

**Die Isolierung und Charakterisierung**  
**der cDNA und des Gens *Metr-1* der Maus, einem Vertreter der**  
***Bruno-like* Genfamilie und Analysen zur Expression.**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Christian Wilhelm**  
aus Heidelberg

Göttingen 2001

D 7

Referent: Prof. Dr. W. Engel

Korreferent: Prof. Dr. S. Hoyer-Fender

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2002

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Abkürzungen</b>	V
<b>1. Einleitung</b>	1
<b>2. Material und Methoden</b>	7
2.1 Material	7
2.1.1 Lösungen und Chemikalien	7
2.1.2 Gebrauchswaren	9
2.1.3 Sterilisation	10
2.1.4 Puffer und Stammlösungen	10
2.2 Biologisches Material	14
2.2.1 Bakterienstämme	14
2.2.2 Plasmide, Phagemide und Lambda-Vektoren	14
2.2.3 Synthetische Oligonukleotide	15
2.2.4 DNA-Bibliotheken	18
2.2.4.1 Phagen-Bibliotheken	18
2.2.4.1.1 Humane fötale Gehirn-cDNA-Bibliotheken	18
2.2.4.1.2 Fötale Maus-Gehirn-cDNA-Cibliotheken	18
2.2.4.2 RZPD-Filter-Bibliotheken	18
2.2.4.2.1 RZPD-cDNA Filter-Bibliotheken	19
2.2.4.2.2 RZPD-Genomische DNA-Filter-Bibliotheken	20
2.2.5 Organ-und Gewebespenden	20
2.3 Methoden	22
2.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren	22
2.3.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Vollblut	22
2.3.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Geweben	23
2.3.1.3 Isolierung aus Plasmid DNA	23
2.3.1.3.1 Minipräparation von Plasmid-DNA	23
2.3.1.3.2 Plasmid-DNA Isolation mit Midi- oder Maxisäulen-Kits	25
2.3.1.4 Isolierung von Phagen-DNA	25

# Inhaltsverzeichnis

---

2.3.1.4.1 Herstellung eines Phagen-Minilysats	25
2.3.1.4.2 Präparation von Phage-DNA	26
2.3.1.5 In vivo Excision	27
2.3.1.6 Isolierung von Gesamt-RNA	28
2.4 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA	28
2.5 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	29
2.5.1 Horizontal-Elektrophorese von DNA in Agarosegelen	29
2.5.2 Vertikal-Elektrophorese von DNA in Agarosegelen	29
2.5.3 Elektrophorese von RNA in denaturierenden Agarosegelen	29
2.5.4 Polacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	30
2.5.5 Denaturierende Polacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	30
2.6 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren-Fragmenten	31
2.6.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
2.6.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Polyacrylamidgelen	32
2.7 Ligation von DNA-Fragmenten	32
2.7.1 Ligation von restringierten DNA-Fragmenten	32
2.7.2 Ligation von PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten	33
2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
2.8.1 PCR-Technik an rekombinanter und genomischer DNA	34
2.8.2 Reverse PCR (RT-PCR)	34
2.8.3 5'-RACE-PCR	36
2.8.4 Nichtradioaktives „Dye Terminator Cycle Sequencing“	38
2.9 Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	39
2.10 Transformation	39
2.11 Transfertechniken	40
2.11.1 Southern-Blotting Technik	40
2.11.2 Northern-Blotting Technik	40
2.11.3 Dot-Blotting-Technik	41
2.12. Markierung von Nukleinsäuren	42
2.12.1 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	42
2.12.1.1 „Random Primer“-Markierung von Nukleinsäuren	42
2.12.1.2 Radioaktive Endmarkierung von Oligonukleotiden	42

# Inhaltsverzeichnis

---

2.12.1.3 Nichtradioaktive <i>in vitro</i> Transkription von RNA	43
2.13 Hybridisierungsmethoden	44
2.13.1 Hybridisierung 32P-markierter DNA-Sonden	44
2.13.2 <i>In situ</i> - Hybridisierung auf Schnittpräparate	44
2.13.3 <i>Whole mount In situ</i> -Hybridisierung	47
2.14 „Primer-Extension“-Analyse	50
2.15 Computeranalysen	51
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>52</b>
3.1 Charakterisierung partieller <i>CAGH4/BRUNOL1</i> - und <i>etr-1/BRUNOL4</i> cDNA-Fragmente des Menschen	52
3.1.1 Isolierung des <i>H32</i> cDNA Fragmentes	52
3.1.2 Die partiellen Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der humanen <i>etr-1</i> und <i>H32</i> cDNA Fragmente	52
3.1.3 Analyse der gewebespezifischen Expression von „ <i>Similar to etr-1</i> “/ <i>BRUNOL4</i> und <i>CAGH4/BRUNOL1</i>	59
3.1.4 Southern Blot Analyse mit genomischer DNA des Menschen	61
3.1.5 Chromosomale Lokalisierung von <i>CAGH4/BRUNOL1</i>	63
3.2 Charakterisierung des <i>Metr-1</i> Gens der Maus	64
3.2.1 Isolierung der <i>Metr-1</i> cDNA	64
3.2.2 Nukleotid- und Aminosäuresequenz von <i>Metr-1</i>	64
3.2.3 Analyse der gewebsspezifischen Expression von <i>Metr-1</i>	69
3.2.4 Southern Blot Analyse mit genomischer DNA der Maus	70
3.2.5 Analyse der zellspezifischen Expression von <i>Metr-1</i> im adulten Gehirn der Maus	72
3.2.6 Die Expression von <i>Metr-1</i> während der Maus-Entwicklung	74
3.2.6.1 Analyse pränataler Maus-Entwicklungsstadien	74
3.2.6.2 Die Expression <i>Metr-1</i> von im postnatalen Testis der Maus	76
3.2.6.3 Die „whole mount“-Analyse für <i>Metr-1</i> in verschiedenen Embryonal-Entwicklungsstadien der Maus	78
3.2.7 Die Isolierung und Charakterisierung eines genomischen Klons für <i>Metr-1</i>	88
3.2.7.1 Die Isolierung eines genomischen Klons für <i>Metr-1</i>	88

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>4. Diskussion</b>	94
4.1 Die isolierten, partiellen cDNA-Fragmente der CAGH4/BRUNOL1 und „Similar to etr1“/BRUNOL4 Gene	94
4.2 Isolierung der Metr-1 cDNA der Maus	97
4.3 Analyse der Nukleotid- und Aminosäuresequenz von Metr-1 der Maus	97
4.4 Homologievergleiche der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von „Similar to etr-1“/BRUNOL4 des Menschen und Metr-1 der Maus	98
4.5 Analyse der gewebespezifischen Expression von „Similar to etr-1“/BRUNOL4, CAGH4/BRUNOL1 und Metr-1	103
4.6 Die Expression von Metr-1	104
4.7 Ein Model für die Funktion von Bruno Proteinen	112
<b>5. Zusammenfassung</b>	114
<b>6. Anhang A</b>	117
<b>7. Literatur</b>	120

# Abkürzungen

---

## Abkürzungen

A	Adenin
$\alpha$	Alpha
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
$\beta$	Beta
BCIP	Brom-4-Chlor-3-Indonyl-Phosphat
$\beta$ -Gal	$\beta$ -Galaktosidase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cpm	„counts per minute“ (radioaktive Zerfälle pro Minute)
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
d-	desoxy-
dd-	didesoxy-
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dt	desoxythymine
DTT	Dithiothreitol
E-	Elektrophorese
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alteres (lat.: und andere)
EtOH (EtOH <sub>ab</sub> )	Äthanol (Äthanol absolut)
FCS/FKS	fötales kälberserum

## Abkürzungen

---

g	Gramm
$\gamma$	Gamma
X g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunden
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethylsulfonsäure
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
l/L	Liter
LB	Luria-Bertani
m-	milli-
M	Mola (mol/l)
Min.	Minuten
ml	Milliliter
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfansäure
mRNA	„messenger“ (Boten) Ribonukleinsäure
$\mu$	mikro ( $1 \times 10^{-6}$ )
NaAc	Natriumacetat
$\eta$	nano ( $1 \times 10^{-9}$ )
NBT	Nitroblau-Tetrazolim-Chlorid
nt/Nt.	Nukleotid
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
OD	optische Dichte
oligo	griech.:viel
p-	pico
$^{32}\text{p}$	radioaktives 32-Phosphat
p.a.	zur Analyse
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
p.c.	post conceptionem
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	pH-Wert
RBD	RNA-Bindungs-Domäne
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease



## Abkürzungen

---

RNP	<u>R</u> ibonukleoprotein-Komplex
RRM	<u>R</u> NA- <u>R</u> ecognition- <u>M</u> otifs (RNA-Erkennungs-Motiv)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec./sek.	Sekunden
SSC	Standard-Saline-Citrat
Std.	Stunden
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-Na <sub>2</sub> EDTA
TE	Tris-Na <sub>2</sub> EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
U	Uracil oder „Unit“
ü.N	über Nacht
UTP	Uracil-5'-triphosphat
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
verd.	verdünnt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

# 1. Einleitung

Zellwachstum und Differenzierung werden durch ein sensibles System bestimmt, das die Gen-Expression auf transkriptioneller, posttranskriptionaler und translationaler Ebene genau kontrolliert. Die Transkription ist die erste Stufe der Regulation der Gen-Expression, und es spielen verschiedene Mechanismen posttranskriptioneller RNA-Prozessierungen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Protein-Biosynthese. Die Prozessierung eukaryontischer prä-mRNA, eingeschlossen die Polyadenylierung, die „Capping“- und „Splicing“-Mechanismen als auch der Transport der mRNAs beeinflussen die Verfügbarkeit reifer mRNA für die Translation. Außerdem bestimmen die Lokalisierung, Stabilität und die Translationsfähigkeit der zytoplasmatischen mRNAs sowohl die quantitativen als auch die qualitativen Aspekte der resultierenden Gen-Expression (Antic and Keene 1997).

## ***Elav-like* und *Bruno-like* Gene bei Vertebraten und Invertebraten**

<b>Name</b>	<b>Homologe Gene</b>	<b>Spezies</b>	<b>Gewebeverteilung</b>	<b>Expression in der Entwicklung</b>	<b>Referenzen</b>
ELAVL1	<i>ElrA</i> <i>HuR</i> <i>MhuA</i> <i>MelG</i>	Xenopus Mensch Maus Maus	ubiquitär	allen Stadien	Good 1995 Ma et al. 1996 Okano und Darnell 1997 Antic und Keene 1997
ELAVL2	<i>ElrB</i> <i>Xell</i> <i>Hel-N1</i> <i>MhuB</i> <i>Mel-N1</i>	Xenopus Xenopus Mensch Maus Maus	Gehirn, Testis, Ovarien	Bis zur Gastrulation und in der Kaulquappe	Good 1995 Perron et al. 1995 Levine et al. 1993 Okano und Darnell 1997 Abe et al. 1996
ELAVL3	<i>ElrC</i> <i>HuC</i> <i>MHuC</i>	Xenopus Mensch Maus	Nervensystem	Späte Gastrula	Good 1995 Szabo et al. 1991 Sakai et al. 1994
ELAVL4	<i>ElrD</i> <i>HuD</i> <i>MhuD</i>	Xenopus, Mensch Maus	Nervensystem	Späte Gastrula	Good 1995 Szabo et al. 1991 Okano und Darnell 1997
<i>Elav</i>		Drosophila	ZNS und peripheres Nervensystem	Neuronenentstehung (allen Stadien)	Robinow und White 1988
<i>Rpb</i>		Drosophila	ZNS und Nervensystem	späte 3d-instar Larve	Kim und Baker 1993
Cel-1		Caenorhabditis elegans	Nervensystem	larvale und adulte Stadien	Antic und Keene 1997
BRUNO L2	etr-1C. legans brunoL-3  BRUNOL2	Caenorhabditis elegans Maus  Mensch	Muskulatur	frühe Embryonen  unbekannt	Milne und Hodgkin 1999 Good and Herring (unpublished) Timchenko et al.1996
BRUNO L1	etr-1 Xenopus etr-1Danio rerio BRUNOL1	Xenopus laevis Danio rerio Mensch	Nervensystem Unbekannt Nervensystem	Larve 18-24 Tage Oozyten und Embryogenese unbekannt	Knecht et al. 1995 Suzuki et al. 2000 Good et al. 2000

**Tab.1:** *Elav-like* und *Bruno-like* Gene bei Vertebraten und Invertebraten. Diese Gene sind hoch konserviert und gehören zu der Superfamilie der RNA-Bindungs-Proteine (RBP).

## Einleitung

---

Viele Gene beeinflussen die Organogenese auf der Ebene der Regulation der Transkription, wohingegen nur wenige Gene in der Regulation des Zellwachstums oder der Zelldifferenzierung auf posttranskriptionaler Ebene verwickelt zu sein scheinen (Yao et al. 1993). Es ist zu erwarten, daß RNA-Protein-Interaktionen eine Schlüsselrolle bei der posttranskriptionellen Gen-Expression spielen (Burd und Dreyfuss 1994).

Das Gen *elav*, dessen Protein auf der Ebene der RNA-Prozessierung interagiert, wurde bei *Drosophila melanogaster* entdeckt (Campos et al. 1985, Robinow and White 1988). Der Name *elav* steht für „Embryonic Lethal Abnormal Visual Phenotype“ und *elav* ist essentiell in der Entwicklung und Reifung des Nervensystems der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Campos et al. 1985, Robinow and White 1988).

Das ELAV Protein und die homologen Vertebraten ELAV-like Proteine (Tab.1) repräsentieren eine Unterfamilie der RRM (RNA Recognition Motif) Superfamilie der RNA-Bindungs-Proteine RBP (Kenan et al. 1991, Robinow und White 1988, Burd and Dreyfuss 1994).

### ***Die Struktur der RNA-Bindungs-Proteine, der BRUNO-like sowie der ELAV-like Proteine***

Charakteristisch für die ELAV Proteine sind die RNP-Motive (Ribonukleoprotein-Komplex) und drei RRM, RNA-Recognition-Motifs (RNA-Erkennungs-Motiv), die eine Kernstruktur einer funktionellen RNA-Bindungs-Domäne (RBD) repräsentieren (Abb.1). RBDs kommen in den RNA-Bindungs-Proteinen in einer oder mehreren Kopien vor (Chambers et al. 1988, Query et al. 1989, Kenan et al. 1991, Burd und Dreyfuss 1994). RNA-Bindungs-Proteine mit RNP-Motiven beinhalten außerdem variable Domänen, die die RNA-Bindung unterstützen (Szabo et al.1991, King et al. 1994).

Die Proteine der ELAV-like Familie weisen konservierte Bereiche auf, die RRM, und eine sehr variable Region, die auch Tether genannt wird, die zwischen dem 2. und 3. RRM im carboxyterminalen Bereich des Proteins liegt und wahrscheinlich mit anderen Substraten interagiert (Gao und Keene 1996). Ein RRM wiederum gliedert sich in mehrere Strukturen. Einerseits gibt es die stark konservierten RNP-Konsensussequenzen RNP1 (bestehend aus 6 Aminosäuren) und RNP2 (bestehend aus 8 Aminosäuren), andererseits besteht die Struktur der RNP Motive zusätzlich aus konservierten, hydrophoben Aminosäuren, die in der Sequenz des RNP-Motivs verstreut vorliegen (Abb.1). Das RNP-Motiv besteht aus einer Domäne aus 90-100 Aminosäuren, die eine RNA-Bindungs-Domäne (RBD) bilden. Die RBDs sind in der Lage, prä-mRNA, mRNA, prä-ribosomale RNA (rRNA) und die kleine nukleäre RNA (snRNA; small nuclear RNA) zu binden (Burd und Dreyfuss 1994).



## Einleitung

---

*Elav-like* Gene und ihre vielfältigen exprimierten Isoformen veranschaulichen ihre funktionelle Bedeutung (Yao et al. 1993).

Die Bedeutung der *Elav* Gene in der Entwicklung, Differenzierung und Regulation des Nervensystems wurde untersucht (Knecht et al. 1995, Good 1997, Robinow and White 1988 und 1991, Suzuki et al. 2000), jedoch ist die Funktion der sequenzspezifischen Bindung der Proteine kaum geklärt. Es gibt jedoch Hinweise, daß alle ELAV-like Proteine über eine ähnliche RNA-Bindungsspezifität verfügen (Liu et al. 1995, Chagnovich et al. 1996, Ma et al. 1996, Chung et al. 1996, Myer et al. 1997). Es hat den Anschein, daß neuronale ELAV Proteine der Mammalia in der Regulation des zytoplasmatischen mRNA-Metabolismus eine Rolle spielen (Gao and Keene 1996). Ebenfalls beim mRNA-Transport, der mRNA-Lokalisation und mRNA-Translation sind die ELAV Proteine essentiell notwendig. Ein weiterer Hinweis in dieser Richtung ergaben Untersuchungen einiger ELAV Proteine bei Vertebraten (Gao und Keene 1996). Die ELAV Proteine der Vertebraten liegen sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch verteilt vor (Barami et al. 1995, Gao und Keene 1996). Die Präsenz der ELAV Proteine an mRNAs, die mit Ribosomen assoziiert vorliegen und an Mikrotubuli lokalisiert sind, läßt vermuten, daß RBPs wahrscheinlich die Prozesse der mRNA Lokalisierung, Translation und RNA-Stabilität beeinflussen (Antic and Keene 1997, St. Johnston 1995). Die Mitglieder der ELAV Familie spielen unter anderem auch bei der Regulation der Zelldifferenzierung eine Rolle (Perron et al. 1999, Akamatsu et al. 1999). Die Bedeutung der RBP in der Embryonalentwicklung wird durch Mutanten in verschiedenen Spezies veranschaulicht, bei denen Störungen der Zelldifferenzierung und des Zellwachstums auftreten (Yao et al. 1993, Lundquist et al. 1996, Ebersole et al. 1996). Ein Beispiel ist das RNA-Bindungs-Protein Bruno (*arrest*), das bei der Ausrichtung der anterior-posterioren Achse von *Drosophila melanogaster* eine Rolle spielt. Eine unkontrollierte Bruno Translation führt zu einer Oozyte und einem Embryo mit zwei posterioren Polen (Ephrussi und Lehmann 1986, Kim-Ha et al. 1995, Webster et al. 1997). Weitere Vertreter der *Bruno* Gen-Familie sind heute bekannt, die evolutionär stark konserviert vorliegen (Good et al. 2000).

### ***Die Bruno-like Gene***

Good et al. (2000) klassifizierten die bisher bekannten Vertebraten *elav-like* Gene neu, die mit dem Gen *Bruno* von *Drosophila melanogaster* eng verwandt sind und daher *Bruno-like* (=BRUNOL) genannt werden. Es sind bisher sechs Vertebraten *Brunol* Gene und seine homologen humanen Gene bekannt: *BRUNOL1*, *BRUNOL2* und *BRUNOL3*, die ursprünglich als *CAGH4* (*BRUNOL1*), *CUG-bp* (*BRUNOL2*), *ETR-3* oder auch *NAPOR* (*BRUNOL3*) bezeichnet wurden (Timchenko et al. 1996, Timchenko 1999, Margolis et al. 1997, Lu et al. 1999, Choi et al. 1998) und die Gene *BRUNOL4*, *BRUNOL5* und *BRUNOL6* (Good et al. 2000). Die *BRUNOL* Gene wiederum lassen sich aufgrund ihrer Sequenzunterschiede und

## Einleitung

---

ihres Expressionsverhalten in zwei Unterfamilien einordnen, die erste mit *BRUNOL2* und *BRUNOL3* sowie die zweite Unterfamilie mit *BRUNOL1*, *BRUNOL4*, *BRUNOL5* und *BRUNOL6*. Bruno Proteine sind bisher auch bei *Xenopus laevis* (ETR-1, -2 und -3 = BrunoL-1, -2 und -3) und *Caenorhabditis elegans* ETR-1 identifiziert worden. Über die Funktionen und das Expressionsverhalten der *BRUNOL4*, *BRUNOL5* und *BRUNOL6* Gene ist nichts bekannt (Good et al. 2000).

Das humane *BRUNOL2* Gen spielt bei der Myotonen Muskel Dystrophie (DM) und bei der Bindung von CUG-Repeats eine Rolle (Timchenko et al. 1996, Timchenko 1999). *BRUNOL3* wiederum weist eine hohe Homologie zu *BRUNOL2* auf und erstaunlicherweise binden beide Proteine dieselbe mRNA wahrscheinlich an den CUG-Repeats (Timchenko et al. 1999, Lu et al. 1999). Good et al. (2000) postulieren, daß *BRUNOL2* und *BRUNOL3* als „Shuttle-Proteine“ fungieren, wahrscheinlich eine wichtige Funktion vieler *BRUNOL* Gene.

Ein weiteres Merkmal der *BRUNOL* Gene ist, daß sie ebenfalls wie die *Elav-like* Gene alternativ gespleißt werden und multiple Protein-Isoformen existieren. So sind vom humanen *BRUNOL2* zwei verschiedene Transkripte bekannt, von *BRUNOL3* sind sogar drei verschiedene Transkripte isoliert worden, die anscheinend durch alternative Promotoren gesteuert werden (Choi et al 1998).

Eine der bisher bekannten Funktionen der Bruno/*BRUNOL* Proteine beruht in der Bindung verschiedener mRNAs und die Formation der RNP-Komplexe, die die Expression des korrespondierenden Genprodukts regulieren. Es ist bis heute jedoch noch nicht klar, wie diese Gene verschiedene Funktionen abhängig von der involvierten mRNA oder dem Zelltyp ausüben können. Ebenso ist unklar, wie verschiedene Bruno/*BRUNOL* Proteine, die an dieselbe mRNA binden, wie z.B. *BRUNOL2* und *BRUNOL3*, über spezifische Funktionen verfügen können (Good et al. 2000). Eine spezifische Wirkung dieser Proteine scheint in diesem Zusammenhang in der Bildung spezifischer Proteinkomplexe begründet zu liegen.

Die vorliegende Arbeit charakterisiert und analysiert ein *brunoL* Gen der Maus und soll zum weiteren Verständnis der *Bruno-like* Gene beitragen.

## **Ziele der vorliegenden Arbeit**

Die Isolierung von Genen, die bei spinocerebellären Erkrankungen des Menschen eine Rolle spielen, ist von großer Bedeutung für das Verständnis der Manifestation der Erkrankung, der molekulargenetischen Prozesse, die zur Entstehung eines Krankheitsbildes führen und der daraus resultierenden therapeutischen Ansätze sowie die pränatale Diagnostik. Bis heute sind eine Reihe an Genen bekannt, wie zum Beispiel *SCA7* (David et al. 1997), *SCA2* (Sanpei et al. 1996) oder *Huntingtin* (The Huntington's disease Collaborative Research Group 1992), die bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen eine Rolle spielen. Ein gemeinsames Charakteristikum dieser Erkrankungen ist die Expansion von Trinukleotid-Repeats (u.a. CAG Repeats) in den betroffenen Genen. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Isolierung und Charakterisierung neuer oder zumindest eines neuen Gens aus dem Gehirn des Menschen, das viele CAG-Repeats aufweist und somit zu einem Kandidatengen für spinocerebelläre Erkrankungen zählen könnte. Durch Screening gehirnspezifischer cDNA-Bibliotheken mit einer 63 CAG-Repeats enthaltenden cDNA Sonde sollten zunächst CAG-Repeats enthaltende cDNA-Klone isoliert werden. Bei Patienten, deren klinischer und genetischer Befund eine Involvierung der bisher genetisch charakterisierten Gendefekte für spinocerebelläre Erkrankungen ausschließt, sollte untersucht werden, ob die CAG-Repeats der isolierten cDNAs bei verschiedenen Patienten polymorph sind. Dieser Befund eines instabilen, polymorphen CAG-Repeats in einem Patientenkollektiv würde als hinreichende Vermutung dienen, daß das Gen bei neurodegenerativen Prozessen eine Rolle spielen kann. Es konnten 16 cDNA-Klone isoliert werden, jedoch nur eine cDNA wies leicht polymorphe CAG-Repeats (13 und 16 CAG Repeats) auf, die in dieser Arbeit näher untersucht wurde.

Die gesamte cDNA des Gens sollte durch Screening humaner gehirnspezifischer cDNA-Bibliotheken vervollständigt werden. Mittels Northern Blot Analyse sollte die Expression des Gens im Menschen untersucht werden. Eine chromosomale Lokalisation des Gens sollte anhand einer FISH-Hybridisierung erfolgen, um zu klären, ob das Gen in einem Chromosomenabschnitt lokalisiert ist, in dem eine genetisch bedingte neurodegenerative Erkrankung kartiert wurde. Weiterhin sollte das homologe Maus Transkript isoliert und dessen Expression charakterisiert werden. Durch RT-PCR, Northern Blot Analyse und *in situ* Hybridisierungen sollte die Expression in adulten Mäusen und in bestimmten Maus-Mutanten untersucht werden. Ebenfalls mittels RT-PCR und „*whole mount in situ*“ Hybridisierungen sollte das embryonale Expressionsmuster im Verlauf der Entwicklung des zentralen Nervensystems untersucht werden. Das Maus Gen sollte isoliert und die Struktur bestimmt werden. Sollte es der zeitliche Rahmen ermöglichen, waren Genkonstrukte für transgene oder Knock out Mäuse vorgesehen, die eine funktionelle Analyse des Maus Gens ermöglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Lösungen und Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid 40 % (w/v, 19:1)	Gibco BRL, Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP)	Fluka, Deisenhofen
Agar	Fluka, Deisenhofen
Agarose	Gibco BRL, Karlsruhe
Alkalische Phosphatase	NEBiolabs, Schwalbach/Taunus
Ammoniumacetat	Fluka, Deisenhofen
Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen GibcoBRL, Karlsruhe
Anti-Digoxigenin-Antikörper konjugiert	Boehringer Mannheim, Mannheim
Bacto-Trypton, Bacto-Pepton	Difco, Detroit, USA
Bacto-Yeast-Extract	Difco, Detroit, USA
Big-Dye Terminator Mix	Applied Biosystems
BluoGal	Biomol, Hamburg
Blocking Reagenz	Boehringer Mannheim, Mannheim
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Baker, Deventer, NL
Dextransulfat	Pharmacia, Freiburg
Diethyl-dicarbonat (DEPC-Ersatz)	Fluka, Deisenhofen
Dimethylformamid	Sigma, Deisenhofen
Dithithreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
1-kb DNA-Längenstandard	GibcoBRL, Karlsruhe
DNA-Ligase	MBI, St. Leon-Rot



## Material und Methode

---

dNTPs	Pharmacia, Freiburg
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ficoll 400	Pharmacia, Freiburg
FKS	GibcoBRL, Karlsruhe
Formaldehyd	Fluka, Deisenhofen
Formamid	Fluka, Deisenhofen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco, Detroit USA
IPTG	Biomol, Hamburg
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
Klenow-Enzym	Pharmacia, Freiburg
Lachs-Spermien-DNA	Sigma, Deisenhofen
Lithiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
4-Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid (NBT)	Fluka, Deisenhofen
Phenol	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen
Radioaktive Nukleotide	Amersham, Braunschweig
Restriktionsenzyme	MBI, St. Leon-Rot, GibcoBRL, Karlsruhe, NEBiolabs, Schwalbach/Taunus
Ribonuklease A (RNase A)	Sigma, Deisenhofen
Ribonuklease Inhibitor	GibcoBRL, Karlsruhe
Röntgenfilme (Hyperfilm <sup>TM</sup> -MP)	Amersham, Braunschweig

---

## Material und Methode

---

Roticlear	Roth, Karlsruhe
Rubidiumchlorid	Fluka, Deisenhofen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg
Spektinomycin	Sigma, Deisenhofen
Taq DNA Polymerase	Pharmacia, Freiburg
T4-DNA-Ligase	Boehringer Mannheim, Mannheim
T3-RNA Polymerase	Boehringer Mannheim, Mannheim
T7-RNA Polymerase	Boehringer Mannheim, Mannheim
Sp6-RNA Polymerase	Boehringer Mannheim, Mannheim
tRNA	Boehringer Mannheim, Mannheim
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Trypton	Difco, Detroit USA
X-Gal	Sigma, Deisenhofen
X-Phosphat/BCIP	Sigma, Deisenhofen
Xylencyanol	Biorad, München

Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von den Firmen Fluka oder Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt) oder ICN (Eschwege) bezogen.

### **2.1.2      Gebrauchswaren**

Nicht aufgeführte Gebrauchswaren wurden von den Firmen Schütt und Krannich (Göttingen) bezogen.

Blotting-Papier GB 003 und 004	Schleicher & Schüll, Dassel
Einmalfilter Minisart NML	Satorius, Göttingen
Einwegspritzen	Terumo, Italien

## Material und Methode

---

Filterpapier 0858	Schleicher & Schüll, Dassel
Filterpapier Optitran BA-85	Schleicher & Schüll, Dassel
Hybond-C Membran	Amersham, Braunschweig
Hybond-N Membran	Amersham, Braunschweig
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Röntgenfilme	Amersham, Braunschweig

### 2.1.3 Sterilisation

Die Sterilisation von hitzeunempfindlichen Medien und Lösungen erfolgte für 20 Min. bei 120°C und  $10^5$  Pascal in einem Dampfdruckautoklaven (Webco, Bad Schwartau) oder bei hitzeempfindlichen Lösungen durch Sterilfiltration (Porengröße: 20  $\mu\text{m}$ ). Gebrauchswaren wurden für mindestens 2 Std. bei 180°C hitzesterilisiert. Nichtsterile Gebrauchswaren und Lösungen für RNA-Präparationen und RNA-Analysen wurden durch Behandlung mit Dimethyldicarbonat (DEPC-Ersatz) nach 12-24 Std. Inkubation autoklaviert.

### 2.1.4 Puffer und Stammlösungen

Puffer und Lösungen für den routinemäßigen Gebrauch wurden nach Sambrook et al. (1989) hergestellt. Die hierfür benötigten Chemikalien wurden in doppelt destilliertem Wasser gelöst und nach Bedarf autoklaviert oder sterilisiert (2.1.3). Puffer und Lösungen gebrauchsfertiger Kits wurden nach Instruktionen des Herstellers behandelt und eingesetzt.

Acrylamid-Lösung (19:1)	38 % Acrylamid (w/v) 2 % Bisacrylamid (w/v)
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH

## Material und Methode

---

50 x Denhardt's Lösung	1% Ficoll (w/v) 1% Polyvinylpyrrolidon (w/v) 1% BSA, pH 7,0 (w/v)
10 x E-Puffer	33 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 267 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 50 mM EDTA pH 7,3 bis 7,45 mit NaOH
Hybridisierungspuffer I	5 X SSC 5 X Denhardts-lösung 10 % (w/v) Dextransulfat 100µg/ml denaturierte Lachsspermien DNA
Hybridisierungspuffer II	50 % (w/v) Formamid (deionisiert) 10 X Denhardts-lösung 5 X SSPE 2 % (w/v) SDS 100µg/ml denaturierte Lachsspermien DNA
Neutralisierungspuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 5.5 1,5 M NaCl
Natriumphosphatpuffer	0,5 M Natriumphosphat pH 7.2 7 % (w/v) SDS 100µg/ml denaturierte Lachsspermien DNA
Natriumphosphatwaschpuffer	40 mM Natriumphosphat pH 7,2 0,1 % SDS

## Material und Methode

---

NBT-Lösung	75 mg/ml in Dimethylformamid
10 x PBS	130 mM NaCl 7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
PBT	1 x PBS 0,1 % Tween 20 (w/v)
Phagenpuffer	20 mM NaCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM Tris/HCL, pH 7,5
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumacetat pH 7,0
20 x SSPE	3 M NaCl 27,6 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20mM EDTA pH 7,4
Stopp-Mix	0,1 % Bromphenolblau (w/v) 0,1 % Xylencyanol (w/v) 15 % Ficoll 400 (w/v)
5 x TBE	445 mM Tris 445 mM Borsäure pH 8,6 10 mM EDTA
10 x TE-Puffer	100 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA

## Material und Methode

---

TFB I-Lösung	30 mM KAc 100 mM KCL 10 mM CaCl <sub>2</sub> 50 mM MgCl <sub>2</sub> 15 % Glycerin (w/v)
TFB I-Lösung	10 mM NaMOPS 10 mM KCL 75 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % Glycerin (w/v)
X-Gal-(BluoGal) Lösung	50 mg/ml in Dimethylformamid
Waschlösungen	2 X – 0.1 X SSC 0.1 % SDS (w/v)

### 2.1.5 Medien für Bakterienkulturen

LB Medium (pH 7,5)	10 g Trypton oder Pepton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 2 g Maltose
LB <sup>++</sup> -Medium	LB-Medium mit 10 mM MgSO <sub>4</sub> und 0.2 % Maltose (w/v)
LB-SOFT-TOP-Agar	LB-Medium 0,7 (w/v) Agarose
LB/Amp Medien	100 µg/ml Ampicillin
LB/Kan Medien	25 µg/ ml Kanamycin
Amp/IPTG/X-Gal Medien	100 µg/ml Ampicillin/ 833 µM IPTG/0,4 % (w/v) X-Gal

Stammlösungen	100 mg/ml Ampicillin in H <sub>2</sub> O
	25 mg / ml Kanamycin in H <sub>2</sub> O
	0,2 g/ml IPTG in H <sub>2</sub> O
	8 % X-Gal in N',N'-Dimethylformamid

Die LB-Agar-Platten enthielten zusätzlich 7,5 g Agar/l. Die LB-Platten und Medien wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt, autoklaviert und bei 4°C gelagert. Antibiotika und sonstige Zusätze wurden dem Medium bzw. dem Agar erst nach Autoklavieren und Abkühlen auf maximal 60°C in den entsprechenden Konzentrationen dazugegeben.

## 2.2 Biologisches Material

### 2.2.1 Bakterienstämme

Zur Vermehrung von Vektoren bzw. rekomanter DNA wurden folgende *Escherichia coli* Stämme eingesetzt:

<i>Escherichia coli</i>	XL1-blue	Bullok et al. (1987)
<i>Escherichia coli</i>	XL1 blue MRF'	Stratagene, La Jolla USA
<i>Escherichia coli</i>	DH5α	Hanahan (1983)
<i>Escherichia coli</i>	pSURE	Invitogen, Leek NL
<i>Escherichia coli</i>	Top10 F'	Invitogen, Leek NL
<i>Escherichia coli</i>	DH 10B	Life Technologies, Eggenstein
<i>Escherichia coli</i>	NM522	Pharmacia, Freiburg
<i>Escherichia coli</i>	NP66	Pharmacia, Freiburg
<i>Escherichia coli</i>	LE392	Murray et al. (1977)

### 2.2.2 Plasmide, Phagemide und Lambda-Vektoren

pXCR	Dr. Maiwald, Humangenetik Göttingen
pGEM-T easy	Promega, Wisconsin USA

## Material und Methode

---

pZerO <sup>TM</sup>	Invitrogen, Leek NL
pSV SPORT 1	Clontech, Palo Alto USA
pSPORT 1	Clontech, Palo Alto USA
pBluescript II SK-	Stratagene, La Jolla USA
pGATA QuanTox <sup>TM</sup>	Quantum, Montreuil France
pBluescript II SK-	Stratagene, La Jolla USA
pBluescript II KS-	Stratagene, La Jolla USA
pLAWRIST 4/7	Pan et al., RZPD
pCYPAC2N	RZPD.Berlin
Lambda ZAP <sup>TM</sup> II	Stratagene, La Jolla USA
Lambda ExCell	Pharmacia Biotech, Freiburg

### 2.2.3 Synthetische Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma NAPS (Göttingen) mit einer Konzentration von 100 pmol/ $\mu$ l bezogen. Die Orientierung der Primer ist in 5'→3'- Richtung angegeben.

Humane cDNA Primer:

H 32113	CCA CTG GGC AGC CTG CCC
H32F	CCC TGG TCG CCC AGC AGC CCC CAC
H32E	GGA GGA GGG TCT CTG TGG CTG
H32P	CGG CAG CCA TGG TGG CCA TGG
H32R	TGT TGC AGC CAT CAG GGC CTT CTC
H32FF	TGG CCT TCT CTG CAC ATC TGC
H32FP	GCA CGG CAG CCA TGG TGG CCA TGG GGC
H32NP	GTA GGC ACT GTG AGC TGC TAC CAG
HETR-nest	CTG CCG AGC CCG TTG GTA CTG AGG
HETR-race	GTG GCT TAA TCC GTT CAT GTG CCC GGC
TIMATG	ATG AAG GAC CAC GAT GCC ATC AAG CTG
TIMUNTR	AGT ACC AAC GGG CTC GGC AGC AGC CCG



## Material und Methode

---

Humane genomische DNA (PAC)-Primer:

H32PACR	GTG TCC CAA GGC CCC AGC CAG CAC
H32F	CCC TGG TCG CCC AGC AGC CCC CAC

Maus cDNA Primer:

ATG-R	CTG CTC GAA GAT GGG CTT CAG
Ex2-R	GGC ACT CTG GGC CTT CAG
Ex3F	ATG AAC AGG CCG ATC CAG
Ex3-R	CCT CGA CTC TCG CTG TCG
Ex3/4	GAG CTT CCG GTC TCC TCG ACT CTC
Ex7	GCA GGC GGC CCT GGT AGC
Ex13-R	GTG GGA GTG AGC CAG GTC
M32FFF	CGA CAA TCC GGC CAG TGC
M136E-R	GGG GCC TGA GGG CTG CC

Maus Cosmid Primer:

ATG-RRR	CCT GCT CCT GAT GTG GGG
Ex1F1	CTC TGC ACT AGA TGG AGG
Ex1F1N	GGA GTG GCT GGA AAG GGC
Ex1F2	GAG AGG AGC ATG GAC AAG
Ex2F2	GCT GTA TGG GAG GAA GG
Ex3R2	GGA CCT AGG TCT TGA GTC
Ex3R3	CCT GGC GAC CGT GGT GAC
ATG-RR	GAG GCC TGG GGA GTT GAG GGC
ATG-Ex2	GTG CTT TCC TGA CGT ACT GTG
Mcetr-3KR	CTG CCC CTC CTG GCT CCA CAG
Mcetr 6K5R	GCT AAA CAG ATC ACG CCC
Mcetr-KF	GAG TGG GCG GTA GGA GTG GTG
Mcetr-9KR	GCC CTC CAC CTT CAC GCA
McosATG-R	CTG CTC GAA GAT GGG CTT CAG

## Material und Methode

---

McosR	GGT GGT GGG GGC TGC TGG GCG
MCosCAGR2	GCG AGT CCG CCC ACC TGG GC
MCosCAGF2	CCT TCT GTC TCT GCT GCC ACC
3K-1	GCA AGC TGC CAG GGC CTC CTC
3K-2	GAG GTG CCT GCC GGT TGC C
3KFF1	GCA GCT CTG GGC TCA GGC
3KFF2	GCT GTG GCC CTG GTT CTG
6KER-1	GAG GAG CCC TAG GGT GGG GTC
6KF-1	CTC AAC CCC TTA GTG TGA G
6KF-2	CCA AGG CTC TGC ACA TAC
6KFF1	GGC CTG TCA GGT GCT CAC
6KFF2	CTG GGA TGC ATC TGG GAG
6KFFF1	CCA AAA GGA CCA GGA GGC
6KFFF2	GGT ACT TTG CCC TCA AGG
6K4F2	ACA CCT CCC TGT CTG CCC

### Primer Extension Primer:

PE1-N	ACT GAA TGC CCA CAC CCA GCC TTG CAG
PE1-R	TCC AGC CTG GGC AAG GTG GGG CCT GAG
PE2-N	CCT GGC ACT TCC TGT GGG AAG CTC AGC
PE2-R	TCA GTA CTC CTA ATG CCC ATT TTC AGC
TATA1	ACA GAG AGC CAG ATT AAA GGA GTC
TATA2	CTT ATC ACC TGG TGG GTG GAA GCT
TA2-RT	AAG ACC AGC TGC TCT TCT GGG
T2-N	TTC CCC TGA CAT CAG TGA TGT CAG TCT
T2-R	CAC AAC CCG GGC AAG AGC CAC GCC CTC

### Plasmid-Primer:

KS	TCG AGG TCG ACG GTA TC
M13-F	GTA AAA CGA CGG CCA TG
M13-R	GCA AAC AGC TAT GAC CAT G

KS	TCG AGG TCG ACG GTA TC
SK	CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC
Sp6	AGG TGA CAC TAT AGA ATA C
Sp6-Promotor	ATT TAG GTG ACA CTA TAG
SP6-SV Sport1	ATT TAG GTG ACA CTA TAG
T3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG
T7-Promotor	TAA TAC GAC TCA CTA TAG
T7	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C

### **2.2.4 DNA-Bibliotheken**

#### **2.2.4.1 Phagen-Bibliotheken**

##### **2.2.4.1.1 Humane fötale Gehirn-cDNA Bibliothek**

Die cDNA Bibliothek wurde von der Firma Stratagene (La Jolla, USA) bezogen. Zur Herstellung der Bibliothek wurde Abort-Material der 17.-18. Schwangerschaftswoche verwendet. Die Synthese der cDNA erfolgte mit Oligo(dt)-Primern zufällig. Die mittlere cDNA Längen betragen 1,0 kb. Unter Verwendung von EcoR1-„Linkern“ wurde die doppelsträngige cDNA in den Lambda-ZAP<sup>TM</sup> Vektor kloniert.

##### **2.2.4.1.2 Fötale Maus-Gehirn-cDNA Bibliothek**

Die cDNA Bank wurde von der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen. Die Synthese erfolgte unter Verwendung der RNA aus fötalem Gehirn der Maus. Die cDNA wurde mit KpnI und Hind III „Linkern“ in Lambda ExCell Vektor kloniert. Die mittlere Länge der cDNA-Fragmente liegt bei 1,5 kb.

### **RZPD-Filter-Bibliotheken**

Die genomischen und cDNA Bibliotheken des Ressourcen Zentrum/Primäre Datenbank (RZPD, Berlin) wurden kostenlos zur Verfügung gestellt. Die in Vektoren klonierte cDNA bzw. genomische DNA ist in 5 X 5 oder 4 X 4 Quadranten, die wiederum 48 X 48 auf einen Filter aufgetragen sind, auf Nitrozellulose fixiert. Jeder cDNA-Klon einer Bibliothek ist in einem Quadranten doppelt aufgetragen. Die in Vektoren klonierten genomische DNA-Fragmente sind punktuell singular in 4 X 4 Quadranten auf dem Filter aufgetragen. Identifizierte Klone konnten von der RZPD als Bakterien-„Stabs“ bestellt werden.

#### **2.2.4.2.1 RZPD-cDNA Filter-Bibliotheken**

### **Humane-cDNA Filter-Bibliotheken**

#### **Humane fötale Gehirn cDNA-Bibliothek (#507)**

Die humane fötale Gehirn cDNA-Bibliothek wurde von S. Meier-Ewert (Lib.# 507) konstruiert. Aus fötalem Gehirngewebe wurde RNA isoliert, in cDNA transkribiert und mit Sall bzw. NotI Linkern in den Vektor pSport 1 inkloniert. Als Wirtszellen wurden *Escherichia coli* XL1-blue verwendet.

#### **Humane adulte Cerebellum-cDNA-Bibliothek (577)**

Diese humane cDNA-Bank (HBC cDNA, Lib.# 577, konstruiert von B. Korn) wurde aus adultem Cerebellumgewebe hergestellt. Die oligo dT geprimte, synthetisierte cDNA wurde mit Sall/NotI-Linkern in den entsprechend restringierten Vektor pSport 1 direktional kloniert und in *Escherichia coli* DH 10B Zellen transformiert.

#### **Humane adulte Gehirn-cDNA-Bank (#588)**

Die humane adulte Gehirn-cDNA-Bank (Lib.# 588, S. Henze/B. Korn) wurde aus menschlichem Gehirngewebe hergestellt und wie die HBC cDNA Bank (Lib.#577) synthetisiert und konstruiert (Vektor: pSport 1, Wirtszellen: *Escherichia coli* DH 10B Zellen)

### **Maus-cDNA Filter-Bibliotheken**

### **Adulte Mus musculus Gehirn-cDNA-Banken (#510/598)**

Adulte Mus musculus cDNA aus Gehirn-RNA, oligo dT geprimt, mit Sall/NotI-Linkern konstruiert, wurde direktional in den Vektor pSport 1 kloniert. Die durchschnittliche cDNA-Größe beträgt 1,5 kb. Als Wirtszellen dienten *Escherichia coli* XL1-blue Zellen (hergestellt von S. Meier-Ewert, Lib.#510).

Die Maus Gehirn-cDNA-Bank (Lib.# 598), hergestellt von S. Henze und B. Korn, wurde wie die Bank # 510 hergestellt, jedoch dienten als Wirtszellen der Bakterienstamm *Escherichia coli* DH 10B.

### **12 Tage embryonale Maus cDNA-Bank (#523)**

Diese cDNA-Bank (Lib.# 523) wurde von B. Herrmann konstruiert. Die RNA wurde aus 12 Tage alten Mus musculus Embryonen isoliert, und die cDNA wurde wie die cDNA Banken # 510/598 hergestellt. Als Wirtszellen dienten *Escherichia coli* XL1-blue

### **2.2.4.2.2 RZPD-Genomische DNA-Filter-Bibliotheken**

#### **Mausstamm 129/ola' Cosmid-Bank**

Genomische Maus (129/ola') DNA, isoliert aus der Milz, wurde partiell mit MboI restringiert. Die DNA wurde daraufhin in den kompatibel restringierten Vektor Lawrist 7 kloniert und in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  transformiert (Lib.# 121, Burgtorf et al.).

#### **Human PAC(#704)**

Die DNA wurde aus einer Fibroblasten Zelllinie eines Mannes isoliert, mit BamHI partiell verdaut und in den kompatibel restringierten Vektor pCYPAC-2N inkloniert. Als Wirt wurde *Escherichia coli* DH 10B benützt (Lib.# 704, RPCI 1-4, Ioannou et al., 1994).

### **2.2.5 Organ- und Gewebeproben**

Zur Isolierung von DNA und RNA und zur Anfertigung von Organ- und Gewebsschnitten wurde ein Mäusestamm aus dem institutseigenen Tierstall verwendet. Humane Organschnitte wurden von der Neuropathologie des Klinikums Göttingen von Herrn Dr. W. Schulz-Schäfer

## Material und Methode

---

zur Verfügung gestellt. Menschliche DNA wurde aus Vollblut von anonymen Patienten des Institutes für Humangenetik gewonnen von Herrn Dr. F. Laccone und zur Verfügung gestellt.

**NMRI** als Wildtyp verwendet

**Testikuläre Mausmutanten:** **W/W<sup>v</sup>**, ohne testikuläre Keimzellen durch Mutation im c-kit Rezeptor; dadurch verminderte Keimzellproliferation und fehlende Keimzelleinwanderung in die Gonadenanlage (Coulombre und Russell, 1954; Tan et al., 1990).

**Tfm/Y**, Arrest der Spermatogenese in primären Spermatozyten-Stadien aufgrund des defekten Androgenrezeptors (Lyon und Hawkes, 1970; Attardi und Ohno, 1974).

**olt/olt**, Arrest der Spermatogenese in frühen Spermatischen Stadien (Moutier, 1976).

**qk/qk**, Arrest der Spermatogenese in elongierenden Spermatischen Stadien (Bennett et al., 1971).

### 2.3 Methoden

Alle nicht weiter aufgeführten molekularbiologischen Standardmethoden wurden nach Protokollen aus „Molecular Cloning“ (Sambrook et al., 1998) oder „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel et al., 1992) durchgeführt.

#### 2.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

##### 2.3.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Vollblut

Frisches Vollblut, mit einem Volumen von 10 ml, wurde mit 30 ml kaltem Lysispuffer gemischt und 30 Min. unter ständiger leichter Bewegung auf Eis inkubiert bis die Lösung klar wurde. Nach Erythrozytenlyse wurde für 15 Min. bei 4°C und 2.000 X g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Leukozytenpellet wurde in 10 ml Lysispuffer resuspendiert und ebenfalls bei 4°C für 15 Min. bei 2.000 X g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde bis zur vollständigen Abtrennung von Erythrozytentrümmern wiederholt, solange bis ein weißliches Pellet zu erkennen war. Dieses Pellet wurde in 5 ml SE-Puffer resuspendiert, mit 250 µl Proteinase K (1 mg/ml) und 500 µl 10 % SDS vermischt und üN bei 55°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Suspension wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, 1,5 ml gesättigte NaCl-Lösung hinzugefügt, auf einem Vortexer gemischt und bei 3.600 X g bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 2 Vol. Äthanol gefällt. Mit einem Glasstab wurde die DNA aufgerollt, in einem Gefäß mit 70 % Äthanol gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde mit dem Glasstab in ein Eppendorf-Gefäß überführt, in Wasser oder TE-Puffer gelöst und bei 4°C gelagert.

Lysispuffer:                    155 mM NH<sub>4</sub>Cl  
                                      10 mM KHCO<sub>3</sub>  
                                      0,1 mM EDTA  
                                      pH 7,4

SE-Puffer:                     75 mM NaCl  
                                      1 mM EDTA  
                                      pH 8,0

### 2.3.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Geweben

(Hogan et al., 1986)

Das Gewebe (1-2 g) wurden zerkleinert und in 700 µl Lysispuffer unter Zugabe von 35 µl Proteinase K (10 mg/ml) üN bei 55°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Danach wurde 1 Vol. Phenol zugefügt, der Ansatz für 10 Min. geschwenkt und zentrifugiert (10 Min., 10.000 X g). Die wäßrige Phase wurde abgezogen, mit 1 Vol. Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, 5 Min. geschwenkt und zentrifugiert (10 Min., 10.000 X g). Dann wurde der wäßrige Überstand abgenommen und mit 2 Vol. EtOH<sub>abs</sub> und 1/10 Vol. 3M NaAc (pH 6,0) versetzt. Die präzipitierte DNA wurde um einen Glasstab gewickelt und mit 70 % EtOH gewaschen. Die DNA wurde kurz angetrocknet und danach in 100-500 µl 1 x TE Puffer oder H<sub>2</sub>O üN bei 4°C gelöst gelagert.

Lysis-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
	100 mM EDTA
	0,5 % SDS

SE-Puffer	75 mM NaCl
	1 mM EDTA
	pH 8,0

### 2.3.1.3 Isolierung von Plasmid DNA

#### 2.3.1.3.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

##### QIAprep Spin Plasmid Methode

Die Isolierung qualitativ hochwertiger DNA aus Bakterienkulturen, die für Sequenzierungen (2.7.4) eingesetzt werden kann, wurde nach dem Protokoll des „QIAprep Spin Plasmid Kits“ der Firma QIAGEN (Hilden) unter Verwendung der in dem Kit enthaltenen Puffer durchgeführt. Die Methode beinhaltet eine Lyse der Bakterien unter alkalischen Bedingungen (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979) und anschließende Aufreinigung der Plasmid-DNA über eine aus Silika-Gel bestehende Säule.



### **Alkalische Lyse zur DNA-Isolation**

(abgewandelt nach Birnboim und Doly, 1979., modifiziert von Ch. Wilhelm)

Diese kostengünstige Methode eignet sich zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen, die für Sequenzierungen (2.7.4) eingesetzt werden kann.

Eine einzelne Bakterienkolonie wurde mit 4 ml LB-Medium mit Antibiotikum-Zusatz angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Bakterienschüttler geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien bei 4.000 X g für 10 Min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Bakterienpellet auf dem Vortexer vollständig in 100 µl E1 Puffer resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl E2 Puffer hinzugefügt, durch mehrmaliges vorsichtiges Wenden gemischt und für 5 Min. inkubiert. Die Fällung der Proteine, der Bakterien-DNA, Fetten, und Kohlenhydraten erfolgte nach Zugabe von 150 µl E3 Puffer. Nach weiteren 5 Min. bei Raumtemperatur erfolgte eine 15 min. Zentrifugation bei 13.000 X g. Der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand wurde abgenommen und ein zweites Mal für mindestens 15 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde mit zweifachem Volumen 96 % EtOH versetzt und für 2 Min. bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurde für mindestens 15 Min. bei 13.000 X g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 300 µl EtOH (70%) gewaschen und erneut bei 13.000 X g für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet ließ man lufttrocknen und löste es in 30 µl TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

E1-Puffer (Zell-Resuspendierungs-Puffer), pH 8,0	50 mM Tris
10 mM EDTA	
100 µg Rnase/ml	

E2-Puffer (Zell-Lysis-Puffer)	200 mM NaOH
1 % SDS (w/v)	
50 mM EDTA	

E3-Puffer (Neutralisierungs-Puffer)	3,1 M Natriumacetat, pH 5,5
-------------------------------------	-----------------------------

### **2.3.1.3.2 Plasmid-DNA Isolation mit Midi- oder Maxisäulen-Kits**

Zur Isolierung qualitativ hochreiner Plasmid-DNA wurde der „JETSTAR Plasmid Midi- bzw. Maxi-Kit“ der Firma Genomed (Bad Oeynhausen) verwendet. Diese Methode beinhaltet eine modifizierte Form der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) zur Präparation eines zellfreien Lysats und eine anschließende Aufreinigung der Plasmid-DNA über eine Anionenaustausch-Chromatographie. Dazu wurde eine Übernacht-Kultur (LB/Antibiotikum-Medium: 100-150 ml für Midipräparation, 200-300 ml für Maxipräparation) 10-20 Min. bei 6.000 X g zentrifugiert und das Bakterienpellet anschließend in einem Resuspensionspuffer E1, der 100 µg/ml RNase A enthielt, aufgenommen. Nach Zelllysis (E2-Puffer) wurde die Suspension durch E3-Puffer neutralisiert und zentrifugiert (30 Min., 13.000 X g). Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, wurde auf eine äquilibrierte Säule gegeben, die mit einem Anionen-Austausch-Harz bestückt war. Die DNA wurde in einem Waschschrift (E5-Puffer) von Zellmetaboliten gereinigt, anschließend mit einem Elutionspuffer (E6) eluiert, mit 0,7 Vol. Isopropanol versetzt und 30 Min. bei 4°C pelletiert (13.000 X g). Danach wurde die DNA mit einem geeigneten Vol. 70 % EtOH gewaschen und nach Zentrifugation getrocknet, in 100-300 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### **2.3.1.4 Isolierung von Phagen-DNA**

#### **2.3.1.4.1 Herstellung eines Phagen-Minilysats**

Zur Vermehrung der Phagen wurde zunächst ein Minilysat angesetzt. Eine Einzelkolonie des entsprechenden Wirtsbakteriums wurde in 10 ml LB<sup>++</sup> Medium ü.N. kultiviert, die Bakterien für 10 Min. bei 1.000 X g sedimentiert und in 3ml LB<sup>++</sup> Medium resuspendiert. 200 µl dieser Kultur wurden mit 100 µl Phagenstock infiziert. Nach 20 Min. Inkubation bei 37°C gab man 5 ml LB<sup>++</sup> Medium hinzu und inkubierte weitere 2-6 Stunden bei 37°C im Schüttler. Nach sichtbarer Lyse wurden nichtinfizierte Bakterien durch die Zugabe von 50 µl Chloroform unter weiterem Schütteln für 10 Min. abgetötet. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (10 Min., 3.000 X g, 4°C) und das Phagenlysat bei 4°C gelagert.

### 2.3.1.4.2 Präparation von Phagen-DNA

Die Präparation der Phagen-DNA wurde nach dem Protokoll der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt.

Zur Präparation von Phagen-DNA wurden 200 ml LB<sup>++</sup>-Medium mit 2-5 ml Bakterienkultur angeimpft, bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,5 bei 37°C geschüttelt und anschließend mit 2-5 ml Minilysat (~10<sup>9</sup> Phagen) versetzt. Nach der Bakterienlyse wurden die nicht infizierten Bakterien mit 500 µl Chloroform vollständig abgetötet und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (6.000 X g, RT, 10 Min.) sedimentiert. Die sich im Überstand befindende Bakterien-DNA bzw. -RNA wurde mit 800 µl DNase- und RNase- enthaltendem Puffer L1 für 1 Std. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 50 ml eiskaltem Puffer L2 wurde der Ansatz vorsichtig gemischt, 1 Std. auf Eis oder üN bei 4°C schüttelnd inkubiert und anschließend die komplexierten Phagenpartikel mit 6.000 X g bei 4°C für 15 Min. sedimentiert. Das Phagenpellet wurde in 9 ml Puffer L3 resuspendiert. Dem Ansatz wurden 9 ml Puffer L4 zugegeben und anschließend 20 Min. bei 70°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt, 9 ml Puffer L5 vorsichtig zugemischt und 30 Min. mit 15.000 X g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut für 10 Min. mit 15.000 X g bei 4°C zentrifugiert. Das partikelfreie Phagenlysat wurde auf eine mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte Säule (Quiagen-tip 500) aufgetragen, mit 30 ml Puffer QC gewaschen und mit 12 ml Puffer QF eluiert. Die freigesetzte Phagen-DNA wurde mit 0,7 Vol. Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (10.000 X g, 20°C, 30 Min.) sedimentiert. Die DNA wurde zweimal mit 70%igem Äthanol gewaschen, bei RT getrocknet und in 50-100 µl Wasser aufgenommen.

Puffer L1:	300 mM NaCl
QBT-Puffer:	750 mM NaCl
	10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
	50 mM MOPS (pH 7,0)
	0,1 mM EDTA
	15% Ethanol
	0,15% TritonX-100

## Material und Methode

---

QC-Puffer:	1 M NaCl 100 mM Tris-HCl (pH 7,5) 50 mM MOPS (pH 7,0) 10mM EDTA 15% Ethanol 0,2mg/ml BSA 20mg/ml RNaseA 6mg/ml DNaseI
Lysispuffer:	155 mM NH <sub>4</sub> Cl 10 mM KHCO <sub>3</sub> 0,1 mM EDTA pH 7,4
SE-Puffer:	75 mM NaCl 1 mM EDTA pH 8,0

### 2.3.1.5 *In vivo* Excision

Die *in vivo* Excision Methode wurde zur Isolierung von rekombinanter DNA aus vereinzelt Phagenklonen einer menschlichen, fötalen Gehirn-cDNA-Bibliothek (2.2.4.1.1) angewendet. Der Uni-ZAP<sup>TM</sup>-XR Vektor erlaubt eine schnelle Isolierung der rekombinanten DNA, da der darin enthaltene Phagemid pBluescript SK(-) mittels eines ExAssist<sup>TM</sup>- Helfer-Phagen (M13) *in vivo* ausgeschnitten werden kann. Für die *in vivo* Excision wurden 200 µl einer Übernachtskultur des Bakterienstammes *E.coli* XL1-Blue mit 100 µl des unverdünnten Phagenstocks und 1 µl ExAssist<sup>TM</sup> Helfer-Phage für 15 Min. bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml LB-Medium wurde die Suspension für weitere ca. 2-2,5 Std. bei 37°C geschüttelt, und zwar bis eine Lyse eintrat. Nichtinfizierte Wirtsbakterien wurden zur Abtötung für 20 Min. bei 70°C inkubiert. Nach einer 15 Min. Zentrifugation bei 4.000 X g, wurde der Überstand in ein neues, steriles Gefäß überführt. Der erhaltene Stock enthielt den hitzeresistenten Phagemid pBluescript SK(-) mit dem zu untersuchenden DNA-Fragment (Lagerung bei 4°C 1-2 Monate möglich). Zur weiteren Präparation der DNA wurden 200 µl frische Bakterienzellen *E.coli*

XL1-Blue mit 10 µl des Phagenstocks für 10 Min. bei 37°C inkubiert. Auf eine LB/Ampicillin-Agar-Platte (2.1.5) wurden 50-100µl dieses Ansatzes ausgestrichen. Bei 37°C über Nacht wurden die Agar-Platten inkubiert. Die Isolierung der DNA erfolgte wie unter 2.3.1.3.1 beschrieben.

### **2.3.1.6 Isolierung von Gesamt-RNA**

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach dem Protokoll des „Total RNA Isolation Reagent“ Kits der Firma BIOMOL (Hamburg). Auf 1 ml „Total RNA Isolation Reagent“ wurde 10-100 mg (oder 5-10 X 10<sup>6</sup> Zellen) frisches Gewebe gegeben. Anschließend wurde das Gewebe mechanisch homogenisiert und für 5 Min. bei 4°C gelagert, um die vollständige Dissoziation der Nukleoprotein-Komplexe zu ermöglichen. Danach fügte man 0.2 ml Chloroform pro 1 ml „Reagent“ hinzu, schüttelte das Gemisch kräftig und inkubierte erneut bei 4°C für 5 Min.. Das Homogenat wurde bei 4°C und 12.000 X g für 15 Min. zentrifugiert. Nach der Hinzugabe des Chloroforms und der Zentrifugation bildet das Homogenat zwei Schichten, eine untere, die organische Phase aus DNA und Proteinen, und eine obere, wässrige Phase, in der sich die RNA befindet. Das Volumen der wässrigen Phase beträgt ca. 40-50% des gesamten Volumens. Diese wässrige Phase wurde vorsichtig in eine neues, steriles Gefäß transferiert und mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt und für 10 Min. bei 4°C gelagert. Anschließend wurde der Ansatz für 10 Min. bei 12.000 X g zentrifugiert. Die RNA präzipitierte als weißliches Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes; der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das RNA-Pellet wurde zweimal mit 75% Äthanol (1ml Äthanol/ 1 ml Ausgangsvolumen) gewaschen, auf dem Vortexer geschüttelt und anschließend bei 7500 X g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das RNA-Pellet kurz angetrocknet, in 50-100µl DEPC behandeltes H<sub>2</sub>O resuspendiert und bei -70°C gelagert.

## **2.4 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA**

Restriktionsendonukleasen erkennen für sie spezifische kurze DNA-Sequenzmotive von 4 bis ungefähr 10 bp (meist 6). Der DNA-Strang wird innerhalb des Erkennungsmotivs oder in einem Abstand von einigen bp hydrolytisch gespalten, wobei die Schnittstelle je nach Spezifität der Endonuklease glatt oder versetzt sein kann. Reaktionsansätze wurden in der Regel zwischen 20 und 200 µl angesetzt und enthielten pro 10 µl bis zu 1 µg DNA, 5-10 U Enzym und den entsprechend vom Hersteller mitgelieferten Puffer in einer 1 X Endkonzentration. Die Ansätze wurden für 1,5-2 Std. (Plasmid-DNA) bzw. 12-16 Std. (genomische-DNA) bei der optimalen Aktivitätstemperatur der Endonuklease inkubiert.

## **2.5 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren**

### **2.5.1 Horizontal-Elektrophorese von DNA in Agarosegelen**

DNA-Fragmente (2.4) werden zur Analyse nach ihrer Molekülgröße üblicherweise in Agarosegelen (0,5 %-3 %) elektrophoretisch aufgetrennt. Agarose wurde durch kurzzeitiges Kochen in 1 X TBE Puffer verflüssigt und nach Abkühlen (~60°C) mit 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) auf 100 ml Gel versetzt und in die entsprechenden Gelträger gegossen. Die DNA-Ansätze wurde mit 1/10 Vol. Stoppmixlösung versetzt und aufgetragen. Die Proben wurden bei 3-4 V/cm<sup>2</sup> in 1 X TBE Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden durch Interkalierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm oder 312 nm sichtbar gemacht und photographiert. DNA-Längenstandards ermöglichten eine Größenordnung der DNA-Fragmente.

### **2.5.2 Vertikal-Elektrophorese von DNA in Agarosegelen**

Restringierte genomische DNA (2.4) wurde in vertikalen Gelelektrophoresekammern (Glasgerätebau Ochs, Bovenden/Lengler) in 1 X E-Lauf- und Gelpuffer elektrophoretisch getrennt. Die zur Anode offene untere Kammeröffnung wurde durch ein 2 % Agarose-Sockelgel verschlossen. Darüber wurde ein 1,0 % Laufgel gegossen. Die Ansätze wurden mit 10 % (w/v) Stoppmixlösung versetzt und bei 15 Volt über Nacht mit Laufpufferumwälzung elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel für ungefähr 5 Min. in einem geeigneten Volumen 1 x E-Puffer geschwenkt, der Ethidiumbromid (1-2 µg/ml) enthielt. Danach wurde das Gel unter UV-Licht (254 nm) photographiert und die DNA auf eine Membran transferiert.

### **2.5.3 Elektrophorese von RNA in denaturierenden Agarosegelen**

Um die Bildung von Sekundärstrukturen in der RNA durch intramolekulare Wasserstoff-Brückenbindungen zu vermeiden, wurde diese unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurden vertikale Gelelektrophoresekammern verwendet. Für das Trenngel wurden 1,5 g Agarose in 87,5 ml DEPC-H<sub>2</sub>O und 12,5 ml 10 x E-Puffer durch Erhitzen verflüssigt, nach Abkühlen (~60°C) 25 ml einer 37%igen Formaldehydlösung zugefügt und sofort in die vorbereitete Gelkammer gegossen.

Ein Probenansatz enthielt folgende Komponenten:

- 7  $\mu$ l einer RNA-Probe
- 3  $\mu$ l Formaldehydlösung (37 %)
- 8  $\mu$ l deionisiertes Formamid
- 2  $\mu$ l 10 x E-Puffer

Bei einem größeren RNA-Probenvolumen wurden die einzelnen Komponenten im entsprechenden Verhältnis erhöht. Die Ansätze wurden 10 Min. bei 65°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und mit 8  $\mu$ l Stoppmixtlösung, die 0,1  $\mu$ g Ethidiumbromid enthielt, versetzt. Nach Einlaufen der Proben wurde bei 4°C und 6 V/cm<sup>2</sup> mit Laufpufferumwälzung elektrophoretisch aufgetrennt, bis der blaue Farbstoff der Stoppmixtlösung den unteren Gelrand erreicht hatte. Das Agarosegel wurde danach unter UV Licht (254 nm) fotografiert und die RNA auf eine Membran transferiert (2.10.2).

### **2.5.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)**

Die PAGE wurde zur Auftrennung von kleinen DNA-Fragmenten (<500bp) verwendet. Entsprechend der Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente wurden 6-12%ige Polyacrylamidgele hergestellt. Dazu wurde 7,5-15 ml 40%ige Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (19:1) und 10 ml 5 X TBE mit H<sub>2</sub>O auf 50 ml aufgefüllt. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von 250  $\mu$ l 10%igem APS und 50  $\mu$ l TEMED gestartet und ist nach ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur abgeschlossen. Restringierte DNA wurde mehrere Stunden bei 150-250 V aufgetrennt. Nach Beendigung der Auftrennung wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 X TBE/ 10-50  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid) gefärbt und unter UV-Licht fotografiert.

### **2.5.5 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)**

Diese Elektrophorese wurde zur Analyse der Primer-Extension-Analyse (2.13) durchgeführt. Die dabei verwendeten Glasplatten wurden sorgfältig mit Wasser und 70%igem Äthanol gereinigt. Eine Platte wurde mit Repelsilan benetzt und gleichmäßig verrieben. Zur Aufrechterhaltung denaturierender Bedingungen wurde 8 M Harnstoff zum Gelmaterial gegeben. Nach vollständigem Lösen des Harnstoffs in TBE-Puffer wurde die entsprechende Menge Acrylamid hinzugegeben. Die Auftrennung der Proben erfolgte in 8%igen Gelen. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l 10%igem APS und 50  $\mu$ l TEMED auf 80 ml Acrylamid-Lösung wurde die Lösung luftblasenfrei zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Nach einem Vorlauf von 30 Min. bei 1600 Volt in 1 X TBE-Laufpuffer wurden bis zu 7  $\mu$ l der

vorher denaturierten Proben mit 1 µl Stoppuffer (5 Min. bei 95°C, 2 Min. auf Eis) aufgetragen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte für 1,5-4 Stunden bei 1600 V. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel mit einem dünnen Whatman-Papier abgezogen, in Frischhalte-Folie eingewickelt, ein Röntgenfilm (Amersham, Braunschweig) aufgelegt und bei -80°C mindestens 1 Tag exponiert.

**Acrylamid-Lösung:**                   42 g Harnstoff  
  20 ml 5 X TBE-Puffer  
  15 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (19:1)  
  ad 100 ml H<sub>2</sub>O

## **2.6           Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren-Fragmenten**

### **2.6.1       Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte nach dem Protokoll von JETSORB „DNA Extraction from Agarose Gels“ der Firma GENOMED (Bad Oeynhausen). Die zu isolierende Bande wurde mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA unter Verwendung des JETSORB-Systems isoliert. Dieses System macht sich die Eigenschaft von Agarose zunutze, sich in Gegenwart von hohen NaClO<sub>4</sub>-Konzentrationen aufzulösen. Die so freigesetzte DNA bindet an zugesetzte Glaspartikel und ist so von der Agarose abzutrennen und aufzuarbeiten. Gemäß den Angaben des Herstellers wurden die aus dem Gel ausgeschnittenen Banden in ein Reaktionsgefäß überführt, gewogen und pro 100 mg Gel 300 µl des NaClO<sub>4</sub>-haltigen Puffers A1 sowie pro 7,5 µg erwarteter DNA 10 µl JETSORB-Glasmilch-Suspension zugesetzt. Es wurde 15 Min. bei 50°C und häufigem Mischen inkubiert und die Suspension mit gebundener DNA 30 Sek. bei mindestens 10.000 X g abzentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in 300 µl A1-Lösung resuspendiert und für 30 Sek. bei mind. 10.000 X g zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig dekantiert und das Pellet zweimal mit 300 µl eines salzhaltigen Waschpuffers (A2) gewaschen und abzentrifugiert. Im Anschluß wurde das Pellet für ca.15 Min. bei RT getrocknet. Zur Elution der DNA wurde das trockene Glasmilchpellet in 30-40 µl TE- Puffer/H<sub>2</sub>O aufgenommen und 10 Min. bei 50°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Die Glasmilch wurde dann 1 Min. bei 13.000 X g abzentrifugiert und das Eluat in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese Zentrifugation wurde bis zur vollständigen Entfernung der Glasmilch-Suspensionsreste mehrmals wiederholt.



### 2.6.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Polyacrylamidgelen

Kleine DNA-Fragmente wurden über ein hochprozentiges Agarosegel (2.5.1) oder über ein PAGE (2.5.4) sauber aufgetrennt und isoliert. Mit einem Skalpell schnitt man die DNA aus dem PAGE und zerkleinerte das Gelstück in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß durch mechanische Kräfte. Durch die Zugabe von 300-500 µl bidestilliertem H<sub>2</sub>O wurde die DNA über Nacht bei 37°C unter Schütteln eluiert. Die Gelmatrix wurde durch Zentrifugation (15 Min, 12.000 X g) abgetrennt. Der Überstand wurde mit 1 Vol. Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert. Anschließend wurde die DNA mit 1/10 Vol. 3 M NaAc (pH 4,8) und 2,5 Vol. 100%igem Äthanol für 10 Min. bei -80°C gefällt, 30 Min. bei 12.000 X g pelletiert, mit 70%igem Äthanol gewaschen, getrocknet und in 10-30 µl bidestilliertem H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

#### 2.7.1 Ligation von restringierten DNA-Fragmenten

Zur Klonierung wurden DNA-Fragmente mit spezifischen Restriktionsenzymen geschnitten (2.4), gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.5), isoliert (2.6) und anschließend in Vektoren (2.2.2) ligiert. Diese Plasmide enthalten Polylinkerregionen bzw. „MCS“ (multiple cloning sites) mit Restriktionsschnittstellen von häufig verwendeten Endonukleasen. Zur Klonierung eines DNA-Fragmentes in das Plasmid wurden 1 oder 2 Schnittstellen der MCS, die den flankierenden Schnittstellen des DNA-Fragments entsprachen, durch restriktionsenzymatische Spaltung geöffnet. Durch eine alkalische Phosphatase-Behandlung der geöffneten Schnittstelle des linearisierten Plasmids wurde eine Religation desselben verhindert. Dazu wurden ca. 1 µg Vektor mit 1 µl (5 „Units“) alkalischer Phosphatase (NEBiolabs, Schwalbach) und Phosphatasepuffer (vom Hersteller mitgeliefert) in 10 µl Ansätzen 1 Std. bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde danach in 2,5 Vol. 100%igem Äthanol und 1/10 Vol. NaAc (Natriumacetat, pH 4,8) gefällt, zentrifugiert und in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O bidest. gelöst. Die Ligation wurde nach Angaben des Herstellers über Nacht bei 4°C, 16°C oder Raumtemperatur für 1-2 Std. in einem 10 µl Ansatz durchgeführt:

<b>Standard-Ligationsansatz</b>	0,05 - 0,1 µg Vektor-DNA
	1-10 x molarer Überschuß DNA-Fragment
	1 µl 10 x Ligationspuffer
	1 µl T4-DNA-Ligase (1-10 U)

### 2.7.2 Ligation von PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten

PCR-Produkte (2.8) wurden durch sogenannte TA-Ligation (TA: Thymidin – Adenin) kloniert. Die in den PCR Ansätzen verwendeten Taq-Polymerasen können in den Elongationszyklen ein einzelnes Desoxyadenosin am 3'-Ende amplifizierter DNA-Fragmente anfügen, was eine TA-Ligation in den pGEM-T EASY Vektor (Promega) erleichtert. Dieser Vektor weist eine geöffnete Insertionsschnittstelle innerhalb der „MCS“ auf, die an beiden Seiten ein 3'-überhängendes Thymidin enthält.

Der Vektor pXCR (Dr. Maiwald, Humangenetik, Göttingen) ermöglicht es durch die restriktionsenzymatische Spaltung mit dem Enzym XcmI freie Thymidin-Überhänge zu generieren, die dann zur Ligation eines PCR-Produkts zur Verfügung stehen.

## 2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(Saiki et al., 1985)

Die PCR an Plasmid-DNA wurde für die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente verwendet, die nicht durch restriktionsenzymatische Spaltung isoliert werden konnten. Mit der Methode der PCR werden DNA-Matrizen exponentiell amplifiziert. Die DNA wurde zuerst durch Hitze denaturiert (Denaturierung) und einzelsträngig gemacht, um eine Anlagerungsreaktion („Annealing“) mit sequenzspezifischen Primern an die DNA-Matrize für eine hitzestabile Polymerase zu ermöglichen. Die Polymerase ist in der Lage, sich an freie 3'-DNA-Enden anzulagern und füllt in einer ganz spezifischen Kettenreaktion (in Richtung 5' nach 3') die Einzelstränge zu Doppelsträngen auf („Elongation“). Die häufig verwendete Taq DNA Polymerase der Firma Perkin Elmer verfügt über einen hitzelabilen Inhibitor, der während der Denaturierung inaktiviert wird, womit eine „Hot Start-PCR“ durchgeführt werden kann.

### 2.8.1 PCR-Technik an rekombinierter und genomischer DNA

In der Regel wurde zur Amplifikation von Plasmid-DNA oder genomischer DNA ein Standard-Ansatz mit folgenden Komponenten hergestellt:

1 ng–100 ng Plasmid-DNA/ 1µg genomische DNA  
10 pmol Forwardprimer  
10 pmol Reversprimer  
5-10 mM dNTPs  
2,5 µl 10 x Polymerase Puffer  
1-8 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
0,2 µl Taq DNA Polymerase (5 U/µl)  
ad 25 µl mit H<sub>2</sub>O

Um das Verdunsten von Wasser zu vermeiden, wurde der Reaktionsansatz mit 1-2 Tropfen Mineralöl überschichtet und die DNA in einem Thermocycler TC-1 der Firma Perkin Elmer Cetus (Überlingen) über 30 Zyklen amplifiziert. Vor Beginn des ersten Zyklus wurde für 5 Min. bei 95°C denaturiert. Die Reaktionsbedingungen sind von verschiedenen Parametern abhängig. Sie richten sich unter anderem nach der Länge der zu amplifizierenden Sequenz, nach der spezifischen „Annealing“-Temperatur der eingesetzten Primerpaare und wurden für jede Primerkombination optimiert. Nach Abschluß der Zyklen wurde ein verlängerter Elongationsschritt von 5-10 Min. (72°C) zur abschließenden Doppelstrangsynthese einzelsträngiger DNA-Fragmente angefügt. Zur Kontrolle des PCR-Produkts auf Spezifität und Größe wurde 5 µl des Reaktionsansatzes auf ein Agarosegel (2.5) aufgetragen.

### 2.8.2 Reverse PCR (RT-PCR)

Die Methode der „reversen PCR“ basiert auf der Umschreibung von mRNA in cDNA (copy oder komplementäre DNA) durch das Enzym reverse Transkriptase. Mit Hilfe der RT-PCR können kleinste Transkriptmengen in Geweben detektiert werden. Für die reverse Transkription mit anschließender PCR wurde das „Titan™ One Tube RT-PCR-System“ (Boehringer Mannheim) verwendet. Dieses System ermöglicht es, die Expression einzelner Gene in bestimmten Geweben oder embryonalen Entwicklungsstadien zu analysieren. Die Kontaminationsgefahr ist bei diesem System auf ein Mindestmaß reduziert. Alle eingesetzten Materialien mußten „RNasefrei“ (DEPC-Behandlung der Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße [2.1.3]) sein, und die Primer für die cDNA-Synthese wurden so gewählt, daß sie eine Bindung

## Material und Methode

---

nur an mRNA gewährleisteten und eine Amplifikation genomischer DNA (Kontamination der mRNA und Reagenzien mit genomischer DNA) ausgeschlossen werden konnte Folgende Komponenten wurden für einen RT-PCR-Ansatz pipettiert:

Pipettieransatz:

1 µl	Forward-Primer* (10pmol/µl)
1 µl	Reverse-Primer* (10pmol/µl)
1 µl	GAPDH-Forward-Primer <sup>+</sup> (10pmol/µl)
1 µl	GAPDH-Reverse-Primer <sup>+</sup> (10pmol/µl)
1 µl	dNTPs (10 mM)
2,5 µl	DTT (100mM)
0,5 µl	Rnase-Inhibitor (40U/µl)
8,0 µl	5x Puffer
1 µl	RNA (≈1µg/µl)
0,8 µl	Titan-Mix
<u>22,2 µl</u>	H <sub>2</sub> O
40 µl	Ansatz

\*= Bei diesen Primern handelt es sich um sequenzspezifische Primer (TIMATG//Ex3/4)des untersuchten Gens.

<sup>+</sup>= Die Primer der ubiquitär exprimierten Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH) der Maus (M32599) diente als Kontrolle der Integrität der RNA (Sabath, 1990) und PCR-Reaktion.

### PCR-Bedingungen:

Nach einer Inkubation für 30 Min. bei 50 °C erfolgte eine einmalige Denaturierung für 2 Min. bei 94°C. Danach wurden folgende Zyklen durchlaufen:

94°C 30 Sek. 60°C 30 Sek. 68°C 1 Min.		10 Zyklen
94°C 30 Sek. 60°C 30 Sek. 68°C 1 Min. + 10 Sekunden Zyklusverlängerung		25 Zyklen
68°C 7 Min.		1 Zyklus

Die PCR-Produkte wurden auf einem 2 %igen (w/v) Agarosegel aufgetragen (2.5.1) und anhand der Fragmentgrößen identifiziert. Zur Kontrolle wurde ein beliebiges DNA-Amplifikat in den pGEM-T EASY Vektor kloniert und die Sequenzanalyse durchgeführt (2.8.4).

### **2.8.3 5'-RACE-PCR**

Zur Synthese der cDNA der 5' nichttranslatierten Region der humanen Gens Hetr-1 wurde der „Marathon Ready™ cDNA Kit“ der Firma Clontech (Palo Alto, USA) verwendet. Die mitgelieferte cDNA des Kits ist so konstruiert, daß mit Hilfe vom Hersteller gelieferter Primer und bekannter sequenzspezifischer Primer des zu isolierenden Gens eine 5'RACE- oder 3'RACE-PCR durchgeführt werden kann. Nach der Erst- und Zweitstrang cDNA-Synthese aus Poly(A<sup>+</sup>)-RNA wurden spezielle „Linker“ an die cDNA ligiert, um eine anschließende PCR zu ermöglichen. Zur Erleichterung der „blunt-end“-Ligation an beide Enden der doppelsträngigen cDNA, sind diese Adapter partiell doppelsträngig und am 5'-Ende phosphoryliert. Die Sequenz des einzelsträngigen „Linkers“-Anteils ist der des Primers AP1 kolinear, der zusätzlich zum sequenzspezifischen Primer in der anschließenden PCR eingesetzt wird. Die AP1-Bindungsstelle wird deshalb ein der ersten Runde des PCR Zyklus dann generiert, wenn die DNA-Synthese vom internen, sequenzspezifischen Primer ausgehend erfolgt ist.

Mit einer Kombination von „Linkern“- und sequenzspezifischen Primern (HETR-race, siehe 2.2.3) wird dann die exponentielle Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments gewährleistet. Um eine ausreichende Amplifikation des PCR-Produkts zu ermöglichen, können für einen zweiten PCR-Schritt sogenannte „nested“-Primer eingesetzt werden, die in 3'-Richtung angrenzend an die ersten Primer liegen. Hierfür setzt man den vom Hersteller mitgelieferten Primer AP2 und einen sequenzspezifischen zweiten Primer (HETR-nest, siehe 2.2.3) ein und amplifiziert cDNA-Produkt aus der ersten PCR in einer erneuten zweiten PCR. Folgende Ansätze wurden pipettiert:

### 5'Race-PCR-PCR Ansatz

5 µl	Gesamt-Gehirn cDNA
1 µl	AP1-Primer (10 pmol/µl)
1 µl	10 pmol HETR-race
1 µl	dNTPs (2mM)
5 µl	5 X Puffer
1 µl	Taq-Polymerase
<u>36 µl</u>	H <sub>2</sub> O
50 µl	Ansatz

Die Zugabe der Polymerase erfolgte erst nach einem 1 minütigen Denaturierungsschritt bei 94°C. Die PCR wurde für 35 Zyklen unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

94°C	30 Sek.
60°C	1 Min.
68°C	1 Min.

### „Nested“-PCR Ansatz

Folgende Komponenten wurden zusammenpipettiert:

1 µl	5`-RACE-PCR-Produkt
1 µl	AP2-Primer (10 pmol/µl)
1 µl	10 pmol HETR-nest
1 µl	dNTPs (10mM)
10 µl	Q- Puffer-Quiagen
0.5µl	Quiagen Taq-Polymerase
<u>35,5 µl</u>	H <sub>2</sub> O
50 µl	Ansatz

Die PCR wurde erst nach einem einmaligen Denaturierungsschritt für 5 Min. bei 95°C gestartet. Die PCR wurde für 35 Zyklen unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

PCR-Bedingungen:

94°C	30 Sek.
60°C	1 Min.
68°C	1 Min.

AP1-Primer (27-mer): 5'-CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC-3'  
AP2-Primer (23-mer): 5'-ACT CAC TAT AGG GCT CGA GCG GC-3'

Das PCR-Produkt aus der „Nested-PCR“ wurde in einem Agarosegel (2.5.1) aufgetrennt und überprüft. Das DNA-Amplifikat wurde in den pXCR (Dr. Maiwald, Göttingen) kloniert und sequenziert (2.7.4)

### 2.8.4 Nichtradioaktives „Dye Terminator Cycle Sequencing“

Die angewendete Methode zur Sequenzierung von DNA beruht auf dem Kettenabbruchverfahren von Sanger et al. (1977). Die nichtradioaktive Sequenzierung wurde mit dem „Dye Termination Cycle Sequencing Kit“ der Firma ABI (Weiterstadt) in Thermocyclern TC1 der Firma Perkin Elmer Cetus (Überlingen) durchgeführt und mit den automatischen Sequenzanlagen 373A bzw. 377A DNA Sequencer der Firma ABI analysiert. Für die nichtradioaktive Sequenzier-PCR werden 4 unterschiedliche mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte ddNTPs (Didesoxynukleosid-5'-triphosphate) verwendet. Reaktionsansätze von 10 µl enthielten 3 µl Big-Dye Terminator Mix, ca. 1 µg DNA und 10 pmol spezifische Primer. Der Big-Dye Terminator Mix (Applied Biosystems) enthielt: dATP, dCTP, dITP (Desoxyinosin-5'-triphosphat), dUTP (Desoxyuridin-5'-triphosphat), markierte ddNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Tris-HCl, pH 9,0, und modifizierte Taq DNA-Polymerase. Die Ansätze wurden mit Mineralöl überschichtet und nach Denaturierung (98°C, 3 Min.) mit folgendem PCR-Programm sequenziert:

98°C	30 Sek.		25 Zyklen
50°C	15 Sek.		
60°C	1 Min.		

Die Ansätze wurden mit H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt und mit 3 Vol. 100%igem Äthanol und 1/10 Vol. NaAc (3 M, pH 4,8) gemischt. Danach wurde die DNA für 30 Min. bei 13.000 X g zentrifugiert, getrocknet und in 4 µl Formamid-Lösung (1 Vol. 0,5 M EDTA, pH 8,0 und 4 Vol. Formamid) aufgenommen.

### 2.9 Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

(modifiziert nach Mandel und Higa, 1970)

Die Methode dient der künstlichen Erhöhung der Kompetenz von *E.coli*-Zellen, freie DNA aufzunehmen. Dies wird durch Modifikation der Zellwand mit  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{RbCl}$  erreicht. Es wurden 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und üN bei 37°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde am nächsten Tag in 300 ml LB-Medium überführt und bis zu einer  $\text{OD}_{600} \approx 0,5$  inkubiert. Die Bakterien, die sich jetzt in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden 30 Min. auf Eis gekühlt und 10 Min. bei 5.000 X g und 4°C zentrifugiert (Sorvall RC5B). Das Zellpellet wurde vorsichtig in 40 ml TFB I/100 ml Kultur resuspendiert und je nach Bakterienstamm 10-15 Min. auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 Min., 5.000 X g, 4°C) wurde der Überstand vollständig verworfen. Die Bakterien wurden in 4 ml TFB II/100 ml Kultur aufgenommen, in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

TFBI:                    100 mM  $\text{RbCl}$   
                             50 mM  $\text{MnCl}_2$   
                             10 mM  $\text{CaCl}_2$   
                             30 mM KAc (pH5,8)  
                             15 % (w/v) Glycerin

TFBII:                    10 mM  $\text{RbCl}$   
                             75 mM  $\text{CaCl}_2$   
                             10 mM MOPS (pH 7,0)  
                             15 % (w/v) Glycerin

### 2.10 Transformation

Für die Transformation eines Ligationsansatzes (2.7) wurden 200 µl kompetente Zellen ( $10^8$ )



kompetent) auf Eis aufgetaut, mit einer entsprechenden Menge Ligationsansatz vermischt und 30 Min. auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dann bei 42°C für 90 Sek. einem Hitzeschock ausgesetzt und für 5 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 500-800 µl LB-Medium hinzugegeben, die Zellen für mindestens 45 Min. bei 37°C unter Schütteln inkubiert, auf Selektionsplatten ausgebracht und üN bei 37°C inkubiert. Die Bakterienkulturen wuchsen über Nacht, so daß am nächsten Tag Bakterienkolonien zu sehen waren.

### **2.11 Transfertechniken**

#### **2.11.1 Southern-Blotting Technik**

(nach Southern, 1975)

Im „Southern-Blotting“ Verfahren wird denaturierte DNA aus Agarosegelen mit einer diffundierenden Salzlösung durch Kapillarkräfte auf Nylonmembranen (HybondN, Amersham) oder Nitrozellulosefilter (HybondC, Amersham) transferiert. Doppelsträngige DNA in Agarosegelen wurde zur Denaturierung in Abhängigkeit der Gelstärke für 15-40 Min. in Denaturierungslösung und anschließend für 2 X 20 Min. in Neutralisierungslösung geschwenkt. Anschließend wurde das Gel auf ein 20 x SSC getränktes Blotting-Papier gelegt, dessen überhängende Enden in eine mit 20 X SSC gefüllte Wanne ragten. Auf das Gel wurde luftblasenfrei eine Transfermembran, darauf zwei in 2 X SSC getränkte Blotting-Papiere, mehrere trockene Papierlagen und ein Gewicht ( 1 kg) gelegt. Nach 12-16 Std. wurde der Filter abgenommen, Gelreste entfernt und die DNA durch Crosslinken (120 mJ; UV Stratalinker TM 1800, Stratagene, Heidelberg) auf der Membran fixiert oder für mindestens 3 Std. bei 80°C gebacken.

Denaturierungslösung:                   0,5 M NaOH  
  1,5 M NaCl

Neutralisierungslösung:               1,0 M Tris-HCl (pH 7,5)  
  1,5 M NaCl

#### **2.11.2 Northern-Blotting-Technik**

Der Transfer von RNA aus denaturierenden Agarosegelen (2.5.3) auf Nylonmembranen wird als Northern-Blotting Verfahren bezeichnet. Als Transferflüssigkeit diente mit DEPC-Ersatz behandeltes 20 X SSC. Die RNA wurde nach dem 16-20stündigen Transfer durch

Crosslinken (120 mJ; UV Stratalinker TM 1800, Stratagene, Heidelberg) auf dem Filter fixiert. Der Filterabschnitt, auf den der RNA-Standard transferiert worden war, wurde für 15 Min. in 5 % Essigsäure gelegt und dann 10 Min. in Methylenblaulösung (0,04 % in 0,5 M NaAc, pH 5,2) angefärbt. Überschüssiges Methylenblau wurde unter fließendem Wasser solange entfernt, bis die blaugefärbten RNA-Banden sichtbar wurden.

**Methylenblau-Lösung:** 0,04% Methylenblau in 0,5 M NaAc (pH5,2)

### 2.11.3 Dot-Blotting-Technik

Für die Analyse von Digoxigenin (DIG)-markierten Proben (2.11.1.3) wurde einzelsträngige Nukleinsäure mit einem Dot-Blotter punktförmig auf Nitrozellulosefilter aufgetragen. Hierfür wurden DIG-markierte Proben in fünf unterschiedlichen Konzentrationen mit einem Standard aufgetragen. Anschließend wurde die DNA durch Crosslinken (120 mJ; UV Stratalinker TM 1800, Stratagene, Heidelberg) auf der Membran fixiert. Die Membran wurde danach für 1 Min. in P1-Lösung gewaschen, für 30 Min. in P2-Lösung inkubiert und erneut für 1 Min. in P1-Lösung gewaschen. Anti-DIG-Antikörper wurde 1:5000 in P1 Lösung, verdünnt und in dieser Verdünnung wurde die mit DNA fixierte Membran ca. 30 Min. inkubiert.

Danach wurde die Membran erneut zweimal kurz in P1-Lösung gewaschen, für 10 Min. in P3-Lösung vorinkubiert und die Färbereaktion erfolgte in der P3-Färbelösung im Dunkeln für 20 Min.. Anschließend wurde die Membran in P4-Lösung gewaschen und bei RT an der Luft getrocknet. Die Konzentration und Effizienz der Markierung der Sonde konnte durch einen optischen Vergleich mit der aufgetragenen DIG-markierten Kontrollprobe durchgeführt werden.

P1-Lösung	0,1 M Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
P2-Lösung	P1 und 0,5% (w/v) Blocking Reagenz (Boehringer)
P3-Lösung	0,1 M Tris, pH 9,5 0,1 M NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
P3-Färbelösung	10 ml P3 45 µl NBT-Lösung (Boehringer) 35 µl X-Phosphatlösung (Boehringer)

P4-Lösung	10 mM Tris, pH 9,5 1 mM EDTA, pH 8,0
-----------	---

## 2.12 Markierung von Nukleinsäuren

### 2.12.1 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

#### 2.12.1.1 „Random Primer“-Markierung von Nukleinsäuren

(Feinberg und Vogelstein, 1983)

Die DNA-Sonden wurden mit dem „Megaprime™ DNA labeling systems“ der Firma Amersham (Braunschweig) radioaktiv markiert. Das Prinzip der Methode beruht auf einer „random primer“-Markierung, bei der Hexamer-Oligonukleotide an den DNA-Strang anlagern und von dort die Neusynthese des komplementären DNA-Stranges unter dem Einbau von [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP initiieren. Die Markierung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Es wurde 20-50 ng doppelsträngige in H<sub>2</sub>O gelöste DNA in einem Volumen von 30  $\mu$ l mit 5  $\mu$ l „Random-Primer“-gemischt und für 10 Min. bei 95°C denaturiert, danach sofort auf Eis gekühlt. Anschließend pipettierte man folgende Komponenten zusammen:

35  $\mu$ l DNA/„Random Primer“-Gemisch  
10  $\mu$ l Reaktionspuffer  
2  $\mu$ l Klenow-Enzym  
3  $\mu$ l [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP= 30  $\mu$ Ci (3000 Ci/mMol)

Der Reaktionsansatz wurde für mindestens 1 Std. bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Vol. auf 200  $\mu$ l mit ddH<sub>2</sub>O erhöht und, zur Abtrennung nichteingebauter Nukleotide, auf eine zuvor vorbereitete Aufreinigungssäule (MicroSpin™ S-300 HR Column, Amersham Pharmacia Biotech) aufgetragen und für 3 Min. bei 3.000 X g zentrifugiert. Danach konnte die markierte Probe bei 4°C oder -20°C bis zur Verwendung gelagert oder sofort für 10 Min. bei 95°C denaturiert und eingesetzt werden.

#### 2.12.1.2 Radioaktive Endmarkierung von Oligonukleotiden

Die radioaktive 5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden erfolgte mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase (Boehringer). Dabei katalysiert die Kinase den Transfer einer radioaktiven Phosphatgruppe von  $\gamma$ - $^{32}$ P ATP an die 5'-Hydroxylgruppe der synthetischen

Oligonukleotide. Der Ansatz wurde nach folgendem Pipettierschema erstellt:

10 pmol des Oligonukleotids  
1  $\mu\text{l}$  10 X Kinasierungspuffer  
5  $\mu\text{l}$   $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  (3000 Ci/mmol)  
1  $\mu\text{l}$  Polynukleotidkinase (10 U/ $\mu\text{l}$ )  
ad  $\text{H}_2\text{O}$  auf 10  $\mu\text{l}$

Die Inkubationszeit betrug 45 Min. bei 37°C und anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 2  $\mu\text{l}$  0,5 M EDTA (pH 8,0) abgestoppt. Die Aufreinigung der Sonde erfolgte mit dem JETSORB „DNA Extractions“ Kit (Genomed) nach Protokoll. Zum Reaktionsgemisch wurde 200  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  hinzupipettiert und laut Protokoll mit A1 und A2 Lösung aufgereinigt. Die Sonde wurde in einem adäquaten Volumen resuspendiert.

### 2.12.1.3 Nichtradioaktive *in vitro* Transkription von RNA

(nach Feinberg und Vogelstein, 1983, 1984)

Die nichtradioaktive *in vitro*-Transkription von RNA erfolgte nach dem Protokoll „*Whole mount in situ hybridisation*“ IRL Press, Oxford. Hierfür wurde der „DIG-RNA-Labeling Kit“ der Firma Boehringer Mannheim verwendet. Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Einbau Digoxigenin markierter Nukleotide bei der Neusynthese eines RNA-Stranges. Diese DIG-Markierung kann über eine Antikörperreaktion mit einer anschließenden Farbreaktion nachgewiesen werden. Es wurde folgender Ansatz pipettiert:

2  $\mu\text{l}$  10 X Transkription-Puffer  
1  $\mu\text{l}$  0,2 M DTT  
2  $\mu\text{l}$  Nukleotid-Mix (pH 8,0)  
1  $\mu\text{l}$  RNasin (80 U/ $\mu\text{l}$ )  
1  $\mu\text{l}$  SP6, T7 oder t3-Polymerase (10U/ $\mu\text{l}$ )  
1  $\mu\text{g}$  linearisierte DNA  
ad 20  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$

Nach einer Inkubation von 2 Std. bei 37°C wurde 2  $\mu\text{l}$  DNaseI hinzupipettiert und für weitere 15 Min. inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend unter Zugabe von 100 $\mu\text{l}$  bidest.  $\text{H}_2\text{O}$ , 10  $\mu\text{l}$  4 M LiCl und 300  $\mu\text{l}$  100%igem Äthanol bei -80°C für 30 Min. gefällt und für 30 Min. bei 13.000 X g pelletiert. Nach dem Waschen mit 70%igem Äthanol wurde das Pellet getrocknet und in 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert. Die Sonde kann bei -80°C für mehrere Monate gelagert

werden. Die Effizienz der DIG-Markierung wurde mittels eines Dot-Blots (2.10.3) auf Quantität und Qualität der Markierung kontrolliert.

### 2.13 Hybridisierungsmethoden

#### 2.13.1 Hybridisierung <sup>32</sup>P-markierter DNA-Sonden

(Denhardt, 1966, modifiziert)

Die vorbereiteten DNA-bzw. RNA-Filter (siehe 2.10.1/2.10.2) wurden mit der DNA-RNA beladenen Seite ins Lumen zeigend, in Hybridisierungsröhren mit 15 ml Hybridisierungslösung, die 300 µl denaturierte Lachsspermien-DNA (10 mg/ml) enthielt, für 3-4 Std. bei 60-72°C im Rollofen vorhybridisiert. Anschließend wurde die zuvor bei 95°C für 10 Min. denaturierte <sup>32</sup>P-markierte Sonde und 300 µl Lachsspermien-DNA (10 mg/ml) hinzupipettiert. Über Nacht wurde im Rollofen bei 60-72°C hybridisiert. Anschließend wurden die Membranen für 2 X 15 Min. in 2 X SSC bei RT und dann stringent bei 60-70°C (2 X SSC mit 0,1 % SDS) gewaschen. Die Abnahme der radioaktiven Signale wurde mit einem Handmonitorgerät (β und γ Detektor, 122LB, Berthold) verfolgt. Bei Detektion von mehr als ~3 Bq/cm<sup>2</sup> wurden die Filter zusätzlich gewaschen (60-70°C, 0,2 x SSC mit 0,1 % SDS). Die Filter wurden noch feucht in eine Folie eingeschweißt und mit einem Röntgenfilm bei -80°C exponiert.

Hybridisierungslösung I: 6 x SSC  
6 x Denhardts' Lösung  
10 % Dextransulfat  
0,5 % SDS

Hybridisierungspuffer II: 7 % SDS  
1 % BSA  
1 mM EDTA  
250 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

#### 2.13.2 *In situ*-Hybridisierung auf Schnittpräparate

Die *In situ* Hybridisierungs-Methode ist ein direkter Nachweis von RNA in Gewebeschnitten. Dazu wurden Maus-Gehirn- und Maus-Testisschnitte zur Verfügung gestellt. Zur Deparaffinierung wurden die Gewebeschnitte 2 X 10 Min. in Roticlear (Roth, Karlsruhe) gestellt, in einer absteigenden Äthanolreihe (2 Min. 98%, 98%, 70%, 50% + 0,45 % NaCl,

## Material und Methode

---

30% + 0,63 % NaCl) jeweils 1 Min. rehydriert und anschließend für 5 Min. in 1 X PBS gewaschen. Die deparaffinierten Gewebeschnitte wurden in 4%ig frischem Paraformaldehyd, gelöst in 1 X PBS, fixiert und erneut in 1 X PBS für 5 Min. gewaschen. Um ein besseres Eindringen der Hybridisierungsprobe zu erreichen, wurden die Gewebeschnitte 10 Min. bei 37°C mit Proteinase K (10 µg/ml) in TEN (pH 8,0) behandelt. Nachdem die Gewebeschnitte zweimal für 5 Min. in 1 X PBS gewaschen worden waren, erfolgte eine Acetylierung. Hierzu wurden 0,25 % Essigsäureanhydrid in 0,1 M Tris (pH 8,0) gegeben und die Gewebeschnitte 10 Min. in der Lösung unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Die Acetylierung wurde mit 1 X PBS für 2 X 5 Min. gestoppt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte wieder in einer ansteigenden Alkoholreihe (30% + 0,63 % NaCl, 50% + 0,45 % NaCl, 70 %, 90 %, 98 %) für jeweils 1 Min. dehydriert. Die Gewebeschnitte trockneten daraufhin staubgeschützt für ca. 1 Stunde und wurden anschließend in einer feuchten Kammer mit 50% Formamid, 5 X SSC vorinkubiert. Die DIG-markierte RNA-Sonde (2.11.1.3) wurde für die Hybridisierung vorbereitet, indem sie in Hybridisierungslösung verdünnt (~1µg Sonde/ 100 µl Lösung) und bei 55°C vorgewärmt wurde. Es wurde 50-100 µl Sonde auf die Gewebsschnitte pipettiert und mit einer Pinzette ein Deckglas aufgelegt. Es war dabei darauf zu achten, daß zuerst die Negativ-Kontrolle vor der Positiv-Kontrolle pipettiert wurde, um eine Kontamination auszuschließen. Um eine Linearisierung der RNA-Sonde zu gewährleisten, wurden die Objektträger auf 80°C erhitzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C in der feuchten Kammer. Danach wurden die Gewebeschnitte langsam auf RT abgekühlt und mit 2 X SSC bis zum abschwimmen der Deckgläser gewaschen. Ein anschließender Waschschrift in Waschpuffer I bei RT folgte. Dieser Waschpuffer I wurde daraufhin langsam auf 65°C erwärmt und ausgetauscht. Erneut wurden die Gewebeschnitte zweimal für 20 Min. gewaschen. Beim letzten Waschschrift wurde die Waschpufferlösung I auf 37°C abgekühlt und zweimal mit 37°C warmem Waschpuffer 2 ausgetauscht und nachgewaschen. In einem separaten Gefäß erfolgte eine RNase-Behandlung (RNase A 20 µg/ml) in Waschpuffer 2 für 5 Min. bei 37°C. Die Gewebeschnitte kühlten daraufhin auf RT ab und wurden für 15 Min. in Waschpuffer 3, 15 Min. in Waschpuffer 4 und 10 Min. in 1 X TBST gewaschen. Anschließend wurde die Färbereaktion eingeleitet. Die Gewebeschnitte inkubierte man für 15 Min. in TBST mit 10 % FKS (GibcoBRL) und 1% Blockingreagenz (Boehringer) und spülte kurz in TBST ab. Der Anti-DIG-Antikörper wurde verdünnt (1:500 in 1 % FKS und 1 % Blockingreagenz) und 60 µl/Gewebeschnitt aufpipettiert. In einer mit TBST angefeuchten Kammer wurde für mindestens 2 Std. inkubiert. Danach kühlte die Kammer auf RT ab und die Gewebeschnitte wurden in TBST gewaschen, bis zum Abschwimmen der Deckgläser gewaschen. Anschließend wusch man dreimal in TBST je 5 Min. und dreimal in TBST je 10 Min., danach erfolgte ein zweimaliges Waschen mit NTM für 5 Min. Die Farbreaktion erfolgte in frisch angesetztem NTM mit 4,5 µl NBT (Boehringer)/ml NTM und 3,5 µl BCIP (Boehringer)/ml NTM unter Lichtabschluß bei 4°C. Nach wenigen Stunden konnte ein Signal erkannt werden und die Reaktion wurde mit 1 X PBS gestoppt. Die Gewebeschnitte wurden

## Material und Methode

---

fotografiert und mit Meyers Hämalaun für 10 Min. gegengefärbt. Danach wurden die Schnitte für 10 Min. mit bidest. Wasser abgespült, mit 2 % Eosin nachgefärbt, nochmals mit bidest. Wasser gespült und in „Aqua mount“ eingebettet.

Hybridisierungspuffer      5 ml deionisiertes Formamid  
   2,5 ml 20 X SSC(pH 4,5)  
   1,45 ml DEPC-H<sub>2</sub>O  
   1 ml 10 % SDS  
   25 µl t-RNA (20 mg/ml)  
   25 µl Heparin (20 mg/ml)

NTM                                      5 ml 1M Tris-Hcl (pH 9,5)  
   1 ml 5 M NaCl  
   2,5 ml 1M MgCl<sub>2</sub>  
   ad 50 ml H<sub>2</sub>O

10 X PBS                                5,75 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
   1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
   40 g NaCl  
   1 g KCl  
   ad 500 ml DEPC-H<sub>2</sub>O

10 X TBST                                125 ml Tris-HCl (pH 7,5)  
   45 g NaCl  
   5 ml Tween-20  
   ad 500 ml DEPC-H<sub>2</sub>O

TEN                                        5 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0)  
   0,2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)  
   ad 500 ml DEPC-H<sub>2</sub>O

Waschpuffer 1                            5 X SSC  
   50 % Formamid  
   1 % SDS

Waschpuffer 2                            0,5 M NaCl  
   10 mM Tris-Hcl (pH 7,5)  
   0,1 % Tween

Waschpuffer 3	2 X SSC 0,1 % SDS
Waschpuffer 4	0,1 X SSC 0,1 % SDS

Stocklösungen bei -20°C gelagert:

5 µl NBT-Lösung (75 mg/ ml in 70% (v/v) DMF)  
35 µl X-Phosphat (BCIP)-Lösung (50 mg/ ml in DMF)

### 2.13.3 *Whole mount In situ*-Hybridisierung

(nach Wilkinson, 1992)

Die *Whole mount In situ*-Hybridisierung ist eine Methode, mit der die RNA-Expression von Genen in ganzen Organismen oder embryonal unterschiedlich weit entwickelten Organen untersuchen kann. Diese Methode ist geeignet, in Maus-Embryonen der Entwicklungsstadien 7,5 post conception (p.c.) bis 12,5 p.c. die RNA-Expression in einzelnen Organanlagen und schon differenzierten Strukturen nachzuweisen. Hierfür wurde eine DIG-markierte RNA-Sonde (2.11.1.3) zur Hybridisierung eingesetzt. Maus-Embryonen der Entwicklungsstadien 10,5 p.c. und 11,5 p.c. wurden in 1 X PBS präpariert und direkt in Fixierlösung (4 % Paraformaldehyd in 1 X PBS) überführt. Die Fixierung erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde zweimal in PBT bei 4°C gewaschen. Die Embryonen wurden danach langsam in einer Methanolreihe ( 25 %, 50 %, 75 % und zweimal 100 %) für jeweils 5 Min. dehydriert. Auf diese Weise konnten die Embryonen für mehrere Tage gelagert werden. Die Rehydrierung der Embryonen erfolgte in derselben reversen Reihenfolge der Methanolreihe für 5 Min. Anschließend wurden die Embryonen zweimal mit PBT gewaschen. Mit frischem 6%igem Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in PBT wurde die Embryonen für 1 Std. gebleicht. Ein dreimaliges Waschen mit PBT folgte diesem Schritt. Ein Proteinase K-Behandlung (10µg/ml) in PBT wurde danach über 8-15 Min. angewandt. Es wurde anschließend mit einer frisch angesetzten Glycin/PBT-Lösung (2 mg/ml) gewaschen. Es folgten zwei Waschschrte mit PBT für 5 Min. Die Embryonen wurden mit 0,2 % Glutaraldehyd/4 % Paraformaldehyd in PBT für 20 Min. refixiert und daraufhin zweimal für 5 Min. mit PBT gewaschen. Nun wurden die Embryonen in 2 ml Gefäße transferiert und mit 1 ml Vorhybridisierungslösung für mindestens 1 Stunde versetzt. In diesem Stadium können die Embryonen bei -20°C längerfristig gelagert werden. Die Vorhybridisierungslösung wurde verworfen, durch Hybridisierungslösung mit DIG-markierter RNA-Sonde (1 µg/ml) ersetzt



## Material und Methode

---

und über Nacht bei leichtem Schütteln bei 70°C hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die Embryonen mit Waschlösung 1 zweimal bei 70°C für 30 Min. gewaschen. Diese Lösung wurde durch eine 1:1 Waschlösungsgemisch (Waschlösung 1:Waschlösung 2) ersetzt und bei 70°C für 10 Min. geschüttelt. Ein dreimaliger 30 minütiger Waschschrift mit Waschlösung 2 folgte. Zu Waschlösung 2 pipettierte man 100 µl/ml RNase A hinzu und inkubierte 30 Min. bei 37°C. Die Embryonen wurden diesmal mit Waschlösung 3 bei 65°C 30 Min. lang gewaschen. Nun folgte ein dreimaliger Waschschrift mit 1 X Maleinsäure für 5 Min.. Es schloss sich ein erneuter Waschschrift mit 1 X Maleinsäure und 2 % Blockingreagenz (Boehringer) über Nacht an, der am nächsten Tag für 15 Min mit frischer Lösung wiederholt wurde. Danach wurden die Embryonen mit 1 X Maleinsäure, 2 % Blockingreagenz und 20 % FKS behandelt, um ein unspezifisches Binden des Anti-DIG-Antikörpers zu verhindern. Nach einem 30 min. Abkühlen auf 4°C wurden die Embryonen mit 1 X Maleinsäure, 20 % FKS und 2 % Blockingreagenz und verdünntem Anti-DIG-Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde mit 1 X Maleinsäure zweimal für 5 Min. gewaschen, anschließend fünfmal mit TBST für 1 Stunde. In einem letzten Waschschrift vor der Farbreaktion wurde dreimal mit NTMT 10 Min. lang gewaschen.

Die Farbreaktion erfolgte in NTMT mit 4,5 µl NBT/ml und 3,5 µl BCIP/ml. Diese Reaktion wurde jede Stunde kontrolliert und nach 4 Stunden mit PBT gestoppt. Es folgte ein zweimaliger Waschschrift mit PBT für 5 Min. Die Embryonen wurden anschließend schonend in einer Glycerolreihe (30%, 50% und 80% Glycerol in PBT für jeweils einen Tag) dehydriert, fotografiert und bei 4°C gelagert.

Es wurden von den Embryonen Quer- und Sagittalschnitte angefertigt. Hierfür wurden die Embryonen wieder auf die gleiche Weise in einer reversen Glycerolreihe rehydriert, in 30%ige Gelatine eingegossen und mit einem Vibratom (MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen) 70 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträgern fixiert. Die Embryonenschnitte wurden in „Aqua mount“ eingedeckelt und fotografiert. Die Embryonen sind bei 4°C nur 2 bis 3 Wochen lagerbar.

NTMT	5 ml 1M Tris-Hcl (pH9,5) 1 ml 5 M NaCl 50 µl Tween-20 2,5 ml 1M MgCl <sub>2</sub> ad 50 ml H <sub>2</sub> O
10 X PBS	130 mM NaCl 7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,4)

## Material und Methode

---

PBT	1 X PBS 0,1 % Tween-20
10 X TBST	125 ml Tris-HCl (pH 7,5) 45 g NaCl 5 ml Tween-20 ad 500 ml DEPC-H <sub>2</sub> O
Maleinsäure	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl pH 7, 5 (mit NaOH eingestellt)
Prähybridisierungslösung	50 % Formamid 5 X SSC (pH 4,5) 1 % SDS 50 µg/ml t-RNA 50 µg/ml Heparin
Hybridisierungslösung	50 % Formamid 5 X SSC 1 X Denhardts 0,1 % Tween-20 0,1 % Chaps 10 mM EDTA (pH 8,0) 50 µg/ml t-RNA 100 µg/ml Heparin
Waschlösung 1	50 % Formamid 5 X SSC (pH 4,5) 1 % SDS
Waschlösung 2	0,5 M NaCl 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 0,1 % Tween-20
Waschlösung 3	50 % Formamid 2 X SSC (pH 4,5)

### 2.14 „Primer-Extension“-Analyse

Die Methode der „Primer-Extension“ diente zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des Gens *Metr* der Maus und gleichzeitig zur Bestimmung der Länge des 5'-nichttranslatierten Bereichs der mRNA. Als Primer dienten synthetische Oligonukleotide (2.2.,4), welche komplementär zu genomischen DNA-Sequenzen, die nach der Computeranalyse für potentielle Transkriptionsstartpunkte gehalten wurden, waren. Dazu wurde 10 pmol des Oligonukleotids mit  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  ATP am 5'-Ende markiert (2.11.1.2). Das radioaktiv markierte Oligonukleotid wurde nun mit 100  $\mu\text{g}$  Gehirn-Gesamt-RNA bzw. 100  $\mu\text{g}$  Nieren-Gesamt-RNA als Kontrolle in 30  $\mu\text{l}$  1 X Hybridisierungspuffer für 15 Min. bei 69°C inkubiert. Nach dem langsamen Abkühlen auf 48°C wurde das Gemisch für 1,5 Std. bei dieser Temperatur hybridisiert. Anschließend wurden die Primer/RNA-Hybridmoleküle mit 2,5 Vol. Äthanol, 0,1 Vol. 3 M NaAc (pH 4,8) für 30 Min. bei -70°C gefällt und durch Zentrifugation (13.000 X g, 15 Min.) pelletiert. Die Synthese des ersten cDNA-Stranges wurde eingeleitet, indem zu dem Pellet folgende Komponenten pipettiert wurden:

24  $\mu\text{l}$  Reverse Transkriptase-Puffer (Promega)  
12  $\mu\text{l}$  dNTPs (je 10 mM)  
2  $\mu\text{l}$  RNasin (20 U/ $\mu\text{l}$ )  
12  $\mu\text{l}$  DTT (0,1 M, NEBiolab))  
67  $\mu\text{l}$  DEPC-H<sub>2</sub>O  
3  $\mu\text{l}$  Reverse Transkriptase (M-MLV, 200 U/ $\mu\text{l}$ , Promega)  
120  $\mu\text{l}$  Gesamtanzstz

Der Ansatz wurde für 40 Min. bei 42°C inkubiert und danach über die JETSORB-Methode (Genomed, siehe 2.11.1.2) aufgereinigt. Die in 5  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O resuspendierten RNA/cDNA-Moleküle wurden in 4  $\mu\text{l}$  Stopp-Puffer aufgenommen und nach einer 5 min. Denaturierung bei 95°C mit einem Längenstandard auf ein 8%iges PAGE aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte wie unter 2.5.5 beschrieben. Das Gel wurde in Frischhaltefolie eingepackt, ein Röntgenfilm aufgelegt und über Nacht bei -70°C exponiert.

5 X Hybridisierungspuffer    1,5 M NaCl  
50 mM Tris-HCl (pH7,5)  
5 mM EDTA

### **2.15 Computeranalysen**

Zur Analyse von Nukleotidsequenzen wurden Internetprogramme („NCBI, BLAST, Advanced BLAST und BLAST 2 Sequences“ des National Center for Biotechnical Information, <http://www.ncbi>) oder das Programmpaket GCG der GWDG (Göttingen) verwendet.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Charakterisierung partieller *CAGH4/BRUNOL1*- und *etr-1/BRUNOL4* cDNA-Fragmente des Menschen**

#### **3.1.1 Isolierung des *H32* cDNA Fragmentes**

Zur Isolierung CAG-Repeat enthaltender Gene, die im Gehirn exprimiert werden, wurde eine fötale Gehirn-cDNA Bibliothek des Menschen (2.2.4.1.1) unter stringenten Bedingungen bei 65° C gescreent. Die hierfür verwendete Sonde war ein 63 CAG-Repeat beinhaltendes cDNA Fragment, das mithilfe sequenzspezifischer Primer für das *Huntingtin* Gens (The American College of Medical Testing/ American Society of Human Genetics Huntington Disease Testing Working Group 1998) aus genomischer DNA eines Patienten mittels PCR (2.8.1) amplifiziert, isoliert und in den Vektor pBluescript SK- kloniert worden war (2.7). Durch radioaktives Screening von  $2 \times 10^5$  Phagen konnten 16 Phagen-Klone identifiziert werden, die durch *in vivo* Excision (2.3.1.5) aufgereinigt wurden.

Die cDNA-Klone lagen somit im Phagemidvektor pBluescript subkloniert vor und wurden mit den vektorspezifischen Primern T7/T3 (2.2.3) sequenziert. Sequenzanalyse und -abgleich (2.8.4) mittels Internet-Programm Blast Search von NCBI ergab unter anderem bei einem Klon eine hohe Homologie zu den Genen *CAGH4/BRUNOL1* und *etr-1* (*elav-type ribonucleoprotein*) von *Xenopus laevis* (Knecht et al., 1995). Das cDNA-Fragment wurde *H32* genannt.

#### **3.1.2 Die partiellen Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der humanen *etr-1* und *H32* cDNA Fragmente**

Durch restriktionsenzymatische Spaltungen (2.4) wurde eine Restriktionskarte für die isolierte humane *H32* cDNA (3.1.1) ermittelt (Abb.2A), die zur Herstellung von Subklonen verwendet wurde. Da nur sehr seltene Restriktionsenzyme im Klon *H32* schnitten, wurden zur Vervollständigung der Sequenz mehrere sequenzspezifische Oligonukleotide (Abb.2A; 2.2.3) ausgewählt, die schließlich die Sequenzanalyse des Klons *H32* ermöglichten (Abb.3B). Die Länge der cDNA-Sequenz von *H32* beträgt 1735 bp.

Durch einen Abgleich der Nukleotidsequenz mit der NCBI Blast Search Datenbank, konnte eine hohe Homologie zur cDNA Sequenz für *etr-1* (*elav-type ribonucleoprotein*) von *Xenopus laevis* (Knecht et al. 1995) und eine 100%ige Homologie zu der humanen partiellen cDNA Sequenz *CAGH4/BRUNOL1* (Margolis et al. 1997) festgestellt werden. Mithilfe des Internetprogramms ExPASy Translate Tool wurde der offene Leserahmen ermittelt. *H32* besitzt einen offenen Leserahmen, der mit der Aminosäure Alanin an Position 1, Nukleotid 1,

## Ergebnisse

---

startet und dem Stoppkodon TGA, Nukleotid 747, an Aminosäureposition 249 endet. An Nukleotidposition 1722 befindet sich ein Polyadenylierungssignal. Der 3' nichttranslatierten Bereich der *H32* cDNA ist 975 bp groß (Abb.3B).

Der 5' nichttranslatierte und 5' translatierte Bereich mit dem initiierenden Startkodon des Transkriptes fehlten. Northern Blot Analysen (Abb.4B) mit einer *H32* Sonde detektierten ein 4.0 kb großes Transkript, so daß große Bereiche des mRNA Transkriptes fehlten (3.1.3, Abb.4B).

Um den 5'-Bereich der *H32* Sequenz zu vervollständigen, wurden die humane fötale Gehirn-cDNA Bank (2.2.4.1.1) erneut, sowie zusätzlich drei weitere humane RZPD Gehirn cDNA-Bibliotheken (2.2.4.2.1) gescreent. Die dabei durchgeführten Hybridisierungen erfolgten mit einem 317 bp großen *H32* EcoRI/PstI (EcoRI ist eine Vektor-Schnittstelle) cDNA-Fragment (Abb.2A) unter stringenten Bedingungen. Durch das Screening wurde ein weiterer 791 bp großer cDNA-Klon isoliert und sequenziert (2.8.4/ Abb.2B). Sequenzanalysen mit dem Computer Programm EMBL ClustalW Alignment ergaben, daß *H17* im 3' Bereich des cDNA-Fragmentes (Nt 777-791) einen kurzen überlappenden homologen Nukleotidbereich von 14 Nukleotiden mit dem 5'-Bereich der cDNA von *H32* aufweist, die 5' liegende Nukleotidsequenz hingegen neu ist (Abb.3A).

Ein Sequenzvergleich mit der NCBI Gen Datenbank ergab, daß *H17* ebenfalls wie *H32* zu über 80% homolog zu *Xenopus laevis etr-1* ist. So ergab sich die Annahme, daß *H17* und *H32* mRNA-Transkripte ein und des selben Gens darstellen.

Nach der Veröffentlichung der Ergebnisse des Humanen Genom Projektes und der somit zur Verfügung stehenden humanen Genomsequenz und der Arbeit von Good et al. (2000) konnte geklärt werden, daß *H17* und *H32* partielle cDNA-Fragmente unterschiedlicher Gen-Transkripte darstellen. Bei einem Sequenzvergleich stellte sich heraus, daß die *H32* cDNA-Sequenz auf Chromosom 1, während die *H17* cDNA-Sequenz auf Chromosom 18 lokalisiert sind. Den endgültigen Beweis, daß *H32* und *H17* unterschiedliche mRNA-Transkripte darstellen, wurde durch eine Veröffentlichung der cDNA Sequenz „*Similar to etr1*“/*BRUNOL4* von R. Strausberg (NCBI Datenbank, BC001946, Juli 2001) erbracht. Die cDNA „*Similar to etr1*“ ist 2278 Nukleotide groß und kodiert für ein 484 Aminosäuren großes Protein. Es ist zu 99,6% mit dem von Good et al. (2000) aus EST-Klonen hergeleiteten Protein BRUNOL4 identisch. Die DNA Sequenzen beider Transkripte sind auf Chromosom 18 lokalisiert. Die cDNA-Sequenz von *H17* weist zu diesen Sequenzen eine 100%ige Homologie auf.

Da die Human Genome Data Bank bei Anfertigung der Arbeit noch nicht zur Verfügung stand, wurden aufgrund der Northern Blot Analysen (3.1.3/Abb.4A+B) und der überlappenden cDNA-Sequenzen von *H17* und *H32* (2A+B) fälschlicherweise die cDNA-Sequenzen assembliert. Diese falsche Annahme bestimmte die weitere Vorgehensweise der Charakterisierung und Analyse der isolierten humanen cDNA-Fragmente *H32* und *H17* in dieser Arbeit.

## Ergebnisse

---

Die Sequenzanalyse von *H17* zeigte, daß die gesamte *H17* cDNA einen durchgehenden offenen Leserahmen aufweist und weitere kodierende Sequenzen des 5' Bereichs des Gens fehlten. Erneut wurden die humanen Phagen- und RZPD-cDNA-Bibliotheken (2.2.4.1.1/2.2.4.2.1) unter stringenten Bedingungen gescreent. Hierfür erfolgte die Hybridisierung mit dem gesamten 791 bp großen *H17* cDNA-Fragment. Es konnten keine weiteren cDNA-Klone identifiziert werden, die zu einer Vervollständigung des 5' Bereichs der cDNA beigetragen konnten.

Zur Vervollständigung des 5'-Bereichs der cDNA wurde schließlich eine RACE-PCR (2.8.3) durchgeführt. Hierfür wurden zwei Primer, HETR-race und HETR-nest im 5' Bereich der *H17* cDNA ausgewählt (2.2.3/Abb.2B), sowie die mitgelieferten Primer und humane cDNA des „Marathon Ready™“ cDNA Kits der Firma Clontech verwendet. Es wurden die RACE-cDNA-Fragmente *RK-1* und *RG-1* (2.7.2) amplifiziert, isoliert und sequenziert (2.8.4). Bei der Sequenzanalyse der beiden cDNA-Fragmente stellte sich heraus, daß *RK-1* ein verkürztes Subfragment von *RG-1* darstellt, das völlig mit der Nukleotidsequenz von *RG-1* übereinstimmt (Abb. 2B). Zusätzlich ergab ein Sequenzabgleich mit dem NCBI Blast Search dbEST Programm, daß der *EST-Klon Nr.28405* (GenBank Acc: AA325391/ dbEST Id: 966647) eine 100%ige Homologie zu den cDNA-Klonen *RK-1* und *RG-1* aufweist. Der *EST-Klon 28405* ist ein cDNA-Fragment, das aus Gehirn-mRNA (Cerebellum) hergestellt wurde. Die drei cDNA-Fragmente erweiterten die cDNA-Sequenz des *H17* Klons in 5' Region (Abb.2B). An Nukleotidposition 206 konnte das erste putative Translations-Startkodon ATG (Abb.3A) gemäß der Konsensussequenz nach Kozak (1989) unter Zuhilfenahme des ExPASy Translate Tool Programms ermittelt werden.

Die isolierten und assemblierten cDNA-Fragmente *H17*, *RG-1*, *RK-1* und *EST 28405* betragen 1036 bp (Abb.3A) und werden in dieser Arbeit „partielle *etr-1*“ Sequenz genannt. Im 5' Bereich der Sequenz konnten 206 bp 5'untranslatierte cDNA vor dem putativen Transkriptions-Startkodon ATG (Nt 207) identifiziert werden. Ein Sequenzvergleich der „partiellen *etr-1*“, *BRUNOL4* und „Similar to *etr1*“ Sequenzen ergab, daß alle drei Sequenzen den gleichen Transkriptionsstartpunkt nutzen und untereinander zu beinahe 100% identisch sind. Sie sind somit Transkripte eines gemeinsamen Gens.

Unter Verwendung des NCBI Blast Protein Search Programms wurde die Proteinsequenz analysiert und es stellte sich heraus, daß die Transkripte von „Similar to *etr1*“, die „partielle *etr-1*“, *BRUNOL4* sowie *Xenopus laevis etr-1* und *CAGH4/BRUNOL1* zu den putativen RNA-Bindungs-Proteinen gehören, die charakteristische, konservierte Domänen, sogenannte RNPs-Motifs (Ribonukleoprotein-Motive) mit hoch konservierten RNP-Konsensussequenzen (Abb. 3A+B) aufweisen.

Die Analyse aller isolierten cDNA-Fragmente mit der NCBI Human Genom Data Bank kam zu folgenden Ergebnissen: Der cDNA Klon *H32*, 1735 bp groß, ist ein partielles cDNA-Fragment des *CAGH4/BRUNOL1* Transkriptes. Das dafür kodierende Gen gehört zur Familie der *Bruno-like* Gene und ist auf Chromosom 1 lokalisiert. Die isolierten cDNA-Klone *H17*,

## Ergebnisse

---

*RG-1*, *RK-1* und der *EST-Klon 28405* (Abb.2B) hingegen gehören zu einem anderen Gen-Transkript, das „*Similar to etr1*“ oder *BRUNOLA* heißt. Das für diese Sequenzen kodierende Gen gehört ebenfalls zur *Bruno-like* Familie, und die Sequenzen der cDNA sind auf Chromosom 18 lokalisiert.

In dieser Arbeit wurden jedoch alle isolierten cDNA-Fragmente assembliert und irrtümlicherweise als ein zusammengehörendes Transkript behandelt. Diese Tatsache bestimmte den Verlauf der anschließend durchgeführten Experimente.

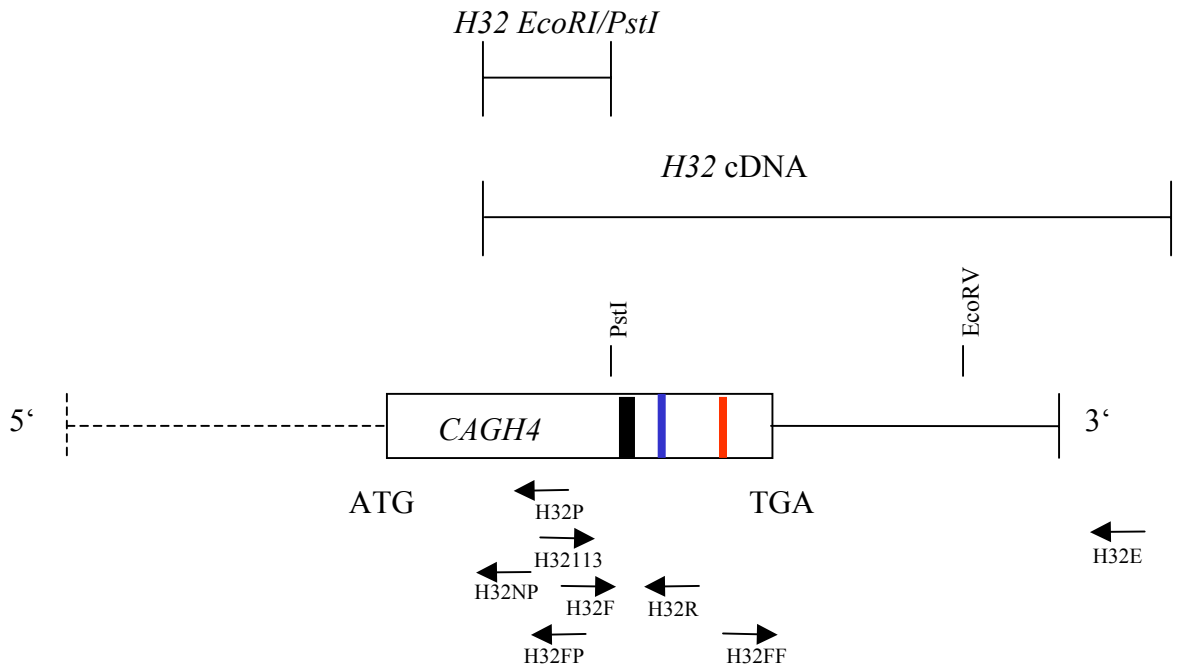
### zu Abb.2A+B (nächste Seite):

Abb2A: Restriktionskarte der *CAGH4/BRUNOLI* und *H32* cDNA. Der aus cDNA Bibliotheken isolierte cDNA-Klon *H32* ist oberhalb der Restriktionskarte eingezeichnet. Abb.2B: Restriktionskarte der „*Similar to etr1*“/partielle *etr-1* cDNA. Der *etr-1* Subklon *H17* und die amplifizierte PCR-Produkte *RG-1*, *RK-1* (Marathon-PCR-Produkte) und der *EST 28403*-Klon sind oberhalb der Restriktionskarte eingezeichnet. Die offenen Balken in Abb2A+B stellen die translatierten Regionen der cDNA Sequenzen *CAGH4* und „*Similar to etr1*“ (*BRUNOLA*) dar, die mit dem Startkodon ATG beginnen und mit dem Stoppkodon TGA enden. Die farblich markierten Regionen stellen die Lage der RNP2 Konsensussequenz (blau) und der RNP1 Konsensussequenz (rot) dar. Der schwarze Balken bei *CAGH4/BRUNOLI* gibt die Lage des CAG-Repeats in der cDNA Sequenz wieder. Die Restriktionsschnittstellen PstI und EcoRV der *partiellen etr-1* cDNA Sequenz und die Lage der spezifischen Primer H32NP, H32P, H32113, H32F, H32FP H32R und H32E sind eingezeichnet. Die Restriktionsschnittstellen der „*partiellen etr-1*“ Sequenz, Sall und EagI sowie die Primer TIMUNTR, TIMATG, Hetr-nest und Hetr-race sind ebenfalls angegeben.

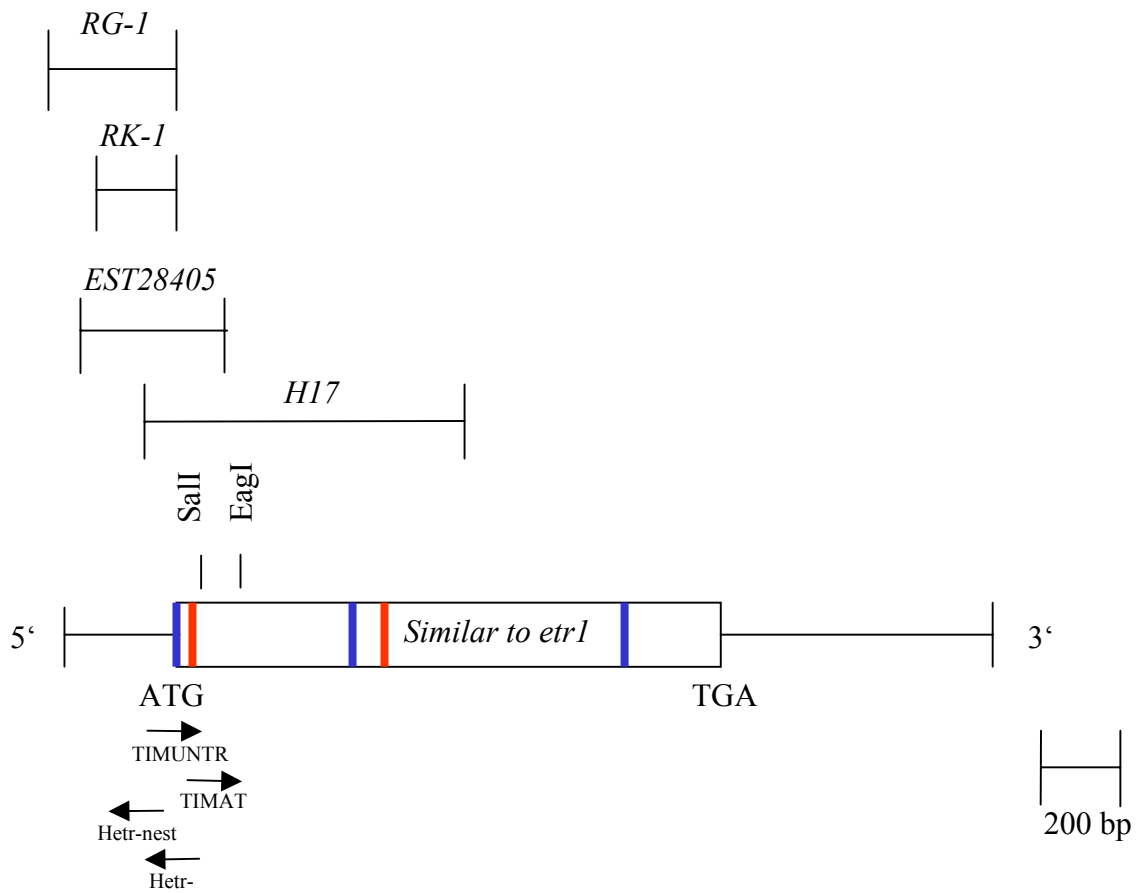


# Ergebnisse

**Abb.2A**



**Abb.2B**



## Ergebnisse

### Abb.3A

#### Humane „partielle *etr-1*“ Sequenz („*Similar to etr-1*“):

	cagagagagagcgcgagcgcgagcgcgagcgcgagagagaagaggagaaaagagagagagcagagagc	61
	gagcggagagcgcgaggtgtagagaaaaccgagggggtgagaacccgagtggtgtatgcgtgt	122
	gcgtgtgtgagcgcgacatgcgagcgcgagagagaggagcgcgagagagtggtgagcgcgaaaagaa	183
	taaaaggaaaagaagatTTTTGTCT	206
	atgtatataaagatggccacgtagcaaacggacag	242
1	M Y I K M A T L A N G Q	
	gctgacaacgcaagcctcagtaccaacgggctcggcagcagccccgggcagtgccgggcac	302
13	A D N A S L S T N G L G S S P G S A G H	
	atgaacggattaagccacagccccggggaacccgctcgaccattcccatgaaggaccacgat	362
33	M N G L S H S P G N P S T I P M K D H D	
	gccatcaagctgttcattgggcagatcccccgcaacctggatgagaaggacctcaagccc	422
53	A I K <u>L F I G O I</u> P R N L D E K D L K P	
	ctcttcgaggagtTTGGCAAATCTACGAGCTTACGGTTCTGAAGGACAGGTTCCACAGGC	482
73	L F E E F G K I Y E L T V L K D R F T <u>G</u>	
	atgcacaaaaggctgcgcccttcctcacctactgcgagcgtgagtcagcgcctgaaggcccag	542
93	<u>M H K G C A F</u> L T Y C E R E S A L K A Q	
	agcgcgctgcacgcagcagaagactctgccccgggatgaaccggccgatccaggtgaagcct	602
113	S A L H E Q K T L P G M N R P I Q V K P	
	gaggacagcgcgagagccgaggaggtagtagctgacctgcccagcccccttcacatagaaaa	662
133	A D S E S R G G S S C L R Q P P S H R K	
	ctcttcggtgggcatgctcaacaagcaacagtcgagggacgacgtgcccgccttttcgag	722
153	<u>L F V G M L</u> N K Q Q S E D D V R R L F E	
	gcctttgggaacatcgaggagtgaccatcctgcgcgggccccgcagcggcaacagcaagggg	782
173	A F G N I E E C T I L R G P D <u>G N S K G</u>	
	tgcgcctttgtgaagtactcctcccacgcccagggcagggcccatcaacgcgatacac	842
193	<u>C A F</u> V K Y S S H A E A Q A A I N A I H	
	ggcagccagaccatgcccgggagcctcgtccagtcctgggtggtaagttcgcgcgacaccgac	902
213	G S Q T M P G A S S S L V V K F A D T D	
	aaggagcgcacgatgcccggcgaatgcagcagatggctggccagatgggcatgttcaacccc	962
233	K E R T M R R M Q Q M A G Q M G M F N P	
	atggccatccctttcggggcctacggcgcctacgctcagggcactgatgcagcagcaagcg	1022
253	M A I P F G A Y G A Y A Q A L M Q Q Q A	
	<b>gccttggtagcggc</b>	
273	A L V A	

**Abb.3A:** Die Nukleotidsequenz (Nummerierung rechts) und die putative Proteinsequenz (Nummerierung links) der „partiellen *etr-1*“ cDNA des Menschen. Die partielle cDNA des humanen *etr-1* weist an Nukleotidposition 206 ein putatives Startkodon auf. Der 3'-Bereich ab Nukleotidposition 1036 fehlt vollständig. Die Aminosäuresequenz, im Einbuchstaben-Kode angegeben, ist unterhalb der cDNA-Sequenz angegeben. Die einzelnen RPN-Konsensussequenzen sind unterstrichen angezeigt. Der 3'-Bereich des Transkriptes fehlt. Die mit dem Klon *H32* überlappende Sequenz ist in fett gedruckten Buchstaben dargestellt.

## Ergebnisse

### Abb.3B

#### **H32 cDNA Sequenz (partielle humane CAGH4/BRUNOL1 Sequenz):**

	<b>gccttggtagcggc</b> tcacagtgcctacctcagccccatggccaccatggctgcccgtgcag	60
1	A L V A A H S A Y L S P M A T M A A V Q	
	atgcagcacatggctgccatcaatgccaatggcctcatcgccacccccatcacccatcc	120
21	M Q H M A A I N A N G L I A T P I T P S	
	tcaggaaccagcaccctcctgccatcgctgccacgcctgtctctgccattccggctgcc	180
41	S G T S T P P A I A A T P V S A I P A A	
	ctggcgtcaacggctacagcccgggtgccaccagcccactgggcagcctgcccctgat	240
61	L G V N G Y S P V P T Q P T G Q P A P D	
	gctctgtatcccaacggggttcaccttaccagcccagagcccggcggcccccgtggac	300
81	A L Y P N G V H P Y P A Q S P A A P V D	
	cccctgcagcaggcctacgcggggatgcagcactacacagcagcctaccagcagcctac	360
101	P L Q Q A Y A G M Q H Y T A A Y P A A Y	
	agcctgggttcacctgcgttcccgcagcctccagcccctggcgcgccagcagcccacac	420
121	S L V A P A F P Q P P A L V A Q Q P P P	
	ccacctcaacagcagcagcagcagcagcagcagcaacagcagcagcaacaagagaaggc	480
141	P P <u>Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q</u> R E G	
	cctgatggctgcaacatcttcatctaccatcttccccaggagttcactgactcagagatc	540
161	P D G C N <u>I F I Y H L</u> P Q E F T D S E I	
	ctccagatgtttgtcccctttggccacgtcatctcagccaaagtcttggttgaccgagcc	600
181	L Q M F V P F G H V I S A K V F V D R A	
	accaatcaaagcaaagtgtttggctttgtgagtttcgacaatccggccagtgccaggct	660
201	T <u>N O S K C F G F</u> V S F D N P A S A Q A	
	gccatccaggccatgaatggcttccagatcggcatgaagcgcctcaaagtccagctaaag	720
221	A I Q A M N G F Q I G M K R L K V Q L K	
	cggcctaaggatgccaaccggccctactga	750
241	R P K D A N R P Y + (249)	
	gggccccaggctctggagatcccagaggaa	780
	ggggcgcctcacaccctcttcccacgactggccccggccctctccgcacacctgccctgg	840
	gccttgactgggttctggggcaaacgctgcttctgctggccccgggggcacaagacaccgg	900
	cccctcccacccccctgcctctctgaaggccatggctatgcttccctggctccaagggc	960
	ccatttctcctagatgcccttttggcctttgtgagggagcaggaacaggctcgaaggc	1020
	tccggggtatctgccttctgctgggctcctgtgacaggccttctgtgccagcgtttgta	1080
	cttgctcccccaacagtgggcctgttctaccctgacagggccccaggagagccgcagggg	1140
	cctgccacacactcccagctcaccctcaccagcctcttccccacattaggggttctt	1200
	ggaagctggctctcactccccctccaccctcagctagaggtaggatatccctgattcctgg	1260
	gctcccagccctaaaactcactgcctcccccaaggccccctcctaaggagggtgtgggg	1320
	gagcctgagggctgccttctgcccagtcagccacagagaccctcctccttccagagga	1380
	aaagactttcccctgaacccttaaaaatgtttacagtctctgctggttccctctgtgtaa	1440
	ataccactaccaccctgcgttatccagcccggcctggccggacgctgccatctc	1500
	tctttctgggagtttagacaatgttgccttggattttttctctctcttaatttctccc	1560
	tttgcttggggggtaattgggtattgggaggaggggtgtggggaggggtcaaggggtt	1620
	gggtgtaaggggagaccggggagtcagtttcagacagttctctatgcttaacttattta	1680
	tttattgcattttacttttaagagttgggtcttttctgtctaaataaagaaaaa	1735

**Abb.3B:** Die Nukleotidsequenz (Nummerierung rechts) und die putative Proteinsequenz (Nummerierung links) des cDNA-Fragmentes *H32*, ein partielles *CAGH4/BRUNOL1*-Fragment des Menschen. Der vollständige 5'-Bereich des Gens und das putative Startkodon fehlen. Die cDNA beginnt mit einem offenen Leserahmen, der für die Aminosäure Alanin kodiert und endet mit dem Stoppkodon TGA an Nukleotidposition 750. Die Aminosäuresequenz ist im Einbuchstaben-Kode unterhalb der cDNA-Sequenz angegeben. Die einzelnen RPN Konsensussequenzen sind unterstrichen angezeigt. Der

Polyglutaminbereich der Aminosäuresequenz ist farblich blau hervorgehoben. Die mit dem Klon *H17* überlappende Sequenz ist in fett gedruckten Buchstaben dargestellt.

### **3.1.3 Analyse der gewebespezifischen Expression von „*Similar to etr-1*“ */BRUNOL4 und CAGH4/BRUNOL1***

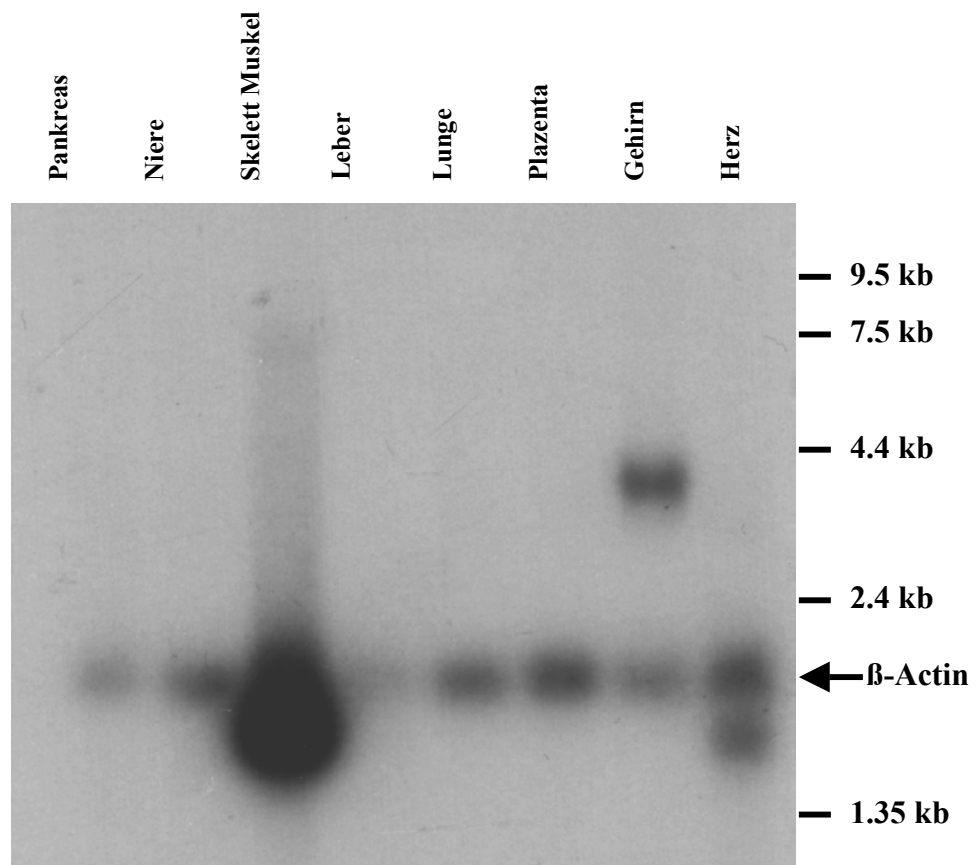
Mittels Northern Blot Analysen (2.11.2) wurde sowohl die Größe der mRNA-Transkripte der partiellen cDNA von *etr-1* und *CAGH4/BRUNOL1*, als auch deren Gewebespezifität in adulten humanen Organen untersucht. Es wurde die poly A<sup>+</sup>-RNA aus verschiedenen menschlichen Organen analysiert. Der Northern Blot Filter Human Multiple Tissue der Firma Clontech (Cat.# 7760-1) wurde für die Hybridisierung eingesetzt. Als Hybridisierungssonden (2.13.1) wurde einerseits der cDNA-Klon *H17* für die Detektion des *etr-1* Transkriptes und andererseits die cDNA-Sonde *H32* für den Nachweis des *CAGH4/BRUNOL1* Transkriptes verwendet. Die *H17*-Sonde ist 791 bp, während die *H32*-Sonde 1735 bp groß ist (3.1.2). Beide Hybridisierungen erfolgten unter stringenten Bedingungen bei 65°C.

Hybridisierte man den Northern Blot mit der *etr-1*-Sonde *H17* unter stringenten Bedingungen, so konnte nur ein prominentes Signal mit der Größe von ca.4.0 kb identifiziert werden (Abb.4A). In der RNA der Lunge, der Niere, des Pankreas, des Skelett-Muskels, der Plazenta, der Leber und des Herzen konnten selbst nach längerer Exposition keine Transkripte von *etr-1* nachgewiesen werden.

Nach der Hybridisierung mit der *CAGH4/BRUNOL1*-Sonde *H32* ist eine Expression von zwei prominenten Signalen von *CAGH4/BRUNOL1* im adulten Gehirn des Menschen nachweisbar (Abb.4B). Die Transkriptgröße des größeren Signal beträgt ca. 4.0 kb, die des kleineren Signals ca. 3.0 kb. Das Signal mit der Transkriptgröße von 3.0 kb ist deutlich schwächer. In der RNA der Lunge, der Niere, des Pankreas, des Skelett-Muskels, der Plazenta, der Leber und des Herzen konnten selbst nach längerer Exposition nachgewiesen keine Transkripte von *CAGH4/BRUNOL1* werden.

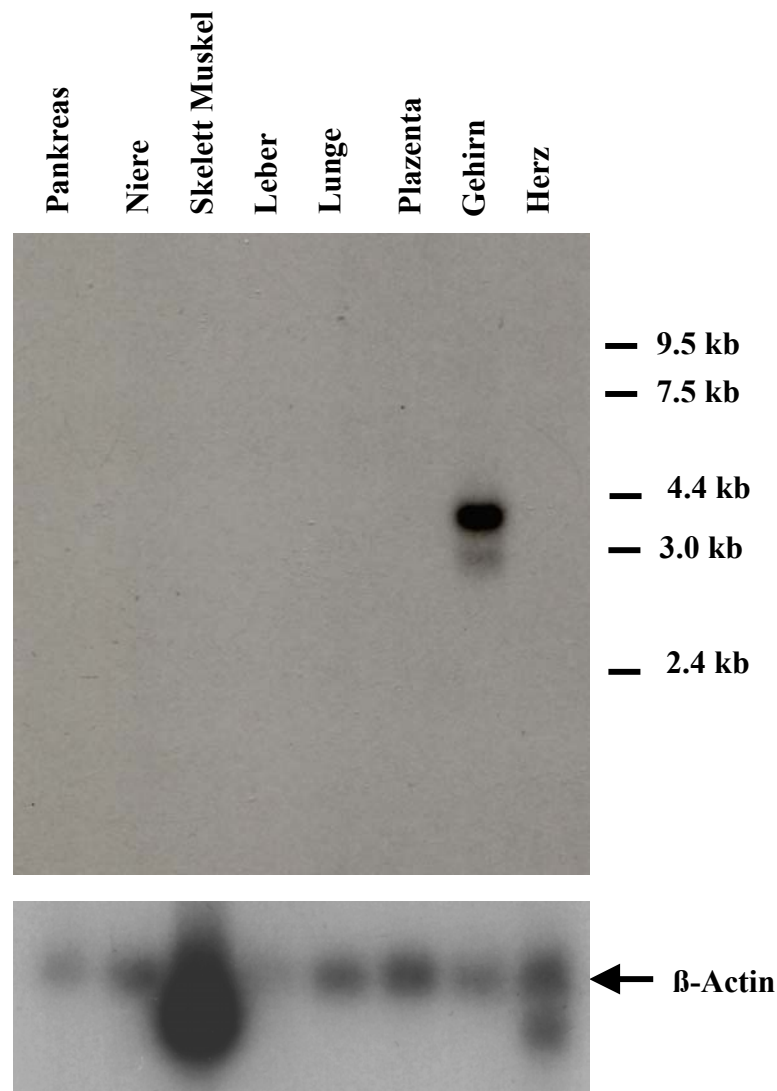
Zur Kontrolle der Integrität der RNA wurde der Northern Blot Filter mit der cDNA des humanen  $\beta$ -Actin ( $\beta$ -Actin; Rapp et al.,1989) hybridisiert.

Abb.4A



**Abb.4A:** Northern Blot Analyse mit 2  $\mu$ g poly A<sup>+</sup> RNA aus verschiedenen Organen des Menschen. Die Hybridisierung erfolgte mit der cDNA-Sonde *H17* (siehe Abb.2B). Ein ca. 4.0 kb großes Transkript in der RNA aus adultem Gehirn wurde detektiert. Die Hybridisierung des Blots mit der  $\beta$ -Actin-Sonde (humanes  $\beta$ -Actin cDNA; Cleveland et al. 1980) zeigte, daß in allen Spuren intakte RNA vorlag.

Abb.4B



**Abb.4B:** Northern Blot Analyse mit 2 µg poly A<sup>+</sup> RNA aus verschiedenen Organen des Menschen. Die Hybridisierung erfolgte mit der cDNA-Sonde *H32* (siehe Abb.2A). Ein ca. 3.0 kb und ein 4.0 kb großes Transkript in der RNA aus adultem Gehirn wurden detektiert. Die Hybridisierung des Blots mit der β-Actin-Sonde (humanes β-Actin cDNA; Cleveland et al.1980) zeigte die Integrität der poly A<sup>+</sup> RNA.

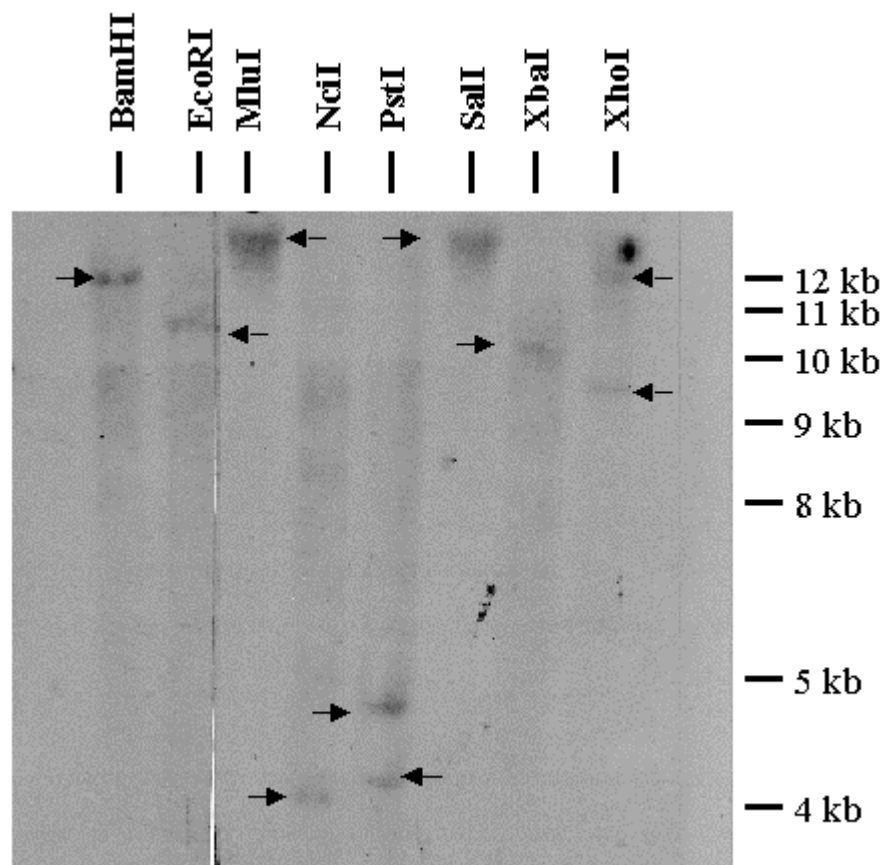
### 3.1.4 Southern Blot Analyse mit genomischer DNA des Menschen

Zur weiteren Charakterisierung des humanen *etr-1* Gens sollte zunächst die Kopienzahl von *etr-1* im Genom des Menschen bestimmt werden, jedoch wurde hierfür die *H32* cDNA Sonde (Abb.2A), die ein *CAGH4/BRUNOLI* Fragment ist, eingesetzt. Die genomische DNA des Menschen wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten und mittels Southern Blot

## Ergebnisse

(2.11.1) analysiert. Die Hybridisierung erfolgte unter stringenten Bedingungen unter Verwendung der radioaktiv markierten cDNA-Sonde (2.12.1.1) *H32* (3.1.2, Abb.2A).

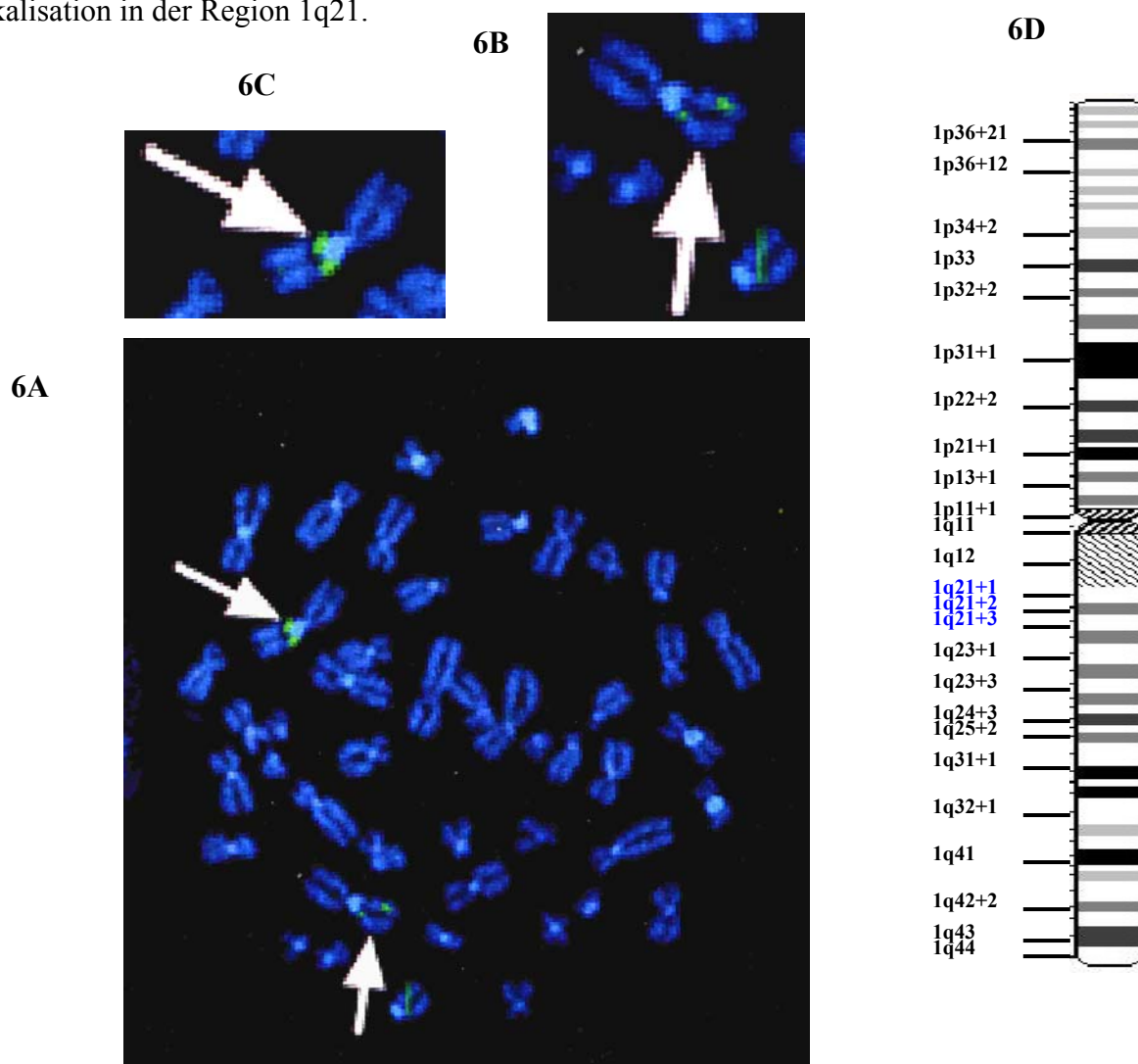
Die Abb. 5 veranschaulicht, wie die cDNA-Sonde mit den restringierten DNA-Fragmenten hybridisiert. Die *H32*-Sonde hybridisiert mit einem >12 kb großen BamHI-, XhoI-, MluI- und Sall-Fragment. Des weiteren hybridisiert die cDNA-Sonde mit einem 11.5 kb großen EcoRI-Fragment, einem 10.5 kb großen XbaI-Fragment und einem 9.7 kb großen XhoI-Fragment. Außerdem hybridisiert die Sonde mit einem ca. 4.8 kb und 4.2 kb großen PstI-Fragment sowie einem 4 kb großem NciI-Fragment. Da die cDNA interne PstI Restriktionsschnittstellen aufweist, erklärt sich die mehrmalige Hybridisierung der cDNA-Sonde mit verschiedenen DNA-Fragmenten. Hingegen konnte in den übrigen Restriktionsansätzen nur ein Fragment detektiert werden, was darauf schließen läßt, daß *CAGH4/BRUNOL1* als „single copy“-Gen im Genom des Menschen vorliegt.



**Abb.5:** Southern Blot Analyse des *CAGH4/BRUNOL1* Gens des Menschen mit genomischer DNA. Jeweils 20 µg menschliche genomische DNA wurde mit den Restriktionsenzymen XhoI, XbaI, Sall, PstI, NciI, MluI, EcoRI und BamHI gespalten und mithilfe eines Southern Blots untersucht. Der Filter wurde mit der humanen cDNA-Sonde *H32* (siehe Abb.2A ) hybridisiert. Die Spaltungsansätze PstI, XhoI und NciI weisen zwei Signale auf, die übrigen hingegen nur ein Signal.

### 3.1.5 Chromosomale Lokalisierung von *CAGH4/BRUNOL1*

Durch die chromosomale Lokalisation sollte untersucht werden, ob im ermittelten Chromosomenabschnitt eine genetische bedingte neurodegenerative Erkrankung lokalisiert ist, die im Zusammenhang mit einer Mutation im Gen stehen könnte. Unter der Verwendung der *H32* cDNA einerseits und andererseits des 150 kb großen humanen genomischen Klones *H198*, der aus einer humanen PAC-DNA Bibliothek (2.2.4.2.2) isoliert und anschließend mit sequenzspezifischen Primern H32R/H32F (Abb.2A/2.2.3) ansequenziert wurde (Daten nicht gezeigt), erfolgte eine FISH Analyse. Die chromosomale Lokalisation von *CAGH4/BRUNOL1* erfolgte mithilfe Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) an Metaphasechromosomen des Menschen. Die FISH wurde von Dr. Karin Bink durchgeführt. Wie in der Abbildung 6A-C dargestellt, hybridisierten sowohl die *H198*-Sonde als auch die *H32* cDNA-Sonde im Bereich 1q21 des Chromosoms 1 des Menschen. Im Rahmen des Humanen Genom Projektes liegt fast die gesamte DNA-Sequenz des Chromosoms 1 vor. Ein Sequenzvergleich des Gens *CAGH4/BRUNOL1* und der Sequenz dieses Bereiches des Chromosom1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) in der Datenbank bestätigte die Lokalisation in der Region 1q21.





zu **Abb.6A-D (vorherige Seite)**: Chromosomale Lokalisation von *CAGH4/BRUNOLI*. Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurde an Metaphasechromosomen des Menschen durchgeführt **6A**. Als Sonde wurde die gesamte genomische DNA des humanen PAC-Klons *H198* sowie die *H32* cDNA verwendet. Das *CAGH4/BRUNOLI* Gen wurde auf Chromosom 1 im Bereich q21 lokalisiert. Die kleinen Bilder **6B** sowie **6C** zeigen die einzelnen Chromosome 1 vergrößert. In **Abb.6D** ist ein Ideogramm des humanen Chromsoms1, blau die Region 1q21 dargestellt.

### 3.2 Charakterisierung des *Metr-1* Gens der Maus

#### 3.2.1 Isolierung der *Metr-1* cDNA

Zur Isolierung des „*Similar to etr1*“/*BRUNOLA* homologen Gens der Maus wurden drei Maus-Gehirn-cDNA-Bibliotheken, eine fötale Maus-Gehirn-Phagen cDNA-Bibliothek, eine RZPD-Filter cDNA-Bibliothek aus 12 Tage alten Embryonen und eine RZPD-Filter GehirncDNA-Bibliothek einer adulten Maus (*Mus musculus*) unter stringenten Bedingungen bei 65°C gescreent (2.2.4.1.2/2.2.4.2.1). Die hierfür verwendete radioaktive Sonde war der humane *etr-1* cDNA-Klon *H17* (3.1.2/Abb.2B), der 791 bp groß ist.

Es konnte ein einziger cDNA-Klon *M136*, 2251 bp groß, aus der cDNA-Bibliothek 12 Tage alte Embryonen isoliert werden. Dieser wurde bei der RZPD als Bakterien-Stab bestellt, auf Selektionsplatten (2.1.5) ausgestrichen, über Nacht inkubiert und mittels Minipräparation (2.3.1.3.1) die cDNA isoliert. Der cDNA-Klon *M136* lag somit im Phagemidvektor pVSPORT subkloniert vor und wurde mit den vektorspezifischen Primern T7/Sp6 (2.2.3) ansequenziert. Die Sequenzierung (2.8.4) und Analyse der Sequenz mittels dem Programm Blast Search von NCBI und EMBL ClustalW Alignment ergab eine hohe Homologie zu dem Gen *etr-1* (*elav-type ribonucleoprotein*) von *Xenopus laevis* (Knecht et al., 1995) und dem neu isolierten Gen „*Similar to etr1*“/*BRUNOLA* (3.1.1/3.1.2). Die vollständige cDNA wurde *Metr-1* genannt.

#### 3.2.2 Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *Metr-1*

Es wurde durch restriktionsenzymatische Spaltungen (2.4) eine Restriktionskarte für den cDNA Klon *M136* erstellt (Abb.7), die zu der Herstellung von Subklonen verwendet wurde. Diese wiederum dienten zur Sequenzierung (2.8.4) beider DNA-Stränge. DNA-Abschnitte, die nicht durch restriktionsenzymatische Spaltungen subkloniert werden konnten, wurden mit Hilfe spezifischer Primer (2.2.3), die teilweise mausspezifischer oder humaner Herkunft waren, sequenziert (Abb.3A+B). Die gesamte Sequenz des cDNA-Klons *M136* (Nt 560-2843) wurde durch Zuhilfenahme des EMBL ClustalW Programms zusammengesetzt und mit der NCBI Sequenz-Datenbank abgeglichen.

## Ergebnisse

---

Es konnte eine ca. 80%ige Homologie zu *etr-1* von *Xenopus laevis* und dem in Kapitel 3.1.2 beschriebenen humanen Gen „*Similar to etr1*“/*BRUNOL4* und der „*partiellen etr-1*“ cDNA gefunden werden. Es handelte sich in diesem Falle um das homologe Maus-Gen zu *Xenopus laevis etr-1* und „*Similar to etr1*“/*BRUNOL4*. Mit Hilfe des Internet Programms ExPASy Translate Tool wurde der offene Leserahmen erstellt, der im Vergleich zu den Genen *etr-1* von *Xenopus laevis* und „*Similar to etr1*“/*BRUNOL4* partiell eine Homologie von ca. 76% aufweist und im 5'-Bereich unvollständig ist, da ein putatives Startkodon fehlt. Das putative Stoppkodon ist an Nukleotid-Position 1754 zu finden. Ein Polyadenylierungssignal konnte an Position 2810-2815 identifiziert werden. Der 3' nichttranslatierte Bereich ist 1089 Nukleotide groß.

Aufgrund der bekannten Sequenzen von *etr-1 Xenopus laevis* und „*Similar to etr1*“/*BRUNOL4* fehlte offensichtlich der 5' Bereich des Gens mit dem putativen Startkodon. Erneut wurden die drei zur Verfügung stehenden Maus-cDNA Bibliotheken mit dem humanen cDNA-Klon *H17* (3.1.2/Abb.2B) unter etwas weniger stringenten Bedingungen bei 60°C gescreent. Es konnten mehrere cDNA-Klone identifiziert und isoliert werden, jedoch ergaben die Sequenzanalysen, daß diese cDNA-Fragmente keine Homologie oder kurze Bereiche mit sehr homologen, konservierten Sequenzabschnitten aufwiesen. Der 5' Bereich des Maus Gens *Metr-1* konnte nicht aus den cDNA-Bibliotheken isoliert werden. Die partielle Vervollständigung der Nukleotidsequenz und des damit offenen Leserahmens erfolgte mittels RT-PCR (2.8.2) unter Verwendung des humanen *H17* cDNA Klons spezifischen Primers TIMATG und des humanspezifischen Primers H32P (Abb.2B/2.2.3), der gleichzeitig eine 100%ige Homologie zur cDNA-Sequenz der Maus aufweist (Abb.7/8). Es konnte ein 700 bp großes PCR-Produkt, *M9*, synthetisiert und in den pGEM-T easy Vektor subkloniert werden (Abb.7). Die Sequenzanalyse und der Sequenzabgleich ergab, daß dieses RT-PCR-Produkt *M9* einen 320 bp überlappenden Sequenzabschnitt mit dem *M136* cDNA-Klon besitzt und einen Teil des 5' Bereiches des *Metr-1* Gens darstellt. An Nukleotid 1 ist ein putatives Startkodon, der offene Leserahmen des *Metr-1* Gens endet an Position 1754 mit dem putativen Stoppkodon TAA (Abb.8). Es wurde versucht, über ein erneutes Screening der Maus cDNA-Bibliotheken mit dem *M9* RT-PCR-Produkt den 5'-Bereich des Gens zu identifizieren, jedoch konnten keine weiteren cDNA-Klone isoliert werden. Auch ein Sequenzabgleich der *Metr-1* cDNA mit der EST- und Sequenz-Datenbank (NCBI Blast Search) konnte keine neuen Sequenzerweiterungen im 5'-Bereich liefern.

Jedoch wurde ein genomischer *Metr-1* Cosmid Klon *Mcos115* und daraus ein 6kb großes *XhoI* DNA-Fragment isoliert (3.2.7.1/siehe Anhang A). Der Cosmid-Klon wurde mit *Metr-1* sequenzspezifischen Primern sequenziert und dabei wurde das erste bis dahin bekannte Startkodon ATG (Nt.273) und die 3'-wärts gelegene cDNA von *Metr-1* sequenziert (Abb.8). Aufgrund dieser Erkenntnis wurde das gesamte 6 kb *XhoI*-Fragment mit Primern sequenziert und die vollständige genomische Sequenz des Cosmid-Fragments ermittelt (Anhang A). Mit dieser ca. 6 kb großen DNA wurde ein EST Sequenzabgleich mit der NCBI Datenbank

## Ergebnisse

---

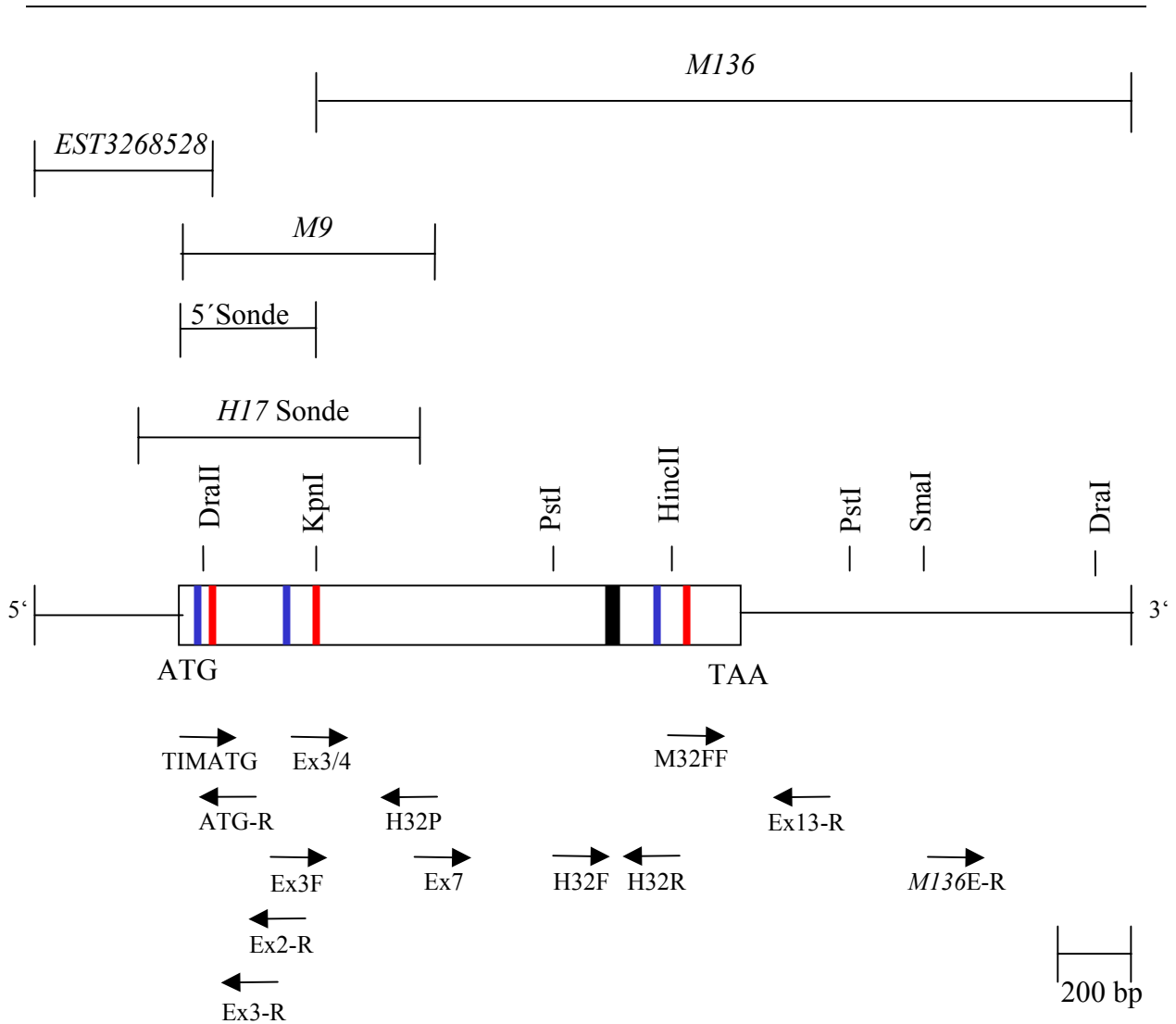
durchgeführt, und dabei wurde ein EST-cDNA-Klon *EST ID3268528* identifiziert (Abb.7). Das cDNA Fragment stammt aus dem Corpus Striatum eines Maus-Embryos (Theiler-Entwicklungsstadium 27-32) und ist 449 bp groß. Es weist mit 272 bp im 5'-Bereich eine 97%ige Homologie zu einer genomischen 6 kb XhoI-Fragment Nukleotidsequenz auf und endet vor dem putativen ersten Startkodon ATG (Nt. 273). Insgesamt 177 Nukleotide des EST-Klons 3'-wärts gelegen von dem putativen Startkodon weisen eine 100%ige Homologie zu der *Metr-1* cDNA auf. Dieser EST-Klon ist unzweifelhaft ein Fragment der *Metr-1* cDNA der Maus und erweitert den 5'-Bereich des *Metr-1* Transkripts um 272 bp ohne ein weiteres Startkodon zu beinhalten.

Es konnte somit eine Gesamtlänge des *Metr-1* Transkripts von 2843 Nukleotiden ermittelt werden, mit einem putativen ATG (Nt. 273), einen Stoppkodon TAA an Position 2755 und einem Polyadenylierungssignal AATAAA (Nt. 2810). Der 5'-untranslatierte Bereich beträgt 272 Nukleotide, der 3'-untranslatierte ist 1089 Nukleotide groß (Abb.8).

Die so erstellte cDNA des *Metr-1* Gens weist eine 80%ige Homologie zu den Genen *Xenopus laevis etr-1* (Knecht et al., 1995), *Danio rerio etr-1* (Suzuki et al. 2000) und dem homologen humanen Gen „*Similar to etr1*“/*BRUNOL4* (3.1.2) auf. Die cDNA kodiert für ein 494 Aminosäuren großes Protein. Die Struktur des Proteins weist die für RNA-Bindungs-Proteine charakteristischen RNP-Motive (Abb.1), die hoch konserviert vorliegen (Abb.7), und bis auf eine einzige Aminosäuresubstitution in RNP1 (METR-1: AS 46: L, *Xenopus laevis* ETR-1 und *Danio rerio* ETR-1: M) sind alle Aminosäuren der Motive konserviert (Abb.7).

Die Anordnung der RNP-Motive bei *Metr-1* ähnelt sehr der RNP-Motiv Strukturen der Familie *elav-like* Gene und der Subfamilie der *Bruno-like* Gene, deren meisten Gen-Familienmitglieder im Nervensystem exprimiert werden (Yao et al., 1993; Good, 1995). *Metr-1* gehört dieser Subfamilie an und stellt das homologe Gen zu *Xenopus laevis etr-1*, *Danio rerio etr-1* und dem humanen Gen „*Similar to etr1*“/*BRUNOL4* dar.

## Ergebnisse



**Abb.7:** Restriktionskarte des *Metr-1* Gens der Maus. Der offene Balken stellt die transkribierte Region der cDNA dar mit dem Startkodon ATG und dem Stoppkodon TAA; die 3'untranslatierte cDNA ist als Strich dargestellt. Die RNP-Konsensussequenzen RPN2 (blau) und RPN1 (rot) sind dargestellt. Die Lage des CAG-Repeats ist mit einem schwarzen Balken schematisch dargestellt. Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme DraII, KpnI, PstI, HincII, SmaI und DraI und die Position der sequenzspezifischen Primer ATG-R, Ex3/4, Ex3F, Ex2-R, Ex3-R, Ex7, M32FFF, M136E-R und Ex13-R sind angegeben. Zusätzlich sind die humanen Primer H32P, H32F und H32R eingezeichnet, da sie eine 100%ige Sequenzhomologie zu der cDNA-Sequenz der Maus aufweisen. Der humane Primer TIMATG wurde für die Synthese des Klons *M9* mittels RT-PCR eingesetzt, ist aber nicht 100%ig homolog zur murinen Sequenz. Oberhalb der Restriktionskarte sind die isolierten cDNA-Klone der Maus, *M9* und *M136*, und der EST-Klon *ID3268528* eingetragen. Die 5'Sonde, ein in vitro Transkript, das für die „whole mount“ Analyse (3.2.6.3) eingesetzt wurde, und die humane *H17* Sonde, die zur Isolierung der *M136*-Klons eingesetzt wurde, sind ebenfalls eingetragen.

# Ergebnisse

Abb.8

ccagatctctgggagggagatcctttgcttgggctatgcccttgggtggcctgacactgtc	60
tgcctagacccttagccctagccctcaactccccaggcctcctttgtgtgaagagccct	120
cctctgctcagcagtggttgggggcaaaggaaaagctggccctgctgggcccctggg	180
ccctaccactgctcctggttgggcagctccctgtctttggtoctctccctgctccc	240
ccaccccggcccctcctcctgggcccga	272
atgaaggagccagatgccatcaagctgtttgtgggagcagatcccaggcatctggaggaa	332
1 M K E P D A I K L F V G Q I P R H L E E	
aaggacctgaagcccatcttcgagcagtttggtcggatcttcgagctgactgtcatcaag	392
21 K D L K P I F E Q F G R I F E L T V I K	
gacaagtacaccgggctgcacaaggatgtgctttcctgacgtactgtgctcgcgattca	452
41 D K Y T G L H K G C A F L T Y C A R D S	
gccctgaagggccagagtgccctgcacgaacagaagactctcccaggatgaacaggccg	512
61 A L K A Q S A L H E Q K T L P G M N R P	
atccaggtaagccagccagcagcagagtgagagaccggaagctcctttgtggcatg	572
81 I Q V K P A D S E S R G D R K L F V G M	
ctaggaaagcagcagacagatgaggtatgctcgggaagatgtttgaaccatttgggata	632
101 L G K Q Q T D E D V R K M F E P F G T I	
gacagtgactgtgctcggggggccagacgggtaccagcaaggctgtgctcctttgtaag	692
121 D E C T V L R G P D G T S K G C A F V K	
ttccagactcacgctgaggcccagccatcaacacccttcacagcagccggcccta	752
141 F Q T H A E A Q A A I N T L H S S R T L	
ccgggtgcctcatccagcctggtgtaagtttctgacacgggagaaggagcaggtctc	812
161 P G A S S S L V V K F A D T E K E R G L	
cgtagaatgcagcaggtggctaccagctgggcatgttcagcccagcgcctccagttt	872
181 R R M Q Q V A T Q L G M F S P I A L Q F	
ggagcctacagcgcctacaccagccctgatgcagcagcagggcggccctggtagcagct	932
201 G A Y S A Y T Q A L M Q Q Q A A L V A A	
cacagtgctacctcagccctatggccaccatggctgcccgtgcatgatgcagcacatggc	992
221 H S A Y L S P M A T M A A V H D A A H G	
tgccatcagtgccaatggcctcatgcaccaccatcactccatccctcaggaaccagcac	1052
241 C H Q C Q W P H R H P H H S I L R N Q H	
ccctcctgctccattgctcccagccctctctgcccctccctgctgcccctggggcgaacgg	1112
261 P S C H C C H A R L C H P C C L G R Q R	
ctacagcccgggtgcccaccagcctacacagggcagcctgcccggatgctctgtatccc	1172
281 L Q P G A H P A Y T G Q P A P D A L Y P	
aacggggttccaccctaccagatgaggtctgtctgctgagagaagtgtggtggggtt	1232
301 N G V H P Y P D E A L S A E R S A G G V	
cccataatgtcccagggccactcatggcttgtgatgctctctgacagcccagagcccggca	1292
321 P I M S Q A H S W L V M L S A A Q S P A	
gcccctgtggaccctctccagcagcctatgcaggaatgcagcactacacagcagctac	1352
341 A P V D P L Q Q A Y A G M Q H Y T A A Y	
cccagcctacagcctggttgacctgcttcccgcagcctccagccctggctgcccag	1412
361 P A A Y S L V A P A F P Q P P A L V A Q	
cagccccaccaccactcagcaacagcagcagcagcagcagcaacagcaacagcag	1472
381 Q P P P P P Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q	
cagcaacgggaagccctgatggctgcaacatcttcatctaccacctgcccaggagttc	1532
401 Q Q R E G P D G C N I F I Y H L P Q E F	
acagactcagagatcctccagatgtttgtcccttttggctatgcatctcagccaaagtc	1592
421 T D S E I L Q M F V P F G H V I S A K V	
tttgttgaccgggcccaccaatcagagcaaatgttttggcttggtagtttcgacaatccg	1652
441 F V D R A T N Q S K C F G F V S F D N P	
gcccagtgcccaggtgcccctccagcctatgaacgggttccagattggcatggaagcctc	1712
461 A S A Q A A I Q A M N G F Q I G M K R L	
Aaagtccagctaaagcggcctaaggatgcaaacaggccctactaa	1752
481 K V Q L K R P K D A N R P Y +	
gggcttcaggtctgg	1772
agataccagaggaaggggcacttcagtataccctcttctctatgactggccctggccttct	1832
ctgcacatctgccccaggccttgattggactctggggcaagagctgcttcaggtccgag	1892
ggcccaggacctggctcactcccaccatcttgcctctctgaagggccatggttttcttc	1952
cctggcttcaagagcctatttccctcccagtgcccttttggcctttgtgaggaagcaagg	2012
aataggcttgaaggttcaggggcatctgcttctgctaaggctcctggatgagcctctgt	2072
gcccactgctggcccttgcctcccctcagtgccctgcagtagctgtgcaggtcggaaag	2132
gcagcaggacactctcctcttcccaagcaccctccccttgcctctcccacagcaggg	2192
ccttctcagaagcctgcttctcagaagctggctcccacgtttctcccaccctcagct	2252
agaggtaggagatctccaaacccgggctctcagccctaaaactcactgccttcccgaag	2312
agcccctccaagggggt	2372
cagtcagtcacagagaccctccttcatgatggaaaatgacctctcctgagtcctaaa	2432
tatgtttacagtcctctgctggccctccatgtaaataccatgaccaccagggttttaac	2492
agcccaccagccagcagctgcccctctctcttctggggagtttagacaatgctgccttg	2552
gattttgttttttctttttctctctctgatttctcctttgctttgggggtaattgg	2612
gtattttgggggaagggatggggaggggctaaaggggtttatctctgatcattttcttta	2672
ggaaaggttctagggaaaaaacatgggggtgggggtgggggtaagggataaggaagg	2732
ggaaatcaatttctgacagttctctactcttaacttatttattgagttttacttttaaga	2792
gttggctctttctgtctaaataagaaaaaacatttgaaaaaaa	2842

**zu Abb.8 (vorherige Seite):** Die Nukleotidsequenz (Nummerierung rechts) und die putative Proteinsequenz (Nummerierung links) der *Metr-1* cDNA der Maus. Die isolierte cDNA enthält einen putativen Poly(A)-Schwanz an Position 2810. Der offene Leserahmen beginnt mit dem Startkodon ATG an Position 273 und endet mit dem Stoppkodon TAA an Position 1754. Die Aminosäuresequenz ist im Einbuchstaben-Kode unterhalb der cDNA-Sequenz angegeben. Die RNP-Konsensussequenzen sind unterstrichen eingezeichnet. Der Polyglutamin-Stretch ist blau hervorgehoben

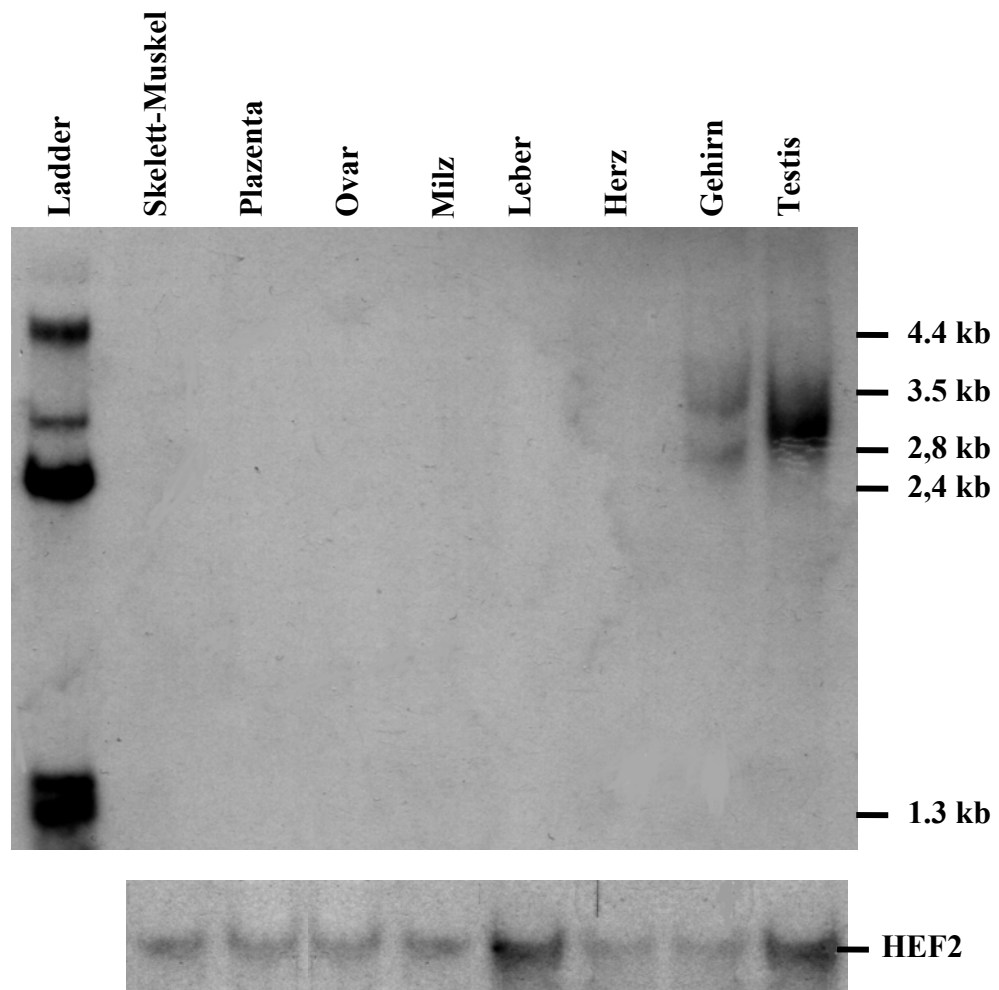
### 3.2.3 Analyse der gewebespezifischen Expression von *Metr-1*

Durch Northern Blot Analysen (2.11.2) wurden sowohl die Größe der *Metr-1* mRNA als auch deren Gewebespezifität in adulten Mäusen untersucht. Hierfür wurde die Gesamt-RNA aus verschiedenen Organen der Maus analysiert. Für die Hybridisierung (2.13.1) wurde eine 3'cDNA-Sonde (3.2.2) verwendet. Die 3'-Sonde ist ein 510 bp großes Subfragment der *M136* cDNA(Abb.7), das mit den Restriktionsenzymen PstI und HincII gespalten wurde (Nt 1272-1782).

Eine starke Expression mit zwei prominenten Signalen von *Metr-1* ist im adulten Gehirn der Maus nachweisbar. Die Transkriptgröße des größeren Signal beträgt ca. 3.5 kb, des kleineren Signals ca. 2.8 kb. Zusätzlich konnte ein Hybridisierungssignal im adulten Testis der Maus nachgewiesen werden; die Transkriptgröße beträgt ca. 3.0 kb (Abb.9). In der RNA des Muskels, der Plazenta, des Ovars, der Milz, der Leber und des Herzen konnten Transkripte von *Metr-1*, selbst nach längerer Exposition nicht nachgewiesen werden.

Zur Kontrolle der Integrität der RNA wurde der Northern Blot Filter mit der cDNA des humanen Elongation Factors 2 (HEF2) hybridisiert (Rapp et al 1989).

Abb.9



**Abb.9:** Northern Blot Analyse mit 20 µg Gesamt-RNA aus verschiedenen Organen der Maus. Die Hybridisierung erfolgte mit der 3'-cDNA-Sonde (siehe 3.2.3). Ein ca. 2.8 kb und 3.5 kb großes Transkript in der RNA aus adultem Gehirn wurde detektiert. Im Testis konnte ein ca. 3.0 großes Transkript nachgewiesen werden. Die Hybridisierung des Blots mit der HEF2-Sonde (Human Elongation Faktor 2 cDNA; Rapp et al. 1989) zeigte die Integrität der Gesamt-RNA.

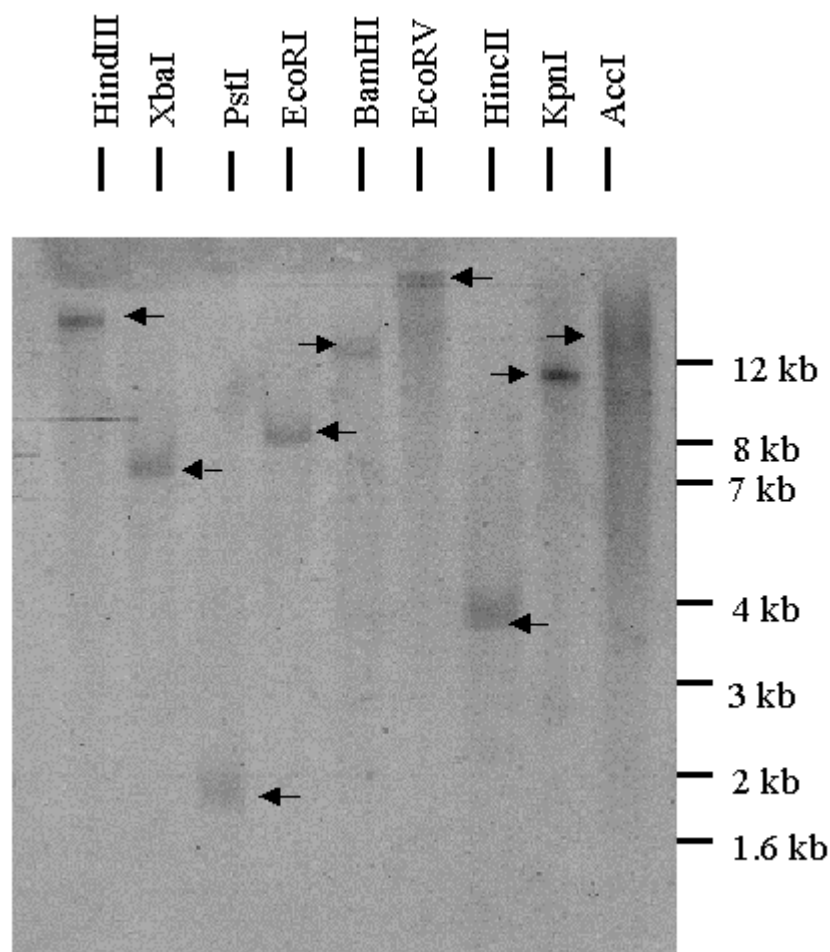
### 3.2.4 Southern Blot Analyse mit genomischer DNA der Maus

Zur weiteren Charakterisierung von *Metr-1* folgte zunächst die Bestimmung der Kopienzahl von *Metr-1* im Genom der Maus. Genomische DNA der Maus wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten und mittels Southern Blot (2.11.1) analysiert. Die Hybridisierung erfolgte unter stringenten Bedingungen unter Verwendung der radioaktiv markierten cDNA-Sonde (2.12.1.1) *M136* (Abb.7). Wie in Abb.10 gezeigt, hybridisiert die cDNA-Sonde mit einem HindIII-, BamHI- und EcoRV-Fragment, das >12 kb ist. Des weiteren konnte eine Hybridisierung mit einem ca.12 kb großem KpnI-Fragment, einem 8 kb großem

## Ergebnisse

EcoRI-Fragment, einem 7.5 kb großem XbaI-Fragment, einem 3.8 kb großem HincII-Fragment und einem 1.8 kb großem PstI-Fragment nachgewiesen werden. Da in jedem Restriktionsansatz nur ein Fragment detektiert wurde, liegt *Metr-1* als „single copy“-Gen im Genom der Maus vor. Die durch die Hybridisierung identifizierten Fragmente wurden außerdem zum Vergleich mit den Hybridisierungsergebnissen der Restriktionskartierung eines isolierten genomischen Klon der Maus verwendet (siehe 3.2.7), um eine Aussage darüber machen zu können, ob es sich um einen das *Metr-1* Gen enthaltenden genomischen Klon handelt

**Abb.10**



**Abb.10:** Southern Blot Analyse des *Metr-1* Gens mit genomischer DNA der Maus. Je 20 µg genomische Maus-DNA wurden mit den Restriktionsendonukleasen AccI, KpnI, HincII, EcoRV, BamHI, EcoRI, PstI, XbaI und HindIII gespalten und mittels Southern Blot untersucht. Der Filter wurde mit der Sonde *M136* (siehe Abb.7) hybridisiert. In jedem Spaltungsansatz ist nur ein Hybridisierungssignal nachweisbar.



---

### 3.2.5 Analyse der zellspezifischen Expression von *Metr-1* im adulten Gehirn der Maus

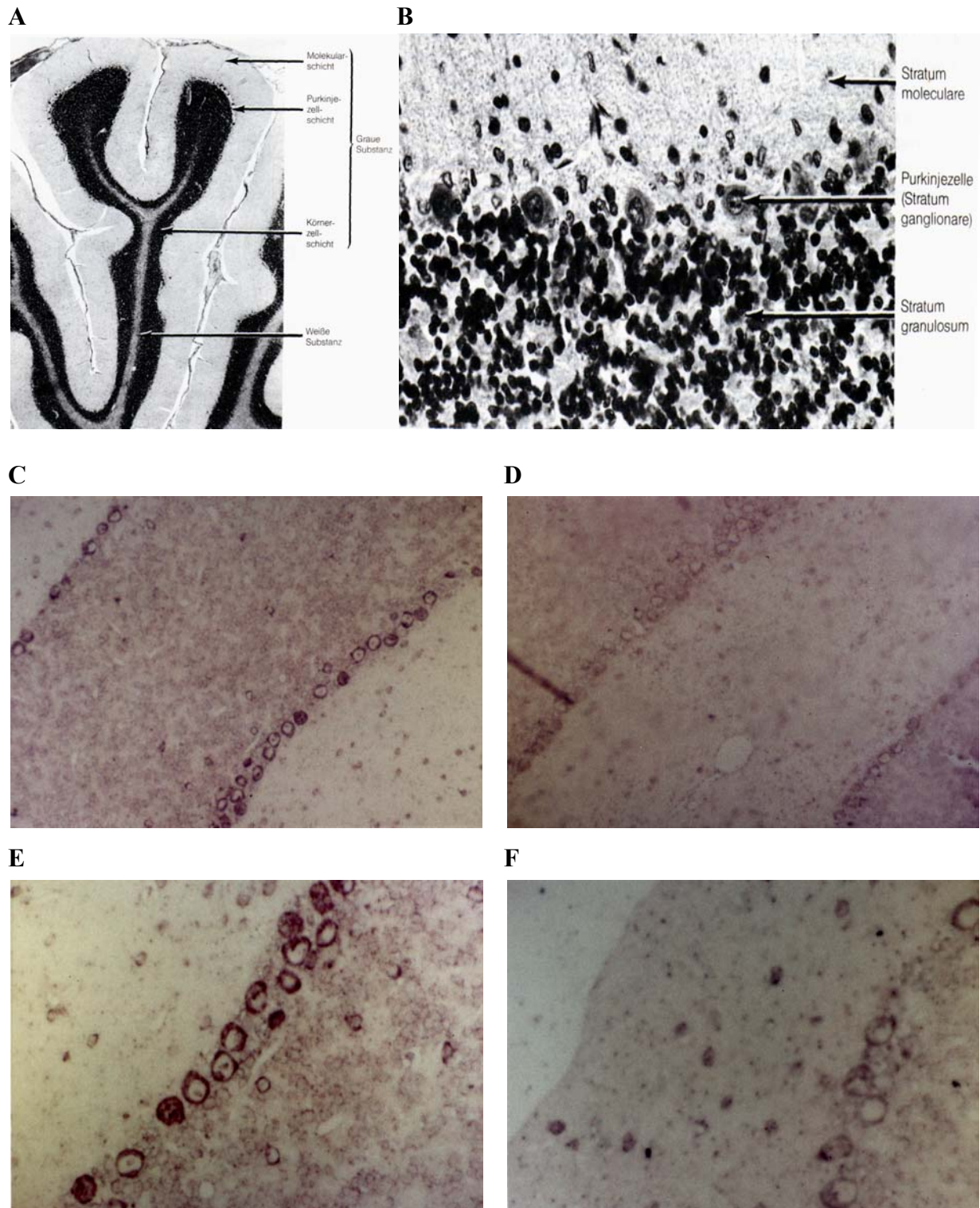
In Northern Blot Analysen wurde gezeigt, daß das *Metr-1* Gen im Gehirn der adulten Maus exprimiert wird (3.2.3). Zur Klärung der Frage, in welchen Zellen des Gehirns eine Expression von *Metr-1* erfolgt, wurden *in situ* Hybridisierungen (2.12.2) an Gewebeschnitten des Gehirns der adulten Maus durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte mit nichtradioaktiven Digoxigenin markierten „antisense“ und „sense“ Ribonukleinsäureproben (2.11.1.3) der 5' cDNA-Sonde *M9* (Abb.7).

In den Abbildungen 11A und 11B sind zum besseren Verständnis der Ergebnisse eine schematische Darstellung des adulten Cerebellums, insbesondere der Kleinhirnrinde dargestellt. Das Kleinhirn besteht aus der weißen Substanz (Mark) und grauen Substanz (Rinde). Die Rinde wiederum gliedert sich in Körnerzellschicht (Stratum granulosum), Purkinjzellschicht (Stratum ganglionare) und Molekularschicht (Stratum moleculare). Die Molekularschicht besteht überwiegend aus marklosen Nervenfasern und Dendritenverzweigungen, durchsetzt mit Nervenzellen, die entweder Korbzellen oder Sternzellen sind. Die Körnerzellschicht setzt sich hauptsächlich aus vielen kleinen und wenigen großen Körnerzellen (Golgi-Zellen) zusammen, die mit Gliazellen und Nervenfasern durchsetzt sind. Die Purkinjzellschicht besteht aus den größten Zellen des Kleinhirns, den Purkinjzellen. Die weiße Substanz besteht aus den Neuriten der Purkinjzellen, den einzigen efferenten Strukturen der Kleinhirnrinde.

Das Ergebnis der *in situ* Hybridisierung mit der „antisense“ RNA-Probe ist in den Abbildungen 4C und 4E dargestellt. Es konnten im Gehirn ausschließlich im Cerebellum des Gehirns Hybridisierungssignale lokalisiert werden. Die Hybridisierungssignale sind nur in der Purkinjzellschicht der grauen Substanz zu erkennen. Die Purkinjzellen, als größte Zellen des Kleinhirns sind leicht zu identifizieren. Außerdem ist gut zu erkennen, daß die riesigen Zellkerne der Purkinjzellen ungefärbt vorliegen, das heißt die mRNA von *Metr-1* konnte nur im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen werden.

Die Kontroll-Hybridisierung eines Parallelschnittes mit dem „sense“ *in vitro*-Transkript, Abbildungen 4D und 4F, zeigen hingegen keine Hybridisierungssignale im Zytoplasma der Purkinjzellen. Auch die vereinzelt bei der „antisense“ Probe auftretenden Zellfärbung in der Molekularschicht, wahrscheinlich handelt es sich hierbei um Stern- und Korbzellen, und der Körnerzellschicht ist bei der Kontroll-Hybridisierung in den entsprechenden Zellen anzutreffen. Hierbei handelt es sich um eine unspezifische Färbereaktion.

## Ergebnisse



**Abb.11:** *In situ* Hybridisierung an Gewebeschnitten des Gehirns der Maus. Querschnitte des adulten Gehirns wurden mit Digoxigenin markierten „antisense“ bzw. „sense“ *in vitro*-Transkripten der 5'-Sonde *M9* hybridisiert. (A) Ausschnitt aus der Kleinhirnrinde bestehend aus Mark (weiße Substanz) und Rinde (graue Substanz). Die Rinde gliedert sich in Körnerzellschicht, Purkinjezellschicht und Molekularschicht (HE-Färbung, 28X).

**(B)** Die Kleinhirnrinde ist stark vergrößert (250x) und besteht aus dem Stratum moleculare, Stratum ganglionare und Stratum granulosum (aus Junqueira und Carneiro 1986). Die Abbildung **(C)** zeigt eine Hellfeld-Aufnahme der Expression von *Metr-1* (es wurde mit der „antisense“ *M9*-Sonde hybridisiert) in der Kleinhirnrinde (100x). **(D)** Kleinhirnrinde hybridisiert mit der „sense“-*M9*-Sonde (Hellfeld-Aufnahme, 100x). **(E)** Vergrößerter Ausschnitt einer „antisense“ Hybridisierung (Hellfeld, 250x). Es sind Körnerzellen, Sternzellen, Korbzellen, Neuriten der Purkinjezellen (leicht rötliche Färbung) und die großen, dunkelrot gefärbten Purkinjezellen zu erkennen. Das *Metr-1* Transkript ist im Zytoplasma der Purkinjezellen lokalisiert, die Zellkerne sind weiß durchsichtig. **(F)** Kontroll-Hybridisierung mit der „sense“ Sonde zeigt keine Signale in den Purkinjezellen, im Stratum moleculare und im Stratum granulosum.

### **3.2.6 Die Expression von *Metr-1* während der Maus-Entwicklung**

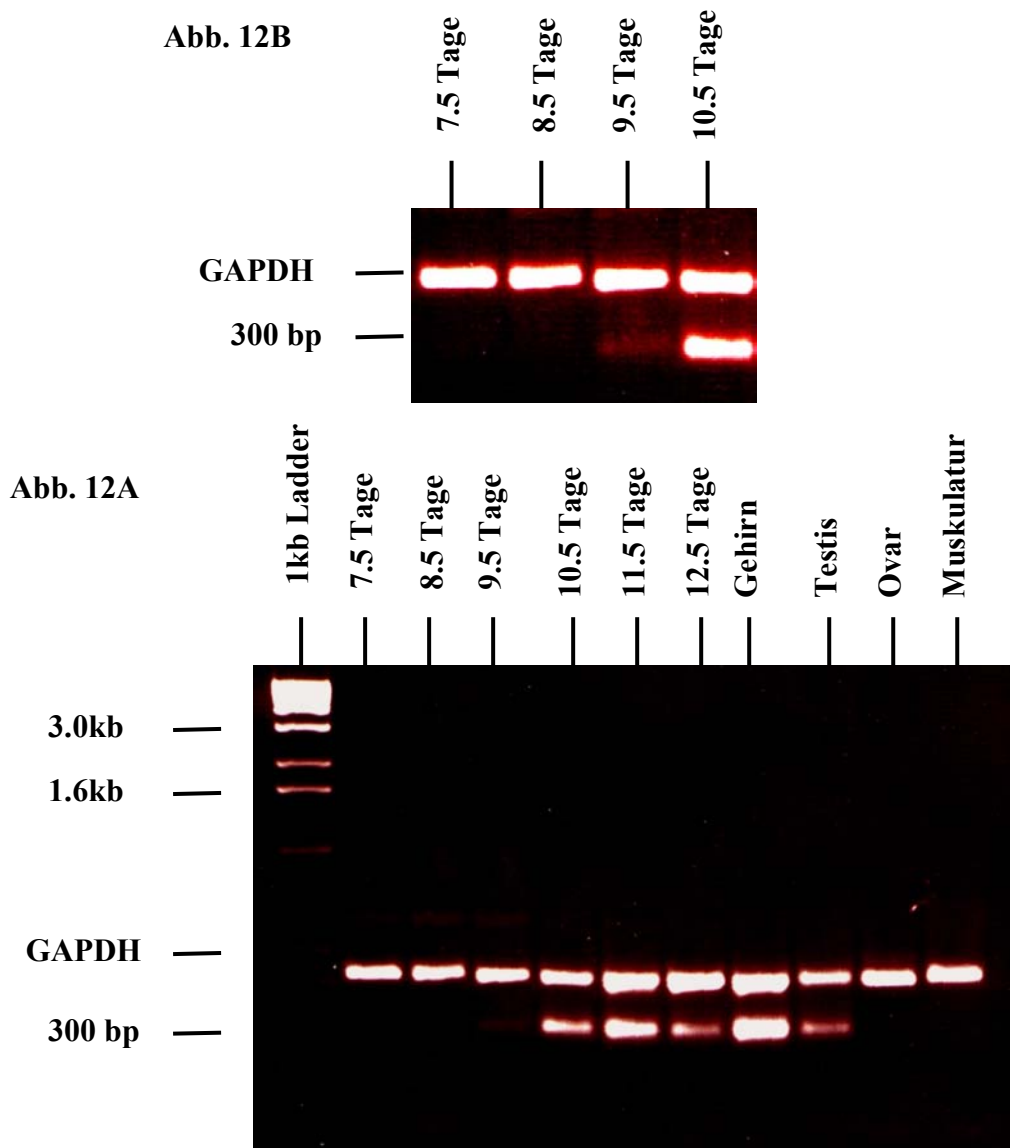
#### **3.2.6.1 Analyse pränataler Maus-Entwicklungsstadien**

Aufgrund der Northern Blot Analyse (3.2.3) war bekannt, daß *Metr-1* im adulten Gehirn und im Testis exprimiert wird. Über die Expression von *Metr-1* in der Embryonalentwicklung war nichts bekannt, jedoch veröffentlichten Knecht et al. (1995), daß das *Metr-1* homologe Gen von *Xenopus laevis* *etr-1*, in der dorsoventralen Differenzierung des neuralen Gewebes bei *Xenopus laevis* eine wichtige Rolle spielt. Basierend auf dieser Erkenntnis wurden verschiedene embryonale Entwicklungsstadien der Maus untersucht. Hierfür wurde Gesamt-RNA der Maus-Entwicklungsstadien 7.5 Tage, 8.5 Tage, 9.5 Tage, 10.5 Tage, 11.5 Tage und 12.5 Tage alter Maus-Embryonen isoliert. Gleichzeitig dienten Gesamt-RNA Proben von Gehirn und Testis sowie des Ovars und des Muskels der adulten Maus als Negativ-beziehungsweise als Positiv-Kontrolle. Mittels RT-PCR (2.8.2) unter Anwendung der maussequenz-spezifischen Primer TIMATG und Ex3/4 und der GAPDH-Primer (2.2.3) wurden in einem PCR-Multiplex-Ansatz ein ca. 300 bp großer 5'-Bereich des Gens als auch ein GAPDH cDNA-Fragment amplifiziert. Der Nachweis genomischer DNA mittels der PCR ist ausgeschlossen, da die Maus-Primer in verschiedenen Exons liegen und zusätzlich der cDNA-Primer Ex3/4 an einer Exon/Intron Übergangsstelle liegt und somit nicht an genomischer DNA binden kann.

Der Nachweis der Integrität der RNA und Qualität der PCR erfolgte mithilfe der Amplifikation eines GAPDH cDNA-Fragments. Wie in Abb.12A gezeigt, konnte die Expression von *Metr-1* ab dem Tage 10.5 p.c. eindeutig nachgewiesen werden. Eine schwache *Metr-1* Expression ist ab dem Tage 9.5 p.c. detektierbar, abgebildet in dem vergrößerten Ausschnitt 12B. In den positiv-Kontrollen Gehirn und Testis Gesamt-RNA

## Ergebnisse

konnte das *Metr-1* Transkript nachgewiesen werden, wohingegen in der negativ-Kontrollen Muskel-bzw. Ovar Gesamt-RNA ein *Metr-1* Transkript fehlt.



**Abb.12A+B:** Nachweis des *Metr-1* Transkripts mittels RT-PCR in pränataler Maus Gesamt-RNA. Pro Multiplex-PCR wurden ca. 1µg Gesamt-RNA und die Maus-Primer TIMATG, Ex3/4 sowie die GAPDH-Primer eingesetzt. Der mit den Maus-Primern amplifizierte 5'-Bereich des Gens konnte in der pränatalen RNA ab dem Tage 9.5 p.c. schwach nachgewiesen werden (Abb.12B). Eine starkes Transkriptionssignal wurde ab dem Tage 10.5 p.c. nachgewiesen, das ebenfalls in den pränatalen RNA-Proben 11.5 p.c. und 12.5 p.c. zu finden ist. In der Gesamt-RNA aus adultem Gehirn und Testis konnte der 5'-Bereich des *Metr-1* Transkriptes ebenfalls nachgewiesen werden, wohingegen in der Ovar-bzw. Muskel-RNA die *Metr-1* Expression nicht nachweisbar war. Die Kontrolle der Qualität der PCR-Reaktion und der RNA erfolgte durch die Amplifikation eines ca. 450 bp großen GAPDH cDNA-Fragmentes.

### 3.2.6.2 Die Expression von *Metr-1* im postnatalen Testis der Maus

Die Ergebnisse der Northern Blot Analyse (3.2.3) zeigten neben einer *Metr-1*-Expression im Gehirn der adulten Maus auch noch eine spezifischen *Metr-1* Expression im Testis der Maus (siehe auch 3.2.6.1). Aus diesem Grunde wurde Testis-RNA postnataler Mäuse mittels RT-PCR (2.8.2) auf die Expression von *Metr-1* untersucht.

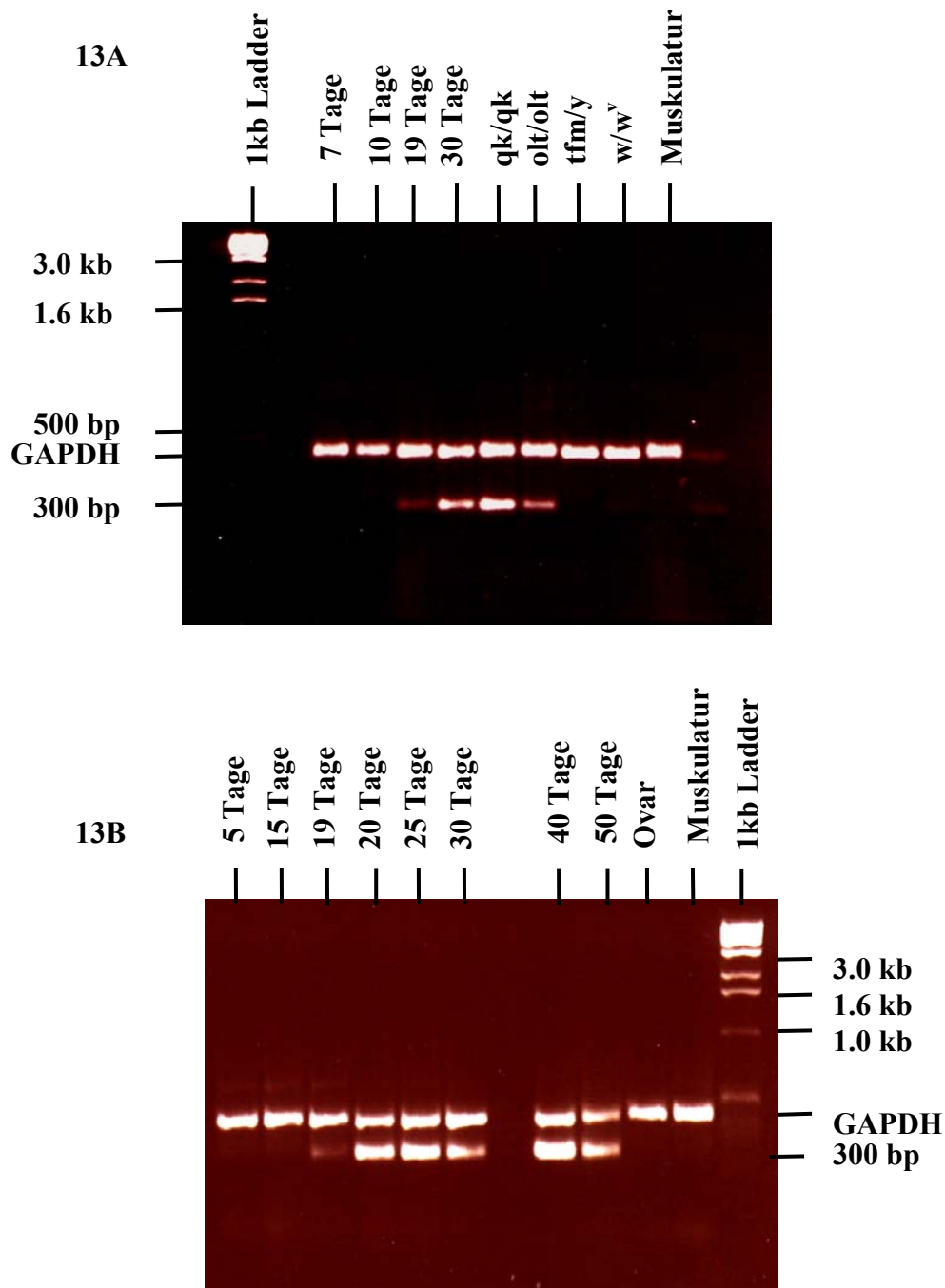
In einem Multiplex-PCR-Ansatz (2.8.2) wurde der cDNA-5' Bereich von *Metr-1* in den RNA-Proben 5 Tage, 7 Tage, 10 Tage, 15 Tage, 19 Tage, 20 Tage, 25 Tage, 30 Tage, 40 Tage und 50 Tage postnatal nachgewiesen.

Der Nachweis genomischer DNA mittels der PCR ist ausgeschlossen, da die Maus-Primer in verschiedenen Exons liegen und zusätzlich der Primer Ex3/4 an einer Exon/Intron Übergangsstelle liegt, und somit nicht an genomischer DNA bindet. Als Integritätskontrolle der RNA und der RT-PCR wurde ein ca. 450 bp großes GAPDH cDNA-Fragment amplifiziert.

Gleichzeitig wurden die Testis RNAs verschiedener Mausmutanten untersucht, deren Spermien in verschiedenen Stadien der Entwicklung arretiert sind. Die RNA der Mauslinien  $w/w^v$ , *tfm/y*, *olt/olt* und *qk/qk* wurden untersucht. Die Mauslinie  $w/w^v$  verfügt über keine testikulären Keimzellen, die Mauslinie *Tfm/y* weist einen Arrest der Spermatogenese in den primären Spermatozyten-Stadien auf, die Mauslinie *olt/olt* hat einen Arrest der Spermatogenese in den frühen Spermatischen Stadien und die Mauslinie *qk/qk* weist einen Arrest der Spermatogenese in den elongierenden Spermatischen auf (2.2.5). Als Negativ-Kontrolle wurde Maus RNA aus Muskulatur und Ovar adulter Tiere eingesetzt.

Der Nachweis des ca. 300 bp großen *Metr-1* cDNA-Transkriptes erfolgte ab dem postnatalen Entwicklungsstadium 19 Tage, 20 Tage, 25 Tage, 30 Tage, 40 Tage und 50 Tage. Die Quantität der Expression des *Metr-1* Transkriptes in der RNA 19 Tage postnatal ist geringer als in der Testis RNA späterer Stadien. Zusätzlich konnte in den Maus-Mutantenlinien *olt/olt* und *qk/qk* die Expression von *Metr-1* nachgewiesen werden. Die Mauslinien  $w/w^v$  und *Tfm/y* weisen kein *Metr-1* Transkript auf.

## Ergebnisse



**zu Abb.:13 A+B:** Nachweis der *Metr-1* Expression in postnataler Testis RNA (13A+B) und bei verschiedenen Mausmutanten (13B). Die Expressionsanalyse erfolgte mittels RT-PCR. Zur cDNA-Synthese wurde RNA aus 5 Tage, 7 Tage, 10 Tage, 15 Tage, 19 Tage, 20 Tage, 25 Tage, 30 Tage, 40 Tage, 50 Tage und aus Testes der Mauslinien w/w<sup>v</sup>, tfm/y, olt/olt und qk/qk verwendet. Durch anschließende PCR wurde die Expression des *Metr-1* Gens in den untersuchten Stadien und Mauslinien untersucht. Zur Kontrolle der Integrität der RNA wurde eine RT-PCR an der RNA für das GAPDH-Transkript durchgeführt.

### 3.2.6.3 Die „whole mount“-Analyse für *Metr-1* in verschiedenen Embryonal-Entwicklungsstadien der Maus

Aufgrund der RT-PCR-Analyse (3.2.6.1) war bekannt, daß *Metr-1* in Maus-Embryonalstadien ab dem Tag 10.5 p.c bis Tag 12.5 p.c. eindeutig exprimiert wird. Eine schwache Expression von *Metr-1* konnte im Stadium 9.5 Tage p.c. nachgewiesen werden. In welchen Körpersegmenten und Organen eine *Metr-1* Expression während der Entwicklung stattfindet, war unbekannt. Ein Hinweis, daß *Metr-1* auch in der Neuralentwicklung des zentralen Nervensystems der Maus eine Rolle spielen könnte, ergab sich aus der Kenntnis, daß das homologe *Xenopus laevis* *etr-1* Gen in der frühen *Xenopus laevis* Entwicklung in der Neuralfalte und dem Trigeminalen Plakoden, als auch in späteren Embryonalstadien im Rückenmark, im Hinterhirn, im ventralen Vorder- und Mittelhirn und in der Epiphyse exprimiert wird (Knecht et al.1995). Basierend auf dieser Erkenntnis und den RT-PCR-Ergebnissen bei den embryonalen Entwicklungsstadien der Maus, wurden die Embryonalstadien 10.5 Tage p.c. und 11.5 Tage p.c. mittels „whole mount“-Analyse (2.12.3) untersucht. Hierfür wurden Maus-Embryonen der entsprechenden Tage präpariert. Embryonen 9.5 Tage p.c. wurden nicht präpariert, da sie erstens schwer zu präparieren sind und zweitens in der RT-Analyse zu erkennen ist, daß *Metr-1* in diesem Stadium schwach exprimiert wird (3.2.6.1) und somit der Nachweis einer *Metr-1* Expression in 9.5 Tagen p.c. alten Embryonen schwierig sein sollte. Als Sonden wurden *in vitro* „sense“ und „antisense“ RNA-Transkripte eingesetzt, die mittels T7 und Sp6-Primern (2.2.3) und des cDNA-Subklons M9 (Abb.7) als Matrize (3.2.2) mit Digoxigenin markiert wurden (2.11.1.3). Sowohl mit dem „antisense“ und dem „sense“ *in vitro* Transkript, einer 5'cDNA-Sonde (Abb.7), wurden die Maus-Embryonen hybridisiert. Die „sense“-Sonde diente als Kontrollprobe.

In der Abbildung 14A sind die „whole mount *in situ*“-Hybridisierungen der Maus-Embryonen dargestellt. Die grünen Pfeile in den Abbildungen markieren Stellen, an denen eine Expression von *Metr-1* auftritt, die roten Markierungen (Pfeile) dienen zur Orientierung.

Die Bilder A1-H2 zeigen die Embryonen am 10.5 Tag p.c., die Bilder I1-P1 die Embryonen am 11.5 Tag p.c.. Die Bilder A1 („antisense“-Sonde hybridisiert) und A2 („sense“-Sonde hybridisiert) zeigen Dunkelfeld Aufnahmen der gesamten Embryonen. Die mit „antisense“-Sonden hybridisierten Embryonen des Stadiums 10.5 Tage p.c. wurden entweder transversal geschnitten (Bilder: D1, E1, F1, G1, und H1) oder sagittal (Bilder: B1 und C1). Die Embryonen, die mit einer „sense“-Sonde hybridisiert wurden, sind ebenfalls transversal (Bilder D2, E2, F2, G2 und H2) oder sagittal geschnitten worden (Bilder B2 und C2). Mit den Embryonen des Stadiums 11.5 p.c. Tage wurde genauso verfahren, Die Bilder I1 (antisense“-Sonde) und I2 („sense“-Sonde) zeigen Dunkelfeld-Aufnahmen der gesamten Embryonen. Die



## Ergebnisse

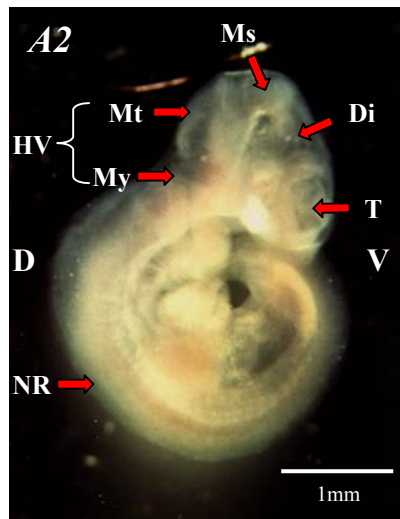
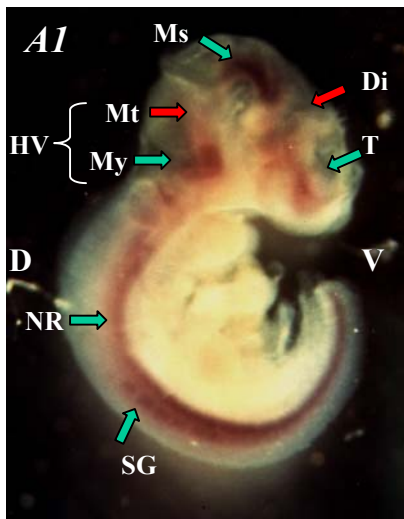
---

Bilder J1 („antisense“-Sonde) und J2 („sense“-Sonde) sind Aufnahmen von Sagittalschnitten. Transversale Schnitte einer „antisense“-Hybridisierung der 11.5 Tage p.c. alten Embryonen veranschaulichen die Bilder K1, L1, M1, N1, O1 und P1. Eine „sense“-Hybridisierung des Entwicklungsstadiums 11.5 p.c. Tage, transversal geschnitten, wird in den Bildern K2, L2, M2, N2 und O2 dargestellt. Die einzelnen Schnittebenen zu den Aufnahmen sind jeweils in kleinen Bildern schematisch dargestellt. Die Legende zur Erklärung der einzelnen Abkürzungen ist als Anhang am Ende der bildlichen Darstellungen angefügt. Zum besseren Verständnis der einzelnen Gehirnabschnitte und ihrer Entwicklung ist in Abb. 14B die frühe Entwicklung des Gehirns schematisch dargestellt.

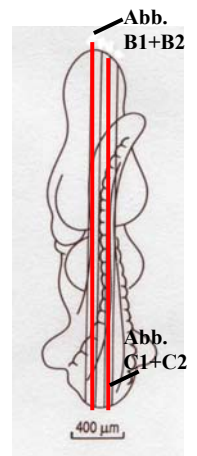
Die Expression von *Metr-1* in der frühen Entwicklung der Maus konnte in Embryonen 10.5 Tage p.c. im Telencephalon (Bilder: B1, C1, G1 und H1), im Mesencephalon (Bilder: B1 und H1), Diencephalon (Bilder: C1, G1), im Myelencephalon (Bilder: B1, C1 und G1), im Neuroepithel des Neuralrohrs (Bilder: B1, C1, D1, E1 und F1) und in den Spinalganglien (Bilder: B1, D1, E1, und F1) nachgewiesen werden. Die Hybridisierung mit der „sense“-Kontrollprobe zeigt in diesen Regionen keine Signale. Die Embryonen 11.5 Tage p.c. zeigen ein ähnliches Hybridisierungsmuster. Die Hybridisierung mit der „antisense“-Sonde ergab Hybridisierungssignale im Telencephalon (Bilder I1, J1, N1 und O1), im Mesencephalon (Bilder: I1, J1 und P1), im Diencephalon (Bilder: I1, N1 und O1), im Myelencephalon (Bilder: I1, O1 und P1), im Neuroepithel des Neuralrohrs (Bilder I1, J1, K1, L1, M1 und N1), in den Spinalganglien (Bilder K1 und L1), dem Trigeminal Ganglion (Bild O1) und im inferioren Ganglion des Glossopharyngealen-Nervs (Bild N1). Der Gehirnabschnitt, der dem Metencephalon entspricht, weist als einziger Gehirnbereich kein Hybridisierungssignal auf (Bilder B1 und C1). In den „sense“-Kontrollhybridisierungen kann ein *Metr-1* Signal nicht identifiziert werden (Bilder: A2-O2).

Die Expression von *Metr-1* weist im Neuralrohr der Embryonen 10.5 Tage p.c. und 11.5 Tage p.c. ein dorsoventrales Muster auf. So ist die Expression nur in der ventralen Seite des Neuralrohrs zu erkennen (Bilder: E1, F1, L1 und M1) und nimmt in dorsaler Richtung ab, bis in den dorsalen Bereichen des Neuralrohrs die *Metr-1* Expression fehlt. Auch im Telencephalon, Mesencephalon und Myelencephalon ist eine dorsal-ventral ausgerichtete Expressionsmuster von *Metr-1* zu erkennen. So ist das *Metr-1* Transkript nur in den ventralen Regionen dieser Gehirnabschnitte lokalisiert und fehlt in dorsalen Bereichen (Bilder: G1, H1, N1, O1 und P1). In den „sense“-*Metr-1* Kontroll-Hybridisierungen fehlt dieses Hybridisierungsmuster (Bilder: A2-O2).

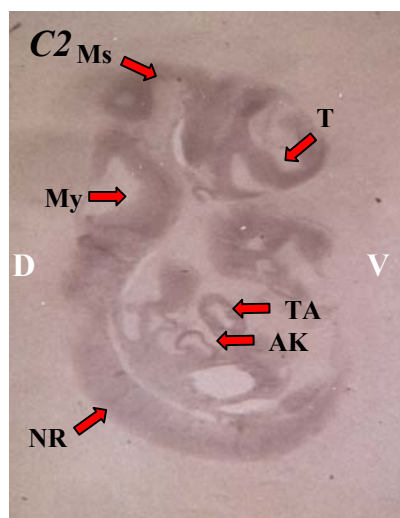
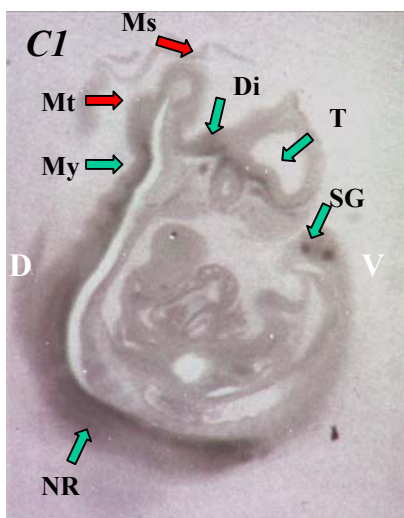
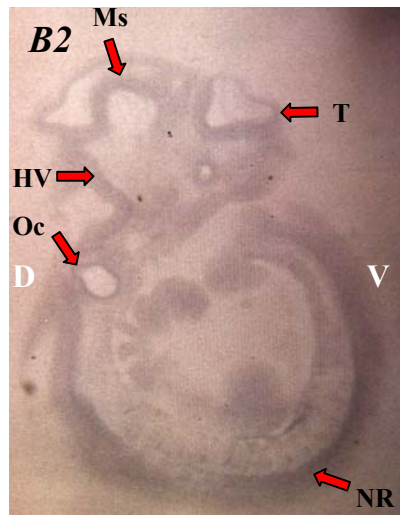
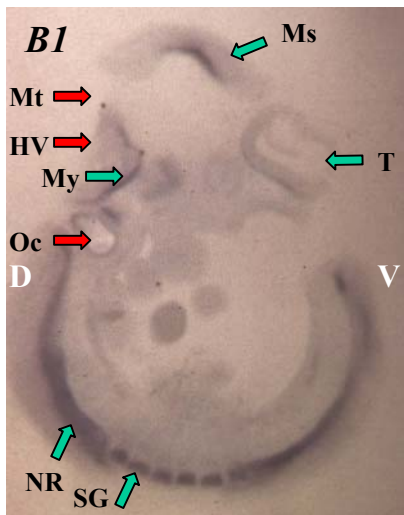


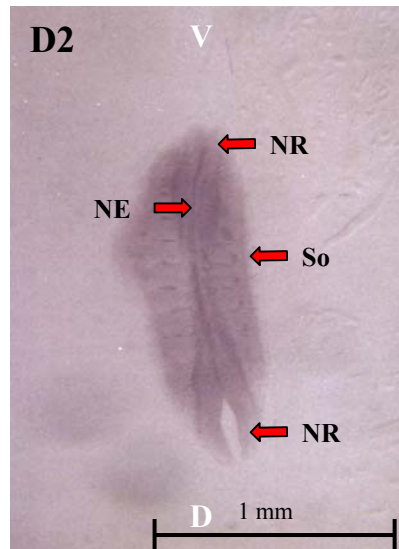
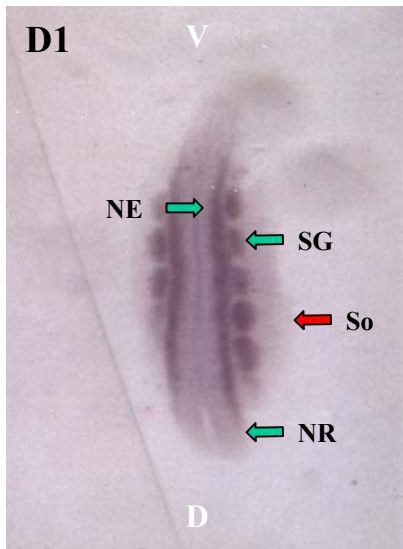


Schnittebenen



Embryo: 10.5 Tage p.c.  
Sagittale Schnitte,  
Theiler Stadium 17-18





**Schnittebenen**

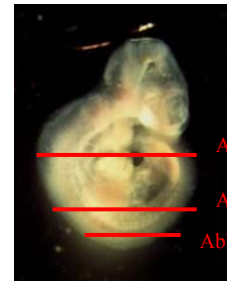
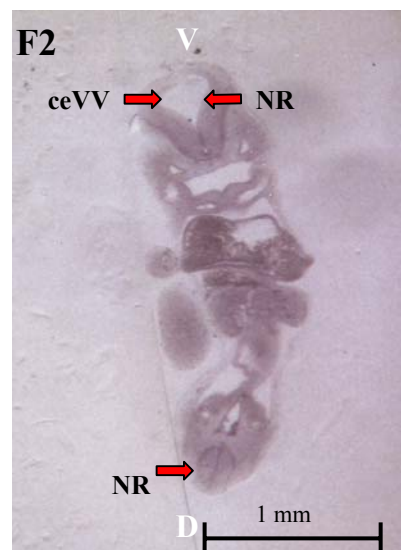
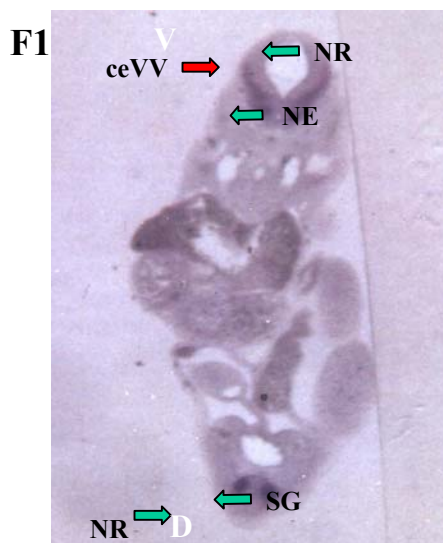
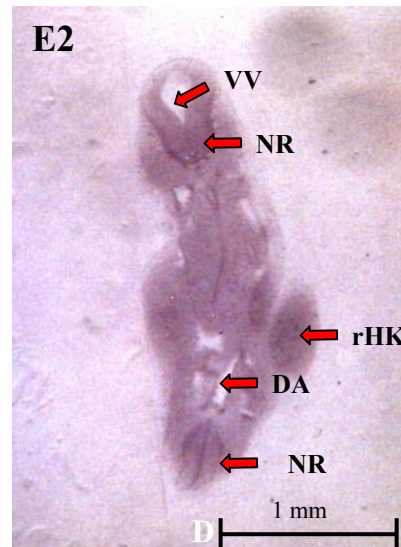
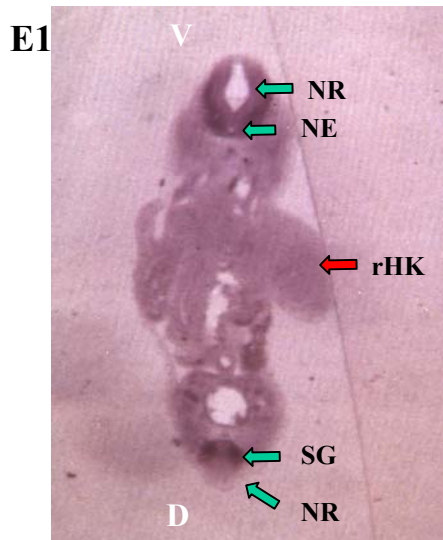


Abb. F1+F2

Abb. E1+E2

Abb. D1+D2

Embryo: 10.5 Tage p.c.,  
Transverse Schnitte,  
Theiler Stadium 17-18



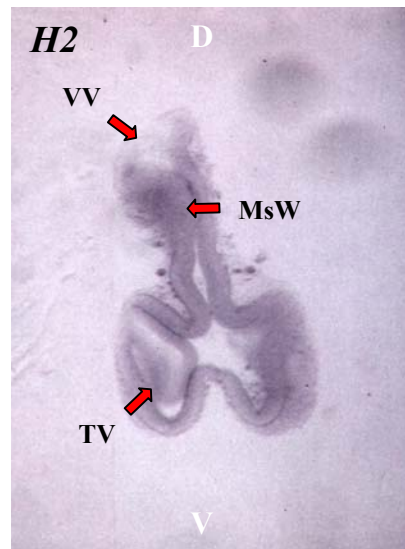
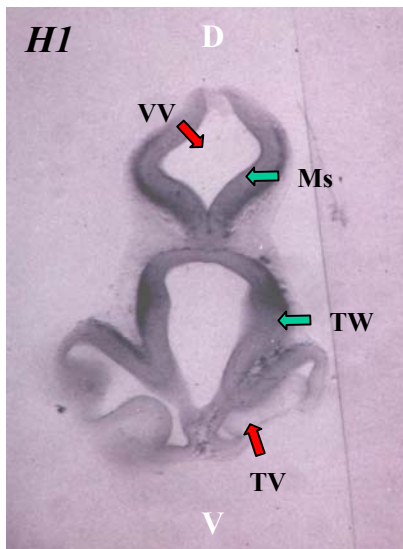
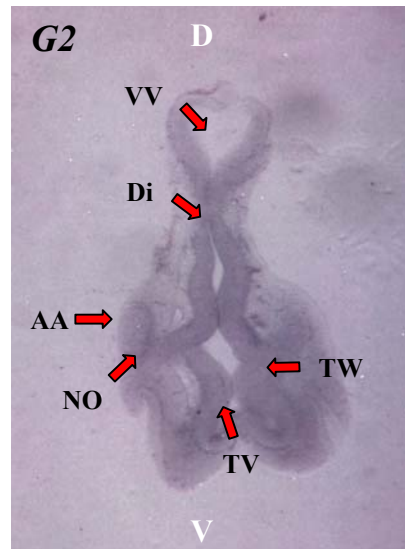
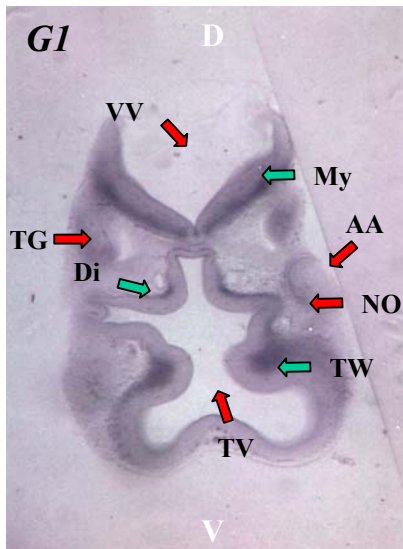
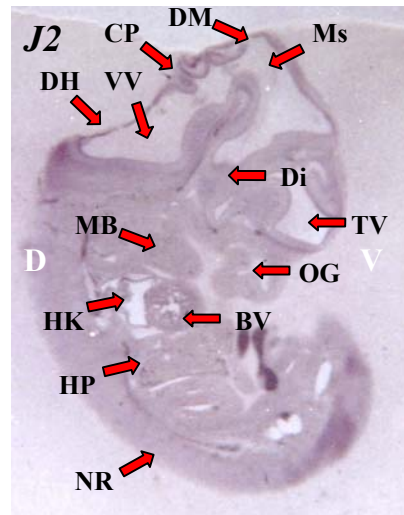
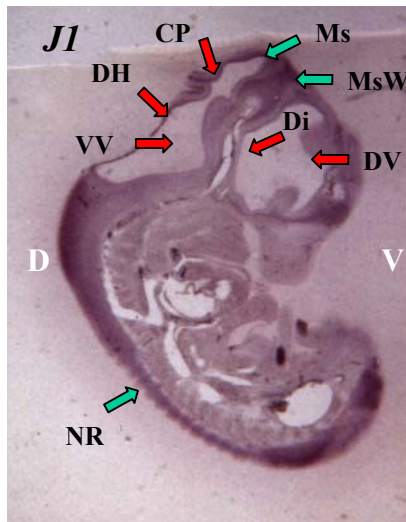
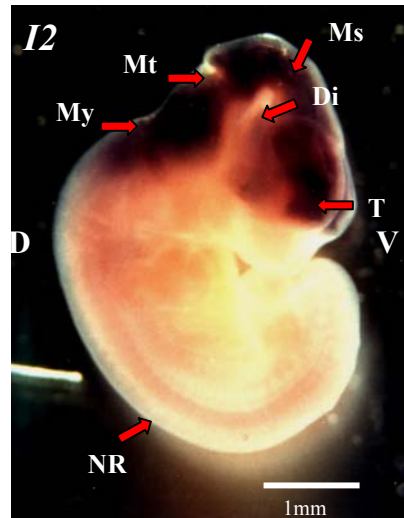
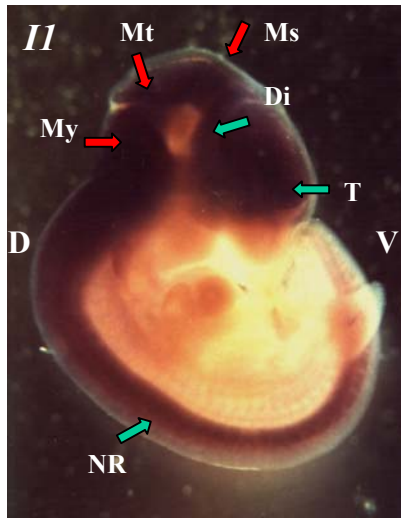


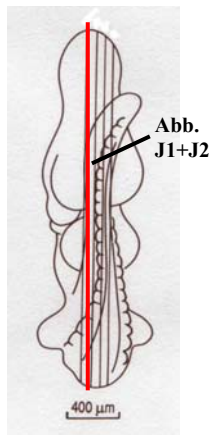
Abb. H1+H2  
Abb. G1+G2

Embryo: 10.5 Tage p.c.  
Transversale Schnitte  
Theiler Stadium 17-18

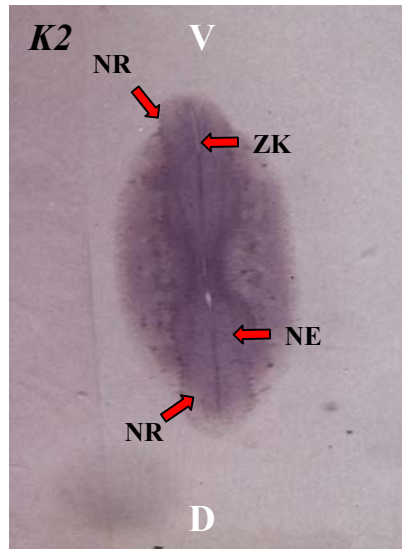
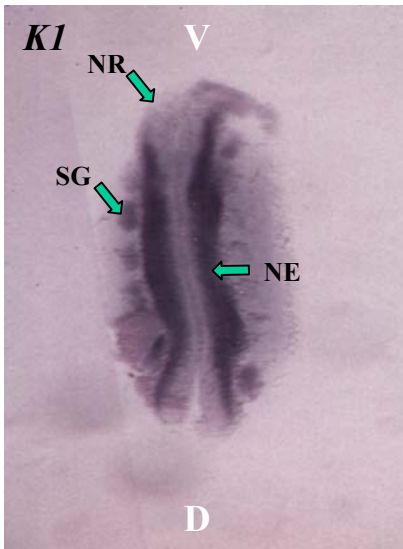




Schnittebene



Embryo: 11.5 Tage p.c.  
Sagittale Schnitte,  
Theiler



Schnittebenen

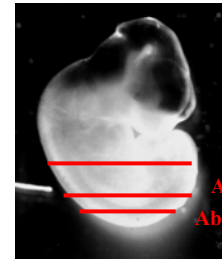
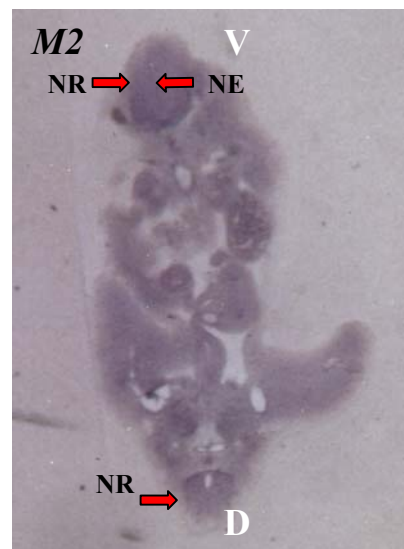
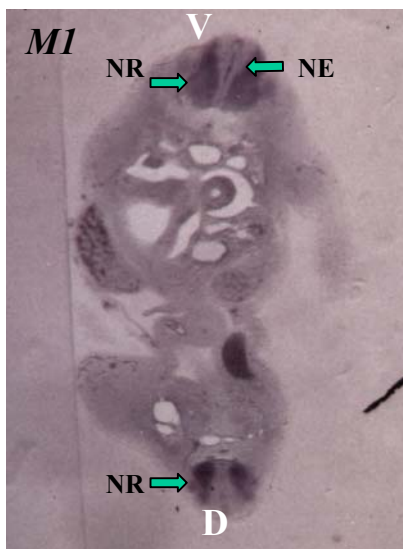
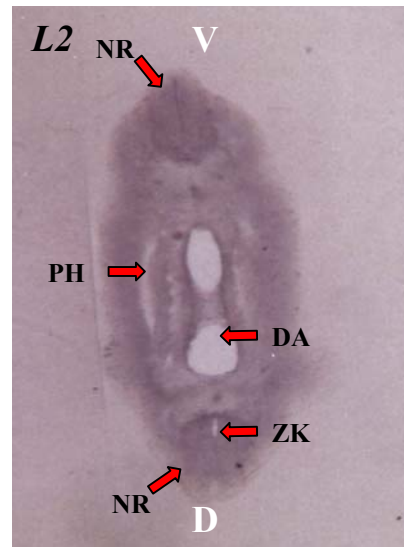
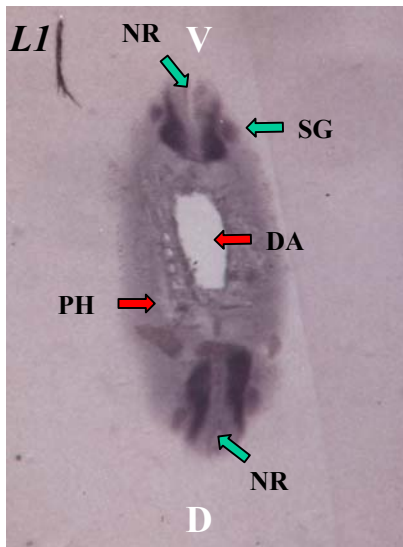
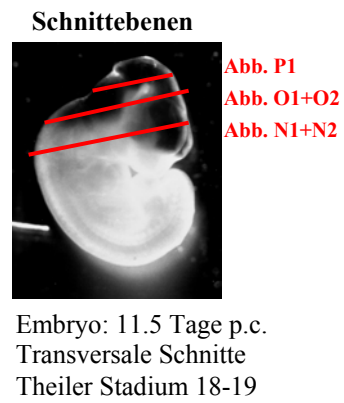
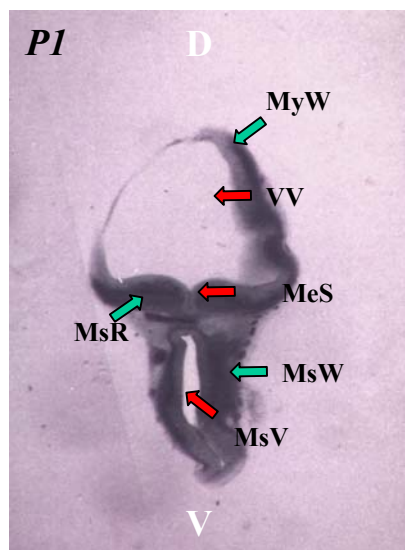
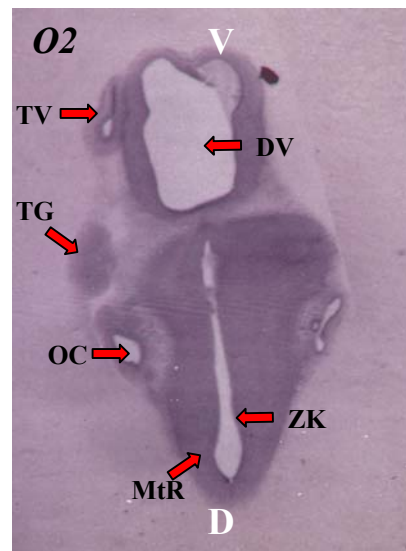
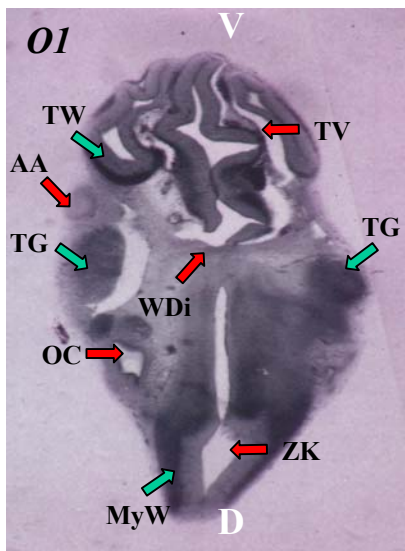
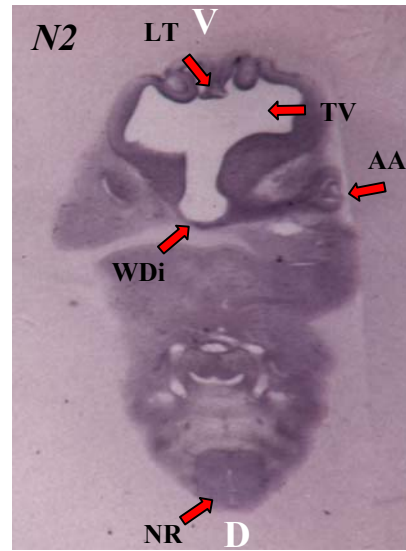
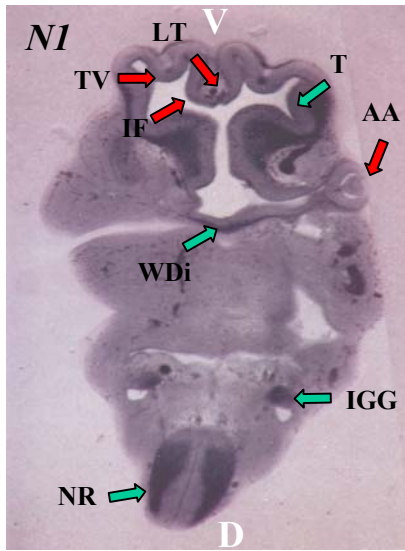


Abb. M1+M2  
Abb. L1+L2  
Abb. K1+K2

Embryo: 11.5 Tage p.c.  
Transversale Schnitte  
Theiler Stadium 18-19

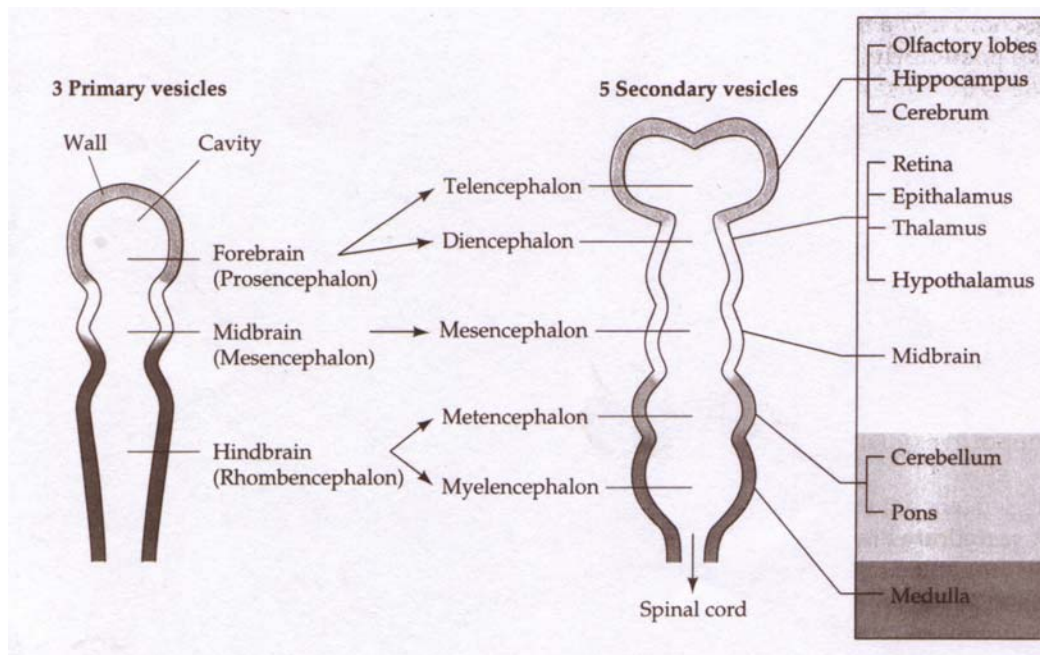




## Legende für die Bilder A1-P1

<b>AA:</b> Augenanlage	<b>O:</b> Neuralschicht der optischen Tasche (zukünftige Retina)
<b>AK:</b> Atrial Kammer	<b>NE:</b> Neuroepithel des Neuralrohrs
<b>BV:</b> Bulbo-Ventrikular Kanal	<b>NR:</b> Neuralroh
<b>ceVV:</b> caudale Extremität des vierten Ventrikel	<b>OC:</b> Otocyst
<b>CP:</b> cerebelläres Primordium	<b>OG:</b> Olfactorische Grube
<b>DA:</b> Mittellinie der dorsalen Aorta	<b>PH:</b> Peritoneale Höhle
<b>Di:</b> Diencephalon	<b>rHK:</b> rechte Hinterfuss-Anlage
<b>DH:</b> Dach des Hinterhirn	<b>SG:</b> Spinal Ganglien
<b>DM:</b> Dach des Mesencephalon	<b>So:</b> Somit
<b>DV:</b> Dritter Ventrikel	<b>T:</b> Telencephalon (Vorderhirn)
<b>HK:</b> Herzkammer	<b>TA:</b> Truncus arteriosus
<b>HP:</b> Hepatisches Primordium (Leber)	<b>TG:</b> Trigeminal Ganglion
<b>IF:</b> Interventricular Foramen	<b>TV:</b> Telencephalon Vesikel
<b>IGG:</b> Inferiores Ganglion des Glossopharyngeal Nerves	<b>TW:</b> Wand des Telencephalon
<b>NE:</b> Neuroepithel des Neuralrohrs	<b>VV:</b> Vierter Ventrikel ( <b>VV</b> ) oder Hinterhirn Vesikel ( <b>HV</b> ) bestehend aus: 1. <b>My:</b> Myencephalon 2. <b>Mt:</b> Metencephalon
<b>NR:</b> Neuralrohr	<b>WDi:</b> Wand des Diencephalon
<b>LT:</b> Lamina terminalis	<b>ZK:</b> Zentral-Kanal
<b>LV:</b> Vesikel der Linse des Auges	
<b>MB:</b> Mandibular Komponenten des 1. und 2. Branchial Bogens	
<b>MeS:</b> Medianer Sulcus	
<b>Ms:</b> Mesencephalon	<b>V:</b> ventral
<b>MsR:</b> mesencephalischer Teil des Rhombencephalon	<b>D:</b> dorsal
<b>MsV:</b> Mesencephalischer Vesikel	
<b>MsW:</b> Wand des Mesencephalon	
<b>Mt:</b> Metencephalon	
<b>My:</b> Myencephalon	
<b>MyW:</b> myencephalischer Teil des Rhombencephalon zukünftige Medulla Oblongata	

**Abb.14A:** Bilder der “whole mount” *in situ* Hybridisierungen an Maus-Embryonen der Embryonalstadien 10.5 Tage p.c. und 11.5 Tage p.c. mit einer “antisense” Metr-1-Sonde (Bilder: A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1, I1, J1, K1, L1, M1, N1, O1 und P1) und einer “sense”Metr-1-Kontrollsonde (Bilder: A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2, H2, I2, J2, K2, L2, M2, N2 und O2). Es sind Gesamtaufnahmen der Embryonen (A1,A2,I1 und I2), sagittale Schnitte (B1, B2, C1, C2, J1 und J2) und transversale Schnitte (D1+2,E1+2,F1+2, G1+2, H1+2, K1+2, L1+2, M1+2, N1+2, O1+2 und P1) zu sehen. Die Legende für die Abkürzungen ist am Ende der Bilder aufgeführt.



**Abb.14B:** Entwicklung des frühen Gehirns. Die drei primären Gehirn-Vesikel unterteilen sich, wenn die Entwicklung voranschreitet. Rechts sind die adulten Derivate dargestellt, die sich aus den Gehirn -Höhlen und -Wänden formen (nach Moore und Persaud,1993).



### **3.2.7 Die Isolierung und Charakterisierung eines genomischen Klons für *Metr-1***

#### **3.2.7.1 Die Isolierung eines genomischen Klons für *Metr-1***

Zur Isolierung genomischer Sequenzen, die das *Metr-1* kodieren, wurde eine genomische Cosmid DNA-Bibliothek der Maus gescreent (2.2.4.2.2). Als Sonden wurden verschiedene cDNA-Fragmente verwendet: die 5' cDNA-Sonde *M9* und die cDNA-Sonde *M136* (Abb.7). Durch das Screening (2.12.1) wurden 2 genomische Klone isoliert, von denen jedoch nur einer, *Mcos115* mit beiden cDNA-Sonden hybridisierte.

Dieser Klon *Mcos115* wurde als Bakterienstock von der RZPD (2.2.4.2.2) bestellt, auf Selektionsplatten ausgestrichen und vermehrt. Ein Bakterienklon wurde gepickt und in Kulturmedium vermehrt, so daß die Plasmid-DNA isoliert werden konnte (2.3.1.3). Das gesamte genomische DNA-Fragment besitzt eine Größe von ca. 46 kb und kann mit dem Restriktionsenzym *XbaI* in 8 Fragmente und mit *XhoI* in 4 Fragmente zerlegt werden (Abb.15C). Um eine Restriktionskarte für den genomischen Klon zu erhalten, wurde der Klon mit verschiedenen Restriktionsenzymen zerlegt: *AccI*, *BamHI*, *EagI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HincII*, *HindIII*, *NotI*, *PstI*, *SacI*, *Sall*, *SmaI*, *XbaI* und *XhoI* (Abb.15A). Der restringierte Klon *Mcos115* wurde mit der 5'-cDNA-Sonde *M9* und der cDNA-Sonde *M136* (Abb.7) radioaktiv hybridisiert (Abb.15B/C). Zusätzlich wurde der Klon *Mcos115* alternierend mit der 5'-cDNA-Sonde *M9*, der *M136* cDNA-Sonde sowie der 3'-cDNA-CAG-Repeat-Sonde hybridisiert (Abb.15C), um die genomischen Fragmente zu identifizieren, die sowohl den 5'-Bereich als auch den 3'-Bereich des *Metr-1* Gens beinhalten. So hybridisierten mit der *M9*-Sonde das 3.0 kb und 6.0 kb große *XhoI*-Fragment als auch das ca. 13.0 kb große *XbaI*-Fragment. Bei einer Hybridisierung mit der CAG-Sonde als auch der *M136*-Sonde zeigten das 9.0 kb große *XhoI*-Fragment und das 7.5 kb große *XbaI*-Fragment ein Signal (Abb.15B+C).

Die bei einer *XhoI*-Restriktionsspaltung entstehenden drei Fragmente mit einer Größe von 3.0 kb, 6.0 kb und 9.0 kb, die bei einer Hybridisierung mit der gesamten *Metr-1* cDNA ein Hybridisierungssignal zeigten, wurden in den Vektor pBluescriptSK- kloniert.

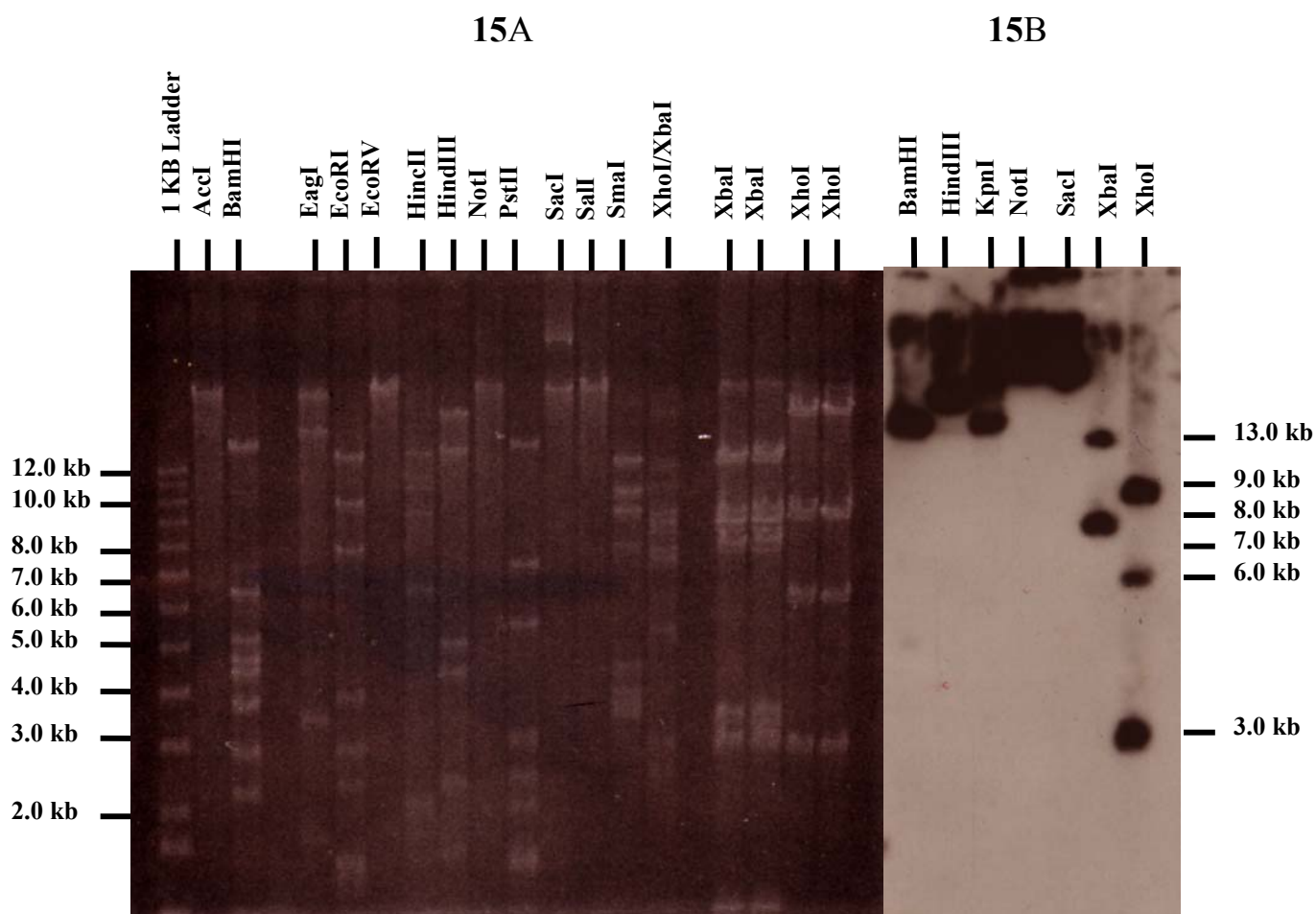
Anschließend wurden die *XhoI*-Fragmente mit den vorhandenen cDNA spezifischen Primern (Abb.7) sequenziert. Aus den neu ermittelten genomischen DNA Sequenzen wurden neue Maus Cosmid Primer (2.2.3) abgeleitet, um die Exon/Intron-Übergänge und die Anordnung der einzelnen Exone zu ermitteln (siehe Anhang A / Abb.17A).

Resultierend aus diesen Erkenntnissen, der bekannten cDNA-Sequenz für *Metr-1* (Abb.8), den vollständig sequenzierten genomischen 3.0 kb, 6.0 kb *XhoI*-Fragmenten und dem partiell sequenzierten genomischen 9.0 kb großen *XhoI*-Fragment, den daraus abgeleiteten Restriktionsschnittstellen in der genomischen und der bekannten cDNA-Sequenz (Abb.7),

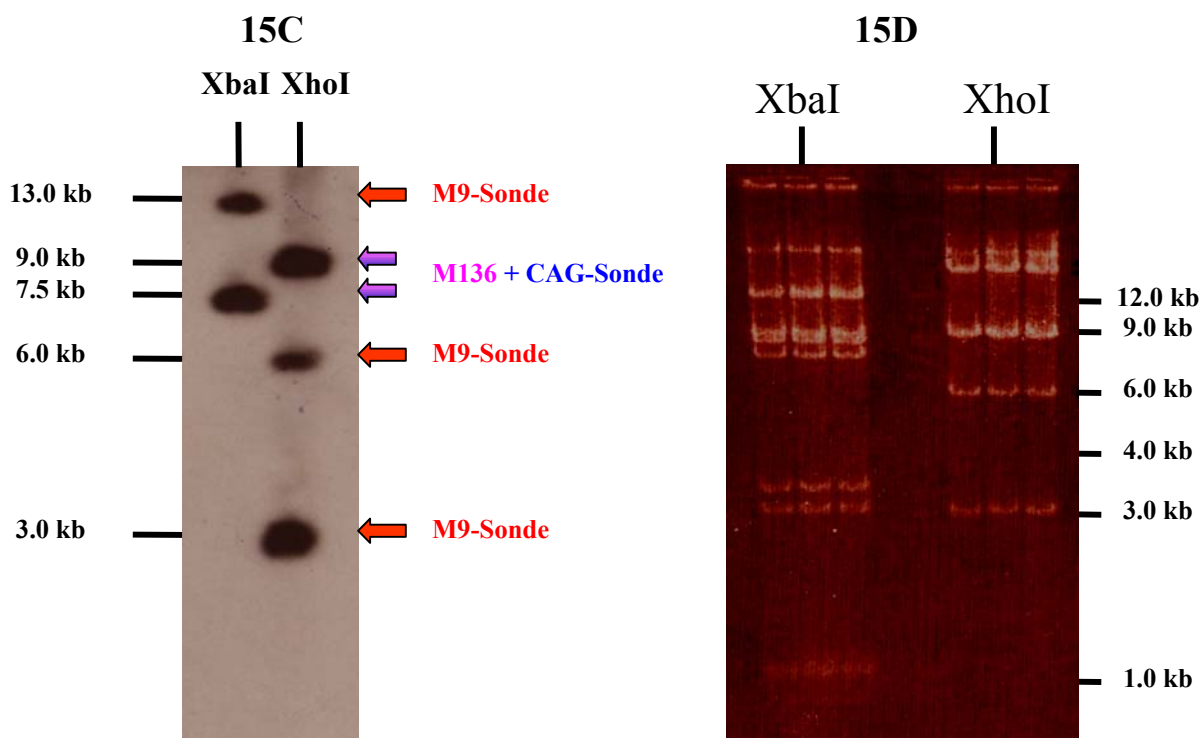
## Ergebnisse

konnte eine Restriktionskarte für einen partiellen Abschnitt von ca. 18 kb des genomischen Klon *Mcos115* erstellt werden (Abb.16).

Die Bestimmung der Exon/Intron-Übergangsstellen erfolgte mit Bestimmung der Consensus-Sequenz, die auch GT-AG-Regel genannt wird. So beginnt jedes definierte Intron mit dem Dinukleotid GT und endet mit dem Dinukleotid AG. Alle Introns des *Metr-1* Gens folgen dieser Regel, so daß 13 Exons, die für das *Metr-1* Transkript kodieren, charakterisiert werden konnten. In der Abb.17B sind die cDNA-Abschnitte gezeigt, die für das jeweilige Exon kodieren; das sequenzierte genomische *Mcos115* XhoI 6kb DNA-Fragment ist in Anhang A dargestellt



Legenden zu Abb. 15A und Abb.15B siehe nächste Seite.



zu. **Abb. 15A-D:** Der Cosmid-Klon *Mcos115* (~10 µg DNA) wurde mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen (AccI, BamHI, EagI, EcoRI, EcoRV, HincII, HindIII, NotI, PstI, SacI, Sall, SmaI, XbaI und XhoI) gespalten und mit einem „Pulse-Field-Gel“ gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb.15A). Der Klon wurde zweimal mit XhoI und XbaI gespalten (beiden rechten Spuren), sowie in einem Kombinationsansatz (XhoI/XbaI) gespalten. In Abb.15B ist das Radiogramm einer weiteren *Mcos115* Restriktionsspaltung (BamHI, HindIII, KpnI, NotI, SacI, XbaI und XhoI) zu sehen. Die DNA ist mit der gesamten radioaktiv markierten *Metr-1* cDNA hybridisiert worden. Bei der XhoI-Spaltung hybridisieren drei DNA-Fragmente (3.0 kb, 6.0 kb und 9.0 kb groß), bei der XbaI-Spaltung zwei DNA-Fragmente (~13.0 kb und 7.5 kb groß). Die DNA-Fragmente der übrigen Restriktionsspaltungen, die mit der Sonde hybridisieren, sind alle größer als 13.0 kb und sind für das weitere Vorgehen nicht in Betracht gezogen worden.

Die Abbildung 15C zeigt das Radiogramm eines Southern Blots des Cosmid *Mcos115* nach einer restriktionsenzymatischen Spaltung mit XhoI und XbaI; es sind 8 XbaI DNA-Fragmente zu sehen (sehr schwach 0.8 kb, 1.0 kb, 3.0 kb, 3.5 kb, 7.5 kb, 8.5 kb, 9.0 kb und ca. 13kb) und 4 XhoI Fragmente ) 3.0 kb, 6.0 kb, 9.0 kb und ein > 13.0 kb großes Fragment zu sehen (wahrscheinlich um die 28 kb groß). Die 3.0 kb und 6.0 kb großen XhoI DNA-Fragmente als auch das 13.0 kb große XbaI DNA-Fragment hybridisieren mit der *M9*-cDNA-Sonde. Mit der

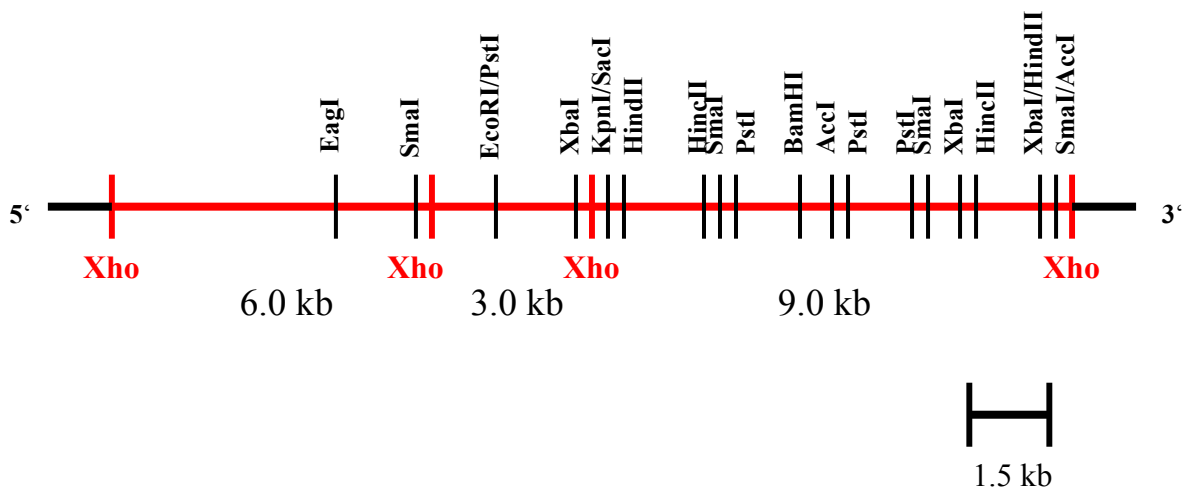
## Ergebnisse

(*CAG*)<sub>63</sub>-Sonde und dem cDNA-Subklon *M136* hybridisiert, weisen das 9.0 kb große *Xho*I-Fragment und das 7.5 kb große *Xba*I-Fragment ein Hybridisierungssignal auf.

Die Abb.15D zeigt das Ergebnis einer entsprechenden Restriktionsspaltung des *Mcos116* Klons mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Xba*I. In jeder Spur (jede Spaltung ist dreimal aufgetrennt) sind ~10 µg DNA aufgetragen. Die *Xho*I DNA-Fragmente 3.0 kb, 6.0 kb und 9.0 kb wurden isoliert und in den Vektor pBlueskript SK- kloniert. Sie hybridisieren (siehe Abb.15C) mit der gesamten cDNA von *Metr-1*.

Abb.16

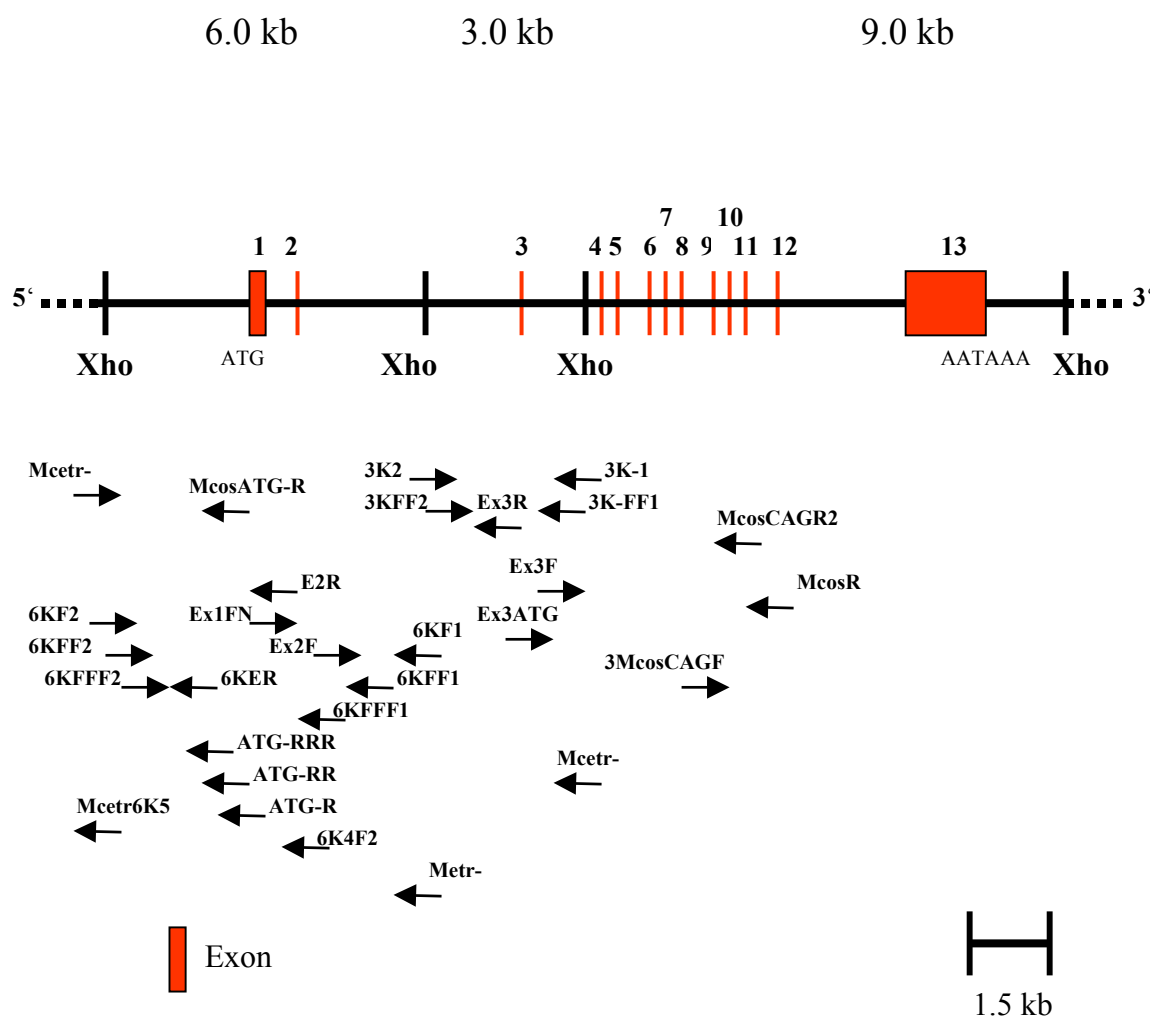
### *Mcos115* *Xho*I-Fragmente



**Abb.16:** Partielle Restriktionskarte des genomischen Cosmid Klons für *Metr-1*. Durch die Restriktion mit *Xho*I und der Hybridisierung mit der gesamten *Metr-1* cDNA lassen sich drei Fragmente identifizieren, in denen die Exons von *Metr-1* liegen (siehe Abb.17). Insgesamt ist das isolierte genomische Fragment *Mcos115* ca. 46 kb groß; in einem Bereich von ca. 18 kb liegt die Genstruktur des *Metr-1* Gens.

17A

## Mcos115 XhoI-Fragmente



**Abb17A.:** Schematische Darstellung der Genstruktur von *Metr-1*. Die Exon/Intron-Übergänge wurden mittels Sequenzanalyse ermittelt. Anhand der GT-AG-Regel konnten die Exons und Introns charakterisiert werden. Die 6.0 kb und 3.0 kb großen XhoI-Fragmente wurden vollständig, das 9.0 kb große XhoI-Fragment nur partiell sequenziert. Die Maus Primer, die aus Intron-Sequenzen abgeleitet sind, wurden verwendet, um die Zuordnung der einzelnen Exons untereinander zu bestimmen. Die Primer, die aus Exon-Sequenzen hergeleitet wurden, sind mit *Ex* gekennzeichnet. Die genannten Primer sind als Pfeile mit der entsprechenden Orientierung dargestellt und wurden für die Sequenzierung eingesetzt. Rote Kästchen symbolisieren die Exons. Das Exon 1 ist 417 bp, die Exons 2-12 sind >200 bp groß und kodieren für das gesamte Protein. Am Ende von Exon 12 liegt das Stoppkodon, wohingegen das 1077 bp große Exon 13 nur untranslatierten 3'-Bereich enthält, mit dem Polyadenylierungssignal AATAAA. Die drei XhoI-DNA-Fragmente scheinen die gesamte Genstruktur von *Metr-1* in 18.0 kb zu beinhalten.

17B

CCAGATCTCTGGGAGGGAGATCCTTTGCTTGGGCTATGCCCTGGTGGCCTGACACTGTCTGCCTAGACCCCTGA  
 CCCCTAGCCCTCAACTCCCAGGCCTCCTTTGTGTGAAGAGCCCTCCTCTGCTCAGCAGTGTGGTTGGGGGCCAA  
 AGGAAAAGCTGGCCCTGCTGGGCCCCTGGGCCCCTACCACCTGCCTCCTGGTTGGGCAGCTTCCCTTGTCTTTGGT  
 CCTCTCCCTGCTCCCCACCCCGGCCCTCCTCCTGGGCCGCCCAATGAAGGAGCCAGATGCCATCAAGCTGT  
 TTGTGGGGCAGATCCCAGGCATCTGGAGGAAAAGGACCTGAAGCCCATCTTCGAGCAGTTTGGTCGGATCTTCG  
 AGCTGACTGTCAAGGACAAGTACACCGGGCTGCACAAGGGATGTGCTTTCCTGACGTACTGTGCTCGCGATT  
 CAGCCCTGAAGGCCAGAGTGCCTGCACGAACAGAAGACTCTCCAGGGATGAACAGGCCGATCCAGGTC AAGC  
 CAGCCGACAGCAGAGATCGAGGAGACCGGAAGCTCTTTGTGGGCATGCTAGGAAAAGCAGCAGACAGATGAGGATG  
 TCCGGAAGATGTTTGAACCATTTGGGACTATAGACGAGTGCACCTGTGCTCCGGGGCCAGACGGTACCAGCAAAG  
 GCTGTGCCTTTGTGAAGTTCCAGACTCACGCTGAGGCCAGGCAGCCATCAACACCTTTCACAGCAGCCGGACCC  
 TACCGGGTGCCTCATCCAGCCTGGTGGTAAAGTTTGTGCTGACACGGAGAAGGAGCGAGGTCTCCGTCGAATGCAGC  
 AGGTGGCTACCCAGCTGGGCATGTTTCCAGCCGATCGCCCTCCAGTTTGGAGCCTACAGCGCCTACACCCAGGCC  
 TGATGCAGCAGCAGGCCGGCCCTGGTAGCAGCTCACAGTGCCTACCTCAGCCCTATGGCCACCATGGCTGCCGTGC  
 ATGATGCAGCACATGGCTGCCATCAGTGCCAATGGCCTCATCGCCACCCCATCACTCCATCCTCAGGAACCAGC  
 ACCCTCCTGCCATTGCTGCCACGCCCGTCTCTGCCATCCCTGCTGCCTTGGGCGTCAACGGCTACAGCCCGGTG  
 CCCACCCAGCCTACACAGGGCAGCCTGCCCGGATGCTCTGTATCCCAACGGGGTTCACCTTACCAGATGAGG  
 CTCTGTCTGCTGAGAGAAGTGTGGCGGGGTTCCATAATGTCCAGGCCACTCATGGCTTGTGATGCTCTCTG  
 CAGCCCAGAGCCCGCAGCCCCCGTGGACCCTCTCCAGCAGGCCATGCAGGAATGCAGCACTACACAGCAGCGT  
 ACCCCGAGCCTACAGCCTGGTTGCACCTGCGTTCGCCGAGCCTCCAGCCCTGGTCGCCAGCAGCCCCACCAC  
 CACCTCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAGCAACAGCAGCAGCAACGGGAAGGCCCTGATGGCTGCA  
 ACATCTTTCATCTACCACCTGCCCCAGGAGTTCACAGACTCAGAGATCCTCCAGATGTTTGTCCCTTTTGGTCATG  
 TCATCTCAGCCAAAGTCTTTGTTGACCGGGCCACCAATCAGAGCAAATGTTTTGGCTTTGTGAGTTTCGACAATC  
 CGGCCAGTGGCCAGGCTGCCATCCAGGCTATGAACGGTTTCCAGATTGGCATGAAGCGCCTCAAAGTCCAGCTAA  
 AGCGCCCTAAGGATGCAAACAGGCCCTAC TAAGGGCTTCAGGTCTGGAGATAACCAGAGGAAGGGCACTTCAGTA  
 TACCCTCTTCTATGACTGGCCCTGGCCTTCTCTGCACACTGCCCCAGGCCTTGATTGGACTCTGGGGCAAGAG  
 CTGCTTTCATGGTCCGAGGGCCAGGACCTGGTCACTCCACCATCTTGCCCTCTGAAGGGCCATGGTTTTGCT  
 TCCCTGGCTTCAAGAGCCTATTTCCCTCCCAGTGCCTTTTTGGCCTTTGTGAGGAAGCAAGGAATAGGTTTTGAAG  
 GTTCAGGGGCATCTGCCTTCTGCTAAGGCTCCTGGATGAGCCTCTGTGCCCACTGCTGGCCCTTGCTCCCTCA  
 GTGGCCTGCAGTAGCTGTGCAGGCTCGGAAGGGCAGCAGGACACTCTCCTCTTTCCCAAGCACCCCTCCCCCTTGC  
 CTCTCCCCACAGCAGGGCCTTCTCAGAAGCCCTGCCTTCTCAGAAGCTGGCTCCACGTTTCTCCCCACCCTCAG  
 CTAGAGGTAGGAGATCTCAAACCCCGGGCTCTCAGCCCTAAAACACTCACTGCCTTCCCAAGAGCCCCCTCCAAG  
 GAGGGTGTGTGTGTGTGTGGGGGGCCTGAGGGCTGCCTCTCTGCCAGTCACTCACAGAGACCCCTCTTTTCAT  
 GATGGAAAATGACCTCTCCCTGAGTCCCTAAATATGTTTACAGTCTCTGCTGGCCCTCCATGTAAATACCATGA  
 CCACCAGGGCTTTAATCAGCCCACCCAGCCAGACGCTGCCATCTCTCTTTCTGGGAGTTTAGACAATGCTGCCCT  
 TGGATTTTTGTTTTTTCTTTTTTCTCTTTGATTTCTCCCTTTGCTTTGGGGTAATTGGGTATTTGGGGGAA  
 GGGTATGGGGAGGGCTAAAGGGGTTTATTACCTGATCATTTTTCTTTAGGAAGAGGTTCTAGGGAAAAAACATGG  
 GGTGGGGTGGGGAGGGTAAAGGATAAGAAGGGGAATCAATTTCTGACAGTTCTTACTCTTAACCTTATTTATG  
 AGTTTTACTTTTTAAAGAGTTGGTCTTTTTCTGTCTAAATAAAGAAAAAACATTTGAAAAAAAAAAAAAA

**Abb.17B:** Die gesamte cDNA-Sequenz von *Metr-1*. Farblich sind die einzelnen Sequenzabschnitte angegeben, die für das jeweilige Exon kodieren. Es ist auffällig, daß die ersten 12 Exons von insgesamt 13 Exons im Vergleich zum letzten Exon 13 sehr klein sind. Das **Exon 13** ist mit 1077 Nukleotiden am größten, **Exon 1** (417 Nt.), **Exon 2** (83 Nt.), **Exon 3** (49 Nt.), **Exon 4** (126 Nt.), **Exon 5** (80 Nt.), **Exon 6** (144 Nt.), **Exon 7** (143 Nt.), **Exon 8** (152 Nt.), **Exon 9** (150 Nt.), **Exon 10** (141 Nt.), **Exon 11** (144 Nt.) und **Exon 12** (136 Nt.) sind sehr klein. Das Exon 13 besteht nur aus untranslatiertem 3'-Bereich.

### 4. Diskussion

Die Ribonukleinsäure-Bindungs-Proteine (RBP) bilden eine Gen-Superfamilie, die eine wichtige Rolle bei der Regulation von Genen auf posttranskriptioneller Ebene, bei der Differenzierung von Zellen und in der Entwicklung spielen (Siomi und Dreyfuss 1997, Varani und Nagai 1998, Perron et al. 1999, Akamatsu et al. 1999). Die ELAV-like und die Bruno-like RBPs repräsentieren eine Unterfamilie, die erstmalig bei *Drosophila melanogaster* beschrieben wurden (Campos et al. 1985, Lehmann and Nüsslein-Vollhard 1986, Robinow 1988, Yao and White 1991). Ein gemeinsames Merkmal vieler *Elav-like* und *Bruno-like* Gene ist, daß sie während der Embryonalentwicklung und einige Gene besonders bei der Entwicklung des Zentralen Nervensystems von größter Bedeutung sind (Robinow und White 1988, Knecht et al. 1995, Akamatsu et al. 1999, Fujita et al. 1999, Milne und Hodgkin 1999, Suzuki et al. 2000, ). Gleichzeitig ist bekannt, daß alle *Elav-like* und *Bruno-like* Gene evolutionär konserviert sind und über ein gemeinsames Merkmal verfügen, die sogenannten RRM (RNA-Recognition-Motifs). Die *Bruno* Gen-Familie ist evolutionär stark konserviert und weist Vertreter bei Pflanzen, Würmern, Fruchtfliegen und Vertebraten auf.

#### *Die Bruno Gen-Familie ist hoch konserviert*

### 4.1 Die isolierten, partiellen cDNA-Fragmente der CAGH4/BRUNOL1 und „Similar to *etr1*“/BRUNOL4 Gene

Der Vergleich zwischen allen isolierten cDNA-Fragmenten (3.1.2) mit der „NCBI Human Genome Data Bank“ kam zu folgenden Ergebnissen:

Der cDNA Klon *H32*, 1735 Basenpaare groß, ist ein partielles cDNA-Fragment des *CAGH4/BRUNOL1* Transkriptes. Das dafür kodierende Gen gehört zur Familie der *Bruno-like* Gene und ist auf Chromosom 1 lokalisiert.

Die isolierten cDNA-Klone *H17*, *RG-1*, *RK-1* und der *EST-Klon 28405* (Abb.2B) hingegen gehören zu einem anderen Gen-Transkript, das „*Similar to etr1*“ oder *BRUNOL4* heißt. Das für diese Sequenzen kodierende Gen gehört ebenfalls zur *Bruno-like* Familie und ist auf Chromosom 18 lokalisiert.

Alle cDNA-Fragmente beider unterschiedlicher Gene waren aufgrund einer überlappenden Nukleotidsequenz von 14 bp fälschlicherweise zu einem zusammengehörenden Gen-Transkript assembliert worden (Abb. 3A/B). Zum Zeitpunkt der Erstellung der Arbeit standen die veröffentlichten DNA-Sequenzen des „Human Genome Projects“ noch nicht zur Verfügung, die ein Sequenzabgleich ermöglicht hätten und diesen Irrtum aufdecken würden. Gleichzeitig stand kein humanes Gehirn-RNA-Material zur Verfügung, das mittels einer RACE-PCR oder einer reversen Transkription unter Zuhilfenahme sequenzspezifischer

## Diskussion

---

Primer zu widersprüchlichen Resultaten geführt hätte. Die gängigen Verfahren zur Isolierung von cDNA mittels cDNA-Bibliotheken-Screenings führten nach mehreren Hybridisierungen verschiedenster humaner cDNA-Bibliotheken, insgesamt 4 Bibliotheken, (2.2.4.2.1), nur zur Isolierung eines einzigen cDNA Klons *HI7*, der schließlich durch einen überlappenden Nukleotidbereich von 14 bp mit dem cDNA Klon *H32* führte. Da zum damaligen Zeitpunkt nur die Isolierung des humanen Gens und des Sequenzabschnittes, in dem die CAG-Repeats lokalisiert sind, von Interesse waren, wurde der genomische humane PAC-Klon *HI98* nur in der CAG-Repeat-Region ansequenziert (3.1.5). Die Charakterisierung der Exon/Intron-Strukturen erfolgte nicht. Dadurch konnte der falsche Zusammenbau der cDNA Klone *H32* und *HI7* nicht aufgedeckt werden.

Zudem sind die Homologien zwischen den humanen *BRUNOL* Genen sehr hoch; so weisen die Transkripte von *BRUNOL1*, *BRUNOL2*, *BRUNOL4* und *BRUNOL 5* auf Aminosäure-Ebene eine Homologie von über 65% auf (Tab.4.2). Die Homologien auf cDNA-Ebene sind besonders im 5'-Bereich der Transkripte und in den konservierten DNA-Domänen, die z.B. für die RRM's kodieren, sehr hoch und liegen bei über 99% (Tab.4.1). Zwischen den beiden Transkripten *CAGH4/BRUNOL1* und „*Similar to etr-1*“/*BRUNOL4* ist die Homologie besonders hoch: so sind ca. 49% der cDNA zu 99%, 41% der cDNA zu ca. 90% homolog und nur ca. 10% der cDNA von *CAGH4/BRUNOL1* sind schwach homolog zu dem cDNA-Transkript „*Similar to etr-1*“/*BRUNOL4* (Tab.4.1). Diese Homologien verdeutlichen sehr anschaulich, wie im Laufe der Evolution die Zahl der Gene durch Genduplikation vervielfältigt wurde.

Auffällig ist, daß die *CAGH4/BRUNOL1* cDNA über einen 15 CAG-Triplet langen Repeat verfügt. Zu Beginn der Arbeit sollten neue Gene gesucht werden, die über lange instabile CAG oder CTG Repeats verfügen, die bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. Chorea Huntington (HD), SCA 1 (Orr et al. 1993) oder der Myotonen Dystrophie (Bates und Lehrach 1994) eine Rolle spielen. Ein Charakteristikum aller Erkrankungen ist, daß die CAG-Repeats expandiert sind und die Funktionsweise des Proteins durch einen großen Glutamin-Stretch verändert ist.

Aufgrund dessen untersuchten wir über 200 Patienten mit cerebellären oder spinocerebellären Ataxien, die den heutigen genetisch charakterisierten Ataxien nicht zuzuordnen sind, wie z.B. den spinocerebellären Erkrankungen SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, HD und DRLPA, mittels PCR auf polymorphe Eigenschaften des CAG-Repeats. Es konnte nur eine geringe Variabilität des CAG-Repeats von 2-3 Repeats festgestellt werden, so daß man davon ausgehen kann, daß der CAG-Repeat bei *CAGH4/BRUNOL1* stabil ist. Somit ist es sehr unwahrscheinlich, daß ein expandierter Glutamin-Stretch des *CAGH4/BRUNOL1* Proteins mit neurodegenerativen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden kann.

Leider war die Auswahl der Patienten beschränkt, da es sich vorwiegend um DNA mitteleuropäischer Kaukasier handelt. Es ist bekannt, daß bestimmte neurodegenerative Erkrankungen in einigen Populationen häufiger, seltener oder überhaupt nicht auftreten. So ist



## Diskussion

z.B. SCA3 in Portugal sehr häufig (ca. 74% aller autosomal dominanten cerebellären Ataxie (ADCA) Patienten), wohingegen SCA2 (4% aller Patienten), SCA1, SCA6, DRLPA selten oder gar nicht auftreten (Silveira et al.1998). In Rußland hingegen ist SCA1 die am häufigsten auftretende Ataxie (Illarioshkin et al. 1996), in Indien SCA1 und SCA2 (Basu et al. 2000) und SCA6 in Großbritannien (Leggo et al. 1997). Dies läßt sich mit dem sogenannten „Founder-Effect“ erklären, der zur Folge hat, daß sich die relative Frequenz der erblichen Ataxien weltweit und ebenso in verschiedenen ethnischen Gruppen unterscheidet. Zusätzlich sind Neumutationen in den betroffenen Genen sehr selten.

Die Genotypen, die den bisherigen Erkrankungen zugeordnet werden können, weisen bei gesunden Kontrollpersonen eine hohe CAG-Repeat Varianz auf. So gelten Huntingtin Gene, die einen CAG-Repeat von 6-35 Repeats (Bates und Lehrach 1994) aufweisen, als normal. Das Gen *CAGH4/BRUNOL1* hingegen weist in seinem CAG-Repeat-Bereich diesen Polymorphismus nicht auf. Jedoch weiß man heute, daß RNA-Bindungsproteine wie das *BRUNOL2/CUGBP1* ebenfalls in neurodegenerativen Erkrankungen involviert sind und in der Ätiologie der Myotonen Dystrophie eine Rolle spielen (Timchenko et al. 1996, Timchenko 1999). In einem späteren Abschnitt wird darauf detaillierter eingegangen .

Gen	cDNA Länge (bp)	Homologe Bereiche zu „ <i>Similar to etr-1</i> “/ <i>BRUNOL4</i>			
		>95%	95%-90%	<90%-80%	<80% bis keine
Mensch <i>CAGH4 (BRUNOL1)</i>	1720	~850 bp 99%	~700 bp 90%	-	~ 170 bp ~10% der Gesamt-cDNA
Mensch <i>CUG-bp1 /BRUNOL2</i>	1461	~800 bp 99%	-	~150 bp 85%	~500 bp ~35% der Gesamt-cDNA
Mensch <i>BRUNOL5</i>	1446	-	-	~700 bp 83%-87%	~750 bp ~52% der Gesamt-cDNA

**Tab.4.1:** Homologievergleiche zwischen den Nukleotidsequenzen der cDNAs (mRNAs) einiger *Elav-like* Gene des Menschen *CAGH4/BRUNOL1*, *BRUNOL5*, *CUG-bp1/BRUNOL2* mit dem Gen „*Similar to etr-1*“/*BRUNOL4*. Es sind nur homologe Bereiche dargestellt, die mehr als 80% der Nukleotide betragen. Da die mRNA-Transkripte der einzelnen Gene unterschiedlich lang sind, wurde in der letzten Spalte ein ungefähre Schätzung der wenig homologen cDNA-Bereiche, bezogen auf die gesamte cDNA, durchgeführt.

### 4.2 Isolierung der *Metr-1* cDNA der Maus

Zur Isolierung des „*Similar to etr-1*“/*BRUNOL4* homologen Gens *Metr-1* der Maus wurden cDNA-Bibliotheken der Maus gescreent (3.2.2). Die dabei isolierte cDNA von *Metr-1* ist 2843 bp groß. Es konnte eine hohe Homologie zu *Xenopus laevis etr-1* und dem in Kapitel 3.1.2 beschriebenen humanen Gen „*Similar to etr-1*“/*BRUNOL4* gefunden werden. Es handelt sich in diesem Falle wahrscheinlich um das homologe Maus-Gen von *Xenopus laevis etr-1* und „*Similar to etr-1*“/*BRUNOL4* des Menschen. Die *Metr-1* cDNA weist einen kurzen nichttranslatierten Bereich von 272 Basenpaaren auf. Der translatierte Sequenzabschnitt startet mit einem ATG Triplet an Nukleotidposition 273 und endet mit einem Stoppkodon TAA (2755) und weist ein Polyadenylierungssignal (Nt.2810) mit dazugehörigem PolyA-Schwanz auf, somit ist der 3'-Bereich des *Metr-1* mRNA vollständig. Die Northern Blot Analyse (3.2.3) zeigte ein ca. 3.5 kb und ein ca. 2.8 kb großes Hybridisierungssignal. Aufgrund dessen scheint zumindest die Isolation der cDNA eines mRNA Transkriptes vollständig zu sein, während das größere 3.5 kb Transkript anscheinend nicht vervollständigt werden konnte. Es ist aber sehr wahrscheinlich, daß das zweite Hybridisierungssignal eine unspezifische Kreuzhybridisierung mit dem *Metr-3* Transkript der Maus ist (Stephanie Schlickum, Diplomarbeit, unveröffentlicht, Institut für Humangenetik, Göttingen, 1999). Wie bereits erwähnt, weisen die humanen Gene „*Similar to etr-1*“/*BRUNOL4* und *CAGH4/BRUNOL1* eine sehr hohe Homologie von über 90% auf. Diese hohe Homologie ist bei *Metr-1* und *Metr-3* ebenfalls vorhanden, so daß die eingesetzte Sonde (3.2.3) unspezifisch hybridisieren konnte. Das homologe Maus-Gen *Metr-3* zu dem humanen Gen *CAGH4/BRUNOL1*, das isoliert wurde, weist diese Transkriptgröße ungefähr auf.

### 4.3 Analyse der Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *Metr-1* der Maus

Der offene Leserahmen für *Metr-1* umfaßt 1485 Nukleotide und kodiert für ein putatives Protein von 494 Aminosäuren. Bei *Metr-1* ist die Regel der Kozak Konsensussequenz nicht vollständig erfüllt. Die flankierenden Sequenzen des putativen Startkodons (5'-GCCCCA[ATG]A-3') entsprechen ebenfalls weitgehend nicht der Konsensussequenz nach Kozak. *Metr-1* verhält sich in dieser Situation wie die anderen *etr-1* Gene von *Caenorhabditis elegans etr-1*, *Danio rerio etr-1* und *Xenopus laevis etr-1*.

Ein weiteres wichtiges kritisches Merkmal für die Funktion der Initiation sind zwei hoch konservierte Nukleotidpositionen flankierend zur ATG-Region: An Position -3 haben 97% aller Vertebraten mRNAs ein Purin (normalerweise ein A) und 46% besitzen ein G an der Position +4 (Kozak 1991). Auch in diesem Punkt kann bei *Metr-1* (+4:C;-3:A) und allen weiteren „bekannten“ Vertebraten *etr-1* Genen keine vollständig übereinstimmende

Konsensussequenz gefunden werden. *Xenopus laevis etr-1* weist an diesen Positionen auf: +4:C;-3:A, ebenso wie *Danio rerio etr-1*: +4.C;-3:A.

*Metr-1* sowie die bisher bekannten homologen *etr-1* Gene, die der *Bruno* Gen Familie angehören, scheinen zu den ca.1% Genen zu gehören, die nicht den Konsensussequenz-Regeln gehorchen, wie z.B. die Gene für die regulatorisch aktiven Proteine der Wachstumsfaktoren und der Zytokinen (Kozak 1991).

#### **4.4 Homologievergleiche der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von „Similar to etr-1“/BRUNOL4 des Menschen und Metr-1 der Maus**

##### ***Die Nukleotidsequenzen von „Similar to etr-1“/BRUNOL4 und Metr-1***

Mit Hilfe des Internet-Programms NCBI BLAST Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) wurden die „Similar to etr-1“/BRUNOL4 und *Metr-1* cDNA-Sequenz mit der Sequenz einiger *Bruno-like* Gene *CUGBP1/BRUNOL2*, *Xenopus laevis etr-3*, *CAGH4/BRUNOL1*, *Xenopus laevis etr-1*, *Danio rerio etr-1*, *BRUNOL5* und *Caenorhabditis elegans etr-1* verglichen. Dieser Vergleich ergab, daß einige Sequenzbereiche eine sehr hohe Homologie (über 80% bis 99%) aufweisen. Es handelt sich hierbei besonders um die Bereiche, die für die RNA-Erkennungs-Motive (RRM) kodieren. *Metr-1* scheint das homologe Maus Gen zu dem humanen Gen „Similar to etr-1“/BRUNOL4 zu sein. Jedoch ist wahrscheinlich, daß die publizierte cDNA-Sequenz von *CAGH4/BRUNOL1* unvollständig ist und der gesamte 5'-Bereich der cDNA-Sequenz fehlt. Aufgrund der bekannten Sequenz im 3'-Bereich der cDNA ist ebenfalls eine sehr hohe Homologie zu *Metr-1* zu entdecken.

##### ***Die Aminosäuresequenz-Vergleiche von „Similar to ETR-1“/BRUNOL4 und METR-1***

Das erste putative Startkodon nach Kozak von *Metr-1* wurde zur Ermittlung der Aminosäuresequenz herangezogen (Abb.8). Auf Aminosäureebene fällt der Homologie der beiden Proteine „Similar to ETR-1“/BRUNOL4 und METR-1 sehr deutlich auf. Jedoch weisen die Aminosäuresequenzen im carboxyterminalen Bereich von METR-1 und CAGH4/BRUNOL1 höhere Homologien untereinander auf, als die carboxyterminalen Bereiche von „Similar to ETR-1“/BRUNOL4 und METR-1. Da die aminoterminalen Bereiche des CAGH4/BRUNOL1 Proteins nicht bekannt sind, ist zum momentanen Zeitpunkt schwer zu beurteilen, zu welchem Protein METR-1 das homologe Protein darstellt.

In der Abbildung 18 sind die Aminosäuresequenzen der in Tab.4.2 aufgeführten ELAV-like Proteine mit den Aminosäuresequenzen von „Similar to ETR-1“/BRUNOL4 und METR-1

## Diskussion

---

verglichen. Die Homologien der Proteine sind relativ in Prozent angegeben. Auffallend ist, daß die meisten ELAV-like Proteine evolutionär sehr stark konserviert sind.

Alle Vertebraten ETR-1 Proteine sowie CAGH4/BRUNOL1 weisen eine ca. 60%ige Homologie zu „Similar to ETR-1“/BRUNOL4 und METR-1 auf, selbst die Homologie zu den anderen in der Tabelle 4.2 erwähnten ELAV-like Proteine beträgt über 50%. Eine Ausnahme ist das Protein *Caenorhabditis elegans* ETR-1, dessen Homologie zu „Similar to ETR-1“/BRUNOL4 ca. 45% und zu METR-1 nur ca. 41% beträgt (Tab.4.2). Es ist fraglich, ob das Protein ETR-1 von *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) das homologe Protein zu „Similar to ETR-1“/BRUNOL4, METR-1 und *Xenopus laevis* ETR-1 darstellt. Alle *etr-1* Transkripte weisen auf Nukleotidsequenz-Ebene als auch die ETR-1 Proteine auf Aminosäuresequenz-Ebene untereinander eine höhere Homologie auf. Wahrscheinlich ist das Protein *C. elegans* ETR-1 nur ein sehr nah verwandtes Protein und nicht das homologe Protein zu „Similar to ETR-1“/BRUNOL4 und METR-1. Hierfür spricht auch, daß das Gen *C. elegans etr-1* in der Muskulatur von Embryonen und adulten Tieren (Milne und Hodgkin 1999) und nicht wie bei all den anderen *etr-1* Genen in Nervensystem exprimiert wird (Knecht et al. 1995, Suzuki et al. 2000/ Abb.1A). Jedoch sind die RRM-Strukturen bei allen ETR-1 Proteinen hoch konserviert. So ist im aminoterminalen Bereich von „Similar to ETR-1“/BRUNOL4 die Region nach dem vierten Methionin, der RNPs 1+2 und der dazwischen liegenden Aminosäuresequenz mit den Konsensussequenzen sowie der gesamte carboxyterminale Bereich des Proteins hoch konserviert.

Einige Konsensussequenzen sind nicht realisiert (Abb.18). Da zur Ermittlung der Konsensussequenzen die Aminosäuresequenzen aller bis 1994 bekannten RNA-Bindungs-Proteine mit RNP1 und RNP2 Motiven herangezogen wurden (Burd und Dreyfuss 1994), einer wiederum relativ heterogenen Gruppe, ist dies nicht verwunderlich. Die Regionen sind trotzdem relativ stark konserviert. Die Homologie zu z.B. *Xenopus laevis* ETR-1, human BRUNOL5, *Danio rerio* ETR-1 und METR-1 beträgt in diesen Regionen über 90%. Für die ETR-1 Proteine der Vertebraten ist die RNP2 (LFIGQI/IVIYH) Region zu 100% homolog, nur die RNP2 Region (GMHKGCAF/GNSKGCAP) weist an der zweiten Aminosäureposition eine Varianz auf. Die sogenannte Tether-Region ist bei allen ELAV-like Proteinen sehr variabel. In der Abbildung 19 sind die bisher bekannten und aus EST-cDNA-Klonen abgeleiteten und vorhergesagten Bruno Proteine in einem schematischen Dendrogramm nach Good et al. (2000) dargestellt. Das in dieser Arbeit isolierte Gen *Metr-1* und das putative Protein METR-1 sind aufgrund der Homologien (Tab.4.2) hinzugefügt worden. METR-1 weist die klassischen Strukturen aller RBPs auf. Das Protein weist aminoterminal die hoch konservierten RRM1 und RRM2 auf, darauf folgt die variable Tether Region und schließlich das dritte RRM. Die RRM sind essentielle Strukturen für die Funktion des Gens. So führen Deletionsmutanten in diesen RRM-Strukturen beim *Drosophila melanogaster* Protein ELAV (Lisbin et al. 2000) und beim Maus ELAV-like Protein mHuC (Akamatsu et al. 1999) zu schwerwiegenden funktionellen Störungen. In den RRMs liegen die hoch konservierten RNP

## Diskussion

Domänen, RNP1 (bestehend aus 6 Aminosäuren) und RNP2 (bestehend aus 8 Aminosäuren). Über die Funktion dieser konservierten Strukturen ist heute auch einiges bekannt. Zelltransfektionsexperimente mit modifiziertem mHuB und mHuC Protein der Maus bewirkten unterschiedlichste Störungen. So führten Aminosäureaustausche im ersten RNP1 des zweiten RRM3 von mHuC zum vollkommenen Verlust der biologischen als auch RNA-Bindungs-Aktivität. Außerdem konnte gezeigt werden, daß nur das RRM3 für die Bindung der Ziel-RNA verantwortlich und essentiell ist, wohingegen RRM1 und RRM2 für diese biologische Funktion nicht notwendig sind (Akamtsu et al. 1999). Die ersten beiden RRM3, RRM1 und RRM2 weisen untereinander eine höhere Homologie auf als zu RRM3, was vermuten läßt, daß RRM1 und RRM2 durch ein Duplikationsereignis entstanden sind, und sich deswegen auch ihre biologische Funktion von der des RRM3 unterscheidet (Lisbin et al 2000). Genauere Studien über die Funktion der einzelnen Proteinstrukturen der Bruno Proteine liegen bis heute nicht vor, es läßt jedoch vermuten, daß die RRM-Strukturen, die RNPs und die Tether Region ähnliche, konservierte biologische Funktionen übernehmen.

### *Proteinsequenzen einiger RNA-Bindungs-Proteine*

CUGBP1/BRUNOL2	-----MNGTLDHPDQPDLD	14
Xenopus 1. ETR-3	----MFERTSKPAFVENICVESMRCPKSAVTMRNEELLF SNGTTNKMNGALDHSDDQDPD	56
Similar to ETR1	-----MYIKMATLANGQADNASLSTNGLGSSPGSAGHMNGLSHSPGNPSTIPMKDHD	52
Human BRUNOL4	-----MYIKMATLANGQADNASLSTNGLGSSPGSAGHMNGLSHSPGNPSTIPMKDHD	52
<b>METR-1</b>	-----MKEPD	
HUMANCAGH4/BRUNOL1	-----	
Xenopus 1. ETR-1	-----MKEPD	5
Danio rerio ETR-1	-----MKEAD	5
Human BRUNOL5	-----MARLTESEARRQQQLLQPRPSPVGS---SGPEPPGGQPD--GMKDLD	43
C.elegans ETR-1	-----MSGAVLPAVLVVPKMESVVVPIAESTVINAKDTPSTAADNDVSPSPSEPDTD	53
CUGBP1/BRUNOL2	AIKMFVGQVPRTWSEKDLRELFEQYGAVVEINVLDRSQNPQSKGCCFVTFYTRKA	74
Xenopus 1. ETR-3	AIKMFVGQIPRSWSEKELKDLFEPYQAVYQINVLDRSQNPQSKGCCFVTFYTRKA	116
Similar to ETR1	AIKLFVGQIPRNLDKDLKPLFEEFGKIYELTVLKDRFT--GMHKGCAF	110
Human BRUNOL4	AIKLFVGQIPRNLDKDLKPLFEEFGKIYELTVLKDRFT--GMHKGCAF	110
<b>METR-1</b>	AIKLFVGQIPRHLEKDLKPIFEQFGRIFELTVIKDKYT--GLHKGCAF	63
HUMANCAGH4/BRUNOL1	-----	
Xenopus 1. ETR-1	AIKLFVGQIPRNLDKDLKPIFEQFGRIFELTVIKDKYT--GMHKGCAF	63
Danio rerio ETR-1	AIKLFVGQIPRNLEKDLKPIFEQFGRIFELTVIKDKYT--GMHKGCAF	63
Human BRUNOL5	AIKLFVGQIPRHLEKDLKPLFEEFGKIYELTVLKDPYT--GMHKGCAF	101
C.elegans ETR-1	AIKMFVGQIPRQWNETDCRRLFEKYGSVFSCNIIIRDKST--QASKGCCFVTFYHRKDAIE	111
<b>Konsensus</b>	<b>LFVGNL E L F FGI I KGFGVXF A</b>	
	<b>D V V</b>	
CUGBP1/BRUNOL2	AQNALHNMKVLPGMHHPIQMKPADSEKNAVE-----DRKIGMILFSKKCTENDIRV	126
Xenopus 1. ETR-3	AQNALHNIKTLPGMHHPIQMKPADSEKNAVE-----DRKLFIGMVSKKCNENDIRV	168
Similar to ETR1	AQSALHEQKTLPGMNRPIQVKPADSESRGSSCLRQPPS-HRKLFVGMNLNKQSEDDVRR	169
Human BRUNOL4	AQSALHEQKTLPGMNRPIQVKPADSESRGSSCLRQPPSQDRKLFVGMNLNKQSEDDVRR	170
<b>METR-1</b>	AQSALHEQKTLPGMNRPIQVKPADSESRGD-----RKLFVGMNLGKQQTDEDVRR	112
HUMANCAGH4/BRUNOL1	-----MRTSG-----R	6
Xenopus 1. ETR-1	AQSALHEQKTLPGMNRPIQVKPADSESRGD-----RKLFVGMNLGKQQTDEDVRR	113
Danio rerio ETR-1	AQNALHEQKTLPGMNRPIQVKPADSESRGD-----RKLFVGMNLGKQLSDADVRR	112
Human BRUNOL5	AQTALHEQKTLPGMARPIQVKPADSESRGGR-----DRKLFVGMNLNKQSEDDVLR	152
C.elegans ETR-1	AQGALHNIKVIEGMHHPVQMKPADTENRNE-----RKLFIGQLSKKHNEENLRE	160
<b>Konsensus</b>	<b>L G LFVGNL E</b>	
	<b>I D</b>	

# Diskussion

CUGBP1/BRUNOL2	MFSS <b>FGQI</b> EECR <b>IL</b> RGPD <b>GLSRGCAF</b> VVTFTRAM <b>AQ</b> TAIKAM <b>HQA</b> QTMEGCSSPMVVKFA	186
Xenopus 1. ETR-3	MFSP <b>FGQI</b> EECR <b>IL</b> RGPD <b>GLSRGCAF</b> VVTFSTRAM <b>AQ</b> NAIKAM <b>HQS</b> QTMEGCSSPIVVKFA	228
Similar to ETR1	LFEA <b>FGNI</b> EECT <b>IL</b> RGPD <b>GNSKGC</b> AFVKYSSHAE <b>AQA</b> AINAL <b>HGS</b> QTMPGASSSLVVKFA	229
Human BRUNOL4	LFEA <b>FGNI</b> EECT <b>IL</b> RGPD <b>GNSKGC</b> AFVKYSSHAE <b>AQA</b> AINAL <b>HGS</b> QTMPGASSSLVVKFA	230
<b>METR-1</b>	MFEP <b>FGTI</b> DECT <b>VL</b> RGPD <b>GTSKGC</b> AFVKFQTHAE <b>AQA</b> AIN <b>LHS</b> SRTLPGASSSLVVKFA	172
HUMANCAGH4/BRUNOL1	CLSP <b>SGPS</b> TSAL <b>CSGGQ</b> MA <b>PAKGC</b> AFVKFQTHAE <b>AQA</b> AIN <b>LHS</b> SRTLPGASSSLVVKFA	66
Xenopus 1. ETR-1	MFEP <b>FGNI</b> DECT <b>VL</b> RGPD <b>GTSKGC</b> AFVKFQTHAE <b>AQA</b> AINAL <b>HGS</b> SRTLPGASSSLVVKFA	173
Danio rerio ETR-1	MFEP <b>FGSI</b> EECT <b>VL</b> RGPD <b>GASKGC</b> AFVKYQSNAE <b>AQA</b> ISAL <b>HGS</b> SRTLPGASSSLVVKFA	172
Human BRUNOL5	LFQP <b>FGVI</b> DECT <b>VL</b> RGPD <b>GSSKGC</b> AFVKFSSHTE <b>AQA</b> IHAL <b>HGS</b> QTMPGASSSLVVKFA	212
C.elegans ETR-1	IFAK <b>FGHI</b> EDCS <b>VL</b> RQD <b>GKSRGC</b> AFVTFNRS <b>CA</b> VVATKE <b>MHS</b> QTMEGC <b>SAP</b> LVVKFA	220
<b>Konsensus</b>	<b>FG I V KGFQVFXF A L G</b> <b>I I I</b>	
CUGBP1/BRUNOL2	DTQKDKEQKRMAQQQLQQ-----MQQQIS--AICVG-----	214
Xenopus 1. ETR-3	DTQKDKEQRRLQQQLAQ-----MQQQLN--TATWGNLTGLGGLTPQYLALLQQ	274
Similar to ETR1	DTDKERTMRRMQQMAGQ-----MGMFNP-MAIPFGAYGAYAQA-----LMQQQ	271
Human BRUNOL4	DTDKERTMRRMQQMAGQ-----MGMFNP-MAIPFGAYGAYAQA-----LMQQQ	272
<b>METR-1</b>	DTEKERGLRRMQQVATQ-----LGMFSP-IALQFGAYSAYTQA-----LMQQQ	214
HUMANCAGH4/BRUNOL1	DTEKERGLRRMQQVATQ-----LGMFSP-IALQFGAYSAYTQA-----LMQQQ	108
Xenopus 1. ETR-1	DTEKERGLRRMQQVANQ-----LGMFSP-IALQFGAYSAYTQAVSDQ-LMQQQ	219
Danio rerio ETR-1	DTEKERGIRRMQQVASQ-----LGVISP-MNLHLGAYNAYTQA-----LVQQQ	214
Human BRUNOL5	DTDKERTLRRMQQMVQ-----LGI LTPSLTLPFSPYSAYAQA-----LMQQQ	255
C.elegans ETR-1	DTQKDKDVKTKSMITGSGAGSPKGGASLLQNLNLPALLQQLGGGQNYQAVASLLSLINGQ	280
CUGBP1/BRUNOL2	-----KPCWSK-----YSWTPVVFSTP	230
Xenopus 1. ETR-3	ATTPSNLGAFGSIIQQMAGMNALQLQNLATLAAAAAAQTSATT-----TNVNPLSTTA	327
Similar to ETR1	AALMASVAQGGYLNPMAAFAAAQMQQMAALNMNGLAAAPMTPT-----SGGSTPPPGITA	325
Human BRUNOL4	AALMASVAQGGYLNPMAAFAAAQMQQMAALNMNGLAAAPMTPT-----SGGSTPPPGITA	326
<b>METR-1</b>	AALVA--AHSAYLSPMATMAAVHDAAHGCHQCQWPHRHPHHSI-----LRNQHPSCHC	266
HUMANCAGH4/BRUNOL1	AALVA--AHSAYLSPMATMAAVQMQHMAA INANGLIATPITPS-----SGSTPPPIAA	160
Xenopus 1. ETR-1	AALVA--AHSAYLNPMATMAAVQMQQMATINPNGI IATPITQINPITSSSGTSTPPTLTA	277
Danio rerio ETR-1	A--LV--AQ SAYLSPVATVAAVQMQQALALNPSSIIATPIASITP---SSGTSTPPTIAA	267
Human BRUNOL5	TTVLS--TSGSYLSPGVAFSPCHIQQIGAVSLNGLPATPVAPA-----SGLHSPPLLGT	307
C.elegans ETR-1	QQQQQ---QHQQQNVLGILGTVLSALGKLTEGGDDASAKSSSEKPRHQALMTSPAPTAT	337
CUGBP1/BRUNOL2	SADCLLWEPQHPEQPPP--NGRVECNAVTEFGCTSCCS-----	266
Xenopus 1. ETR-3	SALGALTSPVAASTANS--SAGAAMNSLTSGLTLQGLAGATVGLNNINALAGTVNSMAAL	385
Similar to ETR1	PAVPSIPSPIGVNGFTG-LPPQANGQPAAEAVFANGIHYP-----	365
Human BRUNOL4	PAVPSIPSPIGVNGFTG-LPPQANGQPAAEAVFANGIHYP-----	366
<b>METR-1</b>	HARLCHPCCLGRQRLQPGAHPAYTGQPAPDALYPNGVHPYPDEALSAERSAGGVPIMSQA	326
HUMANCAGH4/BRUNOL1	TPVSAIPAAALGVNGYSP-VPTQPTGQPAPDALYPNGVHPYP-----	200
Xenopus 1. ETR-1	TQVSAIPATLGVNGYSA-VPTQSTVQPSSEAIYTNGLHPYP-----	317
Danio rerio ETR-1	TPVPALPPP IAVNSYPP-VPAAPNGQSASEALYTNGVHPYQ-----	307
Human BRUNOL5	TAVPGLVAPIT-NGFAG-VVPFPGGHPALETVYANGLVPYP-----	346
C.elegans ETR-1	SSTSSSASHHHQQHQQLSQQQQQQHPQQQGLGNPLLGNPAMAAQNQFDAITMAQIAHQ	397
CUGBP1/BRUNOL2	-----	
Xenopus 1.ETR-3	NGGLGAT---GLTNGTAGTMDALTQAYSGIQQYAA-AALP-----TLY	424
Similar to ETR1	-----AQSPTA-ADPLQQAYAGVQQYAA-AAYP-----AAYGQI	397
Human BRUNOL4	-----AQSPTA-ADPLQQAYAGVQQYAGPAAYP-----AAYGQI	399
<b>METR-1</b>	HSWLVML---SAAQSPAAPVDPLQQAYAGMQHYT--AAYP-----AAYSLV	367
HUMANCAGH4/BRUNOL1	-----AQSPAAPVDPLQQAYAGMQHYT--AAYP-----AAYSLV	232
Xenopus 1. ETR-1	-----AQSPVAQLDPLQQAYAGMQHYT--AAYP-----AAYGLV	349
Danio rerio ETR-1	-----AQSPA--LDPLQQAYTGMQHYT--ATYP-----AAYGLV	337
Human BRUNOL5	-----AQSPTV-AETLHPAFSGVQQYT--AMYPT-----AAITPI	378
C.elegans ETR-1	QQMLALQGFVQQGAPSQQQQGLAGGMAGAKTTS PVAASLANHQIALT PPFAGGAAALDH	457
CUGBP1/BRUNOL2	-----	
Xenopus 1. ETR-3	SQSLQQQSAAGSQKEGL-----LFISAQPEGAN <b>LFIYHL</b> PQEFQD <b>DI</b> LQ	471
Similar to ETR1	SQAFPQPPMIPQQ-----QREGPEGCN <b>LFIYHL</b> PQEFQD <b>AE</b> LMQ	437
Human BRUNOL4	SQAFPQPPMIPQQ-----QREGPEGCN <b>LFIYHL</b> PQEFQD <b>AE</b> LMQ	439
<b>METR-1</b>	APAFPQPPALVAQQPPPPPPQQQQQQQQQQQQQQREGPDGCN <b>IFIYHL</b> PQEFQD <b>SE</b> ILQ	427
HUMANCAGH4/BRUNOL1	APAFPQPPALVAQQPPPPPPQQQQQQQQQQQQQQREGPDGCN <b>IFIYHL</b> PQEFQD <b>SE</b> ILQ	291
Xenopus 1. ETR-1	SPAFTQPPAI IQQQPP-----QQQQQREGPEGCN <b>IFIYHL</b> PQEFQD <b>SE</b> ILQ	395
Danio rerio ETR-1	GQFPFHQPTLVAQQPQQP-----QQLQQREGPEGCN <b>IFIYHL</b> PQEFQD <b>SE</b> MLQ	385
Human BRUNOL5	AHSVPQPPPLLQQQ-----QREGPEGCN <b>LFIYHL</b> PQEFQD <b>TE</b> LQ	418
C.elegans ETR-1	FQAMQQYALLANLQATGGVGVQATTSAQMVGNDVKGPDGAN <b>LFIYHL</b> PQDFGDS <b>DL</b> IN	517
<b>Konsensus</b>	<b>IYIKGM D L</b> <b>E</b>	

## Diskussion

```

CUGBP1/BRUNOL2 -----
Xenopus l. ETR-3 MFMFFGNVISAKVFIDKQTNLSKCFGFVSYDNPVSAQAAIQAMNGFQIGMKRLKVLKRS 531
Similar to ETR1 MFPFFGFV-----SFDNPASAQTAIQAMNGFQIGMKRLKVLKRP 477
Human BRUNOL4 MFLPFGFV-----SFDNPASAQTAIQAMNGFQIGMKRLKVLKRP 479
METR-1 MfvPFGHVISAKVFVDRATNQSKCFGFVSYDNPASAQAAIQAMNGFQIGMKRLKVLKRP 487
HUMANCAGH4/BRUNOL1 MfvPFGHVISAKVFVDRATNQSKCFGFVSYDNPASAQAAIQAMNGFQIGMKRLKVLKRP 351
Xenopus l. ETR-1 MFLPFGNVISAKVFVDRATNQSKCFGFVSYDNPASAQAAIQAMNGFQIGMKRLKVLKRP 455
Danio rerio ETR-1 MFLPFGNVISAKVFVDRATNQSKCFGFVSYDNPASAQAAIQAMNGFQIGMKRLKVLKRP 445
Human BRUNOL5 MFLPFGNIISSKVFMDRATNQSKCFGFVSYDNPASAQAAIQAMNGFQIGMKRLKVLKRP 478
C.elegans ETR-1 TFAPFGGILSAKVFIDKVTNLSKCFGFVSYENAQSATNAISAMNGFQIGSKRLKVLKVD 577
Konsensus F FG V R YA Y A L G
I I/V
  
```

```

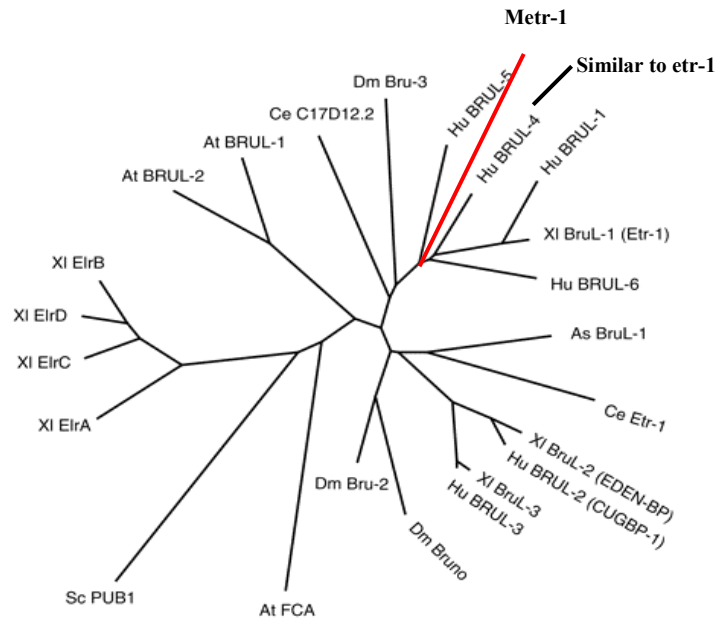
CUGBP1/BRUNOL2 ----- 266 Aminosäuren
Xenopus l. ETR-3 KNDSKPY 538 Aminosäuren
Similar to ETR1 KDANRPY 484 Aminosäuren
Human BRUNOL4 KDANRPY 486 Aminosäuren
METR-1 KDANRPY 494 Aminosäuren
HUMANCAGH4/BRUNOL1 KDANRPY 358 Aminosäuren
Xenopus l. ETR-1 KDANRPY 462 Aminosäuren
Danio rerio ETR-1 KDANRPY 452 Aminosäuren
  
```

**Abb.18:** Aminosäuresequenzen (im Ein-Buchstaben-Code angegeben) verschiedener Bruno-like Proteine der Spezies Mensch [Human CAGH4/BRUNOL1, human „Similar to ETR-1“ BRUNOL4, human BRUNOL5, human CUGBP1/BRUNOL2], Maus (METR-1), *Xenopus laevis* (ETR-1 und ETR-3), Zebrafisch (*Danio rerio*) ETR-1 und *Caenorhabditis elegans* ETR-1. Die Sequenzen der RNP Motive sind farblich **rot**, die Konsensussequenzen der RNPs Motive sind **blau** dargestellt (nach Burd und Dreyfuss 1994 und Birney et al. 1993).

Bruno-like Proteine	Länge der Proteine (in AS)	Homologie „Similar to etr-1“/BRUNOL4 (484 AS)	Homologie zu METR-1 (494 AS)
CUGBP1/BRUNOL2	266	67%	52%
Mensch BRUNOL5	481	67%	52%
CAGH4/BRUNOL1	358	66%	62%
METR-1	494	63%	-
Xenopus laevis ETR-1	462	65%	67%
Xenopus laevis ETR-3	538	52%	55%
Danio rerio ETR-1	452	63%	64%
Caenorhabditis elegans ETR-1	584	45%	41%

**Tab.4.2:** Homologien der Aminosäuresequenzen der Bruno-like Proteine der Spezies Mensch [Human CAGH4/BRUNOL1, human BRUNOL4, human BRUNOL5, human CUGBP1/BRUNOL2], *Xenopus laevis* ETR-1 und ETR-3, Zebrafisch (*Danio rerio*) ETR-1 und *Caenorhabditis elegans* ETR-1 zu BRUNOL4 Protein sowie dem Maus Protein METR-1. Die Analyse erfolgte mit dem Internet NCBI BlastP Search Programm. Die Länge der Aminosäuresequenz (AS) ist relativ in Prozent zu „Similar to ETR-1“/BRUNOL4 bzw. METR-1 angegeben.





**Abb.19: Dendrogramm der Bruno Familie** nach Good et al. (2000), erweitert um das Maus-Protein METR-1. Die bekannten und vorhergesagten Bruno Proteine (abgeleitet aus den bekannten EST Klonen) wurden mit dem Programm ClustalW verglichen und in einem radialen Stammbaum angeordnet. Die Zugangsnummern für die Gen-Datenbank sind in Klammern hinzugefügt. XI EDEN-BP/XI BruL-2 (AF003923), At (*Arabidopsis*) FCA (Z82989), At BruL-1, kodiert durch das Gen T4I9.1 (AF069442), At BruL-2 und At BruL-3. Die Mitglieder der *Xenopus laevis* ELAV-Familie: ElrA, ElrB, ElrC, ElrD (Lie und McDonald 1999) und XI BruL-1 (ETR-1/U16800) sowie die Bruno Proteine von *Caenorhabditis elegans* ETR-1 (Ce ETR-1, U53931) und des vorhergesagten Gens CeC17D12.2, die *Drosophila melanogaster* Bruno Proteine Dm Bruno (U58976), Dm Bru-3 (AC017632) und Dm Bru-2 (AC005711), die humanen Bruno Proteine BRUL1-6 (AF284423, AF248648, U69546, AF248649/AF248650 und AF248651), die Aminosäuresequenz des Manteltieres *Ascidia Halocynthia roretzi* (As BruL-1/AV384552) sowie das Hefe-Protein PUB1 (Sc PUB1/L20767).

#### 4.5 Analyse der gewebespezifischen Expression von „*Similar to etr-1*“ / *BRUNOL4*, *CAGH4/BRUNOL1* und *Metr-1*

##### *Die Expression von „Similar to etr-1“/BRUNOL4 und CAGH4/BRUNOL1*

Durch die Northern Blot Analyse (3.1.3) konnte eine starke Expression von „*Similar to etr-1*“/*BRUNOL4* und *CAGH4/BRUNOL1* in der adulten Gehirn-RNA nachgewiesen werden (Abb.4A+B). Bei einer Hybridisierung mit der „*Similar to etr-1*“/*BRUNOL4* spezifischen cDNA-Sonde *H17* konnte nur ein prominentes Signal von ca. 4.0 kb Größe identifiziert



werden (Abb.4A). Bei einer Northern Blot Analyse mit der *CAGH4/BRUNOL1* spezifischen H32 cDNA-Sonde erhält man zwei Hybridisierungssignale in humaner poly-(A<sup>+</sup>) RNA, nämlich ein schwächeres Signal von einer Größe von ca. 3.0 kb und ein prominentes Signal von ca. 4.0 kb (Abb.4.B). Dies läßt darauf schließen, daß *CAGH4/BRUNOL1* im humanen Gehirn in verschiedenen cDNA-Isoformen transkribiert vorliegt oder daß die H32 Sonde unspezifisch mit einem anderen Gen-Transkript hybridisiert. Dies ist durchaus denkbar, da die *Bruno-like* Genfamilie sehr konserviert vorliegt. So ist die cDNA-Sonde H32 auf Nukleotid-Ebene mit dem Gen *BRUNOL5* über 90% homolog. Außerdem ist bekannt, daß viele *Bruno-like* Transkripte in verschiedenen Isoformen vorliegen, wie z.B. *C.elegans etr-1* (Milne und Hodgkin 1999), *CAGH4/BRUNOL1* (Margolis et al. 1997, Good et al. 2000), *BRUNOL2* (Good et al. 2000), so daß differenzierte Spleißprozesse in der Zelle nicht auszuschließen sind. „*Similar to etr-1*“/*BRUNOL4* und *CAGH4/BRUNOL1* konnten nicht in RNA aus Herz, Plazenta, Lunge, Leber, Skelett-Muskel, Niere und Pankreas nachgewiesen werden.

Die bisher bekannten *BRUNOL* Gene werden sehr unterschiedlich exprimiert. Das humane Gen *CUGBP/BRUNOL2* wird ubiquitär in drei abundanten mRNAs (Timchenko 1999, Good et al. 2000), während nur ein *BRUNOL3*-Transkript (*etr-3*; Lu et al. 1999) hauptsächlich im Herz, in der Muskulatur und im Nervensystem exprimiert wird. Das Expressionsmuster von *BRUNOL4* war bis zu dieser Arbeit nicht untersucht worden, während über die Expression der Gene *BRUNOL5* und *BRUNOL6* bis heute nichts bekannt ist.

### 4.6 Die Expression von *Metr-1*

#### *Northern Blot und RT-PCR Analysen*

In der Northern Blot Analyse konnte gezeigt werden, daß *Metr-1* in adulten Mäusen nur im Gehirn und im Testis exprimiert wird. Im Gehirn konnten zwei mRNA Transkripte von einer Größe von ca. 2.8 kb und 3.5 kb nachgewiesen werden. Es kann sich in diesem Fall um eine Kreuzhybridisierung mit einem anderen mRNA Transkript handeln, wie z.B. dem homologen *CAGH4/BRUNOL1* Transkript, das, wenn es bei der Maus ebenfalls existiert, wahrscheinlich im 3'-Bereich zu *Metr-1* wie die humanen Gene eine sehr hohe Homologie aufweisen wird. Bis heute ist das *CAGH4/BRUNOL1* homologe Maus Gen nicht isoliert worden.

Es ist bekannt, daß *Bruno-like* Transkripte im selben Gewebe in verschiedenen Isoformen vorliegen können, wie z.B. *C.elegans etr-1* (Milne und Hodgkin 1999), *CAGH4/BRUNOL1* (Margolis et al. 1997, Good et al. 2000) und *BRUNOL2* (Good et al. 2000). Die funktionelle Bedeutung dieser verschiedenen mRNA Isoformen ist unbekannt. Jedoch konnte gezeigt werden, daß die variablen Aminosäurebereiche bei *BRUNOL3* (Choi et al. 1998) und *Xenopus BrunoL-3* (Good et al. 2000) außerhalb der RNA-Bindungs-Domäne der beiden

## Diskussion

---

ersten RRM's liegen. Good et al. (2000) postulieren, daß diese Protein-Isoformen die Funktion des Bruno Proteins insofern modifizieren, indem eine Protein-Interaktions-Domäne funktionell verändert oder die zelluläre Lokalisation des Proteins verändert wird. Schließlich verfügt das humane BRUNOL4 Protein über multiple Isoformen (Good et al. 2000), die Deletionen im dritten RRM aufweisen, was wahrscheinlich zu einer alterierten RNA-Bindungsfunktion dieser Domäne und somit Proteins führt.

Im Testis hingegen ist nur ein Transkript von einer Größe von ca. 3.0 kb zu detektieren. Shibata et al. (2001) isolierten ein 2937 bp großes mRNA Transkript *Mus musculus adult male testis cDNA* aus dem Testis einer adulten Maus, dessen Nukleotidsequenz zu 73% eine über 95%ige Homologie zu *Mettr-1* aufweist. Ermittelt man die Aminosäuresequenz des Proteins, so fällt auf, daß diese durch sehr viele Stoppkodons unterbrochen ist. Daß dieses testisspezifische Transkript für ein funktionelles Protein kodiert ist höchstwahrscheinlich auszuschließen. Jedoch kann man annehmen, daß aufgrund der hohen Homologie der cDNA zu *Mettr-1* in der Northern Blot Analyse dieses von Shibata et al. isolierte Transkript im Testis der Maus ermittelt wurde und dem 3.0 kb Hybridisierungssignal entspricht. Die für den Northern Blot eingesetzten cDNA-Sonden *M9* und *M136* weisen eine fast 100%ige Homologie zu den entsprechenden Sequenzabschnitten der *Mus musculus adult male testis cDNA* auf. In der Analyse von postnatalen Testes der Maus (3.2.6.2) mittels RT-PCR konnte gezeigt werden, daß ab dem Tag 19 eine schwache *Mettr-1* Expression nachzuweisen ist, die in den Tagen 20, 25, 30, 40 und 50 im Testis persistiert. Postnatal fehlt die *Mettr-1* Expression in 5, 7, 10 und 15 Tage altem Testis. Ungefähr ab dem Tage 40 sind Mäuse fertil und die Spermatogenese setzt ein. Somit wird *Mettr-1* in den Keimzellen und erst in Pächytän-Spermatozyten exprimiert. Die *Mettr-1* Expression ist beim Einsetzen der Spermatogenese bereits vorhanden. Dieses Ergebnis wurde durch RT-PCRs mit RNA von Maus-Mutantenlinien bestätigt. Die Testis-RNA der Maus-Mutantenlinien *w/w<sup>v</sup>*, *tfm/y*, *olt/olt* und *qk/qk* mittels RT-PCR untersucht wurde. Die Mauslinie *w/w<sup>v</sup>* verfügt über keine testikulären Keimzellen, *Tfm/y*, mit einem Arrest der Spermatogenese in den primären Spermatozyten-Stadien, *olt/olt*, mit einem Arrest der Spermatogenese in den frühen Spermatischen Stadien und *qk/qk* mit einem Arrest der Spermatogenese in den elongierenden Spermatischen. *Mettr-1* konnte nur in den Mauslinien *olt/olt* und *qk/qk* nachgewiesen werden. Im Testis der Maus Mutantenlinie *olt/olt* sind alle Spermatozytenstadien und runde Spermatischen entwickelt. Die elongierten Spermatischen, die in der Mutantenlinie *qk/qk* noch gebildet werden, fehlen, als auch die fertigen Spermatozoen. Die *Mettr-1* Expression kann somit erst ab den Pächytän-Spermatozyten nachgewiesen werden.

Da nur die mRNA Expression im Testis nachgewiesen wurde, fehlt natürlich der Nachweis des METR-1 Proteins. Insofern kann keine Aussage getroffen werden, ob METR-1 in der Spermatogenese eine funktionelle Rolle spielt. Es ist bis heute nicht bekannt, daß *Bruno-like* Gene in der Spermatogenese eine Rolle spielen. Die einzigen Gene, von denen bisher bekannt sind, daß sie im Testis exprimiert werden, sind *BRUNOL2* (Good et al. 2000), das ubiquitär

## Diskussion

exprimiert wird, und *Metr-1*, sowie die testisspezifische *Mus musculus adult male testis mRNA* (Shibata et al. 2001), die wahrscheinlich ein alternatives Transkript von *Metr-1* darstellt. Es ist nicht anzunehmen, daß mit Hilfe der RT-PCR das von Shibata et al. (2001) charakterisierte mRNA Transkript *Mus musculus adult male testis cDNA* (Acc.AK019578) nachgewiesen wurde. Ein Sequenzvergleich ergab, daß die für die RT-PCR (3.2.6.2) eingesetzten Primer nicht oder nur erschwert an *Mus musculus adult male testis cDNA* binden können. Einerseits ist eine Bindung der cDNA erschwert, da der 5'-Bereich der beiden cDNA-Sequenzen *Mus musculus adult male testis cDNA* und *Metr-1* nicht homolog sind und der RT-PCR Primer (ATGTIM, Abb.7) aus dieser nicht homologen Region stammt. Andererseits ist die Bindung des zweiten Primer Ex3/4 dadurch erschwert ist, daß ein Nukleotidtriplet fehlt (siehe Tab.4.3). Da unter sehr stringenten Bedingungen die RT-PCR durchgeführt wurde, ist nur eine spezifische Amplifikation von *Metr-1* möglich und die Amplifikation von *Mus musculus adult male testis cDNA* auszuschließen.

Ex3/4-Primer	5'-GAG GTT CCG GTC TCC TCG ACT CTC-3'
Mus adult male Testis cDNA	5'-GAG GTT CCG GTC TTC TCC TCG ACT CTC-3'

**Tab.4.3:** Der für die RT-PCR eingesetzte Primer Ex3/4 im Vergleich zur Nukleotidsequenz des homologen Bereichs der *Mus musculus adult male testis cDNA* (NCBI Datenbank Acc.AK0119578).

In der Northern Blot Analyse konnte nur ein einziges 3.0 kb großes Transkript im Testis identifiziert werden, somit stellt sich die Frage, ob in diesem Experiment zwei unterschiedliche aber gleich große mRNA Transkripte identifiziert wurden. Hingegen ist die RT-PCR von *Metr-1* zu spezifisch, um gleichzeitig das Transkript von „*Mus musculus adult male testis*“ und *Metr-1* zu amplifizieren. Jedoch ist bekannt, daß aufgrund unterschiedlicher Spleißprozesse differenzierte mRNAs gebildet werden können. So sind vom *BRUNOL2* Gen zwei sehr unterschiedliche mRNA Transkripte bekannt. Good et al.2000 konnten zeigen, daß das ursprünglich *CUGbp1* bezeichnete Transkript (Timchenko et al.1996) ein alternatives Spleißprodukt des Gens *BRUNOL2* ist, sie unterscheiden sich in der 3'-untranslatierten Region. Die Ursache hierfür ist alternatives Spleißen: *CUGbp1* mRNA enthält ein alternatives Exon, während *BRUNOL2* mRNA ein ungespleißtes Exon beinhaltet. Ähnliches ist von *BRUNOL3 (NAPOR)* bekannt, von dem man drei unterschiedliche cDNAs isolieren konnte, die sich im 5'-Bereich der Sequenzen unterscheiden (Choi et al.1998). Vergleicht man diese cDNA Sequenzen mit genomischen Sequenzen, so ergibt sich die Vermutung, daß diese alternativen mRNAs durch alternative Promotoren gesteuert werden, die für spezielle 5'-Exone kodieren (Good et al. 2000). Diese alternativen 5'-Endsequenzen können ebenfalls beim *Xenopus BrunoL-3* Gen beobachtet werden (Good et al. 2000). Aber auch das Protein

wie z.B. ELAV von *Drosophila melanogaster* kann in alternativ gespleißten Protein-Isoformen vorliegen (Koushika et al. 1996).

Ein ähnlicher Mechanismus könnte bei der Regulierung der mRNA Transkripte von *Metr-1* und *Mus musculus adult male testis cDNA* vorliegen. Sowohl die 5'-Bereiche der Gene unterscheiden sich als auch partielle Bereiche der cDNAs.

### ***In situ* Hybridisierungs-Analysen**

Bei *in situ* Hybridisierungs-Experimenten (3.2.5) konnte die *Metr-1* mRNA Expression ausschließlich in den Purkinje Zellen und vereinzelt in den Stern- und Korbzellen des Kleinhirns der Maus nachgewiesen werden. Dieses Resultat ist insofern von großem Interesse, da bekannt ist, daß expandierte CAG-Repeats wie z.B. beim *SCA1* Gen, als molekulargenetische Ursache für die Degeneration der Purkinje Zellen beim Menschen festzustellen sind. In transgenen Mäusen, die ein humanes *SCA1* Gen mit einem expandierten (CAG)<sub>82</sub>-Repeat besitzen, konnte der Purkinje-Zellverlust ebenfalls beobachtet werden (Burrigh et al. 1995). Die transgenen Tiere entwickelten einen neurologischen Phänotyp, der ebenfalls bei menschlichen Ataxien zu beobachten ist. Da jedoch die CAG-Repeats bei *Metr-1* wenig polymorph sind, 2-3 Repeats, ist eine pathogene Wirkung von *Metr-1* in dieser Weise sehr unwahrscheinlich. Jedoch konnte gezeigt werden, daß *Brunol-like* Gene wie das *C. elegans ETR-1* Protein in der Muskelentwicklung von *Caenorhabditis elegans* (Milne and Hodgkin 1999) notwendig sind, und bei der Manifestation neuromuskulärer Erkrankungen des Menschen eine Rolle spielen können.

Das menschliche Bruno Protein BRUNOL2/CUGBP1 ist in der Entwicklung der Myotonen Muskel-Dystrophie (DM) involviert (Timchenko et al. 1996, Timchenko 1999). Die Myotone Dystrophie (DM) ist eine autosomal dominante neuromuskuläre Erkrankung (Harper 1989), die sich im allgemeinen mit einer Myotonie, Muskelschwäche, Muskelabbau, Nerven- und Gehirndegeneration als auch multiplen Organschäden manifestiert. Die Mutation, die die DM verursacht, ist eine CTG-Repeat Expansion, die 500 bp vom polyA-Schwanz in der 3'-untranslatierten Region der mRNA der Myotonen Dystrophie Protein Kinase (DMPK) vorliegt. Der CTG-Repeat ist in der Bevölkerung hoch polymorph, mit einer Verteilung der Allele, die von 5-35 CTG-Repeats variiert (Brook et al. 1992, Fu et al. 1992 und Harley et al. 1992). Allele, die eine DM verursachen, weisen im allgemeinen mehr als 50 CTG-Repeats auf. Im Gegensatz zu anderen Triplet-Repeat Expansionserkrankungen, in denen die Expansion der Triplets in den kodierenden Regionen der mRNAs oder in der 5'-UTR zu defekten Proteinen oder zur Inaktivierung des Promotors führt, ist der genaue Effekt der CTG-Repeat Expansion bei der DM nicht verstanden (Reddy 1996). Eine der vielen Hypothesen ist unter anderem die „RNA Interferenz Hypothese“, die besagt, daß die expandierten CTG Repeats der *DMPK* mRNAs exprimiert werden und als cis-trans Elemente die Expression des *DMPK* Gens und anderer Gene steuern. Diese Repeats, exprimiert als

## Diskussion

---

CUG Repeats in der mRNA, binden wahrscheinlich an RNA-Bindungs-Proteine, deren Funktion wiederum wichtig für die Expression der DMPK und anderer Gene ist. Und tatsächlich ist die Expression der mRNA des mutanten *DMPK* Allels in Muskelzellen von DM Patienten reduziert (Hamshere et al. 1997, Krahe et al. 1997 und Timchenko 1999). Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Expression von CUG Repeats in Muskel-Zelllinien in *cis* die Expression eines Reportergens blockieren und in *trans* von Genen benötigt werden, die für die Muskeldifferenzierung notwendig sind (Bhagwati et al. 1999). BRUNOL2/CUGBP1 ist ein Kandidaten-RNA-Bindungs-Protein (RBP), das in der Lage ist, CUG Repeats der *DMPK*-mRNA zu binden (Timchenko et al. 1996). Das Protein ist ein „heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein“ (hnRNP), das RNA im Nukleus bindet. BRUNOL2/CUGBP1 wird durch die DMPK phosphoryliert und diese Phosphorylierung des Proteins scheint seine nukleäre Lokalisation zu regulieren (Philips et al. 1998, Roberts et al. 1997). Die weiteren Mechanismen, die folgen, sind bis heute nicht geklärt.

Ein weiteres RBP, BRUNOL3 weist sehr hohe Sequenzähnlichkeiten zu dem BRUNOL2/CUGBP1 Protein auf. Es konnte gezeigt werden, daß BRUNOL3 als auch BRUNOL2/CUGBP1 in der Lage sind, an die selben RNA-Elemente zu binden, entweder an das Bruno Response Element (BRE) oder an die CUG Repeats (Timchenko et al. 1996, Lu et al. 1999, Good et al. 2000). BRUNOL3 wird hauptsächlich in Muskel, Herz und Gehirn exprimiert, Organe, die bei DM Patienten betroffen sind. So spielen wahrscheinlich beide RBPs Proteine BRUNOL2/CUGBP1 und BRUNOL3 in der Ätiologie der Muskeldystrophie eine wichtige Rolle.

Man nimmt an, daß die BRUNOL2/CUGBP1 und BRUNOL3 Proteine als mRNA-„Shuttle“-Proteine fungieren, die die zytoplasmatische Akkumulation von mRNAs regulieren, die CUG-Repeats oder BRE Elemente aufweisen (Good et al. 2000). Weiterhin beeinflusst nach der „RNA Interferenz Hypothese“ ,aufgrund der CAG-Repeats, der Defekt der DM teilweise die mRNA Transportfunktion der Bruno Proteine. So akkumuliert die *DMPK*-mRNA mit den expandierten CAG-Repeats im Nukleus und nicht im Zytoplasma, wie normale *DMPK*-mRNA (Hamshere et al. 1997). So verbleibt die mRNA im Nukleus und wird dort gespleißt und polyadenyliert. DM Patienten scheinen einen Defekt im Transport reifer mRNA ins Zytoplasma zu haben (Timchenko 1999). Die Ähnlichkeit der Bruno Proteine mit den ELAV Proteinen in den wichtigen funktionellen Strukturen läßt vermuten, daß diese Proteine ähnliche Funktionen übernehmen.

So ist das humane HuR Protein, ein Mitglied der ELAV Familie, ein mRNA Transport Protein, das an AU reiche Sequenzen bindet (Wei-Jun et al. 1997, Fan and Steitz 1988 (a+b)). Aufgrund der Analogie zu den HuR Proteinen sind BRUNOL2/CUGBP1 und BRUNOL3 potentielle „Shuttle“-Proteine. So wurde das BRUNOL2/CUGBP1 Protein zuerst als ein hnRNP Protein identifiziert, und einige hnRNP Proteine funktionieren als „Shuttle“-Proteine (Piñol-Roma und Dreyfuss 1992).

## Diskussion

---

In den „in situ Hybridisierungs-Analysen“ konnte eine starke *Metr-1* mRNA Expression in dem Zytoplasma der Purkinje Zellen im Kleinhirn der Maus festgestellt werden. *Metr-1* scheint das homologe Maus Gen zu dem humanen Gen „*Similar to etr-1*“/*BRUNOLA* zu sein, weist aber auch hohe Homologien zu dem humanen Gen *CAGH4/BRUNOL1* auf. Von diesen beiden humanen Genen ist nicht bekannt, ob sie bei neurodegenerativen oder sonstigen degenerativen Erkrankungen eine Rolle spielen. Über die Funktion dieser Gene ist bis heute nichts bekannt. Da die stark konservierten *BRUNOL* Gene aufgrund von Genduplikationen entstanden zu sein scheinen, liegen ihre funktionellen Eigenschaften vielleicht ebenfalls „konserviert“ vor. So könnte man sich vorstellen, daß das METR-1 Protein ebenfalls als „Shuttle“-Protein wie *BRUNOL2/CUGBP1* und *BRUNOL3* fungiert und in Protein-„Shuttle“-Prozessen involviert sein könnte.

In diesem Zusammenhang ist vorstellbar, daß METR-1 bei Ataxien eine Rolle spielen könnte. Die neurologische Maus Mutante „purkinje cell degeneration“ (pcd) ist durch eine primäre Degeneration der Purkinje Zellen als auch eine retrograde und sekundäre partielle Degeneration der cerebellären Granula-Zellen und der inferioren olivaren Neuronen charakterisiert (Krulowski et al. 1989). Man kann die pcd-Mäuse als ein Tiermodell für humane Ataxien betrachten (Le Marec et al. 1998). *Metr-1* mRNA wird zumindest in den Purkinje Zellen exprimiert, das Protein ist aber bisher nicht nachgewiesen worden, geschweige denn, daß weitere *mBrunol* Gene wie *Metr-1* in der Manifestation von Ataxien involviert gefunden werden. Man weiß aber, daß das Gen *ELAV* von *Drosophila melanogaster* für das Überleben von Neuronen essentiell ist. Warum *Metr-1* primär in den Purkinje Zellen exprimiert wird, ist unklar, sowie die funktionellen Eigenschaften des Protein, wenn es gebildet werden sollte. Dies sind nur sehr spekulative Überlegungen, die letztendlich nur durch Deletionsmutanten des *Metr-1* Gens in Knock out oder in transgenen Tiermodellen geklärt werden können.

### **“Whole mount in situ” Analysen**

#### *Metr-1, ein Marker Gen in der dorsoventralen Entwicklung des Embryos?*

Die Expression von *Metr-1* in der frühen Entwicklung der Maus konnte in Embryonen 10.5 Tage p.c. in dorsalen Bereichen des Telencephalons, des Mesencephalons, des Diencephalons, des Myelencephalons, des Neuroepithels des Neuralrohrs und in den Spinalganglien nachgewiesen werden. Die Embryonen 11.5 Tage p.c. zeigen ein ähnliches Hybridisierungsmuster. Die Hybridisierung mit der „antisense“-Sonde ergab Hybridisierungssignale im Telencephalon, im Mesencephalon, im Diencephalon, im Myelencephalon, im Neuroepithel des Neuralrohrs, in den Spinalganglien, dem Trigeminal Ganglion und dem inferioren Ganglion des Glossopharyngealen-Nervs. Der Gehirnabschnitt, der dem Metencephalon entspricht, weist als einziger Gehirnbereich kein Hybridisierungssignal auf. Die Expression von *Metr-1* weist im Neuralrohr der Embryonen

## Diskussion

---

10.5 Tage p.c. und 11.5 Tage p.c. ein dorsoventrales Muster auf. So ist die Expression nur in der ventralen Seite des Neuralrohrs zu erkennen und nimmt in dorsaler Richtung ab, bis in den dorsalen Bereichen des Neuralrohrs die *Metr-1* Expression fehlt. Auch im Telencephalon, Mesencephalon und Myelencephalon ist ein dorsal-ventral ausgerichtetes Expressionsmuster von *Metr-1* zu erkennen. So ist das *Metr-1* Transkript nur in den ventralen Regionen dieser Gehirnabschnitte lokalisiert und fehlt in dorsalen Bereichen.

Schon von *Xenopus laevis* *etr-1* war bekannt, daß die mRNA in der frühen Embryonalentwicklung eine Rolle spielt. Es konnte ebenfalls eine dorsal-ventral ausgerichtete Expression des Gens in *Xenopus* Embryonen festgestellt werden. Die Expression von *etr-1* wurde nur in ventralen Bereichen des Vorderhirns beobachtet. Man konnte die mRNA nur in der Neuralfalte und in den Trigeminal-Placoden im Embryonal-Stadium 18 nachweisen. Im Embryonal-Stadium 24 war die *Xenopus laevis* *etr-1* Expression in der Neuralfalte, im Hinterhirn, im ventralen Mittel- und Vorderhirn sowie in der Epiphyse zu beobachten (Knecht et al. 1995).

Ebenfalls konnte die Expression von *Caenorhabditis elegans* *etr-1* im vegetativen Pol von Stadium III Oozyten von *Caenorhabditis elegans* nachgewiesen werden (Suzuki et al. 2000). *Caenorhabditis elegans* *ETR-1* ist ein Protein, das für die Muskelentwicklung essentiell und homolog zu den humanen Genen *BRUNOL2/CUGBP1* und *BRUNOL3* ist. Dies sind die einzigen Studien, die bisher zur Ermittlung der embryonalen Expression von *Brunol* Genen erstellt wurden.

Im Vertebraten-Embryo bildet sich das Zentrale Nervensystem entlang der dorsalen Mittellinie der Körperachse. Man vermutet, daß die Determination des Nervensystems schon während der Gastrulation, wenn das dorsale Mesoderm in Kontakt mit dem darüber liegenden Ektoderm tritt, beginnt. Zusätzlich zur der Induktion des neuralen Gewebes ist das dorsale Mesoderm an der Ausrichtung des Nervensystems an den anterioposterioren und dorsoventralen Körperachsen beteiligt (Kelly and Melton 1995). Bei *Xenopus laevis* sind unter anderem Gene als Marker für die Induktion des neuralen Gewebes bekannt: z.B. *Noggin* und *Follistatin*. Signale, die die ventrale Orientierung bestimmen, induzieren gleichzeitig die Zelltypen entsprechend ihrer Position an der anterioposterioren Achse. So ist das Schicksal der Zellen abhängig von ihrer Lage an der anterioposterioren und dorsoventralen Achse. Ein Gen, das die Ventralisierung des Embryos steuert, ist *sonic hedgehog*, das bei *Drosophila melanogaster* und auch bei Vertebraten isoliert wurde (Kelly and Melton 1995). Für die dorsale Entwicklung sind ebenfalls Gene verantwortlich, wie zum Beispiel das Gen *dsl-1*, das an der Entwicklung dorsaler Zellen beteiligt ist (Kelly and Melton 1995). Bis heute sind mehrere Gene isoliert worden, die die dorsoventrale Entwicklung steuern, unter anderem auch RNA-Bindungs-Proteine (RBP). So sind bei *Xenopus laevis* die Gene *nrp-1* und *etr-1* bekannt, die durch *noggin* induziertes neurales Gewebe des Embryos eine dorsoventrale Determinierung verursachen. Ein weiterer Marker ist das *cpl-1* Protein, das ausschließlich in dorsalen Bereichen exprimiert wird (Knecht et al. 1995). Aber auch bei Vertebraten sind

## Diskussion

---

Gene bekannt, die in der Embryogenese differenziert exprimiert werden. So wird das Protein *Hoxa2* der Maus differenziert an der dorsoventralen Achse des sich entwickelnden Embryos aber auch der adulten Maus exprimiert (Hao et al. 1999).

Die *Metr-1* mRNA weist ebenfalls ein Expression in dorsoventraler Orientierung auf. Da es das homologe Gen zu *Xenopus laevis etr-1* zu sein scheint, übt es anscheinend die gleiche Funktion aus. Es bestimmt wahrscheinlich im Verbund mit anderen Genen die, die noch zu identifizieren sind, die Funktion eines dorsoventralen Markers. Es ist keine neue Erkenntnis, daß RBPs diese Funktion, wie bereits oben erwähnt, ausüben können. In den frühen Embryonalstadium der Maus 10.5 Tage p.c. und 11.5 Tage p.c. ist eine differenzierte dorsale *Metr-1* mRNA Expression im Telencephalon, Mesencephalon und Myelencephalon sowie den dorsalen Bereichen des Neuralrohrs zu beobachten. Die Frage, warum eine Expression im Metencephalon des Mausembryos nicht vorhanden ist, muß unbeantwortet bleiben. Anscheinend wird für die weitere neuronale Entwicklung des Metencephalons in diesem Stadium eine *Metr-1* Expression nicht benötigt. Daß RBPs wichtig für die neuronale Entwicklung des Zentralnervensystems aber auch des peripheren Nervensystems sind, weiß man seit genaueren Untersuchung der mausspezifischen neuronalen ELAV-like RNA-Bindungs-Proteine HuB, HuC und HuD (Akamatsu et al. 1999, Kasahima et al. 1999, Chung et al. 1996). Während die Erkenntnis, daß *Drosophila* ELAV für eine korrekte Differenzierung und das Überleben von Neuronen unabdingbar, seit längerem bekannt ist (Campos et al. 1988, Robinow and White 1989, Robinow et al. 1991, Yao et al. 1993, Yao and White 1994), war diese Funktion für die Maus *Elav-like* Gene *HuB*, *HuC* und *HuD* lange nicht bekannt. So konnte in Transfektionsexperimenten gezeigt werden, daß die Proteine mHuB und mHuC exprimiert in Pheochromocytoma PC12 Zellen, bei den Zellen einen neuronalen Phänotyp induzieren. Deletionsmutanten der Proteine mHuB, mHuC und mHuD verloren indes die Eigenschaft, eine induzierte Zelldifferenzierung zu bewirken (Akamatsu et al. 1999, Kasahima et al. 1999).

Es wäre interessant zu untersuchen, welche Auswirkungen die *Metr-1* Expression in vitro in der Zellkultur verursacht, wie Deletionsmutanten die Entwicklung von Zellen beeinflussen und verändern. Ein weiterer Ansatz wäre die Herstellung einer *Metr-1* Knock-out Mauslinie, jedoch ist wahrscheinlich zu befürchten, daß ein fehlendes METR-1 Protein zu embryonaler Lethalität führt, denn *Metr-1* scheint in der embryonalen neuronalen Entwicklung eine Rolle zu spielen, vielleicht in einer ähnlichen Weise, wie die Maus ELAV-like RNA-Bindungs-Proteine HuB, HuC und HuD. Von *Drosophila melanogaster* ist bekannt, daß ein Knock-out des *ELAV* Gens, welches für die korrekte Differenzierung und das Überleben von Neuronen unabdingbar ist, zu embryonaler Lethalität führt (Campos 1985, Robinow and White 1988). Die Funktion der *Elav-like* und *Bruno-like* Gene bei den Vertebraten wurde jedoch bis heute nicht genauer untersucht, und es existieren keine Tiermodelle, weder von Knock-out Mäusen noch von transgenen Mäusen, in denen ein *Elav-like* oder *Bruno-like* Gen deletiert oder überexprimiert wurde. So stellte ich noch ein cDNA Konstrukt her (Daten nicht gezeigt), bei



dem die CAG Repeats der *Metz-1* cDNA auf (CAG)<sub>112</sub>-Repeats expandiert wurden. Zu diesem Zeitpunkt der Arbeit galt das *Metz-1* Gen noch als ein Kandidatengen für eine neurodegenerative Erkrankung, die ebenfalls wie bei HD oder SCA1 durch eine CAG-Repeat Expansion verursacht wird. Leider konnte eine Mikroinjektion des Konstrukts aus zeitlichen Gründen nicht erfolgen.

### 4.7 Ein Model für die Funktion von Bruno Proteinen

Wie viele RNA-Bindungs-Proteine, so beinhaltet ein einfaches Modell für die Funktion der Bruno Proteine die Bindung von verschiedenen mRNAs und die Formation von Ribonukleoprotein-Komplexen, die die Expression der korrespondierenden Gen-Produkte kontrollieren. Bis heute ist nicht klar, wie diese Proteine über verschiedene Funktionen abhängig von der Ziel-mRNA oder dem Zelltyp verfügen können. Außerdem ist unklar, wie verschiedenen Bruno Proteine, die die selbe Zielsequenz einer RNA binden nichts desto trotz über eine einmalige Funktion verfügen. Good et al. (2000) postulieren, daß die Bruno Proteine an Ziel-mRNAs binden und gleichzeitig mit anderen Proteinen interagieren, um ihre Spezifität der Funktion zu determinieren. Diese anderen Proteine mögen RBPs sein, die zusätzliche Ziel-Sequenzelemente an der Ziel-mRNA erkennen. Es ist aber auch möglich, daß isoform-spezifisch interagierende Proteine die Funktion des RNPs modifizieren. Dieser Mechanismus wurde beim translationalen „Silencing“ der *hunchback* mRNA durch das Pumilio Protein bei *Drosophila melanogaster* beobachtet. In diesem Falle bindet Pumilio spezifisch an Elemente der 3'-UTR der *hunchback* mRNA und rekrutiert ein unspezifisches RNA-Bindungsprotein, Nanos, das mit der mRNA einen Komplex bildet und die Translation unterdrückt (Sonoda and Wharton 1999). Übereinstimmend mit dieser Idee haben Untersuchungen bei dem *Drosophila* Bruno Protein ergeben, daß das „Bruno Response Element“ nicht unabhängig funktioniert, und zusätzliche RNA-Elemente im 3'-Bereich der *oskar* mRNA benötigt werden, um eine korrekte Regulation zu gewährleisten (Lie and McDonald 1999). Wahrscheinlich binden diese zusätzlichen Sequenzen andere Proteine, die wiederum mit Bruno von *Drosophila* interagieren. Verschiedene RNA-Bindungs-Proteine sind identifiziert worden, die mit Bruno interagieren, unter anderem Apontic, das in der Herz- und Kopfentwicklung von Bedeutung ist und an bestimmte Sequenzbereiche in der 3'-UTR der *oskar* mRNA bindet. Es konnte gezeigt werden, daß zumindest *apontic* und *arrest*, letzteres kodiert für das Bruno Protein, interagieren und bei der Regulierung und Steuerung der *oskar* Translation mitwirken (Lie and McDonald 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Vasa, eine RNA Helikase unter anderem in der Regulation der *oskar* Translation in der frühen Entwicklung von *Drosophila melanogaster* involviert ist (Webster et al. 1997). Ebenfalls konnte gezeigt werden, daß Squid, ein hnRNP, das für die Körperachsenformation

## Diskussion

---

des Embryos notwendig ist, ebenfalls mit dem Bruno Protein interagiert. Zusätzliche RNA Elemente steuern ebenfalls zur Regulierung der mRNA Deadenylierung bei, wie zum Beispiel *EDEN-BP (BrunoL-2)* von *Xenopus laevis*. AU-reiche Sequenzelemente verstärken die Deadenylierung der entsprechenden mRNA (Audic et al. 1998). Die Schlüsse, die man aus diesen Erkenntnissen schließen kann, sind, daß verschiedene Proteine an die mRNA binden und zur Deadenylierung beisteuern.

Die Funktion der RNA-Bindungs-Proteine ist bis heute nur ansatzweise verstanden, und besonders die Familie der *Bruno* Gene ist bis heute kaum untersucht.

### 5 Zusammenfassung

Durch Screening humaner Gehirn cDNA-Bibliotheken mit einer Sonde, die 63 CAG-Repeat enthielt, wurde ein cDNA-Fragment *H32* isoliert, das als partielle cDNA-Sequenz des humanen *CAGH4/BRUNOL1* Gens, ein *Bruno-like* Gen, das zur Familie der *ELAV* Gene gehört, identifiziert. Es weist ein 15 Repeat großes CAG-Triplet auf. Die polymorphe Eigenschaft des CAG-Repeats wurde mithilfe der PCR untersucht, indem die CAG-Repeats des Gens bei mehr als 200 Patienten, die an einer nicht genetisch charakterisierten cerebellären oder spinocerebellären Ataxie leiden, amplifiziert wurde. Es wurde nur ein Polymorphismus von 2-3 Repeats festgestellt, was nicht charakteristisch ist für die bisher bekannten Gene, die spinocerebelläre Ataxien mit verursachen. Northern Blot Analysen ergaben prominente 3,0 kb und 4.0 kb große mRNA Transkripte in der Gehirn-RNA, so daß die publizierte Sequenz (1720 bp) des *CAGH4/BRUNOL1* Transkriptes zu klein ist. Es wurde der Ansatz unternommen, die cDNA-Sequenz zu vervollständigen, dabei wurde ein weiterer cDNA-Klon *H17* isoliert, der ein 14 bp großen Überhang mit dem cDNA-Klon *H32* aufweist. Dies hatte zur Folge, daß die beiden cDNA-Klone assembliert wurden, jedoch ergaben Analysen anhand eines DNA-Sequenzabgleiches mit den erst später zugänglichen Daten des „Humanen Genom Projektes“, daß die beiden cDNA-Klone *H32* und *H17* auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind und somit nicht Klone eines gemeinsamen Transkriptes darstellen. Neuere Daten ergaben, daß das zweite isolierte cDNA-Fragment *H17* ein cDNA-Fragment des „*Similar to etr-1*“/*BRUNOL4* Transkriptes darstellt und auf Chromosom 18 lokalisiert ist.

Mit dem cDNA Fragment *H32* wurde ein humaner genomischer PAC-Klon isoliert, der für die chromosomale Lokalisierung des Gens mithilfe einer FISH-Analyse zur Verfügung stand. Eine genauere Charakterisierung des humanen genomischen Fragmentes und somit des Gens erfolgte nicht. Diese FISH-Analyse ergab, daß das Gen *CAGH4/BRUNOL1* auf Chromosom 1q21 lokalisiert ist, was ein Sequenzabgleich später mit der Humanen Genom Datenbank verifizierte.

Gleichzeitig wurde das homologe Maus cDNA-Transkript zu „*Similar to etr-1*“/*BRUNOL1*, die cDNA von *Metr-1*, isoliert. *Metr-1* ist ein 2843 Nukleotide großes Transkript mit einem offenen Leserahmen für ein 481 Aminosäuren großes Protein METR-1. Durch eine Northern Blot Analyse konnten Transkripte in der Gehirn RNA mit einer Größe von 2,8 kb und 3,5 kb nachgewiesen werden, wobei das größere Transkript wahrscheinlich kein alternatives Spleißprodukt darstellt, sondern auf eine Kreuzhybridisierung mit dem zu über 90% homologen Maus Gen *Metr-3* zurückzuführen ist. Ein weiteres starkes Hybridisierungssignal, ca. 3.0 kb groß, konnte im Testis der Maus nachgewiesen werden. Mithilfe eines genomischen Southern Blot Analyse wurde bewiesen, daß *Metr-1* als Einzelkopie im Genom vorliegt. Expressionsanalysen mit Hilfe der RT-PCR zeigten auf, daß *Metr-1* schon sehr früh,

## Zusammenfassung

---

aber schwach in der RNA 9.5 Tage p.c. alter Maus-Embryonen nachweisbar ist. Ab dem Tage 10.5 p.c. ist die Expression eindeutig im embryonalen Gewebe feststellbar und ein Nachweis konnte zumindest bis in embryonaler RNA 12.5 Tage p.c. alter Maus-Embryonen erfolgen. In „*whole mount in situ*“ Analysen wurde zusätzlich gezeigt, daß *Metr-1* in der embryonalen Entwicklung und wahrscheinlich bei der Differenzierung des embryonalen Nervensystems von Bedeutung ist. So wurde das *Metr-1* Transkript in dorsalen Bereichen des Telencephalons, Mesencephalons, Diencephalons, des Myelencephalons, des Neuroepithels, des Neuralrohrs und in den Spinalganglien 10.5 Tage p.c. alter Maus-Embryonen detektiert. Es ist ein deutliches dorsoventrales Hybridisierungsmuster in den Embryonen zu erkennen. Lediglich in dem Gehirnabschnitt, der dem Metencephalon entspricht, war eine *Metr-1* Expression nicht zu lokalisieren. Die Expressionsanalysen in adulten Tieren ergab, daß *Metr-1* sowohl im Gehirn, als auch im Testis exprimiert wird. In *In situ Hybridisierungs*-Analysen des Maus Gehirns wurde eine *Metr-1* Expression ausschließlich im Zytoplasma der Purkinje-Zellen des Cerebellums aufgezeigt. Die RT-PCR-Analyse verschiedener Testis Proben der Maus ergaben, daß ab dem Tag 19 nach der Geburt, weit bevor die Spermatogenese (ab Tag 40) einsetzt, eine *Metr-1* Expression im Testis nachweisbar ist. Die RNA der Mauslinie w/w<sup>V</sup>, die über keine testikuläre Keimzellen verfügt und die Mauslinie Tfm/y, die einen Arrest der Spermatogenese in den primären Spermatozyten-Stadien aufweist, exprimieren *Metr-1* nicht im Testis. Jedoch konnte eine *Metr-1*-Expression in Testis RNA der Mauslinie olt/olt, die einen Arrest der Spermatogenese in den frühen Spermatischen Stadien aufweist, und in der RNA der Mauslinie qk/qk, die einen Arrest der Spermatogenese in den elongierenden Spermatischen hat, mit Hilfe der RT-PCR nachgewiesen werden. *Metr-1* wird somit in den Keimzellen erst in den Pächytän-Spermatozyten exprimiert. Die Bedeutung der *Metr-1* Expression im Testis ist noch ungeklärt.

Weiterhin wurde ein genomischer Maus Cosmid Klon des *Metr-1* isoliert. Es konnten alle Exon/Intron Übergänge des Gens charakterisiert werden. Das Gen *Metr-1* ist ca. 18 kb groß und weist 13 Exons auf.

*Metr-1* ist ein Mitglied *Bruno-like* Gen-Subfamilie, die für RNA-Bindungs-Proteine kodiert. Diese Bruno-like Proteine weisen, wie auch METR-1, charakteristische RNA-Bindungs-Domänen (RBD) auf, die in der Lage sind RNAs zu binden. *Metr-1* ist wahrscheinlich das homologe Gen des humanen Gens „*Similar to etr-1*“/*BRUNOLA*, weist aber auch sehr hohe Homologien zu einem anderen humanen Gen, dem *CAGH4/BRUNOLI*, auf, dessen 5'-Bereich der cDNA unvollständig in der Datenbank vorliegt. Die bekannte *CAGH4/BRUNOLI* Sequenz weist im Allgemeinen eine höhere Homologie zu *Metr-1* auf, als „*Similar to etr-1*“/*BRUNOLA* zu *Metr-1*. Da jedoch der gesamte 5'-Bereich der cDNA fehlt, läßt sich in diesem Bereich keine Aussage über Homologien treffen, und gerade dieser 5'-Bereich des *Metr-1* Gens ist mit der Sequenz des „*Similar to etr-1*“/*BRUNOLA* Gens sehr homolog. Funktionelle Studien über das METR-1 Proteins erfolgten aus zeitlichen Gründen nicht, so

## Zusammenfassung

---

daß dies unter anderem in Tiermodell-Experimenten oder Zell-Transfektions-Experimenten geklärt werden müßte.

Diese Arbeit liefert einen Beitrag zur Charakterisierung eines neuen Gens der Elav Familie der Maus, *Metr-1*, ein Gen der Subfamilie der *Bruno-like* Gene. Das Expressionsmuster läßt vermuten, daß *Metr-1* in der Embryonalentwicklung des Nervensystems von Bedeutung ist und dort in der dorsoventralen Orientierung des Nervensystems eine wichtige Rolle spielt. Die Bedeutung der *Metr-1* Expression im Testis der adulten Maus ist ebenso nicht geklärt. Die Funktion und Bedeutung der bis heute identifizierten *Brunol* Gene der Vertebraten bleibt bisher weitgehend ungeklärt.

**6. Anhang A**

***Nukleotidsequenz des 6kb großen Mcos115 XhoI-Subfragmentes des isolierten genomischen Cosmid-Klons Mcos115 der Maus.***

CTCGAGCCTGAATGGGCAGCAGGGCGGCAGATCTGCTGAGAAGACACAGGGTAATGAGATCA  
GTGGGCCCCTCAGCGGGGTCTCCACATTCACAGGGCGTGATCTGTTTAGCGTCTCCATAAA  
TGTC AAGATCAGATTAGAAGGCAAGAATGGAGAAGTGGGGGTGGGGCAGGTGAATGGAAAGT  
TACTGTGGANAATTACAGCTTTCAACTTCCTGGTCCCCTGGCACTCCCATGGCATCTCCAGG  
CCACTCAGTGTGGAGTCTCCTATGACCTCACCCCTCCCAACACNTTTTAGGGCACCCTACTGG  
GAGGGCCTGANCATCTGCATGATGAANTGTNACCAAGGCTCTGCACATGCATTCACTTCACT  
CACATATATATTTATATACACCTCACCGAATCTAGCTTCAGGCTACAGAGAGCCAGATTAAA  
GGAGTCAGAAGCAGTCAGTAGGGAACAGGGCAGTNGCAGGAAGCACAAAGTCTTCCTCAATG  
TTTCAGTGAGCACAGAGGTAAAGAAAGGCCAGGTTACATCAGTTCATTCTGCAAGGCTGG  
GTGTGGGCATTCAGTGCCTGACCTCAGGCCCCACCTTGCCCAGGCTGGAATCTTACGGNGGT  
GTTTCTAGCTGTGTGATCTTGCGGAGTTATTTAATCACTCTGTGTCTTAGTTTCTTGATCCA  
TNTCATAAAGGGTGGTCTNGCACATTTGGGACAATNCCTNGGATGTGGCAGTTGTTATTTCA  
GTTTCAGAGGAGGAACCTGCTTNGCTGNGATAACTNAGGAATGGANGCCNCTGGGATGCATC  
TGGGAGTCCTCAATANNCAAGCTGCTTCACCCTGGGCATGAATGGGGAATGCATGGGTAGTT  
CTATGGAAGCTGCCAGTGGAGAATGGATGGATGGTGAGCCAGGATTGCTATCACAGAGAGCT  
GATGCCAACAGACACATGGGGCAGGTATGGGGCTGGAGCACAGAGGGCCAACCTGGAACATA  
CAACCAGTTTTAGAAGTATAACTGTTTTGGAGAAAAATAGTTTCTATTTTTTTTTTTTTTTTT  
TTTTTTTTGCCTCCTTTCATCTGACTCTGAGATCTACTCTAGGAACCCAACCAAAGGAAGCA  
AAGGAAGGAGAAATGGGGTACTTTGCCCTCAAGGGNGCCTGGCATCTTGTGCCTGTTNCCA  
CAGAAGGAATCAAGATTCTCTACTTGTACAGGTTCTTTACATTTGATAAGCACCTACTATG  
TGTAAGCAAGACATCATGCTAGACGCTGTGTGCAGTCTTGGTCTACAAGGATAATACGAGAG  
CTGCCACCAGCCGCTGCCTCCCTGCCCAAGCACTCATAACACACAACACCCCCAGAGANAAGG  
AAGGGGGTGTCTGAAAATGCCANACTGCTATAGCTTCCCTTGTNTCTTTTCTGAAAAGTA  
TGCAGACTCTCTCTGCACTCACTCCCACCAGCTCTCTCCTTTTCCACACCCGTTCAAATTTN  
TTNACTCTCCATCTCACTTTTTGCTGTTTTCTCCTAAACCCTGTGGNTGCTTCCTTCCTCAT  
CTACACCTCCCTGTCTGCCCTTCAACCTGCTTGACNGATCTTCTCATTCTTTTCTTTGTT  
TCCTTCTTGGGTTCTCACTCTCAGACTCCCCAAAGGCCAGGCTGCCCTCTCCTCACCGCCC  
CCACCCCCCAGCTTCCATCTCCCGGTCTGCTCTTCTCTTCCAGCACCGGGGACAGCTCC  
AACCCCCGGAACAATGGACCCCACCCTAGGGCTCCTCTATAAATTCTNCATCTTCGTGTCTT  
GCCCAACTCCTGATTGGGGAGTAAGATGGGGGAAGGTTGTNATCAAGACCAGCTGCTCTTC  
TGGGGCAGAAAGGGAGTCAGGGAGGATAGAGATAGAAAGAGGGCGTGGCTCTTGCCCGGGTT  
GTGCGTCTCTCTCCAGGGTAGAGAATTTGTATTCACCCCTCAGACTGACATCACTGATGTC  
AGGGGAAAGNAGGTGGGAGTGGGGAGGNGGGTGTGGAGGGGGGGAGGTTTTTGTGAGGAG

## Anhang A

---

AGCGCGACCGCCACGGCCGGAGAGCAGAGCTCCGGGACCCAGGTGACCGGGAAAGCAGGCA  
GCCCTAGTGTCTGGGAGTAGCCGGCAACAGCCCAGGCCGGGGAACCATAACAGGGTGGGGGTGG  
GAGGGGGGGGGTCTAGGGAGAACCCTGAAGGGGACAGGGCAGAAGGGACCCCCGAAGCCCTGC  
CGCCATCAGAGATCAAGCATTGTCATCAGGGATCTTCGGACCCAGCAGAAGGATCAGCCAC  
AGGGAGGTGTCTCCCTAGGAAGCCAACGAGAGAGTCACTGCCCCACATCAGGAGCAGGGA  
CCCCCTCATGCGCTGCTGGCNAACCATAGCAGTCCCCTAGCCCCCTCAGCCTCTTTCTATCG  
CCCTCTTCTGACTTTACCCCATCTCCTTTGGCATCTGTGCCTTTGCTCCCGCCCTCTGAGCT  
CCACCGTTCCAGCTACCACCCAAACGCCCCAGGGTTTGGTCACCCTGACCCTCAGCCTGGGA  
TATT**AGCCAGATCTCTGGGAGGGAGATCCATTTGCTTGGGCTATGCCCTGGTGGCATGACA**  
**CTGTCTGCCTAGACCCCTGACCCCTAGCCCTCAACTCCCAGGCCTCCTTTGTGTGAAGAGC**  
**CCTCCTGTGCTCAGCAGTGTGGTTGGGGCCAAAGGAAAAGCTGGCCCTGCTGGGCCCTGG**  
**GCCCTACCACCTGCCTCCTGGTTGGCCAGCTTCCCTTGTCTTTGGTCCTCTCCCTGCTCCCC**  
**CACCCCGGCCCTTCTTCTGGGCCGCCCAATGAAGGAGCCAGATGCCATCAAGCTGTTTG**  
**TGGGGCAGATCCCGAGGCATCTGGAGGAAAAGGACCTGAAGCCATCTTCGAGCAGTTTGGT**  
**CGGATCTTCGAGCTGACTGTCAAGGACAAGTACACCGGGCTGCACAAGG**GT**GAGGGGTC**  
AGGCCAGGCTGGAGAGGAGGCACTGAGTGGCCTGCTAGGCAAGAAGGATGGAGGAGGCTGGG  
GGGATGGAGTGGCTGGAAAGGGCTGATTTGGAAGCANAGTCCAGGGGCTGAATGGACTGGAT  
AAATGGAACATAATGTGATGAACTCATGCTGAGATGACAGGGACCATAAGGTGAAAAACTAAG  
GGAACTCTGCACGAGATGGAGGAGGGCATTGGTGGCATGGGATGAACAGAAGGATGAGAAG  
GACAAGTTTTAGGAGATGATCAAGACTGACAATGTGAGAAGCCCAGATAATGTTGGGATGG  
CTGGTCAGGTGTGTTAACCTAGAAAGAGTGGCCACAGTCAAACCAGGGCAACCCAGGACTA  
AGATGAAGGAGCCGGGGAGAGGAGCATGGACAAGAGAGACTGGTTTTAGAAAGTTATTAGGA  
AGAGGTTCTGAGGTCTCTCCAAGCGCTGTGCTGCTAAGCAGAGCTGGCTTGGATCAGCACT  
TGGAGAGCTCCAAGCTCCGGGGNCCAGGGCCACAAGACTTNCTGAAATCTTTGGGTCTGGG  
GAAAAAGCATTTCNGGCTGNAGATTCAATTTNCGGAGCACTATGNGCACNTGTCTCTTGTGA  
AGTCTAGGAGATTCGANAAGTAGGGAAAATGNAAAAAGGGTNATGATGGTCAAGATGGGACG  
NGACGGGAAGGTNAGGGAGAAAAGGGAANAGAGAGCGAGCAAGAGCGCGGCACACNTACNT  
ACTTGTGGAGATCACAGCTCTTTCTGTCCCAGTTCCATCAACAGAGCAAANGCTCTCCC  
ACGTCTCTCACNNCAGGTCTCTGACCCAGAGATAGGGTATAATTTTTAAACCTCTGGATAA  
ATGCCTCCTCCCTCCCAGCCAAGCAGGTAGAGATGTCCAGAAGGGGAAAATCGCTCCTCCA  
GGTCTTGGTCTGGCAGGGAAGCCCCTTAGGAAGGGGAACATGAGGACATCACCATGACACA  
TGTCTCTCAAGCCATGTGTCTC**AGGATGTGCTTTCTGACGTA****CTGTGCTCGGATT****CAGC**  
**CCTGAAGGCCAGAGTGCCCTGCACGAACAGAAGACTCTCCAGGG**GT****GAGTTCTATGCTCA  
GCACGGTCAGCCCCACCTTCCCCCCCCCAAAGCCTTAGGAGTGGCTTCGGACCCATCGC  
CCTCCTAGGACACCGAGCTATTTTCCACCTCTTCATCACTGAAGTCCCTGTAAGCATCCCTT  
TCCCTCCGTNGAGGTGTGAAACAGGAATGATTGGTGGAGTGACCTTTTCTGAGGAGCGCATG  
CTCCTNCCCACGCCCCAGTTGTGTCCCAGGCCATGCAAGAGGGAAGACTTAGCTGTATGG  
GAGGAAGGTAGAGTNGACGGGTACCTGTGTGATGAGCAGGGGCACCCAGGCGCTCTT  
TTGTGGTGCTAAGACAGGCTGGGCTGTGAGATGGGGGAGGGGCGCTGCTGCCCTGAGAACCA

---

## Anhang A

---

GCAGCTGGGCCTGCTGGACTGTTCTGTGCTGCTGTCTGAGATCACACACAGGCTCCCCTGCC  
TGACTCTCAGGAAACTCTAAAACAGAGCCACAGGGCATCAAAGTAGAGAAGGCCGGGAGT  
GGTCATGAGTTTGGGGACAGCAAACACGAGCCGACACCATCATGGAAGATCAGGCTTGACCC  
TACCAGGTGTGCCTGGGGAGTAGAGATGGCTCTGAAGTGGCTTCCCTTCTGCAAAGTGACTT  
TTTCCCCCTTCTTCTTCTTCTTTTTCTTCTTCTTCTGAGACAGTCTTGTACAAGCCTGGGTT  
GGTANCTGAGANCAGACATCAAAGAAGCCTCCTGGTCCTTTTGGCCATCTATCTGCTTCTGT  
TTTCTCTCAGATTGAGTCCCAGCACTGTCTAGGGGCTGGAGACATCTGTCCTAGCCTCTGCT  
TCCTTCCCACATGGGACACAGAATGGTACTGACCACCCATCCTCCTGAGAGGAAACAGACAA  
AACAGATGGGGTGGAGCTATGGAAAATGAAAAAACTACTTAAACTGCCCAACTTCAGACTC  
TCTTGAGGTCCTCCTGTAGCCCGCCTCAACCATCTTATCCCAACCAACAGGAACTGCCATTG  
CCCAGAGTGGAGGGAGGAAGCATGGGTGTGGACAGACACAGGGGTCTAGAGTAAGCATGCAC  
TCGNTCATGCACACATGCATGTGAGCACCTGACAGGCCAGGTTAGGGATACATGCGAGCTGC  
TGAGTCCCAAGCTACCCCTCTTTTTCTTTCCAGAAGGCCCTCACTAATCAGGTTTTACCTC  
TGTTCCCTGTGGGTTTCTACAGGAACTGGAGAATCAGGGGAAGGAGCCATAAGAGGCCAGA  
GTAGGGACTTGGCAGTGTGGGGATGGGCAGGCGCCAAAAGCACAGTACCAGCTAGGCACAT  
CTCCCCTGCATCTGGCTCCTCCAGCTGCCCGTGAAGCTCAGGTTAAGCTGTCCTGAGAAGCC  
AGTGGGCTGGACATAGGAGCCAGGAAAGGCTACCCGGTAAGAATGGCTCTGTCACTCTGCTC  
CAGGCTTCCCAAGTGACACTAAGTTCCACAATGGCCTTTGTACAGTGGACAGAATCCAGG  
GGGACATGATAAAGTTTCATATTAGGAAAGGAGGTTCNATTNTCNTAGCAGGAATCTCACAC  
TAAGGGGTTGAGAAAGTGACTCAGGTCAGTTAAGGGAAGAGATACNTATAAACAAATTTNGC  
NTTTGTACCNTACCAAGTGGCCCCCTCAGTNGTGTGTGTGTATAGTTCTGTGAGTAAAGTTT  
TCCTACTGTCTAATCTGCAAACCTTCTGCAAGGNTATTTTAACTCATGCAGTTTTAGCCT  
GCCTGTGTTGCTCCCCTTATCACCAGAACTTAGTGGCCTGTGGCTGTTGAGCCTCACTCCT  
CTCCAGCAAGAGTCCCAGGATGGCTCTGTGGCAGGTTCCCTGGGTCTGTTCTGAGTAGGGTG  
TGGCCTCTTGGAAGTTGGTTATGAGGGATGCCTCTGCCTGGCTTATCTTCCCCATCTGTTC  
TGGATCAAACCTCCACTCTGAAGCTGTGGGTTTTCCCATCATCTCGAG

**Abb.20:** DNA Sequenz es 5'-Bereichs des *Metr-1* Gens. Im ca. 6kb großen genomischen Maus-Fragment liegen die beiden ersten Exone, Exon1, **rot** unterlegt und Exon2, **blau** unterlegt, des *Metr-1* Gens. Die Konsensusregeln **AG/GT** für Exon/Intron-Übergänge sind erfüllt.



## 7. Literatur

Akamatsu, W., Okano, H. J., Osumi, N., Inoue, T., Nakamura, S., Sakakibara, S.-I., Miura, M., Matsuo, N., Darnell, R. B., and Okano, H. (1999). Mammalian ELAV-like neuronal RNA-binding proteins HuB and HuC promote neuronal development in both the central and the peripheral nervous systems. *Neurobiology* Vol. **96**, Issue 17, 9885-9890.

Antic, D., and Keene, J. D. (1997). Embryonic Lethal Abnormal Visual RNA-Binding Protein Involved in Growth, Differentiation, and Posttranscriptional Gene Expression. *Am. J. Hum. Genet.* **61**: 273-278.

Audic, Y., Omilli, F., and Osborne, H. B. (1998). Embryo Deadenylation Element-Dependent Deadenylation Is Enhanced by a cis Element Containing AUU Repeats. *Mol. Cell. Biol.* **18**; 6879-6884.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1992). "Current Protocols in Molecular Biology". John Wiley & Sons, Inc., USA:

Barami, K., Iversen, K., Furneaux, H., and Goldman, S.A. (1995). Hu protein as an early marker of neuronal phenotypic differentiation by subependymal zone cells of the adult songbird forebrain. *J. Neurobiol* **28**: 82-101.

Basu, P., Chattopadhyay, B., Gangopadhaya, P. K., Mukherjee, S. C., Sinha, K. K., Das, S. K., Roychoudhury, S., Majumde, P. P., Bhattacharyya, N.P. "(2000). Analysis of CAG repeats in SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 and DRPLA loci in spinocerebellar ataxia patients and distribution of CAG repeats at the SCA1, SCA2 and SCA6 loci in nine ethnic populations of eastern India. *Hum Genet* **106**: 597-604.

Birney, E., Kumar, S., and Krainer, A. R. (1993). Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acid Res.* **21**: 5803-5816.

Bhagwati, S., Ghatpande, A., Leung, B. (1996). Identification of two nuclear proteins which binds to RNA CUG repeats: significance for myotonic dystrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **228**: 55-62.

## Literatur

---

Birnboim, F., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid. Res.* **7**: 1512-1523.

Brook, J.D., McCurrach, M. E., Harley, H. G., Buckler, A. J., Church, D. Aburatani, H. et al. (1992). Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3'-end of the transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* **68**: 799-808.

Burd, C. G., and Dreyfuss, G. (1994). Conserved Structures and Diversity of Functions of RNA-Binding Proteins. *SCIENCE* Vol. **265** July: 615-621.

Burright, E. N., Clark, H. B., Servadio, A., Matilla, T., Feddersen, R. M., Yunis, W. S., Duvick, L. A., and Orr, H.T. (1995). SCA1 Transgenic Mice: A Model for Neurodegeneration Caused by an Expanded CAG Trinucleotide Repeat. *Cell*, Vol. **82**, 937-948.

Campos, A. R., Grossmann, D., and White, K. (1985). Mutant alleles at the locus *elav* in *Drosophila melanogaster* lead to nervous system defects. A developmental-genetic analysis. *J. Neurogenet.* Jun; **2(3)**: 197-218.

Chaganovich, D., Fayos, B.E., Cohn, S. L., (1996). Differential activity of ELAV-like RNA-binding proteins in human neuroblastoma. *J. Biol. Chem.* Dec 27; **271(52)**: 33587-33591.

Choi, D. K., Ito, T., Mitsui, Y., Sakaki, Y. (1998). Fluorescent differential display analysis of gene expression in apoptotic neuroblastoma cells. *Gene* Nov 26; **223(1-2)**: 21-31.

Choi, D. K., Ito, T., Tsukahara, F., Hirai, M., Sakaki, Y. (1999). Developmentally-regulated expression of mNapor encoding an apoptosis-induced ELAV-type RNA binding protein. *Gene* Sep. 3; **237(1)**: 135-42.

Chung, S, Jiang, L., Cheng, S., and Furneaux, H. (1996). Purification and properties of HuD, a neuronal RNA binding protein. *J. Biol. Chem.* **271**: 11518-11524.

Chambers, J. C., Martin, B. J., Kenan, D. J., Keene, J. D. (1988). Genomic structure and amino acid sequence domains of the human La autoantigen. *J. Biol. Chem.* **263**: 18043-18051.

Cleveland, D. W., Lopata, M. A., MacDonald, R. J., Cowan, N. J., Rutter, W. J. and Kirschner, M. W. (1980). Number and evolutionary conservation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin and cytoplasmic  $\beta$ - and  $\gamma$ -actin genes using specific cloned cDNA probes. *Cell* **20**:95-105.

## Literatur

---

Ebersole, T. A., Chen, Q., Justice, M. J., Artzt, K. (1996). The quaking gene product necessary in embryogenesis and myelination combines features of RNA binding and signal transduction proteins. *Nat. Genet.* Mar; **12(3)**: 260-5.

Ephrussi, A., Lehmann, R. (1992). Induction of germ cell formation by oskar. *Nature* Jul 30;**358** (6358): 387-92.

Fan, X. H. C., and Steitz, J. A. (1988a). Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO J*, **17**, 3448-3460.

Fan, X. H. C., and Steitz, J. A. (1988b). HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15293-15298.

Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13.

Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1984). Addendum: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **137**: 266-267.

Fu, Y. H., Pizzuti, A., Fenwick, R. G., King, G. Rajnarayan, S., Dunne, P.W., et al. (1992). An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* **255**: 1256.1258.

Fujita M., Kawano, T., Ohta, A., Sakamoto, H. (1999). Neuronal expression of a Caenorhabdits elegans elav-like gene and the effect of its ectopic expression. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* **260**; 646-652.

Gao, F.-B., and Keene, J. D. (1996). Hel-N1/Hel-N2 proteins are bound to poly(A)+ mRNA in granular RNP structures and are implicated in neuronal differentiation. *J. Cell. Sci* **109**: 579-589.

Good, P. J. (1995). A conserved family of elav-like genes in vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **92(10)**: 4557-4561.

Good, P. J. (1997). The role of elav-like genes, a conserved family encoding RNA-binding proteins, in growth and development. *Semin. Cell. Biol.*, **8(6)**: 577-584

## Literatur

---

Good, P.J., Chen, Q., Warner, S. J., and Herring, D. C.(2000). A Family of Human RNA-binding Proteins Related to the Drosophila Bruno Translational Regulator. *J. Biol. Chem.*, Vol. **275**, Issue 37, 28583-28592.

Hamshere, M. G.,Newman, E. E., Alwazzan, M., Athwal, B. S., Brook, J. D. (1997). Transcriptional abnormality in myotonic dystrophy affects DMPK but not neighboring genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 7394-7399.

Hao, Z., Yeung, J. Wolf, L., Doucette, R., Nazarali, A. (1999). Differential expression of Hoxa-2 protein along the dorsal-ventral axis of the developing and adult mouse spinal cord. *Developmental Dynamics* Vol.**216**, Issue2, pp.201-217.

Harley, H. G., Brook, J. D., Rundle, S. A., Crow, S., Reardon, W., Buckler, A. J., Harper, P. S, et al. (1992). Expansion of an unstable DNA region phenotypic variations in myotonic dystrophy. *Nature* **355**: 545-546.

Harper, P. S. (1989). Myotonic dystrophy. Saunders, London/Philadelphia, 2nd Ed..

Hogan, B., Constantini, F., and Lacy, E. (1986). "Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY., USA.

Huntington's Disease Collaborative Group (1993) . A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* **72**, 971-983.

Illarioshkin, S. N., Slominsky, P. A., Ovchinnikov, I. V., Markova, E. D., Miklina, N. I., et al. (1996). Spinocerebellar ataxia type 1 in Russia. *J. Neurol.* **243**: 506-510.

Junqueira, L. C., Carneiro, J. (1986). Histologie, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Kasashima, K., Terashima, K., Yamamoto, K., Sakashita, E., and Sakamoto, H. (1999). Cytoplasmatic localization is required for the mammalian ELAV-like protein HuD to induce neuronal differentiation. *Genes to Cells*; **4**, 667-683.

Kelly, O.G., and Melton, D. A. (1995). Induction and patterning of the vertebrate nervous system. *TIG* July Vol. **11**, No. 7, pp. 273-278.

Kenan, J.D., and Query, C. C. (1991). A review: nuclear RNA binding proteins. In: Cohn WE, Moldave K (eds). Progress in nucleic acid research and molecular biology. Vol **41**. Academic Press, Orlando, pp. 179-202

Kim-Ha, J., Kerr, K., MacDonald, P. M. (1995). Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell* May 5; **81(3)**:403-12.

King, P.H., Levine, T. D., Fremeau, R.T. Jr, Keene, J. D. (1994). Mamalian homologs of Drosophila ELAV localized to a neuronal subset can bind in vitro to the 3'UTR of mRNA encoding the Id transcriptional repressor. *J. Neurosci* **14**: 1943-1952.

Knecht, A. K., Good, P. J., Dawid, I. B., and Harland, R. M. (1995). Dorsal-ventral patterning and differentiation of noggin induced neural tissue in the absence of mesoderm. *Development* Jun; **121(6)**:1927-35.

Koushika, S. P., Lisbin, M. J., White, K. (1996). ELAV, a Drosophila neuron specific protein, mediates the generation of an alternatively splice neural protein isoform. *Curr. Biol.*; **6(12)**: 1634-1641.

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

Kozak, M. (1991). structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* **266(30)**: 19867-19870.

KraheR, Ashizawa, T., Abbruzzese, C., Roeder, E., Carango, P., Giacanelli, M., et al. (1995). Effect of myotonic dystrophy trinucleotide repeat expansion on DMPK transcription and processing. *Genomics* **28**: 1-14.

Krulewski, T. F., Neumann, P. E., and Gordon, J. W. (1989). insertional mutation in a transgenic mouse allelic with Purkinje cell degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol.**86** pp.3709-3712.

Leggo, J., Dalton, A., Morrison, P.J., Dodge, A., Connarty, M., Kotze, M. J., Rubinsztein, D. C. (1997). Analysis of spinocerebellar ataxia types 1:2:3, and 6, dentatorubral-pallidolusian atrophy, and Friedreich's ataxia genes in spinocerebellar ataxia patients in the UK. *J. Med. Genet.* **34**: 982-985.

Le Marec, N., Herbert, C., Amdiss, F., Botez, M. I., Reader, T. A. (1998). Regional distribution of 5-HT transporters in the brain of wildtype and 'Purkinje cell degeneration' mutant mice: a quantitative autoradiographic study with [3H] citalopram. *J. Chem. Neuroanat.* Sep; **15(3)**: 155-71.

- Lie, L. S., MacDonald, P. M. (1999). Translational regulation of oskar mRNA occurs independent of the cap and poly (A) tail in *Drosophila* ovarian extracts. *Development* Nov; **126(22)**: 4989-96.
- Liu, J., Dalmau, J., Szabo, A., Rosenfeld, M., Huber, J., Furneaux, H. (1995). Paraneoplastic encephalomyelitis antigens bind to the AU-rich elements of mRNA. *Neurology* **45**: 544-550.
- Ma, W.-J., Cheng, S., Campbell, C., Wright, A., Furneaux, H. (1996). Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed elav-like protein. *J. Biol. Chem.* **271**: 8144-8151.
- Lehmann, R., Nusslein-Volhard, C. (1986). Abdominal segmentation, pole cell formation, and embryonic polarity require the localized activity of oskar, a maternal gene in *Drosophila*. *Cell* Oct 10; **47(1)**: 141-52.
- Lisbin, M. J., Gordon, M., Yannoni, Y. M., and White, K. (2000). Function of RRM Domains of *Drosophila melanogaster* ELAV: RNP1 Mutations and RRM Domain Replacements With ELAV Family Proteins and SXL. *Genetics* **155(4)**: 1789-1798.
- Lu, X., Timchenko, N. A., Timchenko, L. T. (1999). Cardiac elav-type RNA-binding protein (ETR-3) binds to RNA CUG repeats expanded in myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* Jan; **8(1)**: 53-60.
- Lundquist, E. A., Herman, R. K., Rogalski, T. M., Mullen, G.P., Moerman, D. G., and Shaw, J. E. (1996). The *mec-8* gene of *C. elegans* encodes a protein with two RNA recognition motifs and regulates alternative splicing of *unc-52* transcripts. *Development* **122**, 1601-1610.
- Ma, W. J., Cheng, S., Campbell, C., Wright, A., Furneaux, H. (1999). Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. *J. Biol. Chem* **271(14)**: 8144-51
- Mandel, M., and Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 159-162.
- Margolis, R.L., Abraham, M.R., Gatchell, S.B., Li, S.H., Kidwai, A. S., Breschel, T. S., Stine, O. C., Callahan, C., McInnis, M. G., and Ross, C.A. (1997). cDNAs with long CAG trinucleotide repeats from human brain. *Hum. Genet.* **100 (1)**, 114-122.

## Literatur

---

Milne, C. A., and Hodgkin, J. (1999). ETR-1, a homologue of a protein linked to myotonic dystrophy, is essential for muscle development in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* **9**: 1243-1246.

Myers, V.E., Fan, X.C., and Steitz, J.A.(1997). Identification of HuR as a protein implicated in AUUUA-mediated mRNA decay. *EMBO J.* **16**: 2130-2139.

Okano, H. J., and Darnell, R. B. (1997). A Hierachy of Hu RNA Binding Proteins in Developing and Adult Neurons. *J. Neurosci.* Vol. **17**, Number 9, Issue of May 1, pp. 3024-3037.

Orr, H. T., Chung, M.-y., Banfi, S., Kwiatkowski, T. J., Jr., Servadio, A., Beaudet, A. L., McCall, A. E., Duvick, L. A., Ranum, L. P. W., and Zoghbi, H. Y. (1993). Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nature Genet.* **4**, 221-226

Perron, M., Furrer, M. P., Wegnez, M., and Theodore, L. (1999). *Xenopus* elav-like genes are differentially expressed during neurogenesis. *Mech. Dev.* Jun; **84(1-2)**: 139-42.

Piñol-Roma, S., and Dreyfuss, G. (1992). Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* **355**: 730-732.

Philips, A. V., Timchenko, L.T., Cooper, T. A. (1998). Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* **280**: 737-741.

Query, C.C., Bentley, R. C., Keene, J.D. (1989). A common RNA recognition motif identified within defined U1 RNA-binding domain of the 70K U1 snRNP protein. *Cell* **57**: 89-101.

Rapp, G., Mucha, J., Einspanier, R., Luck, M., and Scheit, K. H. (1989). Cloning and sequence analysis of a cDNA from human ovarian granulosa cells encoding the C-terminal part of human elongation factor 2. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369**: 247-250

Reddy S., Smith, D. B., Rich, M. M., Leferovich J.M., Reilly, P., Davis, B. M., et al. (1996). Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nat. Genet.* **13**: 325-335.

Roberts, R., Timchenko, N.A., Miller, J. W., Reddy. S., Caskey, C. T., Swanson, M. S., Timchenko. L. T. (1997). Altered phosphorylation and intracellular distribution of (CUG)<sub>n</sub> triplet repeat RNA-binding protein in patients with myotonic dystrophy and in myotonic protein kinase knock out mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 13221-13226.

Robinow, S., and White, K. (1988). The locus elav of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurons at all developmental stages. *Dev. Biol.* Apr; **126(2)**: 294-303.

Robinow, S., Campos, A. R., Yao, K. M., White, K. (1989). The elav gene product of *Drosophila*, required in neurons, has three RNP consensus motifs. *Science* Dec.16; **242**: 1570-1572.

Robinow, S., and White, K. (1991). Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during *Drosophila melanogaster* development. *J. Neurobiol* Jul; **22(5)**: 443-461.

Saiki, R. H., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Ehrlich, H. A. (1985). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**. 487-491.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Schlickum, Stephanie (1999). Charakterisierung eines Gens der Maus aus der Elav-Familie. Diplom-Arbeit, Institut für Humangenetik, Göttingen.

Shibata et al. 2001, cDNA Klon *Mus musculus* adult male cDNA: Accession. Nummer für die NCBI Datenbank: gi|12859862|dbj|AK019578.1|AK019578

Silveira, I., Coutinho, P., Maciel, P., Gaspar, C., Hayes, S., Dias, A., et al. (1998). Analysis of SCA1, DRLPA, MJD, SCA2 and SCA6 CAG repeats in 48 Portuguese ataxia families. *Am. J. Med. Genet.* **28**: 134-138.

Siomi, H., Dreyfuss, G. (1997). RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* Jun; **7(3)**: 345-3553.

Sonoda, J., and Wharton, R. P. (1999). *Genes Dev.* **13**, 2704-2712.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 507-517.

Steller, U., Kohls, S., Muller, B., Soller, R., Muller, R., Schlender, J. and Blohm, D. H. (1996). The RNA binding protein HuD: rat cDNA and analysis of the alternative spliced mRNA in neuronal differentiation cell lines P19 and PC12. *Mol. Brain. Res.* **35**: 285-296.



St. Johnston, D. (1995). The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* **81**: 161-170.

Suzuki, H., Maegawa, S., Nishibu, T., Sugiyama, T., Yasuda, K., Inoue, K. (2000). Vegetal localization of the maternal mRNA encoding an EDEN-BR/Bruno-like protein in zebrafish. *Mechanisms of Development* **93**: 205-209

Szabo, A., Dalmau, J., Manley, G., Rosenfeld, M., Wong, E., Henson J., Posner, J. B., et al. (1991). HuD, a paraneoplastic encephalomyelitis antigen, contains RNA-binding domains and is homologous to Elav and Sex-lethal. *Cell* **67**: 325-333.

The American College of Medical genetics/American Society of Human Genetics Huntington Disease Genetic Testing Working Group (1998) ACMG/ASHG statement: laboratory guidelines for Huntington disease genetic testing. *Am. J. Hum. Genet.* **62**:1243-1247

Timchenko, L.T., Miller, J. W., Tichenko, N. A., DeVore, D. R., Datar, K. V., Lin, L., Roberts, R., Caskey, C. T., and Swanson, M. S., (1996). Identification of a (CUG)<sub>n</sub> triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucl. Acids. Res.*; **24(22)**: 4407-4415.

Timchenko, L.T. (1999). Human Genetic '99: Trinucleotide Repeats in Myotonic Dystrophy: The Role of RNA CUG Triplet Repeats. *Am. J. Hum Genet.* **64**: 360-364.

Varani, G., and Nagai, K. (1998). RNA recognition by RNP proteins during RNA processing.. *Annu. Rev. Biophys. Biomol Struct.* **27**: 407-445.

Webster, P. J., Liang, L., Berg, C. A., Lasko, P., MacDonald, P. M. (1997). Translational repressor bruno plays multiple roles in development and is widely conserved. *Genes Dev.* Oct1; **11(19)**: 2510-21.

Wie-Jun, M., Chung, S., and Furneaux, H. (1997). The ELAV-like proteins bind to AU-rich elements and to the poly(A) tail of mRNA. *Nucleic Acids Research*, Vol. **25**, No. 18 pp. 3564-3569.

Wilkinson, D. G. (1992). "In situ hybridization: A practical approach." IRL, Oxford. University Press.

Yao, K. M., White, K. (1991). Organizational analysis of elav gene and functional analysis of ELAV protein of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis*. *Mol. Cell. Biol.* Jun; **11(6)**: 2994-3000.

## Literatur

---

Yao, K. M., Samson, M. L., Reeves, R., and White, K. (1993). Gene elav of *Drosophila melanogaster*: a prototype for neuronal-specific RNA binding protein gene family that is conserved in flies and humans. *J. Neurobiol.* Jun; **26(6)**: 723-739.

Yao, K. M.; and White, K. (1994). Neural specificity of elav expression: defining a *Drosophila* promoter for directing expression to the nervous system. *J. Neurochem.* Jul; **63(1)**;41-51.

## **Danksagung**

Herrn Prof. W. Engel danke ich für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die Einräumung der Arbeitsmöglichkeiten und die finanzielle Unterstützung beim Besuch von Kongressen. Des weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. W. Engel besonders für die immer sehr freundliche Unterstützung und Betreuung der Arbeit bedanken.

Bei Herrn Dr. F. Laccone bedanke ich mich für der Betreuung der Arbeit und der sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre in der Arbeitsgruppe.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. M. Altmann, die mich während der Erstellung der Arbeit immer sehr unterstützt hat, besonders für die Zeiten, in denen Ihre aufmunternde Worte viel Rückhalt gaben.

Außerdem möchte ich allen Mitarbeitern des Institutes für Humangenetik danken, die für eine sehr freundliche und warme Arbeitsatmosphäre sorgten, sowie all den technischen Mitarbeitern, die die Arbeit unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Susanne Herlt und Sabine Buth, die mich sowohl arbeitstechnisch unterstützt, als auch den schmerzlichen Verlust einer lieben Mitarbeiterin erträglicher gemacht haben.

Danken möchte ich meinen Eltern für ihre besonders herzliche Unterstützung und das gesetzte Vertrauen in mich, meinem Bruder Arnd, der den Druck der Arbeit mitgestaltet hat und meinem Bruder Daniel mit seiner Familie, die mich sehr herzlich während der Erstellung der Arbeit motivierten.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Wilhelm  
Vorname: Christian  
Adresse: Bütersworthstr. 15, 30161 Hannover  
Geburtsort: Heidelberg  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Eltern: Lina Wilhelm, geb. Räuchle  
Horst Wilhelm

## Ausbildung

1973-1977 Besuch der Hasenleiser Grundschule in Heidelberg

1977-1986 Besuch des Helmholtz-Gymnasiums in Heidelberg

1987-1989 Immatrikulation an der Gesamthochschule Kassel Universität zu Kassel im Fach Biologie (Diplom)  
Vordiplomprüfung im Wintersemester 1989/90

Dezember 1989 Immatrikulation an der Johannes Gutenberg Universität zu Mainz im Fachbereich Biologie (Diplom)

Januar 1994 Beginn der experimentellen Diplomarbeit an der Royal Infirmary, Department of Immunologie, Leicester, Großbritannien.

März 1995 Diplomprüfung in Mainz an der Johannes Gutenberg Universität.

September 1995 Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Institut für Humangenetik in Göttingen

Seit September 1999 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung für Hämatologie und Onkologie in Hannover