

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Stefan Binnenböse
aus Fürth

Tag der mündlichen Prüfung:

Untersuchungen zur Q/R Editierung
der nicht-NMDA Glutamatrezeptor Untereinheiten
in der Maus und in *C. elegans*

Gutachter: Prof. Dr. Peter H. Seeburg
Prof. Dr. Klaus A. Nave

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen, als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Desweiteren erkläre ich hiermit, daß ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt, beziehungsweise die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, 24.1 01

Danksagung

Hiermit danke ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. P. H. Seeburg ganz besonders für die beispielhaft liebenswürdige Unterstützung und herausragende Menschenführung.

Dr. Rolf Sprengel für die Betreuung der Arbeit.

Dr. Miyoko Higuchi danke ich für die Mitbetreuung des *C. elegans* Projektes.

Für geduldige Unterweisungen im 'Halten der Pipette' Annette Herold, Ulli Krüth, Frank N. Single, Jasna Jerecic und Kim Jin-Hyun.

Ulla Amtmann, Annette Herold, Martina Lang und Sabine Grünewald sowie meinen Bench Nachbarn für experimentelle Hilfe, gute Laune und schmunzelndes Ertragen der Entropie.

Dr. Miyoko Higuchi sowie den Mitgliedern der Versuchstier Anstalt des ZMBH für die Hilfe bei der Aufzucht der transgenen Mäuse.

Mein grösster Dank gilt Kim Jin-Hyun und Derya R. Shimshek, ohne deren Freundschaft und Hilfsbereitschaft diese Arbeit nicht zustandegekommen wäre; ausserdem meinen lieben Eltern, die mich auch in nicht-finanzierten Zeiten dieser Arbeit unterstützten.

Prof. Dr. K. A. Nave danke ich für das Begutachten dieser Arbeit.

Zusammenfassung

Im Säugetiergehirn zählen Untereinheiten für ionotrope Glutamatrezeptoren zu den Kandidaten für mRNA Editierung durch positionsspezifische Adenosindeaminierung. Mit besonders hoher Effizienz wird eine mit Q/R bezeichnete Position in der AMPA Rezeptor Untereinheit GluR2 (=GluR-B) editiert. Über Gene Targeting Experimente konnte die Effizienz der GluR2 Q/R Editierung im Gehirn der Maus reduziert werden. Die Folgen waren ein Anstieg in der Ca^{2+} Permeabilität und der makroskopischen Leitfähigkeit der Mutanten AMPA Rezeptoren sowie ein schwerwiegender neurologischer Phänotyp mit Epilepsien und frühem Tod der Versuchstiere gegen Ende der dritten Lebenswoche. Um die Effekte reduzierter Q/R Editierung auch in der adulten Maus studieren zu können wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Mauslinie etabliert, in der eine nichteditierbare GluR2 Untereinheit über das Tetrazyklin-regulierte System induzierbar exprimiert wird (1). Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob Q/R homologe Positionen in ionotopen Glutamatrezeptoren von *Caenorhabditis elegans* editiert werden (2).

Zu (1): Über Klonierung wurden eine rGluR2(Q)cDNA und ein LacZ Reporter gen der Kontrolle Tet-regulierter, bidirektional angeordneter Minimalpromotoren unterstellt und als Transgen in eine C56B6 Mauslinie eingebracht. Doppelmutanten, die aus der Verpaarung mit einem Transgen zur Expression von tTA unter Kontrolle des α CamKII Promoters hervorgingen, exprimierten Tet-reguliert GluR2(Q) in weiten Teilen des Vorderhirns.

Aus der Überexpression von GluR2(Q) resultierte ein Anstieg der Ca^{2+} Permeabilität und der makroskopischen Leitfähigkeit durch AMPA Rezeptoren in hippocampalen CA1 Pyramidenzellen.

Die induzierte Expression des GluR2(Q) von Geburt an führte zu neurologischen Störungen. Mutanten waren zum Teil hypomorph und erlitten spontane, letale epileptische Anfälle innerhalb der vierten Lebenswoche. Für Individuen, in denen spontane epileptische Anfälle ausblieben, konnte eine gegenüber C57BL6 Wildtyp gesteigerte Anfälligkeit für Geräusch-induzierte epileptische Anfälle gezeigt werden. In äusserer Erscheinung und Verhalten normal blieben dagegen Doppelmutanten, deren GluR2(Q) Synthese zum Studium mutationsbedingter Effekte im adulten Tier ab dem 25. Tag nach der Geburt induziert wurde.

Zu (2): Über 'Blast' Suche in der Gen Datenbank des National Center of Biotechnology Information (NCBI) konnten für *C. elegans* 10 Gene mit Homologie zu Glutamatrezeptor Untereinheiten identifiziert werden. 4 aus 7 vorhergesagten AMPA-/Kainat Rezeptor-ähnlichen Proteinsequenzen trugen in Q/R homologer Position ein Glutaminkodon. Über Sequenzierung revers transkribierter mRNA aus *C. elegans* konnte für drei dieser Gene gezeigt werden, dass diese Positionen in vivo nicht editiert sind. Weiter wurde in vitro gezeigt, daß die Editase T20H4.4 aus *C. elegans* die Q/R und R/G Editierungsstellen in GluR2 nicht editiert.

Inhaltsverzeichnis

1	EINFÜHRUNG	3
1.1	IONOTROPE GLUTAMATREZEPTOREN	3
1.2	EDITIERUNG DER AMPA REZEPTOREN	5
1.3	EXPRESSION NICHT Q/R EDITIERTER GLUR2 UNTEREINHEITEN IM GEHIRN DER MAUS	8
1.5	REGULIERTE EXPRESSION VON GLUR2(Q) IN EINEM TRANSGEN	11
1.6	GLUTAMAT REZEPTOREN UND EDITIERUNG IN DEM NEMATODEN <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i>	12
2.	ERGEBNISSE	13
2.1	INDUZIERBARE EXPRESSION VON GLUR2(Q) IM GEHIRN DER MAUS	13
2.1.1	EXPRESSION DER BIDIREKTIONAL GESTEUERTEN GENE GLUR2(Q) UND LACZ IM GEHIRN DER MAUS	13
2.1.2	GEHIRNSPEZIFISCHE EXPRESSION DES TET-ABHÄNGIGEN TRANSAKTIVATORS	14
2.1.3	EXPRESSIONSANALYSE FÜR GLUR2 ^{+/QTRANS}	16
2.1.4	MESSUNG DER AMPA REZEPTOR STRÖME IN GLUR2 ^{+/QTRANS}	16
2.2	PHÄNOTYP DER GLUR2 ^{+/QTRANS} DOPPELMUTANTE	19
2.2	GLUTAMAT REZEPTOREN IN <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i>	22
2.3	UNTERSUCHUNG DER CELGLURs AUF Q/R EDITIERUNG	30
2.4	RNA ABHÄNGIGE ADENOSIN DEAMINASEN IN <i>C. ELEGANS</i>	30
2.5	KOEXPRESSION VON CELADAR1 MIT rGLUR2 MINIGENEN IN HEK293-ZELLEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER DEAMINASEAKTIVITÄT	35
3.	DISKUSSION	37
3.1	KONDITIONALE EXPRESSION EINER rGLUR2(Q) CDNA IN DER MAUS	37
3.1.1	GENOTYP UND PHÄNOTYP IN VERSCHIEDENEN GLUR2(Q/R) MUTANTEN	38
3.1.2	DER TEMPORÄRE EPILEPTISCHE PHÄNOTYP	40
3.5	GLUTAMATREZEPTOR UNTEREINHEITEN IN <i>C. ELEGANS</i> : EINE IN SILICO ANALYSE	43
3.6	UNTERSUCHUNG DER GLUTAMAT REZEPTOREN AUS <i>C. ELEGANS</i> AUF Q/R EDITIERUNG	44
3.7	NICHT-EDITIERUNG DER Q/R UND R/G EDITIERUNGSSTELLEN IN GLUR2 MINIGENEN DURCH DIE DEAMINASE T20H4 .4 AUS <i>C. ELEGANS</i> IN VITRO	47

4. METHODEN	48
4.1 EXPRESSIONSANALYSEN	48
4.1.1 HYBRIDISIEREN VON NITROZELLULOSEFILTERN	48
4.1.2 cDNS SYNTHESE UND RT PCR	48
4.2 ZELLKULTUR	49
4.2.1 GEWINNUNG UND KULTUR PRIMÄRER MAUS-FIBROBLASTEN	49
4.2.2 TRANSFEKTION VON FIBROBLASTENKULTUREN	49
4.2.3 KULTUR UND TRANSFEKTION VON HEK293 ZELLEN	49
4.2.4 PRÄPARATION VON RNS AUS HEK293 KULTUREN	50
4.3 HISTOLOGIE	50
4.3.1 PRÄPARATION VON MAUSGEHIRNEN	50
4.3.2 X-GAL FÄRBUNG	50
4.3.3 IN-SITU HYBRIDISIERUNG	51
4.4 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE MESSUNGEN	51
4.5 TIERBEOBACHTUNG UND SCHLÜSSELTEST	52
4.6 MOLEKULARBIOLOGISCHE UND ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	52
4.7 SERVICELEISTUNGEN	53
4.7.1 PRONUCLEUSINJEKTION	53
4.7.2 HALTUNG TRANSGENER MÄUSE	53
4.7.3 DNS SEQUENZIERUNG	53
4.7.4 OLIGONUKLEOTIDSYNTHESE	53
5 MATERIAL	54
5.1 LISTE DER VERWENDETEN OLIGONUKLEOTIDE	54
5.2 COMPUTERPROGRAMME	55
6. ANHANG	56
6.1 ABKÜRZUNGEN	56
6.2 ABBILDUNGS-VERZEICHNIS	58
7. LITERATUR	59

1 Einführung

Glutamat ist der bedeutenste erregende Neurotransmitter im Gehirn. Die Rezeptoren für diesen Botenstoff bilden zwei grosse Membran-ständige Rezeptorfamilien: Ionotrope Glutamatrezeptoren koppeln das Ereignis der Transmitterbindung an das Öffnen einer Ionenpermeablen Kanalpore während metabotrope Rezeptoren über Interaktion mit G-Proteinen den cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) und PIP (Phosphoinositoltriphosphat) Signalweg ansteuern. Die grosse Diversität beider Rezeptorfamilien spiegelt ihre weitreichende Bedeutung für Funktionen im ZNS wider.

Glutamat-vermittelte Effekte reichen von schneller Erregungsleitung über Funktionen bei der Steuerung von Überleben, Wanderung und Ausdifferenzierung von Neuronen im sich entwickelnden Gehirn bis zu einer Beteiligung an der Ausbildung von Gedächtnisinhalten. In der Neuropathologie ist Glutamat wegen seiner möglichen Beteiligung an akuten neurodegenerativen Prozessen wie sie bei cerebraler Ischämie, traumatischen Hirnschäden und Epilepsien auftreten, von Bedeutung. Störungen des glutamatergen Systems tragen vermutlich auch zum Zelltod bei den chronischen Nervensystemerkrankungen ALS (Amyotrophe Lateralsklerose), Huntingtonsche Krankheit, Parkinsonsche Krankheit und Alzheimersche Krankheit bei.

1.1 Ionotrope Glutamatrezeptoren

In den 90er Jahren wurde die Struktur der ionotropen Glutamatrezeptoren (GluRs) durch Expressionsklonierung entschlüsselt. Es wurde gezeigt, dass es sich um multimere, membranständige Rezeptoren handelt, die mit grosser Wahrscheinlichkeit aus vier Untereinheiten aufgebaut sind. Die Untereinheiten haben eine durchschnittliche Länge von 900 Aminosäuren und weisen drei Transmembranregionen (M1,3,4) und eine Membranschleife (M2), die an der Ausbildung der Membranpore beteiligt ist, auf. (Kuner et al., 1996; 1997). Die Ionenselektivität eines Kanals wird durch einzelne Aminosäurereste innerhalb der Membranschleife determiniert. Die beiden Ligandenbindungsregionen sind zwischen M3 und M4 und vor M1 lokalisiert (Hollmann und Heinemann, 1994). Die Amino- und Carboxytermini befinden sich auf entgegengesetzten Seiten der Plasmamembran, wobei der Carboxyterminus ins Zellinnere ragt und Phosphorylierungsstellen sowie Erkennungsmotive für die Interaktion mit anderen Proteinen tragen kann (Abb.1B). Bei Säugetieren fand man bis heute 18 Gene, die für GluR-Untereinheiten kodieren (Dingledine et al., 1999).

Nach ihren selektiven Agonisten formen die GluR-Untereinheiten GluR1 bis 4 (A-D) die Gruppe der AMPA (L- α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isokazolpropionsäure) Rezeptoren, die Untereinheiten GluR5 bis 7 und KA1 und 2 die Gruppe der Kainat Rezeptoren und die Untereinheiten NR1 und NR2A-D die Gruppe der NMDA (N-methyl-

D-Aspartat) Rezeptoren (Abb.1A). Die GluR-Untereinheiten delta1 und delta2 lassen sich keiner der genannten drei Gruppen zuordnen. Ihre Funktion ist noch unbekannt. Zusätzlich wurden bei Frosch und Huhn noch Proteine gefunden, die man als Kainat Bindungs Proteine bezeichnet, deren Rolle als Ionenkanal jedoch umstritten ist.

Vergleiche von Gensequenzen lassen für die GluRs einen monophyletischen Urprung vermuten. Innerhalb dieser Verwandtschaftsgruppe bilden die AMPA Rezeptoren aufgrund sehr hoher Sequenzhomologie der einzelnen Untereinheiten die geschlossenste Genfamilie, während die Untereinheiten der Kainat Rezeptoren zwei Genfamilien und die Untereinheiten der NMDA Rezeptoren drei Genfamilien angehören.

Elektrophysiologisch sind AMPA Rezeptoren durch schnelle Kinetik und hohe Leitfähigkeit für Na^+ -Ionen gekennzeichnet. Sie sind die Vermittler der schnellen erregenden postsynaptischen Potentiale im Zentralnervensystem (ZNS). NMDA Rezeptoren, die in den Synapsen meist mit AMPA Rezeptoren kolokalisiert sind, benötigen neben Glutamat zusätzlich den Neurotransmitter Glyzin und zeichnen sich durch einen spannungsabhängigen Block durch Magnesiumionen aus. Daher öffnen sich NMDA Rezeptoren erst dann, wenn Glutamat im synaptischen Spalt vorliegt und die postsynaptische Membran bereits depolarisiert ist. Diese Steuerung macht NMDA Rezeptoren zu Sensoren prä- und postsynaptischer Aktivität (Koinzidenzdetektion). Neben Na^+ sind NMDA Rezeptoren vor allem für Ca^{2+} durchlässig, welches als sekundärer Botenstoff in Erscheinung tritt. Einstrom von Ca^{2+} durch NMDA Rezeptoren als Antwort auf tetanische Reize kann zu einer Langzeitpotenzierung (LTP) der Synapse, d.h. zu einer Veränderung der synaptischen Effizienz, führen. NMDA Rezeptoren scheinen eine Schlüsselrolle in der synaptischen Plastizität und damit in Zusammenhang mit Gedächtnis, Lernen und Gehirnentwicklung zu spielen.

Für Kainat Rezeptoren wurde noch keine eindeutige Funktion nachgewiesen. Eine Unterscheidung von AMPA- und Kainat Rezeptoren auf experimentellem Weg war bisher nur eingeschränkt möglich, da erst seit jüngster Zeit geeignete Antagonisten zur Verfügung stehen, um beide Kanaltypen selektiv zu blockieren.

Da die elektrophysiologischen Eigenschaften der ionotropen Glutamatrezeptoren von der Untereinheitenzusammensetzung abhängen, herrscht aufgrund der möglichen Kombinationen unterschiedlicher GluR-Untereinheiten eine grosse Rezeptorvielfalt (Sprengel und Seeburg, 1993). Die Anzahl der verfügbaren Untereinheiten wird noch dramatisch erhöht, da viele der Untereinheiten durch posttranskriptionelle Modifikationen wie Splicen (Köhler et al., 1994) oder Editierung (Seeburg et al., 1998) verändert werden.

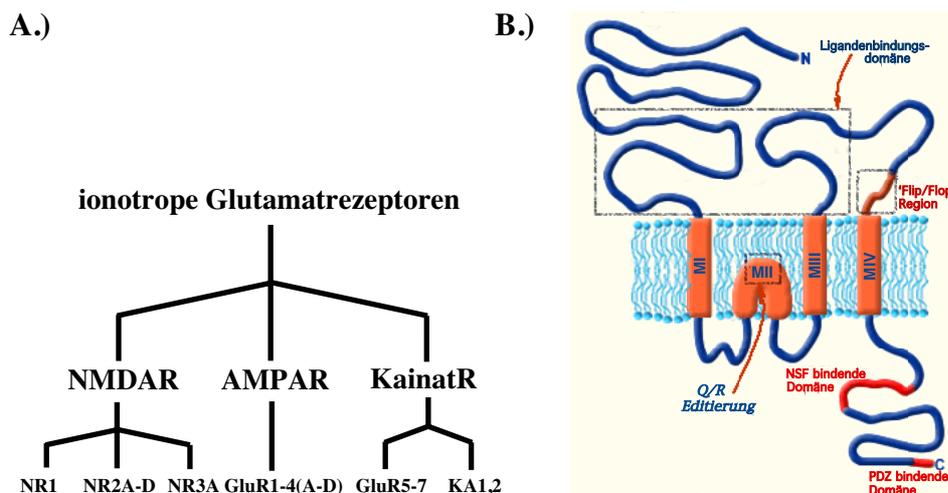


Abbildung 1: Ionotrope Glutamat Rezeptoren der Säugetiere A.) Ionotrope Glutamaterezeptoren werden nach ihren selektiven Agonisten pharmakologisch in NMDA Rezeptoren (NMDAR), AMPA Rezeptoren (AMPA) und Kainat Rezeptoren (KainatR) eingeteilt. Nach Kriterien der Gen Verwandtschaft bilden die vier AMPA Rezeptor Untereinheiten eine geschlossene Gen Familie, während die NMDA Rezeptor Untereinheiten drei Genfamilien und die Kainat Rezeptor Untereinheiten zwei Genfamilien zugeordnet werden. B.) Schematische Darstellung des Proteins der AMPA Rezeptor Untereinheit GluR2 mit vier in der Zellmembran (hellblau) gelegenen Membranregionen (MI-IV), der aus zwei extrazellulär lokalisierten Sequenzabschnitten (S1, 2) gebildeten Bindungsdomäne für den Liganden Glutamat, der Region für die alternativen Flip/Flop Splice-Module sowie den im intrazellulär orientierten carboxyterminalen Bereich des Proteins gelegenen Bindungs Domänen für die Interaktion mit zellulären Proteinen. Die als Membranschleife angeordnete Membranregion MII ist an der Ausbildung der Membranpore beteiligt. Auf dem Apex der Membranschleife befindliche Aminosäure Positionen, die auch eine mit Q/R bezeichnete Editierstelle beinhalten, sind Determinanten für Ionenleitungseigenschaften des AMPA Rezeptors.

1.2 Editierung der AMPA Rezeptoren

AMPA Rezeptoren weisen in Abhängigkeit von Gehirnregion und Nervenzelltyp unterschiedlich hohe Permeabilität für Ca^{2+} Ionen auf. So sind AMPA Rezeptoren, welche in Prinzipalneuronen auftreten, nahezu undurchlässig für Ca^{2+} , während kortikale und neokortikale Interneurone, auditorische Schalt Neurone und Spinal Neurone des Dorsalhorns AMPA Rezeptoren mit hoher Ca^{2+} Leitfähigkeit exprimieren (Geiger et al., 1995). Geringe Ca^{2+} Leitfähigkeit ist stets korreliert mit dem Auftreten der GluR2 Untereinheit in AMPA Rezeptoren. GluR2 ist gekennzeichnet durch die Aminosäure Arginin (R) in der an der Auskleidung der Membranpore beteiligten Membranschleife M2, während die übrigen Untereinheiten in homologer Position Glutamin (Q) tragen. Sequenzanalysen der M2 Region des GluR2 Gens ergaben, dass sich in dieser Position statt des erwarteten Arginincodons wie bei den übrigen AMPA Rezeptor Untereinheiten ein Glutaminocodon befindet. Nachdem man das Vorhandensein von alternativen Exons für M2 oder allelischer Variabilität für GluR2 ausgeschlossen hatte (Köhler, 1993), wurde

eine posttranskriptionelle Editierung der mRNA als möglicher Mechanismus für das Entstehen eines Arginincodons aus einem im Gen vorliegenden Glutaminocodon postuliert (Sommer et al., 1991).

RNA Editierung wird als in vivo Veränderung des Informationsgehaltes einer RNA durch andere Mechanismen als Splicen, 5'- oder 3' Prozessierung oder Bildung hypermodifizierter Basen definiert (Scott, 1995). Unter diesem Begriff versammeln sich also Ausnahmen von der Regel, daß die Aminosäuresequenz eines Proteins vollständig auf die Sequenz des zugehörigen Gens zurückgeführt werden kann. Editierung bei Säugern wurde zum ersten Mal im Transkript des Apolipoprotein B (ApoB) (Chen et al., 1987; Powell et al., 1987), einem wichtigen Baustein des Lipidstoffwechsels, entdeckt. Durch eine Umwandlung der Base Cytosin zu Uracil in Position 6666 der ApoB mRNA entsteht aus einem Glutaminocodon ein Stopcodon, wodurch das Proteinprodukt der editierten mRNA Form, das ApoB48, eine verkürzte Variante, gebildet werden kann. Hervorgegangen aus demselben Gen zeigen beide Protein Varianten funktionelle Unterschiede. Die spezifische Deaminierung des Cytosins wird durch das Enzym APOBEC-1 (apoB mRNA editierende Cytosin Deaminase) katalysiert.

Eine andere frühe Beschreibung von RNA Editierung betrifft die multiplen Insertionen und Deletionen von Uracil in Kinetoplasten mRNA von Trypanosomen (Benne et al., 1986), wodurch es zu Verschiebungen des offenen Leserasters und zur Entstehung neuer Initiations- und Terminationscodons kommen kann. Erst durch die Editierung entsteht ein translatierbares Leseraster in der RNA, welches zu einem funktionalen Protein führt.

ApoB-Editierung und trypanosomale Editierung führen die beiden Mechanismen der RNA-Editierungen vor. Während bei Trypanosomen und dem Schleimpilz *Physarum polycephalum* Insertionen oder Deletionen von Nukleotiden eine vorangehende Spaltung des Phosphodiesterückrats erfordern (Insertions-/ Deletionseditierung), erfolgt die ApoB-Editierung als Modifikation eines Nukleotids innerhalb des intakten RNA-Moleküls (Modifikationseditierung). Die Positionsspezifität mitochondrialer Insertions-Deletions Editierung erfordert die Anlagerung kleiner Helfer-RNAs (engl. Guide-RNA). Bei Säugetieren wird die Modifikation von Nukleotiden von Deaminasen katalysiert. Diese erkennen eine die Editierungsstelle umgebende doppelstängige RNA-Struktur, die auf dem Vorhandensein zweier unvollkommen komplementärer RNA- Abschnitte innerhalb einer mRNA beruhen (Adenosineditierung in GluRs) oder im Konzert mit weiteren Proteinen eine lineare Sequenz (ApoB-Editierung).

Die Entdeckung von Editierungsphänomenen an mRNAs, tRNAs und rRNAs zahlreicher weiterer Organismen auf verschiedensten Stufen der eukaryotischen Stammbaumes wie zb. Schleimpilzen, höheren Pflanzen, Nematoden und Säugetieren deutet die weite Verbreitung von mRNA Editierungen bei Eukaryonten an (Bass, 1997).

Im Fall des GluR2 erfolgt die Umwandlung des genomischen Glutamin (Q) kodons (CAG) in ein Arginin (R) kodon (CGG) in der mit Q/R bezeichneten Position durch Deaminierung eines Adenosins (A) zu Inosin (I), welches von der Translationsmaschinerie als Guanosin (G) gelesen wird. Für den in prä-mRNA, also vor

dem Splicing erfolgenden Editierungsschritt ist ein mit ECS (editing complementary sequence) bezeichnetes, cis-wirksames, intronisches Element von Bedeutung. Dieses führt zur Ausbildung einer die Q/R Position umgebenden, doppelstängigen RNA-Struktur (Higuchi et al., 1993), die von dem Editierungsenzym ADAR2, einer RNA abhängigen positionsspezifischen Deaminase erkannt wird (Melcher et al., 1995). ADAR2 wird in allen daraufhin untersuchten Geweben des Gehirns exprimiert und editiert die Q/R Position in GluR2 mit einer Effizienz >99% (Higuchi et al., 1993). Wie quantitative Analysen bestätigten, ist die unterschiedlich hohe Ca²⁺ Permeabilität der AMPA Rezeptoren in verschiedenen Nervenzelltypen nicht über die Effizienz der Editierung sondern über die Expressionshöhe des editierten GluR2 zu erklären.

Innerhalb der ionotropen Glutamatrezeptoren ist mRNA Editierung nicht auf die Q/R Position in GluR2 beschränkt: insgesamt sieben weitere Editierungspositionen wurden in fünf verschiedenen Genen entdeckt. Wie in GluR2 erfolgt in allen Fällen eine Deaminierung nach dem Adenosin-Inosin Mechanismus. Allerdings ist die Effizienz der Editierung in keinem Fall so hoch wie in GluR2 und oft entwicklungsabhängig. So erfolgt die Umwandlung eines Arginin (R) -Codons in ein Glyzin (G) -Codon in einer Position, die den Flip/Flop Splice Modulen in GluR2-4 vorangeschaltet ist (R/G Position) mit niedriger Effizienz in embryonalen Stadien und steigert sich dann bis zu 42. Tag nach der Geburt (50-95% je nach Untereinheit und Spliceform) (Lomeli et al., 1994). Zwei der Q/R-Position in GluR2 homologe Editierungsstellen in GluR5 und GluR6 werden zu 40 bzw. 80% editiert (Bernard et al., 1994).

Editierungsstellen in AMPA Rezeptoren sind Schlüsselpositionen für elektrophysiologische Eigenschaften dieser Ionenkanäle. Ebenso wie in GluR2 sind auch die Q/R-Positionen in GluR5 und GluR6 sowie die die I/V und Y/C Positionen in der M1 Region von GluR6 Determinanten der Ca²⁺ Permeabilität (Köhler et al., 1993). In der R/G Position editierte GluR Untereinheiten vermitteln verkürzte Refraktärzeiten und damit eine verbessertes Ansprechen dieser Kanäle auf schnelle Reizimpulsfolgen (Lomeli et al., 1994)

Neben den acht exonischen Editierungsstellen werden in AMPA Rezeptoren auch intronische Positionen der prä mRNS editiert (Hotspot1, -2). Deren Deaminierung erfolgt zum Großteil durch das Enzym ADAR1, welches zusammen mit ADAR2 auch ein möglicher Kandidat für die Editierung der R/G Positionen in GluR2-4 ist (Maas et al., 1996). Für die dritte, im Gehirn nachgewiesene Editase, ADAR3, konnte bisher kein Substrat gefunden werden (Melcher et al., 1996). Dieses Enzym weist auch das am stärksten eingeschränkte Expressionsmuster auf, fast ausschließlich in thalamischen Kernen, während ADAR2 ein ausgesprochen neuronales und ADAR1 ein ubiquitäres Expressionsmuster hat. Strukturell charakterisiert sind die Editasen durch das Vorhandensein von jeweils einer Deaminierungsdomäne mit drei hochkonservierten Bereichen, die für die Enzymfunktion von Bedeutung sind, und drei (ADAR1) bzw zwei (ADAR2, -3) dsRNA bindenden Domänen (O'Connell et al., 1995; Melcher et al., 1996).

Der Sequenzvergleich ergibt eine höhere Verwandtschaft zwischen ADAR2, 3 gegenüber ADAR1.

Die dsRNA Bereiche, die den Editasen als Erkennungsstellen dienen, zeigen Unterschiede in der Raumstruktur und Ausdehnung sowie der Einbettung des zu editierenden Adenosins innerhalb der dsRNA. Dieses kann innerhalb der dsRNA Struktur basengepaart (Q/R, GluR2), in einer Basenfehlpaarung (R/G, GluR2-4) oder in einer dsRNA-Schleife (Q/R, GluR5, -6) vorliegen. Das ECS-Element befindet sich in GluR2 in einem Abstand von 300 Nukleotiden stromabwärts der Q/R Position und erstreckt sich über 10 Nukleotide, während dieser zur Editierungsstelle komplementäre RNA-Bereich für die Q/R-Positionen in GluR5 und GluR6 1700 Nucleotide stromabwärts (Herb et al., 1996) und für die R/G-Positionen in GluR2-4 stromabwärts unmittelbar benachbart gelegen ist (Seeburg et al., 1998).

1.3 Expression nicht Q/R editierter GluR2 Untereinheiten im Gehirn der Maus

Kalzium hat in zellulären Systemen die Funktion eines sekundären Botenstoffs. An präsynaptischen Membranen triggert Ca^{2+} die Exozytose synaptischer Vesikel. Der Ca^{2+} Einstrom durch NMDA Rezeptoren setzt intrazelluläre Signalkaskaden in Gang, die bei Aufbau, Aufrechterhaltung und Eliminierung von synaptischen Verbindungen sowie Langzeitveränderungen in der Effizienz von Synapsen vermitteln. Übermäßiger Einstrom von Ca^{2+} in Nervenzellen zB. nach Ischemie oder bei Auftreten von Epilepsien, kann sich andererseits zytotoxisch auswirken und zum Absterben oder Sklerose betroffener Neurone führen.

Bei Säugetieren wird die Ca^{2+} Permeabilität an postsynaptischen Membranen von Prinzipalneuronen durch NMDA Rezeptoren vermittelt, während die AMPA Rezeptoren aufgrund der Präsenz von editiertem GluR2 impermeabel für Ca^{2+} sind. Nach bisherigen Erkenntnissen sind dagegen die zu AMPA Rezeptoren der Säugetiere homologen Glutamat Rezeptoren bei Invertebraten Ca^{2+} permeabel, da das in Q/R homologer Position befindliche Glutaminkodon nicht editiert wird.

Um die Bedeutung, die der Q/R-Editierungsschritt bei Säugetieren für Funktionen des Nervensystems hat, in einem Tiermodell studieren zu können, wurde das ECS Element in einem der beiden GluR2 Allele mittels Gene Targeting in embryonalen Stammzellen der Maus deletiert (Brusa et al., 1995). Über Blastocysteninjektion homolog rekombinierter Zellklone erhielt man Mäuse, die uneditiertes GluR2 und damit AMPA Rezeptoren mit erhöhter Ca^{2+} Permeabilität ($P_{\text{Ca}^{2+}}$) exprimierten. Diese, bezüglich des mutierten Allels heterozygoten Tiere ($\text{GluR2}^{+/\Delta\text{ECS}}$) entwickelten ab dem 13. Tag nach der Geburt Neuropathien. Dies äußerte sich vor allem durch spontane und wiederholt auftretende epileptische Anfälle, sowie Phasen erhöhter motorischer Aktivität. Alle heterozygoten Mäuse starben bis zum 20. Tag nach der Geburt. Neuronale Degenerationserscheinungen

in der lateralen Region des hippocampalen CA3-Bereichs bei $\text{GluR2}^{+\Delta\text{ECS}}$ erinnern an hippocampale Lesionen, wie sie bei Kainatinduzierten Epilepsien oder Temporallappen Epilepsien des Menschen auftreten.

Ein $\text{GluR2}^{+\Delta\text{ECS}}$ sehr ähnlicher epileptischer Phänotyp mit früher Lethalität bis P20 tritt auch bei Mutanten auf, die zwei Nullallele für die Editase ADAR2 (ADAR2-Knockout, $\text{ADAR2}^{-/-}$) tragen (Higuchi et al., 2000). Keine Epilepsien treten dagegen in GluR2 Knockout Mutanten ($\text{GluR2}^{-/-}$) auf, obwohl diese Tiere dreissigfach erhöhte $\text{P}_{\text{Ca}^{2+}}$ aufweisen gegenüber 4.5-5 fach erhöhter $\text{P}_{\text{Ca}^{2+}}$ bei $\text{GluR2}^{+\Delta\text{ECS}}$ und $\text{ADAR2}^{-/-}$ (Jia et al., 1996). Die $\text{GluR2}^{-/-}$ Mäuse zeigen lediglich Hypomorphien und eine geringe Sterblichkeitsrate (20%) im Altersabschnitt um P20, entwickeln sich aber später normal, abgesehen von leichten Störungen der motorischen Koordination im 'Verhalten im offenen Feld'. Der Effekt unterschiedlicher Verhältnisse zwischen GluR2(Q) und $-(\text{R})$ Untereinheiten im Gehirn der Maus, wurde in Mutanten $\text{GluR2}^{\text{Neo}}$ und $\text{GluR2}^{\text{Ntrans}}$ untersucht (Feldmeyer et al., 1999). In der Neo Linie sorgt ein in einem ΔECS Konstrukt belassenes loxP flankiertes Neomycin Gen möglicherweise aufgrund frühzeitiger Termination der Transkription oder einer Behinderung der Splicingeffizienz in $\text{GluR2-}\Delta\text{ECS}$ Transkripten für eine Reduktion der GluR2(Q) mRNA auf 10% gegenüber Wildtyp GluR2 mRNA. Heterozygote Tiere dieser Linie mit zweifach erhöhter $\text{P}_{\text{Ca}^{2+}}$ durch AMPA Rezeptoren in CA1 Neuronen weisen lediglich Einschränkungen im 'Verhalten im offenen Feld' und eine geringe Sterblichkeitsrate (20%) auf, während homozygote Neo Mutanten mit 30fach erhöhter $\text{P}_{\text{Ca}^{2+}}$ durch Lethargie, ausgeprägte Hypomorphie und frühen Tod bis P20 gekennzeichnet sind. Eine sehr geringe Erhöhung der $\text{P}_{\text{Ca}^{2+}}$ und eine ungestörte Jugendentwicklung weist die Mauslinie $\text{GluR2}^{++/\text{Ntrans}}$ auf, welche multiple Kopien eines GluR2(N) Minigens als Transgen zu einer Expressionshöhe von 63% eines Wildtypparallels exprimiert. Diese Mutante entwickelte allerdings in älteren Stadien eine Motoneuronkrankheit. Aus der Kreuzung der $\text{GluR2}^{++/\text{Ntrans}}$ mit $\text{GluR2}^{+/\text{Neo}}$ resultiert ein epileptischer Phänotyp, der dem ΔECS Phänotyp stark ähnelt (hypomorph, übererregbar, früher Tod <P20).

Die erwähnten Experimente ergeben eine verwirrende Vielfalt durch GluR2 Änderungen verursachter Phänotypen. Allerdings besteht Korrelation zwischen der Expressionshöhe an GluR2(Q) und GluR2(R) Untereinheiten und den beobachteten Phänotypen, wonach eine Zusammenfassung in Gruppen möglich ist: Epilepsien treten in heterozygoten Versuchstieren mit gleichzeitig hoher Expression an GluR2(Q) und GluR2(R) Untereinheiten auf (Gruppe 1: $\text{GluR2}^{+\Delta\text{ECS}}$, $\text{GluR2}^{+/\text{Ntrans/Neo}}$). Keine Epilepsien entwickeln GluR2 Mutanten dagegen bei 1) geringer Expression des mutierten Allels ($\text{GluR2}^{+/\text{Neo}}$) in einem heterozygoten Tier (Gruppe 2) oder 2) sehr geringer oder fehlender Expression an Gesamt GluR2 (Gruppe 3: $\text{GluR2}^{\text{Neo/Neo}}$, $\text{GluR2}^{-/-}$).

Ein Zusammenhang zwischen Phänotyp und AMPA Rezeptor Eigenschaften kann schwer hergestellt werden, da durch den Einbau von nicht editiertem GluR2 in AMPA Rezeptoren neben $\text{P}_{\text{Ca}^{2+}}$ auch die Einzelkanalleitfähigkeit, die Spannungsabhängigkeit,

Schaltkinetik und Refraktärzeit beeinflusst werden. Vor allem die innerhalb der epileptischen Gruppe stark erhöhte makroskopische Leitfähigkeit durch AMPA Rezeptoren, die in erster Linie eine Folge der ca. dreifach gesteigerten Einzelkanalleitfähigkeit von AMPA Rezeptoren ohne GluR2(R) gegenüber AMPA Rezeptoren, welche GluR2(R) enthalten, ist, wird als Ursache des epileptischen Phänotyps diskutiert. Keine signifikante Steigerung der makroskopischen Leitfähigkeit weist die Gruppe 3 auf, obwohl die $P_{Ca^{2+}}$ in diesen Tieren ein Maximum erreicht (30x). Dies lässt auf eine verringerte Anzahl an AMPA Rezeptoren in diesen Mutanten schließen. In Unterstützung der Hypothese, dass der GluR2 Untereinheit auch Kontrollfunktionen beim Membrantargeting und der Aggregation von Untereinheiten zu AMPA Rezeptoren erfüllt, würde eine fehlende oder sehr geringe Expression an GluR2 auch zu einer über den Mangel an GluR2 Untereinheiten hinausgehenden Verringerung der AMPA Rezeptor Zahl und damit zu der beobachteten Untererregbarkeit (Lethargie) in Gruppe 3 führen.

Die Ausprägung des neurologischen Erkrankung verläuft bei den meisten Mutanten entwicklungsabhängig, im Rahmen der postnatalen Reifung des Gehirns. Dabei treten, mit einer Ausnahme, keine Anzeichen einer mutationsbedingt veränderten Gehirnanatomie auf. Bei $GluR2^{Neo/Neo}$ wurde eine Verringerung in Länge und Anzahl der basalen Dendriten im CA3 des Hippocampus festgestellt. Sclerotische Schäden im CA3 aller epileptischen Phänotypen sind dagegen als Folgeschäden epileptiformer Aktivität der Neurone anzusehen und wurden auch nach Kainat-induziertem Status Epilepticus und bei Fällen von humaner Temporallappen Epilepsie beobachtet.

Der Tod der epileptischen und $GluR2^{Neo/Neo}$ Mutanten tritt innerhalb eines engen Zeitfensters, gegen Ende der dritten postnatalen Woche ein. GluR2 'Knockdown' Experimente haben bestätigt, dass das Gehirn der Maus in diesem Reifungsabschnitt besonders empfindlich auf eine Verringerung der GluR2 Expression im Gehirn reagiert (Friedman et al., 1998).

1.5 Regulierte Expression von GluR2(Q) in einem Transgen

Ist der frühe Tod heterozygoter GluR2^{+/ Δ ECS} Mutanten entwicklungsbedingt? Und welche Konsequenzen hat die Editierung der GluR2 Untereinheit für synaptische Funktionen im ausgereiften Zentralnervensystem? Der in der vorliegenden Arbeit zur Beantwortung dieser Fragestellungen verfolgte Versuchsansatz soll folgende Voraussetzungen erfüllen

1. Die in das Versuchstier eingebrachte GluR2 Mutation soll nur in bestimmten Hirnarealen und Zellpopulationen z.B. in Pyramidenzellen des Hippocampus exprimiert werden.
2. Die Expression des mutierten GluR2 Allels soll in Amplitude und Zeitverlauf regulierbar sein. Als Regulator bietet sich das durch Tetrazyklin (-derivate) reprimierbare Tet-System (Gossen et al., 1994) an. Dieses besteht aus (i) dem Tet-Transaktivator (tTA), einer Fusion des Tet- Repressors und der Transkriptionsfaktor VP16 Transaktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus, (ii) dem Minimalpromoter aus Cytomegalovirus (CMV) vor dem Zielgen und (iii) einer diesem Promoter vorangeschalteten tTA Bindungsstelle, zusammengesetzt aus einer siebenfachen Aneinanderreihung des Tet-Operators. In Abwesenheit von Tetrazyklinen bindet tTA mit der Tet-Repressordomäne an die Tet-Operatoren und induziert über die VP16 Transaktivierungsdomäne die Transkription des Zielgens. Tetrazykline reduzieren die Affinität zwischen tTA und Operatorsequenz und inaktivieren damit die Expression des Zielgens. Folglich lässt sich in einer Maus ein durch Tetrazyklin regulierbares GluR2 Gen zu einem beliebigen Zeitpunkt durch Absetzen des zB. während der Entwicklung verabreichten Tetrazyklins einschalten. Die geforderte Zell- und Gewebsspezifität der Mutation wird dadurch erzielt, dass tTA unter Kontrolle eines regional spezifischen Promoters exprimiert wird.

1.6 Glutamat Rezeptoren und Editierung in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans*

Seit der Molekularbiologe Sydney Brenner Mitte der sechziger Jahre an *C. elegans* die Mechanismen der Nervensystementwicklung untersuchte, ist die Bedeutung dieses Bodennematoden als Modellsystem für das Studium von Tierentwicklung und Verhalten und deren genetischer Grundlage stetig gewachsen. Gegenüber anderen vielzelligen Modellsystemen besitzt *C. elegans* die Vorzüge einer besonders einfachen Morphologie, Zellzahlkonstanz, leichter Kultivierbarkeit, schneller Generationszyklen und hoher Reproduktionsrate. Nach der lückenlosen Aufschlüsselung des Zellstammbaums und aller neuronalen Verschaltungen in dem zellkonstanten Organismus und der 1998 vollendeten Sequenzierung des gesamten Genoms ist *C. elegans* heute der vermutlich bestuntersuchte vielzellige Organismus.

Das Nervensystem von *C. elegans* umfasst 382 Neurone, die in dem durchsichtigen Organismus experimentell leicht zugänglich sind. Der Nematode ist daher zum Studium von Zusammenhängen zwischen der Aktivität von Neuronen in neuronalen Netzwerken und beobachtetem Verhalten von besonderem Interesse.

Das Genom von *C. elegans* hat mit 97 Mio Basenpaaren nur ein Dreissigstel des Umfangs des menschlichen Genoms. Ein Vergleich vorhergesagter *C. elegans* Gene mit Genen im Nervensystemen der Vertebraten zeigte, daß die meisten Ionenkanäle und Sekundären Botenstoff Systeme hochkonserviert sind. Auch die Familie der ionotropen Glutamatrezeptoren ist in *C. elegans* durch 10 Gene vertreten (Bargmann, 1998), wobei 6 Gene der AMPA Rezeptor / Kainat Rezeptor Gruppe und 2 Gene der NMDA Rezeptor Gruppe zugeordnet werden können. Zwei Gene aus *C. elegans* weisen Homologien zu Editasen (ADARs) der Säugetiere auf.

In dieser Arbeit sollen die vorhergesagten GluR- und ADAR- Sequenzen hinsichtlich ihres Verwandtschaftsgrades untereinander und gegenüber GluRs und ADARs der Säugetiere untersucht werden. Weiterhin soll experimentell gezeigt werden, ob posttranskriptionelle Modifikation in Form von Q/R mRNA Editierung bereits bei *C. elegans* dazu beiträgt, die Rezeptorfamilie zu vergrößern. Man erhält so Aufschluss darüber, wie groß die GluR- Familie auf dieser Stufe der Evolution tatsächlich ist und welche Heterogenität an ionotropen Glutamatrezeptoren für das Funktionieren eines sehr einfachen Nervensystems benötigt wird.

2. Ergebnisse

2.1 Induzierbare Expression von GluR2(Q) im Gehirn der Maus

2.1.1 Expression der bidirektional gesteuerten Gene GluR2(Q) und LacZ im Gehirn der Maus

Für eine Tetrazyklinabhängige Expression im Gehirn der Maus wurde GluR2 cDNA unter die Kontrolle eines tTA abhängigen Minimalpromoters gebracht. Hierfür wurde ein Expressionsplasmid (pUB-2a) verwendet, welches β -Galactosidase und Luciferase als bidirektional exprimierbare Reporter enthält (Abb. 2A). Anstelle des Luciferase Gens wurde die GluR2 cDNA insertiert, um eine gleichzeitige Expression von GluR2(Q) und LacZ zu gewährleisten (Abb. 2B). Durch X-Gal Färbung sollte dann, eine gleichzeitige Expression beider Gene vorausgesetzt, die Expression der GluR2 cDNA im Gehirn der Mausmutanten nachgewiesen werden können.

Das GluR2 Gen wurde in Form einer rGluR2(Q)flip cDNA eingesetzt. Das Fehlen des intronischen ECS-Elements in cDNA sollte in der Mausmutante die durch ADARs vermittelte posttranskriptionelle Editierung der Q/R-Position in rGluR2 verhindern. Die GluR2 cDNA trägt eine Punktmutation im dritten Nukleotid des Glutamincodons der Q/R Position von CAG nach CAA, was jedoch zu keiner Veränderung der Codonbedeutung (CAG=Q; CAA=Q) und damit der physiologischen Funktion des verwendeten GluR2 führt. Zur Optimierung der Translationseffizienz und damit der Expressionshöhe des rGluR2(Q) wurde die GluR2(Q)cDNA am 5' Ende mit der ca. 200 Basenpaare umfassenden nicht translatierten 'Tripartiteleader' Sequenz aus dem Adenovirus (Logan et al., 1984) versehen. Der kodierenden Sequenz des GluR2 wurde ein Polyadenylsignal des humanen Wachstumsfaktor Gens (hgh-PA) angefügt.

Das bidirektionale Konstrukt GluR2'Qtrans' wurde als AseI-Fragment nach Aufreinigung im Sucrosegradienten in Pronuclei befruchteter Eizellen der Maus injiziert. Durch PCR Analyse der DNA aus Mausschwanz Gewebe konnten unter 34 Nachkommen 9 Tiere mit integriertem Transgen identifiziert werden. Die Induzierbarkeit des Konstrukts im Mausgewebe wurde durch X-Gal Färbung an Fibroblastenkulturen aus Mausgewebe transgener Tiere, die mit einem tTA Expressionsplasmid transfiziert waren, überprüft. Bei einer Linie (GluR2'Qtrans1') zeigte sich eine Blaufärbung innerhalb weniger Minuten bei weniger als einem Prozent der Zellen (nicht gezeigt). Bei den übrigen Linien konnte keine Blaufärbung nachgewiesen werden.

2.1.2 Gehirnspezifische Expression des Tet-abhängigen Transaktivators

Für eine gehirnregionsspezifische Expression von tTA wurde mit drei verschiedenen Konstrukten experimentiert.

Das Konstrukt NR1/tTA enthält das tTA-Gen unter Kontrolle eines 7,5kb DNA-Fragments, welches der um den Transkriptionsstart gelegenen Region des NR1-Gens entnommen wurde (Abb. 3A). NR1, die Untereinheit, die in allen NMDA-Rezeptoren auftritt, wird in allen Neuronen des Gehirns exprimiert. Für das NR1-Transgen sind dennoch ortsspezifische Expressionsmuster zu erwarten: Einerseits sind in dem 7,5kb-Promoterfragment nicht alle, die Expression des Gens betreffenden Kontrollelemente enthalten, andererseits ist die aus dem transgenen Ansatz resultierende Integration des Konstrukts an irgendeiner Stelle im Genom mit nicht vorhersagbaren Positionseffekten behaftet. Da weder der Integrationsort, noch das daraus resultierende Expressionsmuster des Konstrukts vorhersehbar sind, ist diese Methode als 'Schrotschuß'-Strategie zu verstehen. Es sollten deshalb mehrere transgene Mauslinien etabliert und anschliessend solche Linien, die ein regional spezifisches Expressionsmuster (zB. CA3, Dentate Gyrus, Cortex) aufweisen, ausgewählt werden. Aus der Pronukleusinjektion dieses Konstrukts resultierten 45 Tiere. Über PCR und Southernblot Analyse wurden 18 Gründertiere identifiziert. Die Expression von tTA sollte durch Kreuzung der Gründertiere mit der transgenen Mauslinie M2, welche LacZ unter Kontrolle eines tetazyklinabhängigen Minimalpromoters exprimiert, anhand einer X-Gal Färbung nachgewiesen werden. Die ausbleibende Färbung ließ auf keine oder sehr geringe tTA Expression schließen. Eine in Situ Hybridisierung von Gehirnschnitten der Doppelmутanten mit einer tTA-Sonde zeigte ebenfalls keinen Unterschied zwischen Transgen und Wildtyp. Die Klonierung des Konstrukts NR1/tTA sowie die erste Analyse der Gründertiere über PCR und Southern-Blot wurden von Dr. Thorsten Storck (Abt. Seeburg) durchgeführt.

Dieselbe 'Schrotschußstrategie' wie für NR1/tTA wird auch mit dem zweiten Konstrukt, GluR2/tTA (Abb. 3B), verfolgt. Als Promoter wurde ein DNA-Fragment aus der um den Transkriptionsstart gelegenen Region des GluR2 Gens verwendet. Aus der Injektion des Konstrukts resultierten 5 Transgen positive Tiere (Gründertiere).

Ebenso wie im Versuch NR1/tTA konnte auch bei diesem Projekt weder durch X-Gal Färbung, noch durch in Situ Hybridisierung tTA Expression nachgewiesen werden. Die Klonierung des Konstrukts sowie die Analyse der Gründertiere über PCR wurden von Dr. Thorsten Storck (Abt. Seeburg) durchgeführt.

Aufgrund fehlender tTA-Expression wurden die Projekte NR1/tTA und GluR2/tTA eingestellt. Ersatzweise wurde zur tTA-Expression die transgene Mauslinie α CAMKII-tTA, welche ein bekanntes gehirnspezifisches Expressionsmuster für tTA aufweist, eingesetzt.

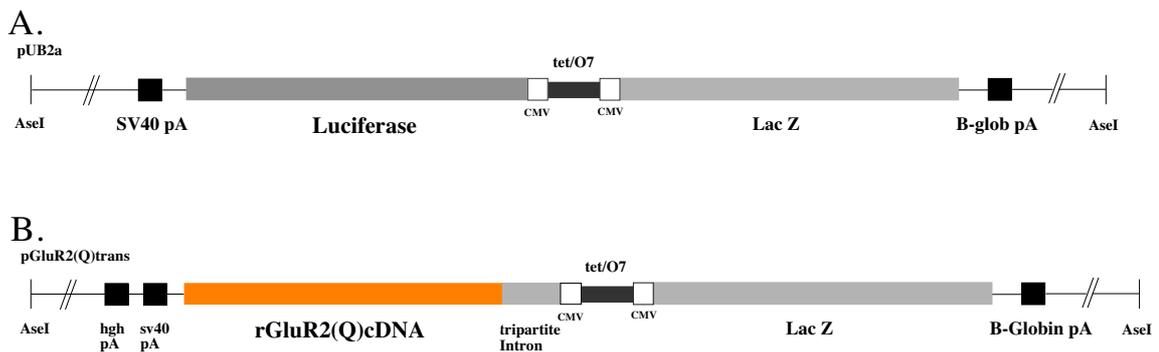


Abbildung 2: A) Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pUB2a mit tTA-abhängig und bidirektional exprimierbaren Reportergenen. B) Konstrukt pGluR2`Qtrans´. Die Integration der rGluR2(Q)flip cDNA in pUB2a erfolgte durch Deletion des Luciferasegens. Das verwendete GluR2(Q) ist eine cDNA der Ratte und trägt eine Punktmutation im dritten Nucleotid der Q/R Position (CAA anstelle CAG).

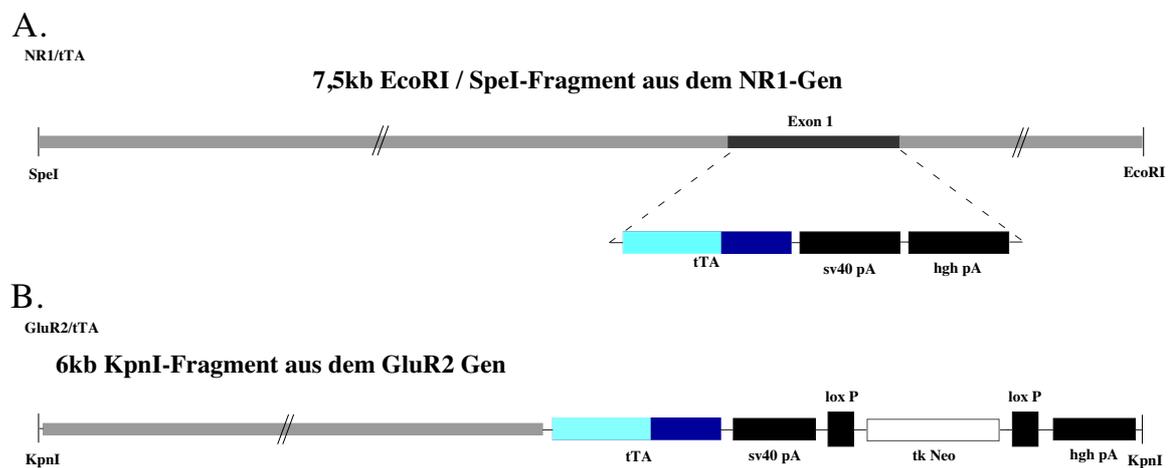


Abbildung 3: A) Schematische Darstellung des Targeting Konstrukts NR1/tTA, welches tTA unter Kontrolle eines 7,5kb Promoterfragments aus dem NR1-Gen enthält. Der Splice Akzeptor in tTA wurde deletiert. B) Schematische Darstellung des Targeting Konstrukts GluR2/tTA, welches tTA unter Kontrolle eines 6kb KpnI-Promoter Fragments aus dem GluR2 Gen enthält. Der Spliceakzeptor wurde in tTA belassen.

2.1.3 Expressionsanalyse für GluR2^{+/+}Qtrans

Die GluR2^{+/+}Qtrans⁻ Gründertiere wurden mit α CAMKII-tTA Tieren verpaart. Für erste Analysen wurde die Funktion des Tet-Transaktivators vom Beginn der Verpaarung bis zu dem 25. Tag nach der Geburt (P25; P=postnatal) der Nachkommen durch Verabreichen von Doxyzyklin mit dem Trinkwasser (20 μ g Dox/ml) supprimiert. Zwanzig Tage nach Absetzen des Doxyzyklins wurden Gehirne doppeltransgener Tiere mit X-Gal Reagenz behandelt. Doppeltransgene Nachkommen von zwei der neun Gründertiere zeigten X-Gal Färbung, die innerhalb weniger Minuten nach Zugabe des Färbereagenz deutlich erkennbar war. In beiden Fällen war die Reaktion auf Regionen des Vorderhirns beschränkt, d.h. auf Striatum, Cortex, Hippocampus, Amygdala, und Bulbus Olfactorius (Abb. 4A). Am stärksten war die Färbung im Hippocampus ausgeprägt, mit Betonung der Regionen CA1,-2 und -4 gegenüber CA3 (Abb. 4B, C). Ein Unterschied in der der Höhe der β -Galactosidase Aktivität zwischen den beiden mit GluR2^{+/+}Qtrans1⁻ und ⁻Qtrans2⁻ bezeichneten Linien war visuell nicht erkennbar. Die Höhe der Expression von rGluR2(Q) im Vorderhirn relativ zur Expression des endogenen mGluR2 wurde anhand von RT-PCR Analyse und Sequenzierungen mit Primern, die sowohl transgene rGluR2(Q) als auch das endogene mGluR2 amplifizieren, untersucht. Anhand der Sequenzunterschiede zwischen dem rGluR2 und mGluR2 konnte die relative Expressionshöhe für GluR2^{+/+}Qtrans durch einen Vergleich der Peakamplituden in den Elektropherogrammen (Abb. 7) berechnet werden. Die aus allen Daten gemittelte relative Expressionshöhe im Vorderhirn betrug für GluR2^{+/+}Qtrans1⁻ 14% (n=4) und für GluR2^{+/+}Qtrans2⁻ 16% (n=2). Zwischen Individuen von ⁻Qtrans⁻ war die Expressionshöhe des Transgens mitunter stark abweichend (ca. 10-30% des Gesamt-GluR2).

Die Integration des Konstruktes Qtrans ins Genom der Versuchstiere wurde für die Linien Qtrans1 und Qtrans2 im Southern Blot überprüft (Abb. 6). Eine vom Tet-Transaktivator unabhängige Expression von ⁻Qtrans⁻ konnte anhand der Ergebnisse aus X-Gal Färbung ausgeschlossen werden: Bei Doppelmутanten, in denen die Funktion von tTA durch Verabreichen von 20 μ g/ml Dox von Geburt an mit dem Trinkwasser unterdrückt war, trat an mit X-Gal Reagenz behandelten Gehirnschnitten keine Blaufärbung auf.

2.1.4 Messung der AMPA Rezeptor Ströme in GluR2^{+/+}Qtrans

Die Expression von GluR2(Q) in GluR2^{+/+}Qtrans sollte zu einem vermehrten Einbau von GluR2(Q) in AMPA Rezeptoren und damit zu einem meßbaren Anstieg der Ca²⁺ Permeabilität und der makroskopischen Leitfähigkeit dieses Rezeptortyps führen. Anhand der Messung der AMPA Rezeptor Ströme an ⁻nucleated patches⁻ hippocampaler CA1 Pyramidenzellen eines Individuum von GluR2^{+/+}Qtrans, welches wiederholte Schlüsseltest-

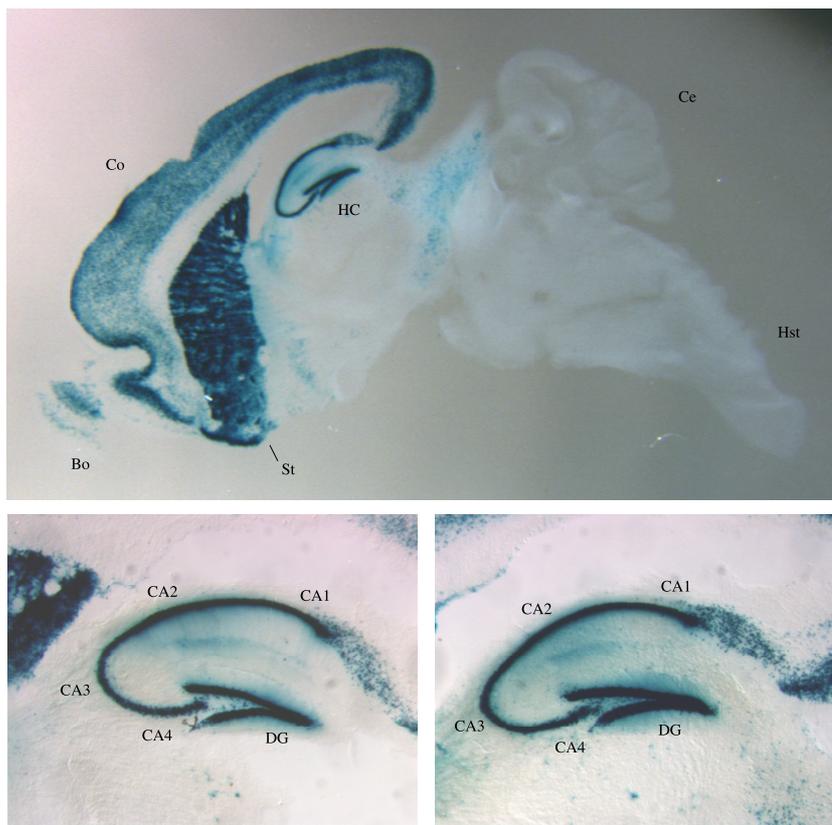


Abbildung 4: X-Gal Färbung an Gehirnschnitten von $\text{GluR2}^{+/Q^{\text{trans}}}$ im Alter P45. Induktion der Tet Expression ab P25 durch Absetzen des mit dem Trinkwasser verabreichten Doxycyclins ($20\mu\text{g/ml}$). Die exprimierenden Regionen sind wie folgt gekennzeichnet: (Bo) Bulbus olfactorius, CA1-4: Regionen des Hippokampus, (DG) Dentate Gyrus, (Ce) Cerebellum, (Co) Cortex, (Hc) Hippocampus, (St), Striatum.

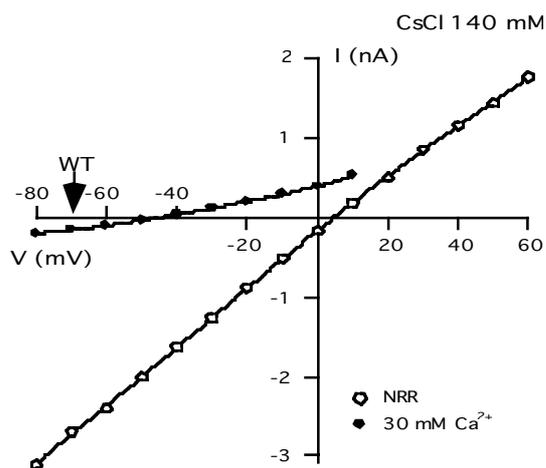


Abbildung 5: Relative Ca^{2+} Permeabilität der AMPA Rezeptoren in CA1 Pyramidenzellen von $\text{GluR2}^{+/Q^{\text{trans}}}$. Strom-Spannungs Verhältnis für Na^{+} -reiche (weisse Kreise) bzw Ca^{2+} -reiche Lösung (ausgefüllte Kreise). Aufgrund der gesteigerten Ca^{2+} Permeabilität der AMPA Rezeptoren in der Mutante ist

die Strom-Spannungs Kurve gegenüber Wildtyp (WT, schwarzer Pfeil markiert zum Vergleich das Umkehrpotential für Wildtyp in Ca^{2+} -reicher Lösung) in Richtung eines positiveren Umkehrpotentials verschoben.

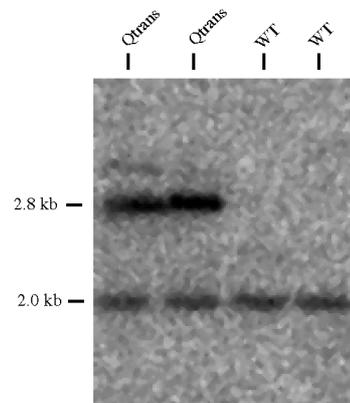


Abbildung 6: Southern Blot für $\text{GluR2}^{+/+Q\text{trans}}$ mit EcoRI verdauter DNA aus Mausleber. Die Detektion des 2.8kb EcoRI Fragments des transgenen rGluR2(Q) und des 2kb EcoRI Fragments des endogenen mGluR2 erfolgte mit einer radioaktiv markierten 250bp rGluR2 Sonde aus Exon11. WT= C57BL6 Wildtyp Kontrolle

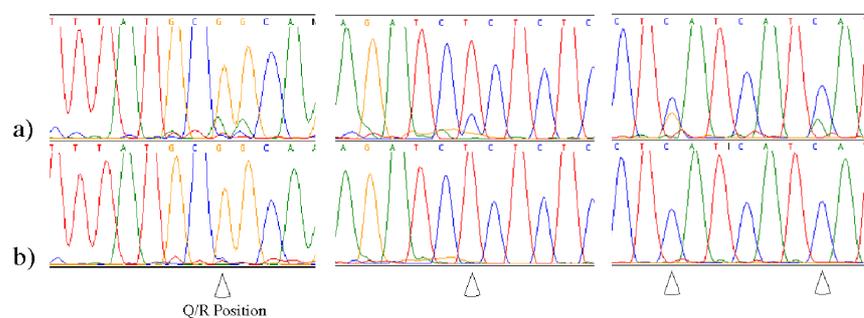


Abbildung 7: Elektropherogramme für die Sequenzanalyse revers transkribierter, aus dem Vorderhirn von $\text{GluR2}^{+/+Q\text{trans}}$ und C57BL6 Wildtyp stammender RNA. Positionen, in denen die Nukleotidsequenz für das endogene GluR2 der Maus und das aus der Ratte stammende transgene rGluR2(Q) verschieden sind, wurden durch Pfeile gekennzeichnet. In diesen Positionen erscheint im Elektropherogramm von $\text{GluR2}^{+/+Q\text{trans}}$ jeweils ein Peak für rGluR2(Q) und endogenes mGluR2 (a), während bei Wildtyp allein der Peak für mGluR2 auftritt (b). Aus dem gemittelten Verhältnis der Einzelpeakamplituden für r- und mGluR2 in diesen Positionen bei $\text{GluR2}^{+/+Q\text{trans}}$ wurde die relative Expressionshöhe für das transgene rGluR2(Q) berechnet. Verwendet wurden Tiere im Alter P45, die bis P25 20 μg Dox/ml mit dem Trinkwasser erhalten hatten.

induzierte epileptische Anfälle durchlaufen hatte (siehe S.18), wurde eine Steigerung der Ca^{2+} Permeabilität und der makroskopischen Leitfähigkeit der AMPA Rezeptoren auf den ca. 2fachen Wert gegenüber C57B6 Wildtyp berechnet (Abb. 5).

2.2 Phänotyp der GluR2^{+/Qtrans} Doppelmutante

Die nicht supprimierte Expression von rGluR2(Q) in der Mutante GluR2^{+/Qtrans} führte zu einem Phänotyp mit neurologischen Störungen, der jedoch zwischen Individuen unterschiedlich stark ausgeprägt war. Unter 18 untersuchten Doppelmutanten fielen 7 Tiere früh durch Kleinwüchsigkeit, Störungen der Motorkoordination und eine veränderte Körperhaltung mit teils buckelartiger Aufwärtskrümmung der Rückenpartie auf. Aus der kleinwüchsigen Gruppe verstarben 4 Tiere im Alter P22 (2Tiere) und P27 als Folge eines epileptieartigen Anfalls.

Die übrigen Tiere waren in Körpergrösse und Haltung normal. Auch im Verhalten, soweit dies anhand von Beobachtungen der spontanen Aktivitäten der Tiere in ihren Käfigen beurteilt werden kann, waren die Tiere von C57BL6 Wildtyp nicht zu unterscheiden.

Einen Hinweis auf eine gesteigerte Erregbarkeit auch bei diesen Tieren erbrachte der Schlüsseltest (S. 52), der auch bei den Mutanten GluR2^{+/ΔECS}, GluR2^{+/Neo/Ntrans} und ADAR2^{-/-} zur Induktion epileptischer Anfälle eingesetzt wurde. Im Schlüsseltest traten bei 5 der 11 Doppelmutanten in Altersstadien zwischen P19 und P27 epileptische Anfälle auf (Abb. 8A, B). Dieselben Anfälle wurden im Schlüsseltest auch bei 3 aus 18 zur Kontrolle eingebrachten C57BL6 Tieren dieses Altersstadiums beobachtet (Abb. 8C). 25% der für GluR2^{+/Qtrans} durchgeführten Schlüsseltest Experimente führten zu einem epileptischen Anfall, während dies bei Wildtyp seltener eintrat (9%). Im Schlüsseltest induzierte epileptische Anfälle traten demnach bei GluR2^{+/Qtrans} um den Faktor 2,7 (Abb. 9) häufiger auf als bei Wildtyp. Einzelne Anfälle verliefen bei Wildtyp und Mutanten mit einer Wahrscheinlichkeit >50% tödlich.

Die epileptischen Anfälle waren von generalisiert tonisch-klonischem Typ und verliefen bei Wildtyp und Mutanten gleich. Eingeleitet wurde ein Anfall in der Regel durch eine wenige Sekunden andauernde Serie schneller Sprünge, in deren Folge das Versuchstier dann auf eine Körperseite fiel. Auf anfängliche Zuckungen der Gliedmassen (klonische Phase) folgte schnell ein Zustand der Gliedmassen- und Körperstarre (tonische Phase) (Abb. 8A). Einzelne Anfälle währten ca. 15 – 20 sec.

Spontane oder im Schlüsseltest induzierte epileptische Anfälle traten bei GluR2^{+/Qtrans} und bei Wildtyp ausschliesslich in den angegebenen Zeitintervallen, also nicht im adulten Tier, auf. Das Versterben zahlreicher Mutanten im Rahmen epileptischer Anfälle könnte jedoch zu einer einseitigen Auswahl an relativ 'gesunden' Mutanten führen, die für Experimente am adulten Tier zur Verfügung stehen. Daher wurden zum Studium mutationsverursachter Effekte im adulten Tier Mutanten verwendet, deren Expression des Transgens bis zum 35 Tag nach der Geburt (P35, 3 Tiere) bzw bis zum 45 Tag nach der Geburt (P45, 5 Tiere) durch Verabreichen von 20µg/ml Dox mit dem Trinkwasser supprimiert war. Die induzierte Expression des Transgens führte jedoch in diesen Tieren zu keinen spontanen oder Schlüsseltest-induzierten Anfällen. Der epileptische Phänotyp von GluR2^{+/Qtrans} kam also im adulten Tier nicht zum Tragen.

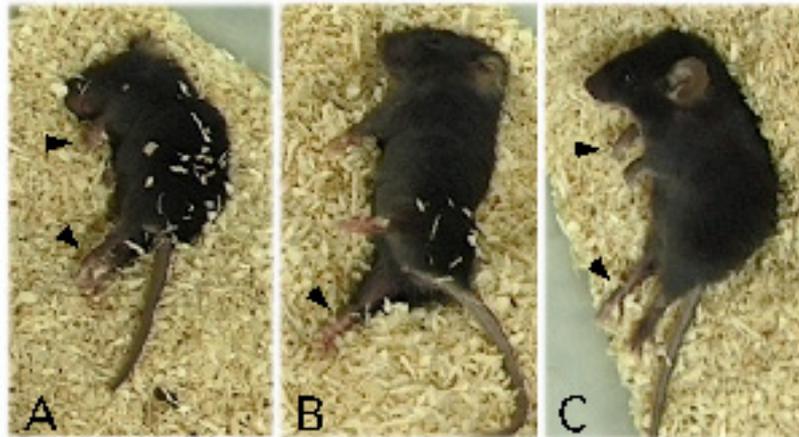


Abbildung 8: Schlüsselttestexperiment. A.) Schlüsselttest-induzierter epileptischer Anfall bei $\text{GluR2}^{+/+/\text{Qtrans}}$ im Alter P22. In der tonischen Phase des Anfalls kommt es zur Adhäsion der vorderen Gliedmassen und zur Extension der hinteren Gliedmaßen (Pfeile). B.) Dasselbe Tier wie bei A.) in beginnender Erholungsphase ca. 20 sec nach Anfallsbeginn. Während das Tier bereits erste Bewegungen des Kopfes und Rumpfes zeigt, hält die Gliedmaßenstarre zunächst noch an. C.) Schlüsselttest-induzierte Anfälle treten mit geringerer Frequenz auch bei C57BL6 Wildtyp in den Altersstadien P19-25 auf. Der Anfallsverlauf ist bei Wilddtyp und Mutanten gleich (vgl. Körperhaltung zwischen A.) und C.).Das gezeigte Tier verstarb im Verlauf des Anfalls.

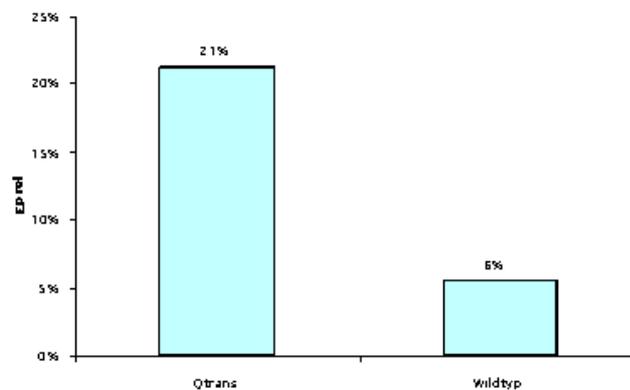


Abbildung 9: Relative Häufigkeit Schlüsselttest-induzierter epileptischer Anfälle bei $\text{GluR2}^{+/+/\text{Qtrans}}$ und C57BL6 Wildtyp im Alter P19-27. Schlüsselttest-induzierte epileptische Anfälle traten bei $\text{GluR2}^{+/+/\text{Qtrans}}$ verglichen mit Wildtyp mit ca. 2,7facher Häufigkeit auf. Die relative Häufigkeit Schlüsselttest-induzierter epileptischer Anfälle ($E_{p,rel}$) wurde nach folgender Formel berechnet: $E_{p,rel} = E_{gesamt} / T \times S$. E_{gesamt} = Anzahl der bei allen Tieren registrierten epileptischen Anfälle; T = Anzahl der untersuchten Tiere; S = Durchschnittliche Anzahl der für jedes Tier durchgeführten Schlüsselttest Experimente.

Mit der Suppression des Transgens während der frühen Entwicklung bis zum 5 Tag nach der Geburt (P5, 3 Tiere) bzw. 15. Tag nach der Geburt (P15, 3 Tiere) sollte eingegrenzt werden, ob die altersabhängig auftretenden Epilepsien als Folge einer gestört verlaufenden Entwicklung des Gehirns oder als Folge akuter Funktionsstörungen des Gehirns in dem kritischen Altersabschnitt auftreten. Im Fall einer Entwicklungsstörung als Ursache des epileptischen Phänotyps sollte die Erkrankung in Mutanten, deren transgene Expression in embryonalen und frühen postnatalen Stadien supprimiert war, nicht auftreten. Die Tiere beider Versuchsgruppen waren in Körpergröße und Verhalten normal. Spontane epileptische Anfälle traten nicht auf. Induzierte Anfälle ohne signifikante Veränderung der Anfallshäufigkeit wurden bei DoxP5 innerhalb des Zeitfensters P19-P27 registriert. Dagegen traten bei DoxP15 keine epileptischen Anfälle auf. In der Beurteilung ist zu berücksichtigen, daß die Induktion der transgenen Expression nach Absetzen des mit dem Trinkwasser verabreichten Doxyzyklins erst verzögert und allmählich einsetzt. Diese Beobachtung wurde in dem mit GluR2^{+/+Qtrans} im Ansatz vergleichbaren transgenen Experiment NR1/tTA gemacht, in dem ebenfalls α CaMKII-tTA Tiere sowie die bidirektionale Expressionseinheit pUB2a, jedoch mit integriertem NR1 Minigen anstelle des GluR2(Q), verwendet wurden. Bei NR1/tTA zeigten ca. 10 Tage nach Induktion lediglich das Transgen hochexprimierende Bereiche des Gehirns eine Blaufärbung nach Behandlung mit X-Gal, während eine mit dem nicht-supprimierten NR1/tTA vergleichbare Expressionshöhe des Transgens erst nach ca. 3 Wochen erreicht war. Das verzögerte Einsetzen der transgenen Expression hängt mit der Einlagerung des Doxyzyklins in Knochen- und Fettgewebe zusammen. Trotz Abwesenheit von Doxyzyklin im Trinkwasser verhindert eine langsame systemische Freisetzung von Doxyzyklin aus den Geweben die schnelle Induktion des Transgens.

Aufgrund der zu erwartenden verzögert eintretenden Expression von GluR2(Q) spricht das Auftreten von Epilepsien bei den mit P5 induzierten Mutanten dafür, daß der epileptische Phänotyp nicht aus einer durch GluR2(Q) verursachten Störung der frühen postembryonalen Entwicklung des Gehirns resultiert. Das Ausbleiben der Epilepsien in den mit P15 induzierten Mutanten spricht nicht dagegen, da in der Epilepsie-anfälligen Phase zwischen P19 und P27 vermutlich noch keine für die Ausprägung des epileptischen Phänotyps ausreichende Expressionshöhe für GluR2(Q) erreicht war. Insgesamt gesehen ist eine altersabhängige, akute Funktionsstörung des Gehirns als Ursache für den epileptischen Phänotyp bei GluR2^{Qtrans} wahrscheinlich, nicht nur aufgrund des Auftretens von Epilepsien in den mit P5 induzierten Mutanten, sondern auch aufgrund des Auftretens Schlüsseltest-induzierter Anfälle bei C57B6 Wildtyp, in Tieren also, deren Frühentwicklung des Gehirns ungestört verlief.

2.2 Glutamat Rezeptoren in *Caenorhabditis elegans*

Die genomische Sequenz von *C. elegans* ist in Form von Sequenzfragmenten, die einzelne Cosmidklone repräsentieren, über die Gen Datenbank des NCBI (National Center Of Biotechnology Information) verfügbar. Die Sequenzen sind in der Regel mit Hilfe von Genanalyseprogrammen vorbearbeitet und beinhalten Vorhersagen über einzelne Gene und deren Intron-Exon Struktur. Über eine Datenbank-Suche nach Schlüsselbegriffen wurden diejenigen Cosmidklone, die Glutamatrezeptor-ähnliche Sequenzen enthalten, ausgewählt. Unter den nicht voranalysierten Cosmidklonen liessen sich weitere GluR-Sequenzen über eine auf Sequenzfragmenten basierende Datenbanksuche (BLASTsearch) in der NCBI Protein Datenbank identifizieren. GluR-Sequenzen eines Gens, die sich über benachbarte Cosmide erstrecken, wurden am Computer zur Fusion gebracht. Um erste Aussagen über die Verwandtschaftsbeziehungen der erhaltenen GluR-Sequenzen von *C. elegans* (CelGluRs) machen zu können, wurden die vorhergesagten Proteinsequenzen über 'Sequence Alignment' untereinander, sowie mit den bekannten GluR-Proteinsequenzen der Ratte (rGluRs) auf Sequenzverwandtschaft verglichen. Über eine 'Blast'-Suche mit CelGluR-Proteinsequenzen wurden diejenigen rGluRs identifiziert, die zu den jeweiligen Cel-Klonen die größte Verwandtschaft aufweisen.

Die erhaltenen rGluR/CelGluR Verwandtschaftspaare wurden im 'Sequence-alignment' verglichen. Anhand der Alignments wurde die Richtigkeit der Genvorhersagen überprüft: 1. Erschienen in den Cel-Sequenzen gegenüber den r-Sequenzen Lücken oder Insertionen, wurde untersucht, ob durch Auswahl anderer Splicepositionen eine höhere Sequenzähnlichkeit erzielbar ist. 2. Waren die Cel-Sequenzen gegenüber den Rattensequenzen an ihren Enden kürzer, sollten durch Blast-suche anhand von Cosmidsequenzen fehlende Exons identifiziert werden. 3. Anhand von ESTS, die den einzelnen Genen zuzuordnen waren, liessen sich die Intron/Exon-Vorhersagen zusätzlich überprüfen.

Um Aussagen über die Genverwandtschaft machen zu können und diejenigen CelGluRs mit hoher Verwandtschaft zu AMPA- und Kainat Rezeptoren zu identifizieren, wurden die CelGluRs im Sequence Alignment untereinander und mit rGluRs verglichen.

Für die Untersuchung der zu der Q/R Position in AMPA Rezeptoren der Ratte homologen Positionen in CelGluRs auf Editierung wurden diejenigen CelGluRs ausgewählt, die aufgrund der Codon Konfiguration in den betreffenden Positionen als Kandidaten für eine mögliche A-I Editierung von Q nach R in Frage kommen. Die Untersuchung der hypothetischen Editierungsstellen auf Editierung in vivo sollte unter Einsatz der RT-PCR Methodik erfolgen.

Die Datenbanksuche nach GluR-ähnlichen Sequenzen in *C. elegans* ergab 16 Cosmidklone, 15 davon mit vorhergesagten GluR-Genen sowie ein Cosmid ohne Genvorhersage, und eine cDNA. Die cDNA (CeU 34661) war identisch zu einem der Klone (B0280-K04G7). Die auf benachbarten Cosmiden codierenden Gen-Fragmente B0280 und K04G7, F14H8 und T01C3, C06A8.9 und C06A8.10, C43H6.9 und T07D1,

F22A3 und C15B12) wurden fusioniert. Zwei Cosmid-Klone enthielten identische GluR-Sequenzen (F07F6, F56F3).

Die Voranalyse ergab 13 potentielle CelGluRs. Für eine dieser Cel-Sequenzen wurde eine Vorhersage als GluR durch die Blastanalyse nicht bestätigt (F23A7.3, Fettsäuresynthase). Aufgrund sehr geringer Sequenzverwandtschaft (13 %) ist auch der Cel-Klon T25E4.2 nicht zu den GluRs zu rechnen. Der Cel-Klon C08B6.5 erwies sich als 25% ähnlich zum N-Terminus der delta2 Untereinheit. Für dieses Gen wurden weder durch `Blast'-Suche noch durch `Genequest'-Analyse auf dem zugehörigen Cosmid CelC08B6 weitere Exons identifiziert. Den genannten 3 Sequenzen fehlte zudem ein in M3 lokalisiertes, 9 Aminosäuren umfassendes Sequenzmotiv (YTANLAAF), welches in allen rGluRs auftritt und auch in den übrigen genannten CelGluRs hochkonserviert ist. Die Clone F23A7.3, T25E4.2 und C08B6.5 sind daher nicht zu den GluRs zu rechnen und wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Die übrigen Cel-Sequenzen zeigen anhand von Sequenz Übereinstimmungen mit den vier hydrophober Membranregionen (M1-4), der Ligandenbindungsstelle und dem erwähnten 'YTANLAAF' Motif eindeutige Verwandtschaft mit bekannten Glutamatrezeptor Untereinheiten. Ein Vergleich der CelGluRs mit rGluRs (Blastp) zeigte, daß die Glutamatrezeptorfamilien AMPA, NMDA und Kainat und delta auch in *C. elegans* repräsentiert sind. Anhand der Sequenzähnlichkeit liessen sich Cel-Sequenzen wie folgt zuordnen: AMPA-ähnlich (B0280.12-K04G7, C06E1.4); Kainat-ähnlich (Zc196.7, F41B4, C06E1.4, K10D3.1, C43H6.9) ; delta-ähnlich (F22A3), NMDA-ähnlich (F07F6.6, F14H8-T01C3) (Abb. 10). Eine Zuordnung der CelGluR Untereinheiten zu einzelnen Genfamilien der Glutamatrezeptoren konnte nur im Fall der NMDA Rezeptoren (F07F6.6 homolog zu NR1, F14H8-T01C3 homolog zu NR2) getroffen werden. Dagegen war eine Zuordnung der CelGluRs zu einzelnen rGluR Untereinheiten innerhalb der Genfamilien der Säugetiere wie z.B. GluR1-4 oder NR2A-D aufgrund zu grosser Sequenzunterschiede zwischen Cel- und rGluRs nicht möglich. (gezeigt am Beispiel der AMPA Rezeptor-ähnlichen CelGluRs: Abb. 11C). Die Sequenzidentität zwischen den CelGluRs und den primatverwandten rGluRs bezogen auf die Gesamt-Proteinsequenz betrug 13.6-29 % (Abb. 11A). Eine grössere Sequenzidentität von 19-50 % wurde erzielt, wenn man ausschliesslich den höherkonservierten Sequenzabschnitt zwischen der Glutamat Bindungs Region S1 und der Membranregion M4, welcher alle für die Proteinfunktion als ionotroper Glutamatrezeptor elementaren Domänen enthält (Abb. 12C, 13), zu Sequenzvergleichen heranzog. Dies änderte jedoch nichts an der Zuordnung der CelGluRs zu den einzelnen Genfamilien der rGluRs.

Im Sequenzvergleich der CelGluRs untereinander zeigen die AMPA-Rezeptor-ähnlichen CelGluRs C06E1.4 und B0280.12-K04G7 besonders hohe Sequenzverwandtschaft (59%) (Abb.12C).

Anhand von Basenpaarungen zwischen CelGluR- und rGluR Sequenzen wurde in 2 Klonen jeweils eine Spliceposition (<1% aller Splice-Stellen Vorhersagen) neu definiert. Eine Überprüfung von Splice-Stellen anhand von Sequenzvergleichen zwischen

vorhergesagter CelGluR-cDNA und den zu den jeweiligen Clonen gehörigen ESTs (Abb.10) führte zu keinen weiteren Korrekturen. Anhand von Sequenzvergleichen zwischen allen überarbeiteten Sequenzen wurde ein phylogenetischer Baum der CelGluRs erstellt (Abb. 11B).

Ein weiteres Kriterium für Genverwandtschaft lieferte der Vergleich der Splice-Positionen in den GluR-Genen zwischen Cel-und rGluRs: Zwischen GluR Genen mit vorhergesagter Sequenzverwandtschaft wie z.B. zwischen AMPA-ähnlichen CelGluRs und der AMPA-Rezeptor Untereinheit GluR2 (Abb. 12A) oder zwischen den NMDA-ähnlichen CelGluRs und den NMDA-Rezeptor Untereinheiten NR1 und NR2 (Abb. 12B) treten mehrere Splice-Positionen konserviert auf. Der Vergleich war jedoch dadurch eingeschränkt, daß die Genstruktur zahlreicher Glutamat Rezeptor Untereinheiten der Ratte, vor allem der Kainat Rezeptor Gruppe, noch nicht aufgeschlüsselt ist.

Die Untersuchung der Q/R homologen Positionen der CelGluRs zeigte, daß in 4 der 7 nicht-NMDA CelGluRs (C06E1.4, B0280.12, C06A8.9-10, K10D3.1) das in den Genen für AMPA- und Kainat Rezeptoren der Ratte konservierte Glutaminocodon auftritt. Auch die Bedeutung der beiden der Q/R-homologen Position 5' und 3' benachbarten Aminosäure Codons (5': M; 3' Q) ist zwischen nicht-NMDA rGluRs und den genannten 4 CelGluRs konserviert (Abb 13). Diese CelGluRs sind mögliche Kandidaten für eine Editierung von Q nach R in Q/R homologer Position. Von besonderem Interesse ist ausserdem das Auftreten eines Arginincodons (R) in Q/R homologer Position bei F41B4.1. Das Arginincodon ist hier genomisch codiert im Gegensatz zu dem im Rahmen der Editierung entstehenden Arginincodon in rGluR2. In den das Arginin flankierenden Aminosäurepositionen weicht F41B4.1 von rGluR2 ab (LRA anstelle MRQ). Die beiden übrigen nicht-NMDA CelGluRs tragen in Q/R Position von allen nicht-NMDA rGluRs abweichende Aminosäuren: C43H6.9 trägt ein Prolin (P) und ZC196.7 ein Lysin (K) (Abb. 13).

Name des Cosmids:	Bezeichnung des Gens	ESTs	GluR-Typ	% homolog zu
C06E1	C06E1.4	yk130h3.3 yk130h3.5 yk250d3.3 yk420e7.3 yk420e7.5	AMPA	29 (GluR1)
B0280, K04G7	B0280.12-K04G7.2	yk250d3.3 yk250d3. yk348d10.3 yk348d10.5	AMPA	28,2 (GluR1)
ZC196	ZC196.7	yk87h12.5 yk122f9.5	Kainat	26,5 (GluR5)
F41B4	F41B4.1*	-	Kainat	23,6 (KA1)
C06A8	C06A8.9-C06A8.10	yk440c12.5	Kainat	24,1 (GluR5)
K10D3	K10D3.1	yk122f9.5	Kainat	28,6 (GluR5)
C43H6, T07D1	C43H6.9-T07D1	yk122f9.5	Kainat	23,3 (GluR5)
F07F6	F07F6.6	yk421g6.3 yk421g6.5	NMDA	24,4 (NR1)
F14H8, T01C3	F14H8.1-T01C3.10	yk420c10.3 yk420c10.5	NMDA	24,2 (NR2)
F22A3, C15B12	F22A3-C15B12	-	delta?	13,6%(delta 1)
F56D3	F56D3	- siehe F07F6.6		

Abbildung 10: Liste der CelGluR Untereinheiten mit zugehörigen Cosmiden folgend der Nomenklatur der CELGenbank des Sanger Centre und der zugehörigen ESTS. Die Zuordnung der CelGluRs zu rGluRs erfolgte anhand von in silico Sequenzvergleichen unter Einsatz des 'Megalign' Programms. Angabe des Sequenzverwandtschaftsgrades zu primatverwandten rGluRs (in Klammern) in Prozent (%).

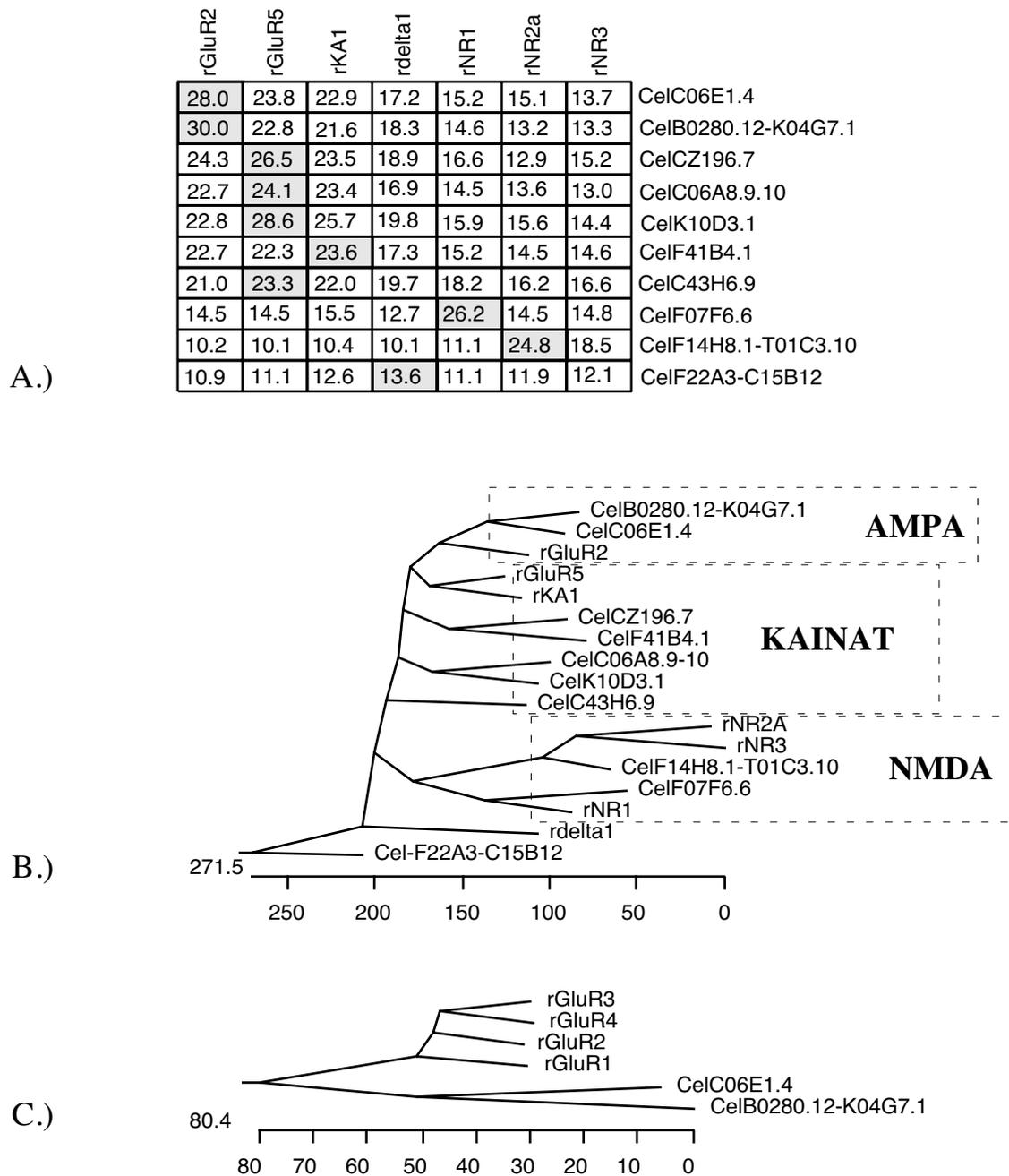


Abbildung 11: Genverwandtschaft der Cel- und rGluRs anhand der Sequenzähnlichkeit A) Sequenzähnlichkeit zwischen Cel- und rGluRs in Prozent (%); grau schattierte Boxen zeigen den höchsten Verwandtschaftsgrad zwischen einzelnen Cel- und rGluRs an. B) Phylogenetischer Baum der CelGluRs und einer Auswahl an rGluRs. Schraffierte Boxen deuten die Verwandtschaft einzelner CelGluRs zu AMPA-, NMDA- und Kainat Rezeptoren an. C) Phylogenetischer Baum der AMPA Rezeptor Untereinheiten der Ratte und der AMPA Rezeptor-ähnlichen CelGluRs. Aufgrund der geringen Sequenzhomologie ist eine Zuordnung der CelGluRs zu einzelnen Untereinheiten der AMPA Rezeptor Familie nicht möglich.

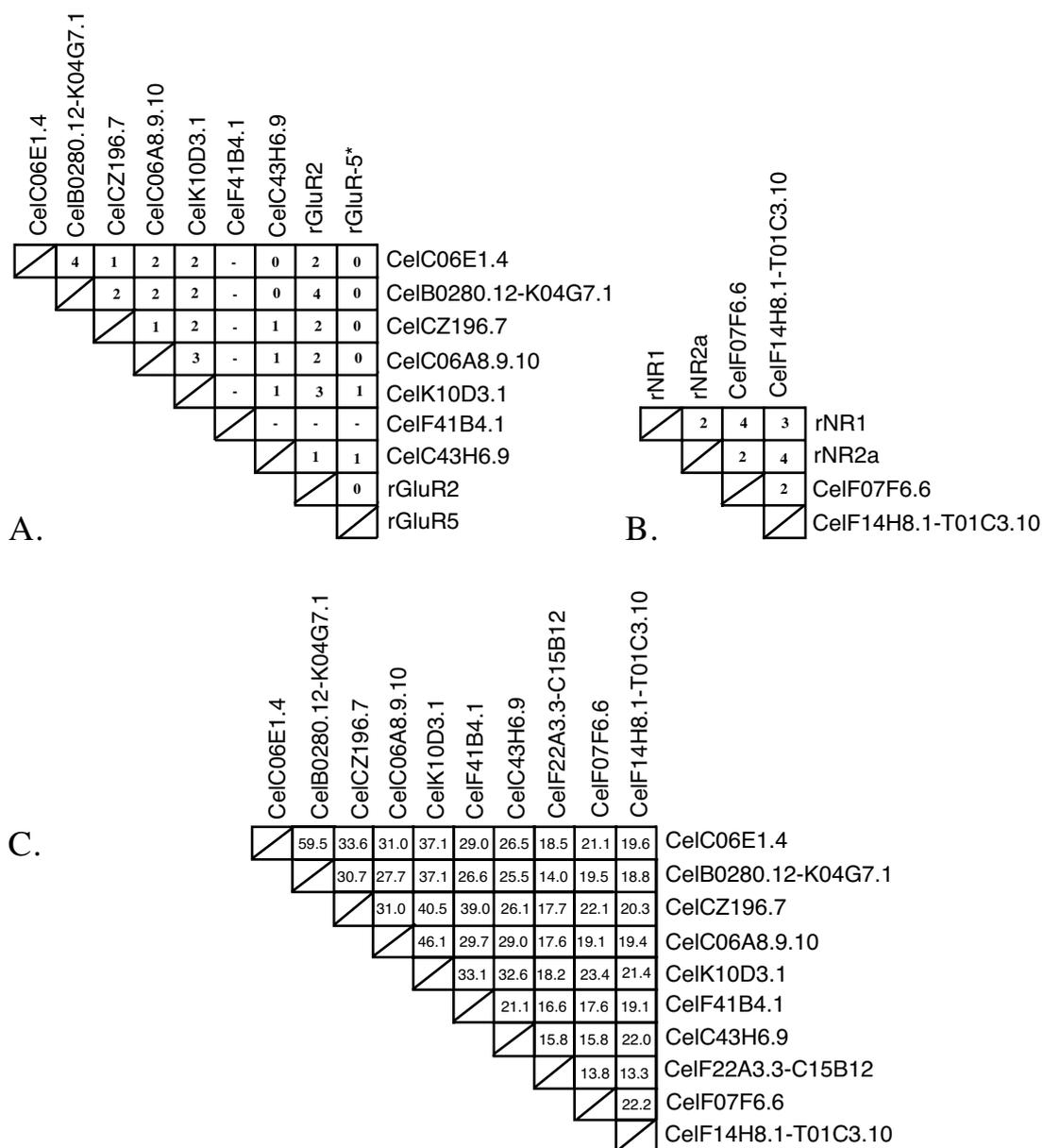


Abbildung 12: Genverwandtschaft der Cel GluRs. A) Splice Stellen in homologen Positionen der DNA Sequenz zwischen nicht-NMDA Cel- und rGluRs als Anzeiger der Genverwandtschaft B) Dasselbe gezeigt für die Cel- und rGluRs vom NMDA-Typ. Für den Vergleich mit CelGluRs wurden nur GluR2, GluR5, NR1 und NR2A herangezogen, da die Genstruktur der übrigen rGluRs noch nicht aufgeschlüsselt ist. Für rGluR5 sind nur 2 Splicepositionen bekannt. Für F41B4.1 und F22A3.3-C15B12 stand keine Vorhersage der Genstruktur zur Verfügung. B.) Sequenzähnlichkeit (%) der CelGluRs untereinander bezogen auf den zwischen der Glutamatbindungsstelle S1 und der Membranregion M4 gelegenen konservierten Sequenzbereich. Die höchste Sequenzverwandtschaft zeigen die AMPA Rezeptor-ähnlichen CelGluRs C06E1.4 und B0280.12-K04G7.1.

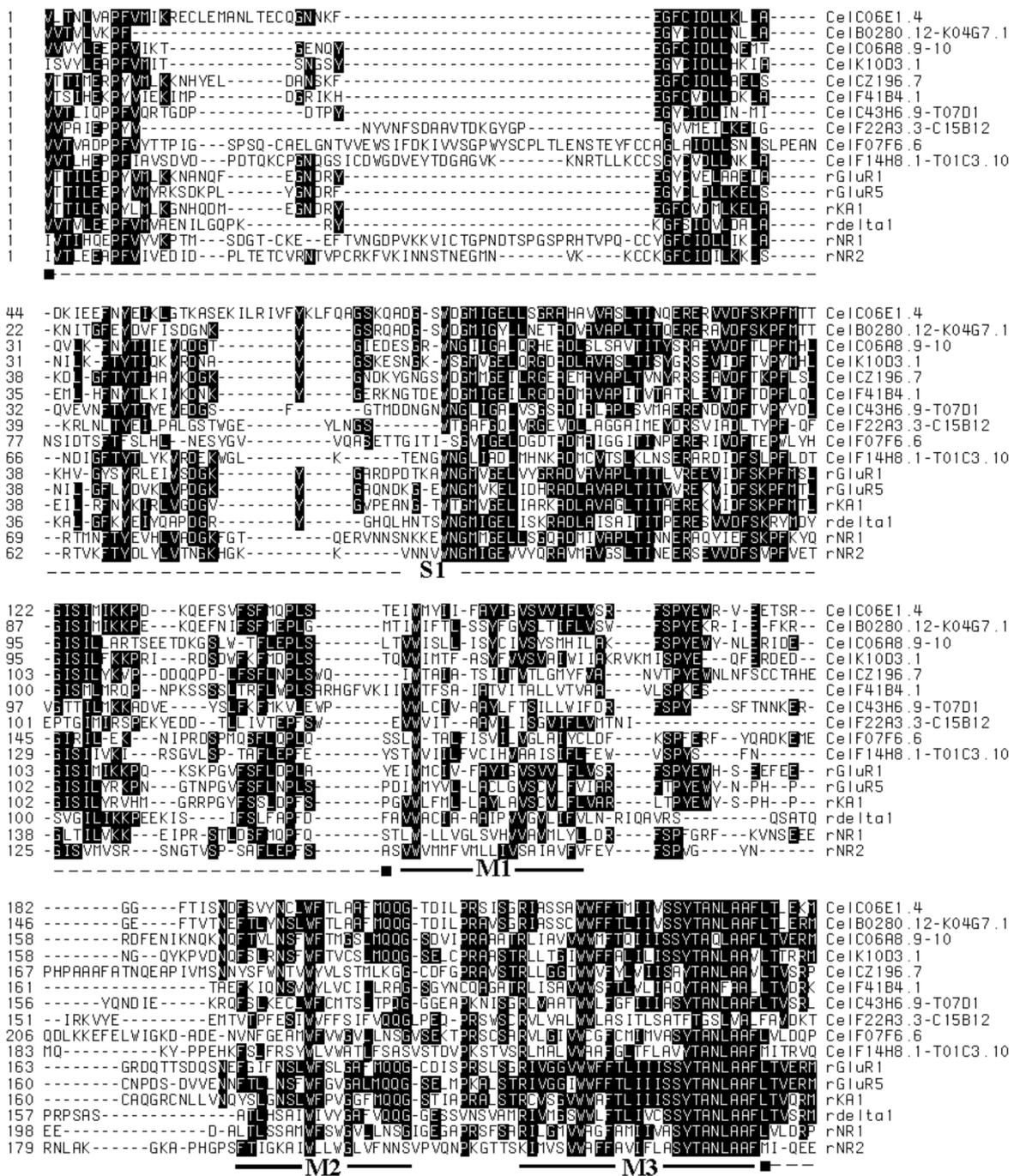


Abbildung 13: Diese und folgende Seite: Sequenzvergleich der Cel GluRs und einer Auswahl an rGluRs für einen Sequenzabschnitt, der die für die Proteinfunktion als Glutamaterezeptor elementaren Proteinregionen; die Membranregionen M1-4 und die Glutamat Bindungsstelle (S1, -2) beinhaltet. Dieser Protein Bereich ist gegenüber Carboxy- und Aminoterminalen Sequenzabschnitten für Verwandtschaftsanalysen besonders geeignet, da zahlreiche Aminosäurepositionen dieser Region konserviert auftreten. Schwarze Boxen=Sequenzübereinstimmungen.

249 -QAPTESVEE-----LAKQSKIKYGIQGGSTASFFKYS-----SVQIYDRITWRYM-----EIQVQ CelC06E1.4
 213 -TPPIESVEE-----RANQKILYGVNEGGSTAFFEEDS-----IVPLYKRWNFH--VSTTQKQIELEKQSI TNSTN CelI0280.12-K04G7.1
 229 -STPIEKLSK-----PNDDKIRYGMGLKSGSTADFFRFS-----KIPMYERIVSVH-----EISSP CelC06A8.9-10
 227 -TPPIESNA00-----RADTKIKYGTILGRGSGTISFFNES-----KIEFYERIVQLM-----EISSP CelK1003.1
 246 -YIPPIKNL00-----RANQTTLSYGTIRGGSTHDFQES-----RIAAHVKHWQYM-----KDKD CelCZ196.7
 223 -SMPFNSEEE-----IGNQTEYNFGSILGGSTHDFFKYS-----RIETFRRLMERH-----QRAEP CelF41B4.1
 224 -QPISSS00-----AKQYKTEYAPIKGSASETYFRRA--EIEEIFYNIVKEISLNSMSSPDRDRKLAWDVYVPS CelC43H6.9-T07D1
 219 -NVPFQNI00---LVRIVKQKFEIVMDENS-----TRTEMIAKSLPVYRDLVHEIIVNHKVK-- CelF22A3.3-C15B12
 284 -KGLTGVTPRLRNPSEN---FSFSTVLSNSVYQYKRAH---VELSSMFRKH----- CelF07F6.6
 229 VYDLSGIIHPMLNFPHDQKPPFRFCTVDGGNTEHTIKAN---WHMHEVYKTI----- CelF14H8.1-T01C3.10
 230 -VSPTESAEI-----AKQTEIRYGTILEAGSTKEFFRRS-----KIAVFEKHWTYM-----KRAEP rGluR1
 230 -VSPIDSD00-----AKQTKTEYGVAVRDSGTHDFFKKS-----KISIVYKHWAFH-----SRRQQ rGluR5
 231 -VPIESVD00-----RADTKTEYGTITGGSTHDFQNS-----RYQTYDRITWRYM-----YSKQP rKA1
 222 -DSPVRF00-----SKQLEMSYGVTRDSAVVEYFRKGTNPLEQDSIFAELV---RTISKNGGA rdeIta1
 262 -EARTGINDPRLRNPSDK---FIVATVQSSVDIYFRRA---VELSTVYRH1----- rNR1
 251 FVDQVIGLSCKKFKRPHDYSPPFRAFCTVNGSTERNIRNN---YPMHQVYIT----- rNR2

S1

299 PMFVA-----SYAEGTERVRSKHGRYAFLEATANEYEN-TRKPDQTHKVGQN- NSIGY-GIATPFES-- CelC06E1.4
 279 RIFVS-----SYADGTEKVRTSKGKYAFLEAITNYES-GRAPDQTHKVGQN- NTLGY-GIATK1ENP CelI0280.12-K04G7.1
 278 GVFVN-----SSREGIARVK--SGBYAVYITESMLEYVL-ERD-DELQSTGGD- DSKAF-----F CelC06A8.9-10
 276 GLFVQ-----SSKEGIARVK--SSDYAVMESSEMLEYAV-ERD-DELQSTGGD- I--DDGY-GIGPKGSPY CelK1003.1
 295 -VAVT-----SNGKIVERR--LSMNVAYMESSTSEYET-QDN-NLTOIGGV- GSKGY-GIALAKKS-- CelCZ196.7
 273 SRFVG-----TNHEGVNRV--LNEKVFVLESATLDYV-ION-NLTRVGNVV- GSNGY-SIALPKGS-- CelF41B4.1
 293 DKFTNHWRYMQESKLPVNMDTAVDQVLSVDGFATIGDATEIKVAAITN- NLQDVGTE-F--SRAPY-ATAVQSSHIL CelC43H6.9-T07D1
 275 -----YVN-----GIRAVVAVVRANP-GVALLGPMATINFYAL-YSDKVVILFDGI- -PVYLSIPVYVYSIY CelF22A3.3-C15B12
 330 -----EPHNVRRASEVHSLNGLSDAFIWDARLEEARH--EARTRGSGDFG--RSAY-GIGPKGSPY CelF07F6.6
 278 -----NKYFRMNSATTEAVKNEELDAFIYDRAVVDYMGKQAND-ALMTVGK--WASHITGY-GIGPKGSP- CelF14H8.1-T01C3.10
 284 SRFV-----TTEEGTIRVKTGKYAVYLESTIMEYIE-DRKPDQTHKVGQN- DSKGY-GIATPKGSAL rGluR1
 280 SRLF-----NSDEGITRV--LTTDYALLMESTSEYVY-ORN-NLTOIGGL- I--DSKGY-GVGTPISSYF rGluR5
 281 SRFV-----STEEGARV--LNSNYAFLESTIMEYVR-ORN-NLTOIGGL- I--DTGY-GIGHVSSVF rKA1
 279 DNCVS-----NPSEGIKKAQK--GVAVFLWDVAVVVEVALTDD-SVTVLIGNSI--SSKGY-GIALQHSYF rdeIta1
 308 -----EKHNYESAREADAVRDNKLAHAFIWDARVLEEARSD--DQVTTTGEFF--RSGF-GIGNRKQSP rNR1
 300 -----RFNRQGVEDALVSLKVTGLD-AFIYDRAVVDYMGKQAND-ALMTVGK--WASHITGY-GIGPKGSP- rNR2

360 -----DWKHINLAAILALQERSELKKENKVVYD-----RQD-DAGITVD-GSSASLN-SKVAGIFYILHEGMVLS1 CelC06E1.4
 342 RYVKNVSLRVSLNLAAILYLSKSELKKENKVVYD-----RQD-DGTGSDG-GTSSLN-SKVAGIFYILLAGMVL51 CelI0280.12-K04G7.1
 329 L-----NILT--VLQDERTILKAKNKVYRD-----RRE-GPSSGPPSEKATNSKPNIF3IFVWLTGLIVAF CelC06A8.9-10
 336 R-----ELISAILALQERTELTEKEKVVYD-----K--SVVCEQP--KRKQDDGSESIGSIFITLVVGLVTA CelK1003.1
 352 -----EWTDRISROILYAKRBITMKKTVWRS--KARASTASAVKHORFASMYVAGLITLVGIVLAR CelCZ196.7
 332 -----KWREKLTROIQDNEKGIILMKNNVWK--SQDEQSEPEDELQT--ALGAEVNVVLLCLAGGSGIGV CelF41B4.1
 367 K-----DKISSAILILLNERRLETKKVVYD-----NPN--KVSCPOSSDESIGSISIONIGSVIVILAGIALSI CelC43H6.9-T07D1
 334 -----SPYFSTKIREIVRQ--FTQVIRAVRSYVADKINECNSTTIGPKSYLDKRAQAFVWFLGGAGLGL CelF22A3.3-C15B12
 391 -----WTPHITSAILRMSSEVNEKDDQVDR--GPNVVEARHS--PARLGLD--LFLVSSGVALGI CelF07F6.6
 341 -----HTSLVNHVHLQVQKQDLERQNFVLT-----DACTPDSHQTQ--SAPLGEVFLSRAVLAGGIIVSV CelF14H8.1-T01C3.10
 347 R-----GPNVAVLXLSQSMQKLSKVVYD-----KGE-GGSKDSSKDKTSALS-SVAVGVYILISGLSLAM rGluR1
 340 R-----DKITAILQLQEEKHMKEVW-R--NG-DPEEDS--KEASALGVENIGSIFVLAHGLVLSV rGluR5
 341 R-----DEFDLAILQLQENNRLEIKRQVW-E--GK-DPEEED--HRAKGLGEMENIGSIFVLAHGLVLA rKA1
 341 R-----DLFSQRIELOTGDLQVKKQVWPH--GRCOLTSHSRAQTGKSLKHSFAGVCTAIGLLAC rdeIta1
 369 -----WKQNVSLKSHNGFHDQKTVWRY--DEQDSRSN-A--PATITFENMAGVFLVAGGIYAGI rNR1
 364 -----WKRODIALQFVGDSEHELETLLT-----GTC-HNEKNEVM--SSDLDIDMAGVFLVLAARHALS rNR2

M4

426 PRLG CelC06E1.4
 415 CTALV CelI0280.12-K04G7.1
 392 ACAG CelC06A8.9-10
 397 VLVIFA CelK1003.1
 420 IIVIFA CelCZ196.7
 398 PAVL CelF41B4.1
 431 VTLAF CelC43H6.9-T07D1
 401 ALFVG CelF22A3.3-C15B12
 451 FLSFV CelF07F6.6
 404 IVLGFE CelF14H8.1-T01C3.10
 412 VALTE rGluR1
 401 FVAIGE rGluR5
 402 FVAL rKA1
 407 VARL rdeIta1
 430 FLIF rNR1
 426 ITFWE rNR2

2.3 Untersuchung der CelGluRs auf Q/R Editierung

Es sollte untersucht werden, ob die von den GluR Untereinheiten von Maus, Ratte und Mensch bekannten Q/R Editierung auch in CelGluRs mit geeigneter Codonkonfiguration in Q/R homologer Position (Abb. 14) auftritt. Mit geeigneten Primern wurden die Q/R Position beeinhaltende Sequenzabschnitte der CelGluRs C06E1.4, B0820.12-K04G7.1, und C06A8.9-10 unter Anwendung der RT-PCR Methodik aus Cel RNA amplifiziert. Trotz zweimaliger Wiederholung des Experiments konnte das Gen K10D3.1 nicht amplifiziert werden. Die Sequenzanalyse der cDNA zeigte, das Q/R homologe Positionen der CelGluRs C06E1.4, B0280.12-K04G7.1 und C06A8.9-10 mit einem Adenosin besetzt sind. Demnach werden diese CelGluR Rezeptoruntereinheiten in Q/R homologer Position in vivo nicht editiert (Abb. 15).

2.4 RNA abhängige Adenosin Deaminasen in *C. elegans*

Die Datenbank Suche nach Adenosindeaminasen (dsADARs=Doppelstrang-abhängige Adenosin Deaminase) in *C. elegans* anhand von Sequenzen der ADARs von Maus, Ratte und Mensch ergaben jeweils einen Treffer in den Cosmidklonen T20H4.4 (CelADAR1) und H15N14.1 (CelADAR2).

In beiden Klonen wurden Sequenzmotive mit Ähnlichkeit zu ADAR-Enzymdomänen gefunden. Beide potentiellen CelADARs tragen wie ADARs der Ratte (rADARs) eine Domäne mit drei konservierten Sequenzabschnitten, die für die katalytische Enzymfunktion notwendig sind. Ausserdem treten in beiden Klonen Sequenzen mit Ähnlichkeit zu den dsRNA bindenden Domänen bekannter ADARs auf. In CelADAR2 treten wie bei rADAR2 der Säuger zwei dsRNA bindende Domänen auf (Abb.16B). CelADAR1 unterscheidet sich von allen rADARs im Auftreten nur einer dsRNA bindenden Domäne, welche die grösste Sequenzverwandtschaft mit der am weitesten aminoterminal gelegenen dsRNA bindenden Domäne der rADARs aufweist (Abb. 16A).

Im Gegensatz zu den ADARs der Säuger zeigen die CelADARs untereinander nur relativ geringe Sequenz Ähnlichkeit (11.5%). Am Sequenz-ähnlichsten mit rADARs ist CelADAR1. Das vorhergesagte Protein ist aufgrund des gegenüber rADARs sehr kurzen aminoterminalen Proteinbereichs sowie der geringeren Zahl der dsRNA bindenden Domänen deutlich kleiner als rADARs, 420 As. Obwohl CelADAR1 in dieser Hinsicht gerade von rADAR besonders stark verschieden ist, besteht eine höhere Sequenzverwandtschaft mit rADAR 1 gegenüber rADAR2, 3 (Abb.16, C;17). CelADAR2 hat gegenüber CelADAR1 eine deutlich geringere Sequenzähnlichkeit mit rADARs, vor allem die potentiellen katalytischen und dsRNA bindenden Bereiche betreffend. Aufgrund des Vergleichs der Gesamt-Sequenz und bestimmter Aminosäure-Sequenzmotive der dsRNA bindenden Bereiche wie z.B. `KKAKL` in RB1 und `KKLAK` in RB2 ist eine grössere Ähnlichkeit mit CelADAR2 gegenüber CelADAR1 feststellbar (Abb. 18).

rGluR2	A	T	G	C	A	G	C	A	A
					M			Q	
CelC06E1.4	A	T	G	C	A	G	C	A	A
					M			Q	
CelB0280.12	A	T	G	C	A	A	C	A	A
					M			Q	
CelC06A8.9-10	A	T	G	C	A	A	C	A	G
					M			Q	
CelK10D3.1	A	T	G	C	A	G	C	A	G
					M			Q	
CelZC196.7	C	T	C	A	A	G	G	G	C
					L			G	
CelF41B4.1	C	T	T	C	G	T	G	C	A
					L			R	
CelC43H6.9	A	C	A	C	C	T	C	A	A
					T			Q	

Abbildung 14: Vergleich der Nucleotid und Aminosäuresequenz im Bereich der Q/R Position zwischen rGluR2 und CelGluRs. Q/R homologe Nucleotid positionen der CelGluRs, deren Editierung zu einem Wechsel der Codonbedeutung von Glutamin (Q) nach Arginin (R) führen würde, sind durch grau schattierte Boxen markiert.

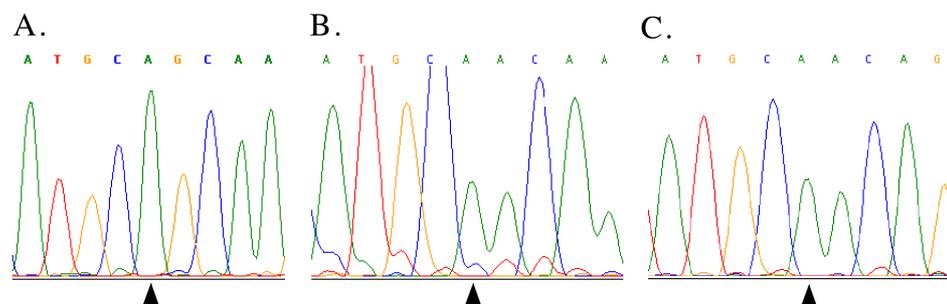


Abbildung 15: Untersuchung der Q/R homologen Positionen der CelGluRs C06E1.4, B0820.12-K04G7, und C06A8.9-10 auf in vivo Editierung. Aus Elektropherogrammen von Sequenzierungen der CelGluR cDNA (A=C06E1.4; B=B0820.12-K04G7.2; C=C06A8.9-10) ist ersichtlich, daß die Q/R homologen Positionen in den CelGluRs nicht editiert sind. Schwarze Pfeile deuten auf die mit einem Adenosin besetzten, also nicht-editierten, Q/R homologen Positionen der CelGluRs .

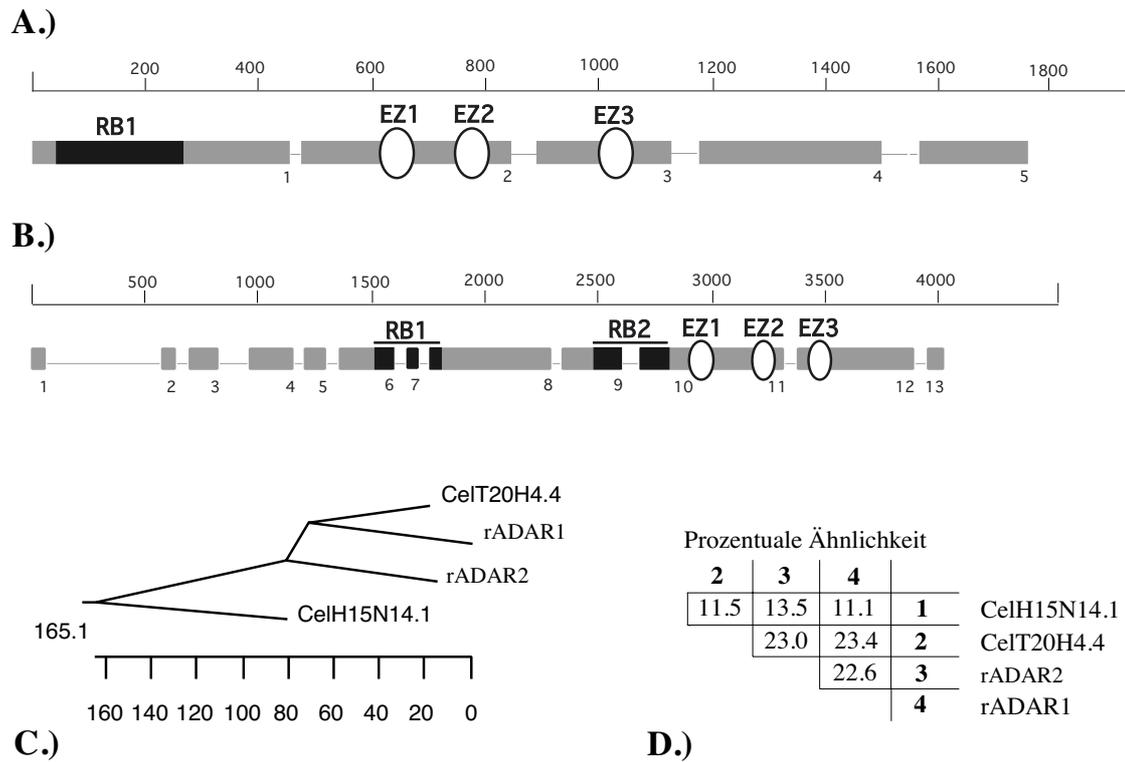


Abbildung 16: CelADARs: Genstruktur von T20H4.4=CelADAR1 (A) und H15N1.1=CelADAR2 (B). graue Boxen=Exons; schwarze Boxen=dsRNA bindende Domänen (RB); weisse Ovale=Sequenzbereiche für enzymatische Funktionen (EZ1-3). C) phylogenetischer Baum der Cel- und rADARs. rDRADA=rADAR1; rRed1=rADAR2 (D) Sequenzähnlichkeit der Cel- und rADARs in Prozent (%).

1	MS-----	CelADAR1
1	MSQGFRGPTGVFPHQTQPCLDPSYEHKWRYLQPRGSESYLRSFQLQQIEFLKGRLEAPLIGAQTQSLPFFLPGHWPRF	rADAR1
3	-----VFE-----	CelADAR1
81	PGPPAQGKQPEIWFPRSVTLRNQGFHIGPPLPPPHSRGPPWRGAEGLCSHFQELSIQNPEQKVLNRLLELGEKATTA	rADAR1
6	-GMEVETLKSFKMDLD-----	CelADAR1
161	YALARERLRTPKKIDINRILYSLERKGLHRGVGKPLWSLVLPSQACTOPPRAVNSDKEVPRGEPDLDSDEGDPASDLEGP	rADAR1
20	-----	CelADAR1
241	SELLDMAEIKEKICDYLFNVSKSALNLAKNIGLAKARDVNAVLDLERQGDVYREGATPPIWYLTDKKRERLQMKRSTH	rADAR1
20	-----	CelADAR1
321	SGPAATPAAVSEATQSTSFPTCHPPQSGSSMATSKRVENGQEPVTKYESRHEARPGPVRLRPHAYHNGPSRAGYVASE	rADAR1
20	-----DNIPD-----FVKEIVERSG-----KNPMSLFSLEYVHMTGNTPVFDFYNNRNP	CelADAR1
401	NGPWATDIDIPDNLNSIHTAPGEFRAIMEMPSYSPILPRCSPIYKLLTECQLKNPVSILLE-YAQTFSQTCDFNLIEQSGP	rADAR1
64	NGSMKFTCVVILNGERIEGNVSKKKKAKVSCSLKGLEVVKHVS-----	CelADAR1
480	SHEPRFKFOVINGREFPPAEAGSKKVAKQDAAVKAMAILLREAKAKDSGQPEELSNCPMEEDPEKPAESQPPSSSATSL	rADAR1
109	-----EYVVA-----	CelADAR1
560	FSGKSPVTTLLECMHKLGNCEFRLLSKEGPAHDPKFOYCVAVGAQTFFSVSAPSCKKVAQMAAEEAMKALQEEAANSAD	rADAR1
115	-----VKFEETTFEML--RRETYA-----KFYE-----LC	CelADAR1
640	DQSGGANTDSLDESVPNKIRRIGELVRYLNTNPVGGLLEYARSHGFAAEFKLIDQSGPPHEPKFVYQAKVGGRWFPVAVC	rADAR1
140	KN-----	CelADAR1
720	AHSSKQKQDAADAALRVLIGESEKAEQLGFAEVTPTGASLRRTMLLSRSPPDAHPTLPLTGSTFHDGIAMLSHRCFN	rADAR1
143	ALTYGFE-----KVIASVFLKINGNLQ--IIALSTGNKGLRGDKIVNDCTALIDCHAEILARRGLLRFLYSEVLFKSTE	CelADAR1
800	ALTNSFOPSLGRKILAAIIMKRDPEDMGVVSLGTCGNRCVKGDLSLSLKGCTVNDCHAEIISRRGFIRFLYSELMKYNHH	rADAR1
215	PP-NSIF--TKCKNALVLPGISFHLFINTAPCG-VARIDKLLKPGTSDDLQNS-----SRERFKIDKMGTVLG	CelADAR1
880	TAKNSIFELARGGKLDIKKTVSFHLYISTAPCGCAHFDKSCSDRAVESTESRHYPVFENPKQKLRIDKVENSGGTIPV	rADAR1
281	GASFEFAPOITDGI MMGERMRTMSCSDK LLRANVLGVOGALLSHIDPIYYSI AVAELNNADR LRKAVYSRAA----TF	CelADAR1
960	ESSDIVP--IWDGIRLGERLRTMSCSDK LLRANVLGVOGALLSHIDPIYYSI AVAELNNADR LRKAVYSRAA----TF	rADAR1
357	KPPA--PFHVQDVEICEQVEDTEQSTSAARSTISSMWNLADG-NTFVVRTSDGMVHDKDMSGADITTPSR LCKKNMA	CelADAR1
1038	EDGLRYEFLVNHKPVGRVSVYDSKR---QSGKTKEYSVNVNCLADGYDLFILLDGTGRTVDG---PCKEL---SRVSKKNIF	rADAR1
434	ELMITITLTKTSVDYPISYEELKAGSQEYAAAKKSEITWLRQKDLGITWQKPREFQMETI-----N	CelADAR1
1109	LQFKKLC SFRARRDLLQLSYCEAKKAARDYDLAKNYEKKSLRDMGYGNWISKPQEEKNFYLCPVPND	rADAR1

Abbildung 17: Sequenzvergleich zwischen CelADAR1 und der Sequenz-ähnlichsten Adenosindeaminase der Ratte, rADAR1 (=DRADA). In CelADAR1 treten Sequenzmotive mit hoher Ähnlichkeit zu dem katalytischen Zentrum und dsRNA-bindenden Domänen der CelADARs auf. In der Proteinsequenz weicht CelADAR1 von rADAR1 besonders durch das Auftreten nur einer dsRNA-bindenden Domäne gegenüber 3 dsRNA-bindenden Domänen bei rADAR1 (graue Boxen) sowie durch den kurzen aminoterminalen Proteinabschnitt ab. Der carboxyterminale Proteinbereich mit dem katalytischen Zentrum ist stärker konserviert als der aminoterminal Abschnitt mit der dsRNA bindenden Domäne. Schwarze Boxen=Übereinstimmung der Proteinsequenz zwischen CelADAR1 und rADAR1; EZ=Aminosäurepositionen mit kritischer Bedeutung für die Enzymfunktion; hellgraue Boxen: dsRNA-bindende Domänen.

```

1 MDQNPNYNFGYGQAYGSGTDHTSDSTNNYNWASQWSQPESAAASLATHTFPOYVSQQQQQQQQAAQQAQNTYAAIMNPIST CelADAR2
1 MD-----IEDEEN-----MSSSI rADAR2

81 FMOQQOQRAQTFPOK KYGQGGAPKPSAIRNNNFAGCGGHALSDEWVQPMSONQMGSPQGNRFFNNOKGGPFNQNKPNWR CelADAR2
15 DVKENRNLDNMPK-----DSSTPGPEGIPLSNGGG-----SISRKRPLEE-----SNCHSKYRLKK rADAR2

161 QNKPKGPAAPKFDSTGKSPAMLLHELFDVSEEYTEVEGVPKKYCCTLVKNGRTFQMESVNKKAQKQKSELVVRDLRP CelADAR2
70 RRKTP-G----- rADAR2

241 DVHVTPEEGVAAKAAAPVKKEIDAASNGQNNKRNADAINOPTPKKVSARKAKLTPVESALSLDLMOKIIAESAEK CelADAR2
76 PVLPKNALMQLNEIKPGLQYMLLSQTGPVHAPLFVMSVEVNGQVFEFGSPTKKAKLHAAEKALRSFVQFPN----- rADAR2

321 YSPVFEASEVPKDPEIPEVEVKKEEVDNGENVANEEKSGWRKNETMHNVTLLKFVEQNKQYTKMGPSRGVLKDMVIREAL CelADAR2
148 -----ASEAHLAMGRTLSVNTD----- rADAR2

401 RDLNVSHADITTVARRHASNRLGHDTTILQCLNITICILNCTLTIECEPAEDRPLGIGRAYFMAKCTIIDHNENDLKFE CelADAR2
165 ---ETSDQADFPD-----TLFNGFE-----PDKSEP-----PFYVG-----SNGDSSF rADAR2

481 VKSSSLAKAMAKDWVAQETLKNYFADPSSCVKTDVAVSQGPCALLHAMLNKQTKQCKIAVEFKDNVPPVAGQATTTF CelADAR2
202 SSGDVSLASPVASLTQPP-----PIPPPF-----PPSGKNPVMI LNEL-----RPGLKYDFLSE-----SGESHAKS rADAR2

561 YCECVIDEETDRYIGVGRSKKLAKSEAAAOALKKLFKIDYPAGNYPLALTSRAMTESKVSPICRHIAEFCKREYHQMTY CelADAR2
263 FVMSVVVDGQFFEGSGRNKKLAKARAAQSALATVFNLHLDOTPS-RQPVLSEGLQLHLPQVLDADAVSRLVLGKFSDLTDN rADAR2

641 YQIAPS--NLFAAFLLVNAQEEK--RVLAMGSSIQYIVPEDTLSGANGLSLHLDAITLARRAMLKAFIHEL-----STV CelADAR2
342 FSSPHARRKVLSGVMTGTGDVQDAKVISVSTGTKCI--NGEYMSDRGLALNDCHAEIISRSLRFLYAQELLYLNNKE rADAR2

712 DSECSIFEKKEEKAAALKPNLRLVLYSNYSPPC-----THAVDDAATKKLSYVTPTNL----- CelADAR2
420 DQKKSIFOKSERGFRLLKDTVQFHLYIS-TSPCGDARIFSPHEPVLEGMAPDSHOLTEPADRHPNRKARGOLRTKIESGE rADAR2

765 TCVP----DDVLTVEQIKETKSLRVHCTADKLFKWNLLGIQALLSNVLHPIFIDNIFFGSEAPVSDLESMLQGRLLGP CelADAR2
499 GTIIVRSNASIQWVQVQGERLLTMSCSDKLARWNVGIQALLSIFVEPIYFSSIILGSLYH--GDHLSRAMYQRISN rADAR2

841 NENEREIIVESMPV-----QMRMHMGISHL---WHRGVDSVETLDYNTGRTSKGSPSRVCKAEIFEAYRKLNGVDQAV CelADAR2
577 IEDLPPLYTLNKEPLLSGISNAEARQPKAPNFVSNWTVGDTAIVINATIGKDELGRPSRLCKHALYCRWRRVHGKVPPh rADAR2

911 V-----NYAKAKEMASEYOYEKVFYEKLEAAGLGKWTQKPAELVDSFTLAAFD CelADAR2
657 LLRTKITKPTTHESKLAAYEQAAKARLFTAFIRAGLGAWVEKTEQ-DOESFTPZ rADAR2

```

Abbildung 18: Sequenzvergleich zwischen CelADAR2 und rADAR2. Aufgrund des Auftretens von 2 dsRNA-bindenden Domänen sowie der Motive `KKAKL` und `KKLAK` in diesen Domänen besitzt CelADAR2 grössere Ähnlichkeit mit rADAR2 gegenüber rADAR1. Insgesamt ist die Ähnlichkeit zu ADARs, vor allem im Bereich des vermuteten katalytischen Zentrums, jedoch schwach. Schwarze Boxen=Übereinstimmung der Proteinsequenz zwischen CelADAR1 und rADAR1; EZ=Aminosäurepositionen mit kritischer Bedeutung für die Enzymfunktion; hellgraue Boxen: dsRNA-bindende Domänen.

2.5 Koexpression von CelADAR1 mit rGluR2 Minigenen in HEK293-Zellen zur Überprüfung der Deaminaseaktivität

Um zu zeigen, ob die Q/R und R/G Positionen in rGluR2 Minigenen durch eine Cel-Deaminase editiert werden können, wurde CelADAR1 (T20H4.4), die potentielle Adenosindeaminase mit der höchsten Ähnlichkeit der Proteinsequenz zu rADARs, von Cel-RNA durch RT-PCR in zwei Fragmenten amplifiziert (Abb. 19A). Für die folgenden Klonierungsschritte waren die für die Amplifikation verwendeten Primer mit Restriktionsschnittstellen versehen. Die beiden cDNA Fragmente wurden in pBluescript subkloniert, ligiert und anschliessend in prkFNRI umkloniert (Abb. 19B). Dieser Expressionsvektor enthält FLAG, eine 24 Nukleotid Sequenz, welche als neuer C-Terminus des Integrats zusammen mit diesem transkribiert und translatiert wird. FLAG dient als Erkennungssignal für den Flag Antikörper (Kodak). Für eine Expression in Zellkultur wurde prkFNRI-CelADAR1 zusammen mit den rGluR2 Minigenen pB13 und pBgl in HEK293 Zellen transfiziert. Das pBgl Minigen (Abb. 19C) enthält die Membranregionen M1 und M2 aus rGluR2 mit der Q/R Position in M2 in ihrer nicht editierten Form. In dem B13 Minigen (Abb. 19D) ist ein GluR2 Fragment mit den Exons 6-9 und der uneditierten R/G Position in Exon 6 enthalten. Als Editierungskontrolle wurden die GluR2 Minigene zusammen mit einem ADAR2-Expressionsvektor transfiziert. Zur Überprüfung der Editierung wurde aus reifen Zellkulturen RNA präpariert und diese mit geeigneten Primern revers transkribiert und anschliessend sequenziert. Die Auswertung der Sequenzierung ergab eine vollständige Editierung der Minigene in den mit rADAR2 kotransfizierten Kulturen, während in den mit CelADAR1 kotransfizierten Kulturen keine Editierung nachweisbar war. (Abb. 19E, F) Die richtige Expression und Translation von CelADAR1 wurde im Northern Blot gezeigt (Abb. 19G)

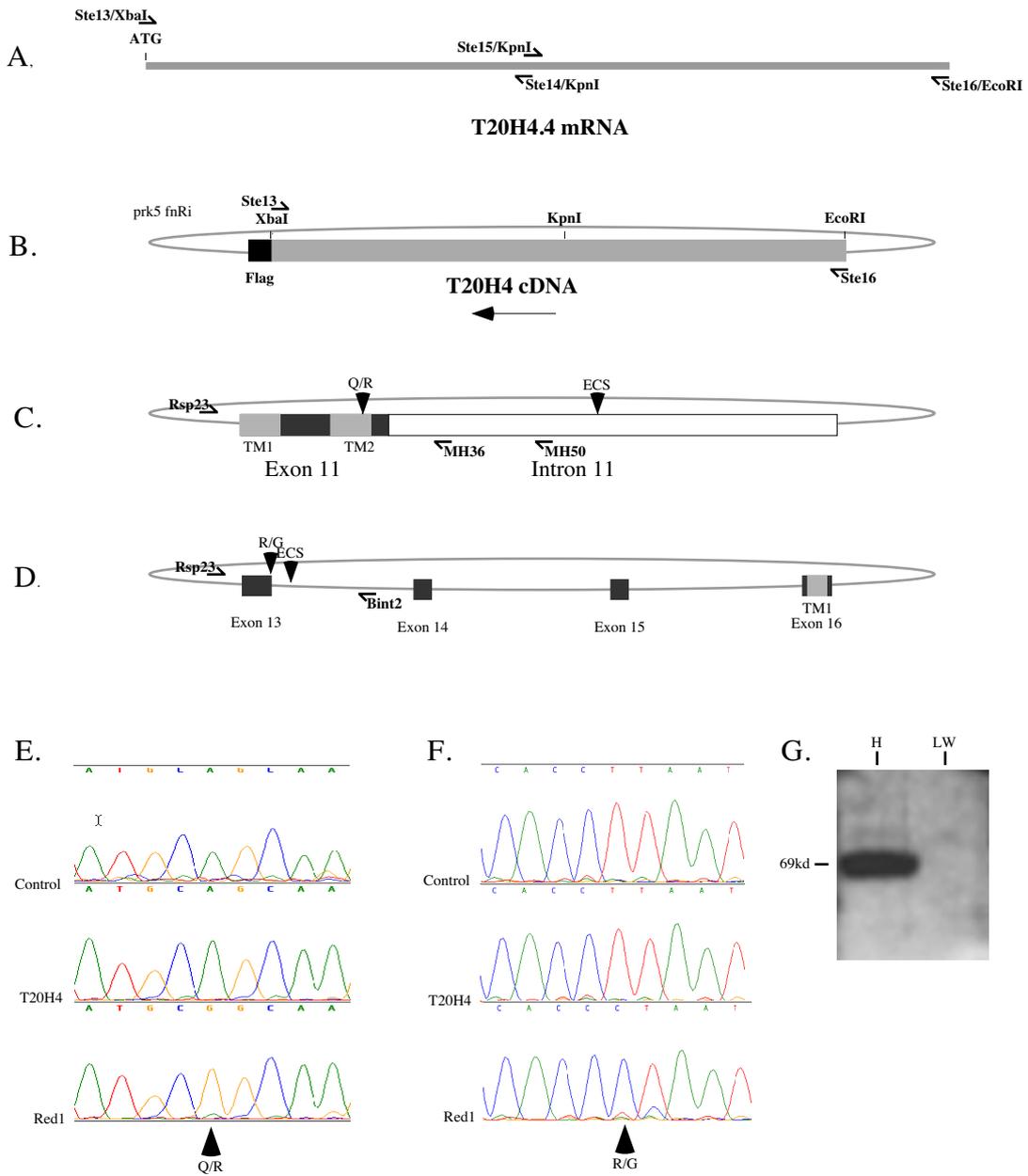


Abbildung 19: Koexpression von CelADAR1 (T20H4.4) mit rGluR2 Minigenen in HEK293 Zellen zur Überprüfung der Deaminaseaktivität von T20H4.4 an Q/R und R/G Editierungsstellen in rGluR2 in vitro. A) Amplifizierung des Gens T20H4.4 in zwei Fragmenten aus cDNA mit den Primerpaaren Ste13/14 und Ste15/16. B) Subklonierung der in pBluescript ligierten Fragmente in den Expressionsvector prkFNRI. Flag dient als Erkennungssignal für den Flag Antikörper C) Das Minigen pBG1 enthält die Membranregionen M1 und M2 aus rGluR2 mit der Q/R Position in M2 in ihrer nicht editierten Form und Intron 11 mit dem ECS Element. D) Das Minigen B13 enthält ein GluR2 Fragment mit Exon13-16, welches die R/G Editierungsstelle in Exon13 und das in dem stromaufwärts gelegenen Intron gelegene ECS Element beinhaltet. E) und F) Sequenzanalyse der revers transkribierten RNA aus dem Transfektionsexperiment: die Q/R und R/G Positionen werden durch die Deaminase rADAR2=rRed1 vollständig editiert, während in dem Ansatz mit CelADAR1= T20H4.4 und in der Leer Kontrolle (LW) keine Editierung auftritt. G) Der Northern Blot zeigt das 69 kD Proteinprodukt für T20H4.4.

3. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Aufgabenstellungen bearbeitet:

A. rGluR2(Q) sollte als Transgen im Gehirn der Maus unter Kontrolle des Tetrazyklinsystems exprimiert werden

B. Es wurde untersucht, ob in Glutamatrezeptor Untereinheiten von *Caenorhabditis elegans* in Homologa der rGluR2 Q/R Position Editierung auftritt.

Zu A:

3.1 Konditionale Expression einer rGluR2(Q) cDNA in der Maus

Für die Expression des rGluR-2(Q) als Transgen im Gehirn der Maus wurde eine bidirektionale Expressionseinheit (Baron et al., 1995) ausgewählt, in der rGluR2(Q) cDNA und ein LacZ Gen der Kontrolle eines tTA abhängigen Minimalpromoters unterstellt sind. Es wurde eine rGluR2(Q) cDNA verwendet, um aufgrund des Fehlens von Introns und damit des intronischen ECS Elements in cDNA die in vivo Editierung der Q/R Position in rGluR2 auszuschliessen. Die Verwendung des GluR2 aus Ratte in der Maus erleichtert aufgrund von Sequenzverschiedenheiten experimentell die Differenzierung zwischen nativem und transgenem GluR2.

Für die Expression des Transaktivators tTA wurden transgene α CaMKII-tTA Tiere eingesetzt, nachdem in den zur regionspezifischen Expression von tTA vorgesehenen Linien NR1/tTA und GluR2/tTA keine tTA Expression nachgewiesen werden konnte. Nach der Verpaarung von GluR2(Q)trans mit α CaMKII-tTA konnte in den doppeltransgenen Individuen die induzierte Expression der Gene rGluR2(Q) und LacZ gezeigt werden. Regional war die Expression auf das Vorderhirn beschränkt und entsprach dem Expressionsmuster des unter Kontrolle des α CaMKII Promoters exprimierten tTA. Die Expressionshöhe war unterschiedlich zwischen Individuen und erreichte Werte zwischen ca. 20 und 60 % eines Wildtyp Allels.

Die Überexpression von GluR2(Q) führte zu veränderten Ionenleitungseigenschaften der AMPA Rezeptoren in der Mutante. In hippocampalen CA1 Pyramidenzellen einer doppeltransgenen Mutante im Alter P25, deren Transgen von Geburt an aktiviert war, wurde ein Anstieg der Ca^{2+} Permeabilität und der makroskopischen Leitfähigkeit auf den zweifachen Wert gegenüber Wildtyp gemessen.

Die Expression des Tet kontrollierten GluR2(Q) wurde durch Absetzen des mit dem Trinkwasser verabreichten Doxycyclins (Dox) in verschiedenen Altersstadien der Maus induziert. In der Folge entwickelten Doppelmutanten, die ohne Dox aufgewachsen waren oder Dox bis zum Alter P5 erhalten hatten, einen neurologischen, übererregbaren Phänotyp, der jedoch in Individuen unterschiedlich ausgeprägt war. In den schwerwiegenden Fällen entwickelten die Tiere nach Geburt Hypomorphien und

eingeschränkte Motorkoordination. Diese Tiere verstarben in einem Alter von P24-27 im Verlauf spontaner epileptischer Anfälle von generalisiert, tonisch-klonischem Typ. Der Verlauf der neurologischen Erkrankung in diesen `schweren` Fällen erinnerte an den Phänotyp von $\text{GluR2}^{+\Delta\text{ECS}}$ Mäusen. In anderen Individuen blieben Hypomorphien, auffällige motorische Einschränkungen sowie die spontanen epileptischen Anfälle aus. Jedoch konnte in diesen Tieren im Alter P18-24 eine gegenüber C57BL6-Wildtyp desselben Alters um den Faktor 2,7 gesteigerte Anfälligkeit für Schlüsseltest-induzierte epileptische Anfälle gezeigt werden, welche den spontanen Anfällen ähnelten. Auffallend ist das Auftreten Schlüsseltest-induzierter epileptischer Anfälle auch bei Wildtyp (C57BL6) dieses Alters. Mit einer Häufigkeit >50% verliefen die einzelnen Anfälle sowohl in $\text{GluR2}(\text{Q})\text{trans}$ als auch C57BL6 letal. In den transgenen und Wildtyp-Individuen, die induzierte epileptische Anfälle überlebten, konnten in Altersstadien >P25 mit dem Schlüsseltest keine weiteren Anfälle ausgelöst werden. Dies trifft auch zu für die Doppelmutanten, die Dox bis zum Alter P35 bzw. P45 erhalten hatten: diese Tiere waren in allen Stadien in Verhalten und Erscheinung von Wildtyp nicht zu unterscheiden.

3.1.1 Genotyp und Phänotyp in verschiedenen $\text{GluR2}(\text{Q}/\text{R})$ Mutanten

Die verschiedenen transgenen Experimente, in denen das Verhältnis von editierten zu nicht editierten GluR2 Untereinheiten im Gehirn der Maus verändert war, führten zu einem breiten Spektrum an Phänotypen: unauffällig, mild, epileptisch-letal, lethargisch-letal (Feldmeyer et al., 1999).

Mit dem Projekt Qtrans wurde der epileptisch letale Phänotyp im Tet-regulierten transgenen Tiermodell reproduziert. Gemeinsame Charakteristika der verschiedenen Mutanten mit epileptischem Phänotyp sind das Auftreten von Hypomorphien, einer charakteristischen Körperhaltung, spontanen epileptischen Anfällen von generalisiert tonisch-klonischem Typ und frühzeitigem Tod. Die neurologische Erkrankung zeigt jedoch bei $\text{GluR2}^{++/\text{Qtrans}}$ einen mildereren Verlauf mit geringerer Häufigkeit spontaner epileptischer Anfälle und späterer Letalität zwischen P24 und 27 gegenüber P20 in den übrigen epileptischen Mutantenlinien. Die größte Diskrepanz ergibt sich aus dem Ausbleiben der beschriebenen neurologischen Symptome in einem Großteil der Individuen von $\text{GluR2}^{++/\text{Qtrans}}$. Einziges Indiz für die Wirksamkeit der Mutation in diesen Tieren ist die gesteigerte Anfälligkeit für epileptische Anfälle im Schlüsseltest.

Der heterogene Phänotyp von $\text{GluR2}^{++/\text{Qtrans}}$ von mild bis epileptisch-letal könnte auf die zwischen Individuen variable Expressionshöhe des Transgens zurückzuführen sein. Mit ca. 10-20% Anteil an Gesamt- GluR2 ist die Expression an $\text{GluR2}(\text{Q})$ in niedrig exprimierenden Individuen der Linie $\text{GluR2}^{++/\text{Qtrans}}$ deutlich geringer als in den epileptisch letalen Mauslinien $\text{GluR2}^{+\Delta\text{ECS}}$ mit 30 % $\text{GluR2}(\text{Q})$ und $\text{GluR2}^{+/\text{Neo}/\text{N-trans}}$ mit 30 %

GluR2(N) + 5% GluR2(Q) und daher möglicherweise nicht ausreichend für die Ausprägung der neurologischen Erkrankung.

Von entscheidender Bedeutung ist neben der absoluten Expressionshöhe das Verhältnis zwischen editierten und nichteditierten Untereinheiten, da der Einbau der editierten Untereinheiten in AMPA Rezeptoren den Effekten des nicht editierten Mutanten GluR2 entgegenwirkt. Unter diesem Gesichtspunkt hat das transgene Experiment (z.B. GluR2^{+/Qtrans}) gegenüber dem Gene Targeting Experiment (z.B. GluR2^{+/ Δ ECS}) Nachteile, da beide Wildtyp Allele erhalten bleiben, während im Zuge der homologen Rekombination eines der Wildtyp Allele durch das mutierte Allel ersetzt wird. Der grosse Pool editierter GluR2 Untereinheiten in der transgenen Mutante sollte das Entstehen milderer Phänotypen begünstigen. Das Zustandekommen des epileptischen Phänotyps in Abhängigkeit von der Expressionshöhe an nicht-editiertem GluR2 und dem Verhältnis für GluR2(Q) und -(R) wurde mit einem Kreuzungsexperiment gezeigt. Heterozygote Tiere der aus einem Targeting Experiment hervorgegangenen Linie Neo (GluR2^{+/Neo}) exprimieren 5% GluR2(Q) anstelle eines Wildtypallels. Dies führte bereits zu messbaren Veränderungen in den Ionenleitungseigenschaften der AMPA Rezeptoren der Mutante, jedoch nur zu geringfügigen Einschränkungen im 'Verhalten im offenen Feld' und einer erhöhten Sterblichkeit (20%). Ähnlich unauffällig war der Phänotyp der transgenen Linie GluR2^{+/Ntrans}, obwohl diese Mutanten 30% GluR2(N) überexprimierten. Erst die kombinierten Expression des GluR2^{Neo} Allels und des GluR2(N) Transgens in Doppelmutanten, die aus der Kreuzung beider Linien hervorgingen, führte zu dem beschriebenen epileptisch letalen Phänotyp. Die Steigerung der Expression nicht editierter GluR2 Untereinheiten von 30% GluR2(N) in GluR2^{+/Ntrans} auf 30% + 5% GluR2(Q) in GluR2^{+/Neo/Ntrans} ist jedoch kaum hinreichend, um die erhebliche Veränderung der Ionenströme durch AMPA Rezeptoren in dieser Mutante und den abweichenden Phänotyp zu erklären. Von grösserer Bedeutung für den schwerwiegender krankhaften Phänotyp von GluR2^{+/Neo/Ntrans} ist vermutlich das stark zugunsten von GluR2(Q) veränderte Verhältnis zwischen GluR2(Q) und -(R) Untereinheiten, welches aus dem Austausch eines der Wildtyp GluR2 Allele bei GluR2^{+/Ntrans} gegen das GluR2^{Neo} Allel resultiert.

Den Effekt der Einkreuzung des GluR2^{Neo} Allels in die transgenen Mutante GluR2^{+/Ntrans}: die Steigerung der Expression von GluR2(Q) und Reduktion der Expression an endogenem GluR2(R) um 50%, könnte man sich auch zur Reduktion des Anteils von GluR2(R) an insgesamt exprimiertem GluR2 in der Linie GluR2^{+/Qtrans} zunutze machen. Falls der relativ milde epileptische Phänotyp von GluR2^{+/Qtrans} auf einer zu niedrigen Expression an GluR2(Q) beruht, sollte die Einkreuzung des GluR2^{Neo} Allels in GluR2^{+/Qtrans} zu einem schwerwiegenderen epileptischen Phänotyp führen. Da das Neo Allel allein lediglich milde phänotypische Veränderungen verursacht, wäre der letal epileptische Phänotyp in einer hypothetischen GluR2^{+/Neo/Qtrans} Doppelmutante weiterhin über die Tet regulierte transgene Expression kontrollierbar.

Gegenüber dem Gene Targeting Experiment birgt die transgene Expression von rGluR2(Q) einen weitere Problematik: Aufgrund der Verwendung eines nicht-GluR2

Promoters (α CaMKII) für die Expression von tTA sowie nicht vorhersagbarer Positionseffekte bei der Integration des Transgens in das Mausgenom sollte das Expressionsmuster für das transgene rGluR2(Q) von dem des endogenen mGluR2 abweichen. LacZ Färbungen von Gehirnschnitten für GluR2^{+/Qtrans} zeigen jedoch ein dem endogenen GluR2 relativ ähnliches Expressionsmuster mit hoher Expression in Hippocampus und Neocortex. Die Gemeinsamkeiten im Phänotyp zwischen den epileptisch-letalen Mutanten und GluR2^{+/Qtrans} deuten ausserdem auf eine ähnliches Expressionsmuster in den Neuronpopulationen, die für das Entstehen des epileptischen Phänotyps von Bedeutung sind. Die Identifikation dieser Neuronpopulationen wäre unter Verwendung regional exprimierender tTA-Mutanten möglich. Derartige Mutanten waren jedoch zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit noch nicht verfügbar.

Die Überexpression nicht editierter GluR2 Untereinheiten in GluR2^{+/Qtrans} führte in CA1 Neuronen des Hippocampus zu einem Anstieg der Ca²⁺ Permeabilität und der makroskopischen Leitfähigkeit der AMPA Rezeptoren um den zweifachen Wert gegenüber Wildtyp.

Der verglichen mit den epileptisch-letalen Mutanten geringe Zuwachs für P_{Ca2+}, der lediglich das Niveau in Mutanten mit mildem Phänotyp GluR2^{+/neo} und GluR2^{+/Ntrans} erreicht, ist auf das bereits erwähnte ungünstige Verhältnis zwischen GluR2(Q) und -(R) in der transgenen Mutante zurückzuführen. Umgekehrt resultiert aus der transgenen Überexpression eine besonders große makroskopische Komponente, da diese nicht nur aufgrund der 2-3fach gesteigerten Einzelkanalleitfähigkeit von AMPA Rezeptoren, die kein GluR2(Q) enthalten (Swanson et al., 1997), sondern auch aufgrund der im Transgen gegenüber Wildtyp vermehrten Zahl der AMPA-Rezeptoren anwächst. Bei GluR2^{+/Qtrans} erreicht die makroskopische Leitfähigkeit die stark erhöhten Werte der epileptisch-letalen Mutanten GluR2^{+/ΔECS}, GluR2^{+/Neo/Ntrans} und ADAR2^{-/-}. Dies bestätigt das Resultat bisheriger Untersuchungen, wonach der epileptische Phänotyp der GluR2 (Q/R) Mutanten mit der vergrösserten makroskopischen Komponente durch AMPA Rezeptoren, nicht jedoch mit der Steigerung der P_{Ca2+} korreliert. Ob P_{Ca2+} in diesem Zusammenhang tatsächlich vernachlässigbar ist oder im Verein mit den vergrösserten makroskopischen Strömen den epileptischen Phänotyp hervorruft, konnte in den vorhandenen Mutantenlinien nicht untersucht werden, da AMPA Rezeptoren nicht selektiv für Ca²⁺ blockierbar sind. Die Fragestellung liesse sich jedoch in einer transgenen Mutante untersuchen, die editierte GluR2 Untereinheiten überexprimiert.

3.1.2 Der temporäre epileptische Phänotyp

Epilepsien, die aus der vermehrten Expression nicht editierter GluR2 Untereinheiten im Gehirn der Maus resultierten, waren durch einen mit Beginn der dritten Lebenswoche einsetzenden, anterograden Verlauf und Letalität für 100% der Mutanten bis zum 20 –25.

Tag nach der Geburt gekennzeichnet. Über Supprimierung der Tet-regulierten Überexpression von GluR2(Q) im Transgen GluR2^{+/+Qtrans} während der Entwicklung wurde gezeigt, daß der epileptische Phänotyp im adulten Tier nicht zum Tragen kommt, sondern auf die dritte und vierte Woche der Mausentwicklung beschränkt bleibt. Ein übereinstimmendes Resultat erbrachte ein 'Knock Down' Experiment für GluR2 (Friedman et al., 1998): Die unilaterale Mikroinfusion von GluR2 Antisense Oligodesoxynukleotiden (AS-ODNs) in den Hippocampus in den drei Altersstadien P8, P13 und adult führte bei allen Tieren zu einer Reduktion des GluR2 Proteins um ca.75 %, jedoch ausschliesslich in der P13 Gruppe zu Verhaltensstörungen und spontanen epileptischen Anfällen. Neurodegenerationserscheinungen in CA3 Neuronen des Hippocampus resultierten aus der epileptischen Aktivität und erinnerten an Läsionen im Hippocampus, wie sie als Folge von kainatinduziertem Status Epilepticus sowie in den epileptisch-letaligen GluR2^{+/ Δ ECS} Mutanten auftraten.

Die beobachtete Epilepsieanfälligkeit innerhalb der zweiten und dritten Woche der Mausentwicklung ist weder spezifisch für das GluR2 Modell, noch für den Hippocampus als involvierte Struktur, sondern scheint, wie die Ergebnisse der Untersuchungen z.B. von neocorticaler fokaler Epilepsie (Mares, 1973), Amygdala Kindling (Moshe, 1981), hippocampalem Kindling (Haas et al., 1990), elektrischer Stimulierung des Hippocampus (Velisek und Mares, 1991), Tetanustoxin induzierter Epileptogenese (Anderson et al., 1997) und audigener Epilepsie (Pierson und Swann, 1991) zeigen, ein weitverbreitetes Phänomen zu sein. Charakteristika der gesteigerten Epilepsieanfälligkeit in diesem Altersstadium in Maus und Ratte sind z.B. schnelle sekundäre Generalisierung epileptischer Anfälle, das Auftreten multifokaler Anfälle, verringerte Refraktärzeiten und eine Tendenz zur Ausbildung von Status Epilepticus.

Die Phase der Übererregbarkeit fällt auf ein Stadium der Entwicklung von Maus bzw. Ratte, wenn Jungtiere alt genug sind, um vom Muttertier entwöhnt zu werden und hippocampale und corticale Strukturen im Gehirn reifen. Im Hippocampus unterliegen die innerhalb der ersten und zweiten postnatalen Woche im Überschuss angelegten axonalen Strukturen in diesem Zeitabschnitt dem 'Remodeling' (Gomez-DiCesare et al., 1997): Durch selektive Eliminierung überschüssiger Axonäste (Pruning) und Proliferation verbliebener Kontakte entstehen adulte Verschaltungsmuster zwischen Neuronen.

Im Überschuss angelegte frühe Axonkollaterale scheinen für das Entstehen epileptiformer Aktivitäten in diesem Altersstadium von Bedeutung zu sein. So konnte z.B. an Gehirnschnitten zwei Wochen alter Mäuse unter Blockade der GABA_Aergen inhibitorischen Systeme durch GABA_A Antagonisten gezeigt werden, daß die Reizung einzelner CA3 Pyramidenzellen im Hippocampus in 85 % der Fälle zu synchronen epileptiformen Aktivitäten der gesamten CA3 Pyramidenzellpopulation führt (Smith et al., 1995), während dieses Phänomen in einer vergleichbaren Studie an Hirnschnitten adulter Tiere seltener auftrat (Miles und Wong, 1983). Altersabhängige Unterschiede in biophysikalischen Eigenschaften früh ausgebildeter erregender Synapsen sowie ihrer Positionierung auf dendritischen Ästen werden als Ursachen dieser gesteigerten

Epilepsieanfälligkeit diskutiert (Swann et al., 1999). Tatsächlich unterscheiden sich glutamaterge EPSPs in Hippocampus und Neocortex erheblich zwischen jugendlichen und adulten Altersstadien (Burgard und Hablitz, 1993). Aus Hybridisierungsstudien geht ein Zusammenhang zwischen der Beschaffenheit der EPSPs und der Expression bestimmter Glutamaterezeptor Untereinheiten in den jeweiligen Altersstadien hervor. So sind z.B. die NMDA Rezeptor Untereinheit NR2D und die flip Varianten der AMPA Rezeptor Untereinheiten, deren Einbau in Rezeptoren zu verlängerten Kanalöffnungszeiten führt, in frühen Entwicklungsstadien höher exprimiert als in adulten Tieren. Auch die insgesamt höhere Expression an Rezeptoruntereinheiten könnte zu der vergrößerten EPSP Komponente beitragen. Ein Zusammenhang zwischen epileptiformer Aktivität im jungen Gehirn und glutamaterger Neurotransmission wurde z.B. an disinhibierten Gehirnschnitten gezeigt: Durch den AMPA Rezeptor Antagonisten 6-Cyano-7-Nitroquinoxaline-2,3 Dione (CNQX) wird die epileptiforme Aktivität in corticalen und hippocampalen Regionen unterdrückt (Lee und Hablitz, 1991).

Ein Zusammenhang zwischen frühen erregenden Axonkollateralen und Synapsen im Hippocampus und den bei verschiedenen GluR2 Mutanten temporär auftretenden Epilepsien wurde bisher nicht nachgewiesen. Für einen möglichen Zusammenhang spricht bisher lediglich: 1.) Das übereinstimmende Zeitfenster zwischen der an disinhibierten Gehirnschnitten junger Mäuse im Hippocampus gezeigten hohen Erregbarkeit und dem Auftreten von Epilepsien in GluR2 Mutanten. 2.) Die Wahrscheinlichkeit einer Funktion hippocampaler Areale als Focus für Epilepsie in GluR2 Mutanten. Dies ist daraus abzuleiten, daß im GluR2 `Knockdown` Epilepsien in Folge der gezielten Infusion von GluR2 AS-ODNs in den Hippocampus auftraten. 3.) Läsionen in der CA3 Region des Hippocampus in den epileptisch-lethalen Mutanten $\text{GluR2}^{+/Δ\text{ECS}}$, $\text{GluR2}^{+/Neo/N\text{-trans}}$, $\text{ADAR2}^{-/-}$ und im GluR2-`Knockdown` Experiment, die Anzeiger wiederholter epileptiformer Aktivitäten in dieser Gehirnregion sind.

Um zu untersuchen, inwieweit die frühen erregenden Axonkollateralen im Hippocampus als Focus für epileptiforme Aktivitäten bei GluR2 Mutanten auftreten, werden nun Mausmutanten benötigt, die nicht-editiertes GluR2 konditional und regionspezifisch, möglichst ausschliesslich in verschiedenen Regionen des Hippocampus wie z.B. CA3, exprimieren. Geeignete regulatorische Elemente sind derzeit unter Konstruktion.

Eine weitere Fragestellung betrifft das Auftreten der Epilepsien in GluR2 Mutanten als Folge einer Störung akuter Hirnfunktionen oder in Folge einer mutationsbedingt gestört verlaufenen Entwicklung des Gehirns. Gegen eine Entwicklungsstörung als Ursache GluR2 vermittelter Epilepsien spricht das Auftreten epileptischer Anfälle im Schlüsseltest auch bei Wildtyp, welche den bei Mutanten spontan auftretenden oder im Schlüsseltest induzierten Anfällen im Verlauf und dem häufig letalen Ausgang ähneln. Dies lässt darauf schliessen, dass den epileptiformen Aktivitäten in Wildtyp und Mutanten derselbe Mechanismus zugrunde liegt und diese bereits bei Wildtyp bestehende Bereitschaft zur Epilepsie in den Mutanten aufgrund vergrößerter makroskopischer AMPA Rezeptor Ströme lediglich verstärkt ist. Daraus folgt weiter, dass die epileptiformen Aktivitäten

akute Funktionsstörungen des Gehirns in dem kritischen Altersstadium sind und nicht als Folgescheinung einer mutationsbedingten Entwicklungsstörung auftreten. Für eine akute Hirnfunktionsstörung als Ursache des epileptischen Phänotyps sprechen ausserdem das Auftreten epileptischer Anfälle im GluR2 `Knockdown´ Experiment bereits wenige Tage nach der ersten Applikation von GluR2 AS-ODNs in den Hippocampus im Alter P12, das Auftreten spontaner epileptischer Anfälle in der LC1 Mutante, welche nicht editierte GluR2 Untereinheiten konditional regulierbar exprimiert, auch bei solchen Tieren, bei denen die Expression des Targeting Allels bis zum 10. Tag nach der Geburt supprimiert war (Frieder und Schwenk, unveröffentlicht) sowie das Fehlen pathologischer Veränderungen der Gehirnmorphologie als Anzeiger von Entwicklungsstörungen bei epileptischen Mutanten. Veränderungen der Gehirnmorphologie traten allerdings in der Mutante GluR2^{Neo/Neo} in Form reduzierter Länge und Anzahl der Verzweigungen basaler Dendriten der hippocampalen CA3 Neurone auf. Der abweichende Phänotyp ohne Epilepsien und die nicht vergrösserte makroskopische Komponente der AMPA Rezeptor Ströme deuten jedoch darauf hin, das für diese Entwicklungsstörung andere als die Epilepsie begünstigenden Faktoren eine Rolle spielen, wie z.B. die extrem gesteigerte Ca²⁺ Permeabilität der AMPA Rezeptoren in dieser Mutante. Eine gesteigerte Ca²⁺ Komponente der AMPA Rezeptor Ströme korreliert auch mit dem Auftreten einer weiteren Entwicklungsstörung, Kleinwüchsigkeit, die bei allen epileptischen Mutanten und bei GluR2^{Neo/Neo} und GluR2^{-/-} auftritt.

Die bisherigen Daten sprechen also dafür, das der epileptische Phänotyp in Q/R Mutanten akut, in Zusammenhang mit vergrösserten makroskopischen Strömen durch AMPA Rezeptoren und möglicherweise in Zusammenhang mit dem Reifungszustand glutamaterger intro-hippocampaler Netzwerke auftritt.

Zu B:

3.5 Glutamaterezeptor Untereinheiten in *C. elegans*: eine in silico Analyse

Ionotrope Glutamaterezeptoren sind in nahezu allen Nervensystemen die Vermittler schneller, erregender, synaptischer Potentiale. Das Auftreten 18 verschiedener Untereinheiten sowie verschiedener Splice- und Editierungsvarianten dieser Untereinheiten im Gehirn der Säugetiere spiegelt die weitreichende funktionelle Bedeutung dieses Rezeptortyps im hochentwickelten Gehirn, u.a für der Ausbildung von Gedächtnis-inhalten und Tierverhalten wider.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand von in silico Analysen vorhergesagter Glutamaterezeptor Gene untersucht, welche im Gen kodierte Vielfalt an Rezeptor Untereinheiten in dem nur 302 Neurone umfassenden Nervensystem des Nematoden *C. elegans*, einem einfachen und weit an der Basis des Evolutionsstammbaumes der Tiere stehenden Organismus, vorliegt. Über eine `Blast´ Suche anhand von Glutamat Rezeptor Sequenzen der Säuger in der *C. elegans* Proteindatenbank des NCBI wurden für den

Nematoden 10 Gene identifiziert, die für Glutamat Rezeptor Untereinheiten kodieren. In allen Untereinheiten wurden Domänen mit Ähnlichkeit zu den in Glutamatrezeptoren der Säugetiere auftretenden drei Transmembranregionen M1 und M3-4, der Membranschleife M2 sowie der beiden Domänen für die Ligandenbindungsstelle identifiziert. Mit einem anhand von Sequenzvergleichen der Glutamat Rezeptor Sequenzen verschiedenster Organismen erstellten, Teile der M2 und die M3 Region beinhaltenden Konsensus Motif der Glutamatrezeptoren (Sprengel et al., 2001): $Wn_3Gn_2xxGn_{4/5}P(R/K)n_4R/Kn_5WWnFn_6$ -SYTANLAAF, zeigten 9 der 10 CelGluRs weitgehende Übereinstimmungen. Das Gen F22A3 erwies sich aufgrund zahlreicher Abweichungen von diesem Motif und der insgesamt geringsten Sequenzverwandtschaft als relativ lose verwandt mit Glutamatrezeptoren. Wie bei einem anderen Vertreter der Invertebraten, *Drosophila* (Sprengel et al., 2001), sind auch in *C. elegans* die vier Glutamat Rezeptor Familien AMPA, Kainat, NMDA und delta mit jeweils mindestens einem Gen vertreten. Inwieweit Rezeptoren aus *C. elegans* allerdings die pharmakologischen Kriterien dieser Rezeptor Einteilung erfüllen, bedarf weiterer Untersuchung. Eine Differenzierung in die einzelnen aus Säugern bekannten Genfamilien für Glutamatrezeptor Untereinheiten konnte mit der Zuordnung der beiden NMDA Rezeptor Untereinheiten aus *C. elegans* zu den Untereinheiten NR1 und NR2 getroffen werden, während eine Zuordnung der Kainat Rezeptor-ähnlichen CelGluRs zu den beiden Kainat Rezeptor Gen Familien der Säuger, KA1-2 und GluR5-7, nicht möglich war. Für die Rezeptor Untereinheit NR3 tritt in *C. elegans* kein analoges Protein auf. Der Sequenzvergleich der Glutamat Rezeptor Untereinheiten von *C. elegans* und Säugern zeigt eine hohe Konserviertheit der Glutamat Rezeptor Familien im Lauf der Tierrevolution. Gleichzeitig macht sich der hohe evolutionäre Abstand zwischen Nematoden und Säugern mit dem Unvermögen bemerkbar, Glutamat Rezeptor Untereinheiten aus *C. elegans* einzelnen Rezeptor Untereinheiten innerhalb einer Genfamilie bei Säugern, z.B. GluR1-4, zuzordnen, da die Verwandtschaft der AMPA Rezeptor Untereinheiten aus *C. elegans* untereinander sehr viel grösser ist als gegenüber den Verwandten bei Säugern.

3.6 Untersuchung der Glutamat Rezeptoren aus *C. elegans* auf Q/R Editierung

Nach bisherigen Erkenntnissen gehören neuronale Rezeptoren zu den in der Evolution bevorzugten Substraten für mRNA Editierung nach dem positionsspezifischen A-I Mechanismus. Ursprünglich in Gentranskripten ionotroper Glutamatrezeptoren der Säuger entdeckt (Sommer et al., 1991), wurde dieser Typus der posttranskriptionellen Modifikation von Primärtranskripten inzwischen auch für neuronale Rezeptoren der Invertebraten; den Kv2 K⁺ Kanal des Tintenfischs (Patton et al., 1997) und die Rezeptor Gene para, cac und DrosGluCl- α aus *Drosophila* (Palladino et al., 2000) nachgewiesen. Gegenüber allelescher Variation, welche im diploiden Organismus entweder kein, ein oder zwei Allel(e) einer Proteinvariante in einem 0:1:2 Verhältnis bereitstellt, bietet

mRNA Editierung die Möglichkeit einer stufenlosen Einstellung des Verhältnisses zwischen unmodifizierten und editierten Proteinvarianten, welche sich zudem nur in einzelnen Aminosäurepositionen unterscheiden. In Zusammenhang mit der Tatsache, dass fast alle untersuchten Editierungsstellen *in vivo* nicht vollständig, sondern nur zu einem gewissen Prozentsatz editiert werden, wurde postuliert, daß mRNA Editierung nach dem positionspezifischen A-I Mechanismus im Laufe der Evolution in Zusammenhang mit den Vorteilen einer Feinabstimmung gewisser neurophysiologischer Prozesse entstand (Seeburg, 2000). Damit stimmen Ergebnisse aus dem 'Knockout' Experiment für die einzige Doppelstrang-abhängige Adenosindeaminase ADAR in *Drosophila* überein: Die Unterbindung der Editierung in den 25 bekannten Editierungsstellen in den Transkripten der neuronalen Rezeptoren *para*, *cac* und *DrosGluCl- α* und vermutlich auch in allen in Gentranskripten von *Drosophila* noch nicht identifizierten Editierungsstellen führte zu einem Phänotyp mit ausschliesslich neurologischen Störungen und daraus resultierendem verändertem Tierverhalten, jedoch nicht zu morphologischen Veränderungen oder gesteigerter Lethalität der Mutanten unter optimalen Bedingungen (Palladino et al., 2000). Besonders subtile Effekte auf neuronale Funktionen scheinen mit Ausnahme der Q/R Editierung die meisten in Glutamatrezeptor Untereinheiten der Säugetiere auftretenden Editierungen hervorzurufen: Der Knock Out für die Deaminase ADAR2 in der Maus, in dem das Ausmaß der Editierung für die meisten der in Glutamat Rezeptoren auftretenden Editierungsstellen stark reduziert war, zeigten keinen erkennbaren krankhaften Phänotyp, wenn in der Q/R Position eine Punktmutation von Q nach R, also für die Q/R-editierte Version des *GluR2* codierend, eingefügt war (Higuchi et al., 2000). Die Editierung der Q/R Position der AMPA Rezeptor Untereinheit *GluR2* bildet einen Sonderfall insofern als die Unterbindung des hier mit einer Effizienz >99% erfolgenden Editierungsschrittes zu der Expression von AMPA Rezeptoren mit extrem veränderten Ionenleitungseigenschaften und in der Folge zu letal verlaufenden neuronalen Dysfunktionen führt (Brusa et al., 1995). Bisher wurde die Q/R Editierung nur bei Säugetieren nachgewiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob Q/R homologe Positionen in Gentranskripten von Glutamat Rezeptoren eines einfach strukturierten Invertebraten, *C. elegans*, ebenfalls editiert werden. Aus Sequenzanalysen von *in silico* vorhergesagten Proteinen für *C. elegans* ging hervor, daß die beiden AMPA Rezeptor-ähnlichen Untereinheiten C06E1.4 und B0280.12 sowie zwei aus 5 Kainat Rezeptor-ähnlichen Untereinheiten (K10D3.1 und C06A8.9-10) mit dem im Bereich der Q/R Position gelegenen konservierten Sequenzmotiv 'MQQ' der nicht-NMDA Glutamat Rezeptoren der Säugetiere Identität aufweisen und somit als Kandidaten für eine mögliche Editierung des in Mittelposition des Sequenzmotifs befindlichen Glutaminocodons in Frage kommen. Interessanterweise liegt in einer weiteren Kainat Rezeptor-ähnlichen Untereinheit, F41B4.1, ein Arginin (R) in Q/R homologer Position bereits im Gen kodiert vor. Inwieweit jedoch dieses Arginin dem in editiertem *GluR2* der Säuger auftretenden Arginincodon funktionell analog ist, bedarf elektrophysiologischer Untersuchung, zumal

die beiden übrigen Aminosäurenpositionen des bei Säugern hochkonservierten `MQQ` Motifs bei F41B4.1 abweichend besetzt sind: `LRA`.

Über Sequenzierung revers transkribierter mRNA aus *C. elegans* konnte für drei der vier `Kandidaten` Untereinheiten gezeigt werden, daß deren Q/R homologe Positionen in vivo nicht editiert sind. Das Gen K10D3.1 konnte aus den RNA Präparationen nicht amplifiziert werden, vermutlich aufgrund des Vorliegens zu geringer Mengen an RNA für dieses ausschliesslich in einem Neuron exprimierte Gen (Brockie et al., 2001).

Interessanterweise treten die Gene K10D3.1 und F41B4.1, welches das Arginocodon in Q/R homologen Position trägt, ausschliesslich in dem thermosensitiven Interneuron RIA auf; ein sehr eingeschränktes Vorkommen in Anbetracht der auf eine Anzahl von 120-360 geschätzten glutamatergen Synapsen in *C. elegans* (Brockie et al., 2001).

Das Auftreten eines Argininkodons in Q/R homologer Position bei Glutamat Rezeptoren von *C. elegans* kann also mit der Ausnahme des Interneurons RIA für das glutamaterge System von *C. elegans* ausgeschlossen werden. Sind also AMPA und Kainat-ähnliche Rezeptoren in *C. elegans* weitgehend Ca^{2+} -permeabel? In diesem Zusammenhang ist von Interesse, daß die meisten der AMPA- und Kainat Rezeptoren exprimierenden Neuronen in *C. elegans* nicht gleichzeitig NMDA Rezeptoren exprimieren, während bei Säugern meist beide Rezeptortypen in denselben Nervenzellen und in den Synapsen kolokalisiert auftreten. Ist also die bei Säugern bestehende Aufgabenverteilung für synaptische Funktionen zwischen NMDA- und AMPA Rezeptoren auf der Evolutionsstufe der Nematoden noch nicht oder wenig etabliert? Mit der Expression nicht-editierter AMPA Rezeptor Untereinheiten in der Maus wurde bereits gezeigt, das der vermehrte Ca^{2+} Einstrom durch mutierte AMPA Rezeptoren in Bezug auf den Langzeit Potenzierungseffekt an der Synapse funktionell NMDA Rezeptoren ersetzen kann (Feldmeyer et al., 1999). Bei *C. elegans* könnten Ca^{2+} - permeable AMPA Rezeptoren in ähnlicher Weise Funktionen erfüllen, die bei Säugern den NMDA Rezeptoren zufallen. Dies ist jedoch zunächst spekulativ.

Ob die in *C. elegans* exprimierten AMPA und Kainat Rezeptor-ähnlichen Untereinheiten in ihren elektrophysiologischen Charakteristika mit ihren nicht Q/R editierten Analoga der Säuger tatsächlich vergleichbar sind, bedarf vor allem in Anbetracht starker Abweichungen von dem erwähnten `MQQ` Motiv bei drei der Kainat Rezeptor ähnlichen Untereinheiten und der nicht bekannten Kombinationen zu Rezeptoren, die diese Untereinheiten eingehen, nun umfassender elektrophysiologischer Untersuchungen. Weiter ist zu untersuchen, ob andere posttranskriptionelle Modifikationen in Glutamat Rezeptoren von *C. elegans* die Rezeptor Familie zu vergrössern.

3.7 Nicht-Editierung der Q/R und R/G Editierungsstellen in GluR2 Minigenen durch die Deaminase T20H4 .4 aus *C. elegans* in vitro

Inosin, das Reaktionsprodukt aus der Deaminierung eines Adenosins in RNA durch Doppelstrang RNA abhängige Adenosindeaminase Aktivität, wurde bisher in allen daraufhin untersuchten Vielzellern, u.a. in *C. elegans*, nachgewiesen. Für *C. elegans* wurden bisher ausschliesslich in Introns gelegene Editierungsstellen nachgewiesen, die Entdeckung weiterer, möglicherweise auch in kodierenden Sequenzen gelegener Editierungsstellen ist in Anbetracht der Eingeschränktheit der bisherigen Suche nicht auszuschliessen. (Morse, Bass, 1999). Über in silico Analysen vorhergesagter Proteinsequenzen konnten für *C. elegans* zwei Kandidaten Gene für Doppelstrang-abhängige Adenosindeaminasen (ADARs) identifiziert werden. Beide vorhergesagten Gene weisen Sequenzen mit Ähnlichkeit zu dem katalytischen Zentrum und dsRNA bindenden Domänen bekannter ADARs auf. Für CelADAR1 wurde eine höhere Sequenzverwandtschaft zu Adenosindeaminasen der Säuger festgestellt als für CelADAR2.

In einem in vitro Experiment wurde die Funktion von CelADAR1 als Deaminase überprüft. Über Kotransfektion von CelADAR1 mit Minigenen, welche Fragmente des GluR2 Gens einschliesslich der Q/R und R/G Positionen und der zugehörigen ECS Elemente enthielten, in HEK Zellen wurde gezeigt, daß CelADAR1 diese Editierungsstellen nicht editiert. Das Negativ Ergebnis schliesst eine Funktion von CelADAR1 als Deaminase in vivo nicht aus. Der hohe evolutionäre Abstand zwischen Deaminasen der Säuger und *C. elegans* und daraus resultierende Sequenzdivergenzen z.B. die dsRNA bindenden Domänen betreffend mögen dazu beitragen, daß ein Enzym aus *C. elegans* Editierungsstellen in einem Gen der Ratte nicht `erkennt`. Auch ein Nicht-Funktionieren von CelADAR1 aufgrund der Expression des Gens in `fremder` Umgebung, der HEK Zelle, ist denkbar. Für zukünftige Ansätze zur Überprüfung der Deaminase Funktion von CelADAR1 sollte auf `Knock Out` oder `Knock Down` Verfahren zurückgegriffen werden.

4. Methoden

4.1 Expressionsanalysen

4.1.1 Hybridisieren von Nitrozellulosefiltern

Vor dem Hybridisieren wurden die NC Filter für 1-2h in Quickhyb inkubiert. Die Hybridisierung der Southernblots erfolgte bei 42 °C für 2-3h in einem Rotationsinkubator. Pro Filter wurden ca. 2×10^5 cpm der radioaktiv markierten Sonde eingesetzt. Das Waschen der Filter erfolgte zunächst bei Raumtemperatur mit 2xSSC, dann stringent bei 55 °C mit 0.1xSSC. Northern Blots wurden nach einer Prähybridisierung für 1h in Quickhyb bei 65 °C für 2-3 h unter Einsatz von 2×10^5 cpm der radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Der stringente Waschgang erfolgte bei 65 °C für 2x15 min.

4.1.2 cDNS Synthese und RT PCR

RNS wird aus den Gehirnen von Mäusen nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) isoliert. Um mögliche Verunreinigungen durch DNA zu entfernen, wird die RNA für 1h bei 37 °C mit 1U/µg RNA RNase freier DNaseI (Boehringer Mannheim) und 2U/µgRNA RNasin in Puffer B (10mM Tris-HCl pH7.5, 10mM MgCl₂, 50mM NaCl, 1mM DTT) inkubiert. Nach Extraktion mit Phenol und Chloroform und Ethanolpräzipitation wird die RNA in Wasser gelöst. Für die Reverse Transkriptase Reaktion werden 1-5µg dieser RNA zusammen mit 200ng Hexamerprimern (dN6, 10ng/ul, Boehringer Mannheim) in einem Volumen von 17µl für 10min bei 72 °C denaturiert und danach auf Eis gestellt. Dann werden 10µl RT-Mix (50mM Tris HCL pH8.5, 75mM KCl, 3mM MgCl₂), 10mM DTT, 20U RNasin (Fermentas) und 500µM je dNTP (Pharmacia) zugegeben. Nach der Entnahme eines Aliquots von 10µl für Kontrollreaktionen (Mock PCR) und Zugabe von 200U reverse Transkriptase (MMLV, BRL) zu dem verbliebenen 20µl, werden beide Aliquots für 60 min bei 37 °C inkubiert. Verbliebene RNS wird anschliessend durch Erhitzen auf 95 °C für 10 min denaturiert. Je 1-3µl aus beiden Aliquots werden für die RT PCR eingesetzt. Die erwartete Grösse der PCR Fragmente und das Fehlen von Produkten in der Mock Kontrolle werden durch Agarose Gelelektrophorese überprüft.

4.2 Zellkultur

4.2.1 Gewinnung und Kultur primärer Maus-Fibroblasten

Um die Expression eines Transgens zu analysieren, ohne die Versuchstiere dafür töten zu müssen (zB bei Founder Tieren), werden primäre Zellkulturen von transgenen Mäusen angelegt. Zur Gewinnung von Mausohr Fibroblasten (MOFs) werden den Versuchstieren im Alter P10-12 mit der Schere Ohrspitzen abgenommen und diese in DMEM Medium mit 10% FCS, 3xPen/Strep aufbewahrt. Nach dem Zerkleinern des Gewebes mit Schere und Pinzette wird dieses in Zellkulturschalen mit 2ml Medium mit 1mg/ml Kollagenase Ia (Sigma) ÜN bei 37°C inkubiert. Mit Hilfe einer Glaspipette, deren Austrittsöffnung durch Schmelze über der Flamme eines Bunsenbrenners verengt wurde, werden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren der Suspension vereinzelt und in 15ml Röhrchen bei 1500rpm für 5 min abzentrifugiert. Nach dem Vereinzeln werden die Fibroblasten auf 3,5cm Kulturschalen in DMEM Medium (10%FCS, 3xPen/Step) ausgesät. In den folgenden Wochen werden die Zellen jeden zweiten Tag mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt. Mit Beginn der zweiten Woche wurde die Konzentration an Pen/Strep im Kulturmedium von 3x auf 1x reduziert. Nach Expansion der Kultur auf ca. 80% Konfluenz werden die MOFs durch Inkubation mit Ca²⁺-Mg-freiem EDTA von ihrer Unterlage abgelöst, abzentrifugiert und nach Resuspension in frischem Medium auf 2-4 neue Kulturschalen verteilt.

4.2.2 Transfektion von Fibroblastenkulturen

Für die Transfektion mit DOTAP (Boehringer Mannheim) wurden Fibroblastenkulturen mit einer Konfluenz von 50-80% verwendet. In einem Transfektionsansatz wurden in getrennten Reaktionsgefäßen 30µl Transfektionsreagenz bzw 5µl zu transfizierende DNA mit HBS (Hepes, 20mmol/l; NaCl, 150mmol/l; pH7.4) zu einem Volumen von jeweils 100µl verdünnt. Nach Vereinigung beider Ansätze und einer Inkubationsdauer von 10min wurde die Transfektions Reagenz/DNA Mischung zu dem in den Kulturschalen vorgelegten Medium (5.8ml) zupipettiert. Die Inkubation erfolgte ÜN bei 37°C und 5% CO₂ und anschliessend für weitere 48h nach Entfernen der Transfektionsmischung durch Austausch des Kulturmediums

4.2.3 Kultur und Transfektion von HEK293 Zellen

HEK293 Zellen (ATTC: CRL 1573) wurden in MEM Medium unter Einsatz von 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum, 2mM L-Glutamin, Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (100mg/ml) auf 94mm-Kulturschalen kultiviert. Die Umgebungstemperatur

betrug 37°C bei 90% Luftfeuchtigkeit und einer CO₂ Konzentration von 5%. Die Transfektion erfolgte nach der CaCl₂-Methode. Pro Kulturschale mit einer Konfluenz von 50-60% wurden 10µg Plasmid DNS eingesetzt. Dazu wurde die Plasmid DNS mit 62.5µl 2M CaCl₂ und Wasser zu einem Endvolumen von 500µl versetzt. Bei beginnender Eintrübung ca. 2min nach Zugabe von 500µl BBS wurde die Lösung auf die Kulturschale aufpipettiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C und 3%CO₂ für 24h, anschliessend bei 37°C und 5% CO₂ für weitere 24 h.

4.2.4 Präparation von RNS aus HEK293 Kulturen

Die Präparation von RNS aus HEK Zellen erfolgte nach dem Tri Reagent (RNA/DNA/Protein Isolation Reagent) Protokoll. Für die Lyse der HEK Zellen wurde pro 9cm Kulturschale 1ml Tri Reagent verwendet.

4.3 Histologie

4.3.1 Präparation von Mausgehirnen

Die Versuchstiere wurden durch CO₂, welches beim Besprühen von Trockeneis mit Wasser freigesetzt wird, in einem abgeschlossenen Behälter erstickt. Nach dem Eröffnen der Schädeldecke wurde das Gehirn entnommen und 1) für spätere in Situ Analysen auf Trockeneis eingefroren. 2) für X-Gal Färbungen in 4% Paraformaldehyd/PBS (137mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.3mM Na₂HP0₄/2H₂O, 1.4mM KH₂PO₄) fixiert, mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend bei 4°C in PBS aufbewahrt.

4.3.2 X-Gal Färbung

Gehirne wurden nach der Entnahme für 2h in 4% Paraformaldehyd fixiert und anschliessend mehrmals mit PBS gewaschen. Nach dem Einbetten in Agarose (2% Seakem LE in Pbs) wurden am Mikrotom (Leica VT 1000S) 100µm dicke Gehirn Schnitte angefertigt. Diese wurden anschliessend mit X-Gal Färbelösung (5mM K₄Fe(CN)₆, 5mM K₃Fe(CN)₆, 2mM MgCl₂, 2mg/ml X-Gal in Dimethylformamid/PBS) bis zum Eintreten der Färbung behandelt. Nach dem zweimaligen Waschen in PBS und anschliessend in 10mM Tris/HCL pH7,5 wurden die Schnitte auf Objektträger übertragen. Nach dem Trocknen wurden sie in Xylol überführt und danach in Eukitt eingebettet.

4.3.3 In-Situ Hybridisierung

Mit dieser Methode wird die Expression von mRNA in Zellgeweben nachgewiesen. Die Gehirne von Versuchstieren wurden freipräpariert und bei -70°C eingefroren. An einem Cryostaten (Bright/Model OTF) wurden davon Gefrierschnitte der Dicke $15\mu\text{m}$ angefertigt. Diese wurden auf Objektträger übertragen, in 4% Paraformaldehyd/PBS für 5min fixiert, in PBS kurz gewaschen und anschliessend in einer Alkoholreihe (70% Ethanol, 95% Ethanol) dehydriert. Für die radioaktive Markierung der Oligonukleotid Sonde werden in einem $20\mu\text{l}$ Reaktionsansatz $0,3\text{pmol}$ Antisense Oligo in 1xReaktionspuffer (Boehringer Mannheim), $2,5\text{mM}$ CoCl_2 , $18,5\mu\text{Ci}$ ^{35}S -ATP, 25U Terminal Transferase (Boehringer Mannheim) für 5-8min bei 37°C inkubiert. Die Beendigung der Reaktion erfolgt durch Zugabe von $50\mu\text{l}$ TE. Nicht eingebaute Nucleotide werden über Zentrifugation durch eine Biospin 6 Säule (Biorad) abgetrennt. Vor der Inkubation werden die Gehirnschnitte 30min bei Raumtemperatur gerocknet. Auf jeden Gehirnschnitt werden $100\mu\text{l}$ Hybridisierungspuffer (50% Formamid, 30mM NaCl , 3mM Natriumcitrat, 10% Dextransulfat, $0,1\text{M}$ DTT) und radioaktiv markiertes Oligo (3×10^7 cpm/pmol) aufgetragen. Um Verdunstung der Hybridisierungspuffers zu verhindern, werden die Objektträger mit Parafilm bedeckt und in einer mit Hybridisierungspuffer dampfgesättigten Kammer bei 42°C ÜN inkubiert. Um überschüssiges und unspezifisch hybridisiertes Oligo zu entfernen, werden die Schnitte mehrfach gewaschen (nacheinander: 5min bei RT mit 1xSSC, 20min bei 60°C mit 1xSSC, 5min bei RT mit 1xSSC, 3min bei RT mit $0,1\text{xSSC}$). Nach der Entwässerung in einer Alkoholreihe (70% Ethanol für 5min, 95% Ethanol für 5min) werden sie bei RT getrocknet. Für die Autoradiographie wurde der Kodak X-omat Film verwendet.

4.4 Elektrophysiologische Messungen

Die elektrophysiologischen Messungen der AMPA Rezeptor Ströme wurden in der Abt. Zellphysiologie am MPI für med. Forschung (Prof. Sakmann) durchgeführt. Es wurden sagittale Schnitte des Hippocampus ($300\mu\text{m}$) präpariert (Edwards et al., 1989) Gehirnschnitte wurden in Extrazellulärlösung (125mM NaCl ; $2,5\text{mM}$ KCl ; 25mM NaHCO_3 ; $1,25\text{mM}$ NaH_2PO_4 ; 2mM CaCl_2 ; 1mM MgCl_2), die mit $95\%\text{O}_2$ und $5\%\text{CO}_2$ angereichert war, aufbewahrt. Die Analyse der AMPA Rezeptor Ströme erfolgte an 'nucleated patches' von akuten Schnittpräparaten. 'nucleated patches' werden durch Anlegen eines negativen Drucks an die Zelle und dem vorsichtigen Herausziehen des Nukleus erzeugt. Dabei schliesst sich die Plasmamembran des Zellkörpers um den angesaugten Kern und erlaubt die Messung der Ströme der AMPA Rezeptor Population in dieser Membran. Zur Aktivierung der AMPA Rezeptoren wird Glutamat (100mM) in einem 100ms Puls aus einer Theta Applikationspipette, die piezoelektrisch verschoben werden kann, auf die Membran gespült. Gleichzeitig werden NMDA Rezeptoren durch

Verabreichen von APV (100 μ M) blockiert. Die AMPA Rezeptor Ströme wurden in Natrium reicher Lösung (135mM NaCl; 5,4mM KCl; 1,8mM CaCl₂; 1mM MgCl₂; 5mM Hepes NaOH; pH7,2) und Ca²⁺reicher Lösung (30mM CaCl₂; 105mM N-methyl-D-glucamine; 5mM Hepes-HCl; pH7,2) gemessen. Die Intrazellulär-lösung enthielt 140mM CsCl, 10mM EGTA, 2mMMgCl₂, 2mM ATP und 10mM CsOH (pH7,3). Das P_{Ca}/P_{Na} Verhältnis wurde aus den in Natriumreicher und Calciumreicher Lösung gemessenen Umkehrpotentialen (V_{revNa} und V_{revCa2+}) nach folgender Gleichung berechnet: $P_{Ca}/P_{Na} = 0,25 a_{Na}/a_{Ca} \{ \exp[(2V_{revCa} - V_{revNa})F/RT] + \exp[(V_{revCa} - V_{revNa})F/RT] \}$ wobei a_{Ca} und a_{Na} für die Aktivität der Na⁺ und Ca²⁺ in der Extrazellulärlösung steht. Über P_{Ca}/P_{Na} wurde P_f für 1,8 mM Ca²⁺ in der Extrazellulärlösung und ein Membranpotential von -60 mV berechnet: $P_f = 1/[1 + (P_{Na}/P_{Ca}) (a_{Na}/a_{Ca}) (1 - \exp(2V_m F/RT))]/4$.

4.5 Tierbeobachtung und Schlüsseltest

Um abnormes Verhalten der Mutanten zu registrieren, wurden Mutanten und Wildtypkontrolltiere in ihren Versuchskäfigen durch eine Infrarot Videokamera überwacht. Die Auswertung erfolgte anhand von Videoband Aufzeichnungen.

Zur Detektion gesteigerter Epilepsieanfälligkeit der Mutanten gegenüber Wildtyp wurde der Schlüsseltest eingesetzt: Aus früheren Experimenten mit den epileptischen Mutanten GluR2^{+/ Δ ECS}, GluR2^{+/ N_{trans}/Neo} , ADAR2^{-/-} war bekannt, daß mit Hilfe eines Schlüsselbundes, der in unmittelbarer Nähe der Versuchstiere (Abstand 20-30 cm) zum Klingeln gebracht wurde, in diesen Mutanten in der 2-3 postnatalen Woche epileptische Anfälle ausgelöst werden konnten. Für GluR2^{+/ Q_{trans}} und C57BL6-Wildtyp wurden Schlüsseltests für eine Dauer von ca. 30 sec durchgeführt.

4.6 Molekularbiologische und zellbiologische Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit angewandten standartisierten Arbeitstechniken wie zb. die Präparation von DNA, RNA und Protein, die Subklonierung von DNA-Fragmenten, PCR Verfahren, Blotting Methoden sind in folgenden Nachschlagewerken beschrieben und nicht in diesem Methodenteil aufgeführt.

Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl; Wiley Interscience, 1989

Molecular cloning: A laboratory Manual, J. Sambrock, E. F. Frisch, T. Maniatis
Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

4.7 Serviceleistungen

4.7.1 Pronucleusinjektion

Pronucleusinjektionen wurden im transgenen Labor des ZMBH durch Frank Zimmermann durchgeführt.

Literatur: Manipulating the mouse embryo, B. Hogan, R. Beddington, F. Costantini, E. Lacy, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994

4.7.2 Haltung transgener Mäuse

Die Versuchstiere wurden entsprechend den Bedingungen des Tierschutzgesetzes in dafür vorgesehenen Einrichtungen gehalten. Im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurden die Versuchstierhaltung (VTH) des ZMBH und das zentrale Tierlabor am MPI. Die Versorgung der Versuchstiere aus dem Projekt 'GluR2^{Qtrans}' mit Doxycyclinhydrochlorid (Sigma) erfolgte in den VTHs über das Trinkwasser zusammen mit 5% Sucrose.

4.7.3 DNS Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmide und DNS Fragmente erfolgte automatisch nach dem Dye Terminator Cycle Sequencing Protokoll und wurde von H. Großkurth in unserem Labor durchgeführt.

4.7.4 Oligonukleotidsynthese

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte auf einem DNS Synthesizer (ABI) und wurde am ZMBH von der Arbeitsgruppe Dr. R. Frank durchgeführt.

5 Material

5.1 Liste der verwendeten Oligonukleotide

tTa1	GTGATTAACAGCGCATTAGAGC
tTA2	AGAAGCTAGGTGTAGAGCAG
tTA3	CGCCGTCTAACTGGAGCTCGTCC
tTA4	GAAGGCTGGCTCTGCACCTTGGTG
tri5	GTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGG
Bfus	GATATAATGGTACCCTTTAACATG
lamlo3'	GCGGTACCTCGTACCACCATTG(TC)TTTTCA
rsb10exb	GGGGATCCAAGTATGGGGCCAGG
rsp10	CCCCTGCTGATGGAGAAGAGC
BgPCR2	GCGGTACCTTGGCGAAATATCGCATC
B52	GCGAATTCACACAAAGTAGTGAATCAACT
Lac5'	TTACGATGCGCCCATCTACAC
Lac3'	TTACCCGTAGGTAGTCACGCA
LacZ21	GGGATTGGTGGCGACGACTC
globin3	CCACACCAGCCACCACCTTCT
hgh rev	TAGAAGGACACCTAGTCAGACAA

In-situ Hybridisierung

tTAis	CATCTCAATGGCTAAGGCGTCGAGCAAAGCCCGCTTATT
-------	---

Amplifikation von Cel GluR Untereinheiten

Ste1	CGCGGTACCGAGAGAGAACGAGCAGTTGAC
Ste2	GCGTCTAGAGAGTGAAGAACCACCAACACG
Ste3	CGCGGTACCGGAGAACTTCTGAGTGGAAAGAGC
Ste4	GCGTCTAGAACGCAGCCGAGTTAGCAGTG
Ste5	GGAGAATTCCAGAGAGGGGATGCAG
Ste6	CGCTCTAGAGTCTGTGCAGCCAAATCATCTGC
Ste7	AGCGAATTCCTCGAACCTTTTCACTGACAG
Ste8	CCTTCTAGAGAACTATTCACGAAGACTCCAG

Klonierung der Cel Deaminase T20H4.4

Ste13	GCGTCTAGAGTGTCCGTCGAAGAAGGTATGGAAG
Ste14	GCACGGTACCCATACCTTTATCAATTTTGAATCG
Ste15	ATGGGTACCGTGCTCGGTGGTGTCTCTGAG
Ste16	GCGAATTCCTTAATTTATAGTAAACATTTGAAATTCTCGT
Ste17	ATTCATGGATCCGTTCCGGTTGG

Ste20 GCGGATCCGCGTGAGGACAACACAGAAGCAG
Ste21 CGGAATTCCTACCACCATCAGACGTTCCCTG
Ste22 CGGGTACCGCTCCTCGCTTCAATCCTACTTCG
Ste23 CGTCTAGAGCCAAGGTGGCGGATCGACAGC

Expression von GluR2 Minigenen in HEK293 Zellen

MH50 GACCCTGTAGGAAAAATCTAACC
Bint ATTCATGGATCCGTTTCGGTTGG w
Rsp23 GGCGGAATTCCCCGTGCCAAGAGTG

5.2 Computerprogramme

Adobe Photoshop 5.0.2

Canvas 7

DNS Strider 1.2 Microsoft Office 6.0

Ofoto 2.0

PRISM Autoassembler

Prism 377 Collection

Prism Sequencing Analysis

DNASTAR Megalign

DNASTAR Mapdraw

DNASTAR Genequest

6. Anhang

6.1 Abkürzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
AMPA	AMPA Rezeptor
apoB	Apolipoprotein B
APOBEC-1	ApoB-mRNA Editierungs Cytidin Deaminase 1
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA Sequenz
C	Cytidin
CA(1-4)	Cornus Ammonis = Ammonshorn
CaMKII	Kalzium/Kalmodulin abhängige Proteinkinase II
Cel	Nematode Caenorhabditis elegans
CMV	Cytomegalovirus
Dox	Doxycyclin
DG	Gyrus dentatus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRADA	Doppelstrang RNA-Adenosindeaminase
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat
EPSP	erregendes postsynaptisches Potential
G	(Nukleotid) Guanosin
G	(Aminosäure) Glyzin
GABA	γ -Amino Buttersäure
GluR	Glutamatrezeptor
h	Stunden
HEK293	Humane, embryonale Nierenzelle
I	Inosin
kD	Kilodalton
m	Maus (Mus musculus)
M1-4	membranständige Domänen integraler Membranproteine
mRNA	Boten RNA
min	Minuten
NC	Nitrocellulose
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	NMDA-Rezeptor
PBS	Phosphatsalzpuffer

PCR	Polymerasekettenreaktion
Q	Glutamin
r	Ratte (<i>Rattus norvegicus</i>)
R	Arginin
RT	(PCR) Reverse Transkription
RT	Raumtemperatur
RED1	ds-RNA spezifische Editase 1 (=ADAR2)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
tTA	Tetrazyclin-abhängiger Transaktivator
T	Thymin
TE	Tris/EDTA-Puffer (10mM Tris, 0,1mM EDTA)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-b-D-Galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

6.2 Abbildungs-Verzeichnis

Abbildung 1: Ionotrope Glutamat Rezeptoren der Säugetiere

Abbildung 2: A) Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pUB2a mit tTA-abhängig und bidirektional exprimierbaren Reportergenen. B) Schematische Darstellung des Konstrukts pGluR2`Qtrans`.

Abbildung 3: A) Schematische Darstellung des Targeting Konstrukts NR1/tTA. B) Schematische Darstellung des Targeting Konstrukts GluR2/tTA.

Abbildung 4: X-Gal Färbung an Gehirnschnitten von GluR2^{+/Qtrans} im Alter P45.

Abbildung 5: Relative Ca²⁺ Permeabilität der AMPA Rezeptoren in CA1 Pyramidenzellen von GluR2^{+/Qtrans}.

Abbildung 6: Southern Blot für GluR2^{+/Qtrans} mit EcoRI verdauter DNA aus Mausleber.

Abbildung 7: Elektropherogramme für die Sequenzanalyse revers transkribierter, aus dem Vorderhirn von GluR2^{+/Qtrans} und C57BL6 Wildtyp stammender RNA.

Abbildung 8: Schlüsseltestexperiment.

Abbildung 9: Relative Häufigkeit Schlüsseltest-induzierter epileptischer Anfälle bei GluR2^{+/Qtrans} und C57BL6 Wildtyp im Alter P19-27.

Abbildung 10: Liste der CelGluR Untereinheiten mit zugehörigen Cosmiden folgend der Nomenklatur der CELGenbank des Sanger Centre und der zugehörigen ESTS.

Abbildung 11: Genverwandtschaft der Cel- und rGluRs anhand der Sequenzähnlichkeit.

Abbildung 12: Genverwandtschaft der Cel GluRs.

Abbildung 13: Sequenzvergleich der Cel GluRs und einer Auswahl an rGluRs für einen Sequenzabschnitt, der die Membranregionen M1-4 und die Glutamat Bindungsstelle (S1, -2) beinhaltet.

Abbildung 14: Vergleich der Nucleotid und Aminosäuresequenz im Bereich der Q/R Position zwischen rGluR2 und CelGluRs.

Abbildung 15: Untersuchung der Q/R homologen Positionen der CelGluRs C06E1.4, B0820.12-K04G7, und C06A8.9-10 auf in vivo Editierung.

Abbildung 16: CelADARs: Genstruktur von T20H4.4=CelADAR1 (A) und H15N1.1=CelADAR2 (B). C) phylogenetischer Baum der Cel- und rADARs.

Abbildung 17: Sequenzvergleich zwischen CelADAR1 und der Sequenz-ähnlichsten Adenosindeaminase der Ratte, rADAR1 (=DRADA).

Abbildung 18: Sequenzvergleich zwischen CelADAR2 und rADAR2.

Abbildung 19: Koexpression von CelADAR1 (T20H4.4) mit rGluR2 Minigenen in HEK293 Zellen zur Überprüfung der Deaminaseaktivität von T20H4.4 an Q/R und R/G Editierungsstellen in rGluR2 in vitro.

7. Literatur

Anderson, A. E., Hrachovy, R. A., Swann, J. W. (1997). Increased susceptibility to tetanus toxin-induced seizures in immature rats. *Epilepsy Res.* 26, 433-442.

Bargmann, C. (1998). Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* 282, 2028-2033.

Baron, U., Freundlieb, S., Gossen, M., and Bujard, H. (1995). Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirektional promoter. *Nucleic Acids Res.* 23, 3605-3606.

Bass, B. L., and Weintraub, H. (1987) A developmentally regulated activity that unwinds RNA duplexes. *Cell* 48, 1089-1098.

Bass, B. L., and Weintraub, H. (1988). An unwinding activity that covalently modifies its double stranded RNA substrate. *Cell* 55, 1089-1098.

Bass, B. L. (1993). RNA editing: new uses for old players in the RNA world. In: *The RNA World*. Gestelund, R., and Atkins, J., eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 383-418.

Bass, B. L. (1995). An I for editing. *Curr. Biol.* 5, 598-600.

Bass, B. L. (1997). RNA editing and hypermutation by adenosine deamination. *Trends in Biochemical Sciences* 22, 157-162.

Ben-Ari, Y., Khazipov, R., Leinekugel, X., Caillard, O., and Gaiarsa, J-L. (1997). GABA_A, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'menage a trois'. *Trends Neurosci* 20, 523-529.

Benne, R., Van den Burg, J. P., Brakenhoff, P., Sloof, J. H., Van Bloom, M., and Tromp, M. C. (1986). Major transcript of the frameshifted *coxII* gene for trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* 46, 819-862.

Bernard, A., Khrestchatisky, M. (1994) Assessing the extent of RNA editing in the TMII regions of GluR5 and GluR6 kainate receptors during rat brain development. *J. Neurochem.* 62, 2057-2060.

Brusa, R., Zimmermann, F., Koh D. -S., Feldmeyer, D., Gass, P., Seeburg, P. H., Sprengel, R. (1995) Early onset epilepsy and postnatal lethality associated with an editing deficient GluR-B allele in mice. *Science* 270, 1677-1680.

Burgard, E. C., Hablitz, J. J. (1993). Developmental changes in NMDA and non-NMDA receptor-mediated synaptic potentials in rat neocortex. *J. Neurophysiol.* 69, 230-240.

Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P. H., Sakman, B. (1992). Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron* 8, 189-198.

Chen, S. -H., Li, X., Liao, W. S. L., Wu, J. H., and Chan, L. (1990). RNA editing of apolipoprotein B mRNA. *J. Biol. Chem.* 265, 6811-6816.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S.F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51, 7-61.

Feldmeyer, D., Kask, K., Brusa, R., Kornau, H. C., Kolhekar, R., Rozov, A., Burnashev, N., Jensen, V., Hvalby, O., Sprengel, R., and Seeburg, P. H. (1999). Neurological dysfunctions in mice expressing different levels of the Q/R site-unedited AMPAR subunit GluR-B. *Nat. Neurosci.* 2, 57-64.

Friedman, L. K., and Koudinov, A. R. (1999). Unilateral GluR-2(B) hippocampal knockdown: A novel partial seizure model in the developing rat. *Journal of Neuroscience* 19 (21) 9412-9425.

Friedman, L. K., Veliskova, J. (1998). GluR2 hippocampal knockdown reveals developmental regulation of epileptogenicity and neurodegeneration. *Mol. Brain Res.* 61, 224-231.

Geiger, J. R. P., Melcher, T., Koh, D. -S., Sakmann, B., Seeburg, P. H., Jonas, P., and Monyer, H. (1995). Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15, 193-204.

Gomez-DiCesare, C. M., Smith, K. L., Rice, F. (1997). Axonal remodeling during postnatal maturation of CA3 hippocampal pyramidal neurons. *J. Comp. Neurol.* 28, 165-180.

Gossen, M., Bonin, A. L., Freundlieb, S., and Bujard, H. (1994). Inducible gene expression systems for higher eucaryotic cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5, 516-520.

Haas, K. Z., Sperber, E. F., Moshe, S. L. (1990). Kindling in developing animals: expression of severe seizures and enhanced development of bilateral foci, *Develop. Brain Res.* 56, 275-280.

Herb, A., Higuchi, M., Sprengel, R., and Seeburg, P. H. (1996). Q/R site editing in kainate receptor GluR5 and GluR6 pre-mRNAs requires distant intronic sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1875-1880.

Higuchi, M., Single, F.N., Köhler, M., Sommer, B., Sprengel, R., and Seeburg, P. H. (1993). RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. *Cell* 75, 1361-1370.

Higuchi, M., Maas, S., Single, F. N., Hartner, J., Rozov, A., Burnashev, N., Feldmeyer, D., Sprengel, R., and Seeburg, P. H. (2000). Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. *Nature* 406, 78-81.

Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., Lacy, E. (1994). Manipulating the mouse embryo. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hollmann, M., and Heinemann, S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 31-108.

Jia, Z., Nadia, A., Miu, P., Xiong, Z., Henderson, J., Gerlai, R., Taverna, F. A., Velumian, A., Macdonald, J., Carlen, P., Abrominov-Newerly, Roder, J. (1996). Enhanced LTP in mice deficient in the AMPA receptor GluR2. *Neuron* 17, 945-956.

Köhler, M., Burnashev, N., Sakmann, B., and Seeburg, P. H. (1993). Determinants of Ca²⁺ permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: diversity for RNA editing. *Neuron* 10, 491-500.

Köhler, M., Kornau, H. C., and Seeburg, P. H. (1994). The organisation of the gene for the functionally dominant α -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole-4-propionic acid receptor subunit GluR-B. *The Journal of Biological Chemistry* 269, pp. 17367-17370.

Kuner, T., Wollmuth, L. P., Karlin, A., Seeburg, P. H., and Sakmann, B. (1996). Structure of the NMDA receptor channel M2 segment inferred from the accessibility of substituted cysteines. *Neuron* 17, 343-352.

Lee, W. L., Hablitz, J. J. (1991). Excitatory synaptic involvement in epileptiform bursting in the immature rat neocortex. *J. Neurophysiol.* 66, 1849-1901.

Logan, J., and Shenk, T. (1984). Adenovirus tripartite leader sequence enhances translation of mRNAs late after infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3655-3659.

Lomeli, H., Mosbacher, J., Melcher, T., Höger, T., Geiger, J. R. P., Kuner, T., Monyer, H., Higuchi, M., Bach, A., and Seeburg, P. H. (1994). Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing. *Science* 266, 1709-1713.

Maas, S., Melcher, T., Herb, A., Seeburg, P. H., Keller, W., Krause, S., Higuchi, M., and O'Connell, M. A. (1996). Structural requirements for RNA editing in glutamate receptor

pre-mRNAs by double-stranded RNA adenosine deaminase. *J. Biol. Chem.*, 271, 12221-12226.

Mares, P. (1973). Ontogenetic development of bioelectrical activity of the epileptogenic focus in rat neocortex. *Neuropadiatrie* 4, 434-445.

Mayford, M., Bach, M. E., Huang, Y. Y., Wang, L., Hawkins, R. D., and Kandel, E. R. (1996). Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* 274, 1678-1683.

Melcher, T., Maas, S., Higuchi, M., Keller, W., and Seeburg, P. H. (1995). Editing of α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR-B pre-mRNA in vitro reveals site-selective adenosine to inosine conversion. *J. Biol. Chem.* 270, 8566-8570.

Melcher, T., Maas, S., Herb, A., Sprengel, R., Seeburg, P. H., and Higuchi, M. (1996). A mammalian RNA editing enzyme. *Nature* 379, 460-464.

Miles, R., Wong, R. K. S. (1983). Single neurons can initiate synchronized population discharge in the hippocampus. *Nature* 306, 371-373.

Mosbacher, J., Schoepfer, R., Monyer, H., Burnashev, N., Seeburg, P. H., Ruppersberg, J. P. (1994). A molecular determinant for submillisecond desensitisation in glutamate receptors. *Science* 266, 1059-1062.

Moshe, S. L. (1981). The effects of age on the kindling phenomenon. *Dev. Psychobiol.* 14, 75-81.

Morse, P., and Bass, B. (1999). Long RNA hairpins that contain inosine are present in *Caenorhabditis elegans* poly(A)⁺ RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6048-6053.

Noebels, J. L. (1996). Targeting epilepsy genes, *Neuron* 16, 241-244.

Noebels, J. L. (1999). Single-gene models of epilepsy, in Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies, Third edition: Advances in Neurology, pp. 227-238.

O'Connell, M. A., Krause, S., Higuchi, M., Hsuan, J. J., Totty, N. F., Jenny, A., and Keller, W. (1995). Cloning of cDNAs encoding mammalian double-stranded RNA-specific adenosine deaminase. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1389-1397.

Oguro, K., Oguro, N., Kojima, T., Grooms, S. Y., Calderone, A., Zheng, X., Bennett, M. V. L., Zukin, R. S. (1999). Knockdown of AMPA receptor GluR2 expression causes delayed neurodegeneration and increases damage by sublethal ischemia in hippocampal CA1 and CA3 neurons. *Journal of Neuroscience* 19 (21), 9218-9227.

Palladino, M. J., Keegan, L. P., O'Connell, M. A., and Reenan, R. A. (2000). A-to-I pre-mRNA editing in *Drosophila* is primarily involved in adult nervous system funktion and integrity. *Cell* 102, 437-449.

Patton, D. E., Silva, T., and Bezanilla, F. (1997). RNA editing generates a diverse array of transcripts encoding squid Kv2 K⁺ channels with altered functional properties. *Neuron* 19, 711-722.

Pierson, M. G., Swann, J. W. (1991). Ontogenetic features of audigenic seizure susceptibility induced in immature rats by noise. *Epilepsia* 32, 1-9.

Powell, L. M., Wallis, S. C., Pease, R. J., Edwards, Y. H., Knott, T. J., and Scott, J. (1987). A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein B-48 in intestine. *Cell* 50, 831-840.

Scott, J. (1995). A place in the world for RNA editing. *Cell* 81, 833-836.

Seeburg, P. H. (1993). The TiPS/TINS Lecture – The Molecular Biology of Mammalian Glutamate Receptor Channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 297-303.

Seeburg, P., Higuchi, M., Sprengel, R. (1998). RNA editing of brain glutamate receptor channels: mechanism and physiology. *Brain Research Reviews* 26, 217-229.

Smith, K. L., Szarowski, D. H. , Turner, J. N. (1995). Diverse populations of neurons mediated by local circuit excitation in developing hippocampus. *J. Neurophysiol.* 74, 650-672.

Sommer, B., Köhler, M., Sprengel, R., and Seeburg, P. H. (1991). RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67, 11-14.

Sperber, E. F., Veliskova, J., Germano, I. M., Friedman, L. K., and Moshe, S. L. (1999). Age dependent vulnerability to seizures, in Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies, Third Edition: Advances in Neurology. Vol. 79, 161-169.

Sprengel R., and Seeburg, P. H. (1994). Ionotropic glutamate receptors. In: Peroutka, S. J. ed., Handbook of Receptors and Ion Channels. Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo: CRC Press, 213-264.

Swann, J. W., Pierson, M. G., Smith, K. L., and Lee, C. L. (1999). Developmental neuroplasticity: roles in early life seizures and chronic epilepsy. *Jaspers's Basic Mechanisms of the Epilepsies, Third Edition: Advances in Neurology, Vol. 79* , pp 203-215.

Swanson, G. T., Kamboj, S. K., Cull-Candy, S. G. (1997). Single-channel properties of recombinant AMPA receptors depend on RNA editing, splice variation, and subunit composition, *Journal of Neuroscience* 17, 58-69.

Velisek, L., Mares, P. (1991). Increased epileptogenesis in the immature hippocampus, *Experimental Brain Research* 20, 183-185.

Wisden, W., Morris B. J. (1993). *In Situ Hybridisation: Protocols for the brain*, Harcourt Brace & Company.