B3463

Az egér glutaminsav dekarboxiláz 67 kDa formáját kódoló gén szerkezete, valamint- szövet és fejlődés-specifikus szabályozása

Ph.D. értekezés

SZABÓ GÁBOR

MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézete

Szeged, 1997.

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK 1

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 4

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 5

ÁBRÁK JEGYZÉKE 7

1. BEVEZETŐ 8

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 10

2.1. A γ–aminovajsav (GABA) funkciója az idegrendszerben 10

2.1.1. A neurotranszmitter GABA 10

2.1.2. GABA mint trofikus faktor 10

2.1.3. A GABA szerepe az idegrendszeren kívül 11

2.2. A GABA receptor család 12

2.3. A GABA-szintézis kulcsenzime a glutaminsav dekarboxiláz (GAD) 13

2.3.1. A heterogén glutaminsav dekarboxiláz 13

2.3.2. A glutaminsav dekarboxiláz aktivitásának szabályozása 15

3. CÉKITŰZÉSEK 17

4. MÓDSZEREK 19

4.1. Általános in vitro DNS "manipulációs" technikák 19
4.2. cDNS és genomiális DNS klónok izolálása génkönyvtárakból 19
4.3. Genetikai térképezés 19
4.4. RNS izolálás és Northern hibridizáció 20
4.5. Specifikus mRNS régiók amplifikálása és cDNS klónozás RNS templáton készült egyesszálú cDNS-en végzett polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) 20
4.6. A GAD67 mRNS ismeretlen 3' végének azonosítása "cDNS végek gyors amplifikációja" módszerével (3'-RACE) 20
4.7. cDNS által kódolt fehérjék termelése bakteriális expressziós rendszerekben 21
4.8. Poliklonális ellenanyagok előállítása 21
4.9. In vitro transzláció 21
4.10. Fehérjék expressziója szövettenyészetekben 22
4.11. Western immunoblott technika 22
4.12. DNS szekvencia analízis 22

5. KUTATÁSI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK 23

5.1. Az egér glutaminsav dekarboxiláz 67 kDa izoformája 23

5.1.1. A cDNS klónozása és a nukleotidsorrendjének meghatározása valamint az általa kódolt fehérje jellemzése 23

5.1.2. Az egér GAD cDNS az enzim 67 kDa formáját kódolja 24

5.1.3. Az egér 65 kDa és 67 kDa GAD, valamint a Drosophila melanogasterből izolált GAD fehérje aminósavsorrendjének összehasonlítása: a glutaminsav dekarboxiláz funkcionális szerkezete 25

5.2. A GAD 67 kDa izoformáját kódoló gén jellemzése 30

5.2.1. A GAD67 cDNS-sel homológ szekvenciákat tartalmazó kromoszómális régiók izolálása 30

5.2.2. Az egér glutaminsav dekarboxiláz 67 kDa izoformáját kódoló valódi gén és pszeudogén kromoszómális helyzetének meghatározása 32

5.2.3. Az egér glutaminsav dekarboxiláz 67 kDa izoformáját kódoló gén szerkezete 35

5.3. Alerantív exonhasználat szerepe a GAD67 gén fejlődés-specifikus működésének szabályozásában: a rövidített embrionális GAD fehérjeformák 37

5.3.1. A bicisztronos GAD67 mRNS-ek szerkezete 37

5.3.2. A bicisztronos GAD mRNS-ek által kódolt rövidített embrionális fehérjék azonosítása 40

5.3.3. A rövidített embrionális GAD fehérjék keletkezési mechanizmusa: transzlációs kapcsoltság 42

5.3.4. A különböző embrionális és felnőtt GAD67 mRNS-eket eredményező alternatív splicing fejlődés-specifikus szabályozása 44

5.3.5. A rövidített embrionális GAD fehérjeformák feltételezett szerepe az idegrendszer differenciációjában 46

5.4. Az egér GAD67 gén transzkripcióját irányító összetett promoter-rendszer azonosítása és jellemzése 49

5.4.1. A felnőtt agyban képződő GAD67 mRNS-ek 5`-végeinek meghatározása és a transzkripció kezdőpontjainak megfelelő promoterek azonosítása 49

5.4.2. A GAD67 gén szabályozásában esetlegesen szerepet játszó potenciális transzkripciós faktor kötőhelyek azonosítása 54

5.4.3. Idegrendszer-specifikus cisz DNS elemek az egér GAD67 gén 5' régiójában 56

6. A FŐBB ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA 59

7. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ 63

8. IRODALOMJEGYZÉK 66

9. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE 79

10. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ FEL NEM HASZNÁLT, DE A TÉMÁHOZ CSATLAKOZÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE 80

11. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK ÉS ABSZRAKTOK 81

12. MELLÉKLET: az értekezésben felhasznált saját közlemények másolatai 83

KÖSZÖNETNYILÁNÍTÁS

Elsősorban feleségemnek Zója Katarovának tartozom hálával, amiért mind a szakmai munkámban, mind pedig a magánéletben társam volt. Fiamnak köszönöm, hogy elfogadta azt, hogy a család mindennapjainak a tudományos kutatás fontos részét képezi.

Tanítómestereim közül Molnár Jánosnak, Udvardy Andornak köszönettel tartozom azért, hogy példaadásukkal elkötelezetté tettek a tudományos pálya iránt.

A mindenkori munkahelyi vezetőimnek, Venetiánar Pálnak és Vígh Lászlónak pedig köszönöm a bizalmat és támogatást.

A néhai Joó Ferencnek örök hálával tartozom atyai jótanácsaiért és önzetlen támogatásáért.

Ralph Greenspan-nak köszönettel tartozom a laboratóriumában töltött felejthetetlen évekért, nagyvonalú támogatásáért és a tudományos témánk elindításáért.

Enrico Mugnaini máig is tartó szakmai együttműködése nélkül nem sikerült volna beindítani és művelmi a molekuláris biológiai kutatásainkat.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AA	-	aminósav
AAD	-	aromás aminósav dezamináz
AChE	-	acetilkolin észteráz
Ach	-	acetilkolin
AMPA	-	"α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate"
ATP	-	adenozin trifoszfát
BDNF	-	"brain derived neurotophic factor"
bp	-	bázispár
DBH	-	dopamin β-hidroxiláz
cAMP	-	ciklikus adenozin monofoszfát
Ca^{++}	-	kálcium ion
cDNS	-	mRNS DNS másolata
ChAT	-	kolin acetiltranszferáz
Cl^-	-	klorid ion
Cm	-	centi Morgan
DNS	-	dezoxi ribonukleinsav
GABA	-	gamma-aminóvajsav
GABA-T	-	GABA transzamináz
GAD	-	glutaminsav dekarboxiláz
GAP 43	-	"growth associated protein 43"
GHRH	-	"growth hormon releasing hormon"
GTP	-	guanozin trioszfát
HLH	-	"helix-loop-helix"
Hox	-	"homeo box"
IPTG	-	"isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside"
K^+	-	kálium ion
kb	-	kilo bázispár
kDa	-	kilo dalton
MGMT	-	"O^6-methylguanine-DNA methyltransferase"
mRNS	-	"messenger" ribonukleinsav

NMDA	-	"N-methyl-D-aspartate"
MOPS	-	"3-[N-morpholino]propanesulfonic acid"
Na^+	-	nátrium
NCAM	-	"neuronal cell adhesion molecule"
NBT-BCIP	-	"(nitro blue tetrazolium)-(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate)"
NRE	-	"negative regulatory element"
NRSE	-	"neuron-restrictive silencer factor"
NRSF	-	"neuron-restrictive silencer element"
ORF	-	"open reading frame" (nyitott leolvasási keret)
PAGE	-	poliakrilamid gélelektroforézis
PCR	-	"polymerase chain reaction"
Pi	-	pirofoszfát
PI	-	piridoxál foszfát
RT-PCR	-	"reverse transcription coupled PCR"
RACE	-	"rapid amplification of cDNA ends"
RPLP	-	"restriction fragment legth polymorphism"
SDS	-	"sodium dodecil sulphate"

ÁBRÁK JEGYZÉKE

1. *A teljes hosszúságú egér GAD67 cDNS szerkezete*

2. *A két egér GAD forma (67 kDa és 65 kDa) és a Drosophila glutaminsav dekarboxiláz szerkezetének összehasonlítása*

3. *Az egér GAD67 és a Drosophila GAD aminósavsorrendjének összehasonlítása: a glutaminsav dekarboxiláz katalitikus doménjének szerkezete*

4. *Az egér GAD gének kromoszómális lokalizációja*

5. *Az egér GAD67 génről átíródó embrionális és felnőtt mRNS-ek és az általuk kódolt fehérjék*

6. *Az embrionális bifunkcionális GAD mRNS két átfedő nyitott leolvasási keretének transzlációs kapcsoltságában fontos cisz DNS regulációs elemek*

7. *A szigorúan szabályzott "alternative splicing" szerepe a különböző GAD fehérjeformák keletkezésében*

8. *Modell: a különböző GAD fehérjeformák szerepe az idegrendszer fejlődésében*

9. *Az egér GAD67gén többszörös promoter-rendszere*

10. *A P1, P2 és P3 promoterről átíródó GAD67 transzkriptumok 5' végi nem-transzlálódó régiójának szerkezete*

1. BEVEZETŐ

A magasabbrendű élőlényekben a különböző szervek összehangolt működésében és a környezethez való alkalmazkodásban az idegrendszernek alapvető szerepe van.

Az idegi működés az igen nagyszámú, strukturálisan és funkcionálisan is rendkívül heterogén, valamint nagymértékben specializált idegsejtek között kialakuló bonyolult kommunikáción keresztül valósul meg.

A magasabb idegi funkciók molekuláris alapjairól annak bonyolultsága miatt ma még meglehetősen keveset tudunk. De a napjainkban rohamos fejlődésnek indult molekuláris neurobiológiai kutatások közelebb visznek ennek megértéséhez.

Mind az idegsejtek specializált működéséhez, mind pedig az idegrendszer fejlődéséhez rendkívül sok gén szabályozott együttműködése szükséges. Az emlősökben működő mintegy százezer gén 30-50%-a kizárólag az idegrendszerben fejeződik ki. Ezen idegrendszer-specifikus gének időben és térben szabályozott együttműködése az alapja a különböző típusú idegsejtek differenciálódásának és a köztük kialakuló plasztikus kapcsolatoknak. Az idegsejtek közötti kommunkációt biztosító szinapszisokon tovaterjedő impulzusok szintén megváltoztatják számtalan gén aktivitását. Ezen génaktivitás változás összefüggésbe hozható az idegrendszer legfontosabb funkciójával, az információtárolással, vagyis a memóriával is.

Az idegsejtek között az információt a neurotranszmitterek közvetítik. Ezen kis molekulasúlyú biológiailag aktív molekulák, pl aminósav származékok vagy peptidek, az idegvégződésekből felszabadulva a posztszinaptikus membránokban található receptorokhoz kötődnek és aktiváló, vagy pedig gátló hatást fejtenek ki a célsejtekre.

A központi idegrendszer legfőbb gátló neurotranszmittere a γ-aminóvajsav (GABA), amelyet az idegsejtek kb egyharmada használ. Ezért aztán nincsen olyan normál vagy kóros idegi működés, amelyben a GABAerg rendszer közvetlenül vagy közvetve ne lenne érintett. Ezenkívül a GABA szerepet játszik az idegi fejlődés szabályozásában, és számos perifériás szövetben pedig (pl hasnyálmirigy inzulintermelő β-sejtjei) a sejtek közötti kommunikáció közvetítésében is részt vesz. A GABA-szintet egyértelműen a szintézisében kulcsszerepet játszó glutaminsav dekarboxiláz (GAD) enzim aktivitása határozza meg. Ezért a GABA-szintetizáló enzimek szabályozásának tanulmányozása a génműködés különböző szintjein nagymértékben elősegíti a magasabb idegi tevékenység

egy fontos láncszemének, a GABAerg rendszer fiziológiás és kóros működésének és kialakulásának megértését.

Ezen túlmenően a GAD gént mint modellrendszert felhasználva az idegi működés és differenciáció génszintű szabályozásának általános törvényszerűségei is tanulmányozhatók.

Az egér glutaminsav dekarboxilázt kódoló gén szövet- és fejlődés-specifikus szabályozásának vizsgálatát a Princetoni Egyetem Biológiai Intézetében és a Roche Molekuláris Biológiai Intézetben kezdtük meg Dr. Ralph Greenspan laboratóriumában, majd hazatérve az SZBK Biokémiai Intézetének az általunk alapított Molekuláris Neurogenetikai Csoportjában folytattuk.

Ezen PhD értekezésben a GAD67 gén szerkezetére és funkcionális analízisére vonatkozó eredményeinket foglaltam össze. Az ismertett kísérletek jelentős részét magam végeztem és egy kis részük tervezésében és irányításában vettem részt.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A γ–aminovajsav (GABA) funkciója az idegrendszerben

2.1.1. A neurotranszmitter GABA

A GABA a baktériumoktól az egysejtűeken és a növényeken át az emlősökig bezárólag szinte valamennyi élőlényben előforduló aminósav származék. 1950 óta ismert, hogy igen nagy mennyiségben található az emlős agyban (1). Ezt követően tíz évnek kellett eltelnie ahhoz, hogy minden kétséget kizáróan bebizonyosodjék, hogy a GABA központi idegrendszerben gátló neurotranszmitter funkciót tölt be (1,2,3,4).

Az emlős agyban az idegsejtek kb 30%-a GABAerg, vagyis γ-aminovajsavat képes szintetizálni, tárolni, megfelelő impulzus hatására felszabadítani, újra felvenni és lebontani. A GABAerg idegsejtek morfológiailag és funkcionálisan is igen sokfélék és az agy minden területén megtalálhatók (5). Többségük lokális neuronhálózatok kialakításában résztvevő interneuron, de vannak olyanok is amelyek igen nagy távolságra is képesek kapcsolatot létesíteni. Mindez azt sugallja, hogy nincsen olyan magasabbrendű idegi funkció amelyben GABAerg idegsejtek ne vennének részt. Ennek megfelelően az idegrendszer kóros működésével járó neurológiai és pszichiátriai kórképekben (pl epilepszia, Parkinzon kór, Alzheimer kór, Huntington chorea, schizofrenia, alkoholizmus és alvászavarok) a GABAerg idegrendszer érintettsége közvetett vagy közvetlen oki tényezőként szerepelhet (6,7).

A GABA elektrofiziológiai hatása a membrán hiperpolarizációja, ami megakadályozza az idegingerület továbbterjedését. Ez a GABA gátló hatásának az alapja. Abban az esetben, ha egy GABAerg neuron szinaptikus kapcsolatot létesít egy másik GABAerg neuronnal, akkor az utóbbi gátló hatása felfüggesztődik (7).

A GABA az idegrendszerben a GABAerg szinapszisokból szabadul fel, és a posztszinaptikus oldalon található receptorokon keresztül fejti ki hatását. Az idegsejtekben a glutaminsav dekarboxiláz szintetizálja a GABA-t glutaminsavból. Egy proton pumpával kapcsolt "carrier" segíti a felvételét a szinaptikus vezikulumokba, ahonnan stimulusra exocitózissal szabadul fel, és egy plazmalemmához kötött GABA transzporter juttatja vissza az idegvégződésekbe.

2.1.2. GABA mint trofikus faktor

Az embrionális fejlődés során a neurotranszmitterek közül a GABA jelenik meg elsőként, időben megelőzve a neuronális differenciációt, migrációt és az érett funkcióképes GABAerg szinapszisok kialakulását (8,9,10). Mindez azt jelzi, hogy a GABA szerepet

játszhat a GABAerg idegrendszer fejlődésében, a szinaptikus kapcsolatok kialkulásában is (11,12,13,14). Például az embrionális gerincvelő és a cortex subventriculáris zónájában főként a differenciálódó, már nem osztódó és migrációra kész, de még éretlen idegsejtekben (nemcsak a GABAerg neuronok prekurzoraiban) feltehetően a célzott migráció szabályozásában vesz részt (15,16,17). Ezt látszanak alátámasztani a differenciálódó neuronális szövettenyésztekben végzett kísérletek is: itt a GABA nyúlvány-növekedést indukál, befolyásolja az idegsejtek túlélését és a vándorló neuronok számára kemoattraktorként is szolgál (18,19,20). A GABA-rendszer sajátosságai a fejlődés alatt eltérnek a felnőttétől. A növekvő, még szinaptikus kapcsolatokat nem létesített idegvégződésekből a funkcionális vezikuláris transzporter hiányában a GABA Ca^{++}-tól független mechanizmussal, feltehetően a transzporter fordított irányú működésének segítségével szabadul fel (21,22). A későbbiekben pedig a GABA trofikus/morfogén hatása a fejlődés során szintén korán megjelenő, de a felnőttől eltérő alegységszerkezetű GABA receptorokon keresztül érvényesül (23). Az "embrionális" GABA receptorok klorid csatornáiban a magas intracelluláris Cl^- koncentráció miatt az áramlás fordított irányú. Ennek az a funkcionális következménye, hogy a GABA inkább serkentő mint gátló hatású (24).

Az idegi differenciációban szerepet játszó trofikus/morfogén GABA szintézisét végző "embrionális" glutaminsav dekarboxiláz is különbözik a neurotranszmitter GABA-t szintetizáló enzimtől (Erre még a kutatási eredmények értékelésénél visszatérünk).

A GABA morfogenikus és szinaptogenikus hatása a felnőtt idegrendszerben is érvényesül. Szerepe lehet a magasabbrendű idegi működések alapjait képező plasztikus folyamatokkal járó szinaptikus átrendeződések szabályozásában.

In vivo és *in vitro* kísérleti modellek is megerősíteni látszanak a GABA ezen szinaptogenikus hatását. Először patkány felső nyaki ganglionban mutatták ki, hogy a kívülről bejuttatott GABA morfológiai és biokémiai változásokat idéz elő a ganglionban, növelve annak szinapszis-képző kapacitását (25). A gonadális szteroid hormonok által az agy különböző részeiben (pl a hippocampus piramidális sejtjei, a hypothalamus különböző régiói) indukált szinaptikus plaszticitást is nagy valószínűség szerint a GABA idézi elő (26,27).

2.1.3. *A GABA szerepe az idegrendszeren kívül*

Az utóbbi időben számos adat, és bizonyíték gyűlt össze arra vonatkozólag, hogy a GABA-rendszer (maga a GABA és a metabolizmus enzimei a glutaminsav dekarboxiláz, a lebontó enzim GABA-T, valamint a transzporter és a receptorok) az idegrendszeren kívül számos perifériás szövetben is előfordul. Ez azt a feltevést támasztja alá, hogy a GABA az idegrendszeren kívül egy általánosabb sejtek közötti mediátor szerepét is betölti (28). Ezen

hatások zöme is GABA receptorokon keresztül érvényesül. A $GABA_B$ receptorok esetében ez könnyebben megmagyarázható, hiszen azok G-fehérjéken keresztül számos másodlagos "messenger"-rendszerhez kapcsolódhatnak. A GABA sejten belüli hatására is van már adat, pl direkt pozitív hatása lehet a fehérjeszintézisre a fejlődő agyban, és számtalan szövetben serkenti a glukóz felvételt (29).

A GABA legfontosabb funkciói az idegrendszeren kívül többek között az endokrin és exokrin funkciók modulációja: a szekréció szabályozása, simaizom összehúzódás kiváltása és immunmodulátor funkció.

A mellékvesében a kromaffin sejtek szabadítanak fel GABA-t, ami a körülöttük lévő sejtek humorális funkcióit szabályozza (30). A gyomorban a gasztrin és a szomatosztatin szekréció áll GABA kontroll alatt (31). A vesecsatornák hámsejtjeiben a GABA feltehetően a transzport folyamatokat szabályozza (32). A petefészekben pedig az ösztradiol és a progeszteron felszabadulást, a herében pedig az androgén szekréciót befolyásolja (33). A hasnyálmirigy inzulin-termelő β-sejtjeiben a GABA a szinaptikus vezikulumokhoz hasonló képződményekben tárolódik és az α-sejteken található GABA receptorokon keresztül feltehetően azok glukagon szekrécióját szabályozza (34,35). Az utóbbi néhány évben ez a rendszer azért került az érdeklődés homlokterébe, mivel bebizonyosodott, hogy a β-sejtekben jelen levő GABA-t szintetizáló glutaminsav dekarboxiláz (GAD 65 kDa) az autoantigén az autoimmun eredetű fiatalkori öröklődő cukorbajban (36).

A gyomorban és a hasnyálmirigyben az exokrin funkciókat is befolyásolja (37).

Az agyi erek falában, a méhben és a petevezetőben található simaizmok GABA receptorain keresztül azok összehúzódását szabályozza (38, 39).

A GABA ezen sokrétű fukciójának ellátásához a hatást közvetítő receptor-rendszer, a GABA-t térben és időben valamint megfelelő mennyiségben biztosító szintetizáló és transzport rendszer igen nagyfokú komplexitása szükséges. Ezek közül itt nagyon röviden a GABA receptor családot, és kissé részletesebben a GABA-szintetizáló enzimrendszert fogom ismertetni.

2.2. A GABA receptor család

A GABA két funkcionálisan igen eltérő receptor családon keresztül fejti ki a hatását. A $GABA_A$ receptor család közvetlenül egy Cl^- csatornát alkot és annak nyitása révén a beáramló Cl^- ionok megnövelik a membrán nyugalmi potenciálját. Ez megakadályozza a membrán depolarizációját, vagyis az akciós potenciál tovaterjedését: ez a gátlás alapja. A receptor komplex öt alegységből áll. Ma már a négy fő csoporton belül összesen közel 20 féle alegység ismert, ami a receptor összeszerelődésében igen nagy variabilitást enged meg. Ez az alapja a $GABA_A$ receptorok farmakológiai és fiziológiai heterogenitásának,

ami elengedhetetlen a változatos GABA-hatás közvetítéséhez (40, 41).A $GABA_B$ receptor család közvetett módon, GTP kötő fehérjéken keresztül kapcsolódik K^+ vagy Ca^{++} csatornákhoz. Az előbbi esetben a kifelé irányuló K^+ áram okozza a membrán hiperpolarizációt, vagyis a gátlást. Az utóbbi estben pedig a Ca^{++} csatornák záródása miatt csökkenő intracelluláris Ca^{++} szint miatt csökken a neurotranszmitterek felszabadulása, ami szintén ingerületi gátlást eredményez (42).

2.3. A GABA-szintézis kulcsenzime a glutaminsav dekarboxiláz (GAD)

A γ-aminovajsav egy igen szorosan regulált egylépéses reakcióban a glutaminsav dekarboxilálásával keletkezik. Szintézisének a kulcsenzime a glutaminsav dekarboxiláz (GAD; EC 4.1.1.15), amely piridoxál foszfátot (PI) használ kofaktorként. A GABA szintézis intenzitása messze elmarad a GAD potenciális maximális aktivitásától, jelezvén azt, hogy a GAD teljes katalitikus aktivitásának csak egy kis hányada van kihasználva. Ennek az az alapja, hogy a teljes GAD készletnek csak mintegy 50%-a aktív, piridoxál foszfáthoz kötött holoGAD. A többi a kofaktor nélküli apoGAD tartalékot képezi, és igény szerint PI kötéssel aktiválható. A kofaktor erősen kötődik az enzimhez, ezért a holoGAD apoGAD átalakuláshoz egy alternatív transzaminálási lépés szükséges, amelyben GABA helyett szukcinát szemialdehid és piridoxamin foszfát keletkezik. Ez utóbbi könnyen ledisszociál az enzimről, így az inaktív apoGAD-dá alakul. A GAD aktivitás regulációjának éppen az apoGAD holoGAD átalakulás az alapja, amelyet többek között az ATP és az inorganikus foszfát (Pi) sejten belüli koncentrációja szabályoz. Az ATP az apoGAD keletkezését segíti elő, míg a Pi pedig az aktív holoGAD képződésének irányába tolja el a reakciót. Tehát az agy sokkal több glutaminsav dekarboxilázt tartalmaz, mint amennyire szükség van a megfelelő GABA szint biztosításához. Ez a tartalék aktiválással könnyen mobilizáható, amikor megnő a GABA igény (43, 44).

2.3.1. A heterogén glutaminsav dekarboxiláz

Mivel a mindenkori aktuális GABA szintet egyértelműen a GAD aktivitása határozza meg, ezért a GABA szintézis regulációjának megértéséhez elengedhetetlenül fontos a GAD aktivitás szabályozásának ismerete. Ennek az egyik legfontosabb tényezője az, hogy az enzim strukturálisan és funkcionálisan is heterogén.
Az már régóta ismert, hogy a különböző GAD ellenanyagok az agyban két igen hasonló méretű fehérjét ismernek fel (45, 46). Az enzimnek kinetikailag is több formáját írták le, aminek az az alapja, hogy a különböző formák eltérő módon kötik a kofaktort (47). Ennek alapján az enzimnek a PI függő és független formáját azonosították (48).

A GAD ezen strukturális és funkcionális heterogenitásának molekuláris alapjait az utóbbi évek klónozási kísérletei fedték fel, amihez a laboratóriumunk is hozzájárult. Az első időben több fajból klónozott minden GAD cDNS azonosnak bizonyult (49,50,51,52,53,54,55). Igen nagy homológiát mutattak még nukleinsav szinten is. A különböző emlős fajokból izolált GAD fehérjék között az azonosság több mint 95%-nak adódott. A későbbiekben sikerült egy másik típusú GAD cDNS-t is klónozni (56,57,58). A kétféle cDNS bizonyítottan a két GAD izoformát kódolja, a 65 kDa és a 67 kDa formát. A két típusú cDNS szekvenciája igen eltérő annak ellenére, hogy fehérje szinten a homológia a két forma között nagyfokú.

A 65 kDa és a 67 kDa GAD izoforma két önálló gén terméke, amelyek génduplikáció eredményeként jöttek létre (56,57). Egérben és humánban a kromoszómális helyzetük is ismert (56,59,60). Mindkét egér gén a 2. kromoszómán található, a GAD67 a humánnal homológ régióban (Lásd bővebben a kutatási eredményeknél).

Az azonos izoformák különböző fajokból igen nagyfokú homológiát mutatnak, ha viszont a két GAD-ot azonos fajokból hasonlítjuk össze, azt tapasztaljuk, hogy az első száz aminósav szinte teljesen különbözik, a maradék kb. 500 aminósav szekvenciája pedig több mint 70%-ban azonos (55,57; lásd bővebben a kutatási eredményeknél). Ez a szerkezeti különbség az alapja a GABA-szintetizáló enzimrendszer funkcionális heterogenitásának.

A legnagyobb eltérés funkcionálisan a két forma között a kofaktor kötődésben van. A 65 kDa izoforma gyengén köti a piridoxál foszfátot. Ennek következtében jelentős része az agyban inaktív, de szükség szerint aktiválható apoGAD formában található. Ezzel szemben a GAD 67 kDa izoforma sokkal erősebben köti a kofaktort, ezért nagyobb része aktív holoGAD-ként funkcionál (61). Ezzel összhangban a sejten belüli lokalizációjuk is eltérő. A 65 kDa forma sokkal nagyobb arányban található az idegvégződésekben a szinaptikus vezikulumok külső membránjához kötve, ahol idegi impulzus hatására holoGAD-dá alakulva (PI kötés) képes GABA-t szintetizálni a gyors szinaptikus funkciókhoz. Ezzel szemben a GAD67 izoforma sokkal nagyobb arányban található szabad formában a sejttestben és a dendritekben, és főleg az állandó GABA szint biztosításában van szerepe, amelynek a neurotranszmisszión kívül egyéb funkciója is lehet (61). A két GAD eltérő sejten belüli lokalizációjáért a különböző N-terminális régiójuk a felelős (62).

A két forma agyon belüli régionális megoszlása nagyon hasonló. Gyakorlatilag mindkét GAD minden GABAerg neuronban megtalálható, de igen eltérő arányban (47, 48). Ez azt jelenti, hogy egy GABAerg neuron teljes funkcionáló GABA készletének biztosításához mindkét GAD-ra szükség van. A szintetizáló enzim két különböző módon szabályozódó izoformájának sejten belüli aránya fogja eldönteni azt, hogy egy adott GABAerg neuron milyen módon és mennyi GABA-t tud felszabadítani. Azokban az idegsejtekben amelyek tónusosan, folyamatosan szabadítanak fel GABA-t, a piridoxáltól független, állandóan működő GAD67 van nagyobb mennyiségben jelen. Ezzel szemben a fázisosan "tüzelő"

neuronokban az indukálható 65 KDa GAD képes idegi impulzus hatására nagyobb mennyiségű GABA-t szintetizálni a kívánt pillanatban (57). Ez azt jelenti, hogy egy GABAerg neuron elektrofiziológiai tulajdonságainak meghatározásában döntő szerepe van a két GAD gén egy sejten belüli eltérő transzkripciós aktivitásának.

2.3.2. A glutaminsav dekarboxiláz aktivitásának szabályozása

A GABA-szintézis regulációjában kulcsszerepe van a GAD aktivitás szabályozásának, amiben a két izoforma jelentősen eltér egymástól. A rövidtávú és gyors szabályozás az inaktív apoGAD holoGAD-dá való átalakulásán keresztül történik, ami PI kötést jelent. Ez a mechanizmus főleg a 65 kDa izoformára jellemző. A GAD67 aktivitásának szabályozásában a PI kötés sokkal kisebb szerepet játszik, mivel ez a forma túlnyomórészt aktív holoGAD-ként van jelen az agyban.

A GABA-szintézis hosszútávú regulációja a rendelkezésre álló GAD mennyiségének szabályozásán keresztül történik. Ez magában foglalja a GAD mRNS-ek szintézisének és stabilitásának a szabályozását, a génműködés poszttranszkripciós szinten történő regulációját, a fehérjeszintézis és lebontás szabályozását, valamint az enzim poszttranszlációs modifikációját (44).

Ismereteink ezen komplex regulációs mechanizmusról még igen korlátozottak. Kiderítésükhöz feltétlenül szükséges a két GAD gén többlépcsős szabályozásának molekuláris genetikai eszközökkel való tanulmányozása.

A GAD67 forma alapvetően két szinten regulálódik: **1)** A fehérje szintézisének és/vagy lebontásának közvetlen szabályozása. *In vivo* és *in vitro* kísérleti adatok szerint is a megemelkedett GABA szint egyenes következménye a 67 kDa GAD mennyiségének csökkenése, ami nem jár együtt az mRNS szintjének változásával (65,66). Ez a regulációs mechanizmus egyáltalán nem érinti a másik izoformát. Tehát a GABA szint változása direkt módon szabályozza az egyik szintetizáló enzimének a mennyiségét, és ezen keresztül a saját szintézisét. **2)** A 67 KDa forma a transzkripció szintjén is szabályozódik. A GAD67 mRNS szintézise egy bizonyos mértékig transz-szinaptikus reguláció alatt is áll. Ez azt jelenti, hogy a szinapszisokon keresztül közvetítődő idegi impulzusok befolyásolják a posztszinaptikus GABAerg neuronokban a GAD67 gén transzkripcióját. Kísérletesen ez úgy bizonyítható, hogyha átvágunk egy bizonyos GABAerg neurontípust beidegző idegpályát, akkor megváltozik az adott idegsejtekben a GAD67 mRNS mennyisége: legtöbbször nő. Például a "substantia nigra"-ból a "striatum"-hoz vezető dopaminerg rostok átvágását követően csökken a "striatum" GABAerg neuronjaiban a GAD67 mRNS szintje és ennek következtében a GAD aktivitás is (67,68). Egy másik példa szerint ha átvágjuk a kisagyi GABAerg Purkinje sejteket beidegző kúszórostokat, akkor a GAD67 mRNS szint növekedésével párhuzamosan megnő azok szinaptikus aktivitása is (69).

A mesterségesen előidézett ischemiát, valamint epilepsziát követő agyi sérülésekben mind azok közvetlen közelében, mind pedig távoli agyterületeken is megváltozik a GAD mRNS szint (főleg a GAD67). A sérülés következtében a GAD expresszió, és ennek megfelelően az enzimaktivitás akut és hosszútávú változásai különböző mértékűek és irányúak lehetnek. Ischemia által kiváltott "cortex" léziókban az azonos oldali "stritátum"-ban a GAD67 mRNS mennyisége nőtt, míg az ellenkező oldali "cortex"-ben viszont csökkent (70). Az epilepsziát kiváló egyoldali "hippocampus" sérülés után hosszútávú növekedés volt megfigyelhető a GAD67 mRNS szintjében az azonos oldali gyrus dentatus-ban valamint a mindkétoldali "cortex" és "thalamus" különböző régióiban (71). A fenti példákban a sérüléseket követő komplex GAD expresszióváltozás az elpusztult idegsejtek projekciós területén a megváltozott transz-szinaptikus szabályozás következménye. A sérülés környezetében viszont a GAD gén fokozott aktivitása következtében a megnövekedett GABA szint a neurodegeneráció indukálta kompenzációs szinaptikus átrendeződések szabályozásában játszik szerepet.

A szinaptikus válozásokkal összhangban a "hippocampus"-ban és a "hypothalamus" bizonyos régióiban az ösztrogén koncentráció változásának is hatása van a GAD mRNS-ek expressziójára. Ez azt sugallja, hogy a GABAerg rendszernek is szerepe lehet az ovarialis szteroid hormonok által kiváltott neuronális plaszticitásban (72,73).

Mindezen irodalmi adtok arra utalnak, hogy a GAD gén(ek) transzkripciós szabályozása a GABA-készlet változtatásán keresztül alapvetően fontos szerepet tölt be az idegrendszer komplex fiziológiás és kóros működésében.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Mint ahogy az előző fejezben is láttuk: az idegrendszer fejlődésében, valamint a fiziológiás és kóros működésében is alapvető szerepet tölt be a GABA úgy is mint gátló neurotranszmitter és úgy is mint trofikus faktor. A "fejlődő" és "valódi" GABAerg neuronok GABA-készletét is alapvetően a szintézisében kulcsszerepet játszó enzim, a glutaminsav dekarboxiláz aktivitása határozza meg. Ezért alapvetően fontos a GAD aktivitást meghatározó komplex molekuláris mechanizmusok tanulmányozása. Ebben két tényezőnek van döntő szerepe: 1) az enzimaktivitás gyors és rövidtávú szabályozása a kofaktorkötés szintjén, 2) az enzim mennyiségének szabályozása a GAD gének transzkripciós és poszttranszkripciós regulációján keresztül.

Az utóbbi mechanizmusnak kitüntett szerepe van abban, hogy a GABA-szintetizáló enzim megfelelő formája a szükséges helyen, a kellő időben és mennyiségben mind a fejlődő, mind pedig a felnőtt idegrendszerben rendelkezésre álljon.

Éppen ezért munkánk alapvető célkitűzése a glutaminsav dekarboxilázt kódoló gén(ek) szövet- és fejlődés-specifikus szabályozásának tanulmányozása volt.

Kísérleti objektumként azért választottuk az egeret, mert ebben a fajban állnak rendelkezésre azok a molekuláris-genetikai módszerek, amelyekkel a génműködés-vizsgálatok egész állatban is elvégezhetők, ami különösen fontos az idegrendszer-specifikus gének esetében.

Másrészt egérben az is lehetséges, hogy távlati célként a GAD gén regulációs elemeit felhasználva mesterségesen beavatkozhassunk a GABAerg idegrendszerbe működésének jobb megértése céljából.

Amikor a kísérleteinket Princetoni Egyetem Biológia Intézetében, Dr. R. Greenspan laboratóriumában megkezdtük, a glutaminsav dekarboxiláz molekuláris genetikájáról semmiféle ismeterettel nem rendelkeztünk. Csak egy cDNS szekvencia volt ismert, és az volt az általános vélemény, hogy egyetlen gén kódol egy fehérjét és a GAD funkcionálisan különböző formái ennek az egy fehérjének a módosításával jönnek létre.

Ezért az alapvető céljaink elérésére a következő kísérleteket terveztük:

Elsőként a macska GAD cDNS próba felhasználásával kívántuk izolálni az egér glutaminsav dekarboxilázt kódoló cDNS-t, majd a nukleotidsorrendjét meghatározni.

A cDNS által kódolt fehérje expressziójával és a vele szemben termelt ellenanyag felhasználásával arra a kérdésre kívántunk válaszolni, hogy mi a kapcsolat az általunk és a

mások által is klónozott GAD és az agyban azonosított két eltérő molekulasúlyú forma között. Azt kívántuk eldönteni, hogy elsődlegesen két GAD fehérje létezik-e, vagy pedig a két eltérő elektroforetikus mozgékonyságú GAD másodlagos modifikáció következtében jön-e létre.

A cDNS klón segítségével a glutaminsav dekarboxilázt kódoló egér gén izolálását és a teljes szerkezetének meghatározását terveztük. A gén szerkezetének ismeretében a következő kérdések tanulmányozhatók: 1) Van-e összefüggés az exonszerkezet és az enzim funkcionális szerkezete között? 2) Léteznek-e szerkezetileg kissé eltérő GAD formák? 3) A poszttranszkripciós szabályozásnak, vagyis az alternatív "splicing"-nak van-e szerepe a gén szövet- és fejlődés-specifikus szabályozásában?

Az egér GAD gén kromoszómális helyzetének meghatározását azért tartottuk fontosnak, mert annak ismerete hasznos lehet a genetikai térképezésekhez általában, valamint a GAD lókuszt esetlegesen érintő mutációk azonosításában is.

A GAD gén fejlődés-specifikus működésének tanulmányozása kapcsán a következő kérdésekre kerestük a választ: 1) A gén a differenciálódás során mikor válik aktívvá?

2) Vannak-e az idegi fejlődés különböző fázisaira specifikus transzkriptumok és GAD formák, amelyeknek esetlegesen szerepük lehet a trofikus hatással rendelkező GABA-készlet szintézisében?

A következőkben a GAD67 gén transzkripcióját közvetlenül irányító promotereket kívántuk azonosítani és jellemezni. Ehhez először a gén 5' régiójának a nukleotidsorrendjét kell meghatározni. Ennek ismeretében azonosíthatók a GAD67 transzriptumoknak megfelelő RNS-szintézis kezdőpontok és a hozzájuk rendelhető promoterek. A szekvencia analízisével pedig a promoterelemek, a gén szövet-specifikus átírását szabályozó transzkripciós faktor kötőhelyek és az idegrendszer-specifikus szabályozóelemek azonosíthatók. Mindezen ismeretek kiindulópontul szogálhatnak a GAD67 gén GABAerg neuron- és fejlődés-specifikus regulációjának komplex vizsgálatához.

4. MÓDSZEREK

Az alkalmazott klónozó vektorok, baktériumtörzsek, emlős sejtvonalak, egértörzsek és módszerek részletes leírásától eltekintek, mivel azokat a mellékelt saját közlemények módszertani fejezetei tartalmazzák. Az értekezés terjedelménél fogva, az általános molekuláris biológiai módszerek felsorolására van csak mód. A legfontosabb metodikák esetében is csak azok elvének leírására szorítkozom.

4.1. Általános in vitro DNS "manipulációs" technikák

Plazmid izoláláls analitikai és preparatív méretekben, restrikcós enzimhasítás, ligálás, *E.coli* transzformálás, DNS fragmentizolálás és jelölés, agaróz gélelektroforézis, Southern hibridizáció, DNS szekvenálás.
A fenti rutinszerűen alkalmazott általános technikáknál az irodalomban leírtakat, illetve az enzimek, kitek és filterek gyártói által megadott utasításokat követtük (74).
DNS fragmentumok szubklónozásához általában a **Bluescript** (Stratagene) nagy kópiaszámú általános plazmid vektort használtuk. A dideoxi lánctermináción alapuló szekvenálási módszerhez az egyesszálú templátot M13 fág-ban állítottuk elő (**M13mp17** és **M13mp18**-Boechringer).
Plazmid klónozásokhoz a **DH5α**, az M13 fágba történő klónozásokhoz pedig az F-faktort is tartalmazó **DH5α'** *E. coli* baktérumtörzset használtuk (GIBCO-BRL).

4.2. cDNS és genomiális DNS klónok izolálása génkönyvtárakból

Az egér GAD cDNS klónokat felnőtt egér agy poli(A)$^+$ RNS-ből készített λgt10 cDNS génkönyvtárból (Dr. W.E. Hanh ajándéka a "Colorado"-i Orvosegyetemről) standard módszerekkel izoláltuk a macska cDNS próba felhasználásával (49). A további analízis céljára a GAD67 cDNS fragmentumokat **Bluescript** plazmidba klónoztuk.
A genomiális klónokat egy Balb/c egértörzsből származó **Charon4A** λ-f'ág génkönyvtárból (ajándék Dr. S. Tilghmantól, Princetoni Egyetem Molekuláris Biológiai Intézet) és egy B6/CBA törzsből előállított **λ-FIX II** (Stratagene) génkönyvtárból izoláltuk. Próbaként a leghosszabb egér cDNS klónt használtuk fel.
A teljes GAD gént az un genomiális séta módszerével izoláltuk. Ennek az a lényege, hogy a már meglévő klónjaink végfragmentjeit próbaként felhasználva további átfedő klónokat izoláltunk a génkönyvtárak ismételt átvizsgálásával. A pozitív fágok egér DNS-eredetű szubklónjait szintén **Bluesript** vektorba klónoztuk (**1,3,4: módszertani fejezet**[*]).

4.3. Genetikai térképezés

Az egér GAD67 gén és pszeudogén kromoszómális térképhelyzetét Dr. Brilliant-tal (Jackson Laboratórium, Bar Harbor, USA), Dr. Kozak-kal (NIH, Bethesda, USA) és Dr. Houseman-nal (MIT, Massachusetts, USA) együttműködésben végeztük.
Különböző egér kromoszómát tartalmazó egér-kínai hörcsög sejthibridekben azonosítottuk azokat a kromoszómákat, amelyek az egér GAD67 próbával homológ régiókat tartalmaznak.

---

[*] A szövegben vastag arab számokkal hivatkozom a mellékletben található saját közleményekre.

A kromoszómán belüli pontosabb térképezést interspecifikus "backcross" analízissel és rekombináns "inbred" törzsek felhasználásával végeztük. A keresztezések során ismert genetikai markerek és a GAD67 lókuszok közötti rekombináció gyakorisága alapján határoztuk meg a GAD67 gén és pszeudogén hozzávetőleges genetikai térképhelyzetét (**2: módszertani fejezet**).

4.4. RNS izolálás és Northern hibridizáció

Teljes RNS-t felnőtt egér agyból és különböző korú embrió fejből/agyból savas guanidin izotiocianát módszerrel tisztítottunk. Poli(A)$^+$ RNS-t oligo(dT)-cellulóz kromatográfiával állítottunk elő (74,75).
Northern hibridizációhoz az RNS mintákat formaldehid-agaróz gélelektorforézissel MOPS pufferben választottuk el, majd kapilláris technikával nitrocellulóz filterre blottoltuk. A hibridizálást P^{32}-jelölt kettősszálú DNS próbával, vagy 5'-végjelölt oligonukleotoiddal formaldehidet nem tartalmazó pufferben a DNS próba esetében 65 ^{o}C-on, oligonukleotidok esetében pedig a hosszuk által meghatározott hőmérsékleten végeztük (74; **1,3,4: módszertani fejezet**).

4.5. Specifikus mRNS régiók amplifikálása és cDNS klónozás RNS templáton készült egyesszálú cDNS-en végzett polimeráz láncreakcióval (RT-PCR)

RT-PCR technikával a GAD67 mRNS különböző régióit amplifikáltuk és az embrionális transzkriptum kódoló régióját klónoztuk.
Első lépésként a megfelelő teljes RNS-ből reverz transzkriptáz segítségével (Superscript-GIBCO/BRL) egyesszálú cDNS-t szintetizáltunk. Ezt templátként felhasználva polimeráz láncreakcióval amplifikáltuk a GAD mRNS-ek kiválasztott régióit. (A reakció specificitását az amplifikációhoz használt primerek határozzák meg.) Az amplifikált reakcióterméket agaróz gélelektroforézissel mutattuk ki.
Az embrionális cDNS-ek RNS-ből való direkt klónozásához az mRNS-ek kódoló régióját két átfedő darabban RT-PCR-al úgy amplifikáltuk, hogy mind az 5', mind pedig a 3' termék tartalmazza az embrionális inszertet. Az amplifikált DNS fragmentumokat tisztítottuk, végeiket pedig polinukleotid kinázzal foszforiláltuk és Klenow polimerázzal feltöltöttük, majd pedig **Blueskript** klónozó vektor *Sma* I helyére klónoztuk. A kódoló régió két darabját az átfedő szakaszban található közös restrikciós hasítóhely felhasználásával egyesítettük (**3: módszertani fejezet**).

4.6. A GAD67 mRNS ismeretlen 3' végének azonosítása "cDNS végek gyors amplifikációja" módszerével (3'-RACE) (76)

Azért volt szükség ezen módszer alkalmazására, mert az általunk izolált cDNS-ek egyike sem tartalmazta az mRNS 3' végét. Az 3'-RACE technika is RT-PCR reakción alapszik.
Azonban az amplifikáció során a génspecifikus "felső primer" mellett egy nem specifikus minden mRNS 3' végén található poli(A) farokkal komplementer oligT-t használunk un. "alsó primernek". Ezen "primer" 3' végén az amplifikáció és a klónozás megkönnyítése céljából egy restrikciós helyeket tartalmazó toldalék is található. Az amplifikácós terméket plazmid vektorba klónozva egy un. mini-génkönyvtárat hoztunk létre, amelyből GAD67 specifikus próbával izoláltuk a GAD67 mRNS 3' végét tartalmazó klónokat, majd meghatároztuk a nukleotidsorrendjét.

4.7. cDNS által kódolt fehérjék termelése bakteriáls expressziós rendszerekben

A különböző hosszúságú GAD67 cDNS-ek és a bifunkcionális GAD embrionális mRNS-ek által kódolt fehérjék szintézisére kétféle bakteriális expressziós-rendszert használtunk. A **pTRB** vektorcsalád esetében a különböző hosszúságú GAD cDNS-eket megfelelő leolvasási keretben a plazmidban található β-galaktozidáz gén kódoló régiójának a végére klónoztuk (77). Erről a vektorról IPTG indukció hatására egy β–galaktozidáz-GAD fúziós fehérje képződik. Gazdasejtként az **XL-Blue-1** (Stratagene) *E.coli* törzset használtuk.
A **pAR039** bakteriális expresszós plazmid megfelelő leolvasási keretben lévő változatát a teljes hosszúságú GAD67 és a rövidített embrionális GAD fehérjék szintézisére használtuk (78). Ezen vektorcsalád a T7 fág RNS polimeráz promoterét és a 10-es gén első 11 aminósavát kódoló szegmentjét tartalmazza. Ebben a rendszerben az "idegen fehérje" expressziója a T7 fág abszolut specifikus transzkripciós és transzlációs kontrollja alatt áll. Indukció hatására a baktérium gazda szintetizálja a T7 RNS polimerázt a vektorba klónozott cDNS átírásához. Az így képződött mRNS-ről nagy mennyiségű fehérje szintetizálódik, ami elérheti a bakteriális összfehérje 50%-át is. Ezt a vektort alkalmaztuk a rekombináns GAD67 preparatív méretekben való előállítására ellenanyag termelés céljából is. Gazdasejtként a Lac kontroll alatt álló T7 RNS polimerázt tartalmazó **DE3** *E.coli* törzset használtuk (Promega).
Mindkét rendszer esetében az indukció hatására képződött GAD fehérjéket a bakteriális extraktumok SDS-poliakrilamid gélelektroforézisével mutattuk ki (**1,3: módszertani fejezet**).

4.8. Poliklonális ellenanyagok előállítása

A rekombináns egér 67 KDa glutaminsav dekarboxilázzal szemben nyúlban termeltünk poliklonális ellenanyagot. A baktérium sejtekben zárványtest formájában felhalmozódó GAD67 fehérjét preparatív SDS-PAGE-vel tisztítottuk, majd az eluálás után részlegesen renaturáltuk. Az immunizáláshoz nyulanként összesen kb 500 μg rekombináns GAD67 fehérjét használtunk. Az első alkalommal az antigént komplett Freund's adjuváns jelenlétében intravénásan és intradermálisan juttattuk a nyulakba. Ezt követte kétszer 2 hetenként intradermális emlékeztető inkomplett Freund's adjuvánsban, majd két hét múlva egy újabb intravénás emlékeztető. Az immunizálás alatt az immunszérum specificitását és titerét immunoblott technikával folyamatosan ellenőriztük (**1: módszertani fejezet**).
Az embrionális GAD-specifikus poliklonális ellenanyagokat a 25 kDa "leader" és a 44 KDa GAD embrionális exon kódolta C-terminális illetve N-terminális peptidjeikkel szemben állítotuk elő (MPSDMRESWLLA-25 KDa specifikus; MGLRAEPKESDLQRC-44 KDa specifikus). A peptideket a nyulak immunizálásához hemocianinhoz kötöttük (**3: módszertani fejezet**).

4.9. In vitro transzláció

Az 5' "cap"-el ellátott felnőtt és embrionális GAD67 mRNS-eket in vitro RNS szintézissel állítottuk elő linearizált plazmid templátokon a megfelelő virális RNS polimeráz felhasználásával (T7, T3, Sp6). Az RNS mintákról a fehérje szintézisét nyúl retikulocita lizátumban és búza csira extraktumban S^{35} metionin jelenlétében végeztük.
A szintetizált fehérjéket közvetlenül, vagy pedig immuonoprecipitáció után SDS-PAGE-vel választottuk el és fluorográfiával detektáltuk. (**3: módszertani fejezet**).

4.10. Fehérjék expressziója szövettenyészetekben

A felnőtt és az embrionális GAD67 mRNS-ek által kódolt fehérjéket a megfelelő GAD cDNS-t tartalmazó eukarióta expressziós vektorokkal transzformált szövettenyészetekben azonosítottuk. A COS majom vese szövettenyészet tranziens transzfekciója során a **pSVL** (Pharmacia) illetve **pBC12B** (79) alapú vektorokat DEAE dextrán módszerrel juttattuk a sejtekbe. Az Epstein-Bar vírussal transzformált C17 humán embrionális vese szövettenyészetből a GAD67 fehérjét alacsony szinten, de stabilan expresszáló sejtvonalat hoztunk létre. Vektorként az EBNA-1 fehérjét is expresszáló **EBO-pLPP** plazmidot használtuk (80). A transzfekciót kálcium-foszfát precipitációs módszerrel végeztük és a stabil transzformánsokat pedig Hygromicin B szelekcióval állítottuk elő. Az expresszált fehérjék kimutatásához a szövettenyészeteket S^{35} metioninnal jelöltük. Az SDS-PAGE elektroforézist megelőzően a különböző GAD formákat specifikus ellenanyagokkal kicsaptuk (**3: módszertani fejezet**).

4.11. Western immunoblott technika

A különböző GAD formákat expresszáló bakteriális extraktumokat, valamint felnőtt és embrionális egér agy/fej homogenátumokat SDS-PAGE-el választottuk el, majd nitrocellulóz filterre elektroblottoltuk. A Western blottokat különböző GAD-specifikus ellenanyagokkal, majd a megfelelő másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk és NBT-CIP alkalikus foszfát szusztráttal előhívtuk (**1,3: módszertani fejezet**).

4.12. DNS szekvencia analízis

A rutin szekvenciaanlízishez az IntelliGenetics Pcgene nukleinsav és fehérje szekvencia analizáló szoftverjét és a UNIX operációs rendszeben futó GCG Wisconsin Szekvencia Analizáló Csomagját használtuk.
A transzkripciós faktor kötőhelyeket pedig az Eukariota Transcripciós Faktor Adatbázis (TFD 7.3) felhasználásával azonosítottuk.

5. KUTATÁSI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. Az egér glutaminsav dekarboxiláz 67 KDa izoformája

5.1.1. A cDNS klónozása és a nukleotidsorrendjének meghatározása valamint az általa kódolt fehérje jellemzése

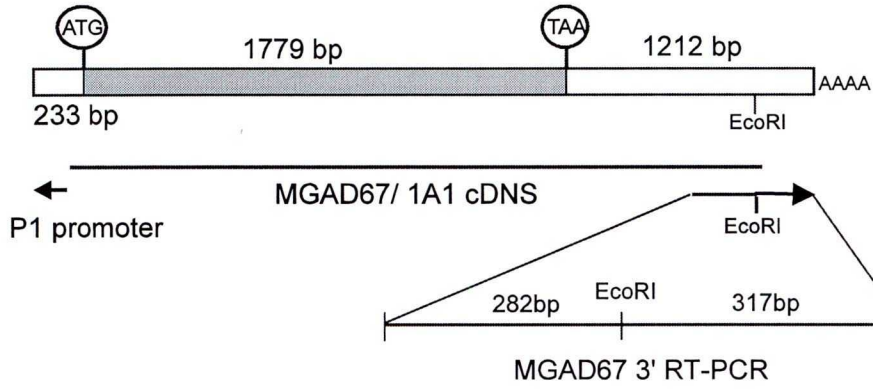
A klónozási munkának közvetlenül azután álltunk neki, amikor az első közlemény megjelent a macska glutaminsav dekarboxilázt kódoló cDNS klónozásáról (49).
A macska GAD cDNS-t heterológ próbaként felhasználva (49) sikerült felnőtt egér agy cDNS könyvtárból (λ gt11) a glutaminsav dekarboxilázt kódoló, átfedő cDNS klónokat izolálnunk (**1: 1. ábra***). A leghosszabb klónnak (2783 bp) meghatároztuk a nukleotidsorrendjét (**1: 2. ábra**). Mind a macska, mind pedig az általunk izolált egér cDNS fő leolvasási kerete is teljesen nyitott volt az 5' irányban. Ezért fontos volt annak eldöntése, hogy a cDNS első metioninja valóban a fehérje kezdőpontja-e. Ezt a megfelelő genomiális klónok szekvenciájának vizsgálatával sikerült bizonyítanunk, mivel a metionin előtt ugyanabban a leolvasási keretben egy stop kodont találtunk (**1: 3. ábra**). Az első metioninnal kezdődő 1779 bp hosszúságú nyitott leolvasási keret egy 593 aminósavból álló fehérjét kódol, amelynek a molekulatömege 66.5 KDa-nak felel meg. Az általunk izolált leghosszabb cDNS klón sem bizonyult teljes hosszúságúnak. Egyik cDNS sem tartalmazta az mRNS teljes 3' nem-transzlálódó régióját és mindegyik klón 3' vége ugyanannál az *Eco*R I helynél kezdődött (**1: 1. ábra**). Ennek az a magyarázata, hogy a cDNS könyvtár készítésénél a belső *Eco*R I helyet valószínüleg nem sikerült metilációval védeni, ezért a cDNS-ek egy részénél a klónozó vektorba való építésük nem az *Eco*R I linkeren, hanem a belső *Eco*R I helyen keresztül történt. A cDNS hiányzó 3'-végét közvetlenül RNS-ből kiindulva a polimeráz láncreakción (PCR) alapuló "cDNS végek gyors amplifikációja"- módszerével (3'-RACE) izoláltuk és meghatároztuk a nukleotidsorrendjét.

---

* A mellékletben található saját közlemények ábráira a közlemény sorszámával és a cikkbeli ábraszám feltüntetésével hivatkozom.

Ezzel együtt, poli(A) farok nélkül a cDNS teljes hosszúságú 3' nem-transzlálódó régiója 1212 bp. A GAD cDNS hiányzó 5' végi régióját az mRNS 5' végek meghatározásakor, a gén megfelelő régiójának ismeretében azonosítottuk (**4**). A fő promoterről képződő mRNS 5' nem-transzlálódó régiójának mérete 233 bp.

Egy átlagos poli(A) farok hosszát 200 bp-nak véve a teljes hosszúságú mRNS és a neki megfelelő cDNS 3424 bp hosszúságunak adódott. Ez jól egyezik a felnőtt egér agy RNS-ből Northern hibridizációval azonosított 3.5 kb GAD mRNS méretével (**3: 3. ábra**) (1. ábra).



1. ábra: ***A teljes hosszúságú egér GAD67 cDNS szerkezete.*** A 2783 bp MGAD67/1A1 cDNS-t a 3' irányba 3'-RACE technikával egészítettük ki. A hiányzó 5' régióját pedig primer extenzióval határoztuk meg. Így a 3244 bp hosszúságú cDNS kódoló régiója 1779 bp, az 5' nem-transzlálódó régiója 233bp, a 3' nem-transzlálódó régiója pedig 1212bp.

5.1.2. *Az egér GAD cDNS az enzim 67KDa formáját kódolja*

Ebben az időben még az volt az általános vélemény, hogy egyetlen egy GAD fehérje létezik génszinten, valamint a különböző méretű és funkcionális tulajdonságú formák feltehetően a fehérje másodlagos modifikációjának és/vagy hasításának következtében keletkeznek. Ez utóbbit látszott alátámasztani az a tény is, hogy az első klónozási próbálkozások különböző fajokból is csak egyféle cDNS-t eredményeztek. Ugyanakkor az sem volt kizárható, hogy a két nagyon hasonló GAD ugyan egy gén terméke, és eltérő exonhasználat játszhat szerepet a két nagyon hasonló forma létrehozásában. Végül pedig az is elképzelhető volt, hogy a két forma ténylegesen két gén terméke. Ezért úgy gondoltuk fontos lehet annak kiderítése, hogy a mi laboratóriumunknak egérből és másoknak pedig

egyéb fajokból ténylegesen melyik formának megfelelő cDNS-t sikerült klónozni. Ezért *E. coli*-ban és különböző emlős szövettenyészetekben az egér GAD cDNS-ről fehérjét szintetizáltunk. A baktériumban és eukariota szövettenyésztben képződött egér glutaminsav dekarboxilázt immunoblott technikával jellemeztük. Ehhez háromféle ellenanyagot használtunk fel: **1)** az általunk, baktériumban termelt egér GAD-dal szemben nyúlban előállított poliklonális ellenanyagot, amely főleg a nagyobb molekulatömegű GAD-ot ismeri fel (#6799;-**1**); **2)** a patkány szinaptoszómális GAD-dal szemben birkában előállított poliklonális ellenanyagot, amely mindkét GAD-ot felismeri (#1440;-81); **3**) a kisebb molekulatömegű GAD-ot specifikusan felismerő GAD6 monoklonális ellenanyagot (82) (**1: 5. és 6. ábra**).

Ezen immunoblott kísérletekkel megállapítottuk, hogy az egér GAD cDNS-ről emlős sejtekben szintetizált fehérje mérete pontosan megegyezik az agyban található nagyobb molekulatömegű GAD-dal. A mesterségesen szintetizált egér glutaminsav dekarboxilázt felismerte mindkét, a nagyobb formával is reagáló ellenanyag. A kisebb GAD formára specifikus monoklonális ellenanyag viszont nem mutatta ki a különböző rendszerekben expresszált egér GAD-ot (**1: 5. és 6. ábra**). Mindez azt bizonyította, hogy az általunk egérből és a mások által egyéb fajokból izolált GAD cDNS-ek a nagyobb molekulatömegű GAD-ot kódolják. Ez egyben annak a lehetőségét is felveti, hogy a két GAD bár nagyon hasonló, de mégis egymástól független fehérje. Az előbbi feltevés megerősítést nyert azáltal, hogy A. Tobin laboratóriumában izolálták a kisebb molekulatömegű GAD-ot kódoló cDNS-t is (57). Így közvetlenül sikerült igazolni, hogy a kisebb és a nagyobb molekulatömegű GAD-ot két független mRNS kódolja, amely két gén terméke. Azóta az elektroforetikus mobilitásuk alapján elkülönített 62 és 59 KDa GAD-ot egyezményesen a cDNS-eik által kódolt fehérjék számított molekulatömge alapján 65 KDa és 67 KDa GAD formáknak nevezzük.

5.1.3. Az egér 65 kDa és 67 kDa GAD, valamint a Drosophila melanogasterből izolált GAD fehérje aminósavsorrendjének összehasonlítása: a glutaminsav dekarboxiláz funkcionális szerkezete

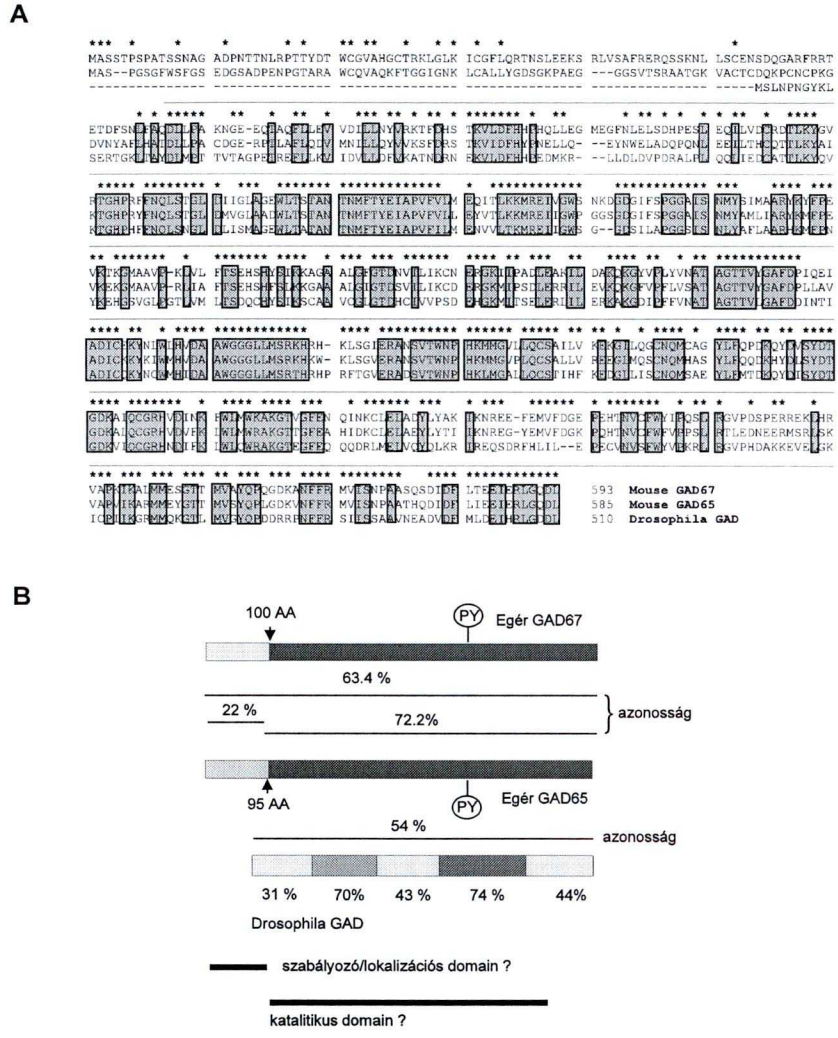
A számos emlős fajból azonosított két, és a *Drosophila melanogaster*-ből klónozott egy GAD aminósavsorrendjét összehasonlítva a következő megállapításokat tehetjük (56,57,83,84): A különböző emlős fajokból származó azonos GAD formák mind fehérje,

mind pedig RNS szinten szokatlanul konzervatívak. A fehérjék azonossága eléri a 95-98%-ot, ami nagyobb mértékű mint a legtöbb enzim esetében. Ezzel szemben az egy fajból származó két független gén által kódolt GAD forma között is jelentős mértékű az azonosság. A homológia a teljes fehérjére vonatkoztatva több mint 60%, de ez nem egyenletesen oszlik meg a molekula mentén. Az első 100 aminósavat kódoló régió szinte teljesen különbözik, a maradék közel 500 aminósavnyi szakaszban pedig az azonosság meghaladja a 70%-ot. Az egér GAD65 és GAD67 esetében a kódoló régióikra vonatkoztatott azonosság RNS szinten 66% és a leghosszabb folyamatos egyezés 17 nukleotid. Az első száz aminósavat kódoló mRNS régiók esetében a homológia 52.8%, míg a maradék 493 AA-t kódolóra vonatkoztatva pedig 68%. Fehérjeszinten az azonosság a két egér GAD forma között 63.4%. Az első 100 aminósavnyi szegment esetében ez csak 22%, de a maradék 493 AA-nyi régióban az azonosság 72.2% (2.ábra).

A glutaminsav dekarboxiláz elsődleges szerkezete nagy mértékben konzerválódott a törzsfejlődés során. Ezt bizonyítja az a kísérletes adat, hogy a különböző gerinces fajokban: békában, halban, madárban és a legkülönfélébb emlősben található glutaminsav dekarboxilázt a patkány és egér GAD-al szemben termelt ellenanyagok felismerik (45, saját nem közölt adat). Sőt egy rovarból, a *Drosophila melanogaster*-ből származó GAD még 54% azonosságot mutat az egér GAD65-el és 56%-ot a GAD67-el. A Drosophila GAD közel 90 aminósavval rövidebb mint az emlős GAD-ok (84). Pontosan ez az a régió, amelyik teljesen különbözik a két emlős GAD formában. Ezért feltételezhető, hogy a glutaminsav dekarboxiláz első 100 aminósava az enzim regulációs régiója. Saját kísérleti adataink szerint az első 100 AA nem szükséges az enzim aktivitásához, mivel a mesterségesen rövidített fehérjék a teljes hosszúságú GAD-dal összevethető enzimaktivitással rendelkeznek (nem közölt kísérleti adat) és az általunk azonosított rövidített 44 KDa embrionális GAD is képes GABA-t szintetizálni (**4**; erre még visszatérünk). Az irodalomból származó kísérletes adatok szerint ez a feltételezett regulációs régió lenne felelős a két forma eltérő sejtenbelüli lokalizációjáért. Nevezetesen a GAD67 forma N-terminálisát felcserélve a GAD65 megfelelő régiójával, szövettenyészetekben a GAD67 a GAD65 formához hasonlóan a diffúz sejtenbelüli megoszlása helyett inkább a Golgi komplex membránjaihoz kapcsolódik (62). A GAD65 N-terminális régiója képes a β-galaktozidáz markerfehérjét is a sejtenbelüli membránokhoz irányítani (85). Tehát a két forma eltérő N-terminálisa felelős azért, hogy a GAD65 az idegsejtekben inkább a szinaptikus végződésekben, feltehetően a szinaptikus

membránokhoz kötődve található. A GAD67 nagyobb mennyisében a sejttestekben és a dendritekben helyezkedik el.

Kísérletes adatok azt is bizonyítják, hogy a GAD67 végződésekben található frakciója a GAD65 N-terminálisához kötődik (86). A két forma eltérő sejtenbelüli megoszlása egy fontos tényező lehet abban, hogy a két forma a sejttestben és a végződésekben található funkcionálisan eltérő GABA frakció szintéziséért felelős.



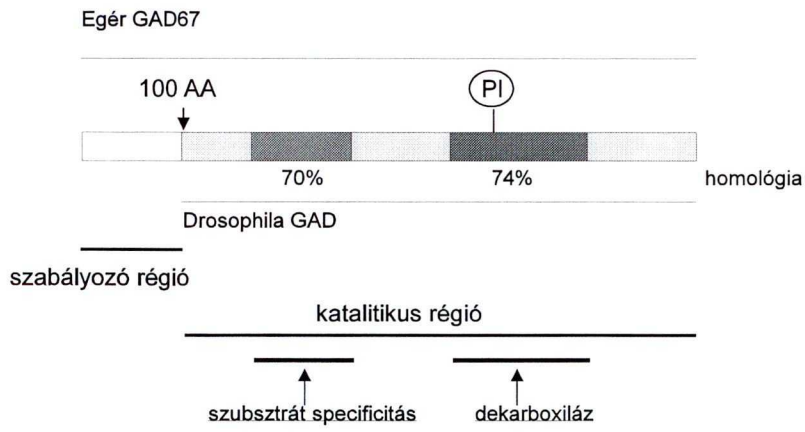
2. ábra: ***A két egér GAD forma (67 KDa és 65 KDa) és a Drosophila glutaminsav dekarboxiláz szerkezetének összehasonlítása.*** **A**) Az egér GAD67 és GAD65, valamint a Drosophila GAD aminósavsorrendjének összehasonlítása. Szürke keretbe foglaltuk azokat az aminósavakat, amelyek mindhárom GAD-ban azonosak. Csillaggal jelöltük a két egér GAD formában közös aminósavakat, a hasonló régiójukat pedig a szekvencia feletti vonallal jelöltük. Az aminósav szekvencia összehasonlítását **NSA Version 2.1 "Multiple Sequence Alignment"** programmal végeztük (IBC-Washington University, Saint Louis, USA-interneten keresztül). **B**) Az egér GAD67 és GAD65 valamint a Drosophila GAD szerkezetének összehasonlítása. Az egér GAD67 és GAD65 N-terminális 100 illetve 95 aminósava, valamint a maradék C-terminális régiók közötti azonosságot %-ban tüntettük fel. A Drosohpila GAD fehérjét az egér GAD formákkal való különböző mértékű azonosság alapján szubrégiókra osztottuk. PY- piridoxálfoszfát kötőhely.

Az emlős GAD-ok és a Drosophila GAD elsődleges szerkezetének összehasonlításából következtetéseket vonhatunk le az enzim katalitikus régiójának finomszerkezetére vonatkozóan is. A molekulán belül két olyan 100 illetve 140 AA hosszúságú régió található ahol az azonosság legalább 70% (84; 3. ábra). Az enzim C-terminálisához közelebbi nagyon konzervatív régióban található a piridoxál foszfát kofaktor kötőhely. Ezért feltételezhető, hogy az enzim ezen szakasza felelős az dekarboxiláz aktivitásért. Az N-terminális véghez közelebbi konzervatív régió pedig a hidroxiláz aktivitással rendelkező enzimekkel való analógia alapján feltehetően a szubsztrátspecificitásért lenne felelős (84). A két GAD forma eltérő funkcionális sajátosságainak strukturális alapjai még máig is teljesen ismeretlenek. A két izoforma eltérő kofaktor kötésének és kinetikai sajátosságainak célzott in vitro mutagenezisen alapuló kísérletes vizsgálatához a fenti szerkezeti információk hasznos kiindulópontul szolgálhatnak.

A

```
 97 LFAQDLLPAK-NGEEQTAQFLLEVVDILLNYVRKTFDHSTKVLDFHHPHQLLEGMEGFNL
 17 LTAYDLMPTTVTAGPETREFLLKVIDVLLDFVKATNDRNEKVLDFHHPEDMKRLLD---L
    * * ** *        *  *** * * **  *  * *   ********          *

                    szubsztrátspecificitás domén
156 ELSDHPESLEQILVDCRDTLKYGVRTGHPRFFNQLSTGLDIIGLAGEWLTSTANTNMFTY
 74 DVPDRALPLQQLIEDCATTLKYQVKTGHPHFFNQLSNGLDLISMAGEWLTATANTNMFTY
      *    * *   **  **** * **** ****** *** *  ****** *********

216 EIAPVFVLMEQITLKKMREIVGWSNKDGDGIFSPGGAISNMYSIMAARYKYFPEVKTKGM
134 EIAPVFILMENVVLTKMREIIGWSG--GDSILAPGGSISNLYAFLAARHKMFPNYKEHGS
    ****** ***   * ***** ***   ** *  *** *** *   *** * **  *  *

276 AAVP-KLVLFTSEHSHYSIKKAGAALGFGTDNVILIKCNERGKIIPADLEAKILDAKQKG
192 VGLPGTLVMLTSDQCHYSIKSCAAVCGLGTDHCIVVPSDEHGKMITSELERLILERKAKG
      *  **  **   *****   *  * ***  *     * ** *   **  **  * **

        dekarboxiláz domén
335 YVPLYVNATAGTTVYGAFDPIQEIADICEKYNLWLHVDAAWGGGLLMSRKHRH-KLSGIE
252 DIPFFVNATAGTTVLGAFDDINTIADICQKYNCWMHIDAAWGGGLLMSRTHRHPRFTGVE
    *  ********* **** *  ***** *** * * ************ ***    * *

394 RANSVTWNPHKMMGVLLQCSAILVKEKGILQGCNQMCAGYLFQPDKQYDVSYDTGDKAIQ
312 RADSVTWNPHKLMGALLQCSTIHFKEDGLLISCNQMSAEYLFMTDKQYDISYDTGDKVIQ
    ** ******** ** ***** *  ** * *  **** * ***  ***** ******* **
              PI
454 CGRHVDINKFWLMWKAKGTVGFENQINKCLELADYLYAKIKNREE-FEMVFDGEPEHTNV
372 CGRHNDIFKLWLQWRAKGTEGFEQQQDRLMELVQYQLKRIREQSDRFHLIL--EPECVNV
    **** ** * ** * **** *** *     **  *    *      *      ***  **

513 CFWYIPQSLRGVPDSPERREKLHRVAPKIKALMMESGTTMVAYQPQGDKANFFRMVISNP
430 SFWYVPKRLRGVPHDAKKEVELGKICPIIKGRMMQKGTLMVGYQPDDRRPNFFRSIISSA
    *** *  *****         *    * **  **  ** ** ***     ****  **

573 AASQSDIDFLTEEIERLGQDL MGAD67
490 AVNEADVDFMLDEIHRLGDDL Drosophila GAD
    *    * **   ** *** **
```

B



3. ábra. ***Az egér GAD67 és a Drosophila GAD aminósavsorrendjének összehasonlítása: a glutaminsav dekarboxiláz katalitikus doménjének szerkezete.*** **A)** A két GAD-ban az azonos aminósavakat csillagokkal jelöltük. A 70% és 74% azonosságot mutató, feltehetően az enzim szubsztrátspecificitásáért és a dekarboxiláz aktivitásért felelős doménjeinek megfelelő régiókat szürke keretbe foglaltuk. A PI kötésért felelős **NPHK** peptidet aláhúzással jelöltük. **B)** Az egér GAD67 és a Drosophila GAD szerkezeti hasonlóságának sematikus ábrázolása.

5.2. A GAD 67 kDa izoformáját kódoló gén jellemzése

5.2.1. A GAD67 cDNS-sel homológ szekvenciákat tartalmazó kromoszómális régiók izolálása

A cDNS klónunkat próbaként felhasználva Balb/c egér genomiális λ-fág génkönyvtárból két egymástól független fágklón csoportot izoláltunk. Az egyik csoport tagjai egyetlenegy, a próbával erősen hibridizáló 2.5 kb *Hind*III fragment formájában tartalmazták a GAD67 cDNS-el homológ DNS szakaszt. A másik csoport pedig egymástól sokszor távol térképeződő, a próba, vagyis a GAD cDNS különböző szakaszaival hibridizáló restrikciós fragmenteket tartalmazott.

Ebben az időben a két eltérő molekulatömegű GAD egymáshoz való viszonya ismeretlen volt. Tartotta még magát az a nézet, hogy egy GAD gén létezik és a két forma poszttranszlációs hasítás, vagy módosítás eredményeként jön létre. Ezért a következő megfontolásokat vettük figyelembe a két független GAD kromoszómális régió analízisekor: **1)** lehetséges, hogy a két független régió a két GAD formát kódolja; **2)** esetlegesen az egyik régió egy a GAD-dal rokon gént tartalmaz; **3)** az egyik fágcsoport egy nem valódi ún. "pszeudogénnek" felel meg, míg a másik pedig a több exonból álló "valódi" GAD gént tartalmazza. Annak az esélye kicsi volt, hogy két nagyon különböző szerkezetű független GAD gén létezik. Ezért mi a 3. lehetőséget tekintettük munkahipotézisnek. Először az abba a csoportba tartozó MGAD8 fágnak határoztuk meg a részletes fizikai térképét, amelynek egyetlenegy fragmentje hibridizált a teljes GAD próbával. Megállapítottuk, hogy az a GAD-dal homológ régióban teljesen megegyezik a cDNS restrikciós térképével (**2: 2. ábra**). Ez azt valószínűsítette, hogy az MGAD8 fág által reprezentált kromoszómális GAD régió nem tartalmaz intronokat. A GAD szekvenciát tartalmazó régió nukleotidsorrendjének meghatározásával egyértelműen sikerült bizonyítanunk, hogy ez a GAD kromoszómális lókusz egy intronmentes processzált pszeudogénnek felel meg, vagyis a GAD mRNS majdnem teljes hosszúságú DNS kópiáját tartalmazza. A pszeudogén régióban összesen 188 pontmutációt azonosítottunk, amelyek egyenletesen oszlottak meg a kódoló és nem-kódoló régió között. Ezenkívül 3 egybázisos és egy 12 bp hosszúságú deléciót, valamint 5 egybázisos és 5 többbázisos inszerciót (a leghosszabb 8 bp) is kimutattunk a szekvenciában. A kódoló régióban található mutációk 35 esetben okoztak aminósavcserét, egy esetben pedig a nukleotid

csere egy transzlációs stop szignált eredményezett a fő leolvasási keret 145. AA pozíciójában (G/T csere, GAA helyett TAA stop kodon). Az integrációs hely 3' végén pedig a beépült mRNS másolat poli(A) farkának maradványát is megtaláltuk. Ezen sajátosságok alapján egy valódi pszeudogénnel állunk szemben. A pszeudogénekhez hasonlóan az egér GAD pszeudogén integrációs helyének közvetlen közelében is, mindkét oldalon egy-egy rövid direkt ismétlődést találtunk. Ez feltehetően a retrotranszpozíció során az mRNS-ről reverz transzkripcióval keletkezett cDNS kópia genomba való integrációjához szükséges (87). Az inszerciós pont mindkét oldalán CT és AC gazdag ismétlődő szekvenciákat találtunk. Az 5' oldalon egy 46 bp-nyi AC gazdag és egy 23 bp-nyi CT gazdag, a 3' oldalon pedig egy 48 bp hosszúságú CT gazdag szekvencia van. Az ismétlődő szekvenciák jelenléte az inszerciós hely környezetében arra utal, hogy az egér GAD pszeudogén is nagy valószinűség szerint a genomban található másik transzpozonba, vagy annak közelébe épült be, mint sok más pszeudogén (88). A processzált pszeudogének keletkezésének, vagyis egy mRNS cDNS kópiájának a genomba való visszaépülésének alapvető feltétele az, hogy az adott génről az ősivarsejtek valamelyikében képződjön RNS. A GAD gén esetében ez a feltétel is teljesül, mivel a GAD67 mRNS különböző formái a herében található ősivarsejtekben is kimutathatók (89,90). Az egér GAD pszeudogén esetében az kissé szokatlan, hogy a kódoló régiójában csak egyetlenegy stop szignál található az eredeti leolvasási keretben és nincs benne egy olyan deléció vagy mutáció sem, amely azt megváltoztatná. Ezért az sem zárható ki, hogy ez a stop kodon nem mutácó eredeménye, hanem eredetileg is megtalálható egy olyan GAD mRNS variánsban, amely a herében képződik és rövidített GAD fehérjeformákat kódolna mint az általunk először azonosított embrionális bifunkcionális GAD mRNS-ek (**3**;- Erre még visszterünk).

A GAD pszeudogén az emlősök közül is csak az egérben található meg, még a legközelebbi rokonában a patkányban sem. Ez arra utal, hogy keletkezése az evulúció során késői esemény volt.

A kezdetben izolált másik, valódi GAD67 gént reprezentáló fágcsoport egyes fágjainak és azok plazmid szubklónjainak különböző restrikciós enzim emésztésekkel meghatároztuk a fizikai térképét. Ennek összevetésével és a fágklónok végfragmentjeivel végzett Southern hibridizációval megállapítottuk a fágok közötti átfedéseket. A fágok által lefedett genomiális régió nem volt folyamatos, ezért a hiányzó szakaszt un "kromoszómális sétával" izoláltuk. Vagyis a hiányzó régiót határoló fágok végfragmentjeinek segítségével további átfedő klónokat izoláltunk egy B6/CBA egér λ-FixII génkönyvtárból. Azért kellett

egy másik egértörzsből származó génkönyvtárat használni, mert az eredetiből többszöri próbálkozással sem sikerült a hiányzó régiót reprezentáló klónokat izolálnunk. A klónozott régiót hasonló technikával mindkét irányba kiterjesztettük. Ily módon mintegy 70 kb-nyi folyamatos kromoszómális DNS régiót izoláltunk. Ezek után a cDNS 5' és 3' nem-transzlálódó régióját és a kódoló régió különböző darabjait tartalmazó fragmentek felhasználásával a fágok szubklónjain megközelítően lokalizáltuk a GAD67 gén kódoló régióit, vagyis az exonjait (**4: 1. ábra**).

5.2.2. Az egér glutaminsav dekarboxiláz 67 kDa izoformáját kódoló valódi gén és pszeudogén kromoszómális helyzetének meghatározása

A GABAerg rendszer- a GABA szintetizáló enzimek, a GABA receptorok és transzporterek- érintettsége számos neurológiai betegség kialakulásában szerepet játszhat. Ez különösen igaz az epilepsziával járó kórképek esetében. Minden öröklődő humán betegség molekuláris alapjainak tisztázásához alapvetően fontosak a kapcsoltsági genetikai vizsgálatok. Ennek segítségével kideríthető az, hogy egy adott betegség kialakulásáért felelős mutációk milyen egyéb kromoszómális markerekkel együtt öröklődnek, vagyis melyik kromoszómális régióba térképeződnek és esetlegesen melyik ismert génnel hozhatók kapcsolatba. Másrészt egy betegséget okozó mutáns gén a mutáció ismert térképhelyzete alapján izolálható. Ezen vizsgálatok során az egérből nyert adatok nagyon hasznosnak bizonyulhatnak, mivel az egér és a humán genom nagyon hasonló. Számos gén ugyanolyan csoportokba rendeződik egérben mint humánban. Ez lehetővé teszi azt, hogy sok esetben az egérben nyert genetikai térképezési és kapcsoltsági adatokat felhasználhassuk emberi gének hozzávetőleges genetikai helyének meghatározásához.

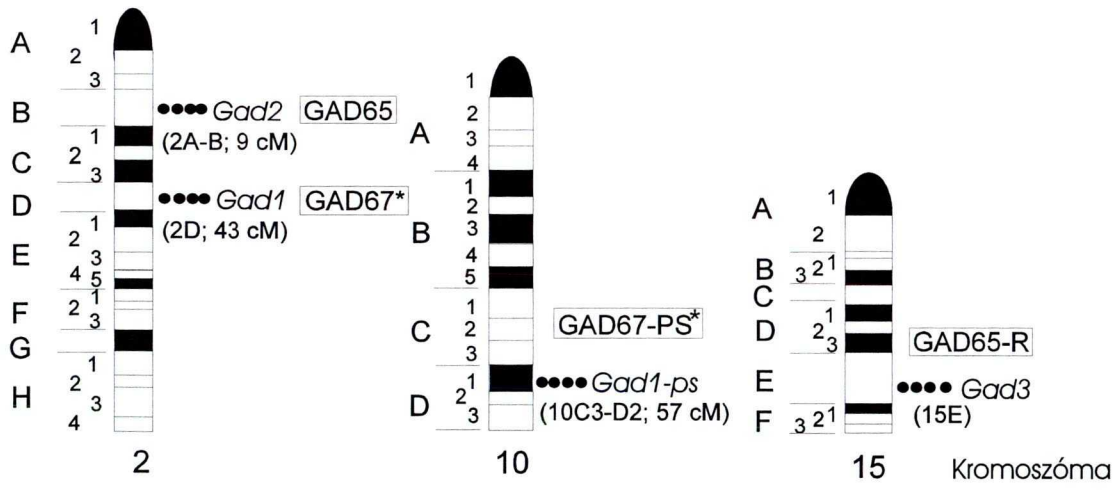
A glutaminsav dekarboxiláz cDNS-el homológ szekvenciák kromoszómális helyének meghatározását több különböző egér kromoszómát tartalmazó egér-kínai hörcsög szomatikus sejthibridek felhasználásával végeztük. A sejthibridekből izolált, *Pst* I és *Eco*R V restrikciós enzimekkel emésztett DNS-ek Southern blottjait jelölt GAD cDNS próbával hibridizáltuk, mivel ekkor még nem álltak rendelkezésünkre a genomiális klónok. Egér GAD67 specifikus hibridizációt mutattak mindazon sejthibridek amelyek a 2. és a 10. vagy csak a 2. egér kromoszómát tartalmazzák. A 4.0 kb *Pst* I fragment a 2. kromoszómával, a 3.3 kb EcoR V fragment pedig a 10. kromoszómával együtt szegregált (**2: 1. ábra és 1. táblázat**). Ez azt jelenti, hogy az egér genomban két különböző kromoszómán találhatók a

GAD67 cDNS-el homológ szekvenciák. Annak eldöntésére, hogy ezek közül melyik a valódi és melyik a pszeudogén a fenti hibridizációs sorozatot olyan próbákkal is megismételtük amelyek a valódi génre, vagy a pszeudogénre specifikusak, de nem tartalmaznak GAD szekvenciát. Ezen próbákkal egyértelműen sikerült azt eldönteni, hogy a valódi gén a 2., a pszeudogén pedig a 10. kromoszómán található.

A GAD67 gén, vagyis a ***Gad1*** genetikai lókusz pontosabb helyét a 2. kromoszómán két távoli egértörzs (*Mus spretus* és *Mus musculus*) keresztezésével előállított hibridek ("interspecific backcross") un restrikciós fragment hossz polimorfizmus (**RFLP**- "restriction fragment length polymorphism") vizsgálatával határoztuk meg. A *Hind* III RFLP a 2. kromoszómán talált ***Gad1*** lókusszal mutatott kapcsoltságot. Ezért a ***Gad1*** pontosabb helyének meghatározásához a *Hind*III **RFLP** öröklődését összevetettük három, korábban a 2. kromoszóma proximális végére térképezett marker: az *Abl* (Abelsom egér leukémia onkogén), a *Gcg* (glukagon) és a *B2m* (b2-mikroglobin) RFLP öröklődésével. A fenti 3 marker és a ***Gad1*** közötti rekombinácó gyakoriságából a következő sorrendet határozhatjuk meg: *Abl-Gcg-**Gad1**- B2m* (**2: 2. táblázat**)(4. ábra). Azt is megállapítottuk, hogy az egér 2. kromoszómáján található ***Gad1*** lókusz azon kapcsoltsági csoportba tartozik, amelyik megegyezik az emberi 2. kromoszóma hosszú karján található kapcsoltsági csoporttal. Ebbe tartozik a *Gcg,* ***Gad1***, *Il1a* és az *Il1b* (interleukin-1a, intraleukin-1b) valamint a *Hox*5.1. A mi, és későbbiekben a mások térképezési adatai alapján (60) a Kromoszóma Bizottság az egér GAD67 gén, vagyis a ***Gad1*** lókusz pontos helyét a 2. kromoszóma D citogenetikai régiójában 43.0 cM (centi Morgan) pozícióban rögzítette (4. ábra).

Az *Sst*I és az *Eco*RV restrikciós enzimekkel azonosított RFLP pedig a 10. kromoszómán található ***Gad1-ps*** lókusszal mutatott kapcsoltságot **(2: 1.táblázat**). De ezt finomtérképezésre nem lehetett felhasználni mivel a 10. kromoszóma genetikai lókuszait még nem jellemezték "interspecific backcross"-ban. Ezért a ***Gad1-ps*** helyét a 10. kromoszómán *Sst*I RFLP analízissel rekombináns beltenyésztett ún. RI egértörzsekben határoztuk meg. Az RI törzseket úgy hoztuk létre, hogy két beltenyésztett törzset kereszteztünk, majd utódaikat legalább 20 generáción keresztül tovább kereszteztük egymással. A **BXH RI** törzset a C57BL/6J és a C3H/HeJ, az **AKXL** RI törzset a AKR/J és a C57L/J, az **AKXD RI** törzset pedig a AKR/J és DBA/J2 keresztezésével állítottuk elő. Ezen RI törzseket azért lehet genetikai térképezésre használni, mert a beltenyésztés során a két szülői törzs genetikai állománya teljesen összekeverődik, de a kapcsolt gének együtt

maradnak a keresztezések során. Ennek a valószínüsége annál nagyobb minél közelebb helyezkedik el két gén egymáshoz. Ezért ha egy RI törzsön belül RFLP segítségével összehasonlítjuk a törzs-specifikus megoszlási mintázatát (SDP) egy ismeretlen térképhelyzetű lókusz alléljainak egy már ismerttel, akkor meghatározhatjuk a rekombináció gyakoriságát, vagyis a genetikai távolságot a két lókusz között. A ***Gad1-ps*** törzsspecifikus megoszlási mintázatát összevetve egy ismert 10. kromoszómán található markerével a *Hsd*-vel (histidinase synthetic rate), a két lókusz között 10% rekombinációs gyakoriságot találtunk (**2: 3. táblázat**). Ezen vizsgálatok azt nem derítették ki, hogy a ***Gad1-ps*** a *Hsd* melyik oldalán helyezkedik el. A későbbiekben a Kromoszóma Bizottság más adatokra is támaszkodva a GAD67 pszudogén, vagyis a ***Gad1-ps*** helyét a 10. kromoszóma C3-D2 citogenetikai régiójában 57.0 cM pozícióban állapította meg (4. ábra). Két további ***Gad*** lókusz kromoszómális helyzete is ismert. A GAD65 génnek megfelelő ***Gad2*** szintén a 2. kromoszómán az A-B citogenetikai régióban 9.0 cM-nél található (60) (4. ábra). A ***Gad3*** lókusz a 15. kromoszóma E citogenetikai régiójában egy a GAD65-höz hasonló de még ismeretlen gént tartalmaz (60) (4. ábra).



4. ábra: ***Az egér GAD gének kromoszómális lokalizációja.*** A sematikusan ábrázolt 2., 10. és 15. egér kromoszómák mellett fekete körökkel jelöltük a **GAD67**, a **GAD65**, a **GAD67-pszeudo** és egy ismeretlen, a **GAD65**-el homológ génnek megfelelő ***Gad1, Gad2, Gad1-ps*** és ***Gad3*** genetikai lókuszok térképhelyzetét

Itt jegyezném meg, hogy a GAD67 gén egy olyan kromoszómális régióban helyzkedik el, ahol feltehetően az idegrendszer működésében fontos egyéb gének is találhatók.

Három neurológiai mutáció: az *mdm* ("myositis"-hez társuló "muscularis dystrophia"; 91), az *anx* ("anorexia"; -92) és az *lh* ("lethargic"; -93) genetikai térképhelyzete a hibahatárton belül megegyezik a ***Gad1*** lókusz kromoszómális lokalizációjával. További genetikai vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy a ***Gad1*** lókusz érintett-e ezen mutációk bármelyikében is.

5.2.3. Az egér glutaminsav dekarboxiláz 67 kDa izoformáját kódoló gén szerkezete

Klónozási adataink azt mutatták, hogy az a kromoszómális GAD régió, amelyből mintegy 70 kb-nyi szakaszt átfedő fágok formájában izoláltunk, az intronokkal megszakított több exonból álló ún. "valódi" GAD67 gént tartalmazza. Az exonok számát és hozzávatőleges helyzetét úgy határoztuk meg, hogy a fágklónok plazmid szubklónjain azonosítottuk azokat a DNS fragmenteket, amelyek a GAD67 cDNS meghatározott rövidebb darabjaival hibridizálnak. Ezeknek a fragmenteknek meghatároztuk a GAD régión belüli pontos helyét és a részletes fizikai térképét. Ezen lépéseket a felbontást növelve többször megismételtük. A nagyjából lokalizált exonok pontos helyét és az exon-intron határokat célzott szekvenálással határoztuk meg.

Ezen adatokat összevetve megállapítottuk, hogy a GAD67 transzkripciós egység mintegy 42 kb hosszúságú. A kódoló régiója 18 exonból áll és ebből egy exonpár (7A és 7B) csak a rövidített embrionális GAD fehérjeformákat kódoló mRNS-ekben található meg (Erre még visszatérünk) (**4: 1. ábra és 1. táblázat**). Az első exon az mRNS 5' nem-transzlálódó régióját kódolja. Ezen exon mérete attól függ, hogy a transzkripció melyik promoterről indul (169 bp; 299 bp és 464 bp)(lásd később). A transzlációs start szignál, vagyis az iniciációs metionin kodon az mRNS 5' nem-transzlálódó régiójából 64 bp-nyit is kódoló 2. exonban található. A többi 16 tisztán fehérjét kódoló exon mérete 55 bp és 234 bp között van. Az utolsó 1384 bp hosszúságú 18. exon a GAD67 utolsó 57 aminósavát és az mRNS teljes hosszúságú 3' nem-transzlálódó régióját kódolja. Két egymással átfedő poli(A) addiciós szignált azonosítottunk az utolsó exonban 1190 bp-nyira a TAA transzlációs stop kodontól (AATAAAATAAA). Ettől 19 bp távolságra található a poli(A) addiciós hely, amelyet 36 bp-nyira követ a poli(A) addició szabályozásában szerepet játszó GTGTT szignál (94) (**4: 1. táblázat**).

Az exon-intron határok minden esetben megegyeztek a konszenzus szekvenciával és tartják a GT/AG szabályt (95). Vagyis minden intron 5' végén GT, a 3'végén pedig AG található.

Az intronok méretét a megfelelő klónok restrikciós térképe alapján határoztuk meg, és hosszuk 84 bp és 5.4 kb között változott (**4: 1. táblázat**).

Az aminósavszinten nagyfokú homológiát mutató egér és humán GAD67-et kódoló gének szerkezete is nagyon hasonló. Az exonok száma és mérete is megtartott, sőt még az exon-intron határok is nagy homológiát mutatnak és az intronok méretében is van hasonlóság (96). Érdekes megjegyezni, hogy nemcsak a különböző fajokból származó GAD67 gének szerkezete hasonló, hanem az egy faj két, 65% azonosságot mutató GAD formáját kódoló génjének (GAD65 és GAD67) szerkezete is nagyon hasonló. A két GAD több mint 70% azonosságot mutató majd 500 AA hosszúságú karboxiterminális szegmentjét kódoló génszakasz szerkezete teljesen megegyezik: az exonok mérete és az exon-intron határok pozíciója is azonos (96). Annak ellenére, hogy a két GAD első 100 aminósava majdnem teljesen különböző, a fehérjék ezen régióját kódoló három exon mérete és határai is gyakorlatilag megegyeznek. A két GAD formát kódoló gén szerkezetének nagyfokú hasonlósága arra utal, hogy a két gén duplikációval keletkezett. Az ősi GAD gén vagy nem tartalmazta az elő három exont, vagy pedig a szétválás után ebben a régióban kisebb volt a szelekciós nyomás. A két GAD nagyon hasonló szegmentje pontosan a 4. fehérjekódoló exonnal kezdődik. Tehát a fehérje funkcionálisan eltérő szegmentjeinek a határai követik az exonhatárokat. Az első 3 exon az enzim feltételezett regulációs régióját kódolja, a több mint 70% azonosságot mutató katalitikus régió pedig pontosan a 4. exontól kezdődik. A csak 22%-ban azonos és a GAD sejtenbelüli lokalizációjáért felelős aminoterminális szegmentjét három exon kódolja. Ezen belül a GAD65 esetében az első exon által kódolt régióra esik az összes ismert foszforilációs hely, a 3. exon által kódolt szakaszra pedig a két palmitoilációs hely, amelyeknek feltehetően a membránkötődés erősségének szabályozásában lehet szerepe (97,98). Ez is azt a feltételezést erősíti, hogy a glutaminsav dekarboxiláz enzim funkcionális organizációja és az exonszerkezet között szoros összefüggés van.

A GAD gének kódoló exonjai közül 7 (3; 4; 5; 12; 15; 16 és 17) szimmetrikus, vagyis ugyanolyan fázisosztályba tartozó intronok határolják (99). A szimmetrikus exonok alternatív használata általános mechanizmusa az egy génről szerkezetileg kissé eltérő fehérjék képződésének (100). Ha például a fenti exonok valamelyike nem épül be a GAD

mRNS-be, akkor a róluk képződő fehérjékben is kisebb-nagyobb deléciók keletkezhetnek. Az ilyen GAD fehérjevariánsok esetlegesen megváltozott tulajdonságokkal rendelkezhetnek. Mostanáig egy ilyen GAD67 mRNS-t írtak le. Emberi inzulinómából származó szövettenyészetben egy olyan transzkriptumot azonosítottak, amelyikből hiányzik egy 50 aminósavat kódoló szakasz, de az általa kódolt rövidített fehérjét még nem sikerült azonosítani (101). Ezen GAD67 mRNS-t összevetve a gén szerkezetével megállapítottuk, hogy a 15. exon hiányzik belőle. Ezenkívül egyéb perifériás szövetekben is, mint pl a herében és a petevezetékben az agyban található 3.5 kb GAD67 mRNS-nél rövidebb transzkriptumok is kimutathatók (89,90). Ezek az mRNS-ek keletkezhetnek alternatív exonhasználattal és elméletileg kódolhatnak rövidebb GAD fehérjéket. Ez a feltevés akkor lesz bizonyítható, ha a fenti szövetekben azonosított rövidebb GAD mRNS-ek pontos szerkezete ismertté válik.

A fenti példákkal az kívántuk demonstrálni, hogy a GAD67 gén szerkezetének ismerete milyen fontos lehet a feltételezhetően létező kissé eltérő tulajdonságú GAD fehérjeformák azonosításában és a GABA-szintetizáló enzimek funkcionálisan különböző régióinak megismerésében.

A következőkben egy szigorúan szabályozott "alternatív splicing" következtében eltérő exonszerkezetű GAD67 bicisztronos mRNS formákat jellemzünk, amelyek az általunk az irodalomban először leírt rövidített GAD fehérjeformákat kódolják.

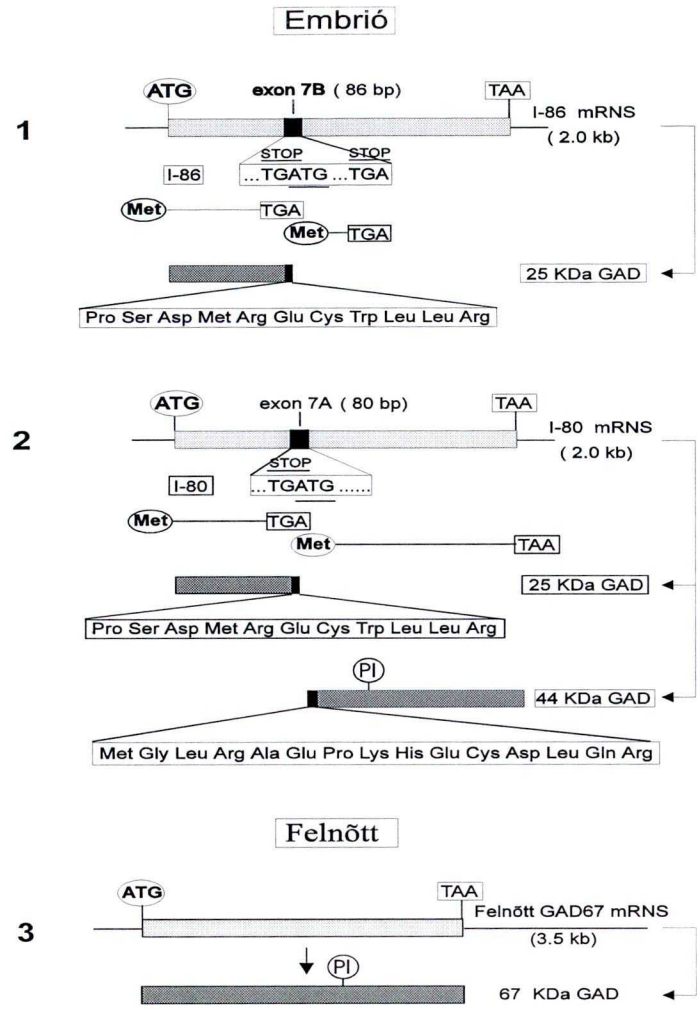
5.3. Alernatív exonhasználat szerepe a GAD67 gén fejlődés-specifikus működésének a szabályozásában: a rövidített embrionális GAD fehérjeformák

5.3.1. A bicisztronos GAD67 mRNS-ek szerkezete

Molekuláris fejlődéstani vizsgálataink (Northern hibridizáció és RT-PCR a GAD67 transzkriptumok kimutatására, valamint immunoblott technika az általuk kódolt fehérjék azonosítására) azt mutatták, hogy a GAD67 gén az egér embrionális fejlődése során már meglehetősen korán, az idegi differenciáció kezdeti szakaszában bekapcsol. A Nothern hibridizációnál sokkal érzékenyebb RT-PCR technikával kimutattuk, hogy a GAD 67 kDa formáját kódoló, a GAD67 génről átíródó 3.5 kb mRNS, ha igen kis mennyiségben is, de már egy 10.5 napos egér embrióban is kimutatható. A transzkript mennyisége fokozatosan növekszik és felnőtt korra éri el a maximális szintjét (**3: 3. ábra**). RT-PCR során a GAD67

mRNS kódoló régiójának az ATG-hez viszonyított 428 és 665 pozíciója közötti 261 bp hosszú szakaszt amplifikáltuk. Különböző korú embrió fejből/agyból izolált RNS templátról készített egyesszállú cDNS-en végzett polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) a Northern hibridizációhoz hasonlóan a 3.5 kb GAD67 transzkriptumnak megfelelő 261 bp PCR termék mennyiségének fokozatos emelkedését tapasztaltuk. Ezzel párhuzamosan két hosszabb, egy 341 bp és egy 347 bp PCR "band"-et is azonosítottunk, amelyekből sokkal több található az embrionális korban. A fejlődés előrehaladtával ezen embrió-specifikus termék mennyisége fokozatosan csökkent és felnőttben már alig volt kimutatható (**3: 1. ábra**). Minden a kódoló régiót amplifikáló további primer-párral csak a már ismert GAD67 mRNS-nek megfelelő méretű PCR terméket kaptuk. Ez azt jelenti, hogy csak két olyan a GAD67 génről átíródó transzkriptum létezik, amelyik egy inszerciót tartalmaz a kódoló régiójában. Ezen embrionális GAD67 transzkriptumok azonosítása céljából a 341 bp és 347 bp hosszú PCR terméket plazmid vektorba klónoztuk és meghatároztuk a nukleotidsorrenjét. Megállapítottuk, hogy mindkét "band" egy-egy 80 bp illetve 86 bp inszerciót tartalmaz a GAD67 cDNS kódoló régiójának 634-es pozíciójában. A kettő között csak az a különbség, hogy a 86 bp inszerció további 6 bp-t tartalmaz a 3' végén (**3: 2. ábra**). Az I-80 és az I-86 inszerciót kódoló exonokat a GAD67 gén megfelelő régiójában azonosítottuk. Ez az embrió-specifikus 7/A és 7/B exonpár átfedő és csak annyiban tér el egymástól, hogy a közös "splice acceptor" mellett különböző, egymástó 6 bp-nyira lévő "splice" donort használ (**3: 2. ábra**). Ezen inszerciót tartalmazó embrionális GAD67 transzkriptumok teljes kódoló régióját RT-PCR technikával közvetlenül RNS-ből klónoztuk, majd meghatároztuk mindkét cDNS teljes nukleotidsorrendjét. Megállapítottuk, hogy a 80 bp illetve a 86 bp inszerción kívül a szekvenciájuk teljesen megegyezik a felnőtt GAD67 mRNS kódoló régiójával. Az inszerciók, vagyis az embrionális exonok szekvenciáját analizálva megállapítottuk, hogy azok az eredeti fő leolvasási keretben egy **TGA** transzlációs stop szignált és vele átfedő pozicióban egy **ATG** transzlációs startkodont tartalmaznak (**TGATG**) (**3: 2. ábra**). Ez utóbbi újra azonos leolvasási keretben van a fehérje további részével. Az átfedő transzlációs stop és start szignál következtében a 7/A vagy 7/B embrionális exont tartalmazó GAD67 mRNS-ek szerkezetileg bicisztronosak, vagyis két tandem helyzetű nyitott leolvasási keretet tartalmaznak (ORF1 és ORF2). Az ilyen típusú bifunkcionális mRNS-ek két fehérjét kódolnak. A fehérjeszinézis az első nyitott leolvasási keret ATG kodonjánál elindul és az ugyanebben a fázisban található stop szignálnál leáll, majd a transzláció reiniciációjával

egy további fehérje képződik az átfedő ATG-nél kezdődő 2. nyitott leolvasási keretről is. Ez az I-80, vagyis a 80 bp inszertet tartalmazó embrionális GAD mRNS esetében azt jelenti, hogy a 7/A exonban található átfedő transzlációs stop és start szignál következtében a GAD67 fehérjét két önálló darabban: egy 25 kDa "leader" és egy 44 kDa rövidített GAD formájában kódolja. Az előbbi az első rövidebb ORF terméke és megegyezik a 67 kDa GAD aminoterminális régiójával és további 11 az embrionális exon által kódolt aminósavat tartalmaz a C-terminálisán. A 44 kDa GAD pedig az átfedő transzlációs szignállal kezdődő második ORF terméke. Ezen rövidített GAD első 15 aminósava szintén az embrionális exon által kódolt, és a fehérje további része pedig megegyezik a GAD67 karboxiterminális régiójával. A 86 bp inszerciót tartalmazó I-86 mRNS viszont csak a szerkezetét tekintve bicisztronos, mivel a 7/B exon 3' végén található további stop kodon megakadályozza azt, hogy ezen mRNS-ről a 44 kDa rövidített GAD is képződjön. Ez az embrionális GAD mRNS csak az első rövidebb leolvasási keretnek megfelelő 25 kDa "leadert" kódolja, tehát funkcionális értelemben nem bifunkcionális (**3: 2. ábra**) (5. ábra).



5. ábra: ***Az egér GAD67 génről átíródó embrionális és felnőtt mRNS-ek és az általuk kódolt fehérjék.*** **1)** Az I-86 embrionális mRNS csak a 25 kDa GAD-ot kódolja, mivel a 7B exonban két STOP kodon található. **2)** Az I-80 embrionális mRNS **7A** exonjában található átfedő transzlációs STOP és START szignál a kódoló régiót két önálló nyitott leolvasási keretre osztja. Ezért ez a bifunkcionális mRNS mind a 25 kDa, mind a 44 kDa GAD-ot kódolja. Külön feltüntettük a 25 kDa GAD C-terminálisának és a 44 kDa GAD N-terminálisának az aminósavsorrendjét. Mindkettőt az embrionális exon kódolja. **3)** A 3.5 kb felnőtt mRNS-ből hiányzik a 7A/B exon és a 67 kDa GAD-ot kódolja. PI-piridoxálfoszfát kötőhely.

5.3.2. A bicisztronos GAD mRNS-ek által kódolt rövidített embrionális fehérjék azonosítása

A rövidített GAD fehérjék képződését sikerült kimutatnunk a mesterségesen szintetizált embrionális mRNS-eket tartalmazó in vitro transzlációs rendszerekben, és az I-80 valamint az I-86 GAD expressziós vektorokkal transzformált COS majom vese sejttenyészetekben is (**3; 4. ábra**). Ez azt bizonyítja, hogy a bifunkcionális GAD mRNS-ek ténylegesen

kódolják a szerkezetükből következő rövidített GAD fehérjéket. A funkcionális értelemben is bicisztronos I-80 mRNS valóban képes mind a 25 kDa "leader"-t mind pedig a 44 kDa GAD-ot is szintetizálni. Ezzel szemben az I-86 transzkriptum a rövidített GAD fehérjék közül csak a 25 kDa "leadert" kódolja (6.ábra). Itt jegyezném meg, hogy mind az in vitro transzlációs rendszerekben, mind pedig szövettenyészetekben is a GAD mRNS-ekben található szinte valamennyi belső metioninról is elindult a fehérjeszintézis (**3: 4. ábra**). Ennek valószínüleg az a magyarázata, hogy az általunk használt mesterséges mRNS-ek nem rendelkeztek a teljes hosszúságú 5' nem-transzlálódó régióval. Az viszont köztudott, hogy az mRNS-ek ezen régiójának szerkezete hatással van a fehérjeszintézis iniciációjára (102). De az sem kizárt, hogy a bifunkcionális GAD mRNS-ek korrekt transzlációjához speciális fehérjefaktorok is szükségesek, amelyek hiányozhatnak az általunk használt rendszerekből.

A bifunkcionális GAD67 mRNS-ekről in vivo képződő fehérjék kimutatása céljából az embrionális egér agy fehérje extraktumokból készült Western blottokat a teljes hosszúságú GAD67 formát felismerő poliklonális ellenanyaggal festettük (#6799 általunk előállított poliklonális nyúl ellenanyag a baktériumban szintetizált egér GAD67-el szemben. Ez az ellenanyag felismeri mindkét GAD formát de preferenciálisan a 67 kDa GAD-ot). Az immunoblottokon a felnőtt GAD-okon kívül (GAD67 és GAD65) egy 44 kDa és két egymáshoz közeli 31-32 kDa fehérjét is azonosítottunk (**3: 7. ábra**).

Az általunk előállított embrionális formaspecifikus ellenanyagokkal sikerült bizonyítanunk, hogy a 44 kDa fehérje ténylegesen megfelel az I-80 bicisztronos embrionális mRNS 7/A exonjában található ATG-nél kezdődő második nyitott leolvasási keret által kódolt rövidített 44 kDa GAD fehérjének. A 31-32 kDa fehérjék pedig valóban azonosak a mindkét embrionális mRNS első cisztronjáról képződő 25 kDa "leader" fehérjével. A méretbeli eltérés oka előkísérleteink szerint az lehet, hogy ez a fehérje szintézise után modifikáción megy keresztül. A 44 kDa fehérje azzal az ellenanyaggal reagált, amelyiket az embrionális exon által kódolt, a 44 kDa GAD aminoterminálisán található 15 AA-ból álló peptid ellen termeltük. A 31-32 kDa fehérjéket pedig az az ellenanyag festi, amelyet a "leader" fehérje karboxiterminálisán található, az embrionális exon által kódolt 11 tagú peptiddel szemben állítottunk elő (**3: 9. ábra**).

Az általunk leírt és az előbbiekben részletesen jellemzett embrionális GAD mRNS az irodalomban az első valódi eukarióta bifunkcionális mRNS, amelyik ugyanannak a fehérjének két funkcionálisan jól elkülöníthető darabját két önálló fehérje formájában kódolja.

5.3.3. *A rövidített embrionális GAD fehérjék keletkezési mechanizmusa: transzlációs kapcsoltság*

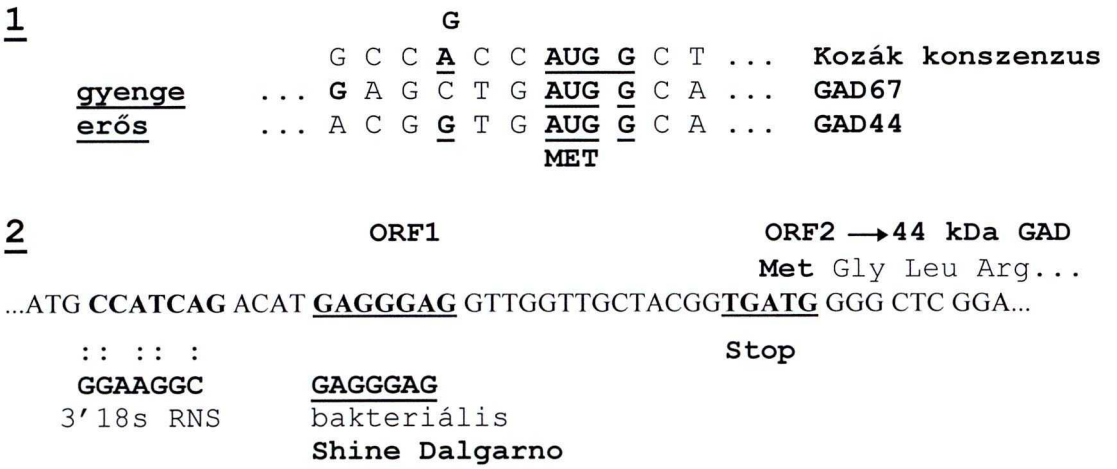
Az I-80 bifunkcionális GAD mRNS két átfedő cisztronja között feltehetően transzlációs kapcsoltság van. Az első tag transzlációs stop szignáljával átfedő ATG-nél kezdődő második nyitott leolvasási keretről a fehérje reiniciációval képződik. Az ilyen típusú transzlációs mechanizmus a bakteriális operonok policisztronos mRNS-eire jellemző. Az operonok egyes tagjai közötti transzlációs kapcsoltság, amelynek az alapja a nagyon közeli, vagy átfedő start és stop szignál, biztosítja az operonok által kódolt és funkionálisan összetartozó fehérjék közös transzlációs szabályozását (103,104,105). Ezzel szemben az eukariota mRNS-ek döntő többsége monocisztronos, tehát egyetlenegy fehérjét kódol és a fehérjeszintézis iniciációjának mechanizmusa is más. A prokariota mRNS-ek esetében az iniciáció során a kis riboszómális alegység kötődéséhez elengedhetetlen az ATG kodont megelőző, a 16S riboszómális RNS 3' végével komplementer rövid szekvencia. (Shine-Dalgarno szekvencia). Ezzel szemben az eukariota mRNS-ek esetében az inicáció az ún. "scanning" mechanizmussal történik. Ennek az a lényege, hogy a kis riboszómális alegység az mRNS elejére kötődik és addig mozog előre, amíg egy olyan ATG-t nem talál, amelyiknek a környezete optimális az iniciációhoz (ún. Kozak konszenzus CCPuCC**AUG**G) (105,106,107,108,109,110). Az eukariota és a virális mRNS-ek között is található néhány bifunkcionális mRNS (111,112). Bár ezek másképpen működnek mint a prokarióták. Abban az esetben, ha az mRNS-en található első ATG szignál "gyenge", vagyis a körülötte lévő szekvencia nem optimális, akkor a riboszómák egy része távolabbi ATG-nél kezdi a fehérjeszintézist ("leaky scanning"). Ennek az lesz az eredménye, hogy ugyanazon mRNS-ről egy hosszabb és egy rövidebb átfedő fehérje is keletkezik. De ha a második inicációs kodon egy más nyitott leolvasási keretben van, akkor egy teljesen más fehérje is szintetizálóhat. Az is előfordul, hogy a fő leolvasási keretben a kezdő ATG-hez viszonylag közel egy stop kodon található. Ebben az esetben a transzláció újra indulhat egy távolabbi metionin kodonnál.

Természetesen az ún. reiniciáció hatásfoka sokkal kisebb és ezért kevesebb képződik a fő funkcionális fehérjéből, mint azt megelőző rövidebb fehérjéből. Ez utóbbinak főleg az a szerepe, hogy szigorú mennyiségi kontroll alatt tartsa a "valódi fehérjét". Valódi transzlációs kapcsoltság csak néhány eukarióta vírus és mesterséges operon esetében létezik (113,114,115,116).

Kísérleti adataink szerint az I-80 bifunkcionális mRNS- esetében a két átfedő ORF-ről a 25 kDa és a 44 kDa GAD inkább transzlációs kapcsoltsággal, mint "leaky scanning" mechanizmussal keletkezik (**3: 4/A ábra** 5. oszlop esetében a 44 kDa GAD-nak megfelelő **b** "band" intenzívebb mint **a**; ezzel szemben **3: 4/B. ábra** esetében pedig ahol bizonyítottan "leaky scanning"-ről van szó az **a** "band" intenzívebb mint **b**). A transzlációs kapcsoltságot a 7/A exonban található átfedő stop és start szignálnál az is elősegíti, hogy 67 kDa GAD és a 25 kDa "leader" fehérje által is használt első ATG-hez tartozó konszenzus nem ideális, ellenben a két cisztron határán a stop kodonnal átfedő ún. reiniciációs ATG környezete optimális a riboszóma kötődéshez (6. ábra). Annak ellenére, hogy általános vélemény szerint az eukariota mRNS-ek esetében a fehérjeszintézis iniciációjához riboszóma kötőhely nem szükséges, a GAD bifunkcionális mRNS-ben található reiniciációs ATG előtt egy a 18S riboszómális RNS konzervatív 3' végi régiójával találtunk részleges homológiát (6. ábra). Feltételezhető, hogy a reiniciáció során ez segíthet a kis riboszómális alegység helyben tartásában. Egy ilyen hasonló prokariota-szerű cisz elemet azonosítottak a picornavírusok esetében is, amelynek szerepe van a vírus mRNS-ek "cap"-struktúrától független ún. belső-iniciáción alapuló transzlációjában (6. ábra) (117). Itt jegyezném meg, hogy ugyanezen régióban egy tökéletes bakteriális Shine Dalgarno szekvenciát is azonosítottunk. Ennek léte magyarázhatja azt, hogy a GAD I-80 embrionális mRNS a bakteriális rendszerekben is bicisztronosként működik, tehát róla transzlációs kapcsoltsággal mind a 25 kDa, mind pedig a 44 kDa GAD fehérje is képződik (**3: 5. ábra**).

Az I-80 bifunkcionális mRNS korrekt iniciációjának szabályozásában a 4E, 4A és 4F általános transzlációs faktorok jöhetnek szóba, mivel az ismert, hogy ezen faktoroknak szerepe van a bicisztronos mRNS-ek belső metioninjáról történő iniciáció szabályozásában (118,119). Az is ismert, hogy éppen az eukariota iniciációs faktor 2 4E alegységének aktivitása a PC12 sejtek in vitro differenciálódásával párhuzamosan változik. A 4A alegység két molekuláris formájának aránya pedig különböző szövetekben eltérő (120,121). Így elképzelhető, hogy bizonyos mértékben a transzláció szabályozásában

szöveti és fejlődésbeni különbségek is vannak. Az sem zárható ki, hogy a karfiol mozaik vírushoz hasonlóan létezik egy a GAD bifunkcionális mRNS-re specifikus transzlációs faktor is. Ugyanis egy abszolút specifikus transzaktivátor fehérje a VII. gén termékével együtt elengedhetelen a policisztronos vírus mRNS tandem helyzetű ORF2 transzlációjához (122,123). Ez az mRNS szerkezetében nagyon hasonlít az I-80 bifunkcionális GAD mRNS-hez.

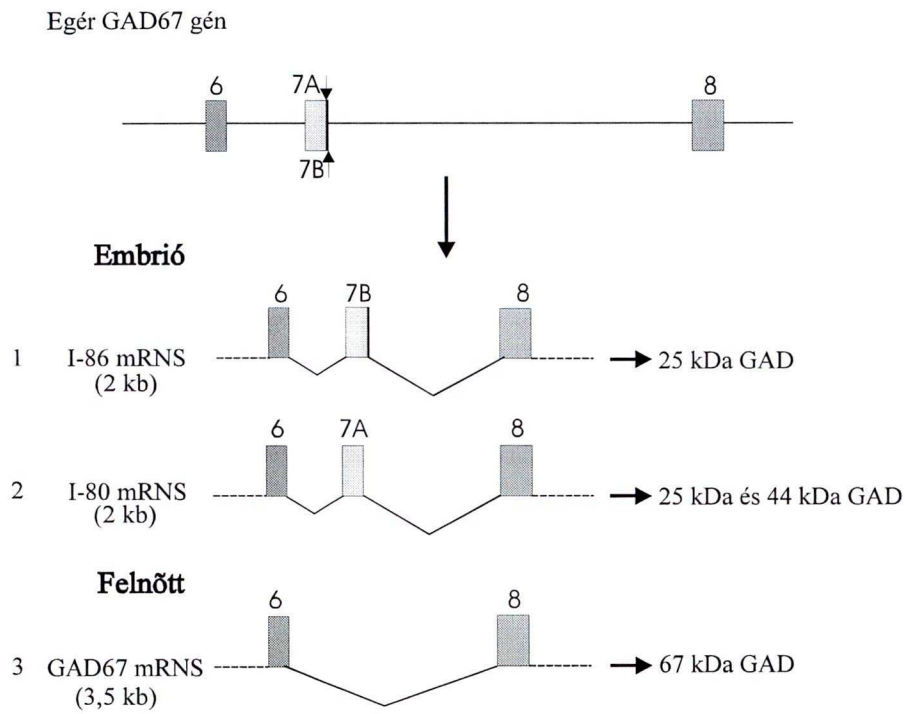


6. ábra: ***Az embrionális bifunkcionális GAD mRNS két átfedő nyitott leolvasási keretének transzlációs kapcsoltságában fontos cisz DNS regulációs elemek.*** **1.** A 67 kDa és a 44 kDa GAD transzlációs START szignálját magába foglaló régió összehasonlítása. Legfelül a Kozak konszenzust tüntettük fel. A konszenzussal megegyező nukleotidokat vastagon jelöltük. **2.** A második leolvasási keret START szignáljától 5' irányban a 18S riboszómális RNS 3' végével komplementer régiót azonosítottunk. Ezt a szakaszt vastagon kiemeltük és a komplementer nukleotidokat kettősponttal kötöttük össze. A bakteriális Shine Dalgarno motívummal egyező szekvenciát aláhúzással és vastag betűvel jelöltük.

5.3.4. A különböző embrionális és felnőtt GAD67 mRNS-eket eredményező alternatív splicing fejlődés-specifikus szabályozása

A felnőtt és az embrionális GAD transzkriptumokat és az általuk kódolt fehérjéket az egér embrionális és posztnatális fejlődése során nyomon követve megállapíthajuk, hogy a különböző GAD mRNS-ek keletkezéséért felelős alternatív splicing mechanizmus igen szigorúan szabályozott. A fejlődés során a GAD67 elsődleges transzkriptumról legkorábban a 7/B exont tartalmazó embrionális mRNS képződik annak ellenére, hogy a splicing 5' poziciójában a ritka TG/GT szekvencia található. Ezen splice hely használatához feltehetően pozitív fehérjefaktorok aktív közreműködése is szükséges

(124,125,126). Ez az I-86 mRNS csak a 25 KDa "leader"-t kódolja. Az időben következő splicing esemény során a 7/A exon épül be az I-80 mRNS-be. Ezen valódi bifunkcionális transzkriptumról a 25 kDa "leader" mellett a 44 kDa rövidített GAD is képződik. A két esemény között csak annyi az eltérés, hogy a "splicing" reakcióban a közös akceptor mellett egy 6 bp-vel közelebbi ideális donor vesz részt. Időben ezt követi a teljes 7/A-7/B exon kivágódása. Az ún. "exon-skipping" (100) eredményeként jön létre a teljes hosszúságú GAD67-et kódoló 3.5 kb mRNS (7. ábra).



7. ábra: ***A szigorúan szabályzott "alrenative splicing" szerepe a különbözõ GAD fehérjeformák keletkezésében.*** A fejlődés során legelőször a 7B exont tartalmazó, és csak a 25 kDa GAD-ot kódoló I-86 mRNs képződik. Ezt követi egy 6 bp-vel távolabbi "splice donor" használata. Ez az mRNS a 7B exont tartalmazza és mindkét rövidített GAD fehérjét kódolja (GAD25 és GAD44). Majd "exon skipping" következtében a 7A/B exon nem épül be a transzkriptumba. Ez a 3.5kb felnőtt mRNS a teljes hosszúságú GAD67-et kódolja. Legfelül a GAD67 gén 6., 7. és 8. exonját tartalamzó régióját ábrázoltuk. A 7A és 7B embrionális exon között csak az a különbség, hogy a 7B exon 6 bp-al hosszabb. Alatta a fejlődésben egymást követő különböző splicing lépések találhatók (1,2,3). A transzkriptumoknak megfelelő fehérjéket is feltüntettük.

Az embrionális exonspecifikus próbát használva megállapítottuk, hogy az embrionális korban azonosított 2 kb körüli GAD transzkriptum felel meg a 7/A vagy 7/B exont tartalmazó I-80 és I-86 mRNS-eknek (**3: 3. ábra**). A GAD mRNS-ek kódoló régiója 1.8

kb, ezért az embrionális GAD transzkriptumok 3' nem-transzlálódó régiója sokkal rövidebb mint a 3.5 kb felnőtt mRNS-é. A 3.5 kb GAD mRNS 3' nem-transzlálódó régiójában a transzlációs stop szignáltól mindössze 170 bp-nyira egy alternatív poli(A) addiciós helyet azonosítottunk. Úgy véljük, hogy ezen poli(A) addiciós hely használata következtében rövidebb az embrionális GAD mRNS 3' nem-transzlálódó régiója. Megállapíthatjuk, hogy a felnőtt és az embrionális GAD67 mRNS-ek képződését szabályozó alternatív splicing alternatív poli(A) addiciós hely használattal is jár, mint sok hasonlóan szabályozódó gén esetében (100).

5.3.5. A rövidített embrionális GAD fehérjeformák feltételezett szerepe az idegrendszer differenciációjában

Mint ahogy már említettük, a különböző embrionális- és felnőtt- GAD mRNS-ek képződéséért felelős alternatív splicing az embrionális fejlődés során szigorúan szabályozott. A gén már az idegi differenciálódás igen korai fázisban bekapcsol és expressziója jellegzetes változást mutat mind RNS, mind pedig fehérje szinten is (**3: 1.,2.,7. ábra**). Legkorábban, már feltehetően az idegi differenciálódás proliferatív fázisában, az enzimaktivitással nem rendelkező 25 kDa GAD-ot kódoló I-86 transzkriptum jelenik meg. Ezt követi az aktív neurogenezis (differenciáció, migráció, szinaptogenezis) fázisában az I-80 embrionális GAD mRNS és ennek megfelelően a 25 kDa GAD mellett a GABA-t szintetizálni képes 44 kDa GAD megjelenése is. Az idegi fejlődés és a GABAerg szinapszisok képződésének előrehaladtával a rövidített embrionális GAD fehérjeformákat fokozatosan felváltja a teljes hosszúságú felnőtt GAD67. A funkcióképes, elektrofiziológiailag aktív GABAerg neuronokban már a GAD67 szintetizálja a neurotranszmitter GABA-t. Az embrionális és a felnőtt GAD fehérjeformák váltása tejles mértékben követi a szinaptogenezis előrehaladását. Ez azt sugallja, hogy a rövidített GAD formáknak ezen folyamat szabályozásában lenne szerepe.

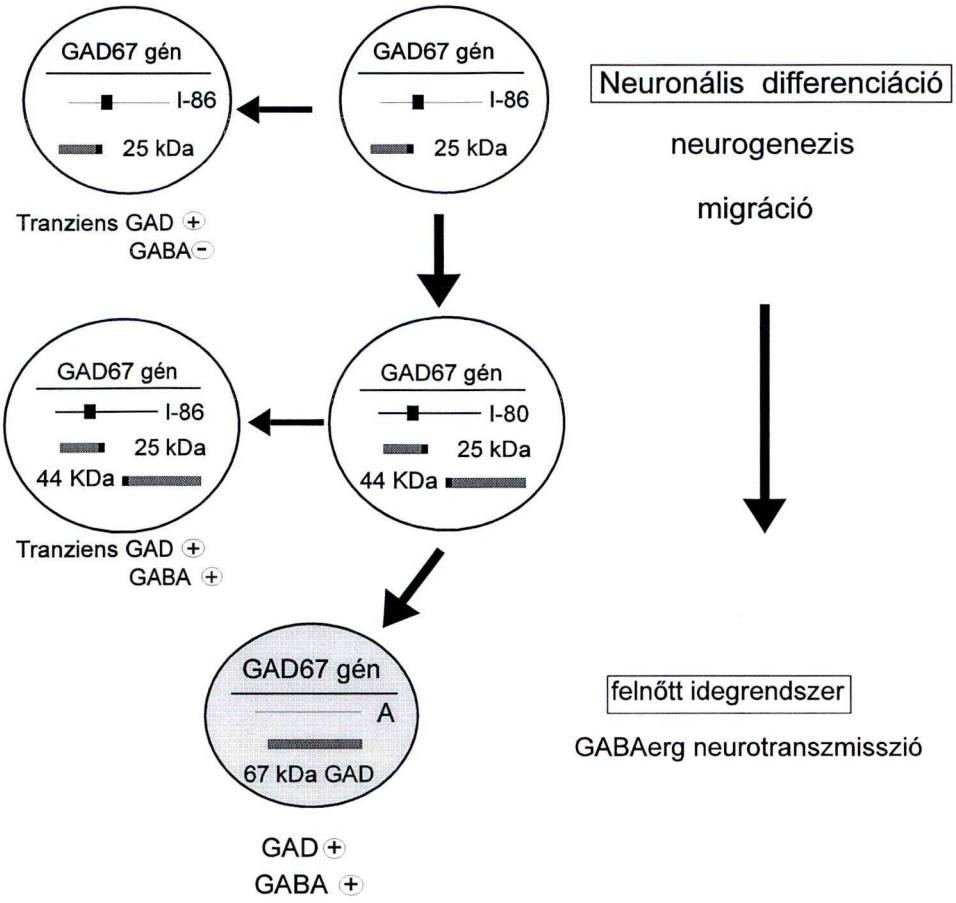
A rövidített GAD fehérjeformák közül a 25 kDa "leader" a GAD regulációs doménjének felel meg és nem rendelkezik enzimaktivitással mivel hiányzik belőle a kofaktor kötőhely. Ezen forma pontos szerepe az idegi differenciáció szabályozásban még teljesen ismeretlen. Feltételezhető, hogy szignálmolekulaként is működhet a GABAerg rendszer fejlődésében és szerepe lehet a 44 kDa GAD szintjének pontos szabályozásában is. Ezzel szemben a GAD67 aminoterminálisával azonos, rövidített GAD44 tartalmazza az enzimaktivitáshoz

szükséges PI kötőhelyet és bizonyítottan képes GABA-t szintetizálni (be nem mutatott adat). A 44 kDa rövidített GAD nem tartalmazza a fehérje feltételezett regulációs/ lokalizációs régióját és végeredményben az enzim katalitikus doménjének felel meg. Ezért feltételezhető, hogy ezen formának a regulációja teljesen eltér a neurotranszmitter GABA-t szintetizáló teljes hosszúságú felnőtt formákétól. Előzetes eredményeink szerint a felnőtt GAD67-től eltérően a GAD44 sejtmembránokhoz kötődik, feltehetően az embrionális exon által kódolt N-terminálisa következtében (15 AA). Úgy véljük, hogy ez a rövidített GAD forma szintetizálná az idegi differenciálódás szabályozásában szerepet játszó, sejten belüli trofikus funkcióval rendelkező GABA készletet.

A fenti adatok figyelembevételével a következő hipotézist állíthatjuk fel a különböző GAD67 formák szerepére az idegi differenciálódás és működés szabályozásában:

A fejlődés legkorábbi szakaszában csak a 25 kDa GAD szintetizálódik, ami önmagában is szignálként szolgálhat további, az idegi differenciációban fontos szerepet játszó gének aktiválódásához. Ezt a sejtpopulációt nevezhetjük tranziens GAD-pozitív és GABA-negatív prekurzoroknak. Egy részükben a differnciálódás olyan irányban halad tovább, hogy a GAD44 is megjelenik. Ez a sejtpopuláció már tartalmaz GABA-t, ezért GAD- és GABA-pozitív neuronális prekurzoroknak is nevezhetjük őket. Ezen differenciálódó, ideiglenesen GABA- és GAD-pozitív neuronok létezésére vannak irodalmi adatok is (16,17,127), bár bennük a GAD fehérjeformák nem azonosítottak. A fejlődés előrehaladtával ezen sejtek egy részéből lesznek a gátló szinaptikus kapcsolatokat kialakító "valódi" GABAerg neuronok. Ezekben az idegsejtekben a neurotranszmitter GABA szintézisét a felnőtt GAD67 veszi át. A GABA funkcióváltásával- trofikus faktorból neurotranszmitterré- teljesen párhuzamos az embrionális GAD formák váltása a felnőtt GAD-ra. Ez azt sugallja, hogy feltehetően a rövidített GAD-nak az idegi differenciálódásban a "nem-szinaptikus" GABA szintézisében lenne szerepe (8. ábra).

Primér neuronális sejtkultúrák és olyan stabil neuroektodermális sejtvonalak, amelyek idegsejtekké képesek differenciálódni a jövőben kiváló objektumként szolgálhatnak ezen hipotézis egyes láncszemeinek igazolására.



8. ábra: ***Modell: a különböző GAD fehérjeformák szerepe az idegrendszer fejlődésében.*** Az idegi differenciáció során a GAD67 génről először csak a GABA-t nem szintetizáló 25 kDa GAD-ot kódoló mRNS íródik át. Ezen sejtpopuláció egy részében a gén kikapcsol (tranziens GAD pozitív és GABA negatív sejtek). Más részükben pedig "alternatív splicing"-gal képződő újabb mRNS (I-80) már a GABA-t szintetizáló GAD44-et is kódolja. A már GABA pozitív sejtek egy részében a GAD67 gén működése ezen a szinten marad, vagy kikapcsol (tranziens GAD és GABA pozitív populáció), vagy pedig "exon skipping" következtében a teljes hosszúságú 67 kDa GAD-ot fogják szinetizálni. Ezek a valódi GABAerg neuronok. A GAD fehérjeformák váltása teljesen párhuzamos az idegi differenciációval és a szinaptogenezissel. Körökkel szimbolizáltuk a különböző sejtpopulációkat, a valódi GABAerg neuronokat szürke szinnel kitöltöttük. Feltüntettük a bennük található GAD mRNS- és fehérje-formákat is.

5.4. Az egér GAD67 gén transzkripcióját irányító összetett promoter-rendszer azonosítása és jellemzése

A GABAerg neuronok GABA készletét alapvetően a szintézisük kulcsenzimének, a glutaminsav dekarboxiláznak az aktivitása határozza meg. Az enzimaktivitás szabályozásában, a közvetlen kofaktor kötésen kívül, különösen a 67 kDa forma esetében, az enzim mennyiségének a transzkripció szintjén történő regulációja is fontos tényező (44). Ezen regulációs mechanizmus megértéséhez, valamint a GAD expresszió szövet- és fejlődés-specifikus szabályozásának tanulmányozásához elengedhetetlenül fontos a GAD67 gén transzkripcióját irányító DNS szakaszok ismerete és jellemzése.

5.4.1. A felnőtt agyban képződő GAD67 mRNS-ek 5`-végeinek meghatározása és a transzkripció kezdőpontjainak megfelelő promoterek azonosítása

Kiindulópontként meghatároztuk a GAD67 gén első nem-transzlálódó exonjának 3'-végétől számított mintegy 1.5 kb hosszúságú DNS szakasz nukleotidsorrendjét (**4: 3. ábra**). A szekvencia ismeretében primerextenziós technika segítségével azonosítottuk a GAD67 génről felnőtt agyban képződő transzkriptumok kezdőpontjait. A 3.5 kb GAD67 mRNS 3' nem-transzlálódó régiójával komplementer két különböző oligonukleotid felhasználásával három csoport extenziós terméket kaptunk, amelyek végei a gén 5' végének mintegy 300 bp-nyi szakaszán belül térképeződtek (**4: 2. ábra**). A legközelebbi fő csoport 8 bp-on belül többszörös iniciációs pontot tartalmazott és a legerősebb ATG-től mért távolsága 233 bp-nak adódott. Az ATG-től 363+4 bp, valamint 528-4bp távolságra két további ritkábban használt kettős transzkripciós kezdőpontot is találtunk. A gén 5'-végének szekvenciaanalízisével pedig az RNS szintézis kezdőpontjainak megfelelő három promoter-régiót azonosítottunk (**4: 3. ábra**). A fő többszörös RNS szintézis kezdőpontot közvetlenül megelőző, a következő iniciációs pontig tartó mintegy 130 bp-nyi DNS szakasz rendkívül gazdag G és C nukleotidokban (77%). Ezen régión belül egyik klasszikus promoter alapelem (**TATA** és **CAAT** elem) sem található meg. Ezzel szemben viszont az ***SP1*** általános transzkripciós faktor kötőhelynek megfelelő **CCCGCC** szekvencia motívumot 3 példányban azonosítottuk (128). Ezen sajátosságok alapján (többszörös RNS szintézis kezdőpont, magas GC tartalon, **TATA** és **CAAT** hiánya, ***SP1*** jelenléte) a felnőtt agyban leggyakrabban használt legközelebbi **P1** promoter leginkább az

általános sejtanyagcserében szerepet játszó, szövetspecficitással nem rendelkező ún. "housekeeping" gének promoterére hasonlít (129). Ezt erősíti meg az a tény is, hogy a gén 5' végének a **P1** promotert, az első két exont és az első intront tartalmazó 2 kb-nyi szakasza egy CpG szigetet alkot (**4: 5. ábra**) (9. ábra).

A magasabbrendű eukarioták genomjára az jellemző, hogy a CpG dinukleotidok, vagyis az egymást követő C és G nukleotidok előfordulási aránya kisebb (1/3), mint az az átlagos bázisösszetételből következne. Ennek az a magyarázata, hogy eukariotákban a CpG dinukleotidokban található citozin bázis egy része metilálva van és ez a metilcitozin a DNS "repair" során dezaminálási lépéssel adenozinná alakul. Vannak azonban a genomban olyan GC gazdag régiók is, ahol a CpG dinukleotidiok aránya sokkal magasabb, megközelíti a várt arányt. Ezek az ún. CpG szigetek minden "housekeeping" gén és a szövetspecifikus gének felének az 5' végén találhatók. A sziget CpG dinukleotidjainak jelentős része demetilált állapotban van, és az ennek következtében nyitott kromatin struktúra elengedhetetlen előfeltétele az adott gén aktivitásának (130,131).

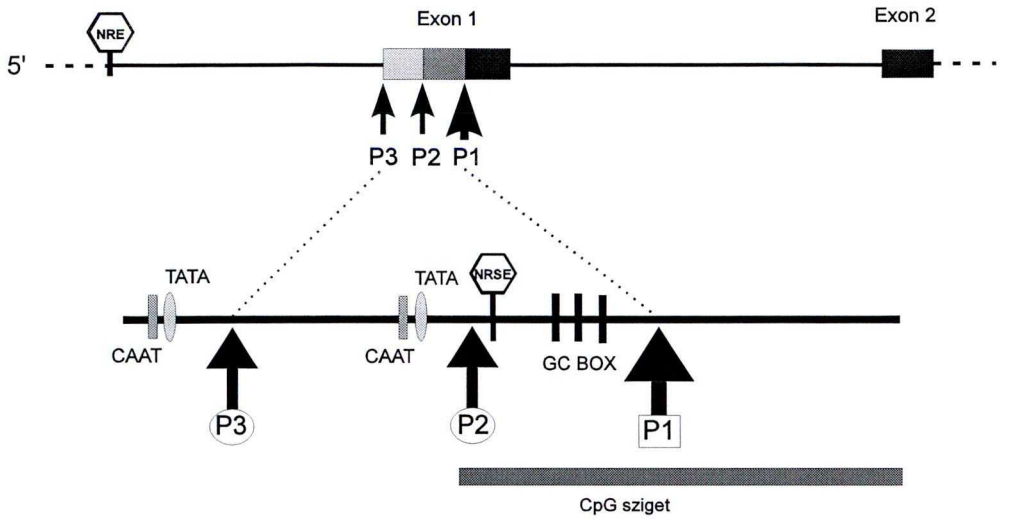
A GAD67 gén 5' végén elhelyezkedő CpG szigetben is sok GC "box" (8-**CCCGCC**) található, mint a CpG szigetekben általában. Ebből három egymáshoz közel a sziget 5'-végén van a P1 régióban (**4: 3. ábra**). Ez feltehetően szerepet játszik abban, hogy az egész sziget hipometilált állapotban legyen, ami alapvetően fontos a GAD67 gén aktivitásához.

Ezenkívül a **P1** promoter által meghatározott fő RNS-szintézis kezdőpont egy nagy palindróma-szerű szerkezetben található. Ez szintén jellemző a GC gazdag "TATA-nélküli promoterekre és úgy tűnik, hogy elengedhetetlen az ilyen típusú promoterek alapaktivitásához (132).

Az ilyen "housekeeping" promoterek számos idegrendszer-specifikus génre jellemzőek annak ellenére, hogy azok jórésze szövetspecifikus (133-144).

Ezzel szemben a CpG szigeten kívül eső, a további két kettős transzkripciós kezdőpontot tartalmazó régió nem GC gazdag. Mindkét transzkripciós starthelytől megfelelő távolságban a szövetspecifikus promoterekre jellemző **TATA** motívumot találtunk (36 és 43 bp-nyira az RNS szintézis kezdőpontjától)(**4: 3. ábra**). Ettől 5' irányban mindkét esetben a másik általános promoter elemet, a **CAAT**-szerű motívumot is azonosítottuk (**ACACCC** szekvencia 32 bp-nyira a **TATA** motívumtól: ez a humán MGMT promoter **CAAT** "boxával egyezik meg (145); **CAAAT** szekvencia 14 bp-nyira a távolabbi **TATA**-tól).

A két távolabbi RNS-szintézis kezdőpontnak megfelelő, a felnőtt agyban ritkábban használt **P2** és **P3** promoter a fenti tulajdonságai alapján a szövetspecifikus gének promotereire hasonlít (146) (9. ábra).



9. ábra: ***Az egér GAD67 többszörös promoter-rendszere.*** Felül a gén 5' végi régióját ábrázoltuk az 1. és a 2. exonnal. Eltérő szürke árnyalattal jelöltük a **P1**, **P2** és **P3** promoterhez tartozó különböző méretű első exonokat. **NRE-** a DBH gén 5' végén azonosított negatív regulációs elemmel homológ DNS motívum. Alul található a promoter régó kinagyított képe a három RNS-szintézis kezdőponttal. A legközelebbi és leggyakrabban használt **P1** promoter egy ún. "house keeping" promoter 3 ***SP1*** kötőhellyel (GC box). A két távolabbi ritkábban használt **P2** és **P3** viszont a **TATA** és **CAAT** elemekkel szövetspecifikus promoterre emlékeztet. **NRSE**- "neuron restrictive silencer" elem. A P1 promotert az 1. exont és intront, valamint a 2. exon is magába foglaló CpG szigetet az ábra alján jelöltük ki.

Megállapíthatjuk, hogy az egér GAD67 gén felnőtt agyban való átírásában legalább három egymáshoz közel elhelyezkedő funkcionálisan két eltérő osztályba tartozó promoter vesz részt (ún. "housekeeping" és szövetspecifikus). További promoterek léte sem kizárt, mivel a GAD67 génről átíródó, a fő 3.5 kb felnőtt GAD67 mRNS-től eltérő méretű transzkriptumokat is azonosítottunk (nem bemutatott adat).

Több promoterrel rendelkező gének esetében azok eltérő időbeni és térbeli használata hozzájárulhat az adott gén működésének komplex szövet- és fejlődés-specifikus szabályozásához. Több promoter szelektív működése révén ugyanazon géntermék különböző szövetekben és sejttípusokban, illetve fejlődési stádiumokban eltérő módon regulálódhat. A többszörös promoter használatával legtöbbször alternatív "splicing" is együtt jár. Ennek következtében a különböző promoterekről átíródó transzkriptumoknak eltérő lesz az 5' exonja, vagyis az 5' nem-transzlálódó régiója. Ez befolyásolhatja a stabilitásukat és a transzláció hatásfokát is. Abban az esetben, ha a transzlációs startszignál

az eltérő 5' exonban található, akkor a képződő fehérjék aminoterminálisa is különböző lesz. Tehát a többszörös promoterhasználattal járó alternatív "splicing" következtében egy génről funkcionálisan kisfokban eltérő fehérjék is képződhetnek. Ezzel térben és időben megnövekszik az adott gének kódolókapacitása (147,148).

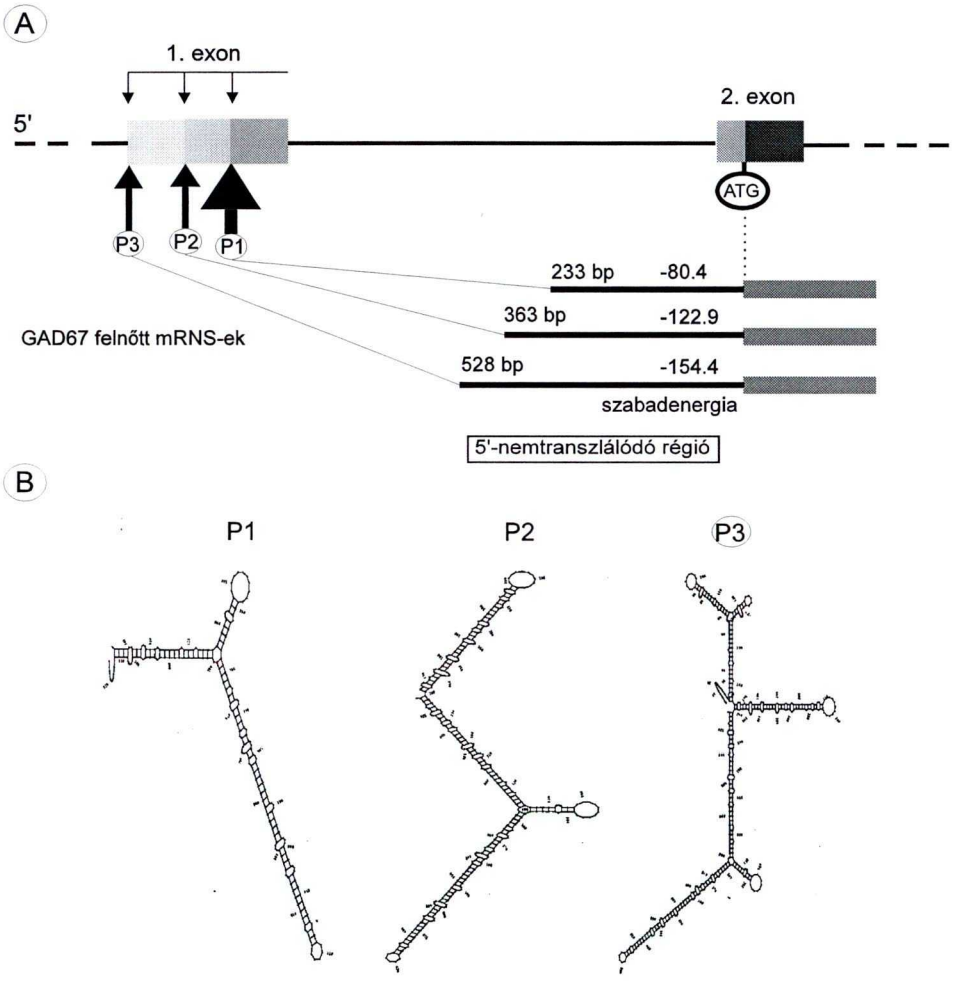
Sok idegrendszer-specfikus gén többszörös promoterrel rendelkezik: különösen azok, amelyek az agyon belül különböző régiókban és idegsejt-típusokban, valamint az idegrendszeren kívül is kifejeződnek (pl. aromás aminósav dekarboxiláz[AAD]-149; növekedési hormon felszabadító hormon [GHRH]-150; disztorfin -151; növekedéssel asszociált fehérje [B-50/GAP-43]-152; kolin acetiltranszferáz [ChAT]-153; és az agyi neurotrofikus faktor [BDNF]-154 génje). Ugyanazon gén esetében az eltérő promoterhasználat következtében különböző regulációs mechanizmusok érvényesülhetnek az idegrendszerben és egyéb szövetekben, valamint a különböző agyterületeken és a fejlődés egyes stádiumaiban.

Az egyik legjobban jellemzett többszörös promoter-rendszerrel rendelkező idegrendszer specifikus gén a BDNF. A négy promoteréről kapcsolt alternatív "splicing"-gal és poli(A) addiciós hely használattal összesen 8 különböző 5' nem-transzlálódó régióval rendelkező mRNS íródik át. Ezek a transzkriptumok nemcsak eltérő módon expresszálódnak az idegrendszerben és a perifériás szövetekben (szív és tüdő), hanem az agyon belül is különböző megoszlást mutatnak. Sőt a promoterek eltérő módon aktiválódnak az idegi impulzusok hatására és a fejlődés különböző fázisaiban is (154,155,156).

A GABA-szintetizáló enzimet, a glutaminsav dekarboxiláz 67 kDa formáját kódoló gén az idegrendszeren kívül számos perifériás szövetben, többek között a hasnyálmirigyben, a herében és a petevezetőben is kifejeződik (54,90). Az agyon belül szinte valamennyi régióban megtalálható, az idegsejtek mintegy 20-30%-át kitevő GABAerg neuronokban expresszálódik. A felnőtt agyban a GAD67 gén transzkripciója transz-szinaptikus kontroll alatt is áll, vagyis a szinapszisokon keresztül közvetített idegi impulzusok befolyásolják a génről átírt mRNS és ezen keresztül a róla képződő enzim mennyiségét is (67,68,69). Mint ahogy az előző fejezetben leírtuk: a fejlődés alatt pedig alternatív "splicing" segítségével a GAD67 gén rövidített fehérjéket is kódol. A GAD67 gén ezen igen komplex szövet- és fejlődés- specifikus, valamint aktivitásfüggő regulációjában a többszörös promoter-rendszere feltehetően fontos szerepet játszik.

Idáig három egymáshoz szokatlanul közel elhelyezkedő és eltérő gyakorisággal használt promotert azonosítottunk. De eltérő méretű és kis gyakoriságú GAD67 transzkriptumok

ismeretében még további promoterek léte is feltételezhető. Az összetett promoter-régióban nem találhatók intronok. Ezért az egyes promoterek használata nem jár együtt alternatív "splicing"-gal, tehát a róluk átíródó GAD67 mRNS-ek csak az 5' nem-transzlálódó régióik hosszában különböznek. Már a **P1** promoterről átíródó mRNS 5' nem-transzlálódó régiójának is erőteljes másodlagos szerkezete van, ami még kifejezettebb a **P2** és a **P3** promoterekről képződő hosszabb mRNS-ek esetében. Ez önmagában is hatással lehet a három promoterről átíródó mRNS-ek transzlációjának hatásfokára. Az ilyen típusú többszörös promoter az eukarioták között meglehetősen ritka (10. ábra).



10. ábra: ***A P1, P2 és P3 promoterről átíródó GAD67 transzkriptumok 5' végi nem-transzlálódó régiójának szerkezete.*** **A)** Legfelül a GAD67 gén első és második exonját tartalmazó 5' régióját tüntettük fel. Eltérő színárnyalattal érzékeltettük a **P1**, **P2** és **P3** promoterekről induló transzkripciónak megfelelő különböző hosszúságú 1. exont. A 2. exonon ATG-vel jelöltük a transzlációs kezdőpontot. Alatta a három promoterről képződő mRNS-ek eltérő hosszúságú 5'nem-transzlálódó régióit a hozzájuk tartozó szabadenergia értékekkel együtt tüntettük fel. **B)** A promoter-specifikus GAD67 mRNS-ek 5' nem-transzlálódó régiójának másodlagos szerkezete. A szerkezetmeghatározáshoz a UNIX operációs rendszerben futó GCG Wisconsin Szekvencia Analizáló Csomagjának ***FOLDRNA*** programját használtuk.

A sokkal ritkább **P2** és **P3** specifikus transzkriptumokat valószínüleg a mennyiségi korlátok és a kis méretbeli különbség miatt (130 és 295 bp) nem sikerült elválasztanunk a **P1** promoterről átíródó legnagyobb mennyiségű 3.5 kb GAD67 mRNS-től. De a távolabbi promoter(ek)ről a kevésbé gyakori hosszabb transzkriptumok létezést az is bizonyítja, hogy macska látókéregből sikerült a fő GAD67 mRNS-en kívül egy attól 200 bp-ral hosszabb minor transzkriptumot is kimutatni (157).

A humán GAD67 gén esetében úgy tűnik, hogy a P2 promoter az embrionális korban aktív és nagy valószínüség szerint nem működik felnőtt cerebellumban, a P3 promoter pedig teljesen hiányzik (158). Az egér esetében még nincsnek arra vonatkozó adataink, hogy a távolabbi két promoter valamelyike kitüntetetten aktív lenne a fejlődő idegrendszerben.

Mindenesetre az feltételezhető, hogy a két eltérő funkcionális csoportba tartozó három GAD67 promoteren keresztül különböző regulációs mechanizmusok érvényesülhetnek az idegrendszerben és a perifériás szövetekben, az agy különböző típusú GABAerg neuronjaiban és régióiban, valamint a fejlődés alatt és a neuronális aktivitást követően. De ennek bizonyítása további kísérleteket igényel.

5.4.2. A GAD67 gén szabályozásában esetlegesen szerepet játszó potenciális transzkripciós faktor kötőhelyek azonosítása

A GAD67 gén mintegy 1.5 kb-nyi 5' régiójában az általános promoterelemeken kívül számos potenciális transzkripciós faktor kötőhelyét azonosítottuk. Ezek közül azokat emeljük ki, amelyeknek esetlegesen szerepe lehet a gén szövet- és fejlődés-specifikus, valamint idegi aktivitásfüggő szabályozásában. A teljes régióban talált nyolc ***AP2*** kötőhely egyike-másika részt vehet a cAMP hatásának közvetítésében (159), mivel az ismert, hogy szövettenyészetben a cAMP befolyásolja a GAD67 gén expresszióját (160) (**4: 3. ábra**). A **P1** promoter régióban a **TGCCCCGC** és a **CGCCCCGC** szekvencia ***egr/krox*** transzkripciós faktor kötőhelyeknek felel meg. Az utóbbi két ***AP2***- és egy ***SP1***- kötőhellyel is átfed (**4: 3. ábra**). Az ***egr/krox*** transzkripciós faktorok a közvetlen korai gének családjába tartoznak. Az idegrendszerben a család néhány tagja a szinaptikus aktivitás és a génműködés szabályozás közötti láncszem szerepét tölti be, míg más tagjai pedig a neuronális fejlődés irányításában vesznek részt (161). Feltételezhető, hogy a GAD67 gén transz-szinaptikus regulációja, amely az mRNS szint idegi impulzustól függő változásáért felelős, az ***egr1*** kötőhelyen keresztül valósul meg. Ezt az teszi valószínűvé, hogy egyrészt

a ***zif268/egr1*** transzkripciós faktor expressziója idegi aktivitás függő, másrészt számos idegrendszer-specifikus gén promoterében a DNS kötőhelye megtalálható. Ide tartoznak a szinapszin I , szinapszin II, szinaptofizin és a szinaptobrevin szinaptikus fehérjéket kódoló gének (162), valamint a BDNF, ChAT, AChE (acetilkolin észteráz) és a neurofilament gén (163,164,165,166). A szinapszin I és AChE gének esetében bizonyított, hogy aktivitásukat részlegesen a ***zif268/egr1*** transzkripciós faktor szabályozza (162,164).

Az összetett promoter régiótól 5' irányban mintegy 500 bp-nyira egy az ***NF-kB*** elsődleges transzkripciós faktornak megfelelő potenciális kötőhelyet azonosítottunk (**GGGACTTCAC**-10/9 azonos) (**4: 3. ábra**). Ezen faktor kiemelt szereppel bír a citoplazma és sejtmag közötti jelátviteli folyamatok szabályozásában. Az ***NF-κB*** indukálható formája változatos sejtenkívüli szignálokat köt össze a génaktiválással (167).

Az ***NF-κB*** konstitutív és indukálható formája is megtalálható az idegsejtekben. Sőt az indukálható ***NF-κB*** az egyetlen transzkripciós faktor, amelyet sikerült a szinaptikus végződésekben is kimutatni. Ezért elméletileg ez a transzkripciós faktor képes lenne mind preszinaptikus, mind pedig posztszinaptikus szignálokat is a sejtmagba közvetíteni (168,169). Mostanáig azonban csak néhány idegrendszer-specifikus gén promoter régiójában sikerült ***NF-κB*** kötőhelyet kimutatni. Ide tartozik az AAD, a proenkefalin és az egér GAD67 gén (170,171).

Az összetett promoter régióban két további esetlegesen funkcionális jelentőséggel bíró DNS cisz regulációs elemet azonosítottunk. Az egyik egy **HLH** (helix-loop-helix) domént tartalmazó transzkripciós faktor kötőhely (E-box: **ANNTG**) (172) (**4: 3. ábra**). Az **HLH** transzkripciós faktor család számos tagja mint például a ***HES-1,-2,-3-4,-5***; ***MES-1,-2***; ***Nscl-1,-2*** az embrionális idegrendszerben kitüntetetten expresszálódik és annak fejlődését szabályozza még ismeretlen célgéneken keresztül (173,174,175). A másik pedig két **ATTA** motívumot tartalmazó potenciális ***Hox*** kötőhely (**4: 3. ábra**). A ***Hox*** a homeoboxot tartalmazó transzkripciós faktorok családjába tartozik és kiemelt jelentőséggel bír az embrionális fejlődésben a testtájak és ezen belül is a központi idegrendszer különböző régióinak a kialakulásában (176). A ***Hox*** gének közül néhány a felnőtt központi idegrendszerben is kifejeződik és ott az idegrendszer működésében fontos gének régióspecifikus működését szabályozhatja. Például a ***Hox 1.3*** a kisagy Purkinje sejtjeiben, a "hippocampus" piramidális- és szemcse- sejtjeiben valamint a gerincvelő motoneuronjaiban is kifejeződik (177). Célgénjei közé tartozhatnak az idegsejt adhéziós

molekulákat (L1; és NCAM) valamint az amiloid prekurzor fehérjét kódóló gének (178,179,180). Az utóbbi két transzkripciós faktor hozzájárulhat mind a fejlődő, mind pedig a felnőtt idegrendszerben a GAD67 gén régióspecifikus szabályozásához is.

5.4.3. Idegrendszer-specifikus cisz DNS elemek az egér GAD67 gén 5' régiójában

A hallatlanul komplex és specializált funkciója miatt, más szövetekkel összehasonlítva az idegrendszerben található a legnagyobb számú és a legtöbb féle sejt. Az idegrendszer ezen nagyfokú strukturális és funkcionális komplexitásának fenntartásához igen sok gén szelektív és összehangolt működése szükséges. Ezt meglehetősen összetett génregulációs mechanizmusok biztosítják.

Általánosságban a szövetspecifikus génműködésre az jellemző, hogy a specificitást főleg az alap-promoterre ható pozitív regulációs elemek biztosítják. A negatív elemek ha szerepet játszanak, akkor főként ezt finomítják tovább.

Ezzel szemben az idegrendszerben a szövetspecifikus promotereken és "enhancer"-eken kívül a negatív regulációs mechanizmusok is kitüntetett jelentőséggel bírnak az ún. általános "agyspecifikus" és azon belül is a régió- illetve idegsejt-típusspecifikus expesszió szabályozásában. Az utóbbi időben azonosítottak egy ilyen neuronális negatív kulcs-szabályozó fehérjét az ún. **neuron-restriktív "silencer" faktort** (***NRSF***) (181), illetve az ezzel analóg "silencer" fehérjét (***REST***) (182). Ez a fehérjefaktor gyakorlatilag valamennyi nem-idegi eredetű szövetben megtalálható és a neki megfelelő cisz DNS elemekhez kapcsolódva megakadályozza azt, hogy az idegrendszer-specifikus gének az idegrendszeren kívül is kifejeződjenek. Ezt a negatív DNS regulációs elemet ("silencert") először a kettes típusú Na^+ csatorna és az SCG10 (a fejlődő idegsejtek végződéseiben felhalmozódó membránhoz kötődő fehérje) gének esetében írták le (183,184). Majd később ennek segítségével azonosították a hozzájuk kapcsolódó fehérjét. Az ***NRSF/REST*** teljes mértékben biztosítja a fenti két gén idegrendszer-specificitását. Azonban egyre növekszik az olyan "pan-neuronális" (minden idegsejtben kifejeződő) illetve idegsejttípus-specificitást mutató gének száma, amelyek regulációs régiójában megtalálható a neuron-restriktív "silencer" elem: **NRSE**. Ide tartozik többek között a szinapszin I, a BDNF, DBH, NMDA és AMPA glutamát receptor, nikotinerg és muszkarinerg ACh receptor, glicin receptor, proenkefalin, és a ChAT gén. (185). Ezek közül számos esetben kimutatták a faktorkötést és a gátló hatást a génexpresszióra. De jónéhány gén esetében kiderült, hogy

az ***NRSF*** önmagában nem elégséges az idegrendszer-specificitás és ezen belül is a régió-specificitás biztosításához. Bizonyítottan ebbe a csoportba tartozik a szinapszin I, a BDNF és a DBH gén. Minden esetben a "kulcs" negatív regulátoron kívül további pozitív és negatív regulációs elemek bonyolult együttműködése is szükséges a teljes idegi szövetspecificitás biztosításához (162,154,186). Egyre több adat támasztja alá azt, hogy az idegrendszerben ez a legáltalánosabb génregulációs mechanizmus.

Az egér GAD67 gén promoter régiójában is kimutattunk néhány, az idegrendszer-specifikus génekre jellemző közös regulációs elemet. Ezek közül a legfontosabb a **P1** promoter közelében azonosított potenciális **NRSE**. A **CAGGTCCGCGGACGAGCTGCC** szekvencia motívum 82% azonosságot mutat a konszenzussal. A szekvencia hasonlóság azonban nem csupán a **neuron-restriktív "silencer" elemre** korlátozódik, hanem az azt körülvevő mintegy 40 bp-nyi szekvencia is legalább 70% azonosságot mutat az SCG10 és szinpszin I megfelelő régiójával (141,135) (**4: 4. ábra**). Sőt az **NRSE** átfed egy ***egr1*** kötőhellyel is ugyanúgy mint a szinapszin I gén esetében is. Ez arra utal, hogy a két regulációs faktor kölcsönhatásba is léphet egymással.

Ezenkívül egy további "silencert", az **NRE**-t azonosítottuk az összetett promotertől 5' irányban (**4: 4. ábra**). Ezt a számos más “silencer”-rel homológiát mutató, és bizonyítottan negatív regulációs elemet a patkány DBH gén esetében írták le. Az **NRE** a DBH gén adrenerg- valamint noradrenerg- neuron specifikus működésében játszik szerepet és annyiban tér el az **NRSE**-től, hogy az idegi erdetű szövetekben is kötődik hozzá fehérje (186).

A két további elem (**SNN és CCAGGAG**), amit a GAD67 5' régiójában azonosítottunk, ugyan jónéhány neuronális génben előfordul, de funkcionális jelentősége egyáltalán nem ismert (141,135,187) (**4: 4. ábra**).

Úgy véljük, hogy az öszetett promoter-régióban azonosított transzkripciós faktor kötőhelyek némelyikének és a negatív neuronális regulációs elemeknek feltétlenül szerepük lehet a GAD67 gén szövet és fejlődés-specifikus szabályozásában. De meg vagyunk arról is győződve, hogy az agyi GABAerg-neuron-specifikus expresszióhoz további, a gén 5' végén távolabb elhelyezkedő többszörös pozitív és negatív regulációs elemek is szükségesek.

Erre utalnak azon transzgenikus egér kísérleteink is, amelyekben a GAD67 gén egyre hosszabb 5' régióját a bakteriális β-galaktozidáz génhez kötöttük. A transzgén expresszióját az agyban nyomonkövetve megállapítottuk, hogy az összetett promoter-régió

felelős a gén idegrendszer-specificitásáért és az itt található silencerek nagyon nagy mértékben gátolják a gén működését. De a konstrukciók hosszát növelve egyre több agyi régióban találtunk transzgén expressziót a GABAerg neuronokban. Ez azt bizonyítja, hogy ténylegesen a gén 5' végén távolabb elhelyezkedő többszörös pozitív és valószínüleg negatív elemek is szükségesek az agyi régió- és GABAerg neuron- specifikus expresszióért. Ezek az "enhancerek" feltehetően úgy működnek, hogy a neuron-specifikus "silencer"-ek gátló hatását régióspecifikus módon felfüggesztik. (A transzgenikus egérben végzett génregulációs vizsgálatainkat azért nem ismertettem részletesebben, mivel azok nem képezik a értekezés tárgyát.)

6. A FŐBB ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Ezen PhD disszertáció alapját képező kísérletes munka a Princetoni Egyetem Biológiai Intézetében és a Roche Molekuláris Biológiai Intézetében Dr. Ralph Greenspan laboratóriumában megkezdett és az *MTA SZBK Biokémiai Intézete Neurogentikai Csoportjában* folytatott kutatások részét képezi. A csoport az idegrendszer egy igen fontos részének, GABAerg-rendszernek a fejlődését és működését meghatározó komplex molekuláris mechanizmusokat tanulmányozza. Ezen belül is a GABA-szintetizáló enzimrendszer ezen folyamatokban betöltött szerepét vizsgálja molekuláris biológiai és genetikai, valamint korszerű neurobiológiai módszerek ötvözésével.

Az értekezés konkrétan az egér glutaminsav dekarboxiláz 67 KDa formáját kódoló gén szövet- és fejlődés- specifikus működésének tanulmányozás során végzett molekuláris biológiai vizsgálataink egy részét ismertette.

Főbb eredményeinket a következő pontokban foglalhatjuk össze:

- Közvetlenül az első gutaminsav dekarboxilázt kódoló cDNS klónozását követően izoláltunk egy egér GAD cDNS-t és meghatároztuk a teljes nukleotidsorrendjét. Először bizonyítottuk be, hogy a GAD cDNS-ek nyitott leolvasási keretének az első ATG kodonja ténylegesen megfelel a GAD fehérje kezdő metioninjának. Az elsők között vetettük fel azt, hogy a glutaminsav dekarboxiláznak két önálló formája létezik, az addig feltételezett eggyel szemben. Továbbá azt is igazoltuk, hogy az általunk egérből és a más laboratóriumokban egyéb fajokból is klónozott GAD a glutaminsav dekarboxiláz nagyobb molekulatömegű 67 kDa formájának felel meg.
- Elsőként állítottunk elő ellenanyagot rekombináns GAD fehérjével szemben. Ezt a nyúlban termelt poliklonális GAD ellenanyagot számos laboratóriumban használták a GABAerg rendszer vizsgálatára.
- Izoláltuk a teljes egér GAD67 gént tartalmazó, mintegy 70 kb-nyi genomiális régiót és egy GAD67 pszeudogént is azonosítottunk. Mindkettőnek meghatároztuk a kromoszómális helyzetét. A GAD 67 kDa izoformáját kódoló gén (***Gad-1***) a 2. kromoszómán található a humánnal homológ régióban. A pszeudogén (**Gad-2**) pedig a 10. kromoszómán lokalizálódik. (Itt jegyezném meg hogy mi közöltük le elsőként egy GAD gén kromoszómális térképhelyzetét.)
- Meghatároztuk az egér GAD67 gén teljes szerkezetét és az exon-intron határok pontos szekvenciáját, valamint a pszeudogén teljes nukleotidsorrendjét is. Megállapítottuk,

hogy az egér GAD67 szerkezete teljesen megegyezik a humánnal, amelyik a másik ismert GAD67 gén.

- Dr. Gottlieb laboratóriumával párhuzamosan azonosítottunk 2 olyan embrionális GAD67 transzkriptumot, amelyek egy inszerciót hordoznak a kódoló régióikban. Megállapítottuk, hogy az inszercióknak megfelelő exonpár (exon 7A-80 bp és 7B-86 bp) kizárólag az embrionáis korban használódik és hiányzik a 67 kDa GAD-ot kódoló mRNS-ből. Dr. Gottlieb csak a GAD67 mRNS fő leolvasási keretében található STOP szignált azonosította az embrionális exonokban. Ezért azt feltételezte, hogy ezen inszerciókat tartalmazó mindkét mRNS a GAD aminoterminálisának megfelelő rövidített fehérjét kódolná. De ezen 25 kDa GAD létét nem bizonyították és az embrionális mRNS-ek teljes kódoló régióját sem azonosították. Ezzel szemben mi meghatároztuk az embrionális exonpárt (7/A vagy 7/B) tartalmazó GAD transzkriptumok teljes kódoló régiójának szekvenciáját, ami az inszerciót leszámítva teljesen megegyezik a GAD67 mRNS nyitott leolvasási keretével. Továbbá azt is megállapítottuk, hogy ezen exonpárban található transzlációs STOP szignál átfed egy START szignállal. Ez utóbbi a 80 bp inszerciót tartalmazó transzkriptum esetében ugyanolyan leolvasási keretbe kerül mint a fehérje további része. Ennek következtében ez az embrionális GAD mRNS bifunkcionálissá válik, vagyis két önálló, de átfedő fehérjekódoló cisztront tartalmaz. Erről a funkcionálisan is bicisztronos mRNS-ről a 67 kDa GAD két részletben, egy 25 kDa "leader" és egy 44 kDa GAD formájában szintetizálódik. Az előbbi megfelel a 67 kDa GAD N-terminális regulációs doménjének, az utóbbi pedig a rövidített, enzimaktivitással is rendelkező GAD-nak.

  Ez az irodalomban leírt első valódi, emlős bifunkcionális mRNS, amely egy fehérjét két különálló darabban kódol.

  A 7/B exont tartalmazó embrionális GAD mRNS viszont csak szerkezetét tekintve bicisztronos, mivel a 86 bp inszerció 3' végén egy további STOP kodon található, ami megakadályozza a 44 kDa GAD képződését.

- A 25 kDa GAD és a 44 kDa GAD embrionális exon által kódolt régióival szemben specifikus poliklonális antipeptid ellenanyagot állítottunk elő.

  Bebizonyítottuk, hogy a bicisztronos embrionális GAD mRNS-ek mind in vitro, mind pedig in vivo is képesek a szerkezetük által meghatározott fehérjéket szintetizálni. A rövidített GAD fehérjék létezését sikerült egér embrióban is kimutatnunk (25 kDa- az embrióban 31-32 kDa, 44 kDa).

- Vizsgálataink az mutatták, a hogy különböző embrionális és felnőtt GAD formákat kódoló transzkriptumokat eredményező alternatív "splicing" az embrionális fejlődés során szigorúan szabályozott. Először csak a 7/B exont tartalmazó mRNS és a neki megfelő 25 kDa "leader jelenik meg. Ezt követi a 7/A exont tartalmazó mRNS és az általa kódolt 44 kDa GAD is. Az idegi differenciálódás és a szinaptogenezis előrehaladtával az embrionális formák szintézise fokozatosan csökken, a teljes hosszúságú GAD67 mRNS és fehérje mennyisége pedig nő. Ezen megfigyeléseink alapján azt a hipotézist állíthatjuk fel, hogy a rövidített GAD67 formáknak szerepük lehet az idegi differenciáció szabályozásában. A rövidített 44 kDa GAD feltehetően azon GABA-készletet szintetizálja, amely a neuronális fejlődés alatt inkább morfogénként/neurotrofikus faktorként funkcionál. A gátló neurotranszmitter GABA-t pedig a teljes hossszúságú forma szintetizálná.
- Meghatároztuk az egér GAD67 mRNS-ek szintézisének a kezdőpontjait és elsőként azonosítottuk a hozzájuk tartozó 3 közel elhelyezkedő promotert. Ezek közül a leggyakrabban használt **P1** egy "housekeeping" típusú promoter, mivel róla a transzkripció több pontban kezdődik, az alap promoterelemek helyett ***SP1*** kötőhelyeket tartalmaz és egy CpG szigetben helyezkedik el. Ezzel szemben a távolabb elhelyezkedő kevésbé használt **P2** és **P3** promoter pedig szövetspecifikusnak tűnik, mert a transzkripciós starthelytől megfelelő távolságban TATA és CAAT elemeket azonosítottunk. Megállapítottuk, hogy a többszörös promoter használat nem jár együtt alternatív "splicing"-gal, ezért a három promoterről átíródó mRNS-ek csak az 5' nem-transzlálódó régiójuk hosszában különböznek egymástól. Ezen összetett promoter eltérő használata szerepet játszhat a GAD67 gén komplex fejlődés- és szövet-specifikus, valamint idegi impulzus-függő szabályozásában is.
- A promoterelemeken kívül az egér GAD67 5' végén az általunk meghatározott 1.3 kb-nyi szekvencia ismeretében számos transzkripciós faktor kötőhelyet (***AP2, E-box, Hox, egr és NF-κB***) és az idegrendszer-specifikus génekben előforduló közös regulációs elemet azonosítottunk (**NRSE, NRE, SNN, CCAGGAG** elem). Ezek közül az ***egr*** és ***NF-kB*** faktoroknak feltehetően a GAD67 gén neuronális aktivitás függő szabályozásában lehet szerepe. A **neuron-restriktív "silencer"** elem (**NRSE**), mint a neuronális gének fő negatív regulátora, valamint az **NRE** "silencer" pedig a gén idegrendszer-specifikus működésében játszhat fontos szerpet.

A PhD tézisben ismertetett kísérleti eredményeink hozzájárultak ahhoz, hogy jobban megértsük a GABA-szintetizáló enzimek különböző formáinak szerepét az idegi folyamatok és differenciáció szabályozásában. Az általunk izolált és jellemzett GAD67 gén és annak regulációs elemei pedig alkalmas eszköznek bizonyulhatnak a GABAerg rendszer célzott módosítására annak érdekében, hogy működését jobban megértsük.

7. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ

GABA (γ–aminobutitric acid) is the principal inhibitory neurotransmitter in the vertebrate nervous system utilized by 20-30% of all central nervous system neurons found virtually in all brain regions. In accordance with their functional diversity, GABAergic neurons form a heterogeneous population in terms of morphology and synaptic connectivity, as well as neurochemical and electrophysiological properties.

During the past few years, it has become clear that GABA also plays a role in the regulation of neuronal development, and serves more diverse signaling functions in many nonneuronal tissues.

The rate limiting step in GABA biosynthesis, the decarboxylation of L-glutamic acid, is catalyzed by the enzyme glutamic acid decarboxylase (GAD). Hence GAD plays a primary role in regulating the production of GABA needed for inhibitory synaptic transmission as well as for other developmental and signaling functions.

In mammals the GABA synthetic enzyme is heterogeneous, both structurally and functionally. There are two molecular forms of glutamic acid decarboxylase, GAD65 and GAD67, encoded by two distinct genes. They are 70% similar with a substantially different amino terminal region of 100 amino acids. The two GADs differ in their interactions with the cofactor pyridoxal phosphate as well as their intracellular distributions. GAD65 and GAD67 virtually colocalize in all GABAergic neurons, although at a significantly different level, which suggests that they may have distinct functions in establishing the GABA pools utilized by different GABAergic neurons.

In producing GABA, the two GADs are regulated by different mechanisms. GAD65 is mainly controlled at the level of enzyme activity through its interaction with the cofactor. In addition, the expression of GAD67 is also regulated at protein level by intracellular GABA through a feedback mechanism, as well as at the level of transcription through synaptic input.

The mechanisms underlying the transcriptional control, an essential component of the regulation of GABA synthesis, as well as the developmental and tissue specific expression of the GAD genes is largely unknown. Therefore we undertook the cloning and structural analysis of the mouse GAD67 cDNA and the corresponding gene including its 5' regulatory region.

In this thesis the results are presented in four parts summarizing the cloning and molecular identification of the mouse GAD67 form, the cloning and structural analysis of the mouse GAD67 gene, the identification of the truncated embryonic GAD67 protein forms generated by developmentally regulated alternative splicing, as well as the characterization of the multiple promoter region of the mouse GAD67 gene.

1) Using the feline GAD cDNA as a probe, we have cloned and sequenced a mouse GAD cDNA. Its initiation codon has also be determined, thus it was the first GAD for which the entire coding sequence has been established. We were the first to identify the brain protein encoded by the putative GAD cDNA, which turned out to be the higher molecular weight form of the enzyme previously identified by different anti-GAD antibodies. Our data strongly supported the existence of two related but distinct molecular forms of glutamic acid decarboxylase in brain, GAD65 and GAD67, which differ by amino acid sequence and not by post-translational modification. Later it has been verified by cloning the cDNA that codes for the 65 kDa form of GAD. The first anti-GAD antibody against recombinant GAD was also raised in our laboratory.

2) We have isolated the murine gene encoding the 67 kDa form of glutamic acid decarboxylase (GAD67) and its processed pseudogene. Their chromosomal locations have also been determined for the first time. In mouse the GAD67 gene is on chromosome two, in the region of conserved syntheny with human chromosome 2 (***Gad 1*** locus) pointing to the evolutionary conservation of the locus. The ***Gad 1*** locus is found in a close proximity to several neurologic loci. However, further fine mapping studies are needed to uncover the interactions between these loci.The ***Gad 1-ps*** locus that corresponds to GAD67 pseudogene is mapped to chromosome 10. This pseudogene is probably a result of a recent integration event, since it is not present in the rat genome.

We also determined the complete structure of the mouse GAD67 gene. Its coding region comprises 18 exons spanning 42 kb genomic DNA. Exon 1 together with 64 bp of exon two defines the 5' untranslated region of GAD67 mRNA. Exon 18 specifies the protein's carboxyl terminal and the entire 3' untranslated region. Exons 7/A and 7/B are not contained in the mRNA that codes for the 67 kDa GAD. Eight of the exons are symmetrical, flanked by introns of the same phase class; thus in theory they can be subject to alternative splicing producing different forms of GAD67.

3) We have cloned two alternatively spliced GAD mRNAs that exclusively contain exon 7/A or exon 7/B and were more abundant in embryo. The overlapping stop-start codon

TGATG, found in the embryonic exons converts the monocistronic adult-type transcript into a bicistronic one, coding for a 25 kDa leader peptide and a 44 kDa enzymatically active truncated GAD. A second stop codon at the 3' end of exon 7/B abolishes the expression of GAD44. We were the first to describe the unique bicistronic structure of these embryonic GAD mRNAs and to identify their protein products both in vitro and in mouse embryos. We have verified that the truncated form of GAD (GAD44) encoded by the second open reading frame of the bicistronic GAD mRNA (I-80) is enzymatically active. We have also postulated that during neuronal differentiation in the absence of GABAergic synapses, GAD44 may be responsible for the synthesis of "morphogenic" GABA.

4) To analyze the 5' regulatory region of the mouse GAD67 gene, we first determined the transcription initiation sites. Sequence analysis of the 5' flanking region reveals putative promoters in the vicinity of all three groups of RNA synthesis start sites. The region upstream of the major multiple initiation sites is enriched in GC, lacks the basic prompter elements TATA and CAAT but contains multiple binding sites for the transcription factor binding site, *Sp1*. This P1 promoter is located within a large CpG island and resembles those of constitutively expressed housekeeping genes. The two additional promoters that correspond to the minor initiation sites posses both TATA and CAAT boxes. Thus the less frequently utilized P2 and P3 promoters, respectively, share the characteristic features of those used by tissue specific genes. We have yet to determine whether the three closely spaced promoters of two different classes are preferentially used in region-specific and/or developmental specific manner similar to other neuronal genes.

In the 5' upstream region, we identified several putative transcription factor binding sites such as AP2, Hox, E-box, egr1, NF-κB and putative neuronal-specific regulatory elements, including the neuronal-restrictive silencer element, which may have functional significance in the developmental and tissue-specific expression of the GAD67 gene.

The availability of the detailed structure of the mouse GAD67 gene and its regulatory region will allow us to study the complex regulatory mechanisms involved in its tissue- and developmental-specific as well as neuronal activity dependent regulation.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Roberts, E. (1986) GABA: The road to neurotransmitter status. in *Benzodiazepine/GABA receptors and chloride channels: structural and functional properties*. (Olsen, R. W. and Venter, C. J. eds.), pp. 1-39. Alan R. Liss, Inc., New York.

2. Kuffler, S., and Edwards, C. (1958) Mechanism of gamma aminobutiric acid (GABA) action and its relation to synaptic inhibition. *J. Neurophysiol.* 21, 589-610.

3. Kravitz, E. A., and Potter, D.D. (1965) A further study of the distribution of gamma-aminobutirc acid in lobster excitatory and inhibitory axons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 54, 778-782.

4. Otsuka, J., Iversen, L.L., Hall, Z.W., and Kravitz, E. A. (1966) Release of gamma-aminobutiric acid from inhibitory nerves of lobster. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 56, 1110-1115.

5. Mugnaini, E. and Oertel, W. (1985). An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunohistochemistry. in Handbook of chemical neuroanatomy, Vol. 4. GABA and neurupeptides in the CNS, part I (Bjorklund A. and Hökfelt T., eds), pp. 436-608. Elsevier, Amsterdam.

6. Modi, I., De Koninck, Y., Otis, T.S., and Soltesz, I. (1994) Bridging the cleft at GABA synapses in the brain. *TINS* 17, 517-525.

7. Johnston, G.A.R. (1978) Neuropharmacology of amino acid inhibitory transmitters. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18, 269-289.

8. Lauder, J. M. 1987. Neurotransmitters as morphogenetic signals and trophic factors. in *Model systems of development and aging of the nervous system* (A. Vernedakis, ed.), pp. 219-237. Nijhoff Publishing, Boston.

9. Lauder, J.M., Han, V.K.M., Henderson, P., Verdoorn, T. and Towle, A.C. (1986) Prenatal ontogeny of the GABAergic system in the rat brain: an immunocytochemical study. *Neuroscience* 19, 465-493.

10. Taylor, J., Docherty, M., and Gordon-Weeks, P.R. (1990) GABAergic growth cones: release of endogenous γ- aminobutiric acid precedes the expression of synaptic vesicle antigenes. *J. Neurochem.* 54, 1589-1699.

11. Balcar, V. J., and Johnston, G.A.R. (1987) Ontogeny of GABAergic systems in the brain. in *Neurotrophic activity of GABA during development*. pp. 57-77. Alan Liss, Inc. New York.

12. Meiner, E,. Hertz, L., and Schousboe, A. (1991) Neurotransmitters as developmental signals. *Neurochem. Int.* 19, 1-15.

13. Van Eden, C.G. Mrzljak, L., Voorn, P., Uylings, H.B.M. (1989) Prenatal development of GABA-ergic neurons in the neocortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* 289, 213-227.

14. Balcar, V., Zetzsche, T. and Wolff, J. R. (1992) Glutamic decarboxylase in developing rat neocortex- does it correlate with the differentiation of GABAergic neurons and synapses? *Neurochem. Res.* 17, 253-260.

15. Fiszman, M., Behar, T., Lange, G.D., Smith, S.V., Novotny, E.A., Barker J.L. (1993) GABAergic cells and signals appear together in the early post-mitotic period of telencephalic and srtiatal development. *Dev. Brain. Res.* 73, 243-251.

16. Ma, W., Behar, T., Maric, D., Maric, I., and Barker, J.L. (1992) Neuroepithelial cells in the rat spinal cord express glutamate decarboxylase immunoreactivity in vivo and in vitro. *J. Comp. Neurol.* 325, 257-270.

17. Ma, W., Bahar, T., and Barker, J.L. (1992) Transient expression of GABA immunoreactivity in the developing rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 325, 271- 290.

18. Hansen, G.H., Maier, E., Abraham, J., and Schousboe, A. (1987) Tropic effects of GABA on cerebellar granule cells in culture. in *Neurotrophic activity of GABA during develpoment.* (Redburn DA, Schousboe A, eds), pp. 109-138. Liss Inc.,New York.

19. Warton, S., Perouansky, M., and Grantyn, R. (1990) Development of synaptic connections in vivo and in cultures from the superior colliciculus. *Dev. Brain Res.* 52, 95-111.

20. Behar, T.N., Schaffner, A.E., Colton, C.A., Somogyi, R., Olah, Z., Lehel, C., and Barker, J.L. (1994) GABA-induced chemokinesis and NGF-induced chemotaxins of embryonic spinal chord neurons. *J. Neurosci.* 14, 29-38.

21. Schwartz, E. A. (1987) Depolarization without calcium can release GABA from a retinal neuron. *Science* 238, 350-355.

22. Taylor, J. and Gordon-Weeks, P. R. (1991) Calcium-independent γ-aminobutyric acid release from growth cones:role of γ-aminobutyric acid transport. *J. Neurochem.* 56, 273-280.

23. Ma, W., Saunders, P. A., Somogyi, R., Poulter, M. O. and Barker, J. (1993) Ontogeny of $GABA_A$ receptor subunit mRNAs in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *J. Comp. Neurol.* 338:337-359.

24. Cherubini, E., Gaiarsa, J.L., and Ben-Ari, Y. (1991) GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *TINS* 14, 515-519.

25. Wolff, J.R., Joo, F., and Dames, W. (1978) Plasticity in dentrites shown by cotinuous GABA administration in superior cervical ganglion of adult rat. *Nature* 274, 72-74.

26. Gould, E., Woolley, C.S., Frankurt, M., and McEwen, B.S. (1990) Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *Neurosci.* 10, 1286-1291.

27. Párducz, A., Perez, J., and Gracia-Seguria, L.M. Estradiol induces plasticity of GABAergic synapses in the hypothalamus. (1993) *Neurosci.* 53, 395-401.

28. Erdő, S. and Wolff, J. (1990) Gamma-aminobutiric acid outside the mammalian brain. *J. Neurochem.* 54, 363-372.

29. Campbell, M.K., Mahler, H.R., Moore, W.J., and Tewari, S. (1966) Protein synthesis systems from rat brain. *Biochem.* 5, 1174-1184.

30. Kataoka, Y., Gutman, Y., Guodotti, A., Panula, P., Wroblewski, J., Cosenza-Murphy D., Wu, J.-Y., and Costa, E. (1984) Intrinsic GABAergic system of adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 3218-3222.

31. Harty, R. F. and Franklin, P. A. (1986) Cholinergic mediation of γ-aminobotiric acid-induced gastrin and somatostatin release from rat antrum. *Gastroenterology* 91, 1221-1226.

32. Párducz, A., Dobó, E., Wolff, J.R., Petrusz, P., and Erdö, S. (1992) GABA-immunoreactive structures in rat kidny. *J. Histochem. Cytochem.* 40, 675-680.

33. Erdő, S. L. (1986) GABAergic mechanisms and their possible role in the oviduct and uterus. *in GABAergic mechenisms in the mammalian periphery* (Erdő S. L. and Bowery N.G. eds), pp. 205-222. Raven Press, New York.

34. Okada, Y. (1986) Localization and function of GABA in the pancreatic islets. in GABAergic mechanisms in the mammalian periphery (Erdő S. L. Bowery N. G. eds), pp. 223-240. Ranen Press, New York.

35. Rorsman, P., Ashgroft, F.M. and Bergren, P.O. (1991) Regulation of glucagon release from pancreatic α-cells. *Biochem. Pharmacol.* 15, 1783-1790.

36. Baekkeskov, S., H. Jan-Aanstoot, S. Christgau, A. Reetz, M. Solimena, M. Cascalho, F. Folli, H. Richter-Olesen, and P. De-Camilli. (1990) Identification of the 64 kDa autoantigen in insulin-dependent diabetes as a GABA synthesizing enzyme glutamate decarboxylase. *Nature* 347, 151-156.

37. Erdő, S.L. and Wolff J. R. (1988) Releasable, non-neuronal GABA pool in rat stomach. *Eur. J. Pharmacol.* 156, 165-168.

38. Fujiwara, M., Muramatsu, I., and Shibata, S. (1975) γ-aminobutiric acid receptors on vascular smooth muscle of dog cerebral arteries. *Br. J. Pharmacol.* 55, 561-562.

39. Riesz, M. and Erdő, S. L. (1985) $GABA_B$ receptors in the rabbit uterus may mediate contractile responses. *Eur. J. Pharmacol.* 119, 119-204.

40. Barnard, E. A. (1988) Structural basis of the GABA-activated chloride channel: Molecular biology and molecular electrophysiology. in Chloride channels and their modulation by neurotransmitters and drugs. (Biggio B., and Costa E. eds), pp. 1-18. Raven Press, New York.

41. Verdoorn, T.A., Draguhn, A., Ymer, S., Seeburg, P. H., and Sakmann, B. (1990) Functional properties of recombinant rat $GABA_A$ receptors depend upon subunit composition. *Neuron* 4, 919-928.

42. Bowery, M. (1989) $GABA_B$ receptors and their significance in mammalian pharmacology. Trends Pharmacol. Sci. 10, 401-406.

43. Martin, D.L. (1987) Regulatory properties of brain glutamate decarboxylase. Cell Mol. Neurobiol. 7, 237-253.

44. Martin, D.L. and Rimvall, K. (1993) Regulation of γ-aminobutoric acid synthesis in the brain. *J. Neurochem.* 60, 395-407.

45. Legay, F., Pelhate, S., and Tappaz, M. (1986) Phylogenesis of brain glutamic acid decarboxylase from vertebrates: immunochemical studies. *J. Neurochem.* 46, 1478-1486.

46. Legay, F., Henry, S., and Tappaz, M. (1987) Evidence for two distinct forms of native glutamic acid decarboxylase in rat brain soluble extracts: an immunoblotting study. *J. Neurochem.* 48, 1022-1026.

47. Spink, D.C., Porter, T.G., Wu, S.J., and Martin, D.L. (1987) Kinetically different, multiple forms of glutamate decarboxylase in rat brain. *Brain. Res.* 421, 235-244.

48. Danner, L. A., and Wu, J-Y. (1985) Two forms of rat brain glutamic acid decarboxylase differ in their dependence on free pyridoxal phosphate. *J. Neurochem.* 44. 957-965.

49. Kaufman, D.L., McGinnis, J.F., Krieger, N.R., and Tobin, A.J. (1986) Brain glutamate decarboxylase cloned in λ–gt11: fusion protein produces γ -aminobutiric acid. *Science* 232, 1138-1140.

50. Kobayashi, Y., Kaufman, D.L., and Tobin, A.J. (1987) Glutamic acid decarboxylase cDNA: nucleotide sequence encoding an enzymatically active fusion protein. *J. Neurochem.* 7, 2768-2772.

51. Julien, J-F., Samama P., and Mallet J. (1990) Rat brain glutamic acid decarboxylase sequence deduced from a cloned cDNA. *J. Neurochem.* 54, 703-705.

52. Katarova, Z., Szabo, G., Mugnaini E., and Greenspan, R. J. (1990). Molecular identification of the 62 kd form of glutamic acid decarboxylase from the mouse. *Eur. J. Neurosci.* 2, 190-202.

53. Wyborsky, R.J., Bond, R.W., and Gottlieb, D.I. (1990) Characterization of a cDNA coding for rat glutamic acid decarboxylase. *Mol. Brain Res.* 8, 193-198.

54. Cram, D.S., Barnett, L.D., Joseph, J.L., and Harrison, L.C. (1991) Cloning and partial nucleic acid sequence of human glutamic acid decarboxylase cDNA from brain and pancreatic islets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 1239-1244.

55. Michelsen, B.K., Petersen, J.S., Boel, E., Moldrup, A., Dyrberg, T., and Madsen, O. D. (1991) Cloning, characterization, and autoimmune recognition of rat islet glutamic acid decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 8754-8758.

56. Bu, D.F., Erlander, M.G., Hitz, B.C., Tillakaratne, N.J.K., Kaufman, D.L., Wagner-McPherson, C.B., Evans, G.A., and Tobin, A.J. (1992) Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67 kDa GAD, are each encoded by a single gene. Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 2115-2119.

57. Erlander, M.G., Tillakarante, N.J.K., Feldblum, S., Patel N., and Tobin, A.J. (1991) Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. **Neuron** 7, 91-100.

58. Karlsen, A.E., Hagopian, W.A., Grubin, C.E., Dube, S., Disteche, C.M., Adler, D.A., Bärmeiner H., Mathewes, S., Grant, F.J., Foster, D., and Lernmark, A. (1991) Cloning and primary structure of a human islet isoform of glutamic acid decarboxylase from chromosome 10. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 8337-8341.

59. Brilliant, M.H., Szabo, G. Katarova, Z., Kozak, C.A., Gasler, T.M., Greenspan, R.J., and Hausman, D.E. (1990). Sequence homologous to glutamic acid decarboxylase cDNA are present on mouse chromosomes 2 and 10. *Genomics* 6, 115-122.

60. Edelhoff, S., Grubin, C. E., Karlsen, A. E., Adler, D. A., Foster, D., Disteche, C. M., Lernmark, A. (1993) Mapping of glutamic decarboxylase (GAD) genes. *Genomics* 17, 93-97.

61. Kaufman, D.L., Houser, C.R., and Tobin, A.J. (1991) Two forms of GABA synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *J. Neurochem.* 56, 720-723.

62. Solimena, M., Aggujaro, D., Muntzel, C., Dirkx, R., Butler, M., De Camilli, P., and Hayday, A. (1993) Association of GAD-65, but not of GAD-67, with the Golgi complex of transfected Chinese hamster ovary cells mediated by the N-terminal region. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 3073-3077.

63. Esclapez, M., Tillakaratne, N.J., Tobin, A.J., Houser C.R. (1993) Comparative localization of mRNAs encoding two forms of glutamic acid decarboxylase with nonradioactive in situ hybridization methods. *J. Comp. Neurol.* 15, 339-362.

64. Esclapez, M., Tillakaratne, N.J., Kaufman, D.L., Tobin, A.J., and Houser, C.R. (1994) Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the two forms. *J. Neurosci.* 14, 1834-1855.

65. Rimvall, K., and Martin, D.L. (1992) Increased intracellular γ-aminobutyric acid selectively lowers the level of the larger of two glutamate decarboxylase proteines in cultured GABAergic neurons from rat cerebellar cortex. *J. Neurochem.* 58, 158-166.

66. Rimval, K., Sheikh, S., Martin, D. L. (1993) Effects of increased γ-aminobutiric acid levels on GAD67 protein and mRNA levels in rat cerebellar cortex. *J. Neurochem.* 60, 714-720.

67. O'Connor, W.T., Lindefors N., Brené, S. Herrera-Marshitz M., Perrson, H., and Ungerstedt, U. (1991) Short-term dopaminergic regulation of GABA release in dopamine deafferented caudate-putamen is not directly associated with glutamic acid decarboxylase gene expression. *Neurosci. Lett.* 128, 66-70.

68. Segoniva, J., Tillakaratne, N.J.N., Whelan K., Tobin, A.J., and Gale K. (1990) Paralell increases in striatal glutamic acid decarboxylase activity and mRNA levels in rats with lesions of the nigro-striatal pathway. *Brain Res.* 529, 345-348.

69. Litwak, J., Mercugliano, M., Chesselet, M.-F., and Oltmans, G.A. (1990) Increased glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA and GAD activity in cerebellar Purkinje cells following lesion-induced increases in cell firing. *Neurosci. Lett.* 116, 179-183.

70. Salin, P., and Chesselet, M.F. (1993) Expression of GAD (Mr 67,000) and its messenger RNA in basal ganglia and cerebral cortex after ischemic lesions in rats. *Exp. Neurol.* 119, 291-301.

71. Feldblum, S., Ackermann, R.F., and Tobin, A.J. (1990) Long term increaase of glutamate decarboxilase mRNA in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neuron* 5, 361-362.

72. Weiland, N.G. Glutamic acid decarboxylase messenger ribonucleic acid is regulated by estradiol and progesterone in the hippocampus. *Endocrinology* (1992) 131, 2697-2702.

73. McCarthy, M.M., Kaufman, L.C., Brooks, P.J., Pfaff, D.W., and Schwartz-Giblin, S. Estrogen modulation of mRNA levels for the two forms of glutamic acid decarboxylase (GAD) in female rat brain. (1995) *J. Comp. Neurol.* 360, 685-697.

74. Sambrook J, Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

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

76. Frohman, M. A., Dush, M.K., and Martin, G.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts using a single gene-specific primer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 85, 8998-9002.

77. Burglin, T.R. and de Robertis, E.M. (1987) The nuclear migration signal of *Xenopus laevis* nucleoplasmid. *EMBO J.* 6, 2617-2625.

78. Studier, M.W., and Moffat, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.

79. Cullen, B.R. (1987) Use of eukaryotic expression technology in the functional analysis of cloned genes. *Methods in Enzymology* 152, 684-704.

80. Margolskee, R.F., Kavathas, P., and Berg, P. (1988) Epstein-Barr virus shuttle vector for stable episomal replication of cDNA expression libraries in human cells. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2837-2847.

81. Oertel, W.H., Schmechel, D.E., Tappaz, M.L., and Kopin, I.J. (1981) Production of a specific antiserum to rat brain glutamic acid decarboxylase by injection of antigen-antibody complex. *Neuroscience*, 6, 2689-2700.

82. Gottlieb, D.I., Chang, Y.C., and Schwob, J.E. (1986) Monoclonal antibodies to glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 8808-8812.

83. Lee, D., Tian, J., Phan, T., and Kaufman, D.L. (1993) Cloning and sequence analysis of a murine cDNA encoding glutamate decarboxylase (GAD65). 1216, 157-160.

84. Jackson, R.F., Newby, L.M., and Kulkarni, S.J. (1990) Drosophila GABAergic systems: sequence and expression of glutamic acid decarboxylase. *J. Neurochem.* 54, 1068-1078.

85. Solimena M., Dirkx R., Jr., Radzynski, M., Mundigl, O., and De Camilli, P. (1994) A signal located within amino acids 1-27 of GAD65 is required for its targeting to the Golgi complex region. *J. Cell Biol.* 126, 331-341.

86. Dirkx, R., Thomas, A., Li, L., Lernmark, A., Sherwin, R., De Camilli, P., Solimena, M. (1995) Targeting of the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylsae to intracellular organelles is mediated by its interaction with the NH2-terminal region of the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 270, 2241-2246.

87. Vanin, E.F. (1985) Processed pseudogenes: characteristics and evolution. *Ann. Rev. Genet.* 19, 253-72.

88. Weiner, A.M., Deininger, P.L., and Efstratiadis, A. (1986) Nonviral retroposons: genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 631-661.

89. Persson, H., Pelto-Huikko, M., Metsis, M., Soder, O., Brene, S., Skog, S., Hokfelt, T., and Martin Ritzen, E. (1990) Expression of the neurotransmitter-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase in male germ cells. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4701-4711.

90. Tillakaratne, N.J.K., Erlander, M.G., Collard, M.W., Greif, K.F., and Tobin, A.J. (1992) Glutamate decarboxylases in nonneural cells of rat testis and oviduct: differential expression of GAD65 and GAD67. *J. Neurochem.* 58, 618-627.

91. Lane, P.W. (1985) Muscular dystrophy with myositis (mdm). Mouse News Lett. 73, 18.

92. Maltais, L.J., Lane, P.W., and Beamer, W.J. (1984) Anorexia, a recessive mouse mutation causing starvation in preweaning mice *J. Hered.* 75, 468-472.

93. Dung, H.C. (1977) Deficiency in the thymus-dependnet immunity in "lethergic" mutant mice *Transplantation* 23, 39-43.

94. Brinstiel, M.L., Busslinger, M., and Strub, K. (1985) Transcription termination and 3' processing: the end is in site. *Cell* 41, 349-359.

95. Shapiro, M.B., and Senapathy, P. (1987) RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acid Res.* 15, 7155-7174.

96. Bu, D.-F. and Tobin, A. (1994) The exon-intron organisation of the genes (GAD1 and GAD2) encoding two human glutamate decarboxylases (GAD67 and GAD65) suggests that they derive from a common ancestral GAD. *Genomics* 21, 222-228.

97. Namchuk M., Lindsay L., Kanaani, J., Turck C. W., and Baekkeskov S. (1997) Phosphorylation of serine residues 3, 6, 10 and 13 distinguishes membrane anchored from soluble glutamic acid decarboxylase 65 and is restricted to glutamic acid decarboxylase 65a. *J. Biol. Chem.* 272, 1548-1557.

98. Christgau S, Aanstoot, H.-J., Schierbeck H., Begley K., Tullin S., Hejnaes K. and Baekkeskov S. (1992) Membrane anchoring of the autoantigen GAD65 to microvesicles in pancreatic β-cells by palmitoylation in the NH2-domain. *J. Cell Biol.* 118, 309-320.

99. Patthy, L. (1987) Intron-dependent evolution: preferred types of exons and introns. *FEBS Lett.* 214, 1-7.

100. Breitbart, R.E., Andreadis, A., and Nadal-Ginard, B. (1987) Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from singel genes. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 467-495.

101. Michesen, B.K., Petersen, J.S., Boel, E., Moldrup, A., Dyrberg, T., and Madsen, O.D. (1991) Cloning, characterization, and autoimmune recognition of rat islet glutamic acid decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8754-8758.

102. Kozak, M. (1991) Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* 266, 19867-19870.

103. Oppenheim, D. S., and C. Yanofsky. (1980) Translational coupling during expression of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Genetics* 95, 785-795.

104. Schumperli, D., McKenney, K., Sobieski, D. A., and M. Rosenberg. (1982) Translational coupling at an intercistronic boundary of the *Escherichia coli* galactose operon. *Cell* 30, 865-871.

105. Das, A., and C.Yanofsky. (1984) A ribosome binding site sequence is necessary for efficient expression of the distal gene of a translationally coupled gene pair. *Nucleic Acids Res.* 12, 4757-4768.

106. Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the ATG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44, 283-292.

107. Kozak, M. (1983) Comparison of initiation of protein synthesis in prokaryotes, eukaryotes and organelles. *Microbiological Reviews* 47, 1-45.

108. Kozak, M. (1978) How do eukaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell* 15, 1109-1123.

109. Kozak, M. (1989) The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.* 108, 229-241.

110. Kozak, M. (1991) An analysis of vertebrate mRNA sequences: Intimations of translational control. *J. Cell Biol.* 115, 887-903.

111. Kozak, M. (1986) Bifunctional messenger RNAs in eukaryotes. *Cell* 47, 481-483.

112. Futterer, J., and T. Hohn. 1992. Role of an upstream open reading frame in the translation of polycistronic mRNA in plant cells. *Nucleic Acids Res.* 20, 3851-3857

113. Horvath, C.M., Williams, M.A., and Lamb, R.A. (1990) Eukaryotic coupled translation of tandem cistrons: identification of the influenza B virus BM2 polypeptide. *EMBO J.* 9, 2639-2647.

114. Schwartz, S., Felber, B., and G. N. Pavlakis. (1992) Mechanism of translation of monocistronic and multicistronic human immunodeficiency virus type 1 mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 12, 207-219.

115. Peabody D.S., and Berg, P. (1986) Translation-reinitiation occurs in the translation of mammalian cell mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 6, 2695-2703.

116. Peabody, D.S., Subramani, S., and Berg, P. (1986) Effect of upstream reading frames on translational efficiency in Simian virus 40 recombinants. *Mol. Cell. Biol.* 6, 2704-2711.

117. Pilipenko, E.V., Gmyl, A.P., Maslova, S.V., Svitkin, Y.V., Sinyakov, A.N., and Agol, V.A. (1992) Prokaryotic-like *cis*-elements in the cap-independent internal initiation of translation on Picornavirus RNA. *Cell* 68, 119-131.

118. Antony D.D., and W.C. Merrick. (1991) Eukaryotic initiation factor (eiF)-4F. Implications for a role in internal initiation of translation. *J. Biol.Chem.* 266, 10218-10226.

119. Tahara, S.M., Dietlin, T.A., Dever, T.E., Merrick, W.C., and Worrilow, L.M.. (1991) Effect of eukaryotic initiation factor 4F on AUG selection in a bicistronic mRNA. *J. Biol. Chem.* 266, 3594-3601.

120. Frederickson, R.M., Mushinsky, W.E., and Sonenberg, N. (1992) Phosphorylation of translation initiation factor eiF-4E is induced in a *ras*-dependent manner during nerve growth factor-mediated PC12 cell differentiation. Mol. Cell. Biol. 12, 1239-1247.

121. Nielsen, P.J., and Traschel, H. (1988) The mouse protein synthesis initiation factor 4A gene family includes two related functional genes which are differentially expressed. *EMBO J.* 7, 2097-2105.

122. Futterer, J., and Hohn, T. (1991) Translation of a polycistronic mRNA in the presence of the cauliflower mosaic virus transactivation protein. *EMBO J.* 10, 3887-3896.

123. Gowda, S., Scholthof, H.B., Wu, F.C., and Shepherd R.J. (1991) Requirenment of gene VII in *cis* for the expression of downstream genes on the major transcript of figwort mosaic virus. *Virology* 185, 867-871.

124. Latchman D. S. (1990) Cell-type specific splicing factors and the regulation of alternative RNA splicing. *The New Biologist* 2, 297-303.

125. Mattox, W., Ryner, L., and Baker, B. (1992) Autoregulation and multifunctionality among *trans*-acting factors that regulate alternative pre- mRNA processing. *J. Biol. Chem.* 267, 19023-19026.

126. Tian, M., and Maniatis, T. (1992) Positive control of pre-mRNA splicing *in vitro. Science* 256, 237-240.

127. Karen, F., Tillakaratne, N.J.K., Erlander, M.G., and Tobin, A.J. Transient increase of a glutamate decarboxylase (GAD) mRNA during the postnatal development of the rat striatum. (1992) Dev. Biol. 153, 158-164.

128. Pugh, B.F., and Tjian, R. (1990) Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell* 61, 1187-1197.

129. Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Wälchili, M., Groth, D.F., Mckinley, M.P., Prusiner, S.B., and Weisman, C. (1986) Scarpie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46, 417-428.

130. Bird, A.P. (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209-213.

131. Razin, A., and Kafri, T. (1994) DNA methylation from embryo to adult. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 48, 53-81.

132. Ackerman, S.L., Minden, A.G., and Yeung, C.-Y. (1993). The minimal self-sufficient element in a murine G+C rich promoter is a large element with imperfect dyand symmetry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11865-11869.

133. Seghal, A., Patil, N., and Chao, M. (1988) A constitutive promoter directs expression of the nerve growth factor receptor gene. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3160-3167.

134. Chin, L-S., Li, L., and Greengard, P. (1994) Neuron-specific expression of the synapsin II gene is directed by a specific core promoter and upstream regulatory elements. *J. Biol. Chem.* 269, 18507-18513.

135. Maue, R.A., Kraner, S.D., Goodman, R. H., and Mandel, G. (1990) Neuron-specific expression of the rat brain type II sodium channel gene is directed by upstream regulatory elements. *Neuron* 4, 223-231.

136. Minowa, M.T., Minowa, T., Monsma, F.J. Jr., Sibley, D.R., and Mouradian, M.M. (1992) Characterization of the 5'-flanking region of the human D_{1A} dopamine receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3045-3049.

137. Kilpatrick, D.L., Zinn, S.A., Fitzgerald, M., Higuchi, H., Sabol, S.L., and Meyerhardt, J. (1990) Transcription of the rat and mouse proenkephalin genes is initiated at distinct sites in spermatogenic and somatic cells. *Mol. Cell. Biol.* 10, 3717-3726.

138. Kirkness, E.F., and Frasner, C.M. (1993) A strong promoter element is located between alternative exons of a gene encoding the human γ-aminobutyric acid type A receptor b3 subunit (GABRB3). *J. Biol. Chem.* 268, 4420-4428.

139. Li, Y., Camp, S., Rachinsky, T. L., Bongiorno, C., and Taylor, P. (1991) Gene structure of mammalian acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* 268, 3563-3572.

140. Salbaum, J.M., Weidemann, A., Lemaire, H.-G., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1988) The promoter of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor gene. *EMBO J.* 7, 2807-2813.

141. Sauerwald, A., Hoeshe, C., Oschwald, R., and Kilimann, M. (1990) The 5'-flanking region of the synapsin I gene. *J. Biol. Chem.* 265, 14932-14937.

142. Suchanek, B., Seeburg, P.H., and Sprengel, R. (1995) Gene structure of the murine N-Mehtyl D-Aspartate receptor subunit NR2C. *J. Biol. Chem.* 270, 41-44.

143. Tenhunen, J., Saliminen, M., Jalanko, A., Ukkonen, S., and Ulmanen, I. (1993) Structure of the rat Cathecol-O-Methyltransferase gene: separate promoters are used to produce mRNAs for soluble and membrane-bound forms of the enzyme. *DNA Cell Biol.* 12, 253-263.

144. Yang, X., McDonough, J., Fydorov, D., Morris, M., Wang, F., and Deneris, E.S. (1994). Characterization of an acetylcholine receptor α3 gene promopter and its activation by the POU domain factor SCIP/Tst-1. *J. Biol. Chem.* 269, 10252-10264.

145. Harris, C.L., Potter, M.P., Tano, K., Shiota, S., Mitra, S., and Brent, T.P., (1991) Characterization of the promoter region of the human O^6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. Nucleic Acids Res. 19, 6163-6167.

146. Maniatis, T., Goodbourn, S., and Fischer, J. (1987) Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* 236, 1237-1244.

147. Schibler, U., and Sierra, F. (1987) Alternative promoters in developmental gene expression. *Ann. Rev. Genet.* 21, 237-257.

148. Ayoubi, T. A. Y., and Van de Ven, W.J.M. (1996) Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB.* J. 10, 453-460.

149. Thai, L.V.A., Coste, E., Allen, M.J., Palmitier, R.D., and Weber, J.M. (1993) Identification of a neuron-specific promoter of human aromatic L-amino acid decarboxylase. *Mol. Brain. Res.* 17, 227-238.

150. Gonzales-Crespo, S., and Boronat, A., (1991) Expression of the growth-releasing hormone gene in placenta is directed by an alternative promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8749-8753.

151. Chelley, J., Hamard, G., Koulakoff, A., Kaplan, J-C., Kahn, A., and Berwald-Netter, Y. (1990) Dystorphin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells. *Nature* 344, 64-65.

152. Eggen, B.J.L., Nielander, H.B., Rensen-De Leeuw, M.G.A., Schotman, P., Gipsen, W.H., and Schrama, L.H. (1994) Identification of two promoter regions in the rat B-50/GAP-43 gene. *Mol. Brian Res.* 23, 221-234.

153. Wu, D., and Hersh, L.B. (1994) Choline acetyltransferase: celebrating its fiftieth year. *J. Neurochem.* 1653-1663.

154. Timmusk, T., Palm, K., Metsis, M., Reintman, T., Paalime, V., Saamra, M., and Perrson, H. (1993) Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* 10, 475-489.

155. Nakayama M., Gahara, Y., Kitamura, T., and Ohara, O. (1994) Distictive four promoters collectiively direct expression of brain-derived neurotrophic factor gene. *Mol. Brain. Res.* 21, 206 218.

156. Timmusk, T., Belluardo, N., Persson, H., and Metsis, (1994) Developmental regulation of brain-derived neurotrophic factor messenger RNAs transcribed from different promoters in the rat brain. *Neurosci.* 60, 287-291.

157. Benson, D.L., Isackson, P.J., Hendry, S.H.C., and Jones, E.G. (1989) Expression of glutamic acid decarboxylase mRNA in normal and monocularly deprived cat visual cortex. *Mol. Brain Res.* 5, 279-287.

158. Erlander, M.G., and Tobin, A.J. (1992) A transcriptional regulatory element of the gene encoding the 67,000-M_r form of human glutamate decarboxylase is similar to a Drosophila regulatory element. *J. Neurochem.* 58, 2182-2190.

159. Mitchell. P.J., Wang, C., and Tjian, R. (1987) Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen. *Cell* 50, 847-861.

160. Segovia, J., Lawless, Tillakaratne, N.J.K., Brenner, M., and Tobin, A.J. (1994) Cyclic AMP decreases the expression of a neuronal marker (GAD67) an increases the expression of an astroglial marker (GFAP) in C6 cells. *J. Neurochem.* 63, 1218-125.

161. Herschman, H.R. (1991) Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 281-319.

162. Thiel, G., Schoch, S., and Peterson, D. (1994) Regulation of synapsin I gene expression by the zinc finger transcription factor. *J. Biol. Chem.* 269, 15294-15301.

163. Nakayama, M., Gahara, Y., Kitamura, T., and Ohara. O. (1994) Distinctive four promoters collectively direct expression of brain-derived neurotrophic factor gene. *Mol. Brain Res.* 21, 206-218.

164. Inoue, H., Baetge, E.E., and Hersh, L.B. (1993) Enhancer containing unusual GC box-like sequences on the human choline acetyltransferase gene. *Mol. Brain Res.* 20, 299-304.

165. Mutero, A., Camp, S., and Taylor, P. (1995) Promoter elements of the mouse acethylcholinesterase gene. *J. Biol. Chem.* 270, 1866-1872

166. Lewis, S.A., and Cowan, N.J. (1986) Anomalous placement of introns in a member of the intermediate filament multigene family: an evolutionary conundrum. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1529-1534.

167. Baeuerle, P. (1991) The inducible transcription activator NF-kB: regulation by distinct protein subunits. *Biochim. Biophys. Acta* 1072, 63-80.

168. Kalschmidt, C., Kalschmidt, B., Neumann, H., Wekerle, H., and Beauerle, P.A. Constitutive NF-kB activity in neurons. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 3981-3992.

169. Kalschmidt, C., Kalschmidt, B., and Beauerle, P.A. (1993) Brain synapses contain inducible forms of the transcription factor NF-kB. *Mech. Develop.* 43, 135-147.

170. Sumi-Ichinose, C., Ichinose, H., Takahashi, E-I., Hori, T-A., and Nagatsu, T. Molecular cloning of genomic DNA and chromosomal assigenment of the gene for human aromatic L-amino acid decarboxylase, the enzyme for cathecolamine and serotonin biosynthesis. (1992) *Biochemistry* 31, 2229-2238.

171. Rattner, A., Korner, M., Rosen, H., Baeuerle, P.A., and Citri, Y. (1991) Nuclear factor kB activates proenkephalin transcription in T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 11, 1017-1022.

172. Blackwell, T.K., and Weitraub, H. (1990). Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* 250, 1104-1110.

173. Sasai, Y., Kageyama, Tagawa, Y., Shigemoto, R., and Nakanishi, S. (1992) Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to Drosophila *hairy* end *Enhancer* of *split*. *Gens Dev.* 6, 2620-2634.

174. Johnson, J.E., Birren, S.J., and Anderson, D.J. (1990) Two rat homologues of *Drosophila achaete-scute* specifically expressed in neuronal precursors. *Nature* 346, 858-861.

175. Lipkowitz, S., Göbel, V., Varterasian, M.L., Nakahara, K., Tchorz, K., and Kirsch, I.R. (1992) A comparative structural characterization of the human NSCL-1 and NSCL-2 genes. *J. Biol. Chem.* 29, 21065-21071.

176. McGinnis, W., and Krumlauf, R. (1992) Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68, 283-302.

177. Odenwald, W.F., Taylor, C.F., Palmer-Hill, F.J., Friedrich, V. Jr., Tani, M., and Lazzarini, R.A. (1987) Expression of homeo domain protein in noncontact-inhibited culture cells and postmitotic neurons. *Genes Dev.* 1, 482-496.

178. Hirsch, M-R., Gaugler, L., Deagostini-Bazinn, H., Bally-Cuif, L., and Goridis, C. (1990) Identification of positive and negative regulatory elements governing cell-type-specific expression of the neural cell adhesion molecule gene. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1959-1968.

179. Kohl, A., Giese, K.P., Mohajeri, D., Moos, M., and Schachner, M. (1992) Analysis of promoter activity and 5' genomic structure of the neural cell adhesion molecule L1. J. *Neurosci. Res.* 32, 167-177.

180. Salbaum, J. M., Weidemann, A., Lemaire, H-G., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1988) The promoter of Alzheimer's disease amyolid A4 precursor gene. *EMBO J.* 7, 2807-2813.

181. Schoenherr, C.J., and Anderson, D.J. (1995). The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science* 267, 1360-1363.

182. Chong, J.A., Tapia-Ramirez, J., Kim, S., Toledo-Aral, J.J., Zheng, Y., Boutros, M.C., Altshuller, Y.M., Froham, M.A., Kraner, S.D., and Mandel, G. (1995). REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell* 80, 949-957.

183. Kraner, D.S., Chong, A.J., Tsay, H-L., and Mandel, G. (1992) Silencing the type II sodium channel gene: a model for neural-specific gene regulation. *Neuron* 9, 37-44.

184. Mori, N., Schoenherr, C. Vandenbergh, D.J., and Anderson, D.J. (1992) A common silencer element in the SCG10 and Type II Na^+ channel genes binds a factor present in nonneuronal cells but not in neuronal cells. *Neuron* 9, 45-54.

185. Schoenherr, C., Paquette, A.J., and Anderson, D.J. (1996) Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9881-9886.

186. Shaskus, J., Zellmer, E., and Lewis, E.J. (1995). A negative regulatory element in the rat dopamine β-hydroxylase gene contributes to the cell type specificity of expression. *J. Neurochem.* 64, 52-60.

187. Nedivi, E., Basi, G.S., Akey, I.V., and Skene, J.H.P. (1992) A neuronal-specific GAP-43 core promoter located between unusual DNA elements that interact to regulate its activity. J. *Neuroscience* 12, 691-704.

9. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. Z. Katarova, **G. Szabó**, E. Mugnaini and R.J. Greenspan: Molecular Identification of the 62 kD Form of Glutamic Acid Decarboxylase from the Mouse. **Eur. J Neurosci.** 2, 190-202 (1990).

2. M. Brilliant, **G. Szabó**, Z. Katarova, C. Kozak, R. Grazler, R.J. Greenspan and D. Houseman: Sequences Homologous to Glutamic Acid Decarboxylase are Present on Two Different Mouse Chromosomes, 2 and 10. **Genomics** 6, 115-122 (1990).

3. **G. Szabó**, Z. Katarova and R.J. Greenspan: Different Protein Forms are Produced from Alternatively Spliced Bicistronic GAD mRNAs During Development. **Mol. Cell. Biol.** 14, 7535-7545 (1994).

4. **G. Szabó,** Z. Katarova. E. Körtvély, R.J. Greenspan and Zs. Urbán: Structure and the Promoter Region of the Mouse Gene Encoding the 67 kDa Isoform of Glutamic Acid Decarboxylase. **DNA Cell Biol.** 15, 1081- 1091 (1996).

10. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ FEL NEM HASZNÁLT, DE A TÉMÁHOZ CSATLAKOZÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

5. Z. Katarova, **G. Szabó**, E. Mugnaini and R. J. Greenspan: Molecular Cloning of L-Glutamic Acid Decarboxylase from the Mouse. **Neurology and Neurobiology** 59, 423-424 (1990).

6. Z .Katarova, E. Mugnaini, G. Sekerkova, J. Mann, Zs. Bősze, A. Aszódi. R.J. Greenspan and **G. Szabó**: Regulation of Cell Type Specific Expression of LacZ by the 5'-Flanking Region of Mouse GAD67 in the Central Nervous System of Transgenic Mice. **Eur. J Neurosci.** Közlésre elfogadva (1997).

7. G. Sekerkova, Z. Katarova, F. Joó, J.R. Wolff, Simona Prodan and **G. Szabó**: Visualization of Beta-Galactosidse by Enzyme- and Immunohistochemistry in the Olfactory Bulb of Transgenic Mice Carrying the LacZ Transgene. **J. Histochem. Cytochem**. 45, 1147-1155 (1997).

8. G. Sekerkova, Z. Katarova, F. Joó, E. Mugnaini, J.R. Wolff and **G. Szabó**: Beta-Galactosidase-Labeled Relay Neurons of Homotopic Olfactory Transplants Establish Proper Synaptic Connections with Host Neurons. **Neuroscience** 80, 973-979 (1997).

12. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK ÉS ABSZRAKTOK

9. G.Bajszár, **G. Szabó**, A. Simoncsits and J. Molnár: Methylated Cap Formation Enzymes Bound to Nuclear Informofer Particles. **Mol. Biol. Rep**. 4, 93-96 (1978).

10. J. Molnár, G. Bajszár, I. Marczinovits and **G. Szabó**: Cleavage of pre-mRNA Sequences by Ribonucleases Bound to Nuclear RNP Particles. **Mol. Biol. Rep**. 4, 157-161 (1978).

11. **G. Szabó**, I. Marczinovits, L Komáromy, G. Bajszár and J. Molnár: HnRNP Particles from Drosophila melanogaster Cells. **Mol. Biol. Rep**. 7, 221-225 (1981).

12. I. Marczinovits, **G. Szabó**, L. Komáromy, G. Bajszár and J. Molnár: Isolation and Characterization of Nuclear HnRNP Complexes from Drosophila melanogaster Tissue Culture Cells. **Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung**. 18, 185-198 (1983).

13. S. Erdei, I. Boros, **G. Szabó** and Pál Venetianer: A Novel Type of Bacterial Transcription Unit Specifying mRNA, rRNA and tRNA. **Mol. Gen. Genet**. 191, 162-164 (1985).

14. **G. Szabó** and P. Venetianer: Translational Coupling at the Intercistronic Boundary of an Arteficially Constructed Operon in Escherichia coli. **Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung**. 20, 223-230. (1985).

15. K. Baksa, H. Morawietz, V. Dombradi, M. Axton, H . Taubert, **G. Szabó,** I Török, A Udvardy, H. Gyurkovics, B. Szöör, D. Glover, G. Reuter and J. Gausz: Mutation in the Protein Phosphatase 1 Gene at 87B Can Differentially Affect Suppression of Position-Effect Variegation and Mitosis in Drosophila melanogaster. **Genetics** 135, 117-126. (1993).

16. I. Krizbai, **G. Szabó**, M. Deli, K. Maderspach, C. Lehel, Z. Olah, J.R. Wolff and F. Joó: Expression of Protein Kinase C Family Members in the Cerebral Endothelial Cells. **J. Neurochemistry** 65, 459-462 (1995).

Publikált kongresszusi összefoglalók

Z. Katarova, T.J. Görcs, T. Lantos, T.F. Freud and **G. Szabó**: GABAergic Innervation of Peptidergic Neurons in the Arcuate Nucleus of the Rat Brain: a Light- and Electronmicroscopic Dual Labeling Immunocytochemical Study. **Soc. Neurosci. Abs**. 16, 354.12 (1990).

G. Szabó, Z. Katarova, Zs. Urbán, T.J. Görcs and R.J. Greenspan: Regulation of Glutamic Acid Decarboxylase Gene Expression in Developing Mouse Brain. **Soc. Neurosci. Abs.** 16, 535.2 (1990).

G. Szabó, Z. Katarova, Zs. Urbán, J. Mann, E. Mugnaini, and R. Greenspan: Regulation of Mouse Glutamic Acid Decarboxylase Gene (Gad-1(2) Expression in Adult Brain and in Developing Embryo. **Soc. Neuroci Abs**. 17, 604.8 (1991).

G. Szabó, Z. Katarova, E. Mugnaini, J. Mann, G. Sekerkova, Zs Urbán and R.J. Greenspan: Developmental and Tissue-Specific Regulation of the Mouse Glutamic Acid Decarboxylase Gene (67 kDa form). **Soc. Neurosci. Abs.** 19, 97.9 (1993).

G. Sekerkova, Z. Katarova and **G. Szabó**: LacZ Positive Cells Identified by X-gal Histochemistry After Homotopic Olfactory Bulb Transplantation. **Eur. J. Neurosci**. 7, S48. (1994).

I. Krizbai, **G. Szabó**, M. Deli, K. Maderspach, C. Lehel, Z. Olah, J.R. Wolff, and F. Joó: Expression of PKC Isoforms in Cerebral Endothelial Cells. **J. Neurochem**. 65, S96 (1995).

I. Krizbai, **G. Szabó**, M. Deli, K. Maderspach, C. Lehel, Z. Olah, J.R. and F. Joó: Expression of PKC Isoforms in Cerebral Endothelial Cells. **Neurobiology** 3, 89.(1995).

Z. Sekerkova, Z. Katarova, F. Joó, and **G. Szabó**: Use of GAD-lacZ Transgenic Mice in Homotopic Olfactory Bulb Transplantation-*lac*Z-Positive Cells of the Graft Identified by X-Gal Staining. **Neurobiology** 3, 117. (1995).

Z. Katarova, E. Mugnaini, G. Sekerkova J. Mann and **G. Szabó**: GAD-lacZ Transgenic Mice as a Model System to Study Gene Regulation and Neuronal Plasticity in the CNS. **Neurobiology** 3, 77. (1995).

G. Sekerkova**,** Z. Katarova, E. Mugnaini and **G. Szabó**: Use of GAD-LacZ Transgenic Mouse Lines in Transplantation Experiments. **Eur. J. Neurosci**. 8, S189 (1995).

G. Sekerkova, F. Joó, Z. Katarova, E. Raceková and **G. Szabó:** Electron Microscopic Study of Mitral and Tufted Cells expressing GAD-LacZ Transgene. In **Proceedings Multinational Congress on Electron Microscopy**, Slovak Academic Press, Bratislava pp. 160-161 (1995).

G. Szabó, Z. Katarova, E. Mugnaini, G. Sekerkova, E. Körtvély, Zs. Urbán, J. Mann, R. Greenspan, A. Aszódi and Zs. Bősze. Neuron Specific Silencers and Region Specific Enhancers Determine GABAergic Specific Expression of the Mouse GAD67 Gene. **Soc. Neurosci. Abs.** 22, 585 (1996).

G. Sekerkova, Z. Katarova, E. Mugnaini, F. Joó, J.R. Wolff and **G. Szabó**. Intrinsically Labeled Relay Neurons of Homotopic Olfactory Bulb Transplants Establish Organotypic Synapses with Host Neurons. **Soc. Neurosc. Abs.** 22, 577 (1996).

G. Sekerkova, Z. Katarova, Joó F. and **Szabó G**: Structural Integration of Homotopic Olfactory Bulb Transplant. **Neurobiology** 4, 372 (1996).