} \cdot [RL] \quad \text{Gleichung 7}$$

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D lässt sich aus (4) ableiten:

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[L] \cdot [R]}{[RL]} = \frac{1}{K_A} \quad \text{Gleichung 8}$$

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D ist ein Maß für die Affinität des Liganden zum Rezeptor und entspricht derjenigen Konzentration des Liganden, bei der die Hälfte der vorhandenen Rezeptoren durch den Liganden besetzt sind. Eine hohe Affinität geht somit mit einem niedrigen K_D -Wert einher. Die Gleichgewichtsassoziationskonstante K_A als Kehrwert von K_D wird ebenfalls zur Beschreibung der Affinität verwendet.

3.3.2 Theoretische Grundlagen von Sättigungsexperimenten

In einem Sättigungsexperiment wird die Interaktion einer einheitlichen Rezeptorpopulation mit steigenden Konzentrationen eines Radioliganden untersucht. Auf diese Weise werden die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D des Liganden für den Rezeptor sowie die Gesamtzahl der vorhandenen Bindungsstellen B_{max} bestimmt. Trägt man die Zunahme der Konzentration an Rezeptor-Ligand-Komplexen $[RL]$ gegen den Logarithmus der Konzentration an freiem Radioliganden $[L]$ auf, so erhält man eine zunächst relativ steil ansteigende, dann jedoch zunehmend flacher werdende Bindungskurve (Langmuir-Isotherme). Die Bindung des Radioliganden in Abwesenheit eines Kompetitors bezeichnet man die Gesamtbindung. Die unspezifische, nicht rezeptorvermittelte Bindung, die proportional zur Radioligandkonzentration ansteigt und nicht sättigbar ist, wird parallel durch Zugabe eines hohen Überschusses eines strukturell unterschiedlichen, rezeptorspezifischen Inhibitors ermittelt. Durch die Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung resultiert die spezifische Bindung des Radioliganden. Die aus einem Sättigungsexperiment ermittelten Daten der spezifischen Bindung können unter Anwendung von Gleichung (9) mittels nichtlinearer Regression computergestützt analysiert werden:

$$B_{\text{spez}} = \frac{B_{\text{max}} \cdot [L]}{K_D + [L]} \quad \text{Gleichung 9}$$

Die Transformation nach Scatchard (1949) stellt eine Form der Linearisierung von Gleichung (9) dar:

$$\frac{B_{\text{spez}}}{[L]} = \frac{B_{\text{max}} - B_{\text{spez}}}{K_D} = -\frac{1}{K_D} B_{\text{spez}} + \frac{B_{\text{max}}}{K_D} \quad \text{Gleichung 10}$$

Wird die Konzentration an spezifisch gebundenem Radioliganden durch die Konzentration an freiem Radioliganden ($B_{\text{spez}}/[L]$) gegen die Konzentration an spezifisch gebundenem Radioliganden B_{spez} aufgetragen, so resultiert eine Gerade, die mittels linearer Regression anhand der Geradengleichung (10) analysiert werden kann. Aus dem negativen Kehrwert der Steigung dieser Regressionsgeraden lässt sich, da die Konzentrationen an freiem $[L]$ und gebundenem Radioliganden (B_{spez}) bekannt sind, ein Schätzwert für K_D und aus dem Schnittpunkt dieser Geraden mit der Abszisse ein Schätzwert für B_{max} ermitteln.

Um die nach Scatchard transformierten Bindungsdaten eines Sättigungsexperimentes auswerten zu können, müssen gemäß Bennett und Yamamura (1985) folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

- Die Interaktion zwischen der einheitlichen Rezeptorpopulation und dem Liganden muss zum Zeitpunkt der Messung im Gleichgewicht sein, bzw. dem Massenwirkungsgesetz folgen.
- Maximal 10% der eingesetzten Ligandkonzentration $[L_T]$ dürfen im Rezeptor-Ligand-Komplex $[RL]$ gebunden vorliegen, damit die freie Ligandkonzentration $[L]$ mit der eingesetzten Ligandkonzentration $[L_T]$ gleichgesetzt werden darf.

Gemäß Bennett und Yamamura (1985) beinhaltet die Methode nach Scatchard aufgrund der reziproken Auftragungsweise eine unterschiedliche Gewichtung der Messpunkte (die relativ größeren Messfehler bei niedrigen Konzentrationen des Radioliganden werden

überbewertet), so dass diese Bestimmung von K_D und B_{max} statistisch weniger exakt ist, als die mittels nichtlinearer Regression; nur letzteres Verfahren wurde hier verwendet.

3.3.3 Durchführung der Sättigungsexperimente

Alle Bindungsversuche wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die einzelnen, in Bindungs-Puffer aufgenommenen Bestandteile wurden in 2 ml Reaktionsgefäße ohne Deckel pipetiert. Die Ansätze hatten ein Gesamtvolumen von 500 μ l, enthielten 100 μ l der Membransuspension und ansteigende Konzentrationen des Radioliganden [3 H]Mesulergine. Hierfür wurden zwei Stammlösungen mit 30nM und 10nM [3 H]Mesulergine erstellt, die dann entsprechend der Endkonzentrationen 1:10 bzw. 1:100 verdünnt wurden. Somit ergab sich die Konzentrationsreihe von 0,1nM, 0,3nM, 1nM, 3nM, 10nM und 30nM. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden parallele Ansätze unter Zusatz von 30,5 μ M ($635 \times K_D$) Ketanserin-Tartrat angesetzt. Dieses wurde in 5 μ l Ethanol hinzugefügt. Die Membranen wurden 60 min unter wiederholtem Schütteln bei Raumtemperatur (20 $^{\circ}$ C) inkubiert. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden die Ansätze mit einem Zell-Harvester durch mit Filtrationspuffer getränkte GF/B-Filter gesaugt. Die Filter mit den zurückgehaltenen Zellmembranen wurden 3x mit 1,5 ml Filtrationspuffer gewaschen und in Zählfläschchen (Mini PolyQ Vials) überführt. Nach Zugabe von 5 ml Szintillationscocktail wurden diese über Nacht geschüttelt. Danach wurde die Tritiumaktivität (dpm-Werte) im Szintillationszähler gemessen. Es folgt die graphische Darstellung eines idealisierten Sättigungsversuchs.

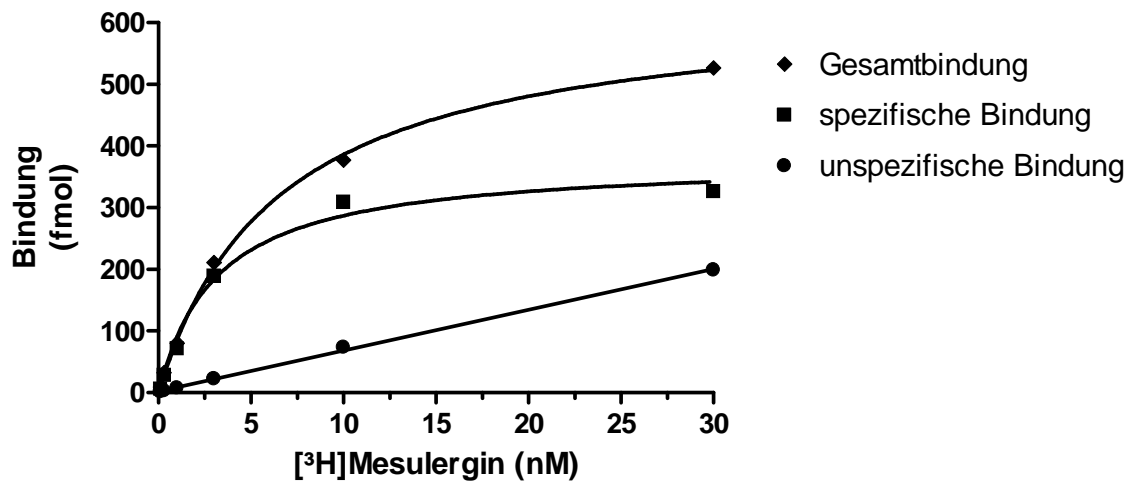


Abbildung 2: Darstellung eines idealisierten Sättigungsversuch mit [³H]Mesulergin.

Gezeigt wird die Kurve der spezifischen Bindung, die sich durch Subtraktion der Kurve der unspezifischen Bindung von der Kurve der Gesamtbindung ergibt (siehe B.3.3.2). Hierdurch wird deutlich, dass die Kurve der spezifischen Bindung immer eine Sättigungskurve darstellt. Die Abszisse zeigt die Konzentration des Radioliganden [³H]Mesulergin in nM. Die Ordinate zeigt die Bindung in fmol an. Bei einer spezifischen Aktivität von 84 Ci/mmol entspricht 1 fmol einer Aktivität von 84pCi und entspricht im Szintillationszähler 186,5 dpm (1pCi = 2,22 dpm).

4. Zellkulturmethoden

4.1 Mediumwechsel

Durch den pH-Indikator Phenolrot im Zellkulturmedium konnte über eine Verfärbung desselben auf eine Änderung des pH-Wertes geschlossen werden. Dabei wird ein neutraler pH-Wert durch Kirschrot angezeigt, wobei eine Verfärbung nach Gelb auf den sauren Bereich hinweist und eine Verfärbung nach Pink auf den basischen Bereich.

Bei entsprechenden Veränderungen wurde dann das Medium abgesaugt und durch frisches ersetzt (175 cm² Kulturflasche: 30ml, 75 cm² Kulturflasche: 15ml, 25 cm² Kulturflasche: 5ml). Bei schlecht wachsenden Zellen wurde das alte Medium nicht vollständig entfernt, sondern ein Rest auf den Zellen belassen, um bereits gebildete Wachstumsfaktoren nicht vollständig zu entfernen.

4.2 Auftauen von Zellen

Vor dem eigentlichen Auftauen der Zellen stand die Vorbereitung adäquater Zellkulturbedingungen. Zu diesem Zweck wurde ein 50ml Zentrifugenröhrchen mit auf 37°C erwärmtem Medium gefüllt und in einer 175cm² Zellkulturflasche 20ml Medium vorgelegt.

Die in Einfrierröhrchen befindlichen Zellen wurden schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden dann die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 800-1000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zell-Pellet in 10ml Kultur-Medium resuspendiert und anschließend in 175 ml Zellkulturflaschen überführt. Ein Mediumwechsel erfolgte 24h später.

4.3 Teilen von Zellen

Die konfluenten HEK293-Zellen wurden nach Absaugen des Kulturmediums in einem kleinen Mediumrest mechanisch durch Klopfen auf die Zellkulturflasche gelöst. Den Zellen wurde 20 ml Medium zugegeben und die Zellsuspension wurde bei 800 - 1000 upm für 5 min pelletiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren in 30 ml frischem Medium resuspendiert und je nach Bedarf geteilt.

4.4 Einfrieren von Zellen

Die Zellen einer 175 cm² Kulturflasche wurden vom Flaschenboden gelöst, wie unter B 4.3 beschrieben. Nach Resuspendierung in 4,5 ml des jeweiligen Mediums wurden 0,5 ml DMSO zugegeben und durch Pipettieren gemischt. Optional konnte auch eine 90% Medium/10% DMSO Einfrierlösung vorbereitet werden, in der die Zellen direkt resuspendiert wurden. Die Zellen wurden auf Einfrierröhrchen (Cryovials; je ca. 1,5 ml) verteilt und in einer Einfrierbox langsam auf -80°C gebracht. Nach 24 h wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt oder für kurze Zeit bei -80°C gelagert.

4.5 Umsetzen von Zellkulturen

Umsetzen von Schalen oder Multiwell-Platten in 75 cm² Flaschen: In der Kulturflasche wurden 13 ml Medium vorgelegt. Die Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren mit 2 ml frischem Medium vom Boden der Schale abgelöst. War dies nicht möglich, wurden die Zellen, wie unter B.4.3 beschrieben, abgelöst, pelletiert und in 2 ml frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in die vorbereitete Kulturflasche überführt. Das Umsetzen von kleineren in größere Kulturflaschen geschah analog.

4.6 Transiente Transfektion von Zellen

Die Transfektion erfolgte durch Lipofektion mit Transit. Die Zellen wurden 24h vor der Transfektion in 175 ml Zellkulturflaschen in 35 ml Medium (ohne FKS und P/S) ausgesät. Die Transfektion erfolgte bei ca. 70% Konfluenz mit einer Mischung aus 35µg cDNA, 105µl Transit (TransIT®-293/ Mirus) und 1750µl Medium ohne FKS und P/S. Medium und Transit wurden für 10 min bei RT inkubiert bevor die cDNA hinzugefügt wurde. Diese Mischung musste für weitere 10 min RT ruhen, bevor der Ansatz den Zellen hinzugefügt wurde. Nach 48h Inkubation (bei 37°C unter 5 % CO₂) und einer Konfluenz der Zellen von ca. 90 % konnten aus den Zellen Membranen gewonnen werden (siehe 3.2).

5. Computerprogramme und Auswertung

Für die Molekularbiologie (PCR etc.) wurden die Programme BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), OligoAnalyzer 3.0 (Integrated DNA Technologies (IDT)) und mFOLD (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu> (integriert in OligoAnalyzer 3.0)) eingesetzt. Die Auswertung der Bindungsdaten erfolgte mit Hilfe von PRISM 4.0 (GraphPad). Statistische Auswertungen wurden mit GraphPad InStat (GraphPad) durchgeführt. Bei den angegebenen Mittelwerten handelt es sich um arithmetische Mittel nach:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \text{Gleichung 11}$$

\bar{x} : Arithmetischer Mittelwert
 x_i : Einzelmesswert
 n : Anzahl der Messwerte

Als Maß der Streuung ist der Standardfehler des Mittelwerts $s_{\bar{x}}$ angegeben. Er lässt sich anhand folgender Formel ermitteln:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{Gleichung 12}$$

Die enthaltene Standardabweichung s ergibt sich aus:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Gleichung 13}$$

Mittelwerte von Gruppen wurden mittels eines zweiseitigen, ungepaarten Student-t-Tests auf signifikante Unterschiede geprüft, unter der Voraussetzung, dass sich die Standardabweichungen der zu vergleichenden Mittelwerte nicht signifikant voneinander unterscheiden. Diese Voraussetzung wurde mittels F-Test verifiziert.

Lag die Irrtumswahrscheinlichkeit bei $p \leq 0,05$ wird der Unterschied als signifikant (*) erachtet. Die beschriebenen statistischen Methoden sind nur anwendbar, wenn die Messwerte normalverteilt sind.

C. Ergebnisse

1. Klonierung und molekularbiologische Charakterisierung des humanen 5-HT_{2C}-Rezeptors und seiner 5-HT_{2C}Cys23Ser-Variante.

1987 wurde zum ersten Mal die genomische Struktur des 5-HT_{2C}-Rezeptors an Mäusen beschrieben (Lubbert et al., 1987). Ein Jahr später folgte die Entschlüsselung des Gens der Ratte (Julius et al., 1988). Damals war der Rezeptor noch unter dem Namen 5-HT_{1C} bekannt; dieser war erstmals 1984 pharmakologisch charakterisiert worden (Pazos et al., 1984). Es folgte die Klonierung der partiellen cDNA des humanen 5-HT_{2C}-Rezeptors durch Saltzman et al. (1991). Lappalainen et al. (1995) beschrieben erstmalig einen Einzelbasenaustausch (SNP) von Guanin zu Cytosin (G68C) an Position 68 der kodierenden Sequenz. Dieser bedingt auf Proteinebene an Position 23 eine Transversion von Cytosin zu Serin.

1.1 Amplifikation und Klonierung des 5-HT_{2C}-Rezeptors

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die cDNA des humanen 5-HT_{2C}-Rezeptors sowie seiner natürlich vorkommenden Variante 5-HT_{2C}-cys23ser in einen Vektor kloniert und unter Kontrolle eines viralen CMV-Promotors exprimiert. Hierzu wurde zum einen 1µg RNA aus einem humanen RNA-Pool („Brain“ und „Cerebellum“, Clontech) mittels einer Reversen-Transkriptase (Superscript II, Life Technologies) in cDNA umgeschrieben (siehe B.2.5) und zum anderen stand ein „Cortex“-cDNA-Pool von 70 Patienten zur Verfügung. Anhand dieser cDNAs wurden insgesamt 23 PCRs durchgeführt. Die Auswahl der entsprechenden Primer für die PCR erfolgte anhand der bekannten Referenzsequenz (Saltzman et al., 1991) aus der Sequenzdatenbank (GenBank, Accession-Nr. U49516.1) und sah wie folgt aus:

„sense“ – Primer:

5-HT_{2C}s1: 5´- ATG GTG AAC CTG AGG AAT GC – 3´

„antisense“ – Primer:

5-HT_{2C}as2: 5´- TCA CAC ACT GCT AAT CCT TTC – 3´

Ergebnisse

Die PCR-Reaktion wurde mit der Taq-Polymerase nach Vorschrift des Herstellers (Invitrogen) unter folgenden Temperaturbedingungen durchgeführt:

1. Denaturierung (initial): 94 °C, 10 min
2. Denaturierung: 94 °C, 1 min
3. Annealing: 58 °C, 0,5 min
4. Elongation: 72 °C, 2 min

Die Schritte 2-4 wurden 35 x wiederholt. Eine abschließende Inkubation erfolgte für 7 min bei 72°C. Die PCR-Produkte der erwarteten Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert in den Vektor pCR2.1 kloniert. Nach Durchführung der Mini Präparation (siehe B.2.1.2) wurden die erhaltenen Klone mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und XhoI geschnitten und auf einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt. Stellvertretend sind in der folgenden Abbildung 6 Klone dargestellt.

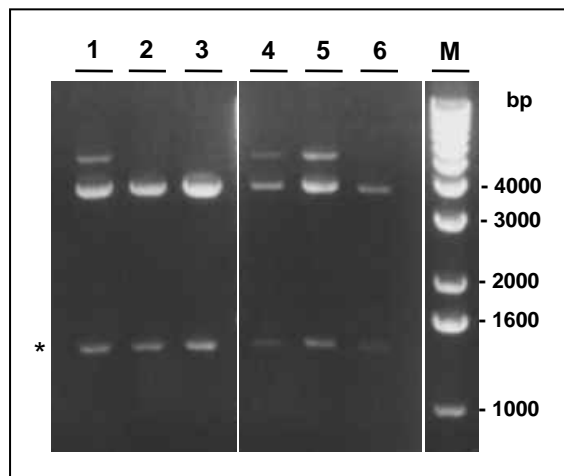


Abbildung 3: Agarose-Gelelektrophorese (0,8%) der klonierten Amplifizierungsergebnisse des 5-HT_{2c}-Rezeptors

Die Inserts sind aus dem Vektor pCR2.1 mit BamHI und XhoI herausgeschnitten.

Die Zahlen entsprechen den Klonen. Mit Sternchen markiert sind die Insert-Banden bei 1,4 kb.

Die Banden bei 3,9 kb entsprechen dem geschnittenen Vektor.

M: Marker („1 kb DNA Ladder“, Invitrogen)

Im Anschluss erfolgte die Sequenzierung. Keine der sequenzierten Klone entsprach exakt der Referenzsequenz. Neben einigen in einzelnen Klonen auftretenden Basenaustauschen, die auf die eingesetzten Polymerasen (Reverse Transkriptase, Taq-Polymerase) zurückzuführen waren, wies ein Drittel der Klone eine 95 Basendeletion auf. Auf dieses Phänomen geht das Kapitel C.1.3 und D. 2. der vorliegenden Arbeit näher ein. Interessanterweise wies keine der Sequenzen, die in der Literatur beschriebene Variante an Position 68 der kodierenden Sequenz, auf. Zur Generierung eines zur Referenzsequenz homologen Klons wurden aus den Klonen 2 und 5 die richtigen Fragmente herausgeschnitten. Klon 2 wurde mit BamHI und AVAII und Klon 5 mit AVAII und XhoI geschnitten. Die korrekten Basensequenzen wurden in den zuvor mit BamHI und XhoI geschnittenen Vektor pCR2.1 religiert und bildeten den Klon 2-5, der nun die korrekte Referenzsequenz aufwies. Die folgende Abbildung veranschaulicht diesen Vorgang.

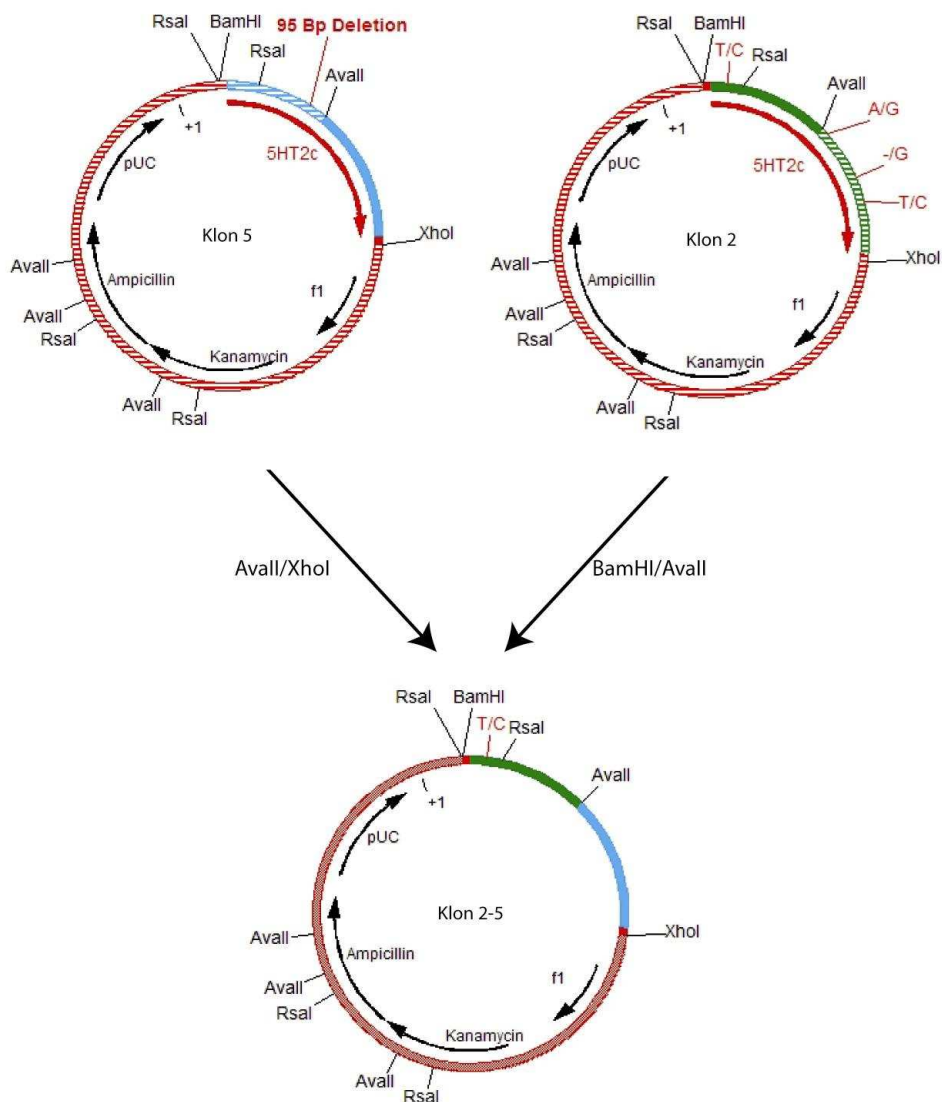


Abbildung 4: Darstellung der Klonierung des 5-HT_{2c}-Rezeptors (Teil 1)

Klon 2 wurde mit BamHI und AVAII (Basen 0 – 653 (grün) – oben rechts) und Klon 5 mit AVAII und XhoI (Basen 654 –1377 (blau) – oben links) geschnitten. Die erhaltenen Fragmente wurden in den Vektor pcR 2.1 ligiert, der zuvor mit BamHI und XhoI geschnitten wurde.

Der neue Klon 2-5 wies noch einen Basenaustausch an Position 75 auf (ATC – ATT). Obwohl dieser auf Proteinebene keinen Aminosäureaustausch bedingt, wurde zur Generierung der exakten Referenzsequenz dieser Basenaustausch ebenfalls mittels Restriktion korrigiert. Hierzu wurde Klon 5 mit BamHI und RsaI und der Klon 2-5 mit RsaI und XhoI geschnitten. Die erhaltenen Fragmente wurden wiederum in den zuvor

Ergebnisse

mit BamHI und XhoI geschnittenen Vektor pCR2.1 religiert. Abbildung 5 veranschaulicht diesen Vorgang.

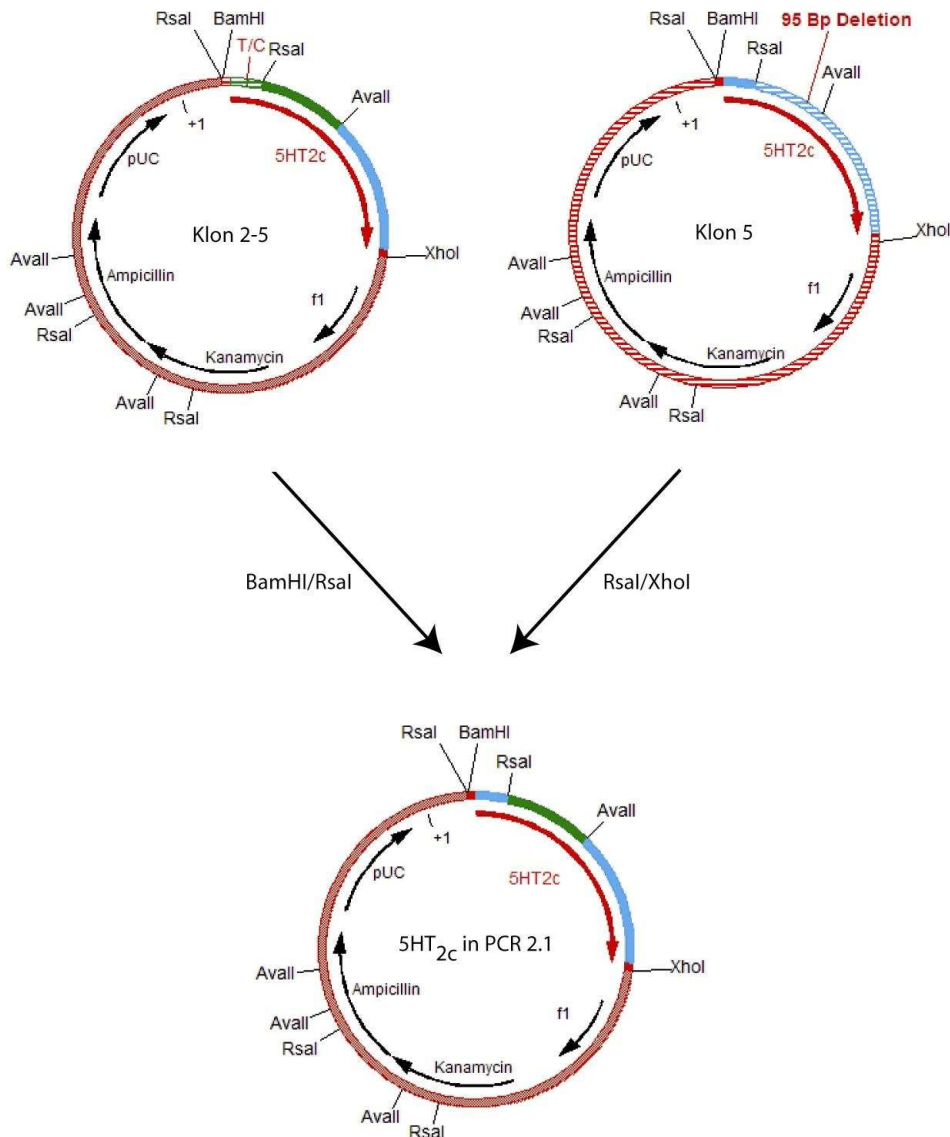


Abbildung 5: Klonierung des 5-HT_{2c}-Rezeptors (Teil 2)

Der Klon 2-5 weist einen Basenaustausch an Position 75 auf (ATC gegen ATT). Dieser wurde mittels Restriktion korrigiert. Hierfür wurde Klon 5 mit BamHI und RsaI (Basen 0-155 (blau) - oben rechts) geschnitten und der neue Klon 2-5 mit RsaI und XhoI (Basen 156-1377 (grün und blau) - oben links) verdaut. Die entsprechenden Fragmente wurden wiederum in den Vektor pCR2.1 ligiert (blau, grün, blau - unten). Dieser neue Klon hatte die exakte Sequenz des 5-HT_{2c}-Rezeptors.

Ergebnisse

Zur Kontrolle wurde der neue Klon mittels Sequenzierung verifiziert und war identisch mit der Referenzsequenz. Die Ergebnisse aller hier verwendeten Sequenzen werden im Folgenden dargestellt.

5HT2cR: atgggtgaacctgaggaatgcggtgcattcattccttgtgcacctaattggcctattggtt 60
Klon2 atgggtgaacctgaggaatgcggtgcattcattccttgtgcacctaattggcctattggtt
Klon5 atgggtgaacctgaggaatgcggtgcattcattccttgtgcacctaattggcctattggtt

5HT2cR: tggcaatgtgatatttctgtgagcccagtagcagctatagtaactgacattttcaatacc 120
Klon2 tggcaatgtgatatttctgtgagcccagtagcagctatagtaactgacattttcaatacc
Klon5 tggcaatgtgatatttctgtgagcccagtagcagctatagtaactgacattttcaatacc

RsaI

5HT2cR: tccgatggtggacgcttcaaattcccagacggggtacaaaaactggccagcactttcaatc 180
Klon2 tccgatggtggacgcttcaaattcccagacggggtacaaaaactggccagcactttcaatc
Klon5 tccgatggtggacgcttcaaattcccagacggggtacaaaaactggccagcactttcaatc

5HT2cR: gtcatacataataatcatgacaataggtggcaacatccttgtgatcatggcagtaagcatg 240
Klon2 gtcatacataataatcatgacaataggtggcaacatccttgtgatcatggcagtaagcatg
Klon5 gtcatacataataatcatgacaataggtggcaacatccttgtgatcatggcagtaagcatg

5HT2cR: gaaaagaaactgcacaatgccaccaattacttcttaatgtccctagccattgctgatatg 300
Klon2 gaaaagaaactgcacaatgccaccaattacttcttaatgtccctagccattgctgatatg
Klon5 gaaaagaaactgcacaatgccaccaattacttcttaatgtccctagccattgctgatatg

5HT2cR: ctagtgggactacttgtcatgcccctgtctctcctggcaatcctttatgattatgtctgg 360
Klon2 ctagtgggactacttgtcatgcccctgtctctcctggcaatcctttatgattatgtctgg
Klon5 ctagtgggactacttgtcatgcccctgtctctcctggcaatcctttatgattatgtctgg

5HT2cR: ccactacctagatatttgtgccccgtctggatttcttttagatgttttattttcaacagcg 420
Klon2 ccactacctagatatttgtgccccgtctggatttcttttagatgttttattttcaacagcg
Klon5 ccactacctagatatttgtgccccgtctggatttcttttagatgttttattttcaacagcg

5HT2cR: tccatcatgcacctctgcgctatatcgcctggatcggtatgtagcaatacgtaatcctatt 480
Klon2 tccatcatgcacctctgcgctatatcgcctggatcggtatgtagcaatacgtaatcctatt
Klon5 tccatcatgcacctctgcgctatatcgcctggatcg-----

5HT2cR: gagcatagccggtttcaattcgcggactaaggccatcatgaagattgctattgtttgggca 540
Klon2 gagcatagccggtttcaattcgcggactaaggccatcatgaagattgctattgtttgggca
Klon5 -----

5HT2cR: atttctataggtgtatcagttcctatccctgtgattggactgagggacgaagaaaagggtg 600
Klon2 atttctataggtgtatcagttcctatccctgtgattggactgagggacgaagaaaagggtg
Klon5 -----gtgtatcagttcctatccctgtgattggactgagggacgaagaaaagggtg

AVAII

Ergebnisse

5HT2cR: ttcgtgaacaacacgacgtgcggtgctcaacgacccaaatcttcttattgggtccttc 660
Klon2 ttcgtgaacaacacgacgtgcggtgctcaacgacccaaatcttcttattgggtccttc
Klon5 ttcgtgaacaacacgacgtgcggtgctcaacgacccaaatcttcttattgggtccttc

5HT2cR: gtagctttcttcataaccgctgacgattatgggtgattacgtattgctgacctctacgtt 720
Klon2 gtagctttcttcataaccgctgacgattatgggtgattacgtattgctgacctctacgtt
Klon5 gtagctttcttcataaccgctgacgattatgggtgattacgtattgctgacctctacgtt

5HT2cR: ctgcgccgacaagctttgatggtactgcacggccacaccgaggaaccgctggactaagt 780
Klon2 ctgcgccgacaagctttgatggtactgcacggccacaccgaggaaccgctggactaagt
Klon5 ctgcgccgacaagctttgatggtactgcacggccacaccgaggaaccgctggactaagt

5HT2cR: ctggatttctcgaagtgctgcaagaggaatacggccgaggaagagaactctgcaaaccct 840
Klon2 ctgcgccgacaagctttgatggtactgcacggccacaccgaggaaccgctggactaagt
Klon5 ctgcgccgacaagctttgatggtactgcacggccacaccgaggaaccgctggactaagT

5HT2cR: aaccaagaccagaacgcacgcccgaagaaagaagaaggagagacgtcctagggggaccatg 900
Klon2 aaccaagaccagaacgcacgcccgaagaaagaagaaggagagacgtcctagggggaccatg
Klon5 AAccaagaccagaacgcacgcccgaagaaagaagaaggagagacgtcctagggggaccatg

5HT2cR: caggctatcaacaatgaaagaaaagcttcgaaagtccttgggattgttttctttgtggtt 960
Klon2 caggctatcaacaatgaaagaaaagcttcgaaagtccttgggattgttttctttgtggtt
Klon5 caggctatcaacaatgaaagaaaagcttcgaaagtccttgggattgttttctttgtggtt

5HT2cR: ctgatcatgtgggtgcccatttttaccatcaaatattctgtctgttctttgtgagaagtcc 1020
Klon2 ctgatcatgtgggtgcccatttttaccatcaaatattctgtctgttctttgtgagaagtcc
Klon5 ctgatcatgtgggtgcccatttttaccatcaaatattctgtctgttctttgtgagaagtcc

5HT2cR: tgtaacccaaaagctcatggaaaagcttctgaatgtggttggattggctatggttgt 1080
Klon2 tgtaacccaaaagctcatggaaaagcttctgaatgtggttggattggctatggttgt
Klon5 tgtaacccaaaagctcatggaaaagcttctgaatgtggttggattggctatggttgt

5HT2cR: tcaggaatcaatcctctgggtgtatactctgttcaacaaaatttaccgaagggcattctcc 1140
Klon2 tcaggaatcaatcctctgggtgtatactctgttcaacaaaatttaccgaagggcattctcc
Klon5 tcaggaatcaatcctctgggtgtatactctgttcaacaaaatttaccgaagggcattctcc

5HT2cR: aactatcttgcggttgcaattataaggtagagaaaaagcctcctgtcaggcagattccaaga 1200
Klon2 aactatcttgcggttgcaattataaggtagagaaaaagcctcctgtcaggcagattccaaga
Klon5 aactatcttgcggttgcaattataaggtagagaaaaagcctcctgtcaggcagattccaaga

5HT2cR: gttgccgccactgctttgtctgggagggagcttaatgttaacatttatcggcataccaat 1260
Klon2 gttgccgccactgctttgtctgggagggagcttaatgttaacatttatcggcataccaat
Klon5 gttgccgccactgctttgtctgggagggagcttaatgttaacatttatcggcataccaat

5HT2cR: gaaccggtgatcgagaaagccagtgacaatgagcccggatagagatgcaagttgagaat 1320
Klon2 gaaccggtgatcgagaaagccagtgacaatgagcccggatagagatgcaagttgagaat
Klon5 gaaccggtgatcgagaaagccagtgacaatgagcccggatagagatgcaagttgagaat

```

5HT2CR: ttagagttaccagtaaatccctccagtggttagcgaaaggattagcagtggtgta 1377
Klon2   ttagagttaccagtaaatccctccagtggttagcgaaaggattagcagtggtgta
Klon5   ttagagttaccagtaaatccctccagtggttagcgaaaggattagcagtggtgta
    
```

Abbildung 6: Darstellung der DNA-Sequenz des 5-HT_{2C}-Rezeptors, sowie der zu seiner Klonierung verwendeten Klon 2 und 5

Mit Rot sind die Abweichungen von Klon 2 und 5 zur Referenzsequenz des 5-HT_{2C}-Rezeptors markiert. Mit RsaII und AVAII sind die Schnittstellen der Restriktionsenzyme gekennzeichnet, die beim Klonieren des WTs aus Klon 2 und 5 zum Einsatz kamen. Da Klon 5 eine Splice-Variante (SpIV) darstellt ist das letzte gemeinsame Codon vom 5-HT_{2C}-Rezeptor und Klon 5 unterstrichen. Dieser weist im Verlauf eine Basendeletion von 95 bp ab Base 456 auf. Durch die Deletion ergibt sich eine Leserasterverschiebung mit einem Stop-Codon ab Base 840 (groß geschrieben und unterstrichen). Die Farbfolge gelb, blau und grün dient der Veranschaulichung der sich ergebenden Leserasterverschiebung der SpIV im Vergleich zum Wildtyp (WT).

1.2 Generierung der kodierenden Sequenz der 5-HT_{2C}Cys23Ser-Variante

Da die kodierende Sequenz der Cys23Ser-Variante in keiner der untersuchten Gen-Pools aufgefunden wurde, wurde der zu Grunde liegende Einzelbasenaustausch (G68C) mittels gerichteter Mutagenese (side directed mutagenesis) nach dem „Quick Change“ Protokoll eingeführt (siehe B.2.11).

WT:	61	5´-tgg	caa	tgt	gat	att-3´	...
	20		W	Q	C	D	I
Mut:	61	5´-tgg	caa	tct	gat	att-3´	...
	20		W	Q	S	D	I

Abbildung 7: Vergleich der Basen- und der AS-Sequenzen vom WT und der 5-HT_{2C}Cys23Ser-Variante (Mut)

Farblich markiert ist das Basen-Trippllett, welches zum Aminosäureaustausch führt. Die Nummern sind die jeweiligen Stellen der Basen und der AS in der DNA-Sequenz des 5-HT_{2C}-Rezeptors.

Als Vorlage diente die zuvor klonierte cDNA des 5-HT_{2C}-Rezeptors (siehe C.1.1), welche vom Vektor pCR 2.1 umfasst wird. Es wurden folgende Primer eingesetzt, um die spezifische Mutation Cystin gegen Serin an Position 23 herbeizuführen:

„sense“-Primer: 5` - gc cta ttg gtt tgg caa tct gat att tct gtg agc c -3`
„antisense“-Primer: 5` - g gct cac aga aat atc aga ttg cca aac caa tag gc -3`

Nach der Mutagenese wurde die Sequenz mittels Restriktion verifiziert. Hierzu wurde die erstellte Mutante Cys23Ser mit dem Enzym BsrDI verdaut. Dieses eignet sich durch den Muations-bedingten Restriktionspolymorphismus zur Unterscheidung von Wildtyp (WT) und Mutante (Mut) (siehe C.1.4, Abbildung 9).

Für den WT ergeben sich hier die Banden 2,46 kb, 1,43 kb, 1,18 kb, 0,22 kb und für die Mutante die Banden 2,46 kb, 1,65 kb und 1,18 kb (Bild nicht gezeigt). In Abbildung 8 (siehe C.1.4) wird ein Restriktionsverdau zur Unterscheidung von WT und Mutante nach Umklonierung in den Expressionsvektor pcDNA3 gezeigt.

1.3 Alternative Splicevariante

Ein Vergleich der Sequenzierungsergebnisse der unterschiedlichen Klone mit der von Saltzmann et al. (1991) publizierten Referenzsequenz des 5-HT_{2C}-Rezeptors ergab, dass ein Drittel der Klone, wie auch der in C.1.1 verwendete Klon 5, eine Deletion von 95 Basen zwischen Position 455 und 551 im „open reading frame“ (ORF) aufwies. Die unmittelbare Nähe zum 6. Exon ließ die Vermutung aufkommen, dass es sich hierbei um eine alternative Splicevariante (SpIV) handeln musste. Die Basendeletion führt zu einer Leserasterverschiebung („Frameshift“) mit Änderung der AS-Sequenz ab AS 154 (siehe C.1.2, Abbildung 6). Genauere Literaturstudien ergaben, dass diese Variante bereits beschrieben wurde (Xie et al., 1996). Es galt zu klären, ob diese SpIV eine Rezeptoraktivität besitzt. Dafür führten wir mit dieser Variante pharmakologische Bindungsversuche durch. Diese Versuche mit transient transfizierten HEK293-Zellen zeigten jedoch, dass diese SpIV keine Bindungsaktivität aufwies (Daten nicht gezeigt).

1.4 Umklonierung des 5-HT_{2C}-Rezeptors und seiner 5-HT_{2C}Cys23Ser-Variante in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3

Zur experimentellen Untersuchung der Auswirkungen des Aminosäureaustauschs Cys23Ser auf die Rezeptorfunktion wurde die kodierende Sequenz des WT und der Mutante nach der in Kapitel B.2.11 und C.1.2 beschriebenen Mutagenese in den Expressionsvektor pcDNA3 umkloniert. Hierzu wurden die Sequenzen aus dem pcR2.1-

Vektor mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI herausgeschnitten. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Banden aus dem Gel herausgeschnitten eluiert und aufgereinigt. Es folgte die Ligation der cDNAs in den ebenfalls mit BamHI und XhoI aufgeschnittenen eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3. Nach der Ligation wurde mittels Restriktion geprüft ob der WT und die Mutante im Expressionsvektor vorlagen. Hierzu wurden die Klone mit dem Enzym BsrDI verdaut. Dieses eignet sich durch den Mutations-bedingten Restriktionspolymorphismus zur Unterscheidung von WT und Mutante. Für den WT ergeben sich hier die Banden 2,86 kb, 1,95 kb, 1,6 kb, 0,25 kb, 0,16 kb und für die Mutante 2,86 kb, 1,95 kb, 1,85 kb und 0,16 kb. Abbildung 8 zeigt einen Ausschnitt dieses Restriktionsverdaus.

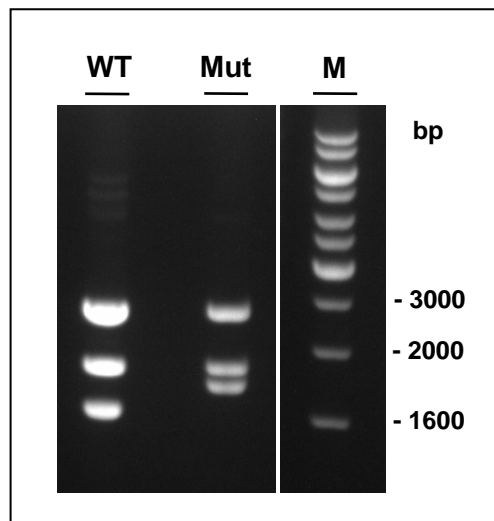


Abbildung 8: Agarose-Gelelektrophorese (0,8%) des 5-HT_{2C}-Rezeptors und der Mutante 5-HT_{2C}Cys23Ser im Expressionsvektor pcDNA3 geschnitten mit BsrDI

Zur Verifizierung der Umklonierung wurden der WT und die Mutante (Mut) mit dem Enzym BsrDI geschnitten. Dieses eignet sich durch den Mutations-bedingten Restriktionspolymorphismus zur Unterscheidung von WT und Mutante. Dargestellt sind die erwarteten Banden des WT (2,86 kb, 1,95 kb, 1,6 kb) und der Mutante (2,86 kb, 1,95 kb, 1,85 kb). M: Marker („1 kb DNA Ladder“, Invitrogen).

Der eukaryotische Expressionsvektor pcDNA3 besitzt eine Ampicillin- und eine Neomycin-Resistenz und eignet sich für die Etablierung von transient und stabil

transfizierter Zelllinien, wie auch die nachfolgend verwendeten HEK293-Zellen. Abbildung 9 veranschaulicht die Umklonierung in diesen Vektor.

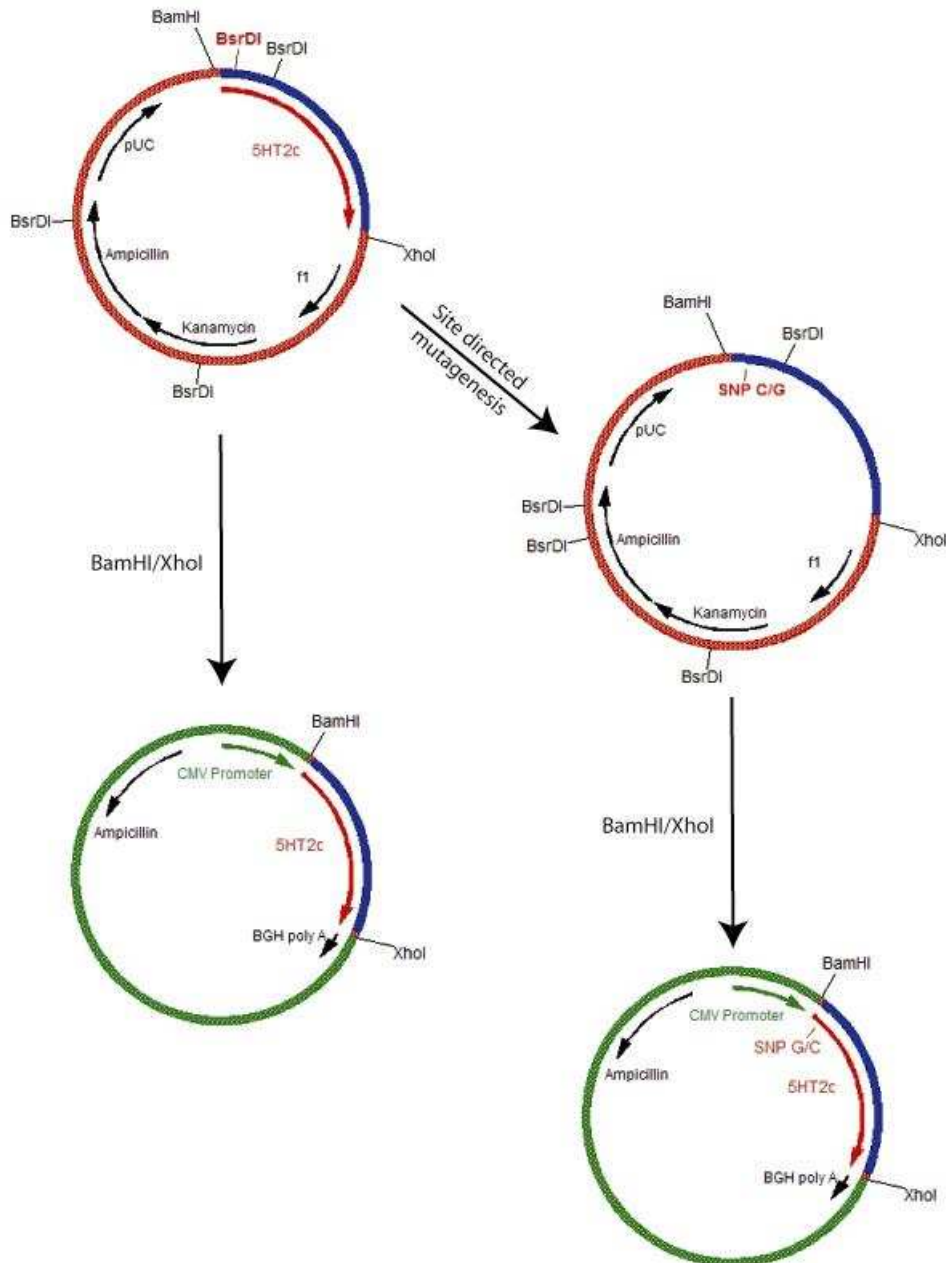


Abbildung 9: Umklonierung der 5-HT_{2c}-Rezeptor-cDNA und seiner Variante 5-HT_{2c}Cys23Ser in den Expressionvektor pcDNA3

Zur transienten Transfektion des WT und der Mutante in HEK293-Zellen mussten die cDNAs in den Expressionsvektor pcDNA3 umkloniert werden. Hierzu wurden diese Sequenzen (blau) aus

dem pcR2.1-Vektor (rot) mit den Restriktionsenzymen BamHI/XhoI herausgeschnitten und nach der elektrophoretischen Auftrennung aus dem Gel eluiert und aufgereinigt. Es folgte die Ligation der cDNAs in den ebenfalls mit BamHI/XhoI aufgeschnittenen eukaryotischen Expressionvektor pcDNA3 (grün).

1.5 Topologisches Modell des 5-HT_{2C}-Rezeptors

Das 5-HT_{2C}-Rezeptor-Gen ist auf dem X-Chromosom Bande q24 lokalisiert (Milatovich et al., 1992). Die komplette cDNA des Rezeptors enthält 4775 Basen. Sie besteht aus einer 728 bp großen 5'- untranslatierten Region aufwärts vom ATG Start-Codon, gefolgt von dem in Abbildung 10 dargestellten 1377 bp großen ORF, welche das Rezeptor-Protein mit 458 AS kodiert, gefolgt von einer weiteren untranslatierten 2670 bp großen 3'- Region. Insgesamt enthält das gesamte Gen sechs Exons und fünf Introns. Obwohl viele GPCRs keine Introns im ORF haben, ist dieser beim humanen 5-HT_{2C}-Rezeptor von drei Introns unterbrochen, eine Voraussetzung für alternatives Splicen. Auch in dieser Arbeit wurde eine SplV (Klon5) gefunden (siehe C.1.3 und Abbildung 6). Die hier kennzeichnende 95 bp große Deletion endet unmittelbar vor Beginn des sechsten Exons, das ab Position 551 beginnt (Xie et al., 1996). Die Abbildung 10 zeigt die Struktur des 5-HT_{2C}-Rezeptors, welcher zur Familie der GPCRs gehört, die mit sieben Transmembran-Helices in der Plasmamembran verankert sind (Collins et al., 1991).

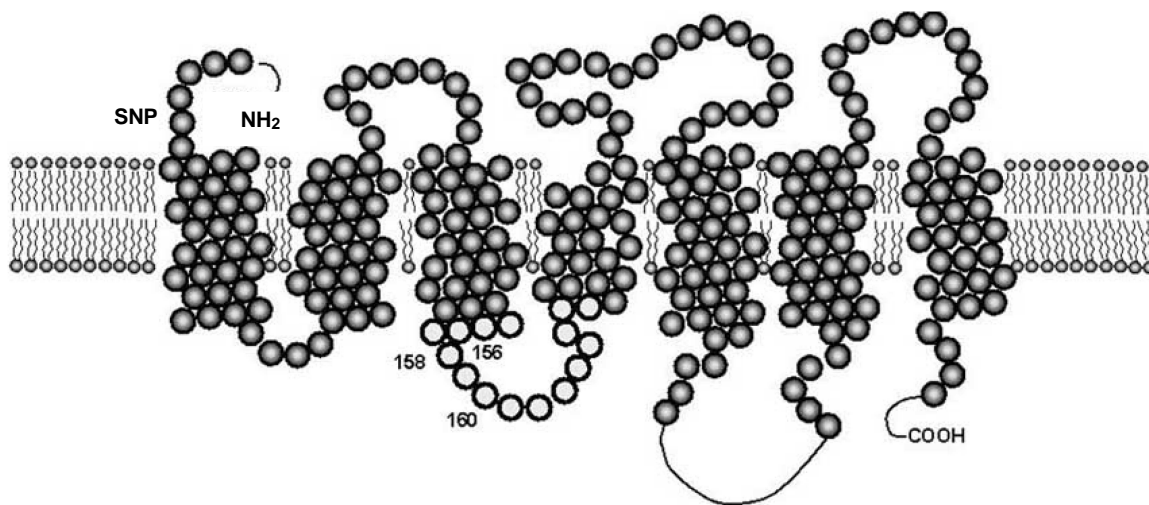


Abbildung 10: Topologisches Modell des 5-HT_{2c}-Rezeptors

Dargestellt sind die Aminosäuren des Rezeptors als Kreise. Das N-terminale Ende ist gekennzeichnet durch NH₂ und befindet sich extrazellulär. Das Carboxyl-Ende ist mit COOH bezeichnet und befindet sich intrazellulär. Der SNP Cys23Ser ist gekennzeichnet und befindet sich im N-terminalen Bereich des Proteins. Mit den Nummern sind die Editing Seiten dargestellt auf die die ADARs wirken (siehe D.3)

2. Ergebnisse der biochemisch-pharmakologischen Versuche

2.1 Sättigungsexperimente mit [³H]Mesulergin am 5-HT_{2C}-Rezeptor und seiner 5-HT_{2C}Cys23Ser-Variante.

Um etwaige funktionelle Unterschiede des SNP Cys23Ser im Vergleich zum WT festzustellen wurden Sättigungsexperimente durchgeführt, mit Hilfe derer sich u.a. Rezeptordichten und Affinitäten der Rezeptoren messen lassen. Zur Bestimmung der Dichte des 5-HT_{2C}-Rezeptors und seiner Cys23Ser-Variante wurden Sättigungsexperimente mit dem Radioliganden [³H]Mesulergin an den Membranen zuvor transient transfizierter HEK293-Zellen (siehe B.4.6) durchgeführt. Anhand einer nichtlinearen Regression der erhaltenen Messwerte wurde die Lage des oberen Plateaus bestimmt. Der so erhaltene Wert entspricht der Zahl der spezifischen Bindungsstellen (B_{max}) und ist somit ein Maß für die Rezeptordichte. Aus der nichtlinearen Regression wurde ferner die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D als Maß für die Affinität des Radioliganden zum Rezeptor erhalten.

Jedes Experiment wurde unter gleichen Bedingungen an unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Die zum Einsatz gekommenen Puffer und Verdünnungsreihen wurden jeweils frisch angesetzt. Pro Konzentration wurden Dreifachbestimmungen gemacht. Ferner wurden zur Optimierung des Versuchsaufbaus im Voraus die Filter GF/B und GF/C jeweils beschichtet und unbeschichtet sowie drei Substanzen zur Ermittlung der unspezifischen Bindung getestet. Diese waren Ketanserin, Serotonin und Clozapin. Ferner wurden Bindungsversuche an nicht transfizierten HEK-293 Zellen durchgeführt, um sicher zu stellen, dass es sich bei der spezifischen Bindung um eine reine 5-HT_{2C}-Rezeptorbindung handelte. Abbildung 11 zeigt den Kurvenverlauf eines repräsentativen Experiments.

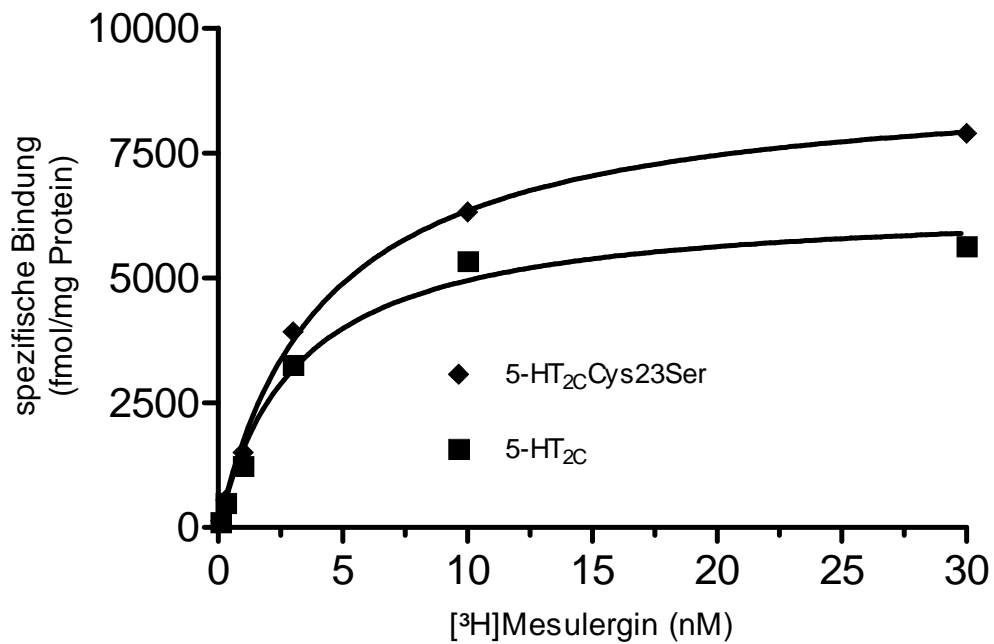


Abbildung 11: Repräsentatives Experiment zur Bindung von [³H]Mesulergin am 5-HT_{2C}-Rezeptor und seiner 5-HT_{2C}Cys23Ser-Variante

Die [³H]Mesulergin Bindung erfolgte an Homogenaten aus den Membranen der transient transfizierten HEK293-Zellen. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden parallel Ansätze in Gegenwart von 30 μM Ketanserin inkubiert (siehe B.3.3.3).

Der Verlauf der Kurve wurde mittels nichtlinearer Regression ermittelt.

Ergebnisse

Wie in Abbildung 11 ersichtlich liegt der B_{\max} -Wert der Cys23Ser-Variante in diesem Experiment über dem des 5-HT_{2C}-Rezeptors. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurden weitere Experimente durchgeführt. In Tabelle 3 und Abbildung 12 werden die Ergebnisse von vier unabhängigen Versuchen zusammengefasst. In jedem dieser Versuche waren die B_{\max} -Werte und nahezu alle K_D -Werte der Cys23Ser-Variante höher als die des WT. Zusammengefasst ergibt sich eine signifikante Steigerung des B_{\max} -Wertes der Cys23Ser-Variante gegenüber dem WT um 20% ($p < 0,05$). Somit ergibt sich eine erhöhte Rezeptordichte an der Plasmamembran für diesen Polymorphismus. Auch der K_D -Wert erscheint tendenziell, aber nicht signifikant, erhöht.

Versuch	5-HT _{2C}		5-HT _{2C} Cys23Ser	
	B_{\max} (fmol/mg Protein)	K_D (nM)	B_{\max} (fmol/mg Protein)	K_D (nM)
1	8621	4,22	9604	4,54
2	7790	3,33	9005	4,67
3	8267	3,16	8618	2,51
4	6519	3,18	9036	4,25
$\bar{x} \pm \text{SEM}$	7799 ± 459	3,47 $\pm 0,25$	9066 ± 203	3,99 $\pm 0,50$

Tabelle 3: B_{\max} - und K_D -Werte vom 5-HT_{2C}-Rezeptor und seiner Variante 5-HT_{2C}Cys23Ser ermittelt aus vier unabhängigen Sättigungsexperimenten

Die Sättigungsexperimente wurden an Membranen von transient transfizierten HEK293-Zellen mit [³H]Mesulergin durchgeführt. Mit angegeben sind Mittelwerte (\bar{x}) und Standardfehler (SEM).

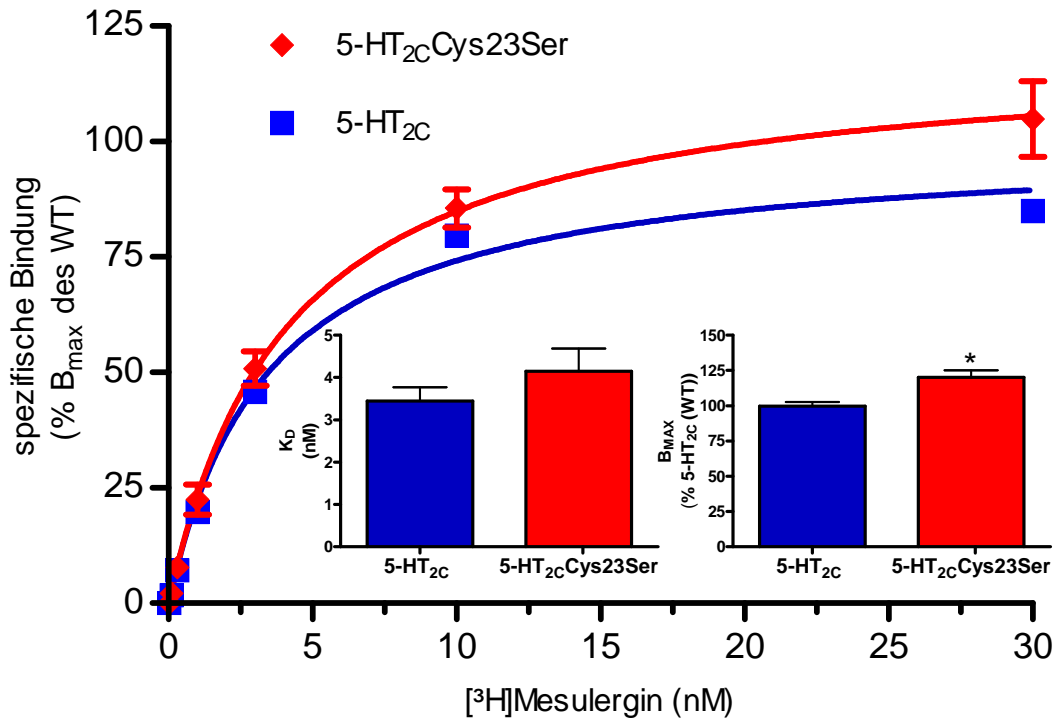


Abbildung 12: Bindung von [³H]Mesulergin am 5-HT_{2C}-Rezeptor und seiner 5-HT_{2C}Cys23Ser-Variante

Die [³H]Mesulergin-Bindung erfolgte an Membranen der transient transfizierten HEK293-Zellen. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden parallele Ansätze in Gegenwart von 30µM Ketanserin inkubiert. Dargestellt sind die mit nichtlinearer Regression gemittelten Sättigungskurven vom WT und der Cys23Ser-Variante. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler aus vier repräsentativen Experimenten.

Insert: B_{max} und K_D aus vier unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± SEM).

D. Diskussion

Genomische Faktoren und molekulare Prozesse haben einen großen Einfluss auf die Funktion und die Expression von 5-HT_{2c} Rezeptoren. Neben genomischen Polymorphismen einzelner Basen (SNP) sind vor allem nicht genomisch determinierte Prozesse, wie alternatives Splicen und RNA-Editing, von großer Bedeutung und rücken zunehmend in den Mittelpunkt der Betrachtung des 5-HT_{2c}-Rezeptors. Die Untersuchung dieser Vorgänge stellt eine wichtige Grundlage in der Diagnostik und Therapie, sowie in der Ursachenforschung von psychiatrischen Erkrankungen wie Essstörungen, Schizophrenie, Depression oder Suchterkrankungen dar. Neben genetischen Assoziationsstudien, die sich mit statistischen Zusammenhängen von Krankheiten und genetischen Veränderungen beschäftigen sind vor allem funktionelle Untersuchungen von großer Bedeutung. Mit Hilfe dieser können etwaige Zusammenhänge auf molekularer Ebene verifiziert werden. So gibt es auch zum vorliegenden Polymorphismus mehrere Assoziationsstudien, die mit den Ergebnissen dieser Arbeit verglichen werden.

1. 5-HT_{2c}Cys23Ser-Variante (SNP)

Ein Polymorphismus am Gen des 5-HT_{2c}-Rezeptors führt zu einem Austausch von Cystein zu Serin am 23. Kodon. In der vorliegenden Arbeit galt es den 5-HT_{2c}-Rezeptor und die Cys23Ser-Variante mit Hilfe molekularbiologischer Methoden zur erstellen und auf funktionelle Unterschiede hin zu untersuchen.

Insgesamt wurden 23 PCRs an verschiedenen cDNA-Banken durchgeführt. Die Sequenzierungen wiesen weder den reinen WT noch den SNP mit der Punktmutation an 68. Position auf, so dass mit Hilfe von Restriktionsverfahren und gerichteter Mutagenese die entsprechenden cDNAs erstellt wurden. Vereinzelte Basenaustausche im Rahmen einer PCR sind durchaus mit der Fehlerhaftigkeit der eingesetzten Taq-Polymerase zu erklären und stellen ein bekanntes Problem beim Klonieren von cDNAs dar, insbesondere wenn es um die Amplifizierung größerer DNA-Abschnitte geht. Die Tatsache, dass keine PCR (n=23) die gewünschte Punktmutation amplifizierte ist verwunderlich, da diese Mutation eine Inzidenz von 13% hat (Lappalainen et al., 1995) und der cDNA-Pool aus DNA von über 70 Patienten bestand. Allerdings sind nur neun PCRs nach Klonierung in den Vektor sequenziert worden.

Nach Umklonierung der erstellten cDNA in den Expressionsvektor folgte die transiente Transfektion in HEK293-Zellen. Die Bindungsversuche wurden an den entsprechenden Membranen durchgeführt. Das Ergebnis dieser Versuche zeigte einen signifikanten Unterschied der B_{max} zwischen WT und Variante. Die Expression der Variante und somit die Rezeptordichte auf der Zellmembran ist um 20% höher als beim WT. Der K_D -Wert wies keinen signifikanten Unterschied auf. Die Affinität des Liganden zu den Rezeptoren ist somit nahezu identisch.

Ein Grund für die unterschiedliche Expression beider Allele könnte eine veränderte Faltung des Proteins aufgrund des Aminosäureaustauschs sein, die eine veränderte Entkopplung des Rezeptors aus dem Golgi Apparat und dem ER zur Folge hat (Bernier et al., 2004).

Insgesamt haben zwei weitere Arbeitsgruppen funktionelle Studien an dieser Variante durchgeführt (Fentress et al., 2005; Okada et al., 2004).

Die Bestimmung der Rezeptordichte erfolgte bei Fentress et al. (2005) im Gegensatz zu dieser Arbeit, mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie an HEK293-Zellen (mit 5-HT_{2C}/YFP cDNA transfiziert) sowie mit Oberflächen-Biotinylierung an NIH-3T3 Fibroblasten. Beide Versuche zeigten für WT und Variante nahezu gleiche Rezeptordichten an den Zellmembranen. Der Unterschied zu den Ergebnissen dieser Arbeit könnte somit an der unterschiedlichen Methodik liegen.

Die Daten von Okada et al. (2004) hingegen demonstrieren einen Unterschied beider Allele in der konstitutiven Aktivität, der Desensibilisierung sowie der Rezeptor-Rezeptor Interaktion. Der 5-HT_{2C}-Rezeptor ist bekannt für eine konstitutive Aktivität (Barker et al., 1994), definiert als die Fähigkeit eines Rezeptors zur spontanen Signaltransduktion ohne Ligandenbindung. Okada et al. (2004) ermittelten eine höhere konstitutive Aktivität bei der Cys23Ser-Variante mittels GTP γ S-Bindung an Sf9-Zellen. Gleichzeitig schlossen sie anhand von Wettbewerbsversuchen mit dem Radioligand [¹²⁵I]DOI an COS-7 Zellen auf eine größere Desensibilisierung der Cys23Ser-Variante. Für die Agonisten 5-HT und m-CPP ergab sich eine geringere Affinität zu dieser Variante als zum WT. Dieses Ergebnis kann als funktionelle Downregulation verstanden werden. Diese Folgerung ist stimmig mit der Aussage von Fathy et al. (1999) die besagt, dass die Rezeptor-Desensibilisierung proportional zur konstitutiven Aktivität ist. Fentress et al. (2005) hingegen haben mittels Wettbewerbsversuchen an NIH-3T3 Fibroblasten und gleichen

Liganden keinen Unterschied in der Bindungsaffinität beider Isoformen festgestellt. Auch eine unterschiedliche konstitutive Aktivität schlossen sie mit Hilfe der Messung von [³H]IP in Abwesenheit jeglicher Liganden aus.

Die intrinsische Aktivität eines GPCRs kann durch die Expressionsdichte beeinflusst werden (Gurdal et al., 1997). Im Hinblick darauf haben Okada et al. (2004) durch Überexpression beider Isoformen in COS-7-Zellen gezeigt, dass diese mit zunehmender Dichte abnimmt; dieser Effekt war bei der Cys23Ser-Variante signifikant stärker. Ein Grund hierfür könnte der unterschiedliche Effekt von Cystein und Serin auf die Stabilität verbundener GPCR Dimere sein (Jordan und Devi, 1999), die durch Disulfidbrücken gekoppelt sind, da Cystein eine Schlüsselrolle in der Bildung von Disulfidbrücken darstellt (Zhang et al., 1996).

Fentress et al. (2005) wiederum schlossen mittels FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) die Möglichkeit aus, dass die Cys23Ser-Variante veränderte Dimerisierungseigenschaften hat. Die Ergebnisse beider Gruppen widersprechen sich somit in allen Punkten, so dass weitere Untersuchungen von Interesse waren.

Neben dem in dieser Arbeit behandelten SNP sind insgesamt noch vier weitere SNPs im Gen des 5-HT_{2C}-Rezeptors bekannt. Drei liegen in der Promoterregion des Rezeptors (G→A bei -995, C→T bei -759 und G→C bei -697) (Yuan et al., 2000) und einer in der nicht translatierten 3' Region (t→G bei 2831) (Song et al., 1999). Assoziationsstudien bezüglich der SNPs in der Promoterregion zeigen, dass diese mit einer geringeren Inzidenz für Übergewicht und Diabetes mellitus Typ 2 einhergehen (Reynolds et al., 2002; Yuan et al., 2000; De Luca et al., 2007; Miller et al., 2005). Diese Nukleotid-Polymorphismen könnten somit mit einer erhöhten Transkriptionsrate des 5-HT_{2C}-Rezeptors einhergehen und somit Resistenzfaktoren für Übergewicht und Diabetes mellitus Typ 2 sein.

Wenn man die Daten dieser Arbeit sowie die Ergebnisse von Okada et al. (2004) zusammenfasst, ist eine veränderte Pathologie in Hinblick verschiedener psychiatrischer Erkrankungen denkbar. Diese Daten werden mit den Ergebnissen klinischer Assoziationsstudien verglichen:

- a) Übergewicht / Essstörung: Sowohl die Ausschaltung des 5-HT_{2C}-Rezeptors bei KO-Mäuse (De Luca et al., 2007; Tecott et al., 1995) als auch die medikamentöse Beeinflussung des Rezeptors (De Luca et al., 2007; Wacker et al., 2007; Rosenzweig-Lipson et al., 2006; Reynolds et al., 2006) legen eine Beteiligung des Rezeptors am Essverhalten nahe. Eine Ausschaltung und eine Antagonisierung führen zu einer deutlichen Gewichtszunahme, wohingegen die Aktivierung des Rezeptors eine Protektion diesbezüglich darstellt. Neue Therapieansätze in der Behandlung von Übergewicht sehen den Einsatz und die Erforschung von selektiven 5-HT_{2C}-Agonisten vor (Halford et al., 2007; Dunlop et al., 2006; Rosenzweig-Lipson et al., 2006) (siehe A.2.1.1, Tabelle 2). In Bezug auf die Daten dieser Arbeit könnte eine erhöhte B_{max} der Cys23Ser-Variante und eine erhöhte konstitutive Aktivität ein Prädiktor für Untergewicht als auch ein Protektionsfaktor für Übergewicht darstellen. Diese Aussagen decken sich mit den Assoziationsstudien von Hu et al. (2003) und Westberg et al. (2002); allerdings zeigt die Studie von Burnet et al. (1999) keinen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Mutante und dem Auftreten von Essstörungen.
- b) Affektive Störung: Der Einfluss des serotonergen Systems in der Pathogenese von uni- und bipolaren Störungen ist unumstritten (Maes et al., 1995). Der Mechanismus antidepressiver Medikamente sieht oftmals eine Modifikation der serotonergen Neurotransmission vor. Und somit spielen Gene, die für die verschiedenen Serotoninrezeptor und -transporter kodieren, eine große Rolle in der Ätiologie von affektiven Störungen (Barnes und Sharp, 1999). So führt ein SNP (C1473G) im Tryptophanhydroxylase 2- (Tph2) Gen zu einer Verminderung der Serotoninproduktion um über 50% (Zhang et al., 2004). Somit spielt dieser SNP eine wichtige Rolle in der endogenen Serotoninproduktion und folglich in der Pathogenese affektiver Störungen. Welchen Einfluss der 5-HT_{2C}-Rezeptor und seine Cys23Ser-Variante in der Genese affektiver Störungen haben, lässt sich monokausal nicht beantworten. Uni- als auch bipolare Störungen sind komplexe Erkrankungen mit multifaktoriellen Ursachen. Sowohl der Einfluss verschiedener Gene als auch Umweltfaktoren werden diskutiert (Tsuang et al., 2004). Pandey et al. (2006) konnte jedoch an post mortem untersuchten Gehirnen von Suizidenten zeigen, dass eine andere Verteilung und Expressionsdichte von 5-HT_{2C}-Rezepto-

ren im Vergleich zur Kontrollgruppe bestand, was eine Beteiligung des Rezeptors in der Pathogenese affektiver Störungen wahrscheinlich macht. Die größte Assoziationsstudie bezüglich der Cys23Ser-Variante und dem Auftreten affektiver Erkrankungen liefern Lerer et al. (2001). Sie hatten über 1150 Patienten verschiedener Nationalität mit affektiven Erkrankungen in Hinblick auf diesen Polymorphismus untersucht und einen positiven statistischen Zusammenhang gesehen. Die Spannweite der Ser23-Allelträger in diesem Patientenkollektiv reicht je nach Nationalität von 9,2% bis 24,6%. Weitere Studien diesem Zusammenhang lieferten Gutierrez et al. (1996) und Oruc et al. (1997) bei weiblichen Allelträgern, sowie Holmes et al. (2003) bei Komorbiden Alzheimer Patienten. Allerdings ist die Signifikanz dieser Studien nicht sehr deutlich, so dass unter Berücksichtigung der Studien, die keinen Zusammenhang sehen (Frisch et al., 1999; Vincent et al., 1999), der genaue Einfluss dieser Mutation auf die Pathogenese affektiver Erkrankungen unklar bleibt. Ein Problem in der Interpretation solcher Studien ist oftmals die Außerachtlassung weiterer genetischer Veränderungen beziehungsweise die Verkopplung verschiedener Polymorphismen bei diesen Probanden, sowie das Auftreten von Subklassen und Sub-Phänotypen von Krankheiten. Dennoch ist es denkbar, dass die in dieser Arbeit ermittelte erhöhte B_{\max} der Cys23Ser-Variante eine erhöhte Inzidenz von affektiven Erkrankungen zur Folge hat. Unterstützt wird die These durch drei weitere Studien an Blutzellen depressiver Patienten, die eine erhöhte B_{\max} für 5-HT_{2C}-Rezeptoren im Vergleich zu nicht Erkrankten ermittelt haben (Maes und Meltzer, 1995).

- c) Schizophrenie: Der 5-HT_{2C}-Rezeptor ist in die neuronale Transmission von Dopamin und GABA v.a. im VTA und SN eingebunden. Durch Aktivierung des Rezeptors wird ein inhibitorischer Effekt direkt an dopaminergen Neuronen ausgeübt, wie auch indirekt über die Aktivierung von inhibitorischen GABA-Neuronen, die auch einen inhibitorischen Einfluss auf andere 5-HT Rezeptoren haben v.a. im dorsalen Raphekern (Alex und Pehek, 2007; Boothman et al., 2006; Bubar und Cunningham, 2007). Die neuronale Vernetzung dieses Rezeptors legt somit einen Einfluss in der Pathogenese schizophrener Krankheitsbilder nahe. Bezieht man die Ergebnisse dieser Arbeit und die von Okada et al. (2004) in diese Erkenntnisse mit ein, so könnte diese Mutation die Entstehung von Schizophrenie

begünstigen. Zu diesem Thema gibt es eine Assoziationsstudie mit einem relativ kleinen Patientenkollektiv (Murad et al., 2001), welche allerdings keinen statistischen Zusammenhang zwischen der Cys23Ser-Variante und dem Auftreten von Schizophrenie aufweist. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist der Einfluss des SNP Cys23Ser auf die Therapie von Schizophrenie mit Clozapin, einem atypischen Neuroleptikum. Clozapin ist ein inverser Agonist am 5-HT_{2C}-Rezeptor und blockiert somit den inhibitorischen Effekt auf Dopamin (Di Mattheo et al., 2002), was einen Teil der antipsychotischen Wirkung des Medikaments ausmacht, neben dem antagonistischen Effekt u.a. an D₄-, M₁-, H₁-, α₁- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren. Eine veränderte Rezeptordichte, wie im Falle der hier untersuchten Cys23Ser-Variante, könnten somit die Wirkung von Clozapin modulieren. Da das Medikament unterschiedliche Erfolge bei Patienten aufweist, ist der Einfluss von genetischen Faktoren in der Therapie der Krankheit untersucht worden. Mit diesem Zusammenhang befasst sich die Pharmakogenetik (Wilffert et al., 2005). Für den vorliegenden SNP gibt es in Bezug darauf drei widersprüchliche Assoziationsstudien. Sodhi et al. (1995) ermittelten, dass 90% der Ser23-Allelträger Clozapin-Responder sind versus 60% der Patienten ohne den Polymorphismus. Im Widerspruch dazu stehen die Studien von Malhotra et al. (1996) und Masellis et al. (1998). Neue Therapieansätze in der Behandlung von tardiven Dyskinesien, die als Nebenwirkung von antidopaminergen Psychopharmaka auftreten, sehen eine Blockierung des 5-HT_{2C}-Rezeptors vor (Kostrzewa et al., 2007). Somit ist ein Einfluss des vorliegenden SNP an der Entstehung dieser Symptome denkbar. Diese Vermutung findet Bestätigung in der Studie von Segman et al. (2000), die eine signifikant erhöhte Frequenz für das Ser23-Allel bei Schizophrenie-Patienten mit tardiven Dyskinesien zeigt.

- d) M. Alzheimer: Der vorliegende SNP spielt in der Pathogenese dieser Erkrankung sicherlich nur eine untergeordnete Rolle. Die Ursachen für diese Erkrankung sind multifaktoriell, wobei der molekulare Einfluss von Serotonin-Rezeptoren eher gering erscheint. So wurde die These aufgestellt, dass der Einfluss der Cys23Ser auf M. Alzheimer erst im Rahmen einer Komorbidität mit anderen psychiatrischen Erkrankungen wie z.B. Depression bemerkbar wird (Holmes et al., 1998; Holmes et al., 2003).

- e) Alkoholismus: Auch hier scheint der SNP Cys23Ser einen untergeordneten Einfluss zu haben. Assoziationsstudien fanden keinen direkten Zusammenhang zwischen der Mutation und Alkoholismus (Hill et al., 2002; Himei et al., 2000). Allerdings ist auch hier ein indirekter Einfluss des SNP als Prädiktor für andere psychische Erkrankungen im Sinne einer Kommorbidität denkbar.

Zusammenfassend kann man die Ergebnisse dieser Arbeit sowie der anderer Arbeitsgruppen nicht eindeutig interpretieren. Ein monokausaler Zusammenhang in der Pathogenese psychiatrischer Erkrankungen und dem Auftreten des SNP Cys23Ser erscheint aufgrund der heterogenen Studienlage eher unwahrscheinlich. Dennoch ist ein Einfluss unterschiedlichen Ausmaßes v.a. in der Entstehung von Essstörungen, affektiven Störungen sowie Schizophrenie, nebst anderer genetischer Prädispositionen sowie Umweltfaktoren, sehr wahrscheinlich.

2. Alternatives Splicen

Nahezu ein Drittel der Sequenzierungen wiesen eine Variante mit einer Deletion von 95 Basen in der Region der vierten Transmembrandomäne auf. Die Analyse dieser Variante ergab, dass es sich um eine Splice-Variante (SpIV) handeln musste, worauf die unmittelbare Nähe zu Exon 6 hindeutete. Diese Basendeletion führt zu einem Frameshift mit Änderung der Aminosäuresequenz ab AS 154 und einem vorzeitigem Stop-Codon was zu einer Verkürzung des Proteins auf 248 AS führt. Genauere Literaturstudien ergaben, dass diese SpIV bereits 1996 beschrieben wurde (Xie et al., 1996). Es galt zu klären, ob diese SpIV eine Rezeptoraktivität besitzt. Dafür haben wir diese Variante kloniert, in HEK293-Zellen transient exprimiert und in pharmakologischen Bindungsversuchen überprüft. Allerdings zeigten diese Versuche an transient transfizierten HEK293-Zellen, dass diese keine Rezeptoraktivität aufwies, was dem Ergebnis von Canton et al. (1996) gleicht. Es ist zu schlussfolgern, dass die Basen-Deletion und die damit verbundene Veränderung des Proteins eine entsprechende Konformationsveränderung bedingt, die zu einer pharmakologisch inaktiven Form führt, die nicht in der Zellmembran exprimiert wird. Entgegen der Cys23Ser-Variante ist diese SpIV nicht genomisch determiniert, sondern ergibt sich im Rahmen der posttranskriptionalen Phase des RNA-Splittings, bei der die Introns des Rezeptor-Gens beseitigt werden (Reaney, 1979). Da der ORF des 5-HT_{2C}-Rezeptors selbst drei Introns enthält, sind entsprechend weitere SpIV denkbar, die verschiedene Rezeptor Isoformen bedingen. Neben dieser beschriebenen SpIV haben Wang et al. (2000) eine weitere im ORF identifiziert, die ebenfalls keine Rezeptoraktivität aufweist. Es stellt sich die Frage, in welchen neuronalen Geweben solche SpIV konzentriert sind, welche Funktionen diese inaktiven Rezeptorformen haben und welche klinischen Konsequenzen sich daraus ergeben. Lokalisiert ist die vorliegende Rezeptor-Isoform (SpIV) wie auch der WT-Rezeptor im Plexus choroideus, Striatum, Hippocampus, Hypothalamus und Rückenmark (Canton et al., 1996; Lopez-Gimenez et al., 2002). Xie et al. (1996) berichten, dass das Verhältnis der SpIV-RNA zur WT-RNA in Tumoren des Plexus choroideus höher ist als in gesunden Hirngewebe. Auch insgesamt ist die Dichte der RNA von 5-HT_{2C}-Rezeptor in Tumoren des Plexus choroideus bei transgenen Mäusen erhöht (Yagaloff et al., 1986). Dies zeigt die Bedeutung des Rezeptors in der Betrachtung dieser Hirntumoren. Denkbar wäre

eine unterschiedliche Regulation in der Expression des Rezeptors in unterschiedlichen neuronalen Geweben während der Tumorgenese (Xie et al., 1996).

Mittlerweile ist bekannt, dass diese SpIV von der snoRNA HBII-52 auf Chromosom 15 reguliert wird (Kishore und Stamm, 2006). Dieses ist beim Prader-Willi Syndrom beschädigt (Ledbetter et al., 1982) und bedingt eine komplexe Behinderung, die mit kognitiven Symptomen einhergeht (Jauregi et al., 2007), welche durch Fehlfunktionen des Zwischenhirns und des Frontalhirns verursacht werden. Folglich haben diese Patienten eine andere Verteilung dieser verschiedenen 5-HT_{2C}-Rezeptor-Isoformen als gesunde Patienten (Kishore und Stamm, 2006). Somit hat die Regulation der vorliegenden SpIV und die damit verbundene Expression eines aktiven 5-HT_{2C}-Rezeptors eine große klinische Bedeutung.

3. RNA-Editing

Neben Nukleotid-Polymorphismen und posttranskriptionalem Splicing gibt es einen weiteren Prozess, der für die Diversität des Rezeptors verantwortlich ist: das RNA-Editing. Der 5-HT_{2C}-Rezeptor ist der einzig bekannte G-Protein-gekoppelte Rezeptor, der diesem Prozess unterliegt. Hierbei kommt es zu einer posttranskriptionalen Modifikation von Adenosin zu Inosin (Burns et al., 1997). Dieser Prozess geschieht unter dem Einfluss von ADARs (adenosine deaminase that act on RNA) an fünf so genannten „editing sites“ die von A bis E durchnummeriert werden und betreffen die AS 156, 158 und 160 (siehe Abbildung 13). Diese liegen im Exon der pre-mRNA in Bereichen, die für die zweite intrazelluläre Schleife kodieren und somit eine Region beeinflussen, die für die Kopplung von G-Proteinen maßgeblich ist (Arora et al., 1995; Visiers et al., 2001).

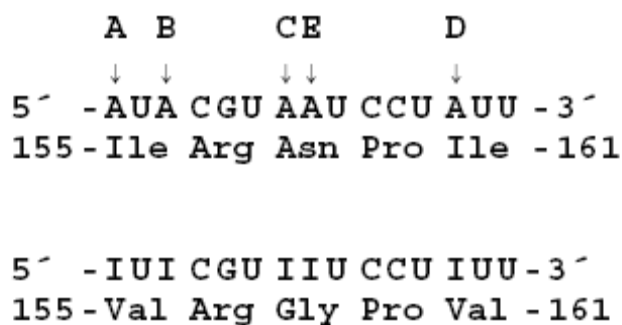


Abbildung 13: RNA-Editing am 5-HT_{2C}-Rezeptor

Oben sind mit Pfeilen die fünf potentiellen „editing sites“ (A-E) am nicht editierten Rezeptor dargestellt. Unten sieht man einen voll editierten Rezeptor mit den entsprechenden Veränderungen auf RNA und Proteinebene.

Insgesamt resultieren aus dem A-I Austausch 32 verschiedene mRNAs, die 24 verschiedene Rezeptor-Isoformen bedingen. Die uneditierte Form nennt man 5-HT_{2C}-INI, wobei das INI für die AS in den Positionen 156, 158 und 160 steht, demnach hier für Isoleucin (156), Asparagin (158) und Isoleucin (160). Die häufigste im Menschen vorkommende Isoform ist der 5-HT_{2C}-VSV-Rezeptor gekennzeichnet durch Valin (156), Serin (158) und Valin (160). Die VSV-Isoform zeigt eine um das 5-Fache erhöhte EC₅₀ für 5-HT, wohingegen die 5-HT_{2C}-VGV Variante eine bis zu 29-fach erhöhte EC₅₀ für Serotonin aufweist (Niswender et al., 1999). Weiterhin zeichnet sich die VGV-Isoform (Valin, Glycin, Valin) durch das Fehlen einer konstitutiven Aktivität aus, eine Eigen-

schaft, welche den uneditierten INI-Rezeptor auszeichnet (Barker et al., 1994). Des Weiteren zeigten Price und Sanders-Bush (2000), dass die intrazelluläre Kalziumfreisetzung nach Ligandenbindung je nach Isoform verändert ist. Mittlerweile ist bekannt, dass die Isoformen unterschiedliche Signaltransduktionswege aktivieren. Zeigt der uneditierte 5-HT_{2C}-INI Rezeptor die Fähigkeit zur Aktivierung alternativer Pathways via G₁₃, so fehlt diese Fähigkeit bei den Isoformen VGV und VSV, die nur über G_{q/11} koppeln (Price et al., 2001).

Trägt man diese neuen Erkenntnisse über den 5-HT_{2C}-Rezeptor zusammen, so wird deutlich, dass die Fähigkeit zur Bildung alternativer Isoformen durch RNA-Editing eine fundamentale Eigenschaft ist, die Funktion des Rezeptors zu verändern und zu modifizieren. Es ist somit nahe liegend, dass es sich hier um ein sehr differenziertes Steuerungselement in der Neurotransmission von 5-HT_{2C}-Rezeptoren und allen mit diesem Rezeptor vernetzen Neuronen handelt. So dass, wie in Kapitel A.2.1.1 und D.1. beschrieben, über diesen Mechanismus auch der dopaminerge und GABAerge Tonus mit beeinflusst wird. Aufgrund dieser Komplexität ist es sehr wahrscheinlich, dass die Isoformen bei bestimmten psychiatrischen Erkrankungen unterschiedlich reguliert sind, und damit auch die Wirkung von Medikamenten mit 5-HT_{2C}-Affinität variiert. Ferner könnte dieser Mechanismus Grundlage für die Entwicklung neuer Psychopharmaka sein. So konnte aktuell gezeigt werden, dass die Bindungseigenschaften von Aripiprazol und Olanzapin je nach Isoform stark variieren (Zhang et al., 2006). Ferner wurde gezeigt, dass durch Fluoxetin wiederum das RNA-Editing selber beeinflusst werden kann (Englander et al., 2005). Erste Tierversuche bei Ratten mit induzierter Depression zeigten unterschiedliche 5-HT_{2C}-Isoformen, wodurch ein potentieller Pathomechanismus für Depression abgeleitet werden kann (Iwamoto et al., 2005), allerdings erscheint fraglich, ob das RNA-Editing Ursache oder Folge psychiatrischer Erkrankungen ist, da gezeigt wurde, dass auch Stress das RNA-Editing beeinflusst (Bhansali et al., 2007). Ob der SNP Cys23Ser einen Einfluss auf das RNA-Editing hat, müssen weitere Studien ergeben. Es ist durchaus denkbar, dass der in dieser Arbeit ermittelte Unterschied der Expression des Rezeptors auch mit dem Einfluss der Cys23Ser- Variante auf das RNA-Editing erklärt werden kann. Somit sind mit der Entdeckung des RNA-Editings weitere Fragestellungen in Bezug auf den vorliegenden SNP entstanden.

E. Zusammenfassung

Der 5-HT_{2C}-Rezeptor gehört zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und ist nur im Gehirn ausgebildet, wo er an wichtigen physiologischen und psychologischen Prozessen beteiligt ist. Verschiedene antipsychotische und antidepressive Medikamente wie Clozapin oder Fluoxetin binden an diesen Rezeptor. Die 5-HT_{2C}-KO-Maus entwickelt ein enormes Übergewicht in Folge eines gestörten Ernährungsverhaltens und leidet an Krampfanfällen, sowie an Schlafstörungen. Deshalb gilt der 5-HT_{2C}-Rezeptor als Target in der Behandlung von Schizophrenie, affektiven Störungen, Epilepsie oder Suchterkrankungen. Spezifische Agonisten werden aktuell in der Behandlung von Fettleibigkeit erprobt. Aufgrund dieser Tatsachen gelten genetische Veränderungen des Rezeptors als potentielle Ursache für neurologische oder psychiatrische Erkrankungen. Eine solche Veränderung stellt der Einzelbasenaustausch (SNP) 5-HT_{2C}Cys23Ser dar. Dieser führt an Position 68 der kodierenden Sequenz zu einem Austausch von Guanin zu Cytosin und bedingt auf Proteinebene eine Transversion der Aminosäure Cytosin zu Serin an Position 23. Die Inzidenz dieses Polymorphismus beträgt etwa 13%.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieser SNP mit Hilfe einer pharmakologischen Bindungsstudie mit dem Radioliganden [³H]Mesulergin untersucht. Mit Hilfe dieser Methode gelang es, die Expressionsdichte des Rezeptors (B_{max}) in der Plasmamembran und die Affinität des Radioliganden (K_D) im Vergleich zum Wildtyp (WT) zu bestimmen. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigte eine signifikante Erhöhung der Expression des Mutations-Rezeptors um 20% im Vergleich zum WT-Rezeptor.

Um diese biochemisch-pharmakologische Versuche durchführen zu können wurden zuerst mittels molekularbiologischer Methoden der 5-HT_{2C}-Rezeptor kloniert, sowie seine 5-HT_{2C}Cys23Ser-Variante mittels gerichteter Mutagenese generiert. Anschließend erfolgte die funktionelle Expression in transient transfizierten HEK293-Zellen.

Ein weiteres Ergebnis war die Analyse einer Splice-Variante, die im Rahmen der Klonierung mehrfach gefunden wurde. Diese ist durch eine Deletion von 95 Basen gekennzeichnet und führt durch eine Verschiebung des Leserasters zur Verkürzung des Proteins von 458 AS auf 248 AS. Auch diese Variante wurde in die Bindungsstudie integriert, erwies sich aber als eine pharmakologisch inaktive Form.

Um die Bedeutung der Ergebnisse abzuschätzen, wurden diese mit Assoziationsstudien verglichen. So könnte eine höhere Expression des 5-HT_{2C}-Rezeptors in Patienten mit dem vorliegenden SNP einen Prädiktor für Untergewicht als auch einen Protektionsfaktor für Übergewicht darstellen. Ferner scheint ein Einfluss des SNPs in der Pathogenese von affektiven Störungen zu bestehen, was Expressionsdichten dieses Rezeptors an post mortem untersuchten Gehirnen von Suizidenten, sowie eine große Assoziationsstudie zu diesem Thema zeigen. Auch eine Beteiligung an der Entwicklung von Schizophrenie ist durch die enge Verschaltung dieses Rezeptors mit dopaminergen und GABAergen Neuronen denkbar. Hierzu sind verschiedene Studien bekannt. Allerdings ist ein monokausaler Zusammenhang in der Pathogenese dieser Erkrankungen und dem Auftreten des SNPs aufgrund der heterogenen Studienlage eher unwahrscheinlich. Neben Umweltfaktoren und sozialen Faktoren scheinen v.a. weitere genetische Veränderungen mitverantwortlich zu sein. Das kürzlich beim 5-HT_{2C}-Rezeptor entdeckte RNA-Editing, bei dem es im Rahmen einer posttranskriptionalen Modifikation der pre-mRNA zur Ausbildung weiterer funktionell unterschiedlicher Rezeptor-Isoformen kommt, könnte eine solche genetische Veränderung darstellen.

Somit ist die genaue Bedeutung des SNP 5-HT_{2C}Cys23Ser in der Pathogenese neuronaler und psychiatrischer Erkrankungen erst durch weiterführende pharmakologische und genetische Studien möglich, die eine gleichzeitige Kopplung mehrerer genetischer Veränderungen berücksichtigen.

F. Literaturverzeichnis

Alex KD, Pehek EA. Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. *Pharmacol Ther* 2007; 113: 296-320

Arora KK, Sakai A, Catt KJ. Effects of second intracellular loop mutations on signal transduction and internalization of the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem* 1995; 270: 22820-22826

Barann M, Urban B, Stamer U, Dorner Z, Bönisch H, Brüss M. Effects of tramadol and O-demethyl-tramadol on human 5-HT reuptake carriers and human 5-HT_{3A} receptors: a possible mechanism for tramadol-induced early emesis. *Eur J Pharmacol* 2006; 531: 54-58

Barker EL, Westphal RS, Schmidt D, Sanders-Bush E. Constitutively active 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors reveal novel inverse agonist activity of receptor ligands. *J Biol Chem* 1994; 269: 11687-11690

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

Bennett JP Jr., Yamamura HI. Neurotransmitter, hormone, or drug receptorbinding methods. In: Yamamura HI, Enna SJ, Kuhar, eds. *Neurotransmitter Receptor Binding*. New York: Raven Press, 1985, 2nd ed.: 61-89

Berg KA, Maayani S, Goldfarb J, Scaramellini C, Leff P, Clarke WP. Effector pathway-dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus. *Mol Pharmacol* 1998; 54: 94-104

Bernier V, Bichet DG, Bouvier M. Pharmacological chaperone action on G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 528-533

Bhansali P, Dunning J, Singer SE, David L, Schmauss C. Early life stress alters adult serotonin 2C receptor pre-mRNA editing and expression of the alpha subunit of the heterotrimeric G-protein G_q. *J Neurosci* 2007; 27: 1467-1473

Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7: 1513-1523

Boothman L, Raley J, Denk F, Hirani E, Sharp T. In vivo evidence that 5-HT_{2C} receptors inhibit 5-HT neuronal activity via a GABAergic mechanism. *Br J Pharmacol* 2006; 149: 861-869

Brett D, Pospisil H, Valcarcel J, Reich J, Bork P. Alternative splicing and genome complexity. *Nat Genet* 2002; 30: 29-30

- Brodie BB, Pletscher A, Shore PA. Evidence that serotonin has a role in brain function. *Science* 1955; 122: 968
- 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-HT7(a) receptor. *Neurochem Int* 2005; 47: 196-203
- Brüss M, Kostanian A, Bönisch H, Göthert M. The naturally occurring Arg219Leu variant of the human 5-HT1A receptor: impairment of signal transduction. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15: 257-264
- Bubar MJ, Cunningham KA. Distribution of serotonin 5-HT2C receptors in the ventral tegmental area. *Neuroscience* 2007; 146: 286-297
- Burnet PW, Smith KA, Cowen PJ, Fairburn CG, Harrison PJ. Allelic variation of the 5-HT2C receptor (HTR2C) in bulimia nervosa and binge eating disorder. *Psychiatr Genet* 1999; 9: 101-104
- Burns CM, Chu H, Rueter SM, Hutchinson LK, Canton H, Sanders-Bush E, Emeson, RB. Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. *Nature* 1997; 387: 303-308
- Camacho NP, Dow D, Toledano TR, Buckmeyer JK, Gertner JM, Brayton CF, Raggio CL, Root L, Boskey AL. Identification of the oim mutation by dye terminator chemistry combined with automated direct DNA sequencing. *J Orthop Res* 1998; 16: 38-42
- Canton H, Emeson RB, Barker EL, Backstrom JR, Lu JT, Chang MS, Sanders-Bush E. Identification, molecular cloning, and distribution of a short variant of the 5-hydroxytryptamine2C receptor produced by alternative splicing. *Mol Pharmacol* 1996; 50: 799-807
- Chang M, Zhang L, Tam JP, Sanders-Bush E. Dissecting G protein-coupled receptor signaling pathways with membrane-permeable blocking peptides. Endogenous 5-HT(2C) receptors in choroid plexus epithelial cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 7021-7029
- Choi DS, Ward SJ, Messaddeq N, Launay JM, Maroteaux L. 5-HT2B receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and myocardial cells. *Development* 1997; 124: 1745-1755
- Clark AJ . *General Pharmacology. Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin: Springer Verlag, 1937
- Collins S, Lohse MJ, O'Dowd B, Caron MG, Lefkowitz RJ. Structure and regulation of G protein-coupled receptors: the beta 2-adrenergic receptor as a model. *Vitam Horm* 1991; 46: 1-39
- De Deurwaerdere P, Navailles S, Berg KA, Clarke WP, Spampinato U. Constitutive activity of the serotonin2C receptor inhibits in vivo dopamine release in the rat striatum and nucleus accumbens. *J Neurosci* 2004; 24: 3235-3241

- De Luca, V, Mueller DJ, de Bartolomeis A, Kennedy JL. Association of the HTR2C gene and antipsychotic induced weight gain: a meta-analysis. *Int J Neuropsychopharmacol* 2007; 10: 697-704
- Di Mattheo, V, Cacchio M, Di Giulio C, Di Giovanni G, Esposito E. Biochemical evidence that the atypical antipsychotic drugs clozapine and risperidone block 5-HT(2C) receptors in vivo. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 71: 607-613
- Dunlop J, Marquis KL, Lim HK, Leung L, Kao J, Cheesman C, Rosenzweig-Lipson S. Pharmacological profile of the 5-HT(2C) receptor agonist WAY-163909; therapeutic potential in multiple indications. *CNS Drug Rev* 2006; 12: 167-177
- Englander MT, Dulawa SC, Bhansali P, Schmauss C. How stress and fluoxetine modulate serotonin 2C receptor pre-mRNA editing. *J Neurosci* 2005; 25: 648-651
- Fathy DB, Leeb T, Mathis SA, Leeb-Lundberg LM. Spontaneous human B2 bradykinin receptor activity determines the action of partial agonists as agonists or inverse agonists. Effect of basal desensitization. *J Biol Chem* 1999; 274: 29603-2960
- Fentress HM, Grinde E, Mazurkiewicz JE, Backstrom JR, Herrick-Davis K, Sanders-Bush E. Pharmacological properties of the Cys23Ser single nucleotide polymorphism in human 5-HT2C receptor isoforms. *Pharmacogenomics J* 2005; 5: 244-254
- Frank MG, Stryker MP, Tecott LH. Sleep and sleep homeostasis in mice lacking the 5-HT2c receptor. *Neuropsychopharmacology* 2002; 27: 869-873
- Frisch A, Postilnick D, Rockah R, Michaelovsky E, Postilnick S, Birman E, Laor N, Rauchverger B, Kreinin A, Poyurovsky M, Schneidman M, Modai I, Weizman R. Association of unipolar major depressive disorder with genes of the serotonergic and dopaminergic pathways. *Mol Psychiatry* 1999; 4: 389-392
- Gaddum JH, Picarelli ZP. Two kinds of tryptamine receptor. *Br J Pharmacol Chemother* 1957; 12: 323-328
- Gurdal H, Bond RA, Johnson MD, Friedman E, Onaran HO. An efficacy-dependent effect of cardiac overexpression of beta2-adrenoceptor on ligand affinity in transgenic mice. *Mol Pharmacol* 1997; 52: 187-194
- Gutierrez B, Fananas L, Arranz MJ, Valles V, Guillamat R, van Os J, Collier D. Allelic association analysis of the 5-HT2C receptor gene in bipolar affective disorder. *Neurosci Lett* 1996; 212: 65-67
- Halford JC, Harrold JA, Boyland EJ, Lawton CL, Blundell JE. Serotonergic drugs : effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Drugs* 2007; 67: 27-55
- Hamon M, Bourgoin S, Hery F, Simonnet G. Activation of tryptophan hydroxylase by adenosine triphosphate, magnesium, and calcium. *Mol Pharmacol* 1978; 14: 99-110

- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983; 166: 557-580
- Hargreaves RJ, Shephard SL. Pathophysiology of migraine--new insights. *Can J Neurol Sci* 1999; 26 Suppl 3: 12-19
- Harte SE, Kender RG, Borszcz GS. Activation of 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors in the parafascicular nucleus suppresses the affective reaction of rats to noxious stimulation. *Pain* 2005; 113: 405-415
- Hill EM, Stoltenberg SF, Bullard KH, Li S, Zucker RA, Burmeister M. Antisocial alcoholism and serotonin-related polymorphisms: association tests. *Psychiatr Genet* 2002; 12: 143-153
- Himei A, Kono Y, Yoneda H, Sakai T, Koh J, Sakai J, Inada Y, Imamichi H. An association study between alcoholism and the serotonergic receptor genes. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24: 341-342
- Holmes C, Arranz M, Collier D, Powell J, Lovestone S. Depression in Alzheimer's disease: the effect of serotonin receptor gene variation. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2003; 119: 40-43
- Holmes C, Arranz MJ, Powell JF, Collier DA, Lovestone S. 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor polymorphisms and psychopathology in late onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1507-1509
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 71:533-554
- Hu X, Giotakis O, Li T, Karwautz A, Treasure J, Collier DA. Association of the 5-HT_{2c} gene with susceptibility and minimum body mass index in anorexia nervosa. *Neuroreport* 2003; 14: 781-783
- Iwamoto K, Nakatani N, Bundo M, Yoshikawa T, Kato T. Altered RNA editing of serotonin 2C receptor in a rat model of depression. *Neurosci Res* 2005; 53: 69-76
- Jauregi J, Arias C, Vegas O, Alen F, Martinez S, Copet P, Thuilleaux D. A neuropsychological assessment of frontal cognitive functions in Prader-Willi syndrome. *J Intellect Disabil Res* 2007; 51: 350-365
- Jordan BA, Devi LA. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 1999; 399: 697-700
- Julius D, MacDermott AB, Axel R, Jessell TM. Molecular characterization of a functional cDNA encoding the serotonin 1c receptor. *Science* 1988; 241: 558-564
- Kishore S, Stamm S. The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C. *Science* 2006; 311: 230-232

- Kojic L, Dyck RH, Gu Q, Douglas RM, Matsubara J, Cynader MS. Columnar distribution of serotonin-dependent plasticity within kitten striate cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1841-1844
- Kostrzewa RM, Huang NY, Kostrzewa JP, Nowak P, Brus R. Modeling tardive dyskinesia: predictive 5-HT_{2C} receptor antagonist treatment. *Neurotox Res* 2007; 11: 41-50
- Kroeze WK, Kristiansen K, Roth BL. Molecular biology of serotonin receptors structure and function at the molecular level. *Curr Top Med Chem* 2002; 2: 507-528
- Kurzweil D, Barann M, Kostanian A, Combrink S, Bönisch H, Göthert M, Brüss M. Pharmacological and electrophysiological properties of the naturally occurring Pro391Arg variant of the human 5-HT_{3A} receptor. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 165-172
- Lander ES. The new genomics: global views of biology. *Science* 1996; 274: 536-539
- Landry ES, Lapointe NP, Rouillard C, Levesque D, Hedlund PB, Guertin PA. Contribution of spinal 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors to locomotor-like movement induced by 8-OH-DPAT in spinal cord-transected mice. *Eur J Neurosci* 2006; 24: 535-546
- Lappalainen J, Zhang L, Dean M, Oz M, Ozaki N, Yu DH, Virkkunen M, Weight F, Linnoila M, Goldman D. Identification, expression, and pharmacology of a Cys23-Ser23 substitution in the human 5-HT_{2c} receptor gene (HTR_{2C}). *Genomics* 1995; 27: 274-279
- Ledbetter DH, Mascarello JT, Riccardi VM, Harper VD, Airhart SD, Strobel RJ. Chromosome 15 abnormalities and the Prader-Willi syndrome: a follow-up report of 40 cases. *Am J Hum Genet* 1982; 34: 278-285
- Lerer B, Macciardi F, Segman RH, Adolfsson R, Blackwood D, Blairy S, Del Favero J, Dikeos DG, Kaneva R, Lilli R, Massat I, Milanova V, Muir W, Noethen M, Oruc L, Petrova T, Papadimitriou GN, Rietschel M, Serretti A, Souery D, Van Gestel S, Van Broeckhoven C, Mendlewicz J. Variability of 5-HT_{2C} receptor cys23ser polymorphism among European populations and vulnerability to affective disorder. *Mol Psychiatry* 2001; 6: 579-585
- Li QH, Nakadate K, Tanaka-Nakadate S, Nakatsuka D, Cui Y, Watanabe Y. Unique expression patterns of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors in the rat brain during postnatal development: Western blot and immunohistochemical analyses. *J Comp Neurol* 2004; 469: 128-140
- Lopez-Gimenez JF, Tecott LH, Palacios JM, Mengod G, Vilaro MT. Serotonin 5-HT_{2C} receptor knockout mice: autoradiographic analysis of multiple serotonin receptors. *J Neurosci Res* 2002; 67: 69-85
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275

- Lubbert H, Hoffman BJ, Snutch TP, van Dyke T, Levine AJ, Hartig PR, Lester HA, Davidson N. cDNA cloning of a serotonin 5-HT_{1C} receptor by electrophysiological assays of mRNA-injected *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 4332-4336
- Maes M, Meltzer HY. The Serotonin Hypothesis of Major Depression. In: Bloom FE, Kupfer DJ, eds. *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. New York: Raven Press, 1995: 933–944
- Malhotra AK, Goldman D, Ozaki N, Rooney W, Clifton A, Buchanan RW, Breier A, Pickar D. Clozapine response and the 5HT_{2C} Cys23Ser polymorphism. *Neuroreport* 1996; 7: 2100-2102
- Masellis M, Basile V, Meltzer HY, Lieberman JA, Sevy S, Macciardi FM, Cola P, Howard A, Badri F, Nothen MM, Kalow W, Kennedy JL. Serotonin subtype 2 receptor genes and clinical response to clozapine in schizophrenia patients. *Neuropsychopharmacology* 1998; 19: 123-132
- Matthes H, Boschert U, Amlaiky N, Grailhe R, Plassat JL, Muscatelli F, Mattei MG, Hen R. Mouse 5-hydroxytryptamine_{5A} and 5-hydroxytryptamine_{5B} receptors define a new family of serotonin receptors: cloning, functional expression, and chromosomal localization. *Mol Pharmacol* 1993; 43: 313-319
- McCormick D. Carcinoid tumors and syndrome. *Gastroenterol Nurs* 2002; 25: 105-111
- McGrew L, Chang MS, Sanders-Bush E. Phospholipase D activation by endogenous 5-hydroxytryptamine 2C receptors is mediated by Galpha13 and pertussis toxin-insensitive Gbetagamma subunits. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 1339-1343
- Meltzer HY, Matsubara S, Lee JC. Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin₂ pKi values. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 251: 238-246
- Meyer LC, Fuller A, Mitchell D. Zacopride and 8-OH-DPAT reverse opioid-induced respiratory depression and hypoxia but not catatonic immobilization in goats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 290: 405-413
- Milatovich A, Hsieh CL, Bonaminio G, Tecott L, Julius D, Francke U. Serotonin receptor 1c gene assigned to X chromosome in human (band q24) and mouse (bands D-F4). *Hum Mol Genet* 1992; 1: 681-684
- Miller DD, Ellingrod VL, Holman TL, Buckley PF, Arndt S. Clozapine-induced weight gain associated with the 5HT_{2C} receptor -759C/T polymorphism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005; 133: 97-100
- Morrison C, Gannon F. The impact of the PCR plateau phase on quantitative PCR. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1219: 493-498

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-350

Murad I, Kremer I, Dobrusin M, Muhaheed M, Bannoura I, Muller, Schulze TG, Reshef A, Blanaru M, Gathas S, Tsenter V, Rietschel M, Belmaker RH, Maier W, Ebstein RP. A family-based study of the Cys23Ser 5HT2C serotonin receptor polymorphism in schizophrenia. *Am J Med Genet* 2001; 105: 236-238

Navailles S, De Deurwaerdere P, Spampinato U. Clozapine and haloperidol differentially alter the constitutive activity of central serotonin_{2C} receptors in vivo. *Biol Psychiatry* 2006; 59: 568-575

Niesler B, Frank B, Kapeller J, Rappold GA. Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT₃ serotonin receptor-like genes HTR3C, HTR3D and HTR3E. *Gene* 2003; 310: 101-111

Niesler B, Walstab J, Combrink S, Möller D, Kapeller J, Rietdorf J, Bönisch H, Göthert M, Rappold G, Brüss M. Characterization of the novel human serotonin receptor subunits 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D}, and 5-HT_{3E}. *Mol Pharmacol* 2007; 72: 8-17

Niswender CM, Copeland SC, Herrick-Davis K, Emeson RB, Sanders-Bush E. RNA editing of the human serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor silences constitutive activity. *J Biol Chem* 1999; 274: 9472-9478

Okada M, Northup JK, Ozaki N, Russell JT, Linnoila M, Goldman D. Modification of human 5-HT_{2C} receptor function by Cys23Ser, an abundant, naturally occurring amino-acid substitution. *Mol Psychiatry* 2004; 9: 55-64

Oruc L, Verheyen GR, Furac I, Jakovljevic M, Ivezic S, Raeymaekers P, Van Broeckhoven C. Association analysis of the 5-HT_{2C} receptor and 5-HT transporter genes in bipolar disorder. *Am J Med Genet* 1997; 74: 504-506

Pandey GN, Dwivedi Y, Ren X, Rizavi HS, Faludi G, Sarosi A, Palkovits M. Regional distribution and relative abundance of serotonin(2c) receptors in human brain: effect of suicide. *Neurochem Res* 2006; 31:167-176

Pazos A, Hoyer D, Palacios JM. The binding of serotonergic ligands to the porcine choroid plexus: characterization of a new type of serotonin recognition site. *Eur J Pharmacol* 1984; 106: 539-546

Peroutka SJ, Snyder SH. Multiple serotonin receptors: differential binding of [³H]5-hydroxytryptamine, [³H]lysergic acid diethylamide and [³H]spiroperidol. *Mol Pharmacol* 1979; 16: 687-699

Peter D, Liu Y, Sternini C, de Giorgio R, Brecha N, Edwards RH. Differential expression of two vesicular monoamine transporters. *J Neurosci* 1995; 15: 6179-6188

Price RD, Sanders-Bush E. RNA editing of the human serotonin 5-HT_{2C} receptor delays agonist-stimulated calcium release. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 859-862

- Price RD, Weiner DM, Chang MS, Sanders-Bush E. RNA editing of the human serotonin 5-HT_{2C} receptor alters receptor-mediated activation of G₁₃ protein. *J Biol Chem* 2001; 276: 44663-44668
- Rana BK, Shiina T, Insel PA. Genetic variations and polymorphisms of G protein-coupled receptors: functional and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 593-624
- Rapport MM, Green AA, Page IH. Crystalline Serotonin. *Science* 1948; 108: 329-330
- Reaney D. RNA splicing and polynucleotide evolution. *Nature* 1979; 277: 598-600
- Reynolds GP, Hill MJ, Kirk SL. The 5-HT_{2C} receptor and antipsychotic-induced weight gain - mechanisms and genetics. *J Psychopharmacol* 2006; 20: 15-18
- Reynolds GP, Zhang ZJ, Zhang XB. Association of antipsychotic drug-induced weight gain with a 5-HT_{2C} receptor gene polymorphism. *Lancet* 2002; 359: 2086-2087
- Rosenzweig-Lipson S, Zhang J, Mazandarani H, Harrison BL, Sabb A, Sabalski J, Stack G, Welmaker G, Barrett JE, Dunlop J. Antiobesity-like effects of the 5-HT_{2C} receptor agonist WAY-161503. *Brain Res* 2006; 1073-1074: 240-251
- Roth BL, Craigo SC, Choudhary MS, Uluer A, Monsma FJ, Jr., Shen Y et al. Binding of typical and atypical antipsychotic agents to 5-hydroxytryptamine-6 and 5-hydroxytryptamine-7 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 268: 1403-1410
- Roth BL, Meltzer HY, Khan N. Binding of typical and atypical antipsychotic drugs to multiple neurotransmitter receptors. *Adv Pharmacol* 1998; 42: 482-485
- Saltzman AG, Morse B, Whitman MM, Ivanshchenko Y, Jaye M, Felder S. Cloning of the human serotonin 5-HT₂ and 5-HT_{1C} receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 1469-1478
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 5463-5467
- Segman RH, Heresco-Levy U, Finkel B, Inbar R, Neeman T, Schlafman M, Dorevitch A, Yakir A, Lerner A, Goltser T, Shelevoy A, Lerer B. Association between the serotonin 2C receptor gene and tardive dyskinesia in chronic schizophrenia: additive contribution of 5-HT_{2C}ser and DRD3gly alleles to susceptibility. *Psychopharmacology (Berl)* 2000; 152: 408-413
- Sodhi MS, Arranz MJ, Curtis D, Ball DM, Sham P, Roberts GW, Price J, Collier DA, Kerwin RW. Association between clozapine response and allelic variation in the 5-HT_{2C} receptor gene. *Neuroreport* 1995; 7: 169-172
- Song HR, Gu A, Schanen NC. Identification of a new polymorphism in the 3'-untranslated region of the human serotonin receptor 2C (5-HT_{2C}) gene. *Mol Genet Metab* 1999; 66: 224-227

Southall MD, Flinn JM, Holt RW, Chandhoke V. Age dependent changes in serotonin and dopamine receptors in *Aplysia californica*. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1997; 118: 137-141

Tecott LH, Sun LM, Akana SF, Strack AM, Lowenstein DH, Dallman MF, Julius D. Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2c} serotonin receptors. *Nature* 1995; 374: 542-546

Thomas DR. 5-HT_{5A} receptors as a therapeutic target. *Pharmacol Ther* 2006; 111: 707-714

Thomas DR, Larminie CG, Lyons HR, Fosberry A, Hill MJ, Hayes PD. Cloning and pharmacological characterisation of the guinea pig 5-HT_{5A} receptor. *Eur J Pharmacol* 2004; 494: 91-99

Tsuang MT, Bar JL, Stone WS, Faraone SV. Gene-environment interactions in mental disorders. *World Psychiatry* 2004; 3: 73-83

Van Bockstaele EJ, Cestari DM, Pickel VM. Synaptic structure and connectivity of serotonin terminals in the ventral tegmental area: potential sites for modulation of mesolimbic dopamine neurons. *Brain Res* 1994; 647: 307-322

Van Oekelen D, Luyten WH, Leysen JE. 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors and their atypical regulation properties. *Life Sci* 2003; 72: 2429-2449

Vincent JB, Masellis M, Lawrence J, Choi V, Gurling HM, Parikh SV, Kennedy JL. Genetic association analysis of serotonin system genes in bipolar affective disorder. *Am J Psychiatry* 1999; 156: 136-138

Visiers I, Hassan SA, Weinstein H. Differences in conformational properties of the second intracellular loop (IL2) in 5HT_{2C} receptors modified by RNA editing can account for G protein coupling efficiency. *Protein Eng* 2001; 14: 409-414

Wacker DA, Varnes JG, Malmstrom SE, Cao X, Hung CP, Ung T, Wu G, Zhang G, Zuvich E, Thomas MA, Keim WJ, Cullen MJ, Rohrbach KW, Qu Q, Narayanan R, Rossi K, Janovitz E, Lehman-McKeeman L, Malley MF, Devenny J, Pelleymounter MA, Miller KJ, Robl JA. Discovery of (R)-9-ethyl-1,3,4,10b-tetrahydro-7-trifluoromethylpyrazino[2,1-a]isoindol-6(2H)-one, a selective, orally active agonist of the 5-HT_{2C} receptor. *J Med Chem* 2007; 50: 1365-1379

Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ, Lipshutz R, Chee M, Lander ES. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 1998; 280: 1077-1082

- Wang Q, O'Brien PJ, Chen CX, Cho DS, Murray JM, Nishikura K. Altered G protein-coupling functions of RNA editing isoform and splicing variant serotonin_{2C} receptors. *J Neurochem* 2000; 74: 1290-1300
- Werry TD, Gregory KJ, Sexton PM, Christopoulos A. Characterization of serotonin 5-HT_{2C} receptor signaling to extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J Neurochem* 2005; 93:1603-1615
- Westberg L, Bah J, Rastam M, Gillberg C, Wentz E, Melke J, Hellstrand M, Eriksson E. Association between a polymorphism of the 5-HT_{2C} receptor and weight loss in teenage girls. *Neuropsychopharmacology* 2002; 26: 789-793
- Whitaker-Azmitia PM. The discovery of serotonin and its role in neuroscience. *Neuropsychopharmacology* 1999; 21: 2-8
- Willfert B, Zaal R, Brouwers JR. Pharmacogenetics as a tool in the therapy of schizophrenia. *Pharm World Sci* 2005; 27: 20-30
- Xie E, Zhu L, Zhao L, Chang LS. The human serotonin 5-HT_{2C} receptor: complete cDNA, genomic structure, and alternatively spliced variant. *Genomics* 1996; 35: 551-561
- Yagaloff KA, Lozano G, van Dyke T, Levine AJ, Hartig PR. Serotonin 5-HT_{1C} receptors are expressed at high density on choroid plexus tumors from transgenic mice. *Brain Res* 1986; 385: 389-394
- Yuan X, Yamada K, Ishiyama-Shigemoto S, Koyama W, Nonaka K. Identification of polymorphic loci in the promoter region of the serotonin 5-HT_{2C} receptor gene and their association with obesity and type II diabetes. *Diabetologia* 2000; 43: 373-376
- Zhang JY, Kowal DM, Nawoschik SP, Lou Z, Dunlop J. Distinct functional profiles of aripiprazole and olanzapine at RNA edited human 5-HT_{2C} receptor isoforms. *Biochem Pharmacol* 2006; 71: 521-529
- Zhang R, Buczko E, Dufau ML. Requirement of cysteine residues in exons 1-6 of the extracellular domain of the luteinizing hormone receptor for gonadotropin binding. *J Biol Chem* 1996; 271: 5755-5760
- Zhang X, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG. Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science* 2004; 305: 217
- Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 3406-3415

Danksagung

Ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. M. Brüß für die Überlassung des interessanten Themas. Leider verstarb Herr Brüß plötzlich und unerwartet im Februar 2006. Insbesondere für die Einführung in die Molekularbiologie, für zahlreiche, wertvolle Ratschläge im Laboralltag und das immer hervorragende Arbeitsklima bin ich sehr dankbar. Die vielen Unterhaltungen in seinem Büro werde ich niemals vergessen.

Herrn Prof. Dr. H. Bönisch gilt großer Dank für die sofortige Übernahme dieser Arbeit, seiner großen Hilfsbereitschaft, seiner freundlichen Unterstützung und für die zahlreichen, wertvollen Ratschläge und kritischen Anmerkungen.

Herrn Prof. em. Dr. Dr. h. c. mult. M. Göthert danke ich für die Möglichkeit eine Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie anzufertigen und für die freundliche Unterstützung.

Herrn Dr. Ralf Gilsbach danke ich sehr herzlich für seine große Hilfe während der gesamten Zeit und für die Durchsicht des Manuskripts.

Meinen Eltern und meiner Familie gilt großer Dank für die Unterstützung während des gesamten Studiums und die Betreuung während zahlreicher Prüfungsvorbereitungen. Meiner Schwester Almut danke ich herzlich für Ihre technische Hilfe beim Verfassen des Manuskripts. Ganz besonders danken möchte ich meinem Vater für die Motivierung, diese Arbeit zu Ende zu führen, sowie für die Durchsicht des Manuskripts.

Meiner Freundin Babette danke ich sehr herzlich für ihre große Unterstützung und Toleranz während der gesamten letzten Jahre.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, insbesondere Petra Breiden und Natalie Lobes, danke ich für die große Unterstützung. Sandra Combrink, Ralf Gilsbach, Britta Hänisch, Gundula Hesse, Andrea Muck, Jutta Walstab und Birger Wenge danke ich für das ausgezeichnete Arbeitsklima.