

Vorkommen und Funktion ionotroper Glutamat- Rezeptoren außerhalb des neuronalen Systems

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Dirk Schwartz
aus Hamburg

Hamburg 2001

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans Marquardt

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Ostertag

Rigorosum: Letzte Prüfung am 15.08.2001

Man muß viel studiert haben, um wenig zu wissen.

(Charles Secondat de Montesquieu, 1689-1755 aus *Vermischte Gedanken*)

„Na schön“, sagte Deep Thought: „Die Antwort auf die Große Frage (...) nach dem Leben, dem Universum und allem (...) lautet...

Zweiundvierzig.“

(Douglas Adams, 1952-2001 aus *Per Anhalter durch die Galaxis*)

1. Inhaltsverzeichnis

1. INHALTSVERZEICHNIS	1
2. ZUSAMMENFASSUNG (SUMMARY)	4
2.1 SUMMARY	6
3. EINLEITUNG	8
3.1 STAMMZELLEN	8
3.1.1 Faktorreiche Mikroumgebung der Stammzellen	11
3.2 DIE SIGNALTRANSDUKTION	12
3.3 VORKOMMEN IONOTROPER GLUTAMAT-REZEPTOREN	15
3.4 STRUKTUR IONOTROPER GLUTAMAT-REZEPTOREN	18
3.4.1 RNA-Prozessiervorgänge	19
3.4.1.1 RNA-Editing	20
3.4.1.2 Alternatives RNA-Spleißen	22
3.4.2 Protein-Prozessiervorgänge	23
3.5 AUFGABENSTELLUNG	25
4. MATERIAL UND METHODEN	27
4.1 MATERIAL	27
4.1.1 Entsorgung und Sicherheit der verwendeten Materialien	28
4.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	28
4.2.1 Kulturbedingungen kompetenter Bakterien	28
4.2.2 Plasmide	28
4.2.3 Oligonukleotide	29
4.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	29
4.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	30
4.2.6 Präparation zellulärer Gesamt-RNA	30
4.2.7 Hybridisierung der Chromosom 1 spezifischen Cosmid Bibliothek	31
4.2.8 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	32
4.2.9 Reverse Transcriptase (RT-) Reaktion	32
4.2.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction)	33
4.2.11 3'-RACE PCR-Primer	35
4.2.12 Klonierung offene Leseraster	35
4.2.13 DNA Sequenzierung	36

4.2.14 T7 RNA -Synthese-----	37
4.3 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN-----	38
4.3.1 Hämatopoetische Zellen-----	38
4.3.2 Weitere Zellen -----	40
4.3.3 Allgemeine Zellkulturbedingungen -----	40
4.4 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE METHODEN -----	41
4.4.1 Präparation von Oozyten aus <i>Xenopus laevis</i> -----	41
4.4.2 Injektion von cRNA in <i>Xenopus</i> Oozyten -----	41
4.4.3 2-Elektroden Spannungsklemme (voltage clamp) -----	41
5. ERGEBNISSE-----	42
5.1 EXPRESSION IONOTROPER GLUTAMAT REZEPTOREN -----	42
5.1.1 Das TF-1 Modell -----	44
5.1.2 Weitere hämatopoetische und neuropoetische Zellen-----	47
5.2 KLONIERUNG OFFENER LESERASTER -----	49
5.2.1 GluR5-Klonierung -----	50
5.2.2 Ka2-Klonierung -----	51
5.2.3 GluR7-Klonierung -----	52
5.3 GENOMISCHE COSMID-BIBLIOTHEK -----	52
5.4 RNA-PROZESSIERVORGÄNGE -----	58
5.4.1 Alternatives RNA-Spleißen-----	58
5.4.2 RNA-Editing -----	62
5.5 PROTEIN-PROZESSIERVORGÄNGE -----	63
5.5.1 Vergleich des C-Terminus der humanen GluR5 Varianten -----	64
5.5.2 Vergleich des C-Terminus der humanen GluR7 Varianten -----	66
5.6 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG AN FROSCHOOZYTEN -----	67
6. DISKUSSION -----	70
6.1 EXPRESSION IONOTROPER GLUTAMAT-REZEPTOREN -----	70
6.2 PROZESSIERVORGÄNGE INNERHALB DER KAINAT-REZEPTOREN-----	75
6.3 GLUR7 ASSOZIIERTE ERKRANKUNGEN-----	77
7. AUSBLICK -----	80
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS -----	81
9. LITERATURVERZEICHNIS-----	83

10. ANHANG	93
10.1 EMBL/GENEBANK AcNo. AJ299451	93
10.2 EMBL/GENEBANK AcNo. AJ308525	95
10.3 EMBL/GENEBANK AcNo. AJ308526	97
DANKSAGUNG	98
CURRICULUM VITAE	99
ERKLÄRUNG	101

2. Zusammenfassung (Summary)

Im Rahmen eines Experiments, das darauf abzielte Gene zu identifizieren, die die hämatopoetische Proliferation und Differenzierung steuern, wurde festgestellt, dass ein eigentlich als gehirnspezifisch eingestuftes Gen auch in hämatopoetischen Zellen erhöht exprimiert wird. Es handelt sich dabei um den Glutamat-Rezeptor 5 (GluR5), der zur relativ großen Genfamilie der ionotropen Glutamat-Rezeptoren (iGluRs) gehört.

Die iGluRs werden in drei Unterfamilien eingeteilt. Entsprechend ihrer exogenen Agonisten werden sie AMPA-, Kainat- und NMDA-Rezeptoren genannt. GluR5 gehört zur Unterfamilie der Kainat-Rezeptoren, deren physiologische Funktion noch weitgehend unklar ist. Ionotrope Glutamat-Rezeptoren spielen in der Gehirnentwicklung und bei der Synaptogenese eine Rolle und werden deshalb in Zusammenhang mit einigen neurodegenerativen Erkrankungen gebracht. Außerdem scheinen sie eine wichtige pathologische Bedeutung bei ischämischen Prozessen und bei der Multiplen Sklerose zu haben.

Der ionotrope Glutamat-Rezeptor ist ein Kationenkanal, der *in vivo* aus vier oder fünf Untereinheiten aufgebaut ist und nach Ligandenbindung vor allem für Ca^{2+} -Ionen passierbar wird. Voraussetzung für die Bildung eines funktionellen Ionenkanals ist, dass er aus mindestens zwei verschiedenen Untereinheiten einer iGluR-Unterfamilie besteht.

Ziel der Arbeit war es zu zeigen, dass auch in elektrisch nicht erregbaren hämatopoetischen Zellen ionotrope Glutamat-Rezeptoren mit spezifischer biologischer Funktion gebildet werden können. Des Weiteren sollte auf RNA-Ebene geklärt werden, welche iGluR-Varianten in hämatopoetischen Zellen am funktionellen Rezeptorkomplex beteiligt sind, denn für iGluRs sind vor allem zwei posttranskriptionelle Modifikationen beschrieben worden: alternatives RNA-Spleißen und RNA-Editing.

Mit Hilfe eines auf der RT-PCR basierenden Expressionsassays gelang der Nachweis, dass auf RNA-Ebene die Untereinheiten der AMPA- und Kainat-Rezeptoren sowohl in humanen primären Blutzellen (CD34-positive und CD34-negative mononukleäre Blutzellen), als auch in humanen etablierten hämatopoetischen Zelllinien mit erythroiden (K-562, TF-1 und verschiedene TF-1 Zellkultur-Modellsysteme) sowie myeloiden (U-937, HL-60) Hintergrund exprimiert werden. Jede Zelle zeigte da-

bei ein spezifisches AMPA/Kainat-Rezeptor Expressionsmuster. Im TF-1 Modellsystem konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen Zellkulturbedingungen bzw. Zellmutationen und dem jeweiligen AMPA/Kainat-Rezeptor Expressionsmuster der Zelle besteht.

Eine für GluR5 und GluR6 wichtige posttranskriptionelle Modifikation ist die Adenosin/Inosin-Konversion durch RNA-Editing innerhalb der Transmembrandomäne II. Im Unterschied zum Mausgehirn wird diese für die Ionenpermeabilität verantwortliche Domäne in keiner untersuchten humanen hämatopoetischen Zelle (K-562, Stroma abhängig wachsende TF-1 Zelle und TF-1 Mutante 29A) editiert. Die selbe Beobachtung konnte für die murine Stroma Zelllinie MS-5 gemacht werden.

Fast jede iGluR-Untereinheit kann in verschiedenen Spleißformen exprimiert werden. Aus einer hämatopoetischen Zelllinie TF-1 Mutante 29A gelang die Klonierung zweier offener Leseraster, die GluR5 Variante GluR5-2b und einer noch unveröffentlichten GluR7 Variante, die in Anlehnung an zwei bekannte Varianten GluR7c genannt wurde. Die Analyse eines genomischen Cosmid Klons, der nach Durchmusterung einer humanen Chromosom 1 angereicherten Cosmid-Bibliothek isoliert werden konnte, ergab, dass die Spleißvariante GluR7c durch alternatives RNA Spleißen generiert wird. Beide humanen GluR7-Varianten konnten aus der neuronalen Zelllinie NT-2 kloniert werden. GluR7c wird außerdem in der hämatopoetischen Zelllinie U-937 exprimiert. Eine *Prosite*-Analyse der in der Wachstumsfaktor unabhängigen Zelllinie TF-1 Mutante 29A verstärkt exprimierten Isoformen GluR5-2b und GluR7c ergab, dass die cytosolischen C-Termini beider Varianten im Gegensatz zu den bekannten humanen Varianten statt Caseinkinase II (CKII)-Proteinkinase C (PKC)-Erkennungsmotive enthalten. Dadurch wird ein heteromerer Kainat-Rezeptorkomplex, der die Varianten GluR5-2b und GluR7c enthält, verstärkt mit dem PKC-Signalprozess interagieren. Mit Hilfe der Zwei-Elektroden Spannungsklemme sollte für die neue Variante GluR7c elektrophysiologische Daten gewonnen werden. Leider konnten in Froschoozyten keine Ionenströme reproduzierbar detektiert werden.

Die gewonnenen Daten auf zellbiologischer bzw. auf molekularbiologischer Ebene könnten dazu beitragen, Signaltransduktionsvorgänge in erregbaren und nicht erregbaren Zellen besser zu verstehen und insbesondere bei der Entwicklung neuer pharmakologischer Wirkstoffe von Nutzen sein.

2.1 Summary

In the course of an experiment designed to identify novel genes, that control hematopoietic proliferation and differentiation, we found that a gene, previously thought to be brain specific, was also expressed in hematopoietic cells. It encodes the glutamate receptor 5 (GluR5), which belongs to the relatively large gene family of ionotropic glutamate receptors (iGluR).

The iGluRs are divided into three subfamilies. Based on their exogenous agonists, they are called AMPA, Kainate and NMDA receptors. GluR5 belongs to the Kainate subfamily, whose physiological function is to a large extent still unknown. Ionotropic glutamate receptors play an important role during brain development and synaptogenesis and, for that reason, may be involved in the context of some neurodegenerative diseases. Furthermore they seem to have an important pathological significance in ischaemic processes, such as strokes and heart attacks as well as in multiple sclerosis.

The ionotropic glutamate receptor is a cation channel, consisting of four or five subunits *in vivo*, and which is made permeable primarily for Ca^{2+} ions after ligand binding. The condition for the formation of a functional ion channel is the interaction of at least two different subunits from one subfamily.

The aim of the work was to show that electrical non-excitabile hematopoietic cells could also express ionotropic glutamate receptors with a distinct biological function. Furthermore the investigations should clarify at the RNA level, which receptor variants participate in the formation of the receptor complex in hematopoietic cells. Two posttranscriptional modifications have been described for iGluRs: alternative RNA splicing and RNA editing.

By means of an RT-PCR based expression assay we found expression of AMPA/Kainate transcripts in human primary blood cells (CD34 positive and CD34 negative mononuclear blood cells) and in human established hematopoietic cell lines with erythroid (K-562, TF-1 and several TF-1 cell culture model systems) and myeloid (U-937, HL-60) backgrounds, respectively. Hence each cell displayed an specific AMPA/Kainate receptor expression patterns. Within the TF-1 model, it could

be shown that both cell culture conditions and cell mutations are coupled with distinct AMPA/Kainate receptor expression patterns.

An important posttranscriptional modification for the Kainate receptors GluR5 and GluR6 is the adenosine/inosine conversion by RNA editing within the transmembrane domain II. In contrast to mouse brain, this domain, which is responsible for ion permeability, was not edited in the examined human hematopoietic cells (K-562, stroma dependent TF-1 cell and TF-1 mutant 29A). The same observation could be made for the murine stroma cell line MS-5.

Almost all iGluR subunits are expressed in different splice isoforms. Two open reading frames were cloned from the growth-factor independent cell line TF-1 mutant 29A, the GluR5 variant GluR5-2b and an unpublished GluR7 variant, which was named GluR7c, in accord with other variants. Analysis of a genomic cosmid clone obtained after screening of a human chromosome 1-enriched library, showed, that the splice variant GluR7c is generated by alternative RNA splicing. Both human GluR7 variants could be cloned from the neuronal cell line NT-2. GluR7c is also expressed in the hematopoietic cell line U-937. A *Prosite* analysis of the isoforms GluR5-2b and GluR7c, expressed in TF-1 mutant 29A, predicted protein kinase C (PKC) recognition motives in the cytosolic carboxy-terminal ends, instead of the casein kinase II (CKII) binding motif found in other known variants. Hence a heteromeric Kainate receptor, which contains the variants GluR5-2b and GluR7c, should couple signaling to the PKC pathway. To determine electrophysiological data for the new variant GluR7c, two-electrode voltage clamp method was used. Unfortunately, no reproducible ion current could be detected in frog oocytes.

These findings presented here should contribute to a better understanding of the signal transduction events in excitable and non-excitable cells and may be helpful for the development of new pharmaceutically active substances.

3. Einleitung

3.1 Stammzellen

Säugetieren haben im Gegensatz zu einigen Amphibien die Fähigkeit, auch im erwachsenen Stadium ganze Glieder bei Verlust nachwachsen zu lassen, im Laufe der Evolution verloren. Trotzdem können sich einige Organe im Säugetier auch bei Verletzung zeitlebens regenerieren. Dieser Prozess, der Homöostase genannt wird, beruht darauf, dass Zellen, die auf natürliche Weise bzw. durch Verletzung sterben, wiederaufgefüllt werden. Verantwortlich hierfür sind sogenannte Stammzellen (SC), die je nach Entwicklungsstadium totipotent (frühe Embryonenzelle; embryonale/totipotente Stammzelle ES/TSC) oder pluripotent sind. Eine Vorläufer- oder Progenitorzelle ist eine frühe Gewebszelle, die bereits auf eine Differenzierungslinie festgelegt ist, sich aber noch teilen kann. Diese Zellen müssen den strengen Kriterien einer Stammzelle entsprechen und die Fähigkeit zur

- a) Selbsterneuerung, d.h. Zellteilung, um weitere identische Stammzellen zu erhalten,
- b) Differenzierung, aus einer SC entwickeln sich genau determinierte, gewebespezifische Zellen und
- c) Migration, d.h. Einwanderung in z.B. verletzte Organstrukturen, besitzen (I.L. Weissman 2000a).

Das hämatopoetische System ist neben weiteren Organen wie Niere, Leber, Haut, Knochen oder Darmschleimhaut ein Beispiel dieses dynamischen Prozesses (D. Herzlinger 1994, S.P. Bruder, D.J. Fink, *et al.* 1994, S.H. Sigal, S. Brill, *et al.* 1992). Auch ohne Verletzung bilden zur Regeneration fähige Organstrukturen immer neue Zellen, die sich kurzfristig teilen, spontan differenzieren oder sterben können. In einer sich auffächernden Differenzierungskaskade gehen aus einer blutbildenden Stammzelle des Knochenmarks (HSC) beispielsweise Thrombozyten, Erythrozyten, Monozyten, Granulozyten und die verschiedenen B- und T-Lymphozyten hervor wie dies auf Seite 10 in Abbildung 1 (Abb.1) angedeutet ist.

Im Gegensatz dazu galt für das erwachsene Gehirn in höheren Lebewesen stets: *no new neurons*. Dieses seit den frühen zwanziger Jahren geltende Dogma musste je-

doch in jüngerer Zeit zumindest teilweise revidiert werden, da gezeigt werden konnte, dass auch das menschliche Gehirn im Erwachsenenalter zumindest in einer bestimmten Region im Hippocampus, der subventrikulären Zone noch regelmäßig neue Nervenzellen erzeugt werden (P.S. Eriksson, E. Perfilieva, *et al.* 1998). Diese zum Großhirn gehörende Region an der Innenseite beider Schläfenlappen spielt eine wesentliche Rolle bei der Gedächtnisbildung und beim Lernen, ohne der eigentliche Speicher zu sein. Auch im Primaten-Gehirn konnte daraufhin die Neubildung von Neuronen beobachtet werden (E. Gould, A.J. Reeves, *et al.* 1999). Somit ist die Annahme, dass es im menschlichen Gehirn keine Stammzellen mehr gäbe und Schädigungen lediglich durch Knüpfung neuer Verbindungen bestehender Neurone kompensiert werden könnten, heute nicht mehr haltbar (C.B. Johansson, S. Momma, *et al.* 1999, B. Scheffler, M. Horn, *et al.* 1999, F. Doetsch, I. Caille, *et al.* 1999, S.A. Azizi, D. Stokes, *et al.* 1998, G. Kempermann & F.H. Gage 1999).

Aus einer neuronalen Stammzelle (NSC) entwickelt sich neben den Nervenzellen (Neuronen) auch die als Glia (griech.: Klebstoff) bezeichneten Stützzellen des Gehirns. Man unterscheidet folgende Formen von Glia: Astrozyten, die an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind. Oligodendrozyten, die für die Bildung von Markscheiden um Nervenzellfortsätze verantwortlich sind sowie Ependymzellen, welche die Gehirnkammern auskleiden. Die ebenfalls im Gehirn vorhandenen Mikrogliazellen entstammen hämatopoetischen SC und nehmen Aufgaben bei der Immunabwehr im Nervensystem wahr.

Obwohl die Spezifität einer SC durch die Keimschicht (meso-, ento- oder ektoderm), zu der die Zelle gehört, kontrolliert wird, weiß man heute, dass neuronale SC nicht darauf beschränkt sind in Neurone oder Glia zu differenzieren. Neuronale SC (ektoderm) des Menschen und der Maus können *in vivo* und *in vitro* in Skelettmuskeln (mesoderm) differenzieren. Voraussetzung ist entweder Kokultur der NSC mit Myoblasten oder Injektion der NSC direkt in erwachsenes Muskelgewebe (R. Galli, U. Borello, *et al.* 2000). Mausexperimente zeigen weiterhin, dass Transplantate von NSC in zuvor letal bestrahlten Mäusen ein funktionierendes, hämatopoetisches System (mesoderm) neu zu generieren vermögen (C.R. Björnson, R.L. Rietze, *et al.* 1999). Bei einem ähnlichen Experiment konnten nach Transplantation von NSC differenzierte Abkömmlinge dieser Zellen in verschiedenen Organe entodermalen

Ursprungs wie Niere, Leber und Lunge wiedergefunden werden (D.L. Clarke, C.B. Johansson, *et al.* 2000).

Der umgekehrte Vorgang ist ebenfalls beobachtet worden. Dabei differenzieren Blutzellen nach Transplantation in Neurone und Leberzellen (N.D. Theise, M. Nimmakayalu, *et al.* 2000, M.A. Eglitis & E. Mezey 1997). Eine vorgeprägte Gewebstammzelle kann also entweder über De-Differenzierung oder Trans-Differenzierung bzw. durch eine veränderte Mikroumgebung den vorbestimmten Weg verlassen und frische Zellen für einen anderen Gewebetyp liefern. Dieser Weg der Trans- bzw. De-Differenzierung ist in Abb.1 durch gestrichelte Pfeile veranschaulicht.

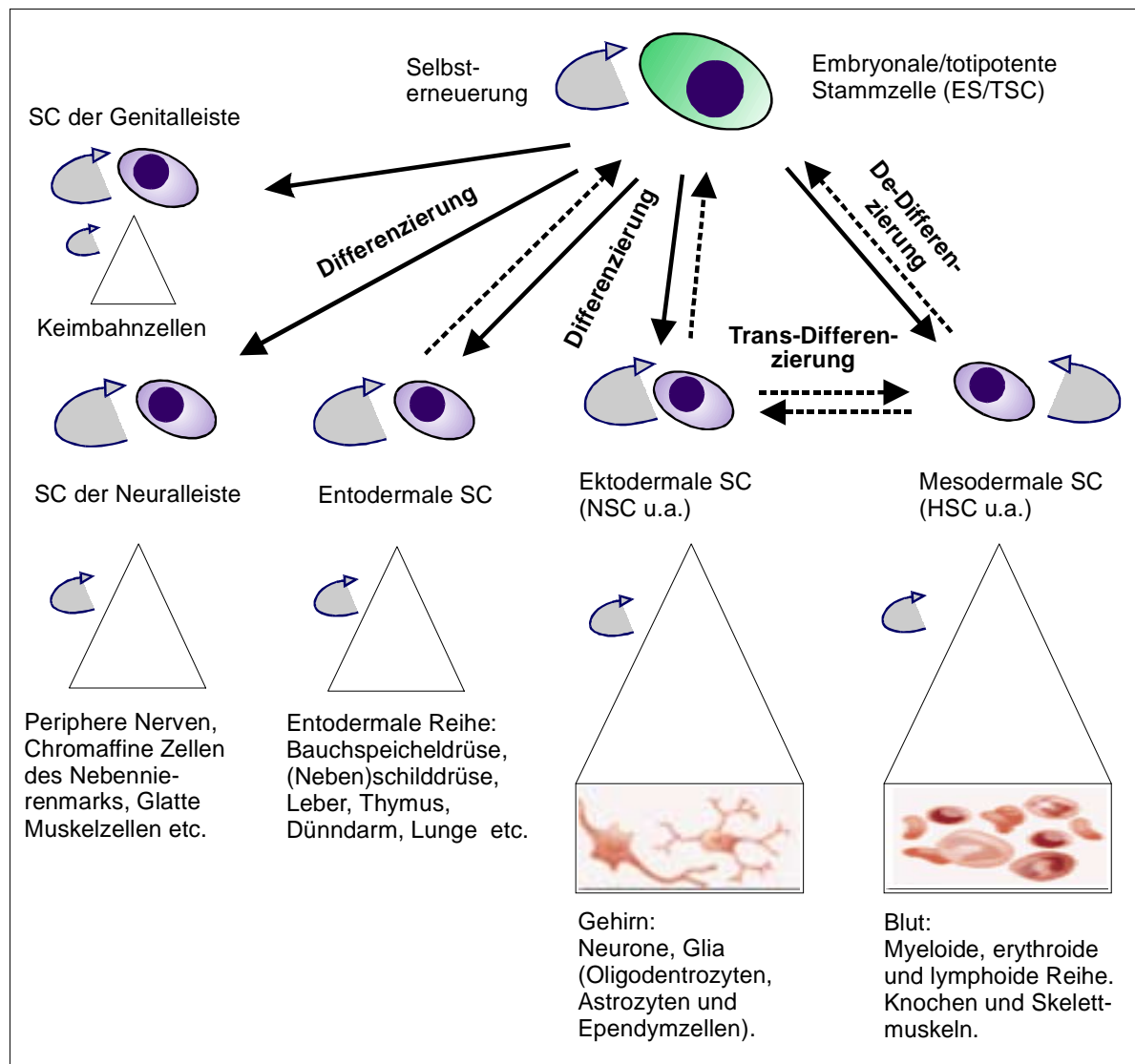


Abb. 1: Die schrittweise Differenzierung von vorgeprägten Vorläuferzellen mit abnehmendem Selbsterneuerungspotential in terminal ausdifferenzierte Zellen ist in Form von Pyramiden dargestellt. Die gestrichelten Pfeile deuten an, dass auch aus einer neuronalen SC durch Trans- bzw. De-Differenzierung hämatopoetische Zellen entstehen können.

3.1.1 Faktorreiche Mikroumgebung der Stammzellen

Die Stammzellen befinden sich, im Körper verteilt, in sogenannten Nischen, die durch ihr Faktorreichtum dafür sorgen, dass die Zellen ihre Pluripotenz behalten. Von hämatopoetischen Stammzellen weiß man, dass sie unter dem Einfluss von Membran gebundenen bzw. löslichen Zytokinen, Wachstumsfaktoren und anderen weniger gut definierten Faktoren differenzieren oder proliferieren können. Diese Faktoren werden von Zellen des Mikroenvironments im Knochenmark bereitgestellt (E. Fuchs & J.A. Segre 2000).

Dieses Mikroenvironment wird auch Knochenmark-Stroma genannt. Gemeint ist eine heterogene Population verschiedener Zelltypen, darunter Fibroblasten, Knochenzellen und Fettzellen, die zusammen mit den hämatopoetischen Zellen u.a. Kollagene, Proteine und Proteoglykane sezernieren und dadurch eine sogenannte Extrazellulärmatrix schaffen. Viele extrazellulär vorkommenden Proteine tragen ausgeprägte Zuckerstrukturen. Zusammen mit dem Stroma bildet die Extrazellulärmatrix im Knochenmark eine Art Schnittstelle zwischen peripherem Blut und Stammzellen. Dadurch entsteht die für die Selbsterneuerung bzw. Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen wichtige faktorreiche Umgebung. Diese Nischenstruktur der HSC kann *in vitro* auch simuliert werden, indem man isolierte Stammzellen auf einer Einzelschicht von etablierten Fibroblastenzellen kultiviert (T.M. Dexter 1982, C. Heberlein, J. Friel, *et al.* 1999).

Analog zum Knochenmark spricht man bezüglich des Gehirns seit kurzem vom „Gehirnmark“. Man meint damit die Nische, in der sich die neuronalen Stammzellen aufhalten. Der Ursprung der proliferativen Eigenschaften im Gehirn scheint neben dem Hippocampus die subependymale Zone zu sein, die die mit Flüssigkeit gefüllten Hohlräume des Gehirns, die Seitenventrikel, auskleidet. Wie das Knochenmark besteht auch die subependymale Zone aus Stammzellen, die in einer Extrazellulärmatrix eingebettet sind und Stromazellen, die ebenfalls unterstützende Funktionen ausüben (I.L. Weissman 2000a, B. Scheffler, M. Horn, *et al.* 1999, F. Doetsch, I. Caille, *et al.* 1999). Somit sind in SC, abhängig von der jeweiligen Nische bzw. von der Faktorzusammensetzung eines Mikroenvironments, verschiedene Signaltransduktionswege aktivierbar.

3.2 Die Signaltransduktion

Innerhalb der Hämatopoese ist der Zusammenhang zwischen Differenzierungs- oder Proliferationsverhalten einer frühen Vorläuferzelle und bestimmten Ligand/Rezeptor-Wechselwirkungen gut untersucht, aber bei weitem nicht vollständig verstanden. Zytokine und Transkriptionsfaktoren spielen dabei eine wichtige Rolle. Einige Zytokine, so der Stammzellfaktor (SCF), Interleukin-3 oder der Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) sind dabei eher für den Erhalt der frühen pluripotenten HSC verantwortlich. Während Zytokine wie Thrombopoetin, Erythropoetin oder Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor ihre Wirkung auf uni- oder bipotente Vorläuferzellen entfalten (I.L. Weissman 2000b, S.J. Morrison, N.M. Shah, *et al.* 1997).

Die Signaltransmission beginnt, wenn ein Botenstoff oder First Messenger z.B. ein Zytokin, ein Wachstumsfaktor oder ein Hormon an seinen jeweiligen Rezeptor andockt. Der Ligand/Rezeptor-Komplex überträgt die Nachricht über spezifische Signalwege durch das Cytosol der Zelle bis in den Kern hinein. Dort binden Transkriptionsfaktoren an die DNA und aktivieren bestimmte Gene. Es folgt die Produktion und Freisetzung der Proteine, für die sie kodieren. Die meisten Aktivitäten, die bei der Signalübertragung Gewicht haben, werden kontrolliert durch Kinasen und Phosphatasen. Ein wichtiger Signalweg, der das Prinzip genauer illustriert, ist die Ras/Raf-Signaltransduktionskaskade, die u.a. durch das Polypeptidhormon PDGF aktiviert werden kann. PDGF wird freigesetzt, wenn Blutgefäße verletzt werden. Nach Bindung an seinen Rezeptor, der eine Tyrosinkinaseaktivität (RTK) besitzt, dimerisiert der Rezeptor und die Kinasedomäne jeder Untereinheit erkennen und phosphorylieren die Tyrosin-Reste der jeweils anderen Untereinheit. Die phosphorylierten Rezeptoren werden von Adapterproteinen erkannt, die nun wiederum über verschiedene Zwischenschritte das Membran assoziierte Ras-Protein aktivieren. Ras aktiviert seinerseits die Serin/Threonin spezifische Proteinkinase Raf, die das Protein Mek1/2 phosphoryliert. Mek1/2 kann sowohl Tyrosin- als auch Ser/Thr-Reste phosphorylieren und aktiviert im nächsten Schritt die Ser/Thr-Kinase Erk1/2. Erk1/2 kann durch die Kernmembran diffundieren, dort mehrere Transkriptionsfaktoren (Elk-1 u.a.) phosphorylieren und dadurch die Expression bestimmter Gene auslösen. Letztendlich wird die Zelle durch PDGF und Aktivierung der entsprechenden Gene veranlasst sich zu teilen, um so die Wundheilung an den verletzten Blutgefäßen zu unterstützen.

Neben Phosphorylierungsreaktionen können viele Signalwege auch durch freie Calcium Ionen beeinflusst werden. Der Ca^{2+} -Spiegel (von $10^{-7}\mu\text{M}$ bis $10^{-4}\mu\text{M}$ freie Ca^{2+} -Ionen in der Zelle) wird in der Zelle äußerst effektiv reguliert. Er ist auf sehr geringem Niveau absolut konstant, kann sich jedoch pulsartig in Form von Wellen, Spitzen oder Oszillationen ändern und wirkt auf diese Weise als äußerst vielseitiger Second Messenger für zum Teil gegensätzliche Prozesse wie Proliferation und den programmierten Zelltod (Apoptose). Nach Bindung eines Wachstumsfaktors oder Neurotransmitters kann Calcium über Kanäle aus dem Extrazellularraum oder von innen aus dem Endoplasmatischen Retikulum in das Cytosol einströmen (M.J. Berridge, M.D. Bootman, *et al.* 1998, F. Striggow & B.E. Ehrlich 1996).

Die mit den verschiedenen Ligand/Rezeptor-Bindungen verknüpften Signalkaskaden wurden anfänglich meist linear untersucht. Heute ist jedoch klar, dass verschiedene Signalkaskaden miteinander quervernetzt sind und die biologische Antwort letztendlich abhängig ist von der Art und Weise dieser Interaktionen.

Zwei weitere wichtige Signalwege werden durch den Neurotransmitter L-Glutamat angeschaltet. Neben metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluRs, ein an das GTP-bindende Protein gekoppelter Rezeptor) werden in neurale und gliale Vorläuferzellen vornehmlich ionotrope Glutamat-Rezeptoren (iGluRs) aktiviert (X. Yuan, A.M. Eisen, *et al.* 1998, K. Cauley, V. Kukekov, *et al.* 1997, V. Gallo, D.K. Patneau, *et al.* 1994). Ionotrope GluRs steuern die Differenzierung und Proliferation direkt über den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen. Calcium aktiviert in Verbindung mit Calmodulin (CaM) die Calcium/Calmodulin abhängige Kinase II (CaMK II) und IV (CaMK IV), die wiederum Ionenkanäle und Signalmoleküle anderer Kaskaden phosphorylieren oder in den Kern eindringen und bestimmte Transkriptionsfaktoren wie SRF und CREB aktivieren können (T.R. Soderling 2000).

Die ebenfalls durch L-Glutamat aktivierbaren mGluRs gehören zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. In der Regel wird über das heterotrimere Guannukleotid-bindende Protein ($\text{G}\alpha\beta\gamma$) entweder die Ras-Kaskade oder über verschiedene Zwischenschritte eine membrangebundene Phospholipase C (PLC) aktiviert, die wiederum ein Plasmamembranlipid zu den Second Messenger 1,2-Diacylglycerin (DAG) und Inosit-1,4,5-trisphosphat (IP_3) spaltet. IP_3 diffundiert nach seiner Freisetzung durch das Cytosol und wird am Endoplasmatischen Retikulum

von einem spezifischen Rezeptor gebunden, der Ca^{2+} -Ionen ins Cytosol freigesetzt. Ca^{2+} wirkt nun als weiterer Second Messenger, der zur Aktivierung verschiedener Proteinkinasen benötigt wird. DAG verbleibt an der Plasmamembran und aktiviert Calcium abhängig die Serin/Threonin Proteinkinase der Familie C (PKC). PKC kann einerseits verschiedene Zwischenstufen der Ras-Kaskade aktivieren, andererseits aber auch direkt durch Phosphorylierung die Öffnungswahrscheinlichkeit von Ionenkanälen erhöhen. In Abbildung 2 sind verschiedene Vernetzungspunkte wie die Ca^{2+} -Ionen, das Ras-Protein oder die PKC dargestellt.

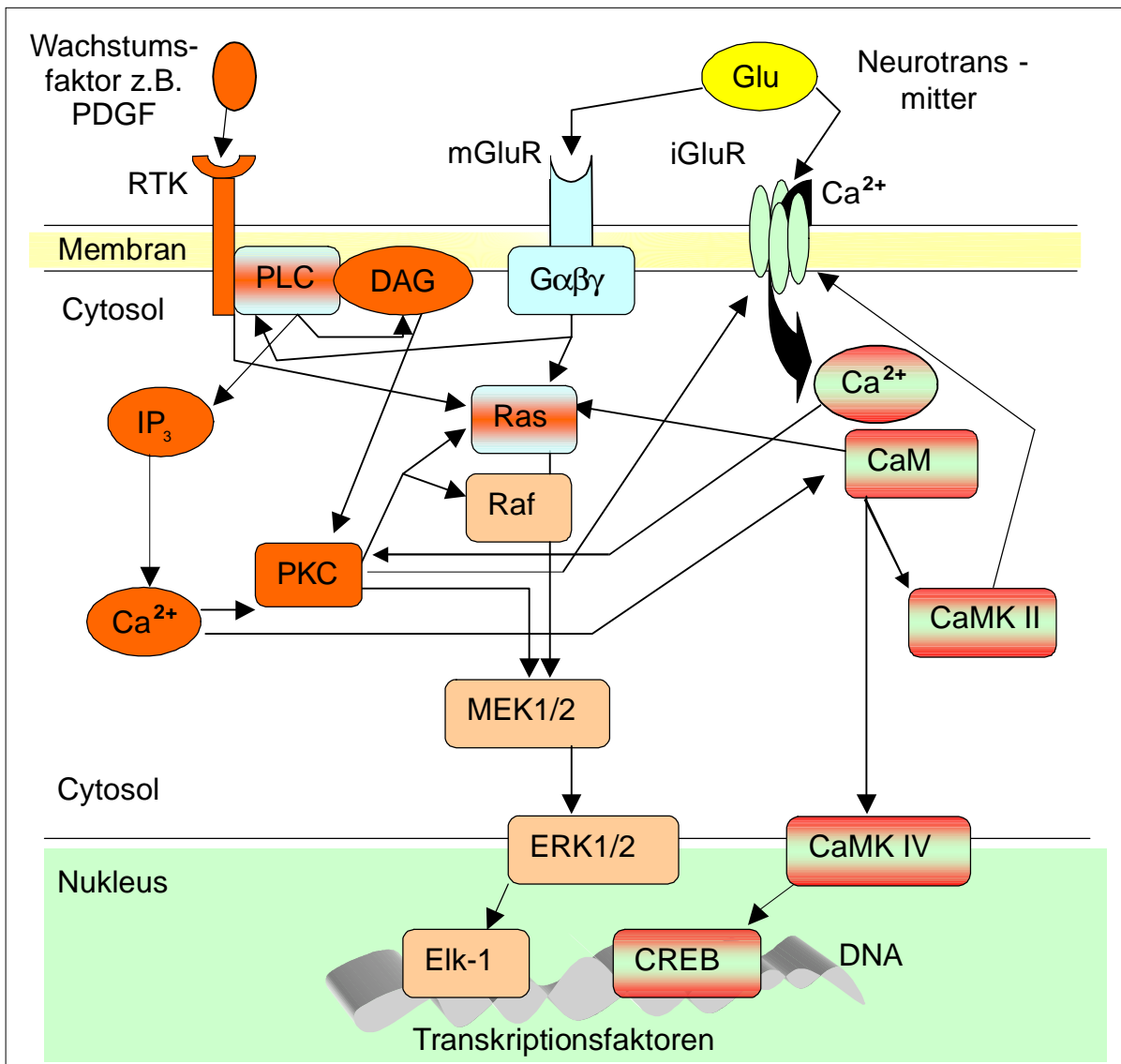


Abb. 2: Quervernetzungen einiger Signalkaskaden im Blockdiagramm. Die Rechtecke stellen Enzyme dar. Ovale Formen entsprechen Second Messenger Moleküle.

Ein weiterer wichtiger, jedoch in Abbildung 2 nicht skizzierter Signaltransduktionsweg, ist der Weg über Janus-Kinasen und STAT-Proteine. Sie werden durch

Zytokine wie die Interferone α , β , γ und Interleukine 2-7, 9-12 und 15 oder GM-CSF ausgelöst und sind ebenfalls über verschiedene Substanzen mit den in Abb.2 vereinfacht dargestellten Kaskaden quervernetzt. So können durch ein konzertiertes Ineinandergreifen verschiedener Signalketten viele Gene sehr schnell exprimiert werden. Fehlfunktionen innerhalb der Kaskaden können daher leicht zu fehlgeleittem Wachstum und in letzter Konsequenz zur Zelltransformationen führen (U.S. Bhalla & R. Iyengar 1999, K. Hinterding, D. Alonso-Diaz, *et al.* 1998, J.D. Jordan, E.M. Landau, *et al.* 2000).

3.3 Vorkommen ionotroper Glutamat-Rezeptoren

L-Glutamat ist einer der wichtigsten erregenden Neurotransmitter im Wirbeltiergehirn. Er bindet an Rezeptoren, die sowohl ionotrop (direkt als Ionenkanal) als auch metabotrop (G-Protein gekoppelt) funktionieren können. Ionotrope Glutamat-Rezeptoren (iGluRs) nehmen neben spannungsgesteuerten Kanälen hauptsächlich an der elektrischen Signalverarbeitung teil, werden aber auch mit gleicher Dichte in elektrisch nicht erregbaren Gliazellen exprimiert (V. Gallo & C.A. Ghiani 2000, T. Müller, T. Moller, *et al.* 1992).

In Säugetieren findet man Expression der iGluRs auch außerhalb des ZNS unter anderem im Dünndarm (H.E. Shannon & B.D. Sawyer 1989), in der Nebennierenrinde (Y. Yoneda & K. Ogita 1987), in den Inselzellen der Bauchspeicheldrüse (N. Inagaki, H. Kuromi, *et al.* 1995, C.D. Weaver, T.L. Yao, *et al.* 1996, C.D. Weaver, V. Gundersen, *et al.* 1998) und in Knochenzellen (A.J. Patton, P.G. Genever, *et al.* 1998, C. Chenu, C.M. Serre, *et al.* 1998). Außerdem werden sie in der Haut in für die Schmerzwahrnehmung wichtigen unmyelierten sensorischen Nervenendigungen (S.M. Carlton, G.L. Hargett, *et al.* 1995, B. Ault & L.M. Hildebrand 1993) und in einigen hämatopoetischen Zellen wie den peripheren Monozyten (J.D. Malone, M. Richards, *et al.* 1986), den Gewebemastzellen (W.M. Purcell, K.M. Doyle, *et al.* 1996) und den Megakaryozyten (P.G. Genever, D.J. Wilkinson, *et al.* 1999) exprimiert. Die biologische Funktion der ionotropen Glutamat-Rezeptoren außerhalb des neuronalen Systems ist aber noch weitgehend ungeklärt. Möglicherweise kann die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer oder anderer Gewebstammzellen über ionotrope Glutamat-Rezeptoren vermittelt werden.

Die cDNAs der meisten ionotropen Glutamat-Rezeptoren wurden in den Jahren 1989 bis 1992 kloniert (M. Hollmann & S. Heinemann 1994). Mit Hilfe molekularbiologischer Untersuchungen konnten seit Anfang der 90er Jahre viele Einsichten in die Pharmakologie, die Physiologie und die Pathophysiologie der iGluRs gewonnen werden. In Abb.3 sind die spezifischen exogenen Agonisten dem Neurotransmitter L-Glutamat gegenübergestellt. Ionotrope GluRs werden nach ihren spezifischen exogenen Agonisten in drei Gruppen eingeteilt:

a) AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionat)-Rezeptoren: GluR1, GluR2, GluR3 und GluR4,

b) Kainat (2-Carboxy-4-(1-isopropenyl)-3-pyrrolidinacetat)-Rezeptoren: GluR5, GluR6, GluR7 (*low affinity*) sowie Kainat-Rezeptor 1 und 2 (Ka1 und Ka2; *high affinity*) und

c) NMDA (N-Methyl-D-aspartat)-Rezeptoren: NR1, NR2A-D und NR3A, die im Gegensatz zu den meisten anderen Ionenkanälen sowohl Liganden als auch spannungsgesteuert funktionieren. Der NMDA-Rezeptorkomplex wird *in vivo* durch die physiologische Mg^{2+} -Konzentrationen geblockt. Erst nach Ligandenbindung und gleichzeitiger Änderung des Membranpotentials wird der Kanal passierbar für Ca^{2+} -Ionen (R. Dingledine, K. Borges, *et al.* 1999).

Kainat-Rezeptoren konstituieren unter den iGluRs eine eigene Proteingruppe mit noch sehr unklaren biologischen Funktionen, denn im Gegensatz zu den AMPA- und NMDA-Rezeptoren sind selektive Agonisten und Antagonisten erst in den letzten drei Jahren entwickelt worden (D. Bleakman & D. Lodge 1998, R. Chittajallu, S.P. Braithwaite, *et al.* 1999, E.K. Michaelis 1998). Das Prolin-Derivat Kainat (Salz der Kainsäure, *kainic acid*) wirkt noch stärker neurotoxisch als L-Glutamat. Die Neurone sterben bei hohen Dosen an

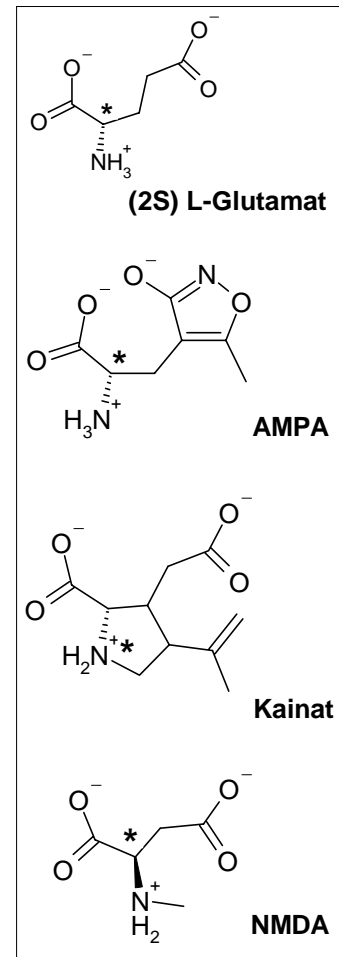


Abb. 3: Strukturformel des Neurotransmitters L-Glutamat und verschiedener Agonisten. Das chirale Zentrum ist mit einem Stern markiert (S-Konfiguration im Cahn-Ingold-Prelog System).

Übererregung. Der Ursprung des Wortes Kainat ist das Japanische „Kaininso“, das frei übersetzt „Meeresungeheuer“ bedeuten kann. Isoliert wurde Kainat erstmalig 1953 aus der Rotalge *Dignea simplex*, die für ihre Wirkung gegen Wurmbefall im Darm bekannt war. Medizinisch wirkt Kainat dabei auf die iGluRs des Wurms (I. Mody 1998).

Neben den 15 iGluR-Untereinheiten existieren noch 12 metabotrope Glutamat-Rezeptoren (mGluRs). Die Aktivierung der mGluRs wirkt sich im Bereich von Sekunden auf intrazelluläre Enzymkaskaden aus (E.K. Michaelis 1998). Ihre Wirkung ist nicht so unmittelbar wie die direkte Öffnung eines Ionenkanals und daher eher längerfristiger, modulierender Natur. Die ionotropen Glutamat-Rezeptoren öffnen sich dagegen bereits innerhalb von Millisekunden nach Transmitterbindung für Kationen. Durch Na⁺-Ionen werden Spannungsänderungen an der postsynaptischen Membran erreicht, während durch Ca²⁺-Einstrom in erster Linie intrazelluläre Signalwege angesprochen werden (B. Bettler & C. Mülle 1995).

Da iGluRs wichtige Funktionen bei der Gehirnentwicklung und der Gedächtnisleistung wahrnehmen, werden sie mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Im Menschen konnte bisher keine Mutation innerhalb der iGluR-Genfamilien direkt mit einer neurologischen oder einer anderen genetischen Erbkrankheit in Verbindung gebracht werden (R. Dingledine, K. Borges, *et al.* 1999). Jedoch wirkt Glutamat unkontrolliert und im Überschuss freigesetzt auf benachbarte Zellen neurotoxisch. Ausgelöst durch den Mangel an Sauerstoff und Glucose, setzen beim Schlaganfall Zellen in den betroffenen Arealen viel Glutamat frei. Bei Nagern konnte durch die Gabe von iGluR-Antagonisten das folgende massenhafte Absterben benachbarter Zellen gestoppt und damit neurologische Ausfälle wesentlich vermindert werden (G.K. Kanellopoulos, X.M. Xu, *et al.* 2000). Ionotrope GluRs sind auch am pathologischen Geschehen der Multiplen Sklerose beteiligt. Hier werden infolge der Krankheit große Mengen Glutamat von verschiedenen Abwehrzellen abgegeben. An einem MS-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass AMPA/KainatR-spezifische Antagonisten den Untergang von mehr als 60% der Oligodendrozyten im Gehirn der Maus verhindern können (D. Pitt, P. Werner, *et al.* 2000, T. Smith, A. Groom, *et al.* 2000).

Aufgrund definierter Sequenzhomologien konnten die relativ zahlreichen Untereinheiten der ionotropen Glutamat-Rezeptoren in mindestens sechs Gruppen eingeteilt werden: eine AMPA-, zwei Kainat- (*high* und *low affinity*) und drei NMDA-Rezeptorfamilien. Die Gene der iGluRs sind mittlerweile fast alle kartiert worden und verteilen sich auf einer Vielzahl von Chromosomen.

Tabelle 1: iGluR-Untereinheiten und die dazugehörigen Gene

Familie	Gruppe	Untereinheit	Gen	Chromosom (human)	GenEMBL AcNo. (human)
AMPA	1	GluR1	<i>gria1</i>	5q33	I57354
		GluR2	<i>gria2</i>	4q32-33	A46056
		GluR3	<i>gria3</i>	Xq25-26	X82068
		GluR4	<i>gria4</i>	11q22-23	U16129
Kainat	2	GluR5	<i>grik1</i>	21q21.1-22.1	U16125
		GluR6	<i>grik2</i>	6q16.3-21	U16126
		GluR7	<i>grik3</i>	1p33-34	U16127
	3	Ka1	<i>grik4</i>	11q22.3	S67803
		Ka2	<i>grik5</i>	19q13.2	S40369
	NMDA	4	NR1	<i>grin1</i>	9q34.3
NR2A			<i>grin2a</i>	16p13.2	U09002
5		NR2B	<i>grin2b</i>	12p12	U28861
		NR2C	<i>grin2c</i>	17q24-25	unbekannt
		NR2D	<i>grin2dc</i>	19q13.1qter	U77783
6		NR3A	<i>grin3a</i>	unbekannt	unbekannt

3.4 Struktur ionotroper Glutamat-Rezeptoren

Alle iGluR-Untereinheiten bestehen aus ca. 900 Aminosäuren, enthalten drei Transmembrandomänen (TM I, III und IV) und eine zur cytosolischen Seite gewandte Transmembranschleife (TM II). Durch eine radiale Anordnung von vier oder fünf verschiedenen GluR-Untereinheiten wird eine Kanalpore gebildet, die je nach Zusammensetzung über die Ionenselektivität entscheidet.

Der große aminoternale Bereich liegt extrazellulär und enthält mehrere Glykosylierungsstellen. Er beinhaltet einen vor der TM I gelegenen 150 Aminosäure großen Bereich (S1), der zusammen mit einem ähnlich großen Bereich hinter der TM III (S2) für die allosterische Transmitterbindung verantwortlich ist. Der C-Terminus ist

intrazellulär gelegen und verantwortlich für die Rezeptorverankerung innerhalb der synaptischen Dichte, spielt zusätzlich bei bestimmten Signaltransduktionskaskaden eine Rolle und kann die Rezeptoraktivität über verschiedene Phosphorylierungsstellen modulieren.

Funktionelle Studien *in vivo* werden vor allem durch die Tatsache erschwert, dass im Gehirn in bestimmten Neuronen das Expressionsmuster der Kainat-Rezeptoren mit denen der AMPA- und NMDA-Rezeptoren überlappt ohne mit ihnen heteromere Rezeptorkomplexe zu bilden (A.S. Niedzielski & R.J. Wenthold 1995, M.Y. Min, D.A. Rusakov, *et al.* 1998). Eine genaue Röntgenstrukturanalyse ist wegen Mangels an Methoden zur Isolierung und Reinigung von Membran gebundenen Rezeptoren noch nicht gelungen.

In Anlehnung an aufgeklärte Rezeptorstrukturen wurde für die Quartärstruktur ein pentamerer Proteinkomplex vorhergesagt, der allerdings in jüngerer Zeit in Frage gestellt worden ist. Die Arbeiten zweier Gruppen favorisieren unabhängig voneinander eine tetramere Quartärstruktur, die immer aus mindestens zwei heteromeren Untereinheiten einer Genfamilie besteht (I. Mano & V.I. Teichberg 1998, C. Rosenmund, Y. Stern-Bach, *et al.* 1998). Für die Gruppe der *high affinity* Kainat-Rezeptoren Ka1 und Ka2 gilt, dass diese Untereinheiten zur Bildung eines funktionellen Ionenkanals mit mindestens einer Untereinheit aus der Gruppe der *low affinity* Kainat-Rezeptoren GluR5-7 interagieren müssen (C. Cui & M.L. Mayer 1999). Die Topologie entspricht in etwa der eines K⁺-Kanals, der ebenfalls eine zur cytosolischen Seite gewandte Transmembranschleife aufweist und als tetramer vorliegt (C. Miller 2000).

3.4.1 RNA-Prozessiervorgänge

Die Diversität des heteromeren Rezeptorkomplexes kann zusätzlich zu den verschiedenen Untereinheiten-Kombinationen beträchtlich erhöht werden, indem die prä-mRNA durch verschiedene posttranskriptionelle Prozesse modifiziert wird. Sämtliche RNA-Prozessiervorgänge werden durch makromolekulare Enzymkomplexe katalysiert und erweitern die Zahl der möglichen Proteinprodukte eines Gens. Neben der Polyadenylierung sind besonders für die iGluRs zwei Vorgänge von Bedeutung, alternatives RNA-Spleißen und RNA-Editing. Zwei wichtige iGluR-Spleißpositionen sind kurz vor und kurz hinter der Transmembrandomäne IV (Flip-

/Flop-Exone und alternative C-Termini). Die wichtigste Editierposition liegt in der Kanal bildenden Transmembranschleife II. Im einzelnen ist wenig bekannt, welche Untereinheiten-Zusammensetzung im Ionenkanal mit entsprechenden biologischen Funktionen korrelieren. In Abb.4 sind einige der wichtigsten Strukturmerkmale sowie mögliche RNA-Modifikationen skizziert.

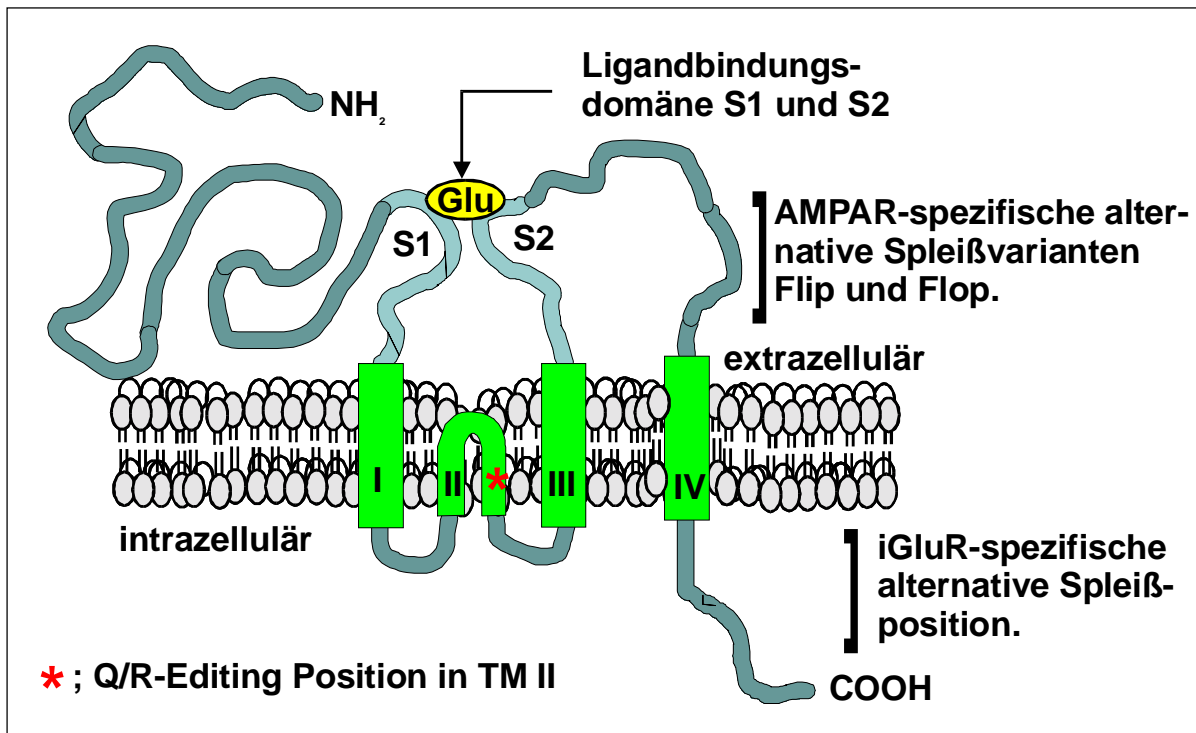


Abb. 4: Topologie der iGluRs: Zwischen einem langem N-Terminus und einem kurzen C-Terminus liegen drei Transmembrandomänen (I, III und IV) und eine Transmembranschleife (II). Die S1- und S2-Domäne sind für die Ligandbindung verantwortlich.

3.4.1.1 RNA-Editing

RNA-Editing ist ein posttranskriptioneller Prozess, der wie die Polyadenylierung der RNA und das alternative Spleißen im Nukleus stattfindet. Dabei sind eine Vielzahl von Modifikationen möglich, die alle direkt zu Ribonukleotid-Veränderungen führen. Diese Art der Editierung sind in tRNAs, in prä-mRNAs und in RNA-Viren, die Säugerzellen infizieren können, beobachtet worden. Mit Ausnahme der seltenen Uridin zu Cytosin und Uridin zu Adenosin Konversion findet am einzelnen Ribonukleotid eine Deaminierungsreaktion statt. Die beiden wichtigsten Deaminierungen sind die Cytosin zu Uridin (C/U) und die Adenosin zu Inosin (A/I) Konversionen. Die RNA des Apolipoprotein B ist das am besten untersuchte Beispiel für eine C/U-Konversion; dort wird gewebs- und entwicklungsabhängig eine durch RNA-Editing

generierte verkürzte Isoform des Proteins exprimiert. Die A/I-Konversion dargestellt in Abb.5 findet u.a. im G-Protein gekoppelten Serotonin-(5-HT_{2c}-)Rezeptor, im Antigenom des Hepatitis Delta Virus (HDV) und in einigen iGluRs statt (C.M. Niswender 1998). In iGluRs katalysieren die Enzyme ADAR1, 2 und 3 die hydrolytische Deaminierung der prä-mRNA von Adenosin in der C6-Position (B.L. Bass 1997). Es entsteht Inosin, das als Guanosin translatiert wird.

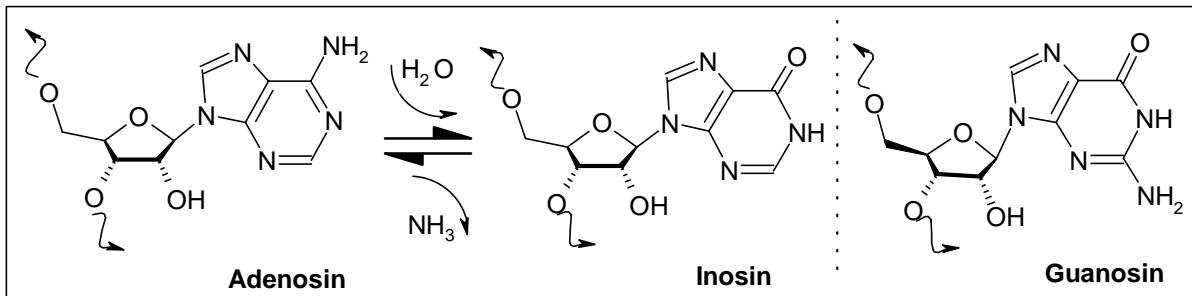


Abb. 5: Bei der enzymatischen Deaminierung dient das Wasser als Nukleophil und greift am C6 des Adenosins an. Es entsteht unter Freisetzung von Ammoniak Inosin, das wie Guanosin nur mit Cytosin Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann. Die wellenförmigen Pfeile am Ribose-Rest symbolisieren den fortlaufenden RNA-Strang.

Die doppelsträngige RNA-Adenosin-Deaminase besitzt zumindest *in vitro* eine nanomolekulare Affinität für die links helikale Z-DNA Konformation, die hinter der vorrückenden RNA-Polymerase während der Transkription entsteht. Der Editiervorgang ist positionsspezifisch und erhöht die Rezeptordiversität zusätzlich (L. Simpson & R.B. Emeson 1996). Wie bereits erwähnt, ist die in der Poren bildenden Domäne (TM II) liegende Q/R-Position sehr wichtig, da sie letztendlich über die Ionendurchlässigkeit, die Einzelkanal-Leitfähigkeit und das Strom/Spannungs-Verhältnis entscheidet. RNA-Editing an dieser Position findet lediglich in den Untereinheiten GluR2, GluR5 und GluR6 statt. Dabei wird das Gen spezifische, ungeladene Glutamin(Q)-Codon (CAG) in ein polares Arginin(R)-Codon (CIG) umgewandelt. Als direkte Konsequenz dieses Editierprozesses besitzen AMPA-Rezeptoren, die die GluR2-Untereinheit beinhalten, nur eine geringe Permeabilität für zweiwertige Ionen. Dadurch werden AMPA-Rezeptoren undurchlässig für Ca²⁺-Ionen. AMPA-Rezeptoren ohne GluR2 sind durchlässig für Ca²⁺-Ionen. Die GluR2-Untereinheit ist im ZNS weitverbreitet und liegt zu fast 100% in editierter Form vor. Experimente an Gen veränderten Mäusen, die nicht in der Lage waren ein verändertes GluR2-Allel zu editieren (Editierrate sinkt auf 70%), litten unter

plötzlichen Anfällen und starben innerhalb der ersten drei Wochen nach der Geburt. Drosselt man die Expression des GluR2-Gens (*knockdown*-Ratten), so entwickelten sie spontan ab postnatalem Tag 13 (P13) anfallartige und neurodegenerative Symptome im Hippocampus. Diese Symptome wurden weder bei postnatalen (P8) noch bei erwachsenen Ratten beobachtet, was darauf schließen lässt, dass GluR2 spezifisch und abhängig vom Alter an der Gehirnentwicklung teilnimmt (M. Higuchi, F.N. Single, *et al.* 1993).

Die Kainat-Untereinheiten GluR5 und GluR6 werden weniger effizient editiert. GluR5 wird im Nager kurz nach der Geburt editiert (P4, Editerrate bei 40%), GluR6 kurz vor der Geburt (E14-19; Editerrate bei 80%). Anders als bei GluR2 hängen die elektrophysiologischen Eigenschaften im Falle der GluR6-Untereinheit noch von anderen Editierstellen ab. In der Transmembrandomäne I kann Isoleucin zu Valin (I/V-Editing) und Thyrosin in Cystein (Y/C-Editing) umgewandelt werden. Dadurch erhöht sich gleichzeitig die Diversität dieser Kainat-Untereinheit auf 8, die alle im ZNS exprimiert werden. Dabei ist die vollständig editierte Variante (V/C/R) die häufigste im Gehirn (F. Lai, C.X. Chen, *et al.* 1997).

Für keine NMDA-Untereinheit konnte bis heute RNA-Editing gezeigt werden. In NMDA-Rezeptoren wird anstelle des in AMPA-/Kainat-Rezeptoren an gleicher Position kodierten Glutamin das ebenfalls ungeladene Asparagin kodiert. Ersetzt man diese Aminosäure *in vitro* durch das polare Arginin, so wird der Kanal undurchlässig für Calcium (N. Burnashev 1996).

3.4.1.2 Alternatives RNA-Spleißen

Durch alternatives Spleißen der mRNA-Vorläufermoleküle kann einerseits die Genexpression reguliert, andererseits die proteomische Komplexität in höheren Eukaryonten erhöht werden. Das An- und Ausschalten der Genexpression gelingt durch Induktion eines Stop-Codons in eine alternativ gespleißte RNA. Die eigentliche Spleißreaktion findet in den Spleißosomen statt. Es handelt sich dabei um einen Komplex aus fünf Ribonukleoprotein-Partikeln und 50-100 Polypeptiden. Die ersten Schritte zur Formation eines Spleißosoms und damit Hauptziel für die Genregulation ist die Erkennung der Verzweigungs-, der 3-Spleiß- und der 5'Spleiß-Konsensuselemente durch spezifische Spleißproteine innerhalb eines Introns. Die Sequenzkomplementarität zwischen der 5'-Spleißposition und der Verzweigungs-

sition ist eine wichtige Voraussetzung für die Bildung und Stabilität des Spleißkomplexes. Chemisch gesehen finden zwei Umesterungen im Spleißosom statt (R.A. Padgett, P.J. Grabowski, *et al.* 1986, C.W.J. Smith & J. Valcárcel 2000).

Ein bemerkenswertes Beispiel für die Erhöhung der Diversität durch alternatives RNA-Spleißen ist die Expression eines K^+ -Kanals entlang der 10.000 Sensorrezeptorzellen im Innenohr der Singvögel. Dort wird ein Satz von 576 RNA-Isoformen exprimiert. Dadurch sind Singvögel in der Lage verschiedene Klangfrequenzen wahrzunehmen (D.L. Black 1998).

Für fast alle iGluRs sind alternative Spleißvarianten kloniert worden. Manche Spleißpositionen beschränken sich auf die jeweilige Unterfamilie, andere liegen in allen Unterfamilien vor. Für das im Cytosol gelegene carboxyterminale Ende können je nach iGluR-Untereinheit mehrere alternativ gespleißte Enden vorliegen. Sie enthalten unter anderem Erkennungssequenzen für Phosphatasen und Kinasen, die durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung Verknüpfungen zu verschiedenen Signaltransduktionskaskaden herstellen können. Diese intrazelluläre Spleißposition kann außerdem bei der Verankerung des Rezeptorkomplexes eine Rolle spielen und zudem direkt die Rezeptoraktivität modulieren.

Die AMPA-Rezeptoren besitzen neben der carboxyterminalen Spleißposition noch eine weitere wichtige alternative Spleißposition. Dort kann ein aus 38 Aminosäuren bestehendes Exon alternativ eingefügt werden. Diese Isoformen werden Flip- oder Flop-Varianten genannt und während der Gehirnentwicklung unterschiedlich stark exprimiert. Die Flip-Variante wird vor allem prä- und postnatal exprimiert, die Flop-Form hingegen eher später bei der Gehirnreifung. Elektrophysiologisch betrachtet, desensibilisiert die Flip-Isoform nach Transmitterbindung bei geringerer Leitfähigkeit wesentlich langsamer, d.h. der Ionenkanal schließt sich nach Transmitterbindung langsamer als die Flop-Form.

3.4.2 Protein-Prozessiervorgänge

In der Regel liegen *in vivo* alle iGluRs glykolysiert vor. Diese Glykolysierung bezieht sich vor allem auf das lange aminoternale Ende. Untersuchungen die die möglichen Glykosylierungsstellen identifizierten, halfen bei der Aufklärung der Tertiärstruktur. AMPARs enthalten vier bis acht, KaRs zwischen acht und zehn und

NMDARs sechs bis zwölf N-Glykosylierungsstellen. Glykosylierungen haben eher bei der Rezeptormodulation, als direkt bei der Ligandenbindung eine Bedeutung (R. Dingledine, K. Borges, *et al.* 1999).

Ein weiterer wichtiger regulatorischer Mechanismus ist die Phosphorylierung cytosolischer Bereiche von Ionenkanälen. Die Serin/Threonin-Phosphorylierungsstellen der NMDA-Rezeptoren sind unter den iGluRs am besten untersucht. NMDA-Rezeptoren können durch Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC) und Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMK II) phosphoryliert werden. In der Regel wird dabei die Agonistenantwort potentiert; sie kann aber auch zur Unterbrechung der Rezeptorkomplexbildung führen. Aktiviert man z.B. in verschiedenen neuronalen Präparationen die Proteinkinase C, so erhöht sich die Funktionalität des NMDA-Rezeptors, indem die Öffnungswahrscheinlichkeit durch Abnahme der Affinität zu Mg^{2+} erhöht wird. Man schätzt, dass im Gehirn 10%-70% der NR1- und NR2-Untereinheit an einer oder mehreren Stellen phosphoryliert vorliegen. Substanziell führt diese Variabilität erneut zu einer Erhöhung der Rezeptorvielfalt auf molekularer und funktioneller Ebene der NMDA-Rezeptoren. Ähnliche Effekte konnten auch für AMPA-/Kainat-Rezeptoren beobachtet werden. Wie es zu einer Erhöhung der Funktionalität nach Aktivierung der Proteinkinasen kommt, ist mechanistisch genauso wenig verstanden wie die Kanalaktivierung nach Agonistenbindung (R. Dingledine, K. Borges, *et al.* 1999).

Die reversible Modifikation von Proteinen durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung ist von großer Wichtigkeit bei der koordinierten Signalvermittlung und in höheren eukaryontischen Organismen für ein effektives intrazelluläres Kommunikationssystem essentiell. Die Identifizierung und Charakterisierung von Signalkaskaden, bei denen Kinasen und Phosphatasen beteiligt sind, war ein wichtiger Schritt im Verständnis verschiedener Signalprozesse. Beide Enzymsysteme sind Bausteine komplexer Signalkaskaden, die unter Einbeziehung verschiedener Second Messenger (Ca^{2+} -Ionen, cAMP, DAG u.a.) Signale von der Zelloberfläche bis zum Kern vermitteln und so für eine gezielte Genexpression sorgen.

3.5 Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit war es, aus zuvor etablierten TF-1 Zellmutanten Mechanismen zu identifizieren, die zur Faktorunabhängigkeit von hämatopoetischen Zellen beitragen. Grundlage hierfür war die an der hämatopoetischen Vorläuferzelllinie TF-1 vorgenommene retrovirale Insertionsmutagenese. Retroviren integrieren in die DNA und wirken so potentiell mutagen. Selektioniert man nun die so mutagenisierte TF-1 Zelle, indem man ihr den Wachstumsfaktor entzieht, so sollten nur diejenigen Zellen überleben, die das Merkmal einer Krebszelle tragen nämlich ungehemmtes Wachstum. Die humane Zelllinie TF-1 wurde ausgewählt, weil sie den Stammzellmarker CD34 trägt und Stammzellpotential besitzt. Ihre Spontanmutationsfrequenz liegt bei $<10^{-8}$. Außerdem wächst sie streng Wachstumsfaktor abhängig und ist nach Stimulus differenzierungsfähig. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt, wobei eine durchschnittliche Erhöhung der Mutationsfrequenz um den Faktor 13 bzw. 28 gegenüber Kontrollexperimenten erzielt wurde. Insgesamt konnten so 241 TF-1 Mutanten isoliert, zur näheren Charakterisierung expandiert und mit molekularbiologischen Techniken analysiert werden (C. Stocking, U. Bergholz, *et al.* 1993).

Es ist anzunehmen, dass in diesen Faktor unabhängigen Mutanten interne Signale generiert werden, die die Funktion des GM-CSF ersetzen. Dafür muss in den TF-1 Mutanten das mitotische GM-CSF Signal durch andere interne Signalwege ersetzt werden. Es könnte sich dabei sowohl um proliferationsstimulierende als auch um Apoptose inhibierende Prozesse handeln. Die Charakterisierung internen Mechanismen sollte somit wichtige Einblicke in die Natur der Onkogenese liefern. Die retrovirale Insertionsmutagenese am Beispiel von TF-1 kann daher im weitesten Sinne als ein Modell zur Untersuchung der Krebsentstehung verstanden werden, denn fast alle Leukämien entwickeln sich aus einer in ihrem Proliferations- bzw. Differenzierungsverhalten gestörten Stammzelle (D.S. Pereira, C. Dorrell, *et al.* 1998).

Die Analyse der TF-1 Mutante 29A beispielsweise zeigte genau eine retrovirale Integration in ein Intron des GluR5 Gens (*grik1* auf Chromosom 21). Interessanterweise fand sich erhöhte RNA Expression dieses Gens nicht nur in der Mutante 29A,

sondern auch in einer Reihe weiterer Mutanten, die keine retrovirale Integration in diesem Genlokus aufwiesen (B. Fehse 1996).

Diese Befunde und das Vorhandensein der als ZNS-spezifisch eingestuften Genfamilie in u.a. Knochenzellen (A.J. Patton, P.G. Genever, *et al.* 1998) und Mikrogliazellen (M. Noda, H. Nakanishi, *et al.* 2000) führten zu folgenden Annahmen:

- Wenn ionotrope Glutamat-Rezeptoren auch außerhalb des ZNS eine biologische Funktion übernehmen, sollte die Expression nicht nur auf die bereits erwähnte Zelllinie TF-1 beschränkt, sondern auch in anderen Blutzelllinien bzw. primären Blutzellen zu finden sein.

- Wenn iGluRs *in vivo* als heteromere Rezeptorkomplexe vorliegen, sollten neben GluR5 weitere Mitglieder der jeweiligen iGluR-Unterfamilie pro Zelltyp transkribiert werden.

Es lag daher nahe zu untersuchen, ob nicht noch weitere Mitglieder dieser Genfamilie auf ähnlichem Niveau exprimiert werden und welche Rolle diese eigentlich nur im ZNS vorkommenden und bei der Lern- und Gedächtnisleistung beteiligten Rezeptoren in der Hämatopoese spielen könnten.

4. Material und Methoden

Eine genaue Beschreibung der verwendeten Materialien und angewandten Methoden erfolgt nur dort, wo sie unmittelbar wichtig für die experimentellen Ergebnisse sind. Klonierung rekombinanter Plasmide, analytische und präparative Restriktionspaltungen oder auch die Transformation kompetenter Bakterien sind molekularbiologische Standardtechniken, die entsprechend folgenden Protokoll-sammlungen durchgeführt wurden:

MOLECULAR CLONING. A LABORATORIAL MANUAL. (2nd Edition, Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989 Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA).

CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Vol. 1-4 Edited by Ausubel, F.M. et al., 1994-1998 by John Wiley & Sons, Inc., USA).

4.1 Material

Die im Labor verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders aufgeführt, von den Firmen Biomol (Hamburg), Biorad (München), Boehringer (Mannheim), Difco-Laboratories (Hamburg), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Uppsala, Schweden), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen. In den Fällen, in denen eine besondere Qualität bezüglich der Reinheit erforderlich war, ist dies gesondert vermerkt, ansonsten wurden die handelsüblichen Standardqualitäten eingesetzt. ³²P-markierte Radionukleotide wurden von der Firma Hartmann Analytik (Braunschweig) bezogen.

Die Restriktionsenzyme und DNA- bzw. RNA-modifizierenden Enzyme z.B. Ligasen, Phosphatasen, Kinasen und Polymerasen wurden von den Firmen Boehringer (Mannheim), Gibco/BRL Life Technologies (Eggenstein), MBI/Fermentas (St. Leon-Rot), Qiagen (Hilden), Stratagene (Heidelberg) und New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Falls nicht anders angegeben, wurden die von den Herstellern empfohlenen Enzymmengen sowie Puffer- und Reaktionsbedingungen gewählt.

4.1.1 Entsorgung und Sicherheit der verwendeten Materialien

Für alle verwendeten Chemikalien wurden die angegebenen R- und S-Sätze der Hersteller beachtet. Die Entsorgung der einzelnen Reagenzien und Puffer erfolgte ebenfalls den Vorschriften entsprechend.

Biologisches Material (Bakterienkulturen etc.) und die mit diesem kontaminierten Gebrauchsartikel (Pipettenspitzen, Agarplatten etc.) wurden autoklaviert und anschließend entsorgt.

Bei dem Umgang mit Radioaktivität wurden die Sicherheitsauflagen (Strahlenschutzverordnung) eingehalten.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Kulturbedingungen kompetenter Bakterien

Zur Transformation und Amplifikation der Plasmide wurden die Bakterienstämme *Escherichia coli Stable II* (elektrokompetent) und *CMK 603* (Ca^{2+} -kompetent), ein Abkömmling des Stammes C600 eingesetzt. Die Kulturbedingungen der Bakterien sowie ihre Lagerung und die Herstellung kompetenter Bakterien erfolgten nach den oben angegebenen Protokollsammlungen.

Zur Anzucht der Bakterien wurde LB(Luria-Bertani)-Medium verwendet. Feste Nährmedien für Petrischalen wurden durch Zusatz von 1,5% Agar zum LB-Medium hergestellt. Zur Selektion transformierter Bakterien wurde eine Konzentration von 100µg/ml Ampicillin bzw. 50µg/ml Kanamycin dem jeweiligem Nährmedium zugesetzt.

4.2.2 Plasmide

Nachfolgend sind die wichtigsten verwendeten DNA-Plasmide aufgeführt. Die in Klammern dargestellte Ziffer bezieht sich auf die Labor interne Nomenklatur.

pBluescript® SK +/- (#202/203): Dieser Vektor (2958bp, pUC 19 modifiziert) ist vielseitig verwendbar. Er enthält u.a. den *lacZ* Promotor zur blau/weiß Selektion sowie T3- und T7-Promotoren, die u.a. in dieser Arbeit verwendet wurden, um RNA-

Transkripte zuvor klonierter, offener Leseraster (ORF) herzustellen. Zur Herstellung stumpfer Enden wurde das Restriktionsenzym *EcoR V* verwendet.

pXcmKn12 (#341): *Taq*-PCR-Klonierungsvektor (2686bp) auf pUC18/19 Basis. Durch die Linearisierung des Vektors mit dem Restriktionsenzym *XcmI* entsteht ein T-Überhang, der zur Subklonierung von *Taq*PCR-Fragmenten genutzt wurde.

pCR®-XL-TOPO (Invitrogen, Leek, NL): Effizienter PCR-Klonierungsvektor (3,5kb) in linearisierter Form und mit einem T-Überhang. Der T7-Promotor ermöglicht auch hier die Transkription zuvor klonierter cDNA.

4.2.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide für die Reverse Transcription, Sequenzierungen und PCR wurden von den Firmen Eurogentec (Saraing, Belgien) und Gibco/BRL (Eggenstein) bezogen. Die gefriergetrockneten Oligonukleotide wurden in entsprechender Menge MilliQH₂O resuspendiert (Stocklösung 1µg/µl) und anschließend die Konzentration photometrisch überprüft.

4.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden zwei unterschiedliche Protokolle angewandt, abhängig davon, ob eine sogenannte Mini-Präparation (Ausbeute ca. 20 µg Plasmid-DNA) oder Maxi-Präparation (Ausbeute ca. 500 µg Plasmid-DNA) durchgeführt wurde. Beide Präparationsarten beruhen auf der Methode der alkalischen Lyse. Die schnelle Mini-Präparation erfolgte nach dem Protokoll aus dem Laborhandbuch *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1994-1998*. Die gewonnene Plasmid-DNA einer 2,5ml Übernachtskultur wurde entsprechend ihrer Menge in 20-50µl TE-Puffer mit 10µg/ml RNaseA aufgenommen. Diese DNA konnte nach gelelektrophoretischer Konzentrationsabschätzung direkt einer Restriktionsanalyse bzw. einer Sequenzanalyse unterzogen werden.

Zur Lagerung und Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien wurde eine 200ml Übernachtskultur nach der alkalischen Lyse über kommerziell erhältliche Fertigsäulen (Qiagen-Tip 500) der Firma Qiagen aufgereinigt. Die Aufarbeitung der Bakteriensuspension sowie die Benutzung der Säulen erfolgte nach den Angaben

des Hersteller. Die isolierte DNA wurde entsprechend ihrer Menge in 200-500µl sterilem TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bzw. gelelektrophoretisch.

4.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen z.B. nach einer präparativen Restriktionsspaltung oder einer präparativen PCR wurden je nach Menge des zu isolierenden Fragments Spinsäulen von zwei verschiedenen Herstellern verwendet. Die Spinsäulen (QIAquick) der Firma Qiagen besitzen eine Bindungskapazität von 10µg. Die Säule (Ultrafree-DA) der Firma Millipore reinigt maximal 100mg eines Agarosegel Stücks auf. Nach Herausschneiden der gewünschten Bande aus dem Agarosegel wurde nach den Angaben des jeweiligen Herstellers verfahren. Die Bestimmung der Konzentration und Qualität der Fragmente erfolgte bei beiden Methoden gelelektrophoretisch. Die isolierten Fragmente wurden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. So aufgereinigte Fragmente konnten mit genspezifischen Primern direkt sequenziert oder zur Hybridisierung der Southern Blots radioaktiv markiert werden.

4.2.6 Präparation zellulärer Gesamt-RNA

Die Isolierung zellulärer RNA erfolgte mit Hilfe von Guanidiniumisothiocyanat (GIT-Puffer) und Ultrazentrifugation über einen CsCl-Gradienten. Es wurden maximal 5×10^7 Zellen in einen Präparationsansatz gegeben, um eine Überladung des CsCl-Gradienten bei der Ultrazentrifugation zu vermeiden. Alle Arbeitsschritte wurden weitgehend unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt.

Dabei wurde das Gehirn einer Maus nach Entnahme und Überführung in flüssigem N₂ sofort im Kühlraum mit Hilfe eines Gewebehomogenisators (Polytron) in GIT-Puffer (3-4ml) aufgearbeitet und auf ein CsCl-Kissen pipettiert. Suspensionszellen wurden durch Zentrifugation (5min, 1000rpm, 4°C, Beckmann GPKR-Untertischzentrifuge) geerntet und in kaltem PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (1000rpm, 4°C, 5min) wurde das Zellpellet durch die Zugabe von 3ml GIT-Puffer lysiert. Die Proben wurden sofort weiterverarbeitet. Dazu wurden 1,4ml 5,7M CsCl in ein SW-60 Zentrifugenröhrchen gegeben. Das Lysat wurde, wenn erforderlich, mehrmals durch eine Kanüle gezogen und vorsichtig auf das CsCl-Kissen pipettiert.

Die Ultrazentrifugation erfolgte im SW-60 Rotor (Beckmann) bei 34000rpm, 20°C, 20h. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Das RNA-Pellet wurde in 200µl 0,3M Na-Acetat pH 6,0 resuspendiert und mit 500µl abs. Ethanol gefällt. Nach der Zentrifugation (13000rpm, 4°C, 20min, Tischzentrifuge) wurde das RNA-Pellet mit 70%igem DEPC-Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (13000 rpm, 4°C, 10min) je nach RNA Menge in DEPC-H₂O resuspendiert. Die RNA wurde anschließend bei -70°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch. Qualität und Quantität wurde in einem 1%igem TBE-Gel überprüft. Bei geringer Zellzahl ($\leq 10^5$) beispielsweise bei CD34-positiven Zellen wurde der RNA Kit II der Firma Invitex (Berlin) verwendet.

4.2.7 Hybridisierung der Chromosom 1 spezifischen Cosmid Bibliothek

Die hier verwendete Chromosom 1 angereicherte Cosmid Bibliothek stammt aus dem Bestand des Ressourcenzentrums/Primärdatenbank (RZPD) im Deutschen Humangenomprojekt; RZPD-Nr. 112 (D. Nizetic, S. Monard, *et al.* 1994).

Die Bibliothek bestand aus je zwei identischen Filterpaaren hoher Dichte. Jeder Filter enthielt 48 x 48 Blöcke à 9 Klone, d.h. je 20 736 Klone. Alle notwendigen Hybridisierungs- und Waschschrte wurden nach Angaben des RZPD durchgeführt. Nach Hybridisierung wurden die Filter in noch feuchtem Zustand in Folie eingeschweißt und über Nacht exponiert (Autoradiographie in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie bei -70°C; Röntgenfilm: ^{New}RX, Medical X-Ray Film, Fuji, Japan). Zur Bestimmung der X/Y-Koordinaten positiver Klone am Durchlicht-Tisch wurde Millimeterpapier auf eine Klarsichtfolie kopiert und auf die entwickelten Filme gelegt. Diese Vorgehensweise erleichterte die Bestimmung der X/Y-Koordinaten der radioaktiv markierten Klone. Vom RZPD wurden fünf Klone zur näheren Analyse angefordert. Um den Status dieser Klone zu verifizieren, wurden die Klone nach Angaben des RZPDs auf LB-Platten ausgestrichen, Minikulturen gezogen und Restriktionsverdau vorgenommen. Die Restriktionsverdau wurden nach den in den oben angegebenen Protokollsammlungen beschriebenen Standardtechniken auf Nylonmembran (Biodyne B Transfermembran; Firma Pall, Porthmouth, UK) transferiert. Vorher wurde am UV-Durchlichttisch die Position jeder Bande des Markers und der Cosmide auf einer Klarsichtfolie markiert. Mit Hilfe dieser 1:1 Kopie ließen sich dann nach einer Regressionsanalyse die Größen der GluR7-Banden bestimmen. Um falsch positive Klone von der Analyse auszuschließen, wurde die

Membran mit der zuvor für die Cosmid-Filter verwendeten GluR7-Sonde hybridisiert. Eine Rehybridisierung beispielsweise mit einer 3'-spezifischen GluR7-Probe ermöglichte die Identifizierung eines Cosmid-Klons, der die gewünschten genomischen 3'- Bereiche enthielt. Alle Cosmide ließen sich mit GluR7-spezifischen Primern sequenzieren, so dass auf Subklonierungen genomisch relevanter Bereiche verzichtet werden konnte.

4.2.8 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden diente das kommerziell erhältliche Prime-It® II Random Primer Labeling Kit (Stratagene).

Die zu markierende DNA-Sequenz wurde mittels PCR gewonnen. Nach Einbau von [γ -³²P]dCTP wurden die radioaktiv markierten Sonden durch Gelfiltration mittels einer MicroSpin™ S-300 HR-Säule (MoBiTec) aufgereinigt (100µl Endvolumen). Zur Aktivitätsmessung der Sonden wurde die Cerenkov-Strahlung eines Aliquots (1µl ≥ 1x10⁵ cpm) der Probe im Szintillationszähler (LS 1701, Beckman) bestimmt.

4.2.9 Reverse Transcriptase (RT-) Reaktion

Für die Durchführung der cDNA-Erststrangsynthese wurde das entsprechende Protokoll des Herstellers der AMV-RT (Promega) verwendet. Um Qualität und Quantität der cDNA zu erhöhen, wurde das Herstellerprotokoll etwas abgewandelt. Die Reaktion wurde in 0,5ml PCR-Tubes in einem Thermocycler mit Heizdeckel (Biometra) durchgeführt. Je 20µl Gesamtansatz wurden 2-3µg RNA und Oligo(dT)-Primer (p(dT)₁₅, Boehringer) im Überschuß (500ng Primer /1µg RNA) eingesetzt.

RT-Protokoll:

Schritt	Temperatur	Zeit	Vorgang
1	70°C	Pause	Äquilibrieren des Heizblocks und -deckels.
2	70°C	5min	RNA/Primer Gemisch denaturieren, danach RNA/Primer-Ansatz auf Eis.
3	37-42°C	Pause	Äquilibrieren des Heizblocks und -deckels, RT-Reaktionsmix (37-42°C vorgewärmt) zum RNA/Primer Gemisch zugeben und mischen.
4	37-42°C	60-90min	Reverse Transcriptase Reaktion
5	75°C	10min	Hitzeinaktivierung der Reaktion
6	4°C	Pause	Danach Lagerung bei -20°C

Um spätere Verunreinigungen detektieren zu können, wurde immer auch eine Blindprobe (DEPCH₂O statt RNA) angesetzt.

Zur Kontrolle der Reaktionen wurde eine PCR auf das *housekeeping gene* β Aktin durchgeführt. Es wurden nur cDNA-Ansätze weiterverwendet, die nach 30 PCR-Zyklen eine starke Bande im Agarosegel aufwiesen.

4.2.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus cDNA-Ansätzen erfolgte mittels der Polymerase Kettenreaktion. Zur Durchführung der PCR wurde das kommerziell erhältliche „Taq DNA-Polymerase Kit“ (Qiagen) verwendet. Die PCR-Ansätze wurden entsprechend dem Qiagen-Protokoll pipettiert und die PCR danach in einem PCR-*Thermocycler* (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die Primersequenz wurde in der Regel so gewählt, daß die Schmelztemperatur T_m , berechnet nach der Wallace-Regel $T_m = [2 \cdot (A/T) + 4 \cdot (G/C)]$, 66°C ergab. Bei einer *nested* PCR lag die Annealing-Temperatur bei 56±2°C für die äußere (20 Zyklen) und bei 60±2°C für die innere PCR (30 Zyklen).

Allgemeines PCR-Protokoll:

Schritt	Temperatur	Zeit	Vorgang
1	94°C	30sec	Initiale Denaturierung, PCR-Block und –deckel vorgewärmt.
2	94°C	30sec	Denaturierungsschritt
3	54-64°C	30-45sec	Primer-Hybridisierung (<i>annealing</i>)
4	72°C	1-5min	Extension und zurück zu Schritt 2 für den 2.Zyklus.
5	72°C	8-10min	Extension zur Homogenisierung der Produkte
6	4°C	Pause	Danach Lagerung bei 4°C oder Analyse im Agarosegel

Eine β Aktin PCR wurde bei 60°C Annealing, 50sec Extensionszeit und 25-30 Zyklen durchgeführt.

Es folgt eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer:

β Aktin-Primer:

Vorwärtsprimer cs21 5'- CGC TGC GCT GGT CGT CGA CA -3'
 Rückwärtsprimer cs37 5'- GTC ACG CTC GAT TTC CCG CT -3'

Nested-Primer:

GluR1

Vorwärtsprimer, außen	dp05	5'- CTG CAC CGG TTT CCT AGG CGC -3'
Vorwärtsprimer, innen	dp06	5'- CCA GCA GTC ACA GGA ACA TGC -3'
Rückwärtsprimer, innen	dp08	5'- GGG TCT CTT CCA GTC CAC CCG -3'
Rückwärtsprimer, außen	dp07	5'- CTT GAA TTA TCC CCC CCA GCT -3'

GluR2

Vorwärtsprimer, außen	dp09	5'- CAG CAT ACA GAT AGG GGG GC -3'
Vorwärtsprimer, innen	dp10	5'- CCA AGG GGC GCT GAT CAA GAA -3'
Rückwärtsprimer, innen	dp12	5'- GGG AGC TCA GTT AGG GTG AC -3'
Rückwärtsprimer, außen	dp11	5'- GCC CAG ACG TGT CAT TTC CTG -3'

GluR3

Vorwärtsprimer, außen	dp13	5'- GCG TGC TCC GGG CGG TCT -3'
Vorwärtsprimer, innen	dp14	5'- CCG CTT TGC CGT GCA GTT -3'
Rückwärtsprimer, innen	dp16	5'- GAT CTG AGA AAG GCA CAA ACC -3'
Rückwärtsprimer, außen	dp15	5'- GCC AGC TTT TCG AGA GCC ACT -3'

GluR4

Vorwärtsprimer, außen	dp17	5'- GAG GAT TAT TTC CAG ACA GAT -3'
Vorwärtsprimer, innen	dp18	5'- ACT CGC CAT GGG AGC CTT TCC -3'
Rückwärtsprimer, innen	dp20	5'- GAG TGT CCT CTC CAT GTC -3'
Rückwärtsprimer, außen	dp19	5'- CCA TGT ATA AAC CTC TCA AGA -3'

GluR5

Vorwärtsprimer, außen	dp129	5'- GGA GTG GAA CGG GAT GGT TAA A -3'
Vorwärtsprimer, innen	dp130	5'- CAA CCC CCT GTC TCC AGA TAT TT -3'
Rückwärtsprimer, innen	dp132	5'- CCA GTC CGG CAG CCA GAA CA -3'
Rückwärtsprimer, außen	dp131	5'- CCA ATA GCT ACA AAT ACA GAA AGG -3'

GluR6

Vorwärtsprimer, außen	dp139	5'- GAC AAT GGA ATG GAA TGG TTC GT -3'
Vorwärtsprimer, innen	dp140	5'- GAA TCC TCT CTC CCC TGA TAT CT -3'
Rückwärtsprimer, innen	dp142	5'- CAA GCC GGC TGC CAG AAC AAT -3'
Rückwärtsprimer, außen	dp141	5'- CAC TGC CAC AAA AAC TGA AAG CA -3'

GluR7a (U16127), Vorwärtsprimer sind universell für GluR7a, b und c

Vorwärtsprimer, außen	dp115	5'- ATC AGC GCG AAT CTC CAT TTC C -3'
Vorwärtsprimer, innen	dp116	5'- TCA GCT GTG TCC TCT TCG TCA T -3'
Rückwärtsprimer, innen	dp119	5'- GCT GTC CTT GCC GGG AAG CC -3'
Rückwärtsprimer, außen	dp120	5'- GGA GGC TGA GGC TTG TGC TTG A -3'

GluR7b

Rückwärtsprimer, innen	dp117	5'- CTT CCT TCC CTG TCC AAC GCA -3'
Rückwärtsprimer, außen	dp118	5'- GCC TCC TCC AGG GCC TCA C -3'

GluR7c

Rückwärtsprimer, innen	dp98	5'- ATC AGC GCG AAT CTC CAT TTC C -3'
------------------------	------	---------------------------------------

Rückwärtsprimer, außen	dp97	5'- TGT GCC TGG CAC ATA CAG GAG -3'
Ka1		
Vorwärtsprimer, außen	dp135	5'- ACC TGG ACG GGA ATG GTC GG -3'
Vorwärtsprimer, innen	dp136	5'- TTT CTC CGG GCG TCT GGC TC -3'
Rückwärtsprimer, innen	dp138	5'- ACG ATT AAG CCA CAA ATA AGA ACC -3'
Rückwärtsprimer, außen	dp137	5'- CCA ACA TAG CCA TAA AAA TGG CC -3'
Ka2		
Vorwärtsprimer, außen	dp121	5'- TCT CCC CTG CTG TGT GGC TC -3'
Vorwärtsprimer, innen	dp122	5'- TCT TGC CTA CCT GGC TGT CAG -3'
Rückwärtsprimer, innen	dp124	5'- ATG ATG AGG CCA CAG ATG AGC A -3'
Rückwärtsprimer, außen	dp123	5'- ATG ACC GCC ACG AAG ACA GCA -3'

4.2.11 3'-RACE PCR-Primer

Für eine 3'-RACE-PCR gelten allgemein die gleichen Bedingungen wie für eine *nested* PCR, allerdings müssen hier die PCR Bedingungen und Primerkombinationen häufig variiert werden, um zu den gewünschten Banden zu kommen. In der Tabelle sind lediglich die Primer-Kombinationen gezeigt, die zu einem Ergebnis führten.

GluR5

Vorwärtsprimer, außen	bp57	5'- CGG AAG AAT AAT GAT ATT GAA CAG -3'
Vorwärtsprimer, innen	bp56	5'- CTG GGA ATC TCA CTG AAG A -3'

GluR7

Vorwärtsprimer, außen	dp89	5'- CATATCATGAAGGAGAAGTGGTG -3'
Vorwärtsprimer, innen	dp68	5'- AGA TCG GGG GCA TCT TCA TTG T -3'

Ka2

Vorwärtsprimer, außen	dp92	5'- GCCTTCCTGCTGGAGTCCAC -3'
Vorwärtsprimer, innen	dp91	5'- CCTGCTGGAGTCCACCATGAA -3'

3'-RACE Primer, universelle Rückwärtsprimer

Adapterprimer 1, AP 1	dp134	5'- CCA CGC GTC GAC TAG TAC T -3'
Adapterprimer 2, AP 2	dp133	5'- CCA CGC GTC GAC TAG TAC TTT TTT TTT TTT TTT TTT -3'

4.2.12 Klonierung offene Leseraster

Hierfür wurde die *Pfu* DNA Polymerase (Promega) verwendet, weil sie eine 3'-5' Exonuklease (*proofreading*) Aktivität besitzt und so den Einbau falscher Nukleotide verringert. Die erwartete Länge der Fragmente lag bei ca. 3,0 kb. Die Dauer des Amplifizierungsschritts betrug 4,5min.

GluR5-2b

Vorwärtsprimer, außen	dp125	5'- GTT GGG TGC ATC TCT CGG GC -3'
Vorwärtsprimer, innen	dp126	5'- AGC GGC TGT ATC TCG GCA TGA -3'
Rückwärtsprimer, innen	dp128	5'- CCT TTT TCT TCC TAC AGG CGT TT -3'
Rückwärtsprimer, außen	dp127	5'- CCA AGT CAT ATC TAT GTG AGC TTT -3'

GluR7a und c

Vorwärtsprimer, außen	dp109	5'- GCC CAA CGA TGA CCG CTC CCT -3'
Vorwärtsprimer, innen	dp110	5'- GAT GAC CGC TCC CTG GCG GC -3'

GluR7a

Rückwärtsprimer, innen	dp150	5'- GTT GTG CCT AGG GGA ACA CAG -3'
Rückwärtsprimer, außen	dp151	5'- CCA GTT GTG CCT AGG GGA ACA -3'

GluR7c

Rückwärtsprimer, innen	dp98	5'- ATC AGC GCG AAT CTC CAT TTC C -3'
Rückwärtsprimer, außen	dp97	5'- TGT GCC TGG CAC ATA CAG GAG -3'

4.2.13 DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung klonierter oder isolierter DNA-Fragmente und Plasmide erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (ABI Prism™ *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*) der Firma Perkin Elmer (Weiterstadt). Der Reaktionsansatz, die notwendige Amplifikationsreaktion (*Personal Cycler*, Biometra, Göttingen), Aufreinigung und Fällung erfolgten gemäß den Angaben im Arbeitsprotokoll des Herstellers. Die anschließende gelelektrophoretische Analyse der Sequenzierung erfolgte im Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie der Universität Hamburg bzw. in der Abteilung Zelluläre Immunologie des Heinrich Pette Instituts.

Je nach Plasmid wurden Promotor spezifische T3 oder T7 Primer verwendet bzw. die kommerziell erhältlichen pUC-Primer (reverse: #1233, #1201; forward: #1211; New England Biolabs, Schwalbach).

Die fünf Cosmid-Klone konnten mit T7- und SP6-Promotor spezifischen bzw. GluR7-spezifischen Primern sequenziert werden. PCR-Fragmente konnten in der Regel nach Aufreinigung ebenfalls mit Gen spezifischen Primern direkt sequenziert werden.

Cosmid Lawrist 4

Primer (T7-Promotor)	L4seqfor	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'
Primer (SP6-Promotor)	L4seqrev	5'- GAT TTA GGT GAC ACT ATA GAA -3'

Genomisch *grik3* und cDNA *GluR7a-c*; 5' vor TM IV

Genspezifischer Sequenzierprimer	dp144	5'- GGG CAG CGG GTG TCC TGA G -3'
----------------------------------	-------	-----------------------------------

Als Software zur Analyse der erhaltenen Sequenzen dienten die Programme DNASIS (Hitachi Software Engineering Co., Ltd. 1984, 1991) und DNASTAR (Dnastar, Inc., Madison, USA, 1998-99).

4.2.14 T7 RNA -Synthese

Die als Templates verwendeten Plasmide besaßen 5' vom Start-Codon die T7 Promotor Sequenz und 3' vom Stop-Codon eine unique Schnittstelle, *HindIII* für den Leserahmen von *GluR5* in pCR[®]-XL-TOPO, *XbaI* für die beiden Leserahmen der *GluR7*-Varianten in pBluescript. Beide Enzyme produzieren keine 3'-Überhänge wie beispielsweise *KpnI* oder *PstI*. 3'-Überhänge führen zu geringeren capped RNA(cRNA)-Ausbeuten. Nach ca. 12h Restriktionsverdau von ca. 10-15µg Plasmid-DNA wurde mit Phenol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Chloroform extrahiert. Danach die linearisierte DNA mit abs. EtOH (300Vol% und Zusatz von 10Vol% 3M NaAc pH 5,0) gefällt, mit 70% EtOH gewaschen, einige Minuten gefriergetrocknet, in 10µl DEPC₂O aufgenommen und je ein Aliquot zur Kontrolle gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zur Synthese der cRNA wurde der mMessageMachine-Kit der Firma Ambion (Austin, USA) verwendet. Der 20µl Ansatz (in 0,5ml PCR-Tubes) für die *in vitro* Transkription enthielt 1µg (max. 6µl) linearisierte DNA, 2µl 10x Enzym-Mix, 2µl 10x Transkriptionspuffer und 10µl 2x Ribonukleotid-Mix. Die Reaktion wurde bei 37°C für 2h in einem Thermocycler mit Heizdeckel durchgeführt. Es folgte ein DNase-Verdau 15min, 37°C. Die Reaktion wurde mit DEPC₂O auf 150µl aufgefüllt. Die folgende Phenol-Extraktion und Isopropanol-Fällung der cRNA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zentrifugiert wurde bei 4°C in einer Tischzentrifuge mit Horizontaler Ausrichtung. Nach Waschen mit 70% DEPCEtOH wurde das cRNA-Pellet kurz gefriergetrocknet und über Nacht bei 4°C mit 20µl DEPC₂O in Lösung gebracht. Ein Mikroliter cRNA wurde auf ein 0,8% TBE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (RNase-freies Arbeiten). Ein weiteres Aliquot wurde für eine genauere Konzentrationsbestimmung verwendet. Der dabei eingesetzte sehr sensitive Fluoreszenzfarbstoff RiboGreen[™] (Molecular Probes, Leiden, NL) eignet sich besonders für die Quantifizierung von RNA in Lösung (La-

ser-Anregungswellenlänge $\lambda_A = 485 \pm 10 \text{ nm}$; -Emissionswellenlänge $\lambda_E = 530 \text{ nm} \pm 12,5 \text{ nm}$). Anhand verschiedener ribosomaler RNA-Verdünnungen (20ng/ml bis 1 $\mu\text{g/ml}$) konnte eine Eichkurve erstellt werden, mit Hilfe derer dann die RNA-Konzentration der Proben bestimmt werden konnte. Diese Arbeiten wurden mit Hilfe von Dr. D. Isbrandt und Mitarbeitern am Zentrum für Molekulare Neurobiologie und Hormonforschung in Hamburg durchgeführt.

4.3 Zellbiologische Methoden

4.3.1 Hämatopoetische Zellen

CD34-positive (CD34⁺) bzw. CD34-negative (CD34⁻) Blutzellen: Diese Primärzellen wurden *ex vivo* aus Nabelschnurblut isoliert. Das Nabelschnurblut wurde mit PBS (2mM EDTA) 1:3 verdünnt auf 15ml Ficoll geschichtet und zentrifugiert (30min; 1700rpm). Die CD34-positiven Zellen konnten angereichert und von den CD34-negativen Zellen getrennt werden, indem die Ficoll-Interphase über eine magnetische Immunselektionstechnik aufgereinigt wurde (CD34 Isolation Kit, Milteny Biotec, Bergisch Gladbach). Die so aufkonzentrierten CD34-positiven Zellen ($\sim 10 \times 10^5$ je nach Qualität des Ausgangsmaterials) wurden zwei Tage in Gegenwart eines Wachstumsfaktor-Cocktails (Medium: BIT 9500, CellSystems Biotechnologie, St. Katharinen; Wachstumsfaktoren: SCF 100ng/ml; Flt-3 100ng/ml Il-3: 20ng/ml, Boehringer Mannheim bzw. Tebu GmbH, Frankfurt/M) stimuliert. Die CD34-negativen Zellen ($\sim 2 \times 10^8$) wurden abzentrifugiert und in RPMI/FCS (\varnothing 15cm Zellkulturschale) aufgenommen. Die nach 12-24h adhärent wachsenden Zellen (mononukleäre Zellen, meist Monozyten/Makrophagen-ähnlich) wurden zur RNA-Präparation mit einem Nunc-Schaber geerntet. Unter diesen Bedingungen teilten sich die Zellen höchstens ein weiteres Mal.

TF-1: Frühe humane, erythromyeloide Vorläuferzelle (CD34-positiv; ATCC-No: CRL-2003), die etabliert wurde aus einem Patienten mit Erythroleukämie (T. Kitamura, T. Tange, *et al.* 1989). Streng Wachstumsfaktor abhängig (IL3 oder GM-CSF) wachsende Suspensionszelllinie, die nach Tetraphorbolmyristacetat (TPA)-Behandlung in Makrophagen-artige Zellen differenzieren. Bei Wachstumsfaktorentzug (TF1-GMCSF) für 30h stoppt die Proliferation und die Zellen gehen in die Apoptose.

Faktorunabhängige TF-1 Mutanten: Die verwendeten Faktor unabhängigen Mutanten wurden aus zuvor retroviral infizierten TF-1 Zellen etabliert (C. Stocking, U. Bergholz, *et al.* 1993). Die verwendete TF-1 Mutante 29A enthielt beispielsweise nur eine retrovirale Integration im *grik1*-Lokus (B. Fehse 1996).

Stroma abhängige TF-1 Klone: Auf einer zuvor letal bestrahlten MS-5 Einfachzellschicht konnten nach ca. drei Monaten Stroma abhängige TF-1 Klone etabliert werden, die ohne Wachstumsfaktoren proliferierten (C. Heberlein, J. Friel, *et al.* 1999).

MO-7e: Humane megakaryoblastische Vorläuferzelllinie (G.C. Avanzi, M.F. Brizzi, *et al.* 1990), die wie TF-1 CD34-positiv ist und GM-CSF bzw. IL-3 abhängig wächst.

U-937: Humane, CD34-negative Promonozyten/Makrophagen-artige Suspensionszelllinie (ATCC-No: CRL-1593.2), die aus einem Patienten mit histiozytischem Lymphom erhalten wurde. Differenzierung zu terminalen Monozyten induzierbar u.a. durch RA, Phorbol ester und Vitamin D3 (C. Sundström & K. Nilsson 1976).

K-562: Humane, CD34-negative, chronisch-myelogene Leukämie-Zelllinie (ATCC-No: CCL-243), die spontan in Vorläufer der erythroiden, granulozytischen oder monozytischen Reihe differenzieren kann (E. Klein, H. Ben-Bassat, *et al.* 1976).

HL-60: Humane, CD34-negative myeloide Zelllinie (ATCC-No: CCL-240) etabliert aus Zellen des peripheren Blutes einem Patienten mit akuter promyelozytischer Leukämie (O. Al-almi, J. Sammons, *et al.* 1998). Diese Suspensionszelllinie differenziert spontan und nach chemischem Stimulus (RA, TPA u.a.).

Jurkat: Humane leukämische T-Zelllinie (ATCC-No: TIB-152). T-Zellmodell, jedoch mit unterschiedlichem Aktivierungsmuster gegenüber T-Zellen *in vivo*. Jurkat-Zellen sind in der Lage beispielsweise durch Phorbol ester-Behandlung große Mengen an IL-2 auszuschütten (A. Weiss & J.D. Stobo 1984).

4.3.2 Weitere Zellen

MS-5: Murine Stroma-Zelllinie, die verwendet wurde, um alternativ Langzeit-Wachstum von TF-1 Zellen ohne Wachstumsfaktor zu etablieren (K. Itoh, H. Tezuka, *et al.* 1989).

NT-2: Neuronal determinierte pluripotente Zelllinie (ATCC No: CRL-1973), die induziert durch RA in neuroektoderme Linien ausdifferenziert. Ursprung der adhären wachsenden NT-2 Zellen waren Lungenmetastasen eines 22-jährigen, männlichen Kaukasiers, der an germinativem Hodenkrebs erkrankt war (Tera-2). Transplantation dieser Zellen in Nacktmäuse entwickelten einen Tumor, der embryonale Karzinomazellen enthielt. Aus diesem Tumor wurde die Ntera-2 Linie entwickelt. Zur weiteren Erhöhung der Uniformität wurden verschiedene Klone etabliert. Die auch in dieser Arbeit verwendete Linie NT-2/D1 ist der am häufigsten verwendete Zellklon (S.J. Pleasure, C. Page, *et al.* 1992).

4.3.3 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden dreimal pro Woche in frisches Medium umgesetzt, in der Regel 1:5 verdünnt. Gehalten wurden die Zellen in unbehandelten Zellkultur-Schale (Ø 9cm, 15cm) oder -Flaschen adäquater Größe. Die adhären wachsenden Zellen MS-5 und NT-2 wurden bei ca. 80% Konfluenz mit einer 1x Trypsin/EDTA-Lösung (10x Trypsin/EDTA in PBS, Biochrom KG, Berlin) von der Oberfläche gelöst und umgesetzt.

Das möglicherweise noch aktive Komplementsystem der verwendeten Seren wurde bei 56°C, 30min inaktiviert. Alle Medien enthielten 1% Penicillin/Streptomycin (5000IU/ml Penicillin, 5000µg/ml Streptomycin, Gibco BRL, Paisley, UK) und 2% Glutamin (200mM). Alle Zelllinien wurden in Brutschränken (Heraeus, Hanau) bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ gehalten.

IMDM-Medium (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco BRL, Paisley, UK) unter Zusatz von 20% (v/v) FCS (*fetal calf serum*, Fötales Kälberserum, PAN Systems, Aidenbach) und 1% Natriumpyruvat für U-937, HL-60 und MO-7e (human IL-3, Konzentration konnte bis 2ng/ml gesenkt werden; Böhringer, Mannheim).

RPMI-Medium (RPMI1640, 1x, Gibco BRL, Paisley, UK) zugesetzt wurden 1% Natriumpyruvat, 10% FCS (Gibco BRL), und 1% humanes GM-CSF für TF-1.

α -MEM-Medium (Minimum Essential Medium, 1x,) mit 20% Pferdeserum (v/v; BioWhittaker UK Ltd., Berkshire, UK) für die MS-5 Kultur.

OptiMEM-I (1x, Gibco BRL, Paisley, UK) unter Zusatz von 5% FCS (v/v; Linaris, Bettingen/Main): Kultur der NT2-Zelllinie.

4.4 Elektrophysiologische Methoden

4.4.1 Präparation von Oozyten aus *Xenopus laevis*

Weibliche Krallenfrösche der Spezies *Xenopus laevis* wurden durch Einlegen (15min) in 0,17%ige Tricain-Lösung anästhesiert und Teile des Ovars operativ entnommen. Nach Präparation der Oozyten wurden sie 5-10min bei RT in 1mg/ml Kollagenase Typ II (Sigma,) inkubiert und bis zur Injektion in modifizierter Barths Lösung bei 4°C aufbewahrt.

4.4.2 Injektion von cRNA in *Xenopus* Oozyten

Injektionspipetten wurden aus Glaskapillaren (Drummond) mit einem Horizontalpipettenzieher (Sutter) hergestellt. Diese wurden mit Silikonöl DC200 (Sigma) gefüllt und in eine Nanoliterpipette (Drummond) eingespannt. Von der hergestellten cRNA-Lösung wurde 1 μ l aufgenommen und jeweils 50nl (20-25ng) pro Oozyte injiziert. Nach der Injektion wurden die Oozyten 2-4 Tage bei 16°C in Barths Lösung gehalten.

4.4.3 2-Elektroden Spannungsklemme (*voltage clamp*)

Beim Verfahren der 2-Elektroden Spannungsklemme kann der Stromfluß durch Ionenkanäle in der Oozytenmembran in Abhängigkeit vom Membranpotential gemessen werden. Die elektrophysiologischen Arbeiten wurden mit Hilfe von Dr. M. Schwarz und Dr. R. Bähring am Zentrum für Molekulare Neurobiologie und Hormonforschung in Hamburg durchgeführt. Da jedoch dieses Verfahren keine brauchbaren Ergebnisse lieferte, soll an dieser Stelle auf die nähere Beschreibung verzichtet werden.

5. Ergebnisse

5.1 Expression ionotroper Glutamat Rezeptoren

Um die im Kapitel 3.5 formulierten Fragestellungen beantworten zu können, wurde ein auf der RT-PCR basierender Expressionsassay etabliert. Mit Hilfe bekannter Sequenzdaten wurde pro AMPA/Kainat-Untereinheit ein inneres und ein äußeres Primerpaar synthetisiert. Diese Methode mit sogenannten *nested* Primerpaaren, die in Abb.6 näher skizziert ist, gilt als hochspezifisch und sehr selektiv. Sie ermöglichte auch die Analyse geringer Zellzahlen.

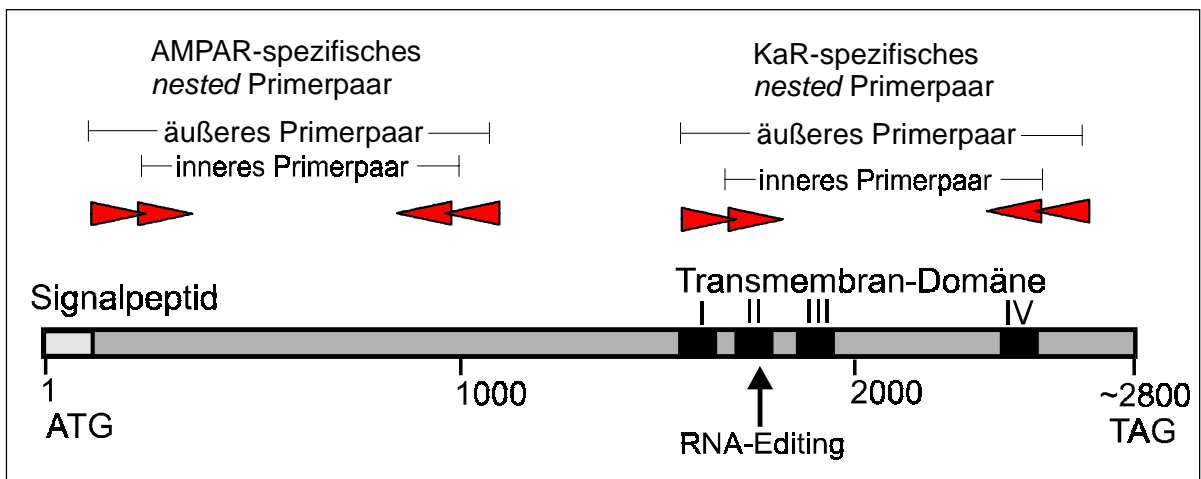


Abb. 6: Strategie der RT-PCR mit *nested* Primern.

Die so erhaltene PCR-Banden des Expressionsassays sind lediglich von qualitativer Natur. Eine quantitative Aussage kann aufgrund der auf der *nested* PCR basierenden Methode nicht getroffen werden. Die erhaltenen PCR-Fragmente entsprachen der zuvor errechneten Größe, wurden aber zur Sicherheit subkloniert und ansequenziert bzw. direkt sequenziert. Die Banden der Kainat-Rezeptoren wurden zur Überprüfung der Spezifität und Selektivität des Assays zusätzlich mit Untereinheiten spezifischen Restriktionsenzymen gespalten. Ein Abgleich mit bekannten Sequenzdaten bestätigte die hohe Spezifität und Selektivität der gewählten Methode. Es handelte sich bei den erhaltenen Fragmenten um die jeweils untersuchte Untereinheit. Jede durchgeführte PCR enthielt immer eine H₂O Blindprobe zur Kontrolle eventuell auftretende Kontaminationen der cDNAs.

Da die retrovirale Insertion in den GluR5-Lokus erfolgte und diese Untereinheit zur Familie der Kainat-Rezeptoren gehört, lag der Schwerpunkt der Analyse auf diese Unterfamilie der ionotropen Glutamat-Rezeptoren. Ein funktionierender Rezeptor wird *in vivo* stets von mindestens zwei Untereinheiten einer Unterfamilie gebildet. Für die Familie der Kainat-Rezeptoren gilt zusätzlich, dass ein funktionsfähiger Ionenkanal aus mindestens einer *low affinity* Untereinheit bestehen muß, d.h. in der TF-1 Mutante 29A sollte neben der hoch exprimierten *low affinity* GluR5-Untereinheit noch mindestens eine weitere Untereinheit aus der *high affinity* oder *low affinity* Gruppe detektierbar sein. Ein Rezeptorkomplex, der nur aus den *high affinity* Untereinheiten Ka1 und Ka2 besteht, bildet *in vitro* keinen funktionellen Kanal (C. Cui & M.L. Mayer 1999).

Im TF-1 Modell wurde zusätzlich überprüft, ob in hämatopoetischen Zellen neben der KaR-Unterfamilie auch die Mitglieder der AMPA-Rezeptoren GluR1-4 exprimiert werden. Auch diese Unterfamilie bildet ausschließlich heteromere Proteinkomplexe.

Die ebenfalls zur Gruppe der iGluRs gehörenden NMDA-Rezeptoren NR1, NR2a-d und NR3 wurden aufgrund ihrer besonderen Physiologie nicht in die Analyse miteinbezogen. Außerdem ist für diese Unterfamilie bereits gezeigt, dass sie unter gewissen Bedingungen in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden können (J.D. Malone, M. Richards, *et al.* 1986). Die Tabelle 2 verdeutlicht zusätzlich die amplifizierten cDNA-Abschnitte.

Tabelle 2: AMPA/Kainat-Rezeptoren

Rezeptor		EMBL/Gen-Bank AcNo.	Vorwärtsprimer		Rückwärtsprimer		Größe innere PCR [bp]
			außen	innen	innen	außen	
AMPA	GluR1	S40299	dp05	dp06	dp08	dp07	760
	GluR2	L20841	dp09	dp10	dp12	dp11	1090
	GluR3	U10301	dp13	dp14	dp16	dp15	1020
	GluR4	U16129	dp17	dp18	dp20	dp19	690
Kainat	GluR5	U16125	dp129	dp130	dp132	dp131	900
	GluR6	U16126	dp139	dp140	dp142	dp141	820
	GluR7	U16127	dp115	dp116	dp120	dp119	910
	Ka1	S67803	dp135	dp136	dp138	dp137	820
	Ka2	S40369	dp121	dp122	dp124	dp123	790

5.1.1 Das TF-1 Modell

Neben der Vorläufer-Zelllinie TF-1 und den Wachstumsfaktor unabhängigen TF-1 Mutanten 29A, 3/1, 10/1 und 33/3 wurde zudem zwei Stroma abhängige Klone verwendet TF-1s und TF-1s MB#8. Diese Klone zeigten Faktor unabhängiges Langzeitwachstum durch Zell/Zell-Kontakt, wenn sie in Kokultur mit der Mausstroma Zelllinie MS-5 gehalten werden. Die TF-1s Zelllinie kann daher als Stroma abhängig betrachtet werden (C. Heberlein, J. Friel, *et al.* 1999). Ebenfalls in die Analyse miteinbezogen wurden Wachstumsfaktor-abhängige TF-1 Zellen, denen man für 30h den Wachstumsfaktor GM-CSF entzogen hatte (TF-1-GMCSF). Sie proliferieren nicht mehr, sondern sollten den programmierten Zelltod einleiten.

Die RT-PCR Analyse für die AMPA-Rezeptoren ist in Abb.7 exemplarisch an den Untereinheiten GluR1 und GluR4 gezeigt.

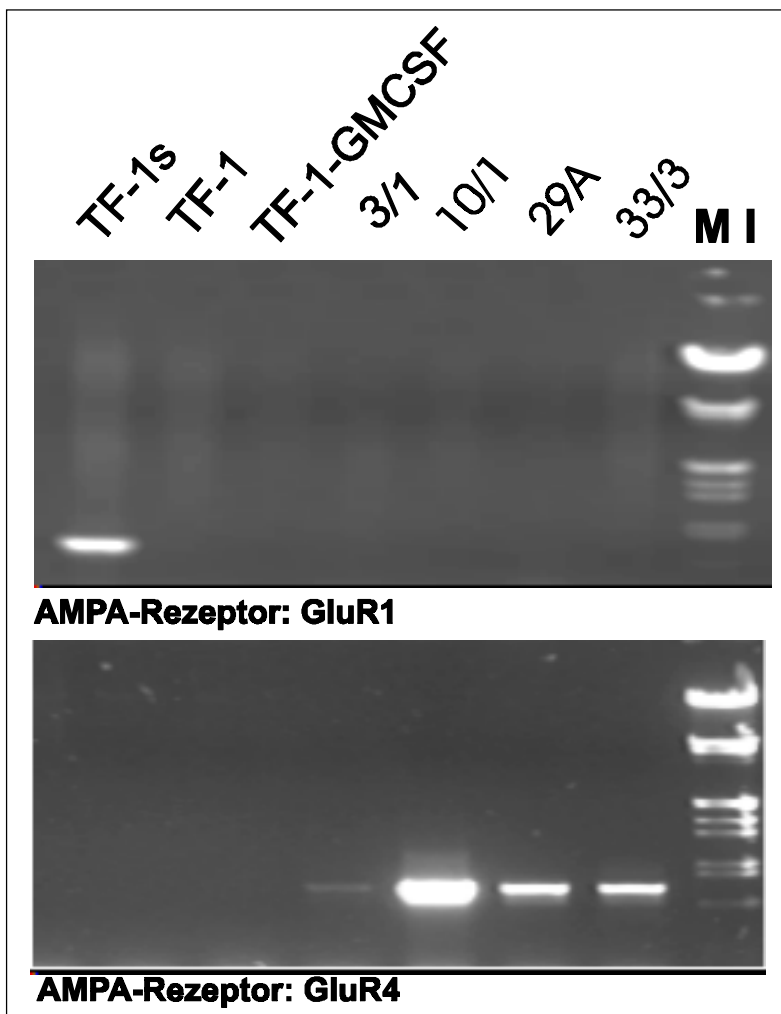


Abb. 7: Expressionsassay AMPA-Rezeptor GluR1 und GluR4 im 1%igen TAE-Agarosegel; Marker I (M I): 500ng λ DNA Standard (*EcoRI/HindIII*-Spaltung)

Die Analyse zusammengefasst in Tabelle 3 zeigt, dass in der Stroma abhängig wachsenden TF-1 Mutante ein heteromerer AMPA-Rezeptorkomplex vornehmlich aus den Untereinheiten GluR1 und GluR3 bestehen sollte. Alle verwendeten TF-1 Mutanten exprimieren ausschließlich die GluR4-Untereinheit erhöht. Hier sollte ein funktionierender Ionenkanal vom GluR4 Rezeptor dominiert werden. In der Wildtyp TF-1 Zelle und in der TF-1 Zelle, der man zuvor den Wachstumsfaktor für 30h

entzog, lag eine mögliche AMPAR-Expression unter der Nachweisgrenze des Assays. Die AMPA-Untereinheit GluR2 konnte in keiner TF-1 Zelle detektiert werden, d.h. wenn in einer der TF-1 Zellen ein AMPA-Rezeptorkomplex exprimiert wird, so findet dies ohne bzw. mit äußerst geringer Beteiligung der GluR2-Untereinheit statt.

Tabelle 3: AMPA-Rezeptoren im TF-1 Modell

	Zelle	GluR1	GluR2	GluR3	GluR4
TF-1 Modell	TF-1	-	-	-	-
	TF-1-GMCSF	-	-	-	-
	TF-1s	+	-	+	-
	TF-1 Mutante 29A	-	-	-	+
	TF-1 Mutante 3/1	-	-	-	+
	TF-1 Mutante 10/1	-	-	-	+
	TF-1 Mutante 33/3	-	-	-	+

Unter bestimmten Bedingungen findet im TF-1 Modell AMPA-Rezeptor Expression statt. In der TF-1 Mutante 29A, in der nach Integration eines Retrovirus im GluR5-Lokus dieses Gen erhöht exprimiert wurde, würde also ein ebenfalls exprimierter heteromerer AMPA-Rezeptorkomplex vornehmlich von der Untereinheit GluR4 dominiert werden. Da keine weitere AMPA-Untereinheit über der Nachweisgrenze des Assays lag, kann über die Zusammensetzung des heteromeren Komplexes keine Aussage getroffen werden.

Die Expression der Kainat-Rezeptoren im TF-1 Modell wurde auf ähnliche Weise wie für die AMPARs getestet. Hierbei sollte auch die Frage beantwortet werden, welche *high affinity* Untereinheit zusammen mit der hoch exprimierten *low affinity* Untereinheit GluR5 in der Mutante 29A an der Bildung eines funktionalen heteromeren Kainat-Rezeptorkomplexes beteiligt ist. Alle fünf Mitglieder der Kainat-Rezeptorfamilie wurden mit Hilfe der *nested* RT-PCR untersucht. Zusätzlich zu den zuvor erwähnten TF-1 Zellen wurde in den Assay die murine MS-5 Stroma-Zelllinie aufgenommen. Sie sollte im Assay als Negativkontrolle fungieren, da von ihr nicht bekannt ist, dass sie neuronale Kanäle exprimiert. Die synthetisierten Primer waren derart gestaltet, dass sie sowohl humane als auch murine Untereinheiten detektieren sollten. Allerdings lagen für Ka1 und GluR7 keine Mausequenzen in den Datenbanken vor, so dass auf Rattensequenzen zurück gegriffen wurde.

In Abbildung 8 sind exemplarisch für die KaRs zwei Gele gezeigt. Der GluR5-Untereinheit, die zur *low affinity* Gruppe gehört, wurde die *high affinity* Untereinheit Ka2 gegenübergestellt.

Aus Abb.8 und der folgenden Tabelle wird ersichtlich, dass im TF-1 Modell pro untersuchter KaR-Untereinheit wie bei den AMPA-Rezeptoren deutliche Unterschiede feststellbar sind. Die autonom wachsende Mutante 29A exprimiert drei Untereinheiten, neben den *low affinity* Untereinheiten GluR5 und GluR7 ist dies die *high affinity* Untereinheit Ka2. Am oligomeren Kainat-Rezeptorkomplex können also mindestens drei Untereinheiten beteiligt sein.

Die Wildtyp TF-1 Zelle, die keine AMPA-Untereinheit exprimiert, zeigt erhöhte Expression der *high affinity*

Kainat-Rezeptoren Ka1 und Ka2. Die *high affinity* Ka2-Untereinheit kann außer in der Stroma abhängig wachsenden Zelle TF-1s in allen untersuchten Zellen des TF-1 Modells an der Bildung eines heteromeren Kainat-Rezeptorkomplexes beteiligt

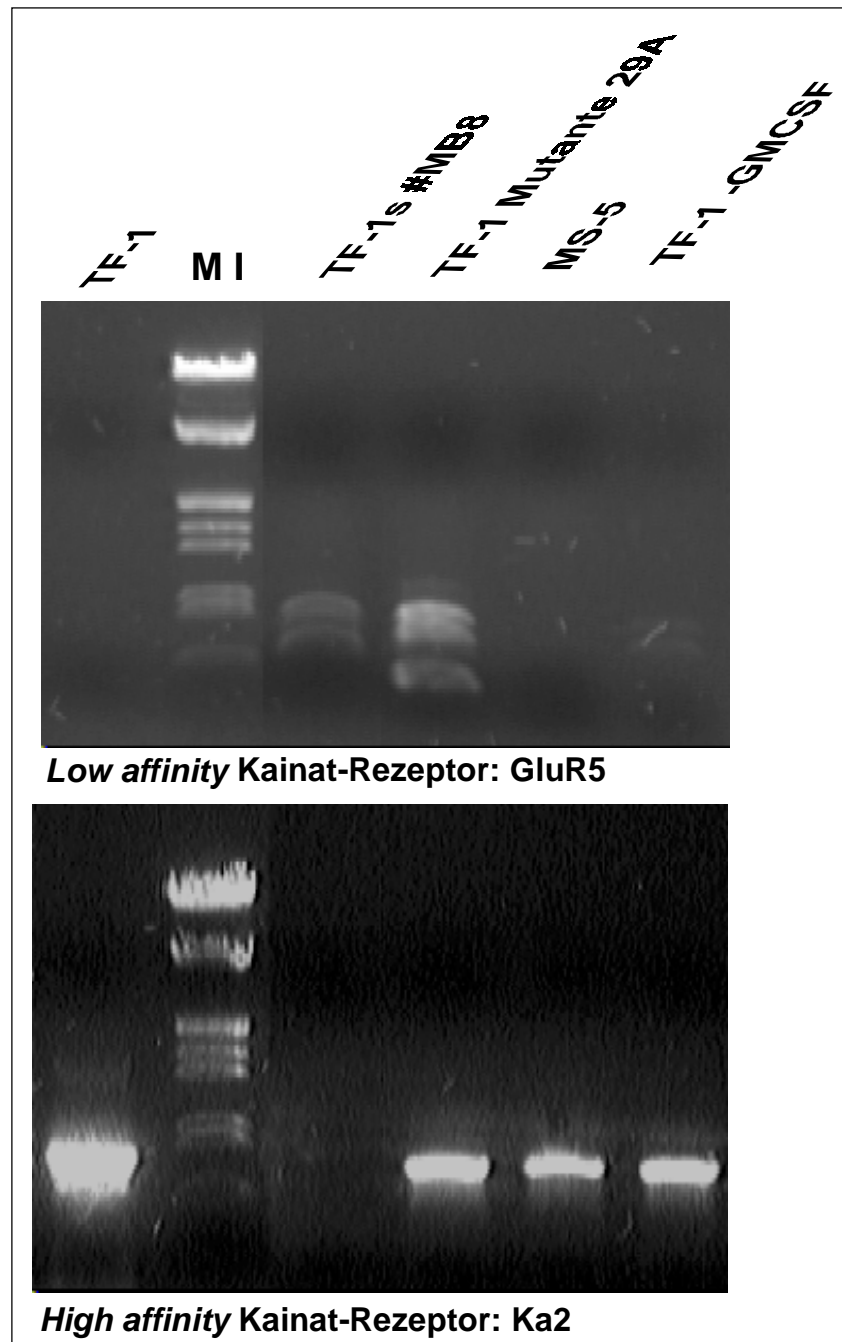


Abb. 8: Expressionsassay Kainat-Rezeptoren TF-1 Modell im 1%igen TBE-Agarosegel; Marker I (M I): 500ng λ DNA Standard (*EcoRI/HindIII*-Spaltung)

sein. In der Zelle TF-1s sollte ein KaR-Komplex vornehmlich aus den *low affinity* Untereinheiten GluR5 und GluR6 gebildet werden. Die TF-1 Zelle, der man den Wachstumsfaktor GM-CSF entzog, zeigte gegenüber der Wildtyp-Form erhöhte Expression der GluR5- statt der Ka1- Untereinheit. Überraschenderweise konnten in der als Negativkontrolle eingesetzten MS-5 Zelllinie erhöhte Transkriptmengen von GluR6 und Ka2 detektiert werden, d.h. auch nicht neuronale, nicht hämatopoetische Zellen besitzen die Möglichkeit, einen ionotropen Glutamat-Rezeptorkomplex zu exprimieren.

Tabelle 4: Kainat-Rezeptoren im TF-1 Modell

TF-1 Modell	Zelle	Low affinity Ka-Rezeptor			High affinity Ka-Rezeptor	
		GluR5	GluR6	GluR7	Ka1	Ka2
	TF-1	-	-	-	+	+
	TF-1-GMCSF	+	-	-	-	+
	MS-5	-	+	-	-	+
	TF-1 Mutante 29A	+	-	+	-	+
	TF-1s (#MB8)	+	+	-	-	-

5.1.2 Weitere hämatopoetische und neuropoetische Zellen

Neben den verschiedenen TF-1 Zellen wurden zusätzlich andere Zellen getestet. Darunter befanden sich zwei mit Hilfe magnetischer Trenntechniken gewonnene Fraktionen primärer hämatopoetischer Zellen. In der ersten Fraktion wurden Zellen aufkonzentriert, die wie TF-1 den Stammzellmarker CD34⁺ trugen, also Blutzellen mit Vorläuferpotential. Bei der zweiten Fraktion handelte es sich um CD34-depletierte, mononukleäre Blutzellen (CD34⁻).

Um zumindest näherungsweise die Vielfalt der unterschiedlichen Zellen des Blutes zu berücksichtigen, wurden außerdem verschiedene hämatopoetische Zelllinien auf Kainat-Rezeptorexpression getestet. Darunter befanden sich sowohl Zellen, die wie TF-1 einen erythroiden Hintergrund besaßen (K-562 und MO-7e) als auch Zellen, die der lymphoiden (Jurkat) bzw. der myeloiden (HL-60, U-937) Reihe zuzurechnen sind. Die Zelllinie MO-7e trägt wie TF-1 den Stammzellmarker CD34.

Als Positivkontrollen wurden im Assay zusätzlich neuronale Zellen untersucht. Hierfür wurde die RNA aus dem Gesamtgehirn einer Maus verwendet sowie die neuronal determinierte humane Zelllinie NT-2 in die Analyse mit einbezogen. NT-2 differenziert nach Retinsäure-Behandlung in Neurone, exprimiert aber auch ohne Stimulus mindestens die AMPA/Kainat-Rezeptoren GluR2, GluR6, GluR7 und Ka1 in einem detektierbaren Rahmen (M. Hardy, D. Younkin, *et al.* 1994). Abbildung 9 zeigt das Expressionsmuster der Kainat-Rezeptoren GluR5 und Ka2 für diese Zellen.

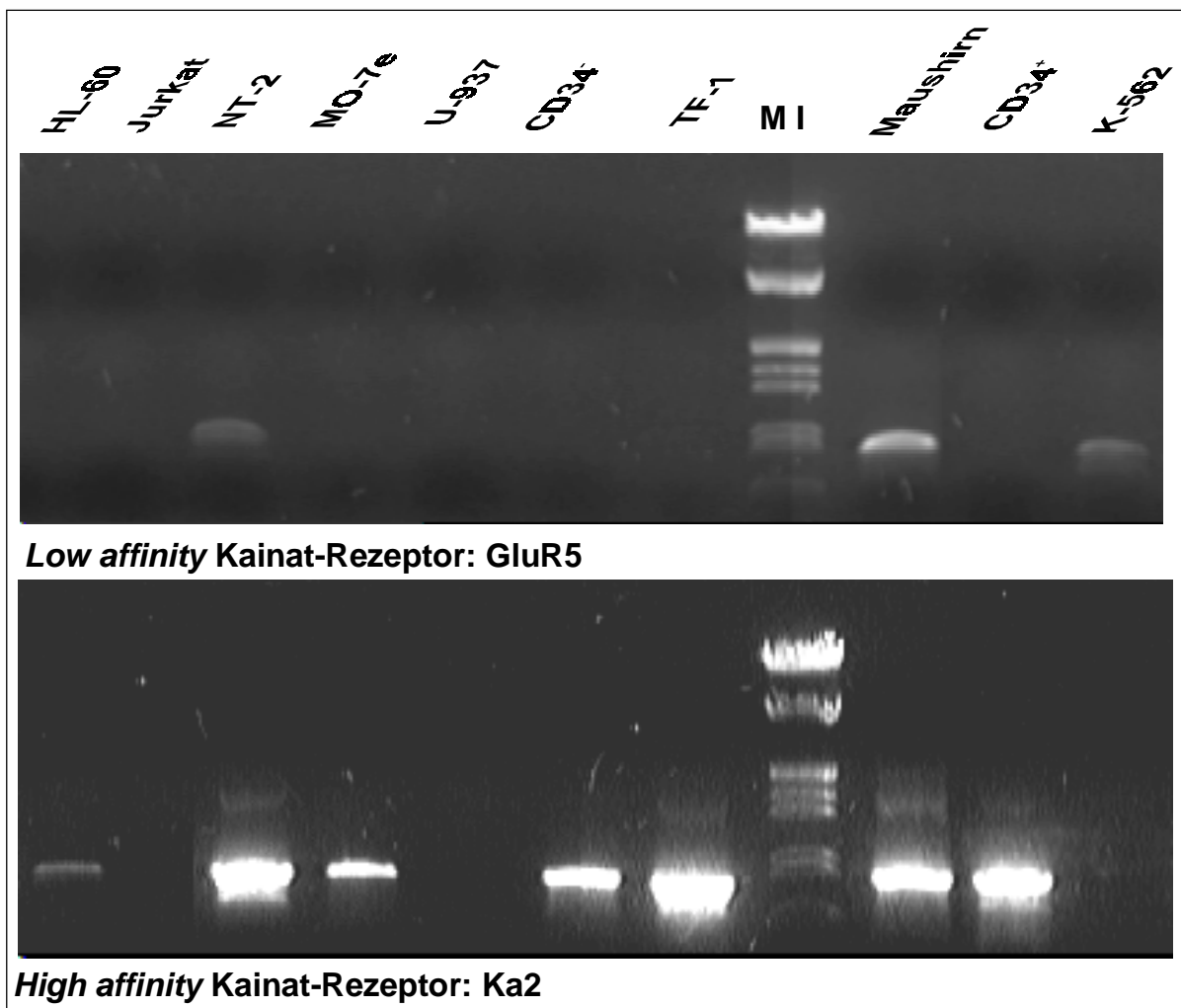


Abb. 9: Expressionsassay Kainat-Rezeptoren hämatopoetische/neuropoetische Zellen im 1%igen TBE-Agarosegel; Marker I (M I): 500ng λ DNA Standard (*EcoRI/HindIII*-Spaltung)

Auffällig ist, dass die CD34-positiven, Wachstumsfaktor abhängigen Vorläufer-Zelllinien (MO-7e, TF-1) bzw. CD34-positiven Primärzellen nur die *high affinity* Kainat-Rezeptoren verstärkt exprimieren. In diesen Zellen lag keine *low affinity*

Untereinheit über der Nachweisgrenze des Assays. Ein heteromerer Ionenkanal wird hier vornehmlich aus den *high affinity* Untereinheiten bestehen.

Für die übrigen CD34-negativen Zellen lag mindestens eine Untereinheit über der Nachweisgrenze. Dies war GluR5 für die erythro-monozytische Zelllinie K-562, GluR7 für die Promonozyten/Makrophagen-artige Zelle U-937 und Ka2 für HL-60, die einen prämyelozytischen Hintergrund besitzt. Nur in der Jurkat Zelle konnte überhaupt keine Untereinheit detektiert werden.

Tabelle 5 faßt die Expressionsdaten dieser Zellen zusammen und stellt sie der TF-1 Zelle gegenüber:

Tabelle 5: Expressionsmuster der Kainat-Rezeptoren in verschiedenen Zellen

Zelltyp		Low affinity Ka-Rezeptor			High affinity Ka-Rezeptor	
		GluR5	GluR6	GluR7	Ka1	Ka2
CD34-positiv	TF-1	-	-	-	+	+
	Primäre Zellen	-	-	-	-	+
	MO-7e	-	-	-	+	+
CD34-negativ	Primäre Zellen	-	-	-	+	+
	K-562	+	-	-	-	-
	U-937	-	-	+	-	-
	Jurkat	-	-	-	-	-
	HL-60	-	-	-	-	+
Neuronal	NT-2	+	+	+	+	+
	Gesamtgehirn (Maus)	+	+	+	+	+

Die hier durchgeführten Expressionsstudien verdeutlichen, dass ionotrope Glutamat-Rezeptoren insbesondere die Mitglieder der hier näher untersuchten Unterfamilie der Kainat-Rezeptoren nicht auf neuronale Zellen beschränkt sind, sondern in vielen zum Teil sehr unterschiedlichen Zellen exprimiert werden können.

5.2 Klonierung offener Leseraster

In Kapitel 5.1 ist die Expression der iGluRs untersucht worden, indem mittels PCR die jeweiligen cDNA-Fragmente amplifiziert wurden. Unklar blieb, ob tatsächlich das komplette Leseraster transkribiert wurde oder ob in den untersuchten Zellen lediglich Transkripte vorliegen, die nicht zu funktionellen Rezeptoren führen. Aus

diesem Grunde wurde am Beispiel der hämatopoetischen TF-1 Mutante 29A versucht, die offenen Leseraster der dort erhöht exprimierten Kainat-Untereinheiten Ka2, GluR7 und GluR5 zu klonieren.

Da jede iGluR-Untereinheit zusätzlich noch in verschiedenen RNA-Varianten vorliegen kann, würde eine Klonierung der Leseraster zusätzlich Aufschluß darüber geben, in welchen posttranskriptionell modifizierten Formen die jeweiligen Rezeptoren in der Zelle vorliegen. Denn für fast alle AMPA-/Kainat-Rezeptoren sind vor allem zwei posttranskriptionelle Modifikationen bekannt: Alternatives RNA-Spleißen und RNA-Editing.

Auf mögliche alternative Spleißvarianten deuten die in Kapitel 5.1 gezeigten Gele hin, denn sowohl im GluR5- als auch im Ka2-Gel sind Mehrfachbanden in einigen Spuren zu sehen. Abbildung 10 zeigt diese Mehrfachbanden für die GluR5-Untereinheit in der TF-1 Mutante 29A.

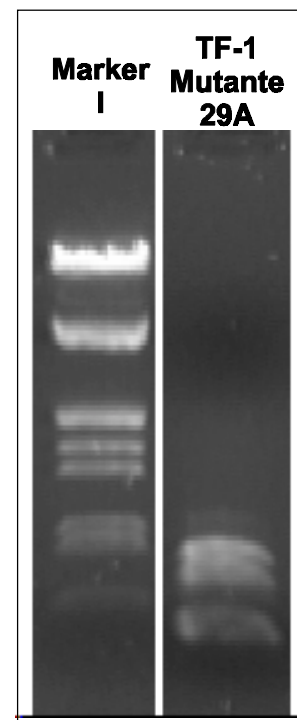


Abb. 10: GluR5 Mehrfachbanden in der TF-1 Mutante 29A

5.2.1 GluR5-Klonierung

Die Klonierung der GluR5-Untereinheit wurde mit Hilfe der *nested* PCR-Technik durchgeführt. Hierfür wurde ein inneres und ein äußeres Primerpaar am 5'- und am 3'-Ende derart gestaltet, dass das innere Fragment das komplette GluR5 Leseraster enthalten sollte. Dieses Fragment könnte dann in geeignete Plasmide kloniert werden. Am 3'-Ende mußten zwei Primerpaare synthetisiert werden, da im Menschen zwei verschiedene 3'-Enden durch alternatives Spleißen generiert werden können. Die humane Variante mit der AcNo. U16125 ist homolog zu einer Rattensequenz (B. Korczak, S.L. Nutt, *et al.* 1995). Die andere humane Variante mit der AcNo. L19058 besitzt hingegen keine Nagerhomologie (P. Gregor, B.F. O'Hara, *et al.* 1993). Insgesamt sind im Nager für GluR5 drei verschiedene C-Termini kloniert worden (B. Bettler, J. Boulter, *et al.* 1990, P. Gregor, B.F. O'Hara, *et al.* 1993, B. Sommer, N. Burnashev, *et al.* 1992).

Aus der TF-1 Mutante 29A konnte lediglich ein carboxyterminales Ende von zwei möglichen detektiert werden. Die daraufhin klonierte GluR5-Untereinheit aus der TF-1 Mutante 29A war Sequenz identisch zur bereits veröffentlichten Variante U16125 (B. Korczak, S.L. Nutt, *et al.* 1995) und lag an der TM II in ihrer nicht editierten Form vor.

5.2.2 Ka2-Klonierung

Die oben beschriebene PCR-Strategie wurde auch für die Ka2-Untereinheit angewandt. Jedoch konnte mit Primern, die in der Nähe des Stop-Codons synthetisiert wurden, keine Amplifikate erhalten werden. Es konnte lediglich ein Fragment kloniert werden, welches vom Start-Codon angefangen bis zur TM IV homolog zu der in der Datenbank veröffentlichten humanen Sequenz war (R.K. Kamboj, D.D. Schoepp, *et al.* 1992).

Um zu überprüfen, ob in der TF-1 Mutante 29A ein noch nicht in der Datenbank veröffentlichtes 3'-Ende generiert wird, wurde die Technik der 3'-PCR angewandt. Diese spezielle PCR-Methode wird in der Regel mit zwei Gen spezifischen und zwei sogenannten Adapter-Primern wie eine *nested* PCR durchgeführt. Sie ermöglicht die Identifizierung unbekannter Sequenzbereiche am 3' Ende. Dabei wird sich die Eigenschaft vieler mRNAs zu Nutze gemacht, dass sie mit einem poly(A)-Schwanz enden. Die Skizze in Abb.11 verdeutlicht die angewandte PCR-Methode.

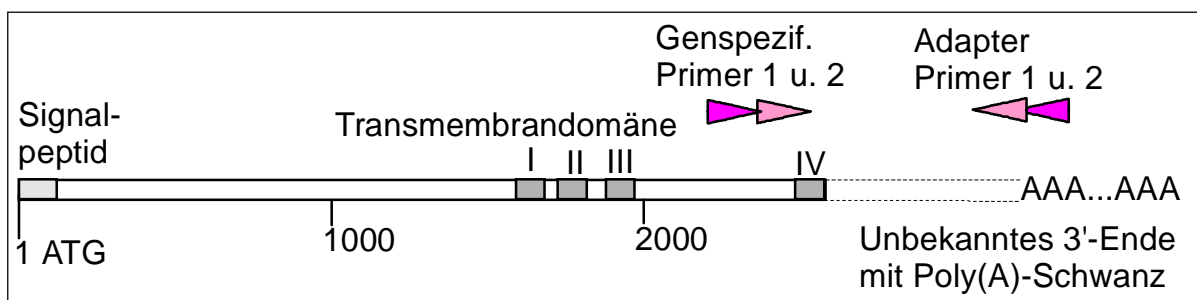


Abb. 11: Strategie der 3'-RACE PCR. Inneres und äußeres Primerpaar wie bei einer *nested* PCR. Die Größe der amplifizierbaren PCR-Fragmente lag zwischen 400 - <1300bp.

Es konnten mit den Ka2-spezifischen Vorwärtsprimern dp91/dp92 verschiedene PCR-Banden unterschiedlicher Größe auch aus anderen Ka2 positiv getesteten Zellen amplifiziert werden. Eine Sequenzanalyse dieser Banden ergab neben vielen

unspezifischen Banden anstatt eines Ka2-spezifischen Fragmentes das 3'-Ende des AMPA-Rezeptors GluR3, der in der TF-1 Mutante 29A in der Flip-Form vorlag. Für Ka2 fand sich kein alternatives 3'-Ende. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass neben der bekannten Ka2-Variante eine oder mehrere noch unbekannte alternative Spleißvarianten transkribiert werden.

5.2.3 GluR7-Klonierung

GluR7 ist die dritte Untereinheit, die in der Mutante 29A erhöht exprimiert wird. Im Menschen ist bisher nur eine Sequenz publiziert, die zu etwa 90% Sequenz identisch zu der Rattensequenz GluR7a ist (S.L. Nutt, K.H. Hoo, *et al.* 1994). In der Ratte ist für GluR7 eine weitere 3'-Variante, die GluR7b genannt wird, publiziert (H.H. Schiffer, G.T. Swanson, *et al.* 1997). Es wurde erneut versucht mit GluR7a-spezifischen Primern in der Mutante 29A ein Fragment entsprechender Größe zu amplifizieren. Wie bei Ka2 führte diese Methode zu keinem Ergebnis, deshalb wurde wiederum versucht mit Hilfe einer 3'-RACE PCR das in der TF-1 Mutante 29A exprimierte 3'-Ende der GluR7-Untereinheit zu detektieren.

Tatsächlich zeigte die Sequenzanalyse eines 3'-RACE PCR Fragmentes ein mögliches GluR7 3'-Ende, welches keine Sequenzidentität zu bisher in den Datenbanken veröffentlichten Rezeptoren besaß. Mit dieser Sequenzinformation gelang die Klonierung des offenen Leserasters für GluR7 aus der TF-1 Mutante 29A. Zur Unterscheidung von den bereits veröffentlichten Varianten wird diese Variante im Verlauf der Arbeit GluR7c genannt. GluR7b bezeichnet die von Schiffer und Mitarbeiter klonierte Rattenvariante und GluR7a meint die homologen GluR7 Sequenzen der Ratte bzw. des Menschen. Um auszuschließen, dass es sich bei der klonierten Variante um ein PCR-Artefakt handelt, wurde mit Hilfe einer genomischen Bibliothek das mögliche Spleißereignis näher untersucht.

5.3 Genomische Cosmid-Bibliothek

Das für GluR7 beobachtete Spleißereignis soll auf genomischer Ebene bestätigt und wenn möglich, erklärt werden. Eine Analyse des GluR7-Genlokus sollte zeigen, wie die humanen GluR7-Varianten GluR7a und GluR7c aus einer gemeinsamen prä-mRNA generiert werden können. Allgemein ist die Wahl von Spleißerkennungssequenzen *in vivo* eng verbunden mit dem Problem der normalen Erkennung kon-

stitutiver Spleißpositionen. Dabei wird alternatives Spleißen abhängig vom Zelltyp bzw. vom Entwicklungsstadium einer Zelle sehr strikt reguliert. Es ist integraler Bestandteil komplexer Genexpressionsprogramme wie der neuronalen Differenzierung oder des programmierten Zelltodes der Apoptose (C.W.J. Smith & J. Valcárcel 2000).

Zur Aufklärung des GluR7-Spleißereignisses wurde eine Chromosom 1 angereicherte Cosmid-Bibliothek (D. Nizetic, S. Monard, *et al.* 1994) über das Ressourcenzentrum Primäre Datenbank (RZPD) im Deutschen Humangenomprojekt (DHGP) aus Berlin angefordert und mit einer GluR7-Sonde durchgemustert. Abbildung 12 zeigt die Cosmid-Bibliothek nach Hybridisierung mit einer GluR7 cDNA Sonde.

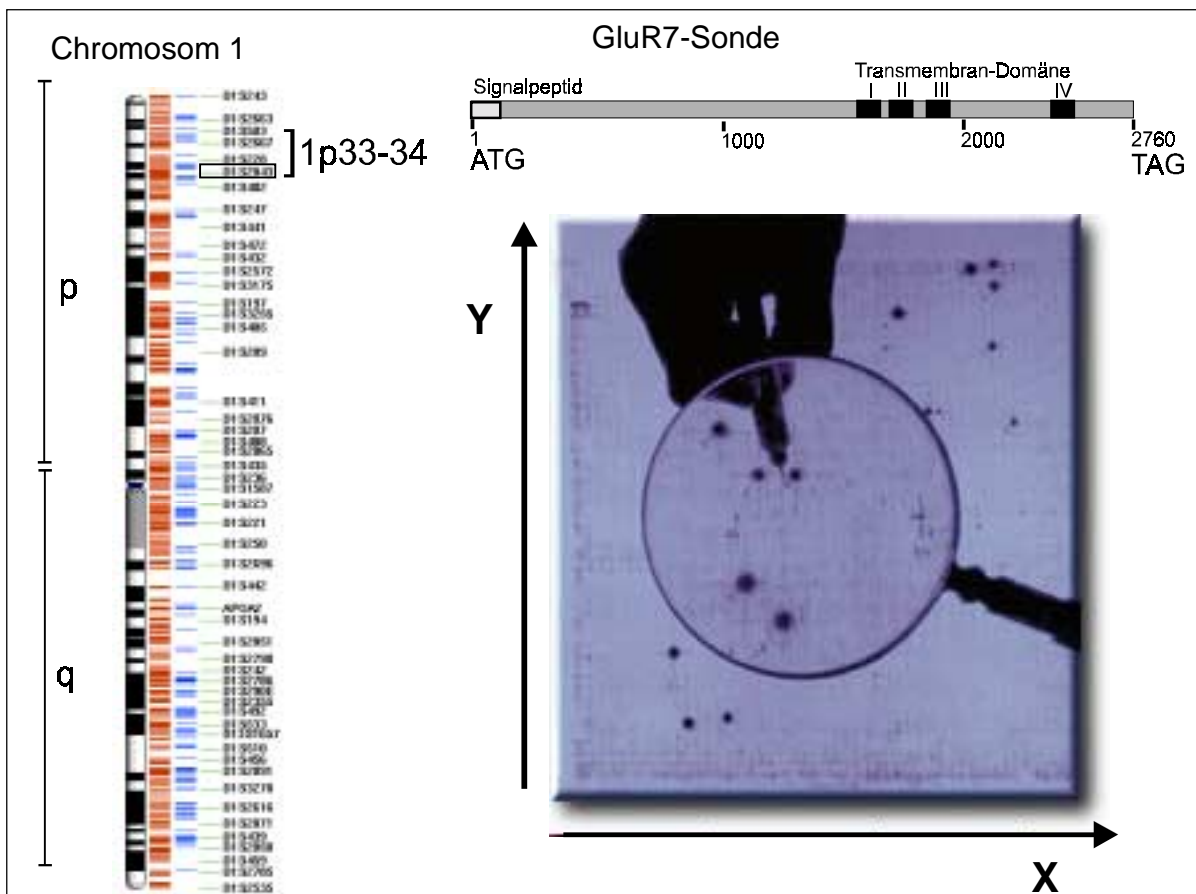


Abb. 12: Genomische Cosmid-Bibliothek: Neben dem Chromosom 1 Ideogramm mit Markern ist eine Cosmid-Membran dargestellt, die mit der oben skizzierten radioaktiv markierten GluR7-Sonde hybridisiert wurde. Die schwarzen Punkte auf der Membran repräsentieren positive Cosmid-Klone, die anhand ihrer X/Y-Koordinaten vom RZPD angefordert werden konnten.

Das GluR7(*grik3*)-Gen (*grik3*, *glutamate receptor ionotropic kainate 3*) ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 1 lokalisiert 1p33-34 (R.S. Puranam, J.H. Eubanks, *et*

al. 1993) und wird zwischen den Markern D1S2843 (proximal) und D1S417 (distal) kartiert. Chromosom 1 ist das größte Chromosom des Menschen und umfaßt etwa 300 Mb DNA, das entspricht ca. 10% des menschlichen Genoms.

Aus den positiven Signalen wurden fünf Klone ausgewählt, die X/Y-Koordinaten bestimmt und vom RZPD zur näheren Analyse angefordert. Eine Southern Blot Analyse der erhaltenen Cosmid-Klone, die in dieser Arbeit zur Vereinfachung nach ihren X/Y-Koordinaten bezeichnet werden, ergab nach Hybridisierung mit einer GluR7-Sonde die Identifizierung Gen spezifischer Spaltprodukte. Die jeweilige Größe der Spaltprodukte konnte nach Bestimmung der Laufstrecke der Marker I (λ -DNA, *EcoRI/HindIII*) Banden mit Hilfe einer potentiellen Restriktionsanalyse ermittelt werden. *BamHI* und *EcoRI* erwiesen sich als geeignete Enzyme, die erhaltenen fünf Cosmide zu spalten und erneut mit einer 3'-spezifischen Gensonde nach 3'-Sequenzen durchzumustern. Dies ist in Abb.13 gezeigt.

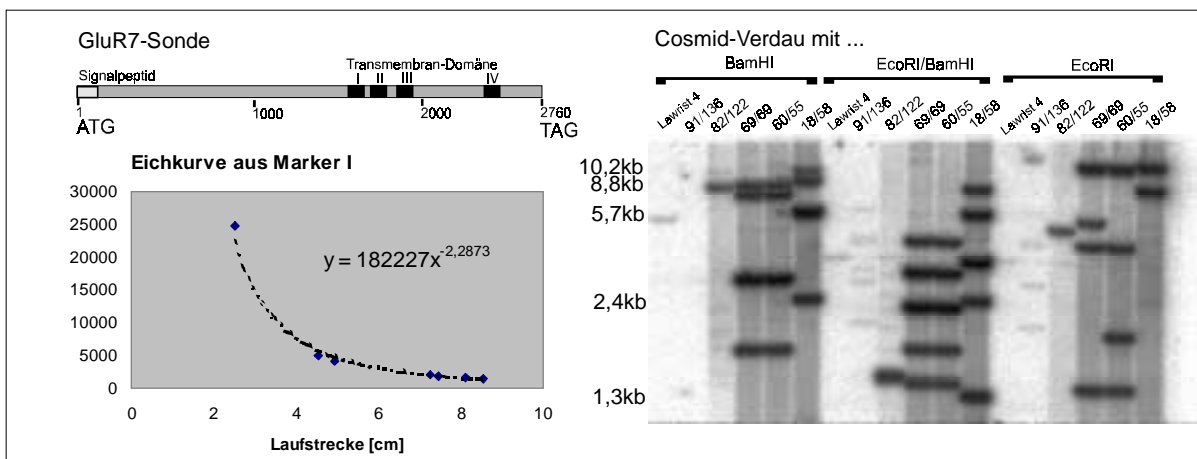


Abb. 13: Mit Hilfe einer potentiellen Restriktionsanalyse ermittelt aus Marker I konnten die Fragmentgrößen für Cosmid 18/58 bestimmt werden. Der systematische Fehler wurde mit $\pm 100\text{bp}$ grob abgeschätzt.

Nur der Cosmid-Klon mit den X/Y-Koordinaten 18/58 enthielt die gewünschten 3'-GluR7 Sequenzen und konnte einer intensiven Sequenzanalyse mit entsprechenden Primern unterzogen werden. Die Klone 60/55 und 69/69 enthielten zwar genomische GluR7-Bereiche, jedoch nicht den gewünschten 3'-Bereich. Sie wurden bei der Sequenzanalyse nicht berücksichtigt. Die Cosmide 82/122 und 91/136 enthielten keine GluR7-spezifischen Sequenzen und lieferten nach

Hybridisierung nur falsch positive Banden.

Tabelle 6 faßt die Ergebnisse der Cosmid-Bibliothek nochmals zusammen. Sie enthält auch die RZPD eigene Bezeichnung der Cosmid-Klone.

Tabelle 6: Status der erhaltenen Cosmid-Klone (RZPD-Bibliothek Nr. 112)

Ermittelte X/Y-Koordinaten	RZPD eigener Name	Status des Klons nach Southern-Blot
18/58	ICRFc112 M1949 Q1	Positiv, enthält genom. GluR7-Sequenzen
60/55	ICRFc112 N0541 Q1	Positiv, enthält genom. GluR7-Sequenzen
69/69	ICRFc112 J0213 Q1	Positiv, enthält genom. GluR7-Sequenzen
82/122	ICRFc112 H2121 Q1	Falsch positiv; enthält keine GluR7-Sequenzen
91/136	ICRFc112 C1839 Q1	Falsch positiv; enthält keine GluR7-Sequenzen

Mit dem Primer dp144 erhält man eine genomische Sequenz, die die neue Variante GluR7c kodieren kann. Es wird beim Spleißvorgang offensichtlich eine 5' Spleißstelle 42nt hinter der Transmembrandomäne IV überlesen, so dass intronische Sequenzen in der prozessierten mRNA erhalten bleiben und nach weiteren 54nt ein neues Stop-Codon generieren. Der 5'-Spleißkonsensus weicht in der letzten Position von der hier sequenzierten (T statt C) ab. Wird diese 5'-Spleißstelle benutzt, führt dies zur bereits veröffentlichten Sequenz GluR7a. Dies zeigt die Sequenzanalyse mit Primer dp119, der in Abbildung 14 den kodierenden Bereich bis zur 3'-Spleißstelle liefert.

Die hier nicht gezeigte Analyse mit Primer dp98 liefert die in den Datenbanken noch nicht vorhandenen Intron/Exon-Grenzen des vorletzten GluR7-Exons. Es besteht insgesamt aus 83 Aminosäuren und enthält die Transmembrandomäne IV, die aus 21 Aminosäuren gebildet wird. Im humanen GluR5- bzw. *grik1*-Gen konnte das vorletzte Exon als das sechzehnte von achtzehn Exone identifiziert werden (A. Barbon & S. Barlati 2000).

Die Analyse der Chromosom 1 angereicherten Cosmid-Bibliothek bestätigt das auf RNA-Ebene beobachtete mögliche Spleißereignis dargestellt in Abbildung 14.

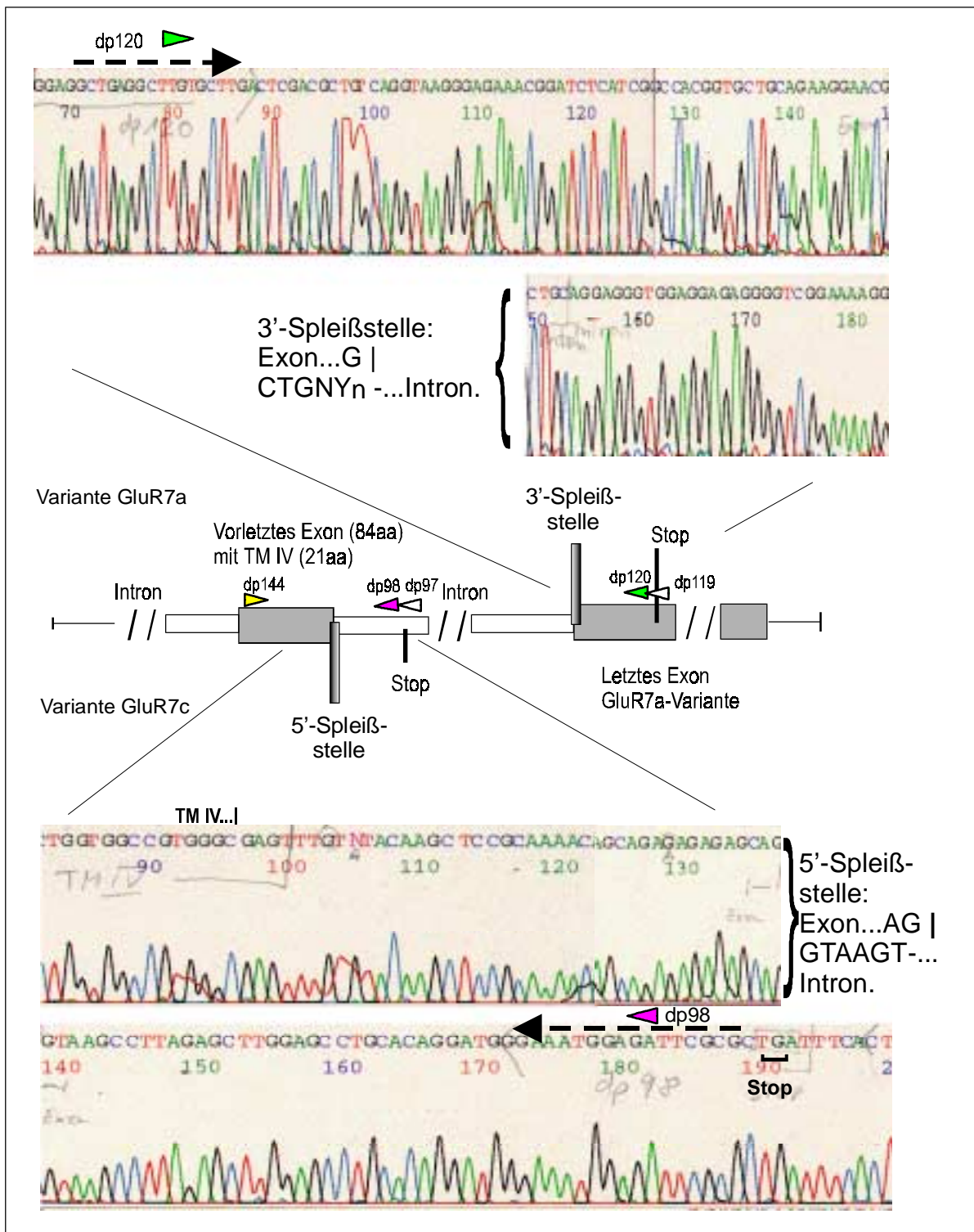


Abb. 14 Sequenzanalyse des grik3(GluR7)-Genlokus. Der Cosmid-Klon 18/58 konnte mit den Primern dp144 (untere Sequenz), dp119 (obere Sequenz) und dp97 (nicht gezeigt) direkt sequenziert werden.

Die Frage, welche Spleißposition genutzt wird, ist eng mit dem Problem der normalen Erkennung von konstitutiven Spleißpositionen *in vivo* verknüpft. Sogar sehr gute Computerprogramme sind in der Vorhersage von verwendeten und nicht verwendeten Spleißpositionen unter vielen ähnlichen Kandidatensequenzen nur zu 50% genau. Dieses Problem der Erkennung wird noch durch die Tatsache unterstrichen, dass 15% aller humanen genetischen Erkrankungen auf Mutationen zurück zu führen sind, die entweder funktionelle Spleißpositionen zerstören oder neue erschaffen (C.W.J. Smith & J. Valcárcel 2000).

3'-Spleiß-Konsensus ^[in %]	Intron													Exon			
	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	C ¹⁰⁰	A ¹⁰⁰		G ¹⁰⁰	G ¹⁰⁰	
Exon 16	T ⁴⁶	T ⁴⁶	C ²⁷	T ⁵⁹	C ⁴²	C ³³	C ⁴⁰	T ⁴⁶	G ⁵	C ⁴¹	T	C	A	G	G		
Exon 18	C ³²	C ³⁵	A ⁷	C ³⁰	C ⁴²	C ³³	T ⁴¹	C ⁴⁶	C ⁴⁹	T ⁴⁶	G	C	A	G	G		
Konsensus Verzweigungsstelle											Y	N	C	U	R	<u>A</u>	C
Verzweigungsadenosin liegt 77 Nukleotide stromabwärts von der 3'-Spleißposition des Exons 16											A	C	C	T	G	<u>A</u>	C
Verzweigungsadenosin liegt 25 Nukleotide stromabwärts von der 3'-Spleißposition des Exons 18											T	T	C	C	G	<u>A</u>	C
5'-Spleiß-Konsensus ^[in %]	Exon		Intron					Exon									
	A ⁶²	G ⁷⁷	G ¹⁰⁰	U ¹⁰⁰	A ⁶⁰	A ⁷⁴	G ⁸⁴	U ⁵⁰									
Exon 16	A	G	G	T	A	A	G	C ¹⁷									

Abb. 15: Abgleich der sequenzierten Intron/Exon-Grenzen und Verzweigungsstellen des *grik3*-Gens mit bekannten Konsensus-Sequenzen. Ein Y steht für ein Pyrimidin-Rest (C oder T), ein R für ein Purin-Rest (A oder G) und ein N für A, C, G oder T. Die hochgestellten Zahlen in Prozent geben die Häufigkeit im Konsensus an. Die grau unterlegten Basen markieren Abweichungen im *grik3*-Gen vom Konsensus. Das Verzweigungsadenosin im Konsensus ist unterstrichen und kommt in allen prä-mRNAs vor.

In Abb.15 zeigt ein Vergleich der Intron/Exon-Grenzen und der Verzweigungsstelle des *grik3*-Gens eine hohe Übereinstimmung mit entsprechenden Konsensus-Sequenzen. Die in der Abbildung angegebenen Prozentzahlen beziehen sich auf eine prä-mRNA Analyse von 400 Wirbeltiergenen, die an der 5'-Spleißposition mit einem GU beginnen und an der 3'-Spleißposition mit einem AG aufhören (R.A. Padgett, P.J. Grabowski, *et al.* 1986).

Die prozentuale Häufigkeit für ein U in der letzten Position der 5'-Spleißposition beträgt 50%, für ein G 18%, für ein A 15% und für das hier sequenzierte C 17%. Trotz der hohen Sequenzhomologie wird die 5'-Spleißposition bei der Expression der Variante GluR7c nicht erkannt und in die entsprechenden Aminosäuren translatiert. Dieser Bereich kodiert Exon 17 der Variante GluR7c.

Die nach Analyse des untersuchten Cosmids erhaltenen genomischen Sequenzen des *grik3*-Gens, die auch in Abb.14 ausschnittsweise dargestellt sind, erscheinen unter der AcNo. AJ308525 sowie AJ308526 in der EMBL/Genbank und sind dem Anhang beigelegt. Erstere beinhaltet Exon 16 und 17, letztere Teile des Exons 18, welches nur in der Variante GluR7a translatiert wird.

5.4 RNA-Prozessiervorgänge

In diesem Kapitel soll auf die in Kainat-Rezeptoren des ZNS beobachteten posttranskriptionellen Modifikationen eingegangen werden. Die auf GluR5 und GluR6 positiv getesteten Zellen sollen auf den in diesen Untereinheiten typischen Q/R-Editierprozess innerhalb der für die Ionendurchlässigkeit verantwortlichen TM II untersucht werden. Am Beispiel der drei möglichen GluR7 Isoformen soll der Vorgang des alternativen RNA-Spleißens näher untersucht werden.

5.4.1 Alternatives RNA-Spleißen

Da die GluR7 Klonierung aus dem hämatopoetischen Zellklon TF-1 Mutante 29A vorgenommen wurde, sollte in einer Wiederholung des Expressionsassays überprüft werden, welche 3'-Spleißvariante in den GluR7 positiv getesteten Zelle jeweils exprimiert wird. Die Tabellen 4 und 5 des Kapitels 5.1 zeigen GluR7-Expression in der TF-1 Mutante 29A, in den Zellen des Mausgehirns, in der neuronalen Zelllinie NT-2 und in der hämatopoetischen Zelle U-937. Um die drei verschiedenen 3'-Spleißvarianten voneinander unterscheiden zu können, wurde auf allen drei GluR7-Enden Varianten spezifische Rückwärtsprimer am 3'-Ende synthetisiert und wiederum eine *nested* PCR durchgeführt. Die Vorwärtsprimer dp115 und dp116 waren universell für alle drei Spleißvarianten verwendbar.

Die Primer für GluR7a wurden so gewählt, dass sie 100% mit der Nagersequenz bzw. humanen Sequenz übereinstimmten. Um diese Banden trotzdem voneinander unterscheiden zu können, wurden sie mit dem Restriktionsenzym *Sfi*I gespalten.

Diese Schnittstelle kommt nur sehr selten und ausschließlich in der humanen GluR7a-Sequenz (U16127) vor. Die Varianten GluR7b und GluR7c wurden zur Sicherheit mit den Enzymen *Bgl*II bzw. *Bgl*I gespalten. Die amplifizierten Fragmente wurden aus dem Gel isoliert, mit variantenspezifischen Restriktionsenzymen gespalten und elektrophoretisch analysiert. Verwendete Primer und Restriktionsenzyme sind in Tabelle 7 zusammengefaßt. Das Gel in Abb.16 zeigt die gewonnenen PCR-Produkte vor und nach zum Teil unvollständiger Spaltung.

Tabelle 7: GluR7 Spleißvarianten

GluR7 Variante	GluR7a hum; rat	GluR7b	GluR7c
Embl/GenBank AcNr.	U16127; Z11718	AF027331	AJ299451
Vorwärtsprimer außen	dp115	dp115	dp115
innen	dp116	dp116	dp116
Rückwärtsprimer innen	dp118	dp120	dp98
außen	dp117	dp119	dp97
Spezif. Restriktionsenzym	<i>Sfi</i> I	<i>Bgl</i> I	<i>Bgl</i> II
PCR-Fragmente [bp] [vor] → [nach] Spaltung	gültig für hum. Zellen [910] → [457] + [453]	[850] → [620] + [240]	[888] → [518] + [370]

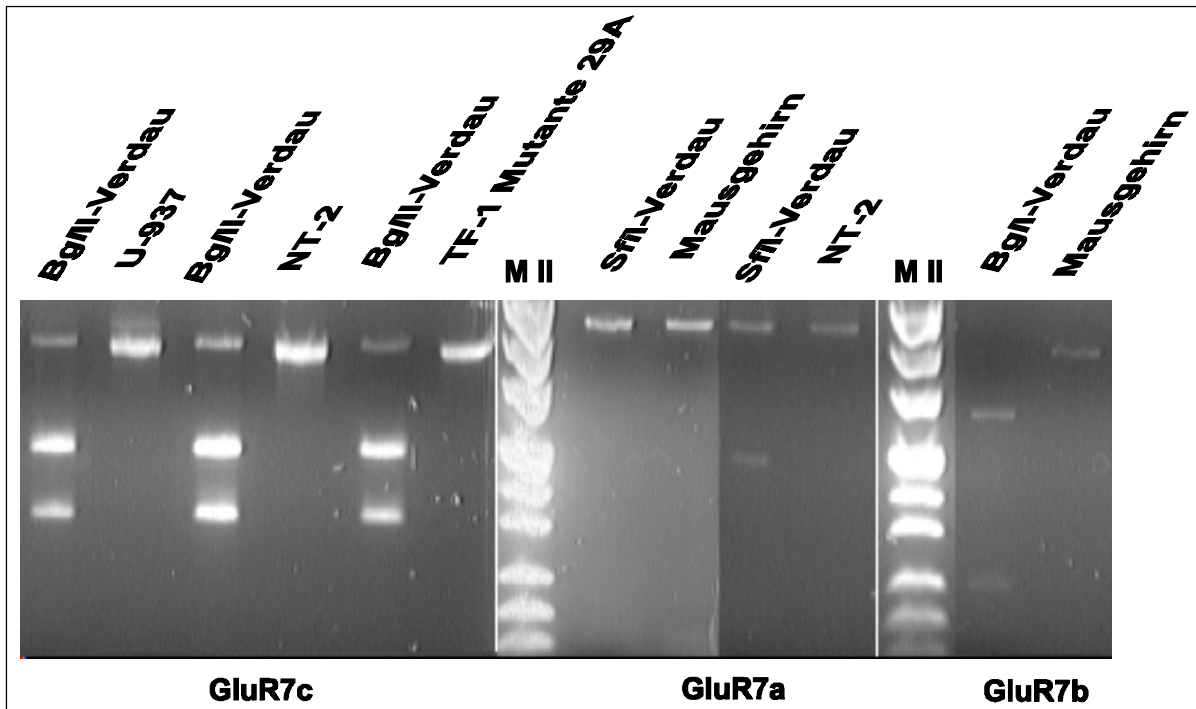


Abb. 16: Restriktionsanalyse der 3 GluR7-Varianten GluR7a, GluR7b und GluR7c. EtBr-gefärbtes 1%iges TBE-Agarosegel. Marker II (M II): 250ng pUC19 DNA/*MspI* gemischt mit pUC57 DNA/*DraI* und *HindIII*.

Wie die TF-1 Mutante 29A exprimiert auch die andere hämatopoetische Zelle U-937 nur die neu klonierte Variante GluR7c in einem detektierbaren Rahmen. Die humane Variante GluR7a und die aus der Ratte klonierte Variante GluR7b konnten in beiden Zellen nicht detektiert werden. Die GluR7c-Variante wird aber auch in der neuronalen Zelle NT-2 exprimiert. NT-2 exprimiert zusätzlich noch die Variante GluR7a, die mit entsprechenden Primern aus NT-2 kloniert werden konnte. Das offene Leseraster stimmte zu 100% mit der bereits publizierten Sequenz überein.

Beide Rattenvarianten GluR7a und GluR7b fanden sich auch im Mausgehirn wieder, wobei die GluR7b Sequenz in keiner humanen Zellen detektiert werden konnte und damit Nager spezifisch zu sein scheint. Umgekehrt konnte die hier neu klonierte Variante GluR7c nicht im Mausgehirn detektiert werden. Dieses Spleißereignis scheint human spezifisch zu sein. Die neue Variante GluR7c erscheint unter der AcNo. AJ299451 in der EMBL/GenBank und ist dem Anhang beigefügt.

Die Abbildung 17 verdeutlicht das alternative RNA-Spleißereignis im Menschen.

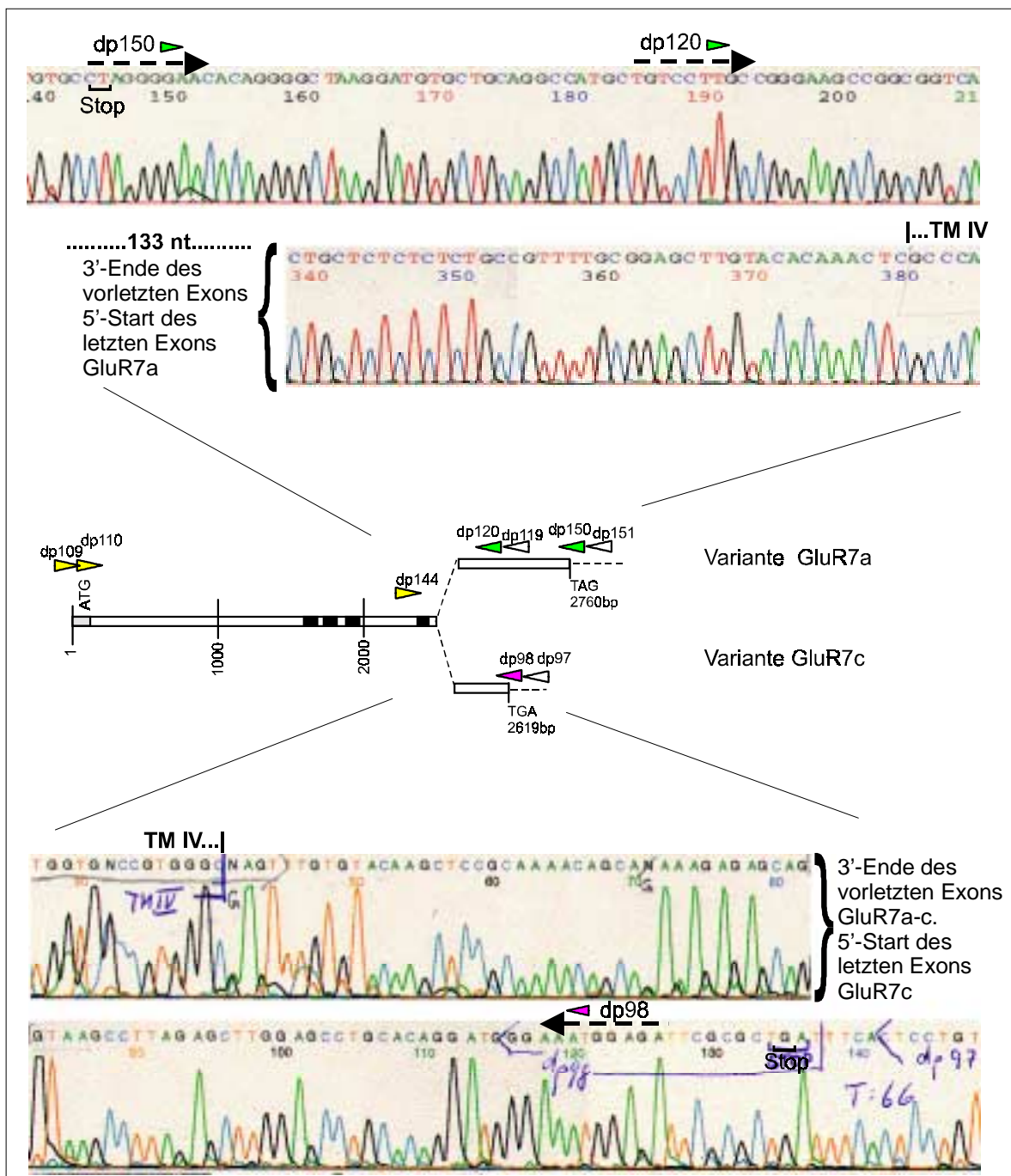


Abb. 17: Sequenzvergleich der carboxyterminalen Enden von GluR7a und GluR7c.

In allen drei Varianten GluR7a, b und c wird 42 Nukleotide hinter der TM IV ein alternativer C-Terminus kodiert. Das letzte Exon der GluR7c-Variante besteht aus 54 weiteren Nukleotiden. Die Variante GluR7a hingegen generiert erst nach 195nt ein Stop-Codon. GluR7b enthält 42 Nukleotide hinter der TM IV eine Insertion von 40 Nukleotiden, die zu einer Verschiebung des Leserasters führt (H.H. Schiffer, G.T.

Swanson, *et al.* 1997). Die Analyse des für GluR7c sequenzierten 3'-RACE PCR-Fragments endete hinter dem Stop-Codon Strom aufwärts nach ca. 300 weiteren Nukleotiden. Eine zur Anheftung von poly(A)-Enden und zur Spaltung nötige Hexanukleotid-Folge **AATAAA** konnte im sequenzierten Abschnitt nicht gefunden werden. Die bereits in der Datenbank publizierte Sequenz GluR7a enthält 836 weitere Nukleotide hinter dem Stop-Codon ebenfalls ohne die Hexanukleotid-Folge **AATAAA**.

5.4.2 RNA-Editing

Der hier untersuchte Editiervorgang an der für die Kanalbildung wichtigen Transmembrandomäne II beschränkt sich auf die nicht neuronal determinierten Zellen, die die Kainat-Untereinheiten GluR5 und GluR6 erhöht exprimieren. Dies sind für GluR6 die murine MS-5 und die humane TF-1s Zelllinie. GluR5 wird in K-562, TF-1 Mutante 29A, TF-1 ohne GM-CSF und TF-1s exprimiert. Dieser in Abb.18 skizzierte Editierprozess an der Transmembrandomäne II tritt innerhalb der iGluRs nur noch in der AMPA-Untereinheit GluR2 auf; dort wird im Menschen ein CAG-Triplett (Glutamin) in ein CGG-Triplett (Arginin) umgewandelt, wodurch sich die elektrophysiologischen Eigenschaften der Rezeptoren zum Teil drastisch ändern können.

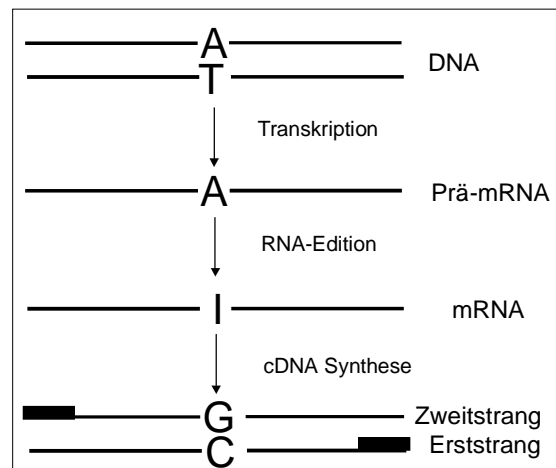


Abb. 18: Das Diagramm zeigt wie in der cDNA aus einem ursprünglich kodierten A an dieser Position nach RNA-Editing ein G resultiert.

Für die neuronale Zelllinie NT-2 ist dieser Editiervorgang bereits näher untersucht worden. Es zeigte sich, dass in der undifferenzierten NT-2 Zelle nur geringe mRNA-Fractionen von GluR5 (8%) und GluR6 (10%) in editierter Form vorlagen. Behandelt man NT-2 Zellen mit Retinsäure (RA), so differenzieren sie in neuronale, postmitotische Zellen. Die Q/R-Editierrate innerhalb der TM II in GluR5 und GluR6 stieg dabei nach drei Wochen auf 27 bzw. 30% an. Nach weiteren zwei Wochen waren fast alle Zellen ausdifferenziert. Die Editierrate lag nun bei 70% für GluR5 bzw. 92% für GluR6 (F. Lai, C.X. Chen, *et al.* 1997).

Der in Abbildung 19 dargestellte Ausschnitt einer Sequenzanalyse zeigt am Beispiel der murinen Zelle MS-5 und des Mausgehirns das Ende der Transmembrandomäne II der GluR6-Untereinheit.

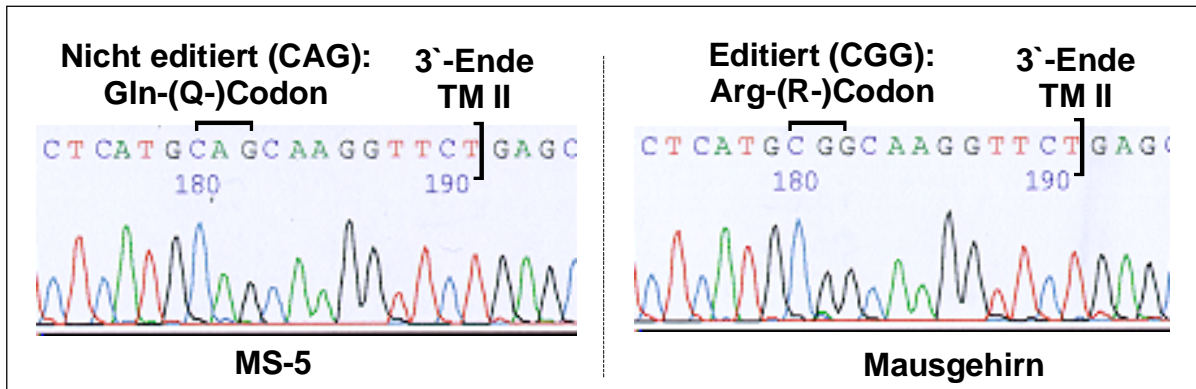


Abb. 19: Sequenzvergleich MS5 | Mausgehirn. Markiert ist jeweils das editierte bzw. das uneditierte Q/R-Triplett der GluR6-Untereinheit vier Codons vor Ende der Transmembrandomäne II.

Im erwachsenen Mausgehirn liegt GluR6 zu etwa 80% in seiner editierten Form vor. Dies ist in der Sequenzanalyse des Mausgehirns in Abbildung 19 am wenig ausgeprägtem Adenin-Peak unter dem Guanin zu erkennen. In der Zelllinie MS-5 wird im Gegensatz zum Mausgehirn das Transmembransegment II nur geringfügig oder gar nicht editiert, da kein Guanin- unter dem Adenin-Peak erkennbar ist.

Für GluR5 zeigen die sequenzierten Bereiche ähnliches Aussehen. Die cDNA-Fragmente, die direkt nach der PCR sequenziert wurden, zeigen nahezu vollständiges RNA-Editing für eine Präparation, die direkt aus dem Gesamtgehirn der Maus isoliert wurde. Das genomische Triplet CAG wird in CGG umgewandelt. Im Gegensatz dazu konnte in den untersuchten menschlichen Zellen kein RNA-Editing detektiert werden. Das genomische Triplet lässt sich in den sequenzierten humanen hämatopoetischen Zelllinien K-562, TF-1s und TF-1 Mutante 29A wiederfinden.

5.5 Protein-Prozessiervorgänge

Mit Hilfe des Computerprogramms *Prosit* wurden in diesem Kapitel die in den humanen hämatopoetischen und neuropoetischen Zellen exprimierten Varianten der *low affinity* Untereinheiten GluR5 und GluR7 auf mögliche Unterschiede in ihrem Phosphorylierungsmuster untersucht. Die verschiedenen GluR5 und GluR7 Nager

Varianten wurden in den folgenden Analysen nicht berücksichtigt. *Prosite* ist ein Programm, das innerhalb einer gegebenen Proteinsequenz Konsensus-Motive verschiedener Enzyme erkennt. Es wird vom sogenannten HUSAR-Server (HUSAR, *Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources*) des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg zur Verfügung gestellt und basiert auf einer Convex-GCG-Unix Version (GCG, *Genetics Computer Group Inc.*, Madison, Wisconsin, USA).

5.5.1 Vergleich des C-Terminus der humanen GluR5 Varianten

Für GluR5 sind im Menschen zwei offene Leseraster kloniert worden. Sie unterscheiden sich am N-Terminus durch die Gegenwart oder Abwesenheit eines zusätzlichen Exons GluR5-1 oder GluR5-2. Dieses Exon kodiert für 15 weitere Aminosäuren, die 177 Reste vor der Transmembrandomäne I eingefügt werden. Die beiden humanen Varianten GluR5-1d (AcNo.: L19058) und GluR5-2b (AcNo.: U16125) unterscheiden sich zusätzlich zum N-Terminus noch am carboxyterminalen Ende. Dort können in Nagern und im Menschen 14 Aminosäuren hinter der Transmembrandomäne IV durch alternatives Spleißen verschiedene Exone eingefügt werden, die alphabetisch gekennzeichnet werden (GluR5a-d).

Ein *Prosite*-Vergleich der aus der TF-1 Mutante 29A klonierten Variante GluR5-2b mit der alternativen Variante GluR5-1d zeigt, dass nach Expression eines der beiden Varianten in nicht erregbare Zellen verschiedene Verknüpfungen zu Transduktionskaskaden über bestimmte Phosphorylierungsstellen möglich werden. Beide Varianten können durch eine Proteinkinase C (PKC) bzw. einer cAMP/cGMP-abhängigen Proteinkinase phosphoryliert werden. Die nicht in der TF-1 Mutante 29A exprimierte Variante GluR5-1d kann zusätzlich noch von einer Caseinkinase II phosphoryliert werden. Im Gegensatz zu den zuvor erwähnten Kinasen, hängt ihre Aktivität weder von der Calciumkonzentration noch von zyklischen Nukleotiden ab.

Abbildung 20 zeigt eine *Prosite*-Analyse für die beiden bekannten Varianten GluR5-2b und GluR5-1d.

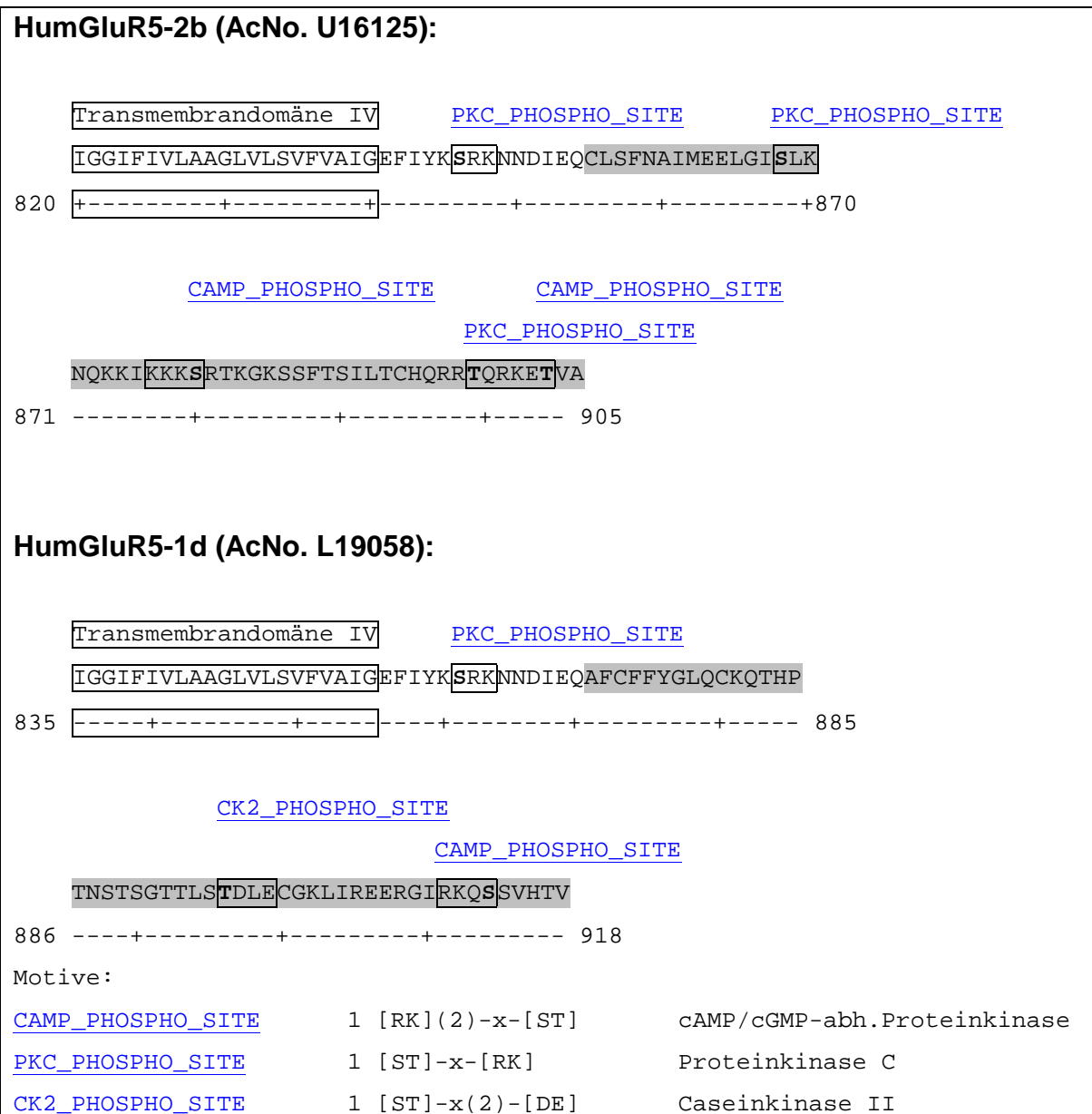


Abb. 20: *Prosite*-Analyse der C-Termini GluR5-2b und GluR5-1d: Grau eingefärbt ist das alternative carboxyterminale Ende. Die mögliche Phosphorylierung findet an den fett gedruckten Tyrosin- bzw. Serin-Resten der eingerahmten Kinase-Erkennungsmotive statt.

5.5.2 Vergleich des C-Terminus der humanen GluR7 Varianten

Das Ergebnis einer *Prosite*-Analyse für die beiden humanen GluR7-Enden ist in Abb.21 dargestellt.

HumGluR7a (AcNo. U16127):

3'-Ende hinter TM IV in NT-2 und Primärzellen des humanen bzw. Nagergehirns

Transmembrandomäne IV [CK2 PHOSPHO SITE](#)

IGGIFIVLAAGLVLSVLVAVG EFVYKLRKTAEREQRSFCS TVADE EIRFSLTCQRRVKHKPQP

821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 882

.....[CK2 PHOSPHO SITE](#)

PMMVKTDAVINMHTFND RRLPGKDSMACSTSLAPVFP

883 -----+-----+-----+-----+----- 919

HumGluR7c (AcNo. AJ299451):

3'-Ende hinter TM IV in NT-2, U-937 und TF1-Mutante 29A

Transmembrandomäne IV [PKC PHOSPHO SITE](#)

IGGIFIVLAAGLVLSVLVAVG EFVYKLRKTAEREQVSLR AAWSLHRMGNGDSR

821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 871

Motive:

PKC_PHOSPHO_SITE	1 [ST]-x-[RK]	Proteinkinase C.
CK2_PHOSPHO_SITE	1 [ST]-x(2)-[DE]	Caseinkinase II

Abb. 21: Prosite-Analyse der C-Termini GluR7a und GluR7c: Grau eingefärbt ist das alternative carboxyterminale Ende. Die mögliche Phosphorylierung findet an den fett gedruckten Tyrosin- bzw. Serin-Resten der eingerahmten Kinase-Erkennungsmotiven statt.

Ein Vergleich mit dem humanen GluR5 Spleißereignis lässt Gemeinsamkeiten erkennen. Wie bei GluR5 kann 14 Aminosäuren hinter der Transmembrandomäne IV durch alternatives Spleißen ein alternatives Exon eingefügt werden. Im Nager ist zur Variante GluR7a (AcNo. Z11716) eine alternative Variante GluR7b (AcNo. AF027331) kloniert worden, die statt zweier Caseinkinase II (CKII) zwei PKC-Erkennungssequenzen im alternativen C-Terminus

enthält. Die neu klonierte humane Variante GluR7c (AcNo.: AJ299451) enthält ebenfalls eine PKC-Erkennungssequenz, ist aber wesentlich kürzer als GluR7a (AcNo.: U16127). Möglicherweise ersetzt die humane Variante GluR7c mit ihrem PKC-Erkennungsmotiv die im Menschen nicht detektierte alternative Nagervariante GluR7b, die ebenfalls PKC Erkennungsmotive enthält. Ob jedoch diese Erkennungssequenzen *in vivo* tatsächlich benutzt werden, ist noch nicht untersucht worden.

Da sowohl im Nager als auch im Menschen bei GluR5 und GluR7 an der gleichen Stelle hinter der Transmembrandomäne IV alternative Exone eingefügt werden, handelt es sich sehr wahrscheinlich um einen evolutionär hoch konservierten Spleißmechanismus innerhalb der *low affinity* Kainat-Rezeptoren.

5.6 Elektrophysiologische Untersuchung an Froschoozyten

Mit der Expression eines Membrankanalproteins in einer Zelle, die normalerweise das Protein nicht besitzt, bietet sich die Möglichkeit, die Eigenschaften eines bekannten Ionenkanals mit den Eigenschaften eines unbekanntes, aber zur selben Familie gehörenden Ionenkanals, vergleichen zu können. Für solche Untersuchungen haben sich Oozyten (Eizellen vor Abschluss der Meiose) des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* bewährt.

Aus den drei klonierten Kainat-Untereinheiten GluR5-2b, GluR7a und GluR7c wurde zunächst in ausreichender Menge cRNA (*capped*cRNA) hergestellt. Nach Mikroinjektion und anschließender Inkubation sollten die elektrophysiologischen Eigenschaften der entstandenen Ionenkanäle analysiert werden können. Die GluR5-2b Variante der Ratte wurde bereits 1990 von B. Bettler (B. Bettler, J. Boulter, *et al.* 1990), die des Menschen erst fünf Jahre später von B. Korczak (B. Korczak, S.L. Nutt, *et al.* 1995) kloniert und elektrophysiologisch untersucht. Es sollten mittels der Zwei-Elektroden Spannungsklemme neben GluR5-2b (Positivkontrolle) folgende homomere bzw. heteromere Rezeptorkomplexe analysiert werden: GluR7a und GluR7c sowie GluR5-2b/GluR7a und GluR5-2b/GluR7c. Der Versuch wurde analog der Arbeit von B. Bettler durchgeführt. Hierbei wurden mindestens zehn Oozyten mit je 2ng cRNA injiziert und nach drei bis vier Tagen Inkubation vermessen. Das Membranpotential lag bei $-30V$ und das K^+ -Gleichgewichtspotential (kein

Nettostromfluß) bei -60mV . Kainat-Rezeptoren werden nach ihrer Aktivierung sehr schnell desensibilisiert, d.h. der Rezeptor geht trotz Agonistenbindung in einen nicht leitenden Zustand über. Diese schnelle Desensibilisierung kann verhindert werden, indem die Oozyten 5-10min vor Zugabe der Agonisten mit dem Pflanzenlektin Concanavalin A (ConA) inkubiert werden. Danach wurde der in Abb22 dargestellte starke L-Glutamat Agonist Domoat (Salz der Domoinsäure, IUPAC-Name: [2S-[2 α ,3 β ,4 β (1Z,3E,5R)]]-2-Carboxy-4-(5-carboxy-1-methyl-1,3-hexadienyl)-3-pyrrolidinessigsäure) hinzugegeben. Domoat ist ein stärkerer Agonist als Kainat und bietet den Vorteil, dass die Rezeptoren wesentlich langsamer als bei Kainat desensibilisieren. Dies erleichtert die Detektion auftretender Membrandepolarisationen, da die Kanäle länger geöffnet bleiben.

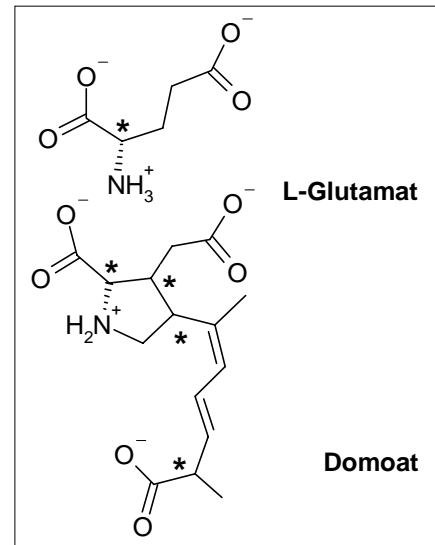


Abb. 22: Strukturformel L-Glutamat und seines starken Agonisten Domoat. Stereogene Zentren sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Die in Abb.23 gezeigten Kurven sind aus der Arbeit von B. Bettler und Mitarbeitern. Beide GluR5-Varianten zeigen nur eine sehr schwache Membrandepolarisation ($3,5\text{mV}$ für GluR5-1b bzw. $4,5\text{mV}$ für GluR5-2b) nach Glutamat-Bindung. Die in dieser Arbeit angewandte Meßmethode zielte darauf ab, Ionenströme in Abhängigkeit von der Zeit zu detektieren. Nach Agonistenbindung öffnen sich die Ionenkanäle und Kationen strömen in die Zelle. Das Membranpotential wird mit einer Messelektrode gemessen und mittels eines zweiten rückgekoppelten Stromkreises durch den ebenfalls gemessenen kompensatorischen Strom auf einen gewünschten und konstant gehaltenen Wert gebracht. Jedoch waren die in unserem Experiment detektierten Peaks nicht reproduzierbar oder lagen im

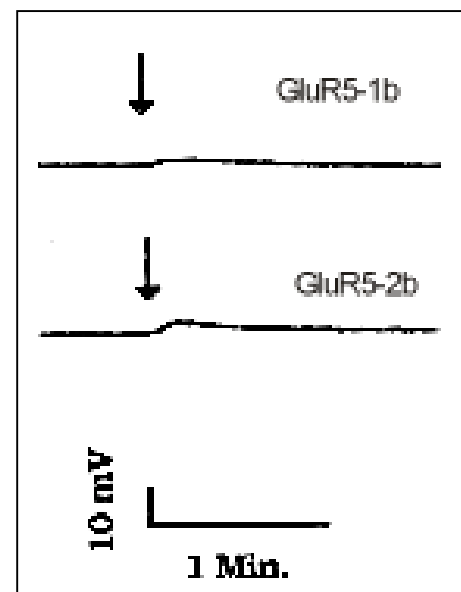


Abb. 23: Von B. Bettler und Mitarbeitern aufgenommene Spannungskurven der homomeren Rezeptoren GluR5-1b und GluR5-2b. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Glutamat Applikation.

Grundrauschen, so dass letztendlich für keine homomere bzw. heteromere Rezeptorzusammensetzung verlässliche elektrophysiologische Daten gewonnen werden konnten.

6. Diskussion

6.1 Expression ionotroper Glutamat-Rezeptoren

Die Beobachtung, dass nach einer retroviralen Insertionsmutagenese in der humanen hämatopoetischen Zelllinie TF-1 der verwendete Retrovirus im GluR5 (*grik1*) Genlokus integrierte und daraufhin erhöhte GluR5 mRNA Transkriptmengen nicht nur in dieser Zelle, sondern auch in anderen TF-1 Mutanten detektiert wurden, führte zu folgenden in der Aufgabenstellung formulierten Fragen:

- Kann erhöhte GluR5 mRNA Expression auch in anderen Zellen mit hämatopoetischen Hintergrund beobachtet werden ? Und:
- Werden neben GluR5 noch weitere Mitglieder der Familie der ionotropen Glutamat-Rezeptoren koexprimiert, denn funktionelle Rezeptorkomplexe liegen immer als Heteromere vor und bestehen aus mindestens zwei verschiedenen Untereinheiten.

Die Antworten auf beide Fragen lieferte ein in den Kapiteln 5.1 und 5.2 angewandter RT-PCR Expressionsassay. Dort wurde in primären Zellen und etablierten Zelllinien mit hämatopoetischem Hintergrund das jeweilige mRNA Expressionsmuster der vier AMPA- und der fünf Kainat-Rezeptoren ermittelt. Ähnlich wie in den verschiedenen Zelltypen des Zentralnervensystems unterschieden sich die ermittelten Expressionsmuster der AMPA/Kainat-Rezeptoren in den untersuchten Zellen zum Teil erheblich und führen zu der Frage: Kann aus den detektierten Expressionsmuster ein funktionierender Rezeptorkomplex entstehen ? Und welche Funktion kann der mögliche Rezeptorkomplex in dem jeweiligen Zelltyp übernehmen ?

Nach dem heutigen Stand der Forschung können funktionierende AMPA/Kainat-Rezeptoren *in vivo* nur gebildet werden, wenn der Rezeptorkomplex aus mindestens zwei Untereinheiten einer Unterfamilie besteht. Für die Unterfamilie der Kainat-Rezeptoren gilt zusätzlich, dass die Gruppe der *high affinity* Rezeptoren untereinander keinen funktionellen Kanal bilden und deshalb mindestens mit einer *low affinity* Untereinheit interagieren müssen.

Die Domänen, die die Komplexbildung regulieren und die Zusammensetzung zu einem funktionellen Glutamat-Rezeptor gewährleisten, sind noch nicht identifiziert worden. Jedoch müssen Kontrollmechanismen existieren, die einerseits die Komplexbildung innerhalb einer Genfamilie erlauben und andererseits die Komplexbildung mit Einheiten anderer Unterfamilien verhindern. Funktionelle AMPA-Rezeptoren, die untereinander eine Sequenzidentität von 68-73% besitzen, bestehen ausschließlich aus den Untereinheiten GluR1, GluR2, GluR3 und GluR4. Die *low affinity* Kainat-Rezeptoren GluR5-7 bilden funktionelle Kanäle, indem sie untereinander oder mit den *high affinity* Untereinheiten Ka1 und Ka2 interagieren. Sie bilden keine Komplexe mit den AMPA-Rezeptoren (39-41%), obwohl die Sequenzhomologie mit 43-44% ähnlich gering ist wie zu den *high affinity* Kainat-Rezeptoren (R. Dingledine, K. Borges, *et al.* 1999).

Der angewandte Expressionsassay gibt Aufschluss darüber, in welcher Zusammensetzung der AMPA- bzw. Kainat-Rezeptor in der jeweiligen Zelle vorliegen kann. Er erlaubt keine direkte quantitative Aussage über das Expressionsniveau der einzelnen Untereinheiten in den untersuchten, hämatopoetischen Zellen. Ein Vergleich jedoch mit neuronalen Zellen (NT-2 und Mausgehirn) zeigt, dass die mRNA-Expression in den hier untersuchten Zellen auf ähnlichem Niveau liegen sollte, denn das PCR-Sättigungsplateau wird nach etwa gleichen Zyklenzahlen erreicht.

Die als interne Kontrolle eingesetzte neuronale Zelle NT-2 besitzt Vorläuferpotential und exprimiert die mRNA aller fünf Ka-Rezeptoren. Dies steht im Widerspruch zu Ergebnissen einer Forschergruppe, die 1993 weder GluR5 noch Ka2 detektieren konnten (M. Hardy, D. Younkin, *et al.* 1994). GluR5 konnte jedoch ein Jahr später von einer anderen Forschergruppe in NT-2 Zellen nachgewiesen werden (F. Lai, C.X. Chen, *et al.* 1997). Die Differenzen der Expressionsmuster sind auf unterschiedliche RT-PCR Bedingungen zurückzuführen. Offensichtlich waren die hier verwendeten RT-PCR Bedingungen empfindlicher als die in den Arbeiten von Hardy und Lai.

In undifferenzierten NT-2 Zellen konnten im Gegensatz zu NMDA-Rezeptoren mit elektrophysiologischen Messmethoden bisher keine funktionellen AMPA/Kainat-Rezeptoren nachgewiesen werden. Nach Differenzierung in postmitotische NT-2 Zellen zeigen AMPA/Kainat-Rezeptoren Funktionalität. Ein ähnliches Verhalten kann auch

für einige der hier untersuchten hämatopoetischen Zellen, die wie NT-2 differenzierungsfähig sind, postuliert werden. Zellen, die den Stammzellmarker CD34 tragen und Vorläuferpotential besitzen wie die isolierten CD34-positiven Zellen des Nabelschurblutes und die etablierten hämatopoetischen Zelllinien MO-7e und TF-1, exprimieren keine *low affinity* Untereinheiten. Infolgedessen können keine funktionellen Rezeptorkomplexe ausgebildet werden.

Dieses Expressionsmuster der AMPA/Ka-Rezeptoren in frühen hämatopoetischen Zellen wurde stellvertretend für diese Zellen am TF-1 Modell näher untersucht. Die TF-1 Wildtyp (wt) Zelle, die ebenfalls den Stammzellmarker CD34 trägt, exprimiert keine AMPARs, sondern nur die *high affinity* Untereinheiten Ka1 und Ka2. Entzieht man ihr transient den Wachstumsfaktor GM-CSF, so gehen die Zellen in die Apoptose (TF1-GMCSF). Dabei ändert sich das KaR-Expressionsmuster. Die Beteiligung der *low affinity* Untereinheit GluR5 statt Ka1 am Proteinkomplex kann nun zur Expression eines funktionellen Rezeptors führen.

Kultiviert man hingegen wt TF-1 Zellen ohne Wachstumsfaktor über einen längeren Zeitraum hinweg auf einer Einfachschicht Stromazellen, so lassen sich Stroma abhängig wachsende, GM-CSF unabhängige TF-1 Klone etablieren (TF-1s). Diese TF-1s Klone exprimieren die AMPA-Rezeptoren GluR1 und GluR3 sowie die Kainat-Rezeptoren GluR5 und GluR6. Beide Kombinationen können zu funktionellen Ionenkanalproteinen führen.

Ähnliches gilt für retroviral infizierte TF-1 Zellen, die man auf Wachstumsfaktorunabhängigkeit selektionierte. Die etablierte, GM-CSF unabhängige TF-1 Mutante 29A exprimiert einen möglichen Kainat-Rezeptorkomplex, der die Untereinheiten GluR5, GluR7 und Ka2 enthalten kann.

In Abb.24 ist der mögliche Zusammenhang zwischen Wachstumsfaktorangebot und der AMPA/KaR-Expressionsmuster im TF-1 Modell dargestellt.

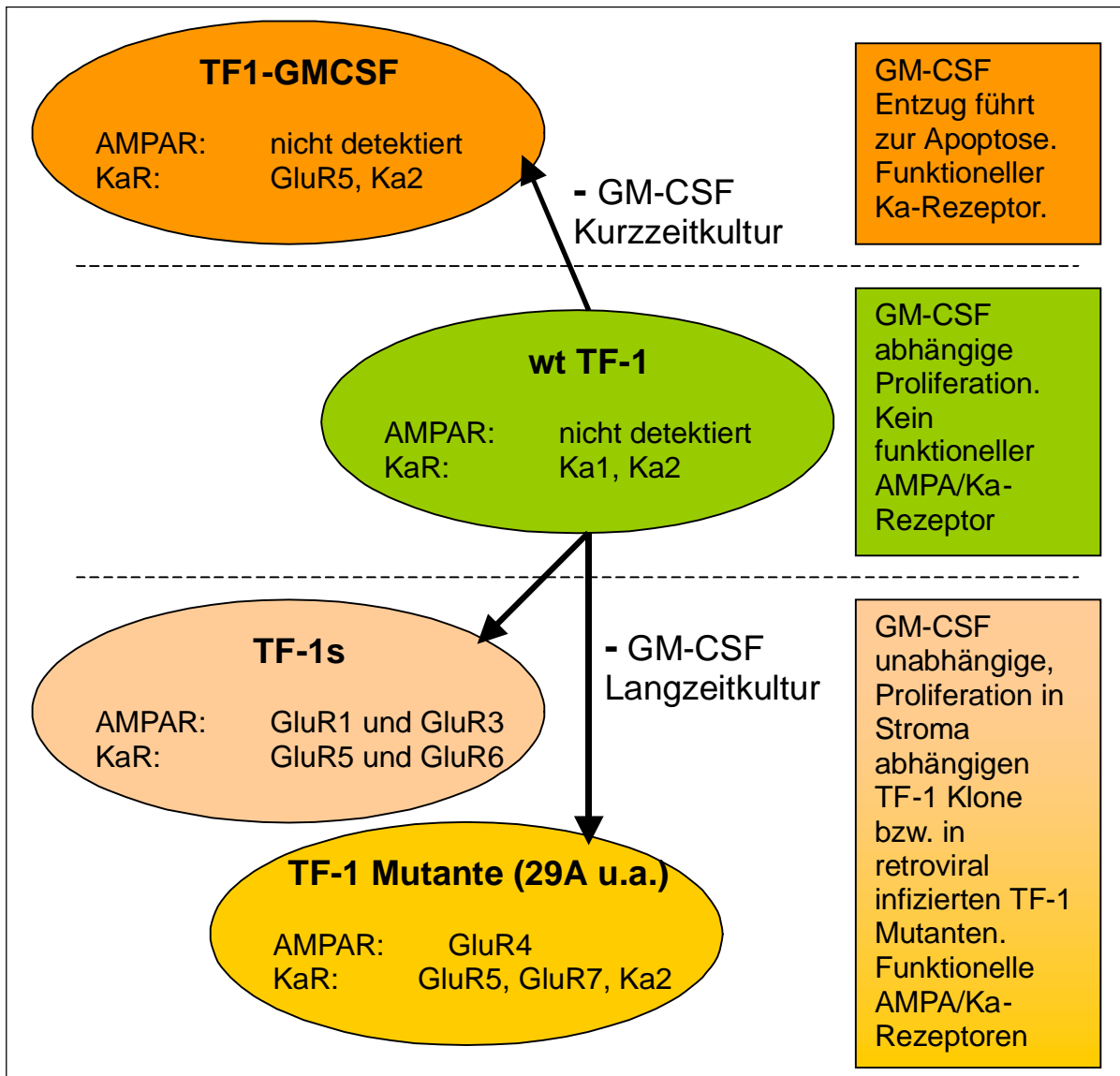


Abb. 24: Zusammenhang zwischen Wachstumsfaktorangebot, Proliferationsverhalten und dem Expressionsmuster der AMPA/Ka-Rezeptoren im TF-1 Modell.

Wegen der Vielseitigkeit des durch einen funktionellen Kainat-Rezeptor vermittelbaren Calciumsignals kann über die Funktion in den TF-1 Zellen nur spekuliert werden. Gut untersucht ist das durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren vermittelte Proliferationssignal. Die Stimulation des Rezeptors nach GM-CSF Bindung führt zur Aktivierung von Kinase/Phosphatase Kaskaden der Jak/Stat-Familie und Freisetzung von Second Messenger Molekülen, die die Expression proliferationsfördernder Gene regulieren. Bekannt ist weiterhin, dass der GM-CSF Entzug in TF-1 Zellen zur Senkung des Bcl-2 Spiegels und somit zur Einleitung der Apoptose führt. Bcl-2 ist ein Protein, das im äußeren Mitochondrienmembran, im Endoplasmatischen Retikulum und im Kernmembran lokalisiert ist und im Verlauf der Fetalentwicklung in vielen Geweben, im erwachsenen Organismus hingegen nur in Stamm- bzw. frühen

Vorläuferzellen exprimiert wird. Die Herabregulation in terminal differenzierten Zellen, die nur eine begrenzte Lebensspanne haben, scheint umgekehrt die Eliminierung dieser Zellen zu fördern. Die genaue Funktionsweise des Bcl-2 Proteins bei der Blockierung der Apoptose ist unbekannt. Eine Annahme ist, dass es die Freisetzung von Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum ins Cytosol verhindert, denn der programmierte Zelltod kann nur bei gleichzeitiger Erhöhung des cytosolischen Calciumspiegels eingeleitet werden (R.C. Duke, D.M. Ojcius, *et al.* 1996, J.M. Garland & A. Halestrap 1997, A.J. Hale, C.A. Smith, *et al.* 1996).

Für die TF1-GMCSF Zelle, die in die Apoptose geht, können die parallel exprimierten funktionellen Calciumkanäle folgende Aufgaben übernehmen:

Das aus dem Extrazellularraum einströmende Calcium könnte das apoptotische Signal noch verstärken, indem die durch den abgesengten Bcl-2 Spiegel erhöhte Calciumkonzentration im Cytosol aufrecht erhalten bleibt. Diese Apoptose unterstützende Funktion der Kainat-Rezeptoren wird auch nach einem Schlaganfall beobachtet; dort führt der unkontrollierte Ca^{2+} -Einstrom ins Cytosol zum massenhaften Absterben von Gehirnzellen, wenn die betroffene Region durch Blutgerinnsel mit Nährstoffen unterversorgt ist (G.K. Kanellopoulos, X.M. Xu, *et al.* 2000).

Jedoch könnte die nach Faktorentzug beobachtete Expression funktioneller Kainat-Rezeptoren auch einen proliferationsfördernden Effekt haben. Ein kontrollierter Einstrom des Second Messengers Calcium könnte über Calcium/Calmodulin-induzierbare Signaltransduktionskaskaden zur Expression proliferationsfördernder Gene führen, die die eingeleiteten apoptotischen Prozesse zumindest transient kompensieren sollten. Für ein langfristiges Überleben der Zelle müssen allerdings noch weitere exogene bzw. endogene Ereignisse eintreffen. Solche Ereignisse können sowohl für die Stroma abhängig wachsenden TF-1 Klone als auch für die TF-1 Mutanten postuliert werden. In einer Langzeitkultur wird eine ohne GM-CSF proliferierende TF-1s Kultur exogen durch Zell/Zell-Kontakte mit zuvor letal bestrahlten MS-5 Mausfibroblasten stimuliert. Die Stimulation durch Zell/Zell-Kontakte ist auch ein Grund warum Stammzellen im Mikroenvironment nahezu unbegrenzt lebensfähig sind. Ob hierfür die Expression ionotroper GluRs nötig ist, ist bisher nicht untersucht worden. Jedoch konnte von einer Forschergruppe, die die elektrophysiologischen Aspekte der Differenzierung von Mikrogliazellen untersuchte, beobachtet werden, dass auch Milz-Makrophagen und Blut-Monozyten elektrophysiologische

Eigenschaften von Mikrogliazellen entwickeln, wenn sie auf einer Schicht Astrozyten in Kultur gehalten werden (J. Schmidtmer, C. Jacobsen, *et al.* 1994).

Für die ebenfalls in einer Langzeitkultur ohne GM-CSF wachsenden TF-1 Mutanten sind endogene Prozesse vorstellbar. Ältere Studien im Labor von Prof. Wolfram Ostertag haben bereits gezeigt, dass erhöhte ektope bzw. endogene Expression bestimmter Gene, die wie die ionotropen Glutamat-Rezeptoren die Proliferation bestimmter Zellen beeinflussen, zur Etablierung einer Langzeitkultur führen kann (J. Hannemann, T. Hara, *et al.* 1995). Sehr wahrscheinlich finden in solchen Modellsystemen auf dem Weg zur Wachstumsfaktorunabhängigkeit noch weitere genetische bzw. epigenetische Modifikationen statt.

6.2 Prozessvorgänge innerhalb der Kainat-Rezeptoren

In dieser Arbeit wurden die für iGluRs typischen posttranskriptionellen Modifikationen RNA-Editing und alternatives RNA-Spleißen untersucht. Am Beispiel der Transmembrandomäne II der Kainat-Rezeptoren GluR5 und GluR6 wurde festgestellt, dass die auf GluR5 und GluR6 positiv getesteten Zellen fast ausschließlich in ihrer nicht editierten Form vorlagen. Rezeptoren, die die nicht editierte Q-Form enthielten, blieben permeabel für Ca^{2+} -Ionen. Insgesamt ist der Editiervorgang *in vivo* und *in vitro* von verschiedenen Forscherteams intensiv untersucht worden. RNA-Editing spielt eine wichtige Rolle während der Gehirnentwicklung und erhöht die Diversität des Rezeptorkomplexes (B.L. Bass 1997, A. Bernard, L. Ferhat, *et al.* 1999, C.M. Niswender 1998, L. Simpson & R.B. Emeson 1996).

Durch alternatives RNA-Spleißen erhöht sich die Diversität des Rezeptorkomplexes noch einmal. Es gibt verschiedene Spleißpositionen innerhalb der KaR-Familie, die *in vitro* die elektrophysiologischen Eigenschaften des Rezeptors beeinflussen können. Bisher sind nur wenige Untersuchungen durchgeführt worden, die die Lokalisation, Regulierung und biologische Funktion der verschiedenen Isoformen zum Inhalt haben. Die mRNAs der verschiedenen KaR-Untereinheiten sind über das gesamte ZNS verteilt und werden je nach Gehirnregion verschieden stark exprimiert. Erhöhte Expression der iGluRs findet man während der Embryonalentwicklung des Gehirns. Studien, die *in vivo* und *in vitro* die Beteiligung

und Funktion der exprimierten Untereinheiten am Rezeptorkomplex in einer Zelle untersuchten, werden erschwert, weil nicht für alle Untereinheiten spezifische Antagonisten und Agonisten vorliegen. Es sind bisher auch nur Antikörper erhältlich, die unspezifisch mehrere *low affinity* Kainat-Rezeptoren erkennen und auch nicht zwischen einzelnen Spleißvarianten unterscheiden können.

In dieser Arbeit wurde anhand der TF-1 Mutante 29A ermittelt, dass von den fünf Kainat-Rezeptoren nur drei in ganz bestimmte Isoformen exprimiert werden. Von den bisher klonierten humanen Varianten GluR5-2b und GluR5-1d wird nur die Variante GluR5-2b exprimiert. Ein Unterschied zwischen beiden Sequenzen sind Erkennungsmotive im C-Terminus. Die hier exprimierte 2b-Variante enthält im Gegensatz zur 1d-Isoform PKC- statt Caseinkinase II Erkennungsmotive. Ka2 und GluR7 lagen mit einem noch unbekanntem alternativen C-Terminus vor. Für GluR7 konnte diese alternative C-terminale Spleißvariante kloniert werden. Sie wurde in Anlehnung an zuvor klonierte GluR7-Spleißvarianten GluR7c genannt und wird nicht nur in TF-1, sondern auch in der hämatopoetischen Zelllinie U-937 sowie in der neuronalen Zelllinie NT-2 exprimiert. Sehr wahrscheinlich wird GluR7c auch im menschlichem Zentralnervensystem exprimiert. Es scheint sich bei GluR7c um eine human spezifische Isoform zu handeln, die einen Kainat-Rezeptorkomplex in die Lage versetzt mit dem PKC-Signalprozess zu interagieren.

Die Variante GluR7a kann im Menschen und in der Ratte über seinen cytosolischen C-Terminus mit der Caseinkinase II interagieren. Eine andere 1997 von Schiffer publizierte Rattenvariante GluR7b konnte in den hier untersuchten Zellen nur in murinen nicht jedoch in humanen Zellen detektiert werden. GluR7b enthält ebenfalls PKC statt Caseinkinase II Erkennungsmotive (H.H. Schiffer, G.T. Swanson, *et al.* 1997). Bei GluR7c könnte es sich also um das humane Gegenstück zur Nagersequenz handeln.

Der Kainat-Rezeptorkomplex in der TF-1 Mutante 29A besitzt über die exprimierten Isoformen GluR5-2b und GluR7c eine Präferenz für den PKC-Signalprozess. Die elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Untereinheiten-Kombination sind weder *in vivo* noch *in vitro* näher charakterisiert worden, da es sich bei der Variante GluR7c um eine noch unveröffentlichte Variante handelt. Von den bekannten Isoformen GluR7a und GluR7b weiß man aus Expressionsstudien, dass sie *in vitro*

sowohl als Homomer als auch als Heteromer nur geringe Kanalaktivität zeigen, obwohl die Kanal bildende Transmembrandomäne II, wenn sie in GluR1 bzw. GluR6 transplantiert wird, funktional ist (C. Villmann, N. Strutz, *et al.* 1999). Die biologische Funktion der GluR7-Isoformen im heteromeren Rezeptorkomplex ist wenig erforscht. GluR7 wird vor allem in der frontalen Großhirnrinde exprimiert und steht deshalb in Zusammenhang mit Gedächtnis assoziierten Störungen wie sie bei der Schizophrenie beobachtet werden. Untersuchungen an Schizophrenie Patienten ergaben, dass GluR7 in dieser Hirnregion gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe bzw. einer Gruppe, die bis zum Tod antipsychotische Medikamente erhielt, nur äußerst gering exprimiert wird (B.P. Sokolov 1998).

Funktionelle Kainat-Rezeptoren, die vor allem GluR7 und nicht GluR5 und GluR6 enthielten, wurden auch in Tanyzyten und in Astrozyten des Hypothallamus gefunden. Tanyzyten sind lange, zum Teil tief ins Hirninnere ragende, den Ependymzellen verwandte, spezielle Gliazellen, die unter Umgehung der Blut/Hirnschranke Kontakt mit dem Blut haben. Glutamat könnte nach Bindung an GluR7 die Segregation der freisetzungsfördernden bzw. freisetzungshemmenden Hormone dieses Organs regulieren, denn Versuche mit dem starken Agonisten Kainat ergaben, dass der Transkriptionsfaktor c-Fos in Tanyzyten und Astrozyten des Hypothallamus erhöht exprimiert wird. Die beobachtete c-Fos Expression ist ein Zeichen, dass Kainat auf Gliazellen stimulierend wirkt. Die biologische Funktion besteht vielleicht darin den Anteil von freisetzungsfördernden bzw. -hemmenden Hormonen im Hypothallamus zu beeinflussen (O. Eyigor & L. Jennes 1998).

6.3 GluR7 assoziierte Erkrankungen

Mit Hilfe einer Chromosom 1 angereicherten Cosmid Bibliothek konnte bestätigt werden, dass die neu klonierte Variante GluR7c durch alternatives RNA Spleißen entstehen kann. GluR7 bzw. *grik3* wird auf Chromosom 1p33-34 kartiert und da es sich bei GluR7 um einen Ionenkanal handelt, ist es interessant zu prüfen, ob in der gleichen Region Krankheiten kartiert worden sind und ob diese Erkrankungen mit einem mutierten Ionenkanal assoziiert sein können. Mutationen in verschiedenen Ionenkanälen führen in der Regel zu neurologischen Krankheitsbildern.

Eine Suche in den Datenbanken ergab, dass in unmittelbarer Nähe des *grik3*-Lokus zwei neurologische Erkrankungen kartiert worden sind. Dies ist in Abb.25 skizziert.

Bei der ersten handelt es sich um eine vererbare, nicht syndromische Form der Taubheit, die DFNA2 (*deafness autosomal dominant*) genannt wird und auf Position 1p34 kartiert wird. Sie konnte mit einem zuvor klonierten Kaliumkanal KCNQ4 in Verbindung gebracht werden. In der mutierten Form führt der Austausch von nur einer Aminosäure in der Kanal bildenden Domäne dazu, dass keine Kaliumströme in den äußeren sensorischen Haarzellen der Gehörschnecke fließen (C. Kubisch, B.C. Schroeder, *et al.* 1999).

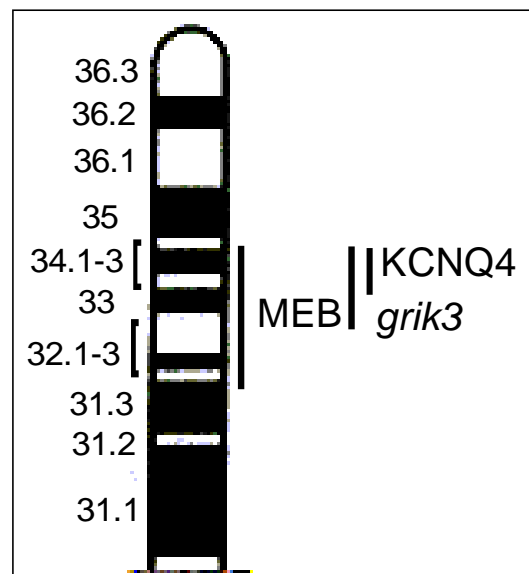


Abb. 25: Ausschnitt des kurzen Arms von Chromosom 1.

Die zweite Erkrankung wird auf Position 1p32-34 kartiert und MEB-Krankheit (*muscle-eye-brain disease*) genannt. Sie wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:>50.000 autosomal-rezessiv vererbt. Es handelt sich bei dieser Erkrankung um eine seltene Form der Lissenzephalie (griech.: „glattes Gehirn“), die zu schweren und komplexen Störungen während der Gehirnentwicklung führt und wie das bei Ionenkanalerkrankungen häufig beobachtet wird, auch Organe außerhalb des neuronalen Systems betreffen kann. Bei einer MEB Erkrankung kommt es im Auge zu einer schweren fortschreitenden Kurzsichtigkeit bis hin zur Entwicklung eines Grauen Stars. Parallel leiden die Betroffenen an einer kongenitalen Muskelhypotonie und überschreiten selten das junge Erwachsenenalter. In Finnland sind etwa 20 Fälle bekannt, außerhalb Finnlands sind weltweit nur 10 sporadische Fälle beschrieben. Dies liegt an der Besonderheit der finnischen Gesellschaft, die sich aus nur wenigen Gründern vor etwa 3000 Jahren, lange Zeit in Isolation entwickelte (B. Cormand, K. Avela, *et al.* 1999).

Ein weiterer Beleg dafür, dass GluR7 mit MEB in Zusammenhang stehen kann, sind unveröffentlichte *in situ* Hybridisierungen mit Antisense GluR7 cRNA-Oligomere, die

von Irm Hermans-Borgmeyer, Zentrum für Molekulare Neurobiologie in Hamburg freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Sie sind in Abb.26 dargestellt und zeigen in der Maus, dass die mRNA Expression des GluR7-Rezeptors nicht auf das ZNS beschränkt ist, sondern auch in nicht erregbaren Organen wie der Zunge oder den Zähnen exprimiert werden kann.

In der adulten Maus findet man GluR7-Expression auch im Auge (D.E. Hamassaki-Britto, I. Hermans-Borgmeyer, *et al.* 1993). Die chromosomale Nähe, die Expression von GluR7 im Auge und im Muskel (Zunge) der Maus deuten darauf hin, dass MEB mit krankhaften Veränderungen des GluR7-Gens in Zusammenhang stehen kann. Wegen des breiten Symptomenkomplexes ist es wahrscheinlich, dass es sich nicht um eine monogenetische Erkrankung handelt, sondern dass an der Ausprägung dieser Krankheit noch weitere krankhaft veränderte Gene beteiligt sind.

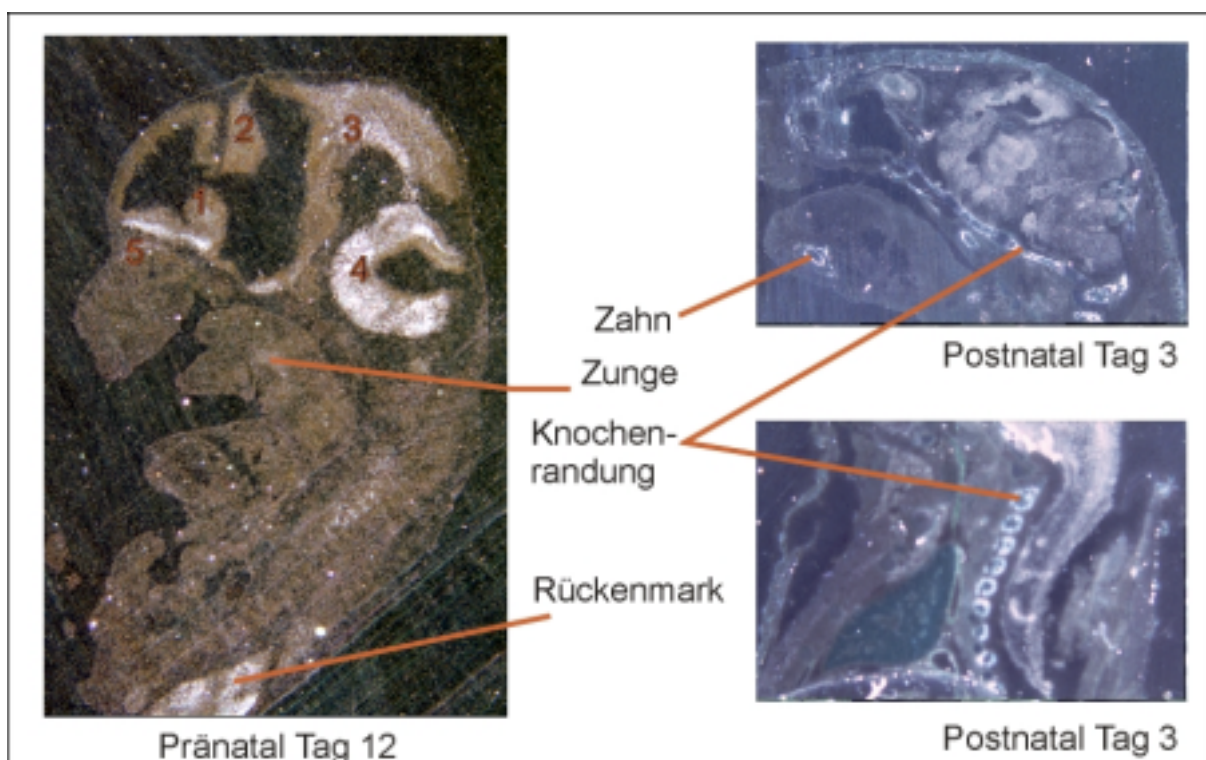


Abb. 26: Unveröffentlichte Maus *in situ* Hybridisierungen mit Antisense GluR7 cRNA-Oligomere durchgeführt in der Gruppe von Stephen Heinemann wie in folgender Veröffentlichung beschrieben (D.E. Hamassaki-Britto, I. Hermans-Borgmeyer, *et al.* 1993). Nummerierung: 1. Großhirn; 2. Zwischenhirn; 3. Mittelhirn; 4. Nachhirn und 5. Riechepithel.

7. Ausblick

Die Tatsache, dass iGluRs auch in hämatopoetischen Zellen und in der murinen Stromazelllinie MS-5 exprimiert werden, eröffnet die Möglichkeit in genau definierten Zellkultursystemen die jeweilige Rezeptoruntereinheit und ihrer verschiedenen Isoformen innerhalb ihres biologischen Kontextes untersuchen zu können. Das Expressionsmuster ist durch Wechsel der Zellkulturbedingungen oder durch Mutationen veränderbar. Untersuchungen an heteromeren Kainat-Rezeptorkomplexen in den etablierten Zelllinien könnten Erklärungen liefern, warum sich die funktionellen Eigenschaften der nativen von denen der rekombinanten Rezeptoren unterscheiden. Kennt man die genauen physiologischen Zusammenhänge und die Eigenschaften der verschiedenen Rezeptorkompositionen, so könnten sich daraus auch neue therapeutische Konzepte ergeben, denn die funktionelle Analyse auf biophysikalischer Ebene der natürlich vorkommender Rezeptorvarianten sollte es einerseits ermöglichen, vererbte neurologische Krankheitsbilder auf molekularer Ebene besser zu verstehen, andererseits sollten sie tiefere Einblicke in die funktionelle Architektur ligandengesteuerter Ionenkanalproteine und den mit ihnen verknüpften Signaltransduktionskaskaden liefern.

Wegen der Vielfalt der Aufgaben von L-Glutamat im ZNS und dessen therapeutischer Bedeutung in Krankheitszuständen, in denen Glutamat eine Hauptrolle zu spielen scheint, ist es interessant die Wirkung sowohl des natürlichen Neurotransmitters als auch neuer Substanzen (Agonisten und Antagonisten), die selektiv mit verschiedenen iGluR-Untereinheiten und ihren Isoformen in Wechselwirkung treten können, nach Rezeptorbindung zu untersuchen. Solche Substanzen sind nicht nur wichtig für das Studium der Rezeptoren selbst, sondern sollten zukünftig auch bei der Therapie der Multiplen Sklerose oder von Anomalien im ZNS wie Epilepsien, neurodegenerative (ALS, Alzheimer, Parkinson und Chorea Huntington) und ischämische Erkrankungen (Herzinfarkt und Schlaganfall) Anwendung finden.

Vielleicht wird es in Zukunft sogar möglich sein diese Substanzen gezielt bei Störungen des blutbildenden Systems oder zur Behandlung bestimmter Leukämieformen einzusetzen.

8. Abkürzungsverzeichnis

AcNo	<i>EMBL/GenBank Accession Number</i>
ADAR	<i>Adenosine Deaminase that Acts on dsRNA</i>
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionat
AP	Adapter-Primer
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Rockville, USA)
bp	Basenpaare
CaM	Calmodulin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CKII	Caseinkinase II
cM	centiMorgen
CREB	<i>cAMP-Response Element Binding protein</i>
DAG	1,2-Diacylglycerin
DHGP	Deutsches Humangenomprojekt
Erk1/2	<i>Extracellular Signal Regulated Kinase</i> oder Map-Kinase)
G$\alpha$$\beta$$\gamma$	heterotrimeres Guaninnukleotid-bindendes Protein
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
gria	<i>Glutamate Receptor, ionotropic, AMPA</i>
grik	<i>Glutamate Receptor, ionotropic, Kainate</i>
grin	<i>Glutamate Receptor, ionotropic, NMDA</i>
GSP	Gen-spezifischer Primer
HSC	<i>Hematopoietic Stem Cell</i>
iGluR	ionotroper Glutamat-Rezeptor
IL	Interleukin
IP₃	Inosit-1,4,5-trisphosphat
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
KaR	Kainat-Rezeptor
Kb	Kilobasenpaare
M I	Markermix I; λ -DNA <i>EcoRI/HindIII</i> Verdau (MBI)
M II	Markermix II; pUC-DNA Verdau mit verschiedenen Enzymen (MBI)
Mbp	Megabasenpaare
Mek1/2	<i>Map and Erk</i> oder Map-Kinase-Kinase
mGluR	metabotroper Glutamat-Rezeptor
MILLIQH₂O	reinst Wasser (Reinigungsanlage der Firma Millipore)
nt	Nukleotide
NMDA	N-Methy-D-aspartat
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
RA	Vitamin A-Säure, all-trans-Retinsäure (<i>Retinoic Acid</i>)

RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
Raf	auch Map-Kinase-Kinase-Kinase genannt; Map, <i>Mitogen Activated Protein</i>
Ras	<i>Rat Sarcoma</i>
RT	Reverse Transkription/Transkriptase
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
RZPD	Ressourcenzentrum Primäre Datenbank in Heidelberg/Berlin
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
Sp	Signalpeptid
SRF	<i>Serum Response Factor</i>
TM	Transmembrandomäne oder -schleife
wt	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

9. Literaturverzeichnis

1. O. Al-almi, J. Sammons, J.H. Martin & H.T. Hassan (1998). Divergent effect of taxol on proliferation, apoptosis and nitric oxide production in MHH225 CD34 positive and U937 CD34 negative human leukaemia cells. *Leuk Res*, **22**, 10, 939-45.
2. B. Ault & L.M. Hildebrand (1993). Activation of nociceptive reflexes by peripheral kainate receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, **265**, 2, 927-32.
3. G.C. Avanzi, M.F. Brizzi, J. Giannotti, A. Ciarletta, Y.C. Yang, L. Pegoraro & S.C. Clark (1990). M0-7e human leukaemic factor-dependent cell line provides a rapid and sensitive bioassay for the human cytokines GM-CSF and IL-3. *J Cell Physiol*, **145**, 3, 458-64.
4. S.A. Azizi, D. Stokes, B.J. Augelli, C. DiGirolamo & D.J. Prockop (1998). Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7, 3908-13.
5. A. Barbon & S. Barlati (2000). Genomic organization, proposed alternative splicing mechanisms, and RNA editing structure of GRIK1. *Cytogenet Cell Genet*, **88**, 3-4, 236-9.
6. B.L. Bass (1997). RNA editing and hypermutation by adenosine deamination [published erratum appears in Trends Biochem Sci 1997 Jul;22(7):278]. *Trends in Biochemical Sciences*, **22**, 5, 157-62.
7. A. Bernard, L. Ferhat, F. Dessi, G. Charton, A. Represa, Y. Ben-Ari & M. Khrestchatsky (1999). Q/R editing of the rat GluR5 and GluR6 kainate receptors in vivo and in vitro: evidence for independent developmental, pathological and cellular regulation. *Eur J Neurosci*, **11**, 2, 604-16.
8. M.J. Berridge, M.D. Bootman & P. Lipp (1998). Calcium-a life and death signal [news]. *Nature*, **395**, 6703, 645-8.
9. B. Bettler, J. Boulter, I. Hermans-Borgmeyer, A. O'Shea-Greenfield, E.S. Deneris, C. Moll, U. Borgmeyer, M. Hollmann & S. Heinemann (1990). Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: expression in the nervous system during development. *Neuron*, **5**, 5, 583-95.

10. B. Bettler & C. Mülle (1995). Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology*, **34**, 2, 123-39.
11. U.S. Bhalla & R. Iyengar (1999). Emergent properties of networks of biological signaling pathways [see comments]. *Science*, **283**, 5400, 381-7.
12. C.R. Björnson, R.L. Rietze, B.A. Reynolds, M.C. Magli & A.L. Vescovi (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo [see comments]. *Science*, **283**, 5401, 534-7.
13. D.L. Black (1998). Splicing in the inner ear: a familiar tune, but what are the instruments? *Neuron*, **20**, 2, 165-8.
14. D. Bleakman & D. Lodge (1998). Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology*, **37**, 10-11, 1187-204.
15. S.P. Bruder, D.J. Fink & A.I. Caplan (1994). Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem*, **56**, 3, 283-94.
16. N. Burnashev (1996). Calcium permeability of glutamate-gated channels in the central nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, **6**, 3, 311-7.
17. S.M. Carlton, G.L. Hargett & R.E. Coggeshall (1995). Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. *Neurosci Lett*, **197**, 1, 25-8.
18. K. Cauley, V. Kukekov & D. Young (1997). Kainate/AMPA receptors expressed on human fetal astrocytes in long-term culture. *J Neurosci Res*, **47**, 3, 311-21.
19. C. Chenu, C.M. Serre, C. Raynal, B. Burt-Pichat & P.D. Delmas (1998). Glutamate receptors are expressed by bone cells and are involved in bone resorption. *Bone*, **22**, 4, 295-9.
20. R. Chittajallu, S.P. Braithwaite, V.R. Clarke & J.M. Henley (1999). Kainate receptors: subunits, synaptic localization and function. *Trends Pharmacol Sci*, **20**, 1, 26-35.
21. D.L. Clarke, C.B. Johansson, J. Wilbertz, B. Veress, E. Nilsson, H. Karlström, U. Lendahl & J. Frisen (2000). Generalized potential of adult neural stem cells. *Science*, **288**, 5471, 1660-3.

22. B. Cormand, K. Avela, H. Pihko, P. Santavuori, B. Talim, H. Topaloglu, A. de la Chapelle & A.E. Lehesjoki (1999). Assignment of the muscle-eye-brain disease gene to 1p32-p34 by linkage analysis and homozygosity mapping. *Am J Hum Genet*, **64**, 1, 126-35.
23. C. Cui & M.L. Mayer (1999). Heteromeric kainate receptors formed by the coassembly of GluR5, GluR6, and GluR7. *J Neurosci*, **19**, 19, 8281-91.
24. T.M. Dexter (1982). Stromal cell associated haemopoiesis. *J Cell Physiol Suppl*, **1**, 87-94.
25. R. Dingledine, K. Borges, D. Bowie & S.F. Traynelis (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*, **51**, 1, 7-61.
26. F. Doetsch, I. Caille, D.A. Lim, J.M. Garcia-Verdugo & A. Alvarez-Buylla (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, **97**, 6, 703-16.
27. R.C. Duke, D.M. Ojcius & J.D. Young (1996). Cell suicide in health and disease. *Sci Am*, **275**, 6, 80-7.
28. M.A. Eglitis & E. Mezey (1997). Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8, 4080-5.
29. P.S. Eriksson, E. Perfilieva, T. Björk-Eriksson, A.M. Alborn, C. Nordborg, D.A. Peterson & F.H. Gage (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus [see comments]. *Nat Med*, **4**, 11, 1313-7.
30. O. Eyigor & L. Jennes (1998). Identification of kainate-preferring glutamate receptor subunit GluR7 mRNA and protein in the rat median eminence. *Brain Res*, **814**, 1-2, 231-5.
31. B. Fehse (1996) Klonierung und Charakterisierung retroviraler Insertionsstellen aus Wachstumsfaktor-unabhängigen Zellmutanten. *Fachbereich Biologie*, Hamburg, Universität Hamburg, 110 Seiten.
32. E. Fuchs & J.A. Segre (2000). Stem cells: a new lease on life. *Cell*, **100**, 1, 143-55.
33. R. Galli, U. Borello, A. Gritti, M. Minasi, C. Björnson, M. Coletta, M. Mora, M. De Angelis, R. Fiocco, G. Cossu & A. Vescovi (2000). Skeletal myogenic

- potential of human and mouse neural stem cells. *Nature Neuroscience*, **3**, 10, 986-991.
34. V. Gallo & C.A. Ghiani (2000). Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new functions. *Trends Pharmacol Sci*, **21**, 7, 252-8.
 35. V. Gallo, D.K. Patneau, M.L. Mayer & F.M. Vaccarino (1994). Excitatory amino acid receptors in glial progenitor cells: molecular and functional properties. *Glia*, **11**, 2, 94-101.
 36. J.M. Garland & A. Halestrap (1997). Energy metabolism during apoptosis. Bcl-2 promotes survival in hematopoietic cells induced to apoptose by growth factor withdrawal by stabilizing a form of metabolic arrest. *J Biol Chem*, **272**, 8, 4680-8.
 37. P.G. Genever, D.J. Wilkinson, A.J. Patton, N.M. Peet, Y. Hong, A. Mathur, J.D. Erusalimsky & T.M. Skerry (1999). Expression of a functional N-methyl-D-aspartate-type glutamate receptor by bone marrow megakaryocytes. *Blood*, **93**, 9, 2876-83.
 38. E. Gould, A.J. Reeves, M.S. Graziano & C.G. Gross (1999). Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science*, **286**, 5439, 548-52.
 39. P. Gregor, B.F. O'Hara, X. Yang & G.R. Uhl (1993). Expression and novel subunit isoforms of glutamate receptor genes GluR5 and GluR6. *Neuroreport*, **4**, 12, 1343-6.
 40. A.J. Hale, C.A. Smith, L.C. Sutherland, V.E. Stoneman, V.L. Longthorne, A.C. Culhane & G.T. Williams (1996). Apoptosis: molecular regulation of cell death [published erratum appears in *Eur J Biochem* 1996 May 1;237(3):884]. *Eur J Biochem*, **236**, 1, 1-26.
 41. D.E. Hamassaki-Britto, I. Hermans-Borgmeyer, S. Heinemann & T.E. Hughes (1993). Expression of glutamate receptor genes in the mammalian retina: the localization of GluR1 through GluR7 mRNAs. *J Neurosci*, **13**, 5, 1888-98.
 42. J. Hannemann, T. Hara, M. Kawai, A. Miyajima, W. Ostertag & C. Stocking (1995). Sequential mutations in the interleukin-3 (IL3)/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/IL5 receptor beta-subunit genes are necessary for the complete conversion to growth autonomy mediated by a truncated beta C subunit. *Mol Cell Biol*, **15**, 5, 2402-12.

43. M. Hardy, D. Younkin, C.M. Tang, J. Pleasure, Q.Y. Shi, M. Williams & D. Pleasure (1994). Expression of non-NMDA glutamate receptor channel genes by clonal human neurons. *J Neurochem*, **63**, 2, 482-9.
44. C. Heberlein, J. Friel, C. Laker, D. von Laer, U. Bergholz, M. Bogel, L.K. Ashman, K. Klingler & W. Ostertag (1999). Downregulation of c-kit (stem cell factor receptor) in transformed hematopoietic precursor cells by stroma cells. *Blood*, **93**, 2, 554-63.
45. D. Herzlinger (1994). Renal stem cells and the lineage of the nephron. *Annu Rev Physiol*, **56**, 671-89.
46. M. Higuchi, F.N. Single, M. Kohler, B. Sommer, R. Sprengel & P.H. Seeburg (1993). RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. *Cell*, **75**, 7, 1361-70.
47. K. Hinterding, D. Alonso-Diaz & H. Waldmann (1998). Organische Synthese und biologische Signaltransduktion. *Angewandte Chemie*, **110**, 716-780.
48. M. Hollmann & S. Heinemann (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*, **17**, 31-108.
49. N. Inagaki, H. Kuromi, T. Gono, Y. Okamoto, H. Ishida, Y. Seino, T. Kaneko, T. Iwanaga & S. Seino (1995). Expression and role of ionotropic glutamate receptors in pancreatic islet cells. *FASEB J*, **9**, 8, 686-91.
50. K. Itoh, H. Tezuka, H. Sakoda, M. Konno, K. Nagata, T. Uchiyama, H. Uchino & K.J. Mori (1989). Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow. *Exp Hematol*, **17**, 2, 145-53.
51. C.B. Johansson, S. Momma, D.L. Clarke, M. Risling, U. Lendahl & J. Frisen (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*, **96**, 1, 25-34.
52. J.D. Jordan, E.M. Landau & R. Iyengar (2000). Signaling Networks: The Origins of Cellular Multitasking. *Cell*, **103**, 193-200.
53. R.K. Kamboj, D.D. Schoepp, S. Nutt, L. Shekter, B. Korczak, R.A. True, D.M. Zimmerman & M.A. Wosnick (1992). Molecular structure and pharmacological characterization of humEAA2, a novel human kainate receptor subunit. *Mol Pharmacol*, **42**, 1, 10-5.

54. G.K. Kanellopoulos, X.M. Xu, C.Y. Hsu, X. Lu, T.M. Sundt & N.T. Kouchoukos (2000). White matter injury in spinal cord ischemia: protection by AMPA/kainate glutamate receptor antagonism. *Stroke*, **31**, 8, 1945-52.
55. G. Kempermann & F.H. Gage (1999). New nerve cells for the adult brain. *Sci Am*, **280**, 5, 48-53.
56. T. Kitamura, T. Tange, T. Terasawa, S. Chiba, T. Kuwaki, K. Miyagawa, Y.F. Piao, K. Miyazono, A. Urabe & F. Takaku (1989). Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J Cell Physiol*, **140**, 2, 323-34.
57. E. Klein, H. Ben-Bassat, H. Neumann, P. Ralph, J. Zeuthen, A. Polliack & F. Vanky (1976). Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer*, **18**, 4, 421-31.
58. B. Korczak, S.L. Nutt, E.J. Fletcher, K.H. Hoo, C.E. Elliott, V. Rampersad, E.A. McWhinnie & R.K. Kamboj (1995). cDNA cloning and functional properties of human glutamate receptor EAA3 (GluR5) in homomeric and heteromeric configuration. *Receptors Channels*, **3**, 1, 41-9.
59. C. Kubisch, B.C. Schroeder, T. Friedrich, B. Lutjohann, A. El-Amraoui, S. Marlin, C. Petit & T.J. Jentsch (1999). KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell*, **96**, 3, 437-46.
60. F. Lai, C.X. Chen, V.M. Lee & K. Nishikura (1997). Dramatic increase of the RNA editing for glutamate receptor subunits during terminal differentiation of clonal human neurons. *J Neurochem*, **69**, 1, 43-52.
61. J.D. Malone, M. Richards & A.J. Kahn (1986). Human peripheral monocytes express putative receptors for neuroexcitatory amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 10, 3307-10.
62. I. Mano & V.I. Teichberg (1998). A tetrameric subunit stoichiometry for a glutamate receptor-channel complex. *Neuroreport*, **9**, 2, 327-31.
63. E.K. Michaelis (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol*, **54**, 4, 369-415.

64. C. Miller (2000). Ion channel surprises: prokaryotes do it again! *Neuron*, **25**, 1, 7-9.
65. M.Y. Min, D.A. Rusakov & D.M. Kullmann (1998). Activation of AMPA, kainate, and metabotropic receptors at hippocampal mossy fiber synapses: role of glutamate diffusion. *Neuron*, **21**, 3, 561-70.
66. I. Mody (1998). Interneurons and the ghost of the sea [news; comment]. *Nat Neurosci*, **1**, 6, 434-6.
67. S.J. Morrison, N.M. Shah & D.J. Anderson (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, **88**, 3, 287-98.
68. T. Müller, T. Moller, T. Berger, J. Schnitzer & H. Kettenmann (1992). Calcium entry through kainate receptors and resulting potassium-channel blockade in Bergmann glial cells [published erratum appears in *Science* 1992 Aug 28;257(5074):1190]. *Science*, **256**, 5063, 1563-6.
69. A.S. Niedzielski & R.J. Wenthold (1995). Expression of AMPA, kainate, and NMDA receptor subunits in cochlear and vestibular ganglia. *J Neurosci*, **15**, 3 Pt 2, 2338-53.
70. C.M. Niswender (1998). Recent advances in mammalian RNA editing. *Cell Mol Life Sci*, **54**, 9, 946-64.
71. D. Nizetic, S. Monard, B. Young, F. Cotter, G. Zehetner & H. Lehrach (1994). Construction of cosmid libraries from flow-sorted human chromosomes 1, 6, 7, 11, 13, and 18 for reference library resources. *Mamm Genome*, **5**, 12, 801-2.
72. M. Noda, H. Nakanishi, J. Nabekura & N. Akaike (2000). AMPA-kainate subtypes of glutamate receptor in rat cerebral microglia. *J Neurosci*, **20**, 1, 251-8.
73. S.L. Nutt, K.H. Hoo, V. Rampersad, R.M. Deverill, C.E. Elliott, E.J. Fletcher, S.L. Adams, B. Korczak, R.L. Foldes & R.K. Kamboj (1994). Molecular characterization of the human EAA5 (GluR7) receptor: a high-affinity kainate receptor with novel potential RNA editing sites. *Receptors Channels*, **2**, 4, 315-26.
74. R.A. Padgett, P.J. Grabowski, M.M. Konarska, S. Seiler & P.A. Sharp (1986). Splicing of messenger RNA precursors. *Annu Rev Biochem*, **55**, 1119-50.

75. A.J. Patton, P.G. Genever, M.A. Birch, L.J. Suva & T.M. Skerry (1998). Expression of an N-methyl-D-aspartate-type receptor by human and rat osteoblasts and osteoclasts suggests a novel glutamate signaling pathway in bone. *Bone*, **22**, 6, 645-9.
76. D.S. Pereira, C. Dorrell, C.Y. Ito, O.I. Gan, B. Murdoch, V.N. Rao, J.-P. Zou, E.S.P. Reddy & J.E. Dick (1998). Retroviral transduction of TLS-ERG initiates a leukemogenic program in normal human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14, 8239-8244.
77. D. Pitt, P. Werner & C.S. Raine (2000). Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis [see comments]. *Nat Med*, **6**, 1, 67-70.
78. S.J. Pleasure, C. Page & V.M. Lee (1992). Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *J Neurosci*, **12**, 5, 1802-15.
79. R.S. Puranam, J.H. Eubanks, S.F. Heinemann & J.O. McNamara (1993). Chromosomal localization of gene for human glutamate receptor subunit-7. *Somat Cell Mol Genet*, **19**, 6, 581-8.
80. W.M. Purcell, K.M. Doyle, C. Westgate & C.K. Atterwill (1996). Characterisation of a functional polyamine site on rat mast cells: association with a NMDA receptor macrocomplex. *J Neuroimmunol*, **65**, 49-53.
81. C. Rosenmund, Y. Stern-Bach & C.F. Stevens (1998). The tetrameric structure of a glutamate receptor channel [see comments]. *Science*, **280**, 5369, 1596-9.
82. B. Scheffler, M. Horn, I. Blumcke, E.D. Laywell, D. Coomes, V.G. Kukekov & D.A. Steindler (1999). Marrow-mindedness: a perspective on neurogenesis. *Trends Neurosci*, **22**, 8, 348-57.
83. H.H. Schiffer, G.T. Swanson & S.F. Heinemann (1997). Rat GluR7 and a carboxy-terminal splice variant, GluR7b, are functional kainate receptor subunits with a low sensitivity to glutamate. *Neuron*, **19**, 5, 1141-6.
84. J. Schmidtmer, C. Jacobsen, G. Miksch & J. Sievers (1994). Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: membrane currents. *Glia*, **12**, 4, 259-67.

85. H.E. Shannon & B.D. Sawyer (1989). Glutamate receptors of the N-methyl-D-aspartate subtype in the myenteric plexus of the guinea pig ileum. *J Pharmacol Exp Ther*, **251**, 2, 518-23.
86. S.H. Sigal, S. Brill, A.S. Fiorino & L.M. Reid (1992). The liver as a stem cell and lineage system. *Am J Physiol*, **263**, 2 Pt 1, G139-48.
87. L. Simpson & R.B. Emeson (1996). RNA editing. *Annu Rev Neurosci*, **19**, 27-52.
88. C.W.J. Smith & J. Valcárcel (2000). Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends in Biochemical Sciences*, **25**, 8, 381-388.
89. T. Smith, A. Groom, B. Zhu & L. Turski (2000). Autoimmune encephalomyelitis ameliorated by AMPA antagonists [see comments]. *Nat Med*, **6**, 1, 62-6.
90. T.R. Soderling (2000). CaM-kinases: modulators of synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*, **10**, 3, 375-80.
91. B.P. Sokolov (1998). Expression of NMDAR1, GluR1, GluR7, and KA1 glutamate receptor mRNAs is decreased in frontal cortex of neuroleptic-free schizophrenics: evidence on reversible up-regulation by typical neuroleptics. *J Neurochem*, **71**, 6, 2454-64.
92. B. Sommer, N. Burnashev, T.A. Verdoorn, K. Keinänen, B. Sakmann & P.H. Seeburg (1992). A glutamate receptor channel with high affinity for domoate and kainate. *EMBO J*, **11**, 4, 1651-6.
93. C. Stocking, U. Bergholz, J. Friel, K. Klingler, T. Wagener, C. Starke, T. Kitamura, A. Miyajima & W. Ostertag (1993). Distinct classes of factor-independent mutants can be isolated after retroviral mutagenesis of a human myeloid stem cell line. *Growth Factors*, **8**, 3, 197-209.
94. F. Striggow & B.E. Ehrlich (1996). Ligand-gated calcium channels inside and out. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 4, 490-5.
95. C. Sundström & K. Nilsson (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line U-937. *Int J Cancer*, **17**, 5, 565-77.
96. N.D. Theise, M. Nimmakayalu, R. Gardner, P.B. Illei, G. Morgan, L. Teperman, O. Henegariu & D.S. Krause (2000). Liver from Bone Marrow in Humans. *Hepatology*, **32**, 1, 11-16.

97. C. Villmann, N. Strutz, T. Morth & M. Hollmann (1999). Investigation by ion channel domain transplantation of rat glutamate receptor subunits, orphan receptors and a putative NMDA receptor subunit. *Eur J Neurosci*, **11**, 5, 1765-78.
98. C.D. Weaver, V. Gundersen & T.A. Verdoorn (1998). A high affinity glutamate/aspartate transport system in pancreatic islets of Langerhans modulates glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem*, **273**, 3, 1647-53.
99. C.D. Weaver, T.L. Yao, A.C. Powers & T.A. Verdoorn (1996). Differential expression of glutamate receptor subtypes in rat pancreatic islets. *J Biol Chem*, **271**, 22, 12977-84.
100. A. Weiss & J.D. Stobo (1984). Requirement for the coexpression of T3 and the T cell antigen receptor on a malignant human T cell line. *J Exp Med*, **160**, 5, 1284-99.
101. I.L. Weissman (2000a). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, **100**, 1, 157-68.
102. I.L. Weissman (2000b). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*, **287**, 5457, 1442-6.
103. Y. Yoneda & K. Ogita (1987). Enhancement of [3H]glutamate binding by N-methyl-D-aspartic acid in rat adrenal. *Brain Res*, **406**, 1-2, 24-31.
104. X. Yuan, A.M. Eisen, C.J. McBain & V. Gallo (1998). A role for glutamate and its receptors in the regulation of oligodendrocyte development in cerebellar tissue slices. *Development*, **125**, 15, 2901-14.

10. Anhang

10.1 EMBL/GeneBank AcNo. AJ299451

ID	HSA299451	confidential; RNA; HUM; 2619 BP.
XX		
AC	AJ299451;	
XX		
DE	Homo sapiens mRNA for glutamate receptor 7 (GRIK3 gene)	
XX		
KW	glutamate receptor 7; GRIK3 gene.	
XX		
OS	Homo sapiens (human)	
OC	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;	
OC	Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.	
XX		
RN	[1]	
RP	1-2619	
RA	Schwartz D.;	
RT	;	
RL	Submitted (30-OCT-2000) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.	
RL	Schwartz D., Cell- and Virusgenetics, Heinrich Pette Institut,	
RL	Martinistrasse 52, 20251 Hamburg, GERMANY.	
XX		
RN	[2]	
RA	Schwartz D.;	
RT	;	
RL	Thesis (2000), Department of Chemistry, University of Hamburg,	
RL	Hamburg, Germany.	
XX		
FH	Key	Location/Qualifiers
FH		
FT	source	1..2619
FT		/organism="Homo sapiens"
FT	CDS	1..2619
FT		/gene="GRIK3"
FT		/product="glutamate receptor 7"
FT		/function="ion channel"
FT		/evidence=EXPERIMENTAL
FT		/translation="MTAPWRRRLRSLVWEYWAGLLVCAFWIPDSRGMHPVIRIGGIFEYA
FT		DGPNAQVMNAEEHAFRF SANI INRNRTLLPNTTLYTDIQRIFHDSFEATKKACDQLAL
FT		GVVAIFGPSQGSCTNAVQSI CNALEVPHIQLRWKHHPLDNKDTFYVNLYPDYASLSHAI
FT		LDLVQYLKWRSATVYDDSTGLIRLQELIMAPSRYNIRLKI RQLPIDSDDSRPLLKEMK
FT		RGREFRIIFDCSHTMAAQILKQAMAMGMMTEYYHFIFTTLDLYALDLEPYRYSGVNLTG
FT		FRILNVDNPHVSAIVEKWSMERLQAAPRAESGLLDGVMMTDAALLYDAVHIVSVCYQRA
FT		PQMTVNSLQCHRHKAWRFGGRFMNF IKAQWEGLTGRIVFNKTSGLRDTDFDLDI I SLKE
FT		DGLEKVGWVSPADGLNITEVAKGRGPNVTDLSLTNRSLIVTTVLEBEPFVMFRKSDRTLYG
FT		NDRFEGYCIDLLKELAHILGFSYEIRLVEDGKYGAQDDKGQWNGMVKELIDHKADLAVA
FT		PLTI THVREKAIDFSKPFMTLGVSI LYRKPNGTNPVSVF SFLNPLSPDIWMYVLLAYLGV
FT		SCVLFVIARFSPYEWYDAHPCNPGSEVVENNETLNSFWFGMSLMQQGSVLMPKALST
FT		RIIGGIWFFTLII ISSYTANLAAFLTVERMESPIDSADDLAKQTKIEYGAVKDGTMT
FT		FFKKSILSTFEKMWAFMSRKPSALVKNNEEGIQRAL TADYALLMESTPIEYVTQRNCNL
FT		TQIGGLIDSKGYGIGTPMGSPYRDKITIAILLQLQEEDKLHIMKEKWWRGSGCPEENKE
FT		ASALGIQKIGGIFIVLAAGLVLSVLVAVGGEFVYKLRKTAEREQVSLRAWSLHRMNGGDS
FT		R"
XX		
SQ	Sequence 2619 BP; 582 A; 779 C; 723 G; 535 T; 0 other;	
	atgaccgctc cctggcggcg cctccggagt ctggtttggg aatactgggc cgggctcctc	60
	gtgtgcgect tctggatccc ggactcgcgc gggatgcccc acgtcatccg gatcggagga	120
	atcttcgagt atgcccagcg ccccaacgcc caggatcatga atgccgagga gcatgccttt	180
	cgattttctg ccaacatcat caacaggaac aggactctgc tgcccaacac aaccttgacc	240
	tatgacatac agaggattca ctccatgac agcttcgagg cgaccaaaaa ggcctgtgac	300
	cagctggcac tgggcgtggt ggcgatcttc ggcccatcac agggctcctg caccaatgcc	360
	gtccagtgcca tctgcaatgc cctggagggtg ccccatatcc agctgcgttg gaagcaccac	420
	ccgctgggaca acaaggacac ctctctacgt aacctctacc cggactacgc ctcgctcagc	480
	catgcatccc tcgacctggt ccagtaacct aagtggcggg cageccaccg gtcctatgac	540
	gacagtacag ggctcatccg actgcaggag ctcatcatgg ccccatcaag atacaacatc	600
	cgctgaaga tccgtcagct ccccatcgac tctgacgact cgcgccccctt gctcaaggag	660
	atgaagcgag gccgggaatt ccgcattatc ttcgactgca gccacactat ggcggccccag	720
	atcctcaagc aggccatggc catgggcatg atgactgagt actaccactt catcttcacc	780
	actctggatc tctacgcttt agacctggag ccctaccgct actcaggcgt gaacctgaca	840
	ggattccgga ttctcaatgt ggacaaccca cacgtctcgg ccattgtgga gaagtggctc	900

atggagcggc	tgcaggcagc	tccccgggcc	gagtctggcc	tgctggatgg	agtgatgatg	960
actgatgcag	ccttactgta	cgacgccgtc	catatcgtgt	ccgtgtgcta	ccagcgggca	1020
ccacagatga	ccgtgaactc	cctgcagtgc	categgcaca	aggcctggcg	ctttggcggc	1080
cgcttcatga	acttcatcaa	ggaggctcaa	tgggaaggat	taactggaag	aattgttttc	1140
aacaaaacta	gtggcttgcg	gacggatttt	gatctggaca	tcatcagcct	gaaagaggat	1200
ggcctggaga	aggttggggg	gtggagtcc	gccgacgggc	tcaacatcac	tgaggttgcc	1260
aaaggccgag	gccctaagt	caccgactct	ctgacaaaca	gatcactcat	tgtcaccaca	1320
gtgctggagg	agcccttcgt	catgtttcgg	aaatcagaca	ggacgtata	tgggaatgac	1380
cggttcgagg	gctactgcat	cgacctgcta	aaggagctgg	cccacatcct	tggtttctcc	1440
tatgagatcc	ggctgggtgga	ggacggcaag	tacggggcac	aggatgacaa	gggccagtgg	1500
aaaggcatgg	tcaaggagct	catcgaccac	aaggcagatc	tggccgtggc	ccccctgacc	1560
atcacccatg	ttcgagagaa	ggccatcgac	ttctccaagc	ccttcatgac	acttgggtgtg	1620
agcatcctgt	atcgaaagcc	caatggcacc	aaccccagcg	tcttctcctt	cctcaatccc	1680
ctgtccccag	acatctggat	gtatgttctc	ctgcctacc	tgggggtcag	ctgtgtcctc	1740
ttcgtcatcg	ccaggttcag	cccttatgag	tggtacgatg	ctcaccctg	caaccctggc	1800
tccgaggtgg	tggaaaataa	cttcaactctg	cttaacagct	tctggtttgg	aatgggatcc	1860
ctgatgcagc	aagggctctgt	gctgatgcc	aaagccctgt	ccacacgcat	cattgggtggc	1920
atctggtggt	tctttacgct	catcatcatc	tcttctaca	cggccaacct	ggetgccttt	1980
ctgaccgtgg	agcgcattgga	atcacccatt	gactctgctg	atgacctggc	caagcaaacc	2040
aaaatcgagt	atggggctgt	caaggatggg	gccaccatga	ccttcttcaa	gaaatccaag	2100
atctccacct	tccgagaagat	gtgggccttc	atgagcagga	agccatcggc	gctggtgaag	2160
aacaacgagg	agggcatcca	gagggccctg	acggccgact	acgcgctgct	catggagtcc	2220
accaccatcg	agtacgtcac	gcagaggaac	tgcaacctca	cccagatcgg	gggcctcatt	2280
gactccaagg	gctacggcat	cggcacgccc	atgggctccc	cataccggga	caagatcacc	2340
atcgccatcc	tgcagcttca	ggaggaggac	aagctgcata	tcatgaagga	gaagtgggtgg	2400
cggggcagcg	ggtgtcctga	ggaggaaaac	aaagaggcca	gtgccctggg	gatccagaag	2460
atcgggggca	tcttcattgt	cctggccgcc	gggctggtcc	tctctgtgct	ggtggccgtg	2520
ggcgagtttg	tgtacaagct	ccgcaaaaca	gcagaaagag	agcaggtaa	ccttagagct	2580
tggaagcctgc	acaggatggg	aaatggagat	tccgctga			2619

//

10.2 EMBL/GeneBank AcNo. AJ308525

```

ID   HSA308525  confidential; DNA; HUM; 1365 BP.
XX
AC   AJ308525;
XX
DE   Homo sapiens partial GRIK3 gene for glutamate receptor 7, exon 16
XX
KW   alternative splicing; glutamate receptor 7; GRIK3 gene.
XX
OS   Homo sapiens (human)
OC   Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
OC   Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
XX
RN   [1]
RP   1-1365
RA   Schwartz D.;
RT   ;
RL   Submitted (16-FEB-2001) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
RL   Schwartz D., Cell- and Virusgenetics, Heinrich Pette Institut,
RL   Martinistrasse 52, 20251 Hamburg, GERMANY.
XX
RN   [2]
RA   Schwartz D.;
RT   ;
RL   Thesis (2001), Department of Chemistry, University of Hamburg,
RL   Hamburg, Germany.
XX
FH   Key          Location/Qualifiers
FH
FT   source       1..1365
FT               /organism="Homo sapiens"
FT               /clone_lib="Cosmid Library No: 112"
FT               /clone="ICRFc112M1949Q1"
FT               /chromosome="1"
FT               /map="1p32-33"
FT   intron      <1..226
FT               /gene="GRIK3"
FT               /number=16
FT   exon        227..477
FT               /gene="GRIK3"
FT               /number=16
FT               /note="conserved exon"
FT   CDS         <227..>477
FT               /codon_start=3
FT               /gene="GRIK3"
FT               /product="glutamate receptor 7"
FT               /function="ion channel"
FT               /note="GluR7a"
FT               /translation="SPYRDKITITAILQLQEEXKLHIMKEKWWRGSGCPPEENKEASALG
FT               IQKIGGIFIVLAAGLVLSVLVAVGEFVYKLRKTAEREQ"
FT   exon        227..>531
FT               /gene="GRIK3"
FT               /number=16
FT               /note="variant exon"
FT   CDS         <227..531
FT               /codon_start=3
FT               /gene="GRIK3"
FT               /product="glutamate receptor 7"
FT               /function="ion channel"
FT               /note="GluR7c variant"
FT               /translation="SPYRDKITITAILQLQEEXKLHIMKEKWWRGSGCPPEENKEASALG
FT               IQKIGGIFIVLAAGLVLSVLVAVGEFVYKLRKTAEREQVSLRAWSLHRMNGDSR"
XX
SQ   Sequence 1365 BP; 358 A; 353 C; 338 G; 310 T; 6 other;
ccacagggnc tgatacncaa tgggcgacc ctcnctgctc aaacaggnca tttccactcn      60
cccagatacc atgctgatgat ttaaagggga ctcacagggga tagggacccc ctttcatgag      120
ctgatccaga gggctagtgg tggtagcctg accagggtgt tggcagagcc aaacacagaa      180
tgggccacac gccactgatg gctaggggtc ccttctccct gctcaggctc cccataccgg      240
gacaagatca ccatgcgat cctgcagctt caggaggagg ncaagctgca tatcatgaag      300

```

gagaagtgg	ggcggggcag	cggtgtcct	gaggaggaaa	acaaagaggc	cagtgcctg	360
gggatccaga	agatcggggg	catcttcatt	gtcctggccg	cgggctggg	cctctctgtg	420
ctgggtggccg	tgggcgagtt	tgtgtacaag	ctccgcaaaa	cagcagagag	agagcaggta	480
agccttagag	cttgagcct	gcacaggatg	ggaaatggag	attcggctg	atttcactcc	540
tgtatgtgcc	aggcacacag	tgggtgtctca	tctcagcctc	acaacagctc	accctgcatc	600
cagtgcggcca	gcaagccctg	ccactctacc	tctgtcctga	cctggcactt	ttttccatcg	660
ccgttgcccc	acccagggc	aagccccatc	acctcctgcc	tggattatgc	cgcagccttc	720
aaactggccc	tccagcctcc	atgcttcccc	aacaccatcc	acaattcaca	cagcaactgg	780
taccttgttt	aaaacttaat	tcaaaccata	tcattttcct	gcataaaacc	ctccagggta	840
attggttgaag	gtgggtgatg	gttgcatagg	gtttcattat	actgttctct	ctaccttgc	900
atatatttgg	aaatttccat	aatcaaaagt	ttaaaaagga	aaagttaaca	gggttggccc	960
aagcatatag	acagtagaac	taggctcagg	ccttctgatt	aattcaagca	tgggtgggca	1020
gtagttctgg	gtcccagtag	caaattagaa	tcacagggag	aaagttttca	agtgctaagt	1080
ccctggactc	actcccagag	actctctggt	ttaattggtc	tgtggtggag	ccagcattat	1140
gcttttacia	aaccctacag	ggtgatttaa	atgtgtgccc	gagatgaggg	ccgctgggct	1200
gggggaagca	caactcacag	agaagttaa	ggatattgca	gttaaattat	atatagaagg	1260
gccattata	aacaagcaac	ttacatatcc	gtaaaaaacg	aatggaatc	ctctataacc	1320
agcaagcctt	agtcaacaaa	gaggaggggg	aaagataata	ctcga		1365

//

10.3 EMBL/GeneBank AcNo. AJ308526

```
ID HSA308526 confidential; DNA; HUM; 197 BP.
XX
AC AJ308526;
XX
DE Homo sapiens partial GRIK3 gene for glutamate receptor 7, exon 18
XX
KW glutamate receptor 7; GRIK3 gene.
XX
OS Homo sapiens (human)
OC Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
OC Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
XX
RN [1]
RP 1-197
RA Schwartz D.;
RT ;
RL Submitted (16-FEB-2001) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
RL Schwartz D., Cell- and Virusgenetics, Heinrich Pette Institut,
RL Martinistrasse 52, 20251 Hamburg, GERMANY.
XX
RN [2]
RA Schwartz D.;
RT ;
RL Thesis (2001), Department of Chemistry, University of Hamburg,
RL Hamburg, Germany.
XX
FH Key Location/Qualifiers
FH
FT source 1..197
FT /organism="Homo sapiens"
FT /clone_lib="Cosmid Library No: 112"
FT /clone="ICRFc112M1949Q1"
FT /chromosome="1"
FT /map="1p32-33"
FT CDS <87..>197
FT /codon_start=1
FT /gene="GRIK3"
FT /product="glutamate receptor 7"
FT /note="GluR7a"
FT /function="ion channel"
FT /translation="RSPFCSTVADEIRFSLTCQRRVKHKPQPMMVKTDAVI"
FT intron <1..86
FT /gene="GRIK3"
FT /number=17
FT exon 87..>197
FT /gene="GRIK3"
FT /number=18
XX
SQ Sequence 197 BP; 37 A; 70 C; 47 G; 43 T; 0 other;
agaaagggga ggaactggct ggagttgcaa gcacgggcat catctctgtg ccccttttcc 60
gacccctctc ctccaccctc ctgcagcggt ccttctgcag caccgtggcc gatgagatcc 120
gtttctcct tacctgccag cgtcagatca agcacaagcc tcagcctccc atgatggtca 180
agactgacgc cgtcatc 197
//
```

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Wolfram Ostertag danke ich sehr herzlich für die großzügig gewährte Freiheit bei der Durchführung des gestellten Themas und der steten Diskussionsbereitschaft während dieser Zeit.

Ich danke Frau Dr. Carol Stocking für ihre Einsatzbereitschaft, ihre hervorragende Betreuung, ihre Kreativität und die von ihr geschaffene angenehme und persönliche Arbeitsatmosphäre innerhalb der Gruppe. Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe (Sibyll Hein, Marion Ziegler, Oliver Frank, Johann Meyer, Ulla Bergholz, Martin Forster, Michaela Rodenburg, Steffi Peter, Susanne Roscher) und der Abteilung danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und für die vielen anregenden Diskussionen. Dazu gehört natürlich auch die Sekretärin der Abteilung Frau Ingrid Michalski.

Bei Herrn Prof. Dr. Hans Marquardt bedanke ich mich für die Betreuung seitens des Fachbereiches Chemie der Universität Hamburg.

Für die schnelle und unbürokratische finanzielle Unterstützung danke ich der FAZIT-Stiftung aus Frankfurt/M.

Herrn Prof. Wittko Francke danke ich genauso wie Herrn Prof. Hans-Georg Kräusslich für die nicht selbstverständliche Unterstützung, die nötig war, diese Arbeit zu beenden.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung der biophysikalischen Experimente bei folgenden Mitarbeitern des ZMNHS Dr. Robert Bähring, Dr. Martin Schwarz sowie Dr. Dirk Isbrandt und Mitarbeitern. Des weiteren danke ich Dr. Irm Hermanns-Borgmeyer für die Bereitstellung der „*In situs*“.

Bei meinen Freunden, insbesondere bei Nicoletta, Ute (für „*beispielsweise Bezug*“), Björn und Frank (für „*Dia-Scan? – Kein Problem!*“), meinen Eltern und Geschwistern möchte ich mich für ihre tatkräftige und moralische Unterstützung bedanken. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ihnen allen sei an dieser Stelle von ganzem Herzen gedankt.

Curriculum Vitae

von

Dirk Schwartz

geboren in Bad Oldesloe

Kontakt:

Rothestrasse 31

Tel.: +49 +40 3990 9229

22765 Hamburg

Email: dschwartz@web.de

Promotion:

Seit August 1995 Doktorand am **Heinrich Pette Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg**. Abteilung für Zell- und Virusgenetik (Prof. Wolfram Ostertag).

Gefördert durch ein Promotionsabschluss-Stipendium der **FAZIT-Stiftung** aus Frankfurt/Main.

Studium:

Okt. 1990 Vordiplom am Fachbereich Chemie der **Johann Wolfgang von Goethe Universität Frankfurt/M.**

Nov. 1994 Hauptdiplom am Fachbereich Chemie der **Universität Hamburg**.

Praxis:

1994/1995 Diplomarbeit bei Prof. Hubert Köster am **Institut für Biochemie und Molekularbiologie** der Universität Hamburg. Titel: *Darstellung und Analytik von Oligodesoxynukleotiden mit Modifikationen in der Internukleotid-Bindung* (Stichworte: Antisense-Therapeutika; HPLC, Photo Diode Array; MALDI-TOF-MS).

1995 **GBA (Gesellschaft für Bioanalytik mbH)** in Hamburg; (Stichworte: Aflatoxine in Lebensmitteln, KW-Gehalt in Bodenproben).

1994/1995 Lehrbeauftragter an der **Universität Hamburg** für die Veranstaltung: *Chemie für Mediziner*.

1991/1993 Studentische Hilfskraft am **Institut für Angewandte und Anorganische Chemie** der Universität Hamburg (Spurenanalytik, Aerosol-Schadstoffdeposition).

Veröffentlichungen:

Schwartz, D., Ostertag, W. and Stocking, C. (2001). Cloning and Characterisation of a New Human GluR7 Splice Variant. *In Vorbereitung*.

Schwartz, D., Ostertag, W. and Stocking, C. (2000): Kainate Receptor Diversity in the Human Hematopoietic System: Identification of a Novel Subunit Splice Variant Contributing to a Functional Receptor. (Abstr.). *Eur J Neurosci*, **12** (Suppl. 11) 134.09.

Fehse, B., Papadopoulos, P., Kühlcke, K., Schwartz, D., Ratz, I., Stocking, C., Ostertag, W. and Lothar, H. (1996): Molecular Genetic Analysis of Growth-Factor Independent Cell Mutants Obtained by Retroviral Insertion Mutagenesis (Abstr.). *Eur J Cell Biol*, **69** (Suppl. 42) 30.

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01.08.95 bis zum 30.09.00 in der Abteilung von Prof. W. Ostertag am Heinrich Pette Institut für experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg angefertigt.

Diese Arbeit ist nicht zuvor in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und keine anderen als die erlaubten Hilfsmittel verwendet habe. Die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Quellen stammenden Angaben habe ich als solche kenntlich gemacht sowie die Inanspruchnahme persönlicher Hilfe namentlich erwähnt.

Dirk Schwartz