Aus der Abteilung Humangenetik (Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Engel) im Zentrum Hygiene und Humangenetik der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# Zur Funktion des Brunol4-Gens

# Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

> vorgelegt von Heike Lucia Ellen aus Norden

Göttingen 2011

Dekan:	Prof. Dr. med. C. Frömmel
I. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Engel
II. Berichterstatter/in:	PrivDoz. Dr. med. Männer
Tag der mündlichen Prüfung:	24. Juli 2012

# Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGEN	IV
1. EINLEITUNG	1
1.1 Die Brunol /Celf-Familie	1
1.2 Übersicht über die Funktionen der Mitglieder der Brunol/Celf-Familie	3
1.3 Untersuchungen von für Mitglieder der Brunol-Familie defizienten Tieren	4
1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit	6
2. MATERIAL UND METHODEN	7
2.1 Materialien	7
2.1.1 Chemikalien	7
2.1.2 Lösungen und Puffer	9
2.1.3 Sterilisation	
2.1.4 Medien, Antibiotika und Agarplatten	
2.1.4.1 Medien für Bakterien	
2.1.4.2 Medien für Zellkultur	
2.1.4.3 Antibiotika	
2.1.4.4 IPTG/X-Gal - Platten	
2.1.5 Bakterienlinie	
2.1.6 Plasmid	
2.1.7 Synthetische Oligonukleotide	
2.1.7.1 Primer für Genotypisierungen	
2.1.7.2 Primer zum Herstellen der Sonden für Northern-Blot-Analyse	14
2.1.7.3 Primer für RT-PCR	
2.1.7.4 Primer für Sequenzierungen	
2.1.8 cDNA Proben für die Northern-Blot-Analyse	
2.1.9 Eukaryontische Zelllinien	
2.1.10 Mauslinien	
2.1.11 Antikörper	
2.1.11.1 Primäre Antikörper	
2.1.11.2 Sekundäre Antikörper	
2.1.12 Enzyme	16
2.1.13 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	
2.1.14 Labormaterialien	
2.1.15 Gebrauchswaren für die Zellkultur	
2.1.16 Geräte	
2.2 Methoden	20
2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren	
2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli	
2.2.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Geweben	
2.2.1.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Geweben mittels Lysepuffer I	21

2.2.1.2.2 Isolierung genomischer DNA mit Viagen DirectPCR-Tail (Peqlab, Erlangen)	21
2.2.1.3 Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellen	21
2.2.1.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebeproben	22
2.2.2 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	22
2.2.3 Gelelektrophorese	23
2.2.3.1 Agarosegelelektrophorese von DNA	23
2.2.3.2 Agarosegelelektrophorese von RNA	23
2.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten nach Auftrennung durch Gelelektrophorese	24
2.2.5 Enzymatische Modifikation von DNA	24
2.2.5.1 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	24
2.2.5.2 Ligation von DNA Produkten in pGEM T easy- Vektor (TA-Klonierung)	25
2.2.6 Transformation kompetenter Ecoli-Bakterien	25
2.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
2.2.7.1 PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten	26
2.2.7.2 Reverse-Transkriptase- PCR (RT-PCR)	28
2.2.8 Blot-Techniken	29
2.2.8.1 Southern-Blot-Technik für den Transfer von DNA auf Nitrozellulose-Filter	29
2.2.8.2 Northern-Blot -Technik für den Transfer von RNA auf Nitrozellulose-Filter	30
2.2.9 Random-Prime-Methode zur Herstellung <sup>32</sup> P-markierter DNA	30
2.2.10 Hybridisierung von Nukleinsäuren	31
2.2.11 Sequenzierung von DNA	31
2.2.12 Histologische Arbeitsmethoden	32
2.2.12.1 Gewebepräparation und Fixierung für die Einbettung in Paraffin	32
2.2.12.2 Herstellen von Paraffinschnitten	32
2.2.12.3 Hämatoxylin & Eosin – Färbung histologischer Schnitte	33
2.2.12.4 Präparation von Hippocampus-Zellen für Immunhistochemie	.33
2.2.12.5 Färbung mit DAPI, Munc18-Antikörper und Beta-III-Tubulin-Antikörper	34
2.2.13 Untersuchung von Spermien - Parametern	35
2.2.13.1 Zählen von Spermien in der Cauda epididymidis	35
2.2.13.2 Spermienmotilität	35
2.2.14 Methoden zur Herstellung von Knockoutmäusen	35
2.2.14.1 Methoden für die eukaryontische Zellkultur	36
2.2.14.2 Elektroporation und Selektion von ES-Zellen	36
2.2.14.3 Isolierung und Kryokonservierung von ES-Zellklonen	36
2.2.15 Herstellung von Chimären	37
2.2.16 Software und Computer Tools	37
3. ERGEBNISSE	39
3.1 Expressionsanalyse von Brunol4	39
3.2 Herstellung einer Brunol4-defizienten Maus	41
3.2.1 Elektroporation von ES-Zellen mit dem Targeting-Vektor Brunol4 und Selektion homolog	
rekombinanter Brunol4 <sup>-/-</sup> -ES-Zellen	42
3.2.2 Herstellung von chimären Mäusen durch Injektion von Brunol4 <sup>+/-</sup> -ES-Zellen in Blastozysten.	.45
3.2.3 Züchtung und Genotyp-Analysen der Nachkommen in der F1- und F2-Generation	45
3.3 Kontrolle der Inaktivierung des Brunol4-Gens	48
3.3.1 Northern-Blot-Analyse	48
3.3.2 RT-PCR-Analyse	52
3.4 Phänotyp- Analyse	55
3 4 1 Überlehenszeit der Brunold <sup>-/-</sup> -Tiere	55
3 4 2 Vergleich der Körnergewichte von Brunol4-defizienten Mäusen und Geschwistertieren	57
3.4.3 Auftreten von Krampfanfällen bei adulten Brunol4 <sup>-/-</sup> -Tieren	59

3.5	Morphologische Untersuchungen des Gehirns	60
3	.5.1 Histologie des Gehirns bei Brunol4-defizienten Mäusen	60
3	.5.2 Untersuchungen auf Unterschiede in der Verteilung und Expression von munc-18 ur	nd beta-
Т	ubulin sowie in der Länge der Neuronenfortsätze bei Brunol4 <sup>-/-</sup> -Mäusen	63
3.6	Generierung und Untersuchung von Brunol1/Brunol4-Doppelt-Knockout-Mäusen	65
3	.6.1 Generierung und Genotypisierung	65
3	.6.2 Untersuchungen der Testes und Spermien einer Brunol1 <sup>+/-</sup> /Brunol4 <sup>+/-</sup> -Maus	67
	3.6.2.1 Histologie der Testes	68
	3.6.2.2 Morphologische Untersuchung der Spermien nach DAPI-Färbung	69
	3.6.2.3 Spermienzählung:	
	3.6.2.4 Analyse der Motilität der Brunol1 <sup>17</sup> /Brunol4 <sup>17</sup> -Mäuse	70
4.	DISKUSSION	73
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	73
4.2	Zur Struktur der Brunol-Genfamilie	73
4.3	Zur Funktion der Brunol-Gene	75
4	.3.1 Zur Funktion von Brunol1	75
4	.3.2 Zur Funktion von Brunol2	76
4	.3.3 Zur Funktion von ETR-3	79
4	.3.4 Zur Funktion von Brunol5	
4	.3.5 Zur Funktion von Brunol6	
<u>4</u>	Zur Funktion von Brunol4	87
4	4.1 Neurologische Auffälligkeiten bei Brunol4-defizienten Tieren ohne mornhologisches	Korrelat
ir	n Gehirn	
4	.4.2 Verkürzte Lebenserwartung von Brunol4-defizienten Tieren	
4	.4.3 Signifikante Wachstumsretardierung bei Brunol4-defizienten Tieren	
4	.4.4 Mögliche Infertilität der Brunol4 <sup>-/-</sup> -Männchen	89
4.5	Zur Expression der Bruno-like-Gene bei der Maus	
4	.5.1 Weitere Spleißvariante der Brunol4 -mRNA	92
16	Hobe Letalität hei Brunol1 <sup>-/-</sup> /Brunol/ <sup>-/-</sup> -Donnelt-Knockout-Mäusen	02
4.0		
5.	ZUSAMMENFASSUNG	95
6	ANHANG	96
0.		
6.1	Abbildungsverzeichnis	96
6.1 6.2	Abbildungsverzeichnis	96 96

# Abkürzungen

aa	amino acids
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C-	Centi- (1x10 <sup>-2</sup> )
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
Chr.	Chromosom
Ci	Curie
d	Tag
d.h.	das heißt
Dapi	4',6'-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes H <sub>2</sub> O
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dpc	dies post coitum
Е	Embryonaltag
E.coli	Escherichia coli
E-Cup	Eppendorf-Cup
ES-Zelle	Embryonale Stammzelle
et al.	et alii
F	Farad
F1	Erste Filialgeneration
F2	Zweite Filialgeneration
FCS	Fetal Calf Serum
FM	Fluoreszenz-Mikroskop
g	Gravity of Earth (9,81 m/s <sup>2</sup> )
g	Gramm

GFP Gy	<i>Green fluorescent protein</i> gray
h	Stunde
HE	Hämatoxylin/Eosin
HPRT	Hypoxanthin- Phosphoribosyl- Transferase
ID	Identifikationsnummer
IPTG	Isopropyl-B-thiogalactopyranosid
k-	kilo- (1x10 <sup>3</sup> )
Kap.	Kapitel
1	Liter
μ-	Mikro- (1x10 <sup>-6</sup> )
Μ	Molar (Mol/l)
m	Meter
m-	milli- (1x10 <sup>-3</sup> )
Mb	Megabasen
min.	Minute/n
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
n-	nano- (1x10 <sup>-9</sup> )
Neo	Neomycin
0.g.	Oben genannte(n)
Pa	Pascal
PBS	"Phosphate Buffered Saline"
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pН	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Prä-mRNA	Präkursor-mRNA
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transkriptase polymerase chain reaction
S	Svedberg
S.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek.	Sekunde
S.O.	siehe oben
SS	single strand
SSC	Standard Saline Citrat (-Puffer)

Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA (-Puffer)
TE	Tris-EDTA (-Puffer)
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UK	United Kingdom
UTR	untranslated region
V	Volt
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-ß-Galactopyranosid

## Symbole für Nukleotide (1-Buchstaben-Code)

	A 1 ·	
Λ	A denocin	
л	Aucitosiii	L

- C G
- Cytosin Guanin Thymidin Uracil Т
- U

## 1. Einleitung

#### 1.1 Die Brunol /Celf-Familie

Bei der Brunol-bzw. Celf-Familie handelt es sich um eine Gruppe von sechs RNA bindenden Proteinen. Die Gene wurden in unterschiedlichen Laboratorien kloniert bzw. identifiziert. Daher führten unterschiedliche namensgebende founder-Proteine zu zwei Bezeichnungen für dieselbe Familie. Aufgrund der Ähnlichkeit in der Sequenz mit dem Drosophila-melanogaster-Protein Bruno (Kim-Ha et al. 1995) wird die Familie Brunol-Familie (bruno like) genannt (Good et al. 2000). Der Name Celf-Familie basiert auf den Homologien zu CUG-BP1 (auch Celf1) (Timchenko et al. 1996) und Etr-3 (auch CUG-BP2/Celf2) (Hwang et al. 1994) und steht für CUG-BP1 and Etr-3 like factors (Ladd et al. 2001; Ladd et al. 2004). Die Proteine werden mit Celf1 bis Celf6 bzw. Brunol1, Brunol2 und Brunol4 bis Brunol6 bezeichnet. In der Maus wird das sechste Mitglied in der Brunol-Familie CUG-BP2 bzw. Etr-3 genannt. Die Nummerierung der Mitglieder dieser Genfamilie ist in den unterschiedlichen Nomenklaturen nicht einander entsprechend. Tabelle 1.1 gibt daher eine Übersicht über die Gene mit den dazugehörigen Bezeichnungen und der chromosomalen Lokalisation bei Maus und Mensch, sowie den Grad der Homologie zwischen den jeweiligen Proteinen der beiden Spezies. Im Folgenden wird für die Mitglieder der Brunol/Celf-Familie die Brunol-Nomenklatur verwendet.

	Mitglieder der Brunol/Celf-Familie					
Mus	Brunoll	Brunol2	CUG-BP2	Brunol4	Brunol5	Brunol6
musculus	Celf3	Celfl	Etr-3	Celf4	Celf5	Celf6
			Celf2			
Lokalisation	Chr. 3	Chr. 2	<i>Chr. 2</i>	Chr. 18	Chr. 10	Chr. 9
Homo	Brunoll	Brunol2	Brunol3	Brunol4	Brunol5	Brunol6
sapiens	Celf3	Celfl	Celf2	Celf4	Celf5	Celf6
Lokalisation	Chr. 1	Chr. 11	Chr. 10	Chr. 18	Chr. 19	Chr. 15
Protein-	97%	99%	85%	96%	95%	97%
Homologie						

 Tab. 1.1: Nomenklatur, Lokalisation und Homologien zwischen den Mitgliedern der

 Brunol/Celf-Familie bei Maus und Mensch

Zur Übersicht sind die einzelnen Vertreter der Brunol/Celf-Familie mit den dazugehörigen Namen je nach Nomenklatur dargestellt. Außerdem gibt die Tabelle Auskunft über die chromosomale Lokalisation der Gene sowie über den Grad der Homologien zwischen den Proteinen bei Mensch und Maus.

Die Proteine Brunol1, Brunol2, Etr-3 und Brunol4 - Brunol6 sind sowohl strukturell als auch in der Sequenz miteinander verwandt. Die Primärstruktur der Proteine ist in Abbildung 1.1 dargestellt.



Abb. 1.1: Proteinstruktur der Mitglieder der Bruno-like/Celf- Familie

Am N-terminalen Ende der Proteine befinden sich zwei RRMs (*RNA recognition motif*). Diese sind durch eine Linker-Region mit einem dritten C-terminalen RRM verbunden (nach Burd und Dreyfuss 1994).

Die Proteine enthalten drei RNA bindende Domänen (RBD oder RRM für RNA recognition motif). Zwei dieser RRMs befinden sich am N-terminalen Ende und sind durch eine Linker-Region mit dem C-terminalen RRM verbunden (Burd und Dreyfuss 1994). Die Aminosäuresequenzen der RRMs sind bei den verschiedenen Brunol-Mitgliedern sehr ähnlich, die Sequenz der Linker-Region ist jedoch weniger konserviert. Sie wird daher auch divergent region genannt (Ladd et al. 2001). Entsprechend ihrer Sequenz in der Linker-Region lassen sich die Proteine in zwei Untergruppen einteilen, welche jeweils größere Ähnlichkeiten zeigen. Die erste Gruppe enthält Brunol2 und Etr-3, die zweite enthält Brunol1 sowie Brunol4-Brunol6 (Ladd et al. 2001; 2004). Die Analyse der veröffentlichten Daten (Choi et al. 1998; Good et al. 2000; Li D et al. 2001) und Datenbankrecherchen (NCBI) zeigen, dass einige Transkripte der Brunol/Celf-Familie alternativ gespleißt werden. Aktuell werden in der Maus 2 Proteinisoformen für das Brunol2-Gen (NP 059064.2, NP 059064.2), 6 Proteinisoformen für Etr-3 (NP 001103698.1, NP 001103699.1, NP 001103700.1, NP 001103701.1, NP 001103701.1, NP 001103702.1, NP 001153764.1, NP 001153765.1 , <u>NP 034290.2</u>) und 6 Isoformen für Brunol4 (<u>NP 001139764.1</u>, <u>NP 001139765.1</u>, NP 001139766.1, NP 001139767.1, NP 001167545.1, NP 573458.2) beschrieben.

## 1.2 Übersicht über die Funktionen der Mitglieder der Brunol/Celf-Familie

RNA-Bindungsproteine spielen im Rahmen der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression sowohl für die normale Zellfunktion als auch für die Entwicklung eine große Rolle (Antic und Keene 1997). Durch Bindung an bestimmte Sequenzen der RNA sind die Brunol-Proteine am Alternativen Spleißen von Prä-mRNA, der Translationsinitiation und der Stabilisierung von mRNA beteiligt.

Wie im Folgenden geschildert, können Fehlregulationen dieser Mechanismen an der Pathogenese unterschiedlicher Erkrankungen beteiligt sein.

So ist das Alternative Spleißen von Exon 5 des kardialen TroponinT (cTNT) in Mäusen entwicklungsabhängig. Exon 5 ist vor allem in mRNA des embryonalen Herzens vorhanden, während es in mRNA des adulten Herzens meist fehlt (Cooper und Ordahl 1985). Alle sechs Proteine der Brunol-Familie fördern die MSE-abhängige (muscle specific splicing enhancers) Exon-Inklusion in cTNT-Minigen-Prä-mRNA in Fibroblasten (Ladd et al. 2001; 2004) und Brunol2 und Etr-3 induzieren die Inklusion von Exon 5 des cTNT in Mäusen (Charlet-B et al. 2002a; Ladd et al. 2005a). Entsprechend korreliert der Switch der Spleißvarianten mit einer Herunterregulation von Etr-3 und Brunol2 (Ladd et al. 2005a). Versuche mit einem herzspezifischen dominant-negativen Protein (ein strukturell dem Wildtyp ähnliches Protein, jedoch mit Funktionsverlust), welches das Brunol-vermittelte Spleißen hemmt, führen bei Mäusen zu schwerer Kardiomyopathie (Ladd et al. 2005b). Diese heilt jedoch bei Tieren mit niedrigerer Expression des dominant-negativen Proteins im adulten Stadium spontan. Daraus kann gefolgert werden, dass das Brunol-abhängige alternative Spleißen im Herzen nur in der frühen postnatalen Phase für die Herzfunktion erforderlich ist (Terenzi et al. 2009). Untersuchungen zu Etr-3 und Brunol4 deuten an, dass die zwei Nterminalen RRMs und ein kleiner Teil der Linker-Region ausreichend für die volle MSE-abhängige Spleiß-Aktivität sind (Singh et al. 2004).

Brunol2 und Brunol6 sowie Etr-3 hemmen außerdem das Spleißen des alternativen Exon 11 des humanen Insulinrezeptors (IR) (Savkur et al. 2001; Ladd et al. 2004; Han und Cooper 2005). Des Weiteren unterdrückt Etr-3 die Inklusion von Exon 2 bzw. Exon2 und Exon 3 der Tau Prä-mRNA in T98-Zellen (humanes Glioblastom), und auch Brunol4 trägt möglicherweise zur Inhibition der Inklusion bei (Leroy et al. 2006a).

Verändertes Alternatives Spleißen dieser durch Brunol-Proteine regulierten RNAs von kardialem Troponin T, dem Insulinrezeptor und Tau wurde bei der Myotonen Dystrophie Typ I (DM1) beobachtet (Philips et al. 1998; Sergeant et al. 2001; Savkur et al. 2001; Leroy et al. 2006a). Sowohl *Brunol2-, Etr-3-* als auch *Brunol4-*Transkripte sind signifikant reduziert im Gehirn von an DM1 erkrankten Menschen im Vergleich zu Kontrollen. Brunol2 scheint jedoch zudem durch erhöhte Aktivität eine Fehlregulation des alternativen Spleißens des humanen ClC-1 (Muskel-spezifischer Chlorid-Kanal, auch CLCN-1) zu induzieren. Daraus resultiert ein ClC-1-Verlust im Skelettmuskel, welcher zu Myotonien im Rahmen der DM1 führt (Charlet-B et al. 2002b).

Es wurde außerdem gezeigt, dass die Expression von Etr-3 in HeLa-Zellen (eine humane Zervixkarzinom-Zelllinie) nach Schädigung durch Strahlenexposition heraufreguliert wird. Etr-3 bindet dann an eine A/U-reiche Sequenz der 3'-UTR der *Cyclooxygenase 2-mRNA (COX-2)* und erhöht damit ihre Stabilität. Ihre Translation wird jedoch inhibiert. Damit ist Etr-3 eine wichtige Komponente der bestrahlungsinduzierten Apoptose (Mukhopadhyay et al. 2003a).

Brunol4 wurde des Weiteren als unabhängiger prognostischer Indikator im sporadischen Kolorektalen Karzinom beim Menschen identifiziert (Poulogiannis et al. 2010).

## 1.3 Untersuchungen von für Mitglieder der Brunol-Familie defizienten Tieren

Bezüglich der Abklärung der Funktion der Brunol/Celf-Familie gibt es bereits verschiedene Untersuchungen (s.o.). Allerdings existieren nur wenige Untersuchungen über die Funktion der Brunol-Gene *in vivo*. Durch die Herstellung einer Knockout-Maus für ein Gen ist es möglich, den ganzen Organismus betreffend rückwirkend Aussagen über die Funktionen eines Gens zu machen. Zur Zeit existieren Veröffentlichungen zu Knockout-Mäusen für *Brunol1* und *Brunol2*. *Brunol1* wird in der Maus sowohl im Gehirn als auch im Testis exprimiert (Dev et al. 2007). *Brunol1<sup>-/-</sup>*Mäuse zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen bis auf eine Reduktion in der Spermienanzahl sowie Unterschiede in bestimmten Parametern der Spermienmotilität keine Auffälligkeiten. Die Fertilität der Tiere ist nicht beeinträchtigt (Dev et al. 2007). Die Ausschaltung des ubiquitär exprimierten Gens *Brunol2* führt in Mäusen zu einer erhöhten perinatalen Mortalität, einer bereits in der Embryonalentwicklung auftretenden

Wachstumsretardierung und zu einer Hypofertilität sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Tieren. Zwei Drittel der Männchen zeigten Beeinträchtigungen in der Spermatogenese und eine verstärkte Apoptose in verschiedenen Reifestadien (Kress et al. 2007). Es ist verwunderlich, dass die Brunoll-defizienten Mäuse einen vergleichsweise unauffälligen Phänotyp aufweisen. Da es jedoch sechs Brunol-Gene gibt, kann davon ausgegangen werden, dass eine Redundanz zwischen den Genen besteht. Für Etr-3, Brunol4, Brunol5 und Brunol6 sind noch keine Knockout-Mäuse beschrieben worden, so dass bezüglich deren Funktionen noch viele Fragen offen sind. Bei dem Versuch der Inaktivierung von Brunol4 (Dev 2006) konnten keine Brunol4<sup>-/-</sup> Mäuse generiert werden. Dev (2006) hat vermutet, dass im Genom der Tiere mehr als eine Kopie des Brunol4-Gens vorliegen müsse. Es wurden jedoch epileptische Anfälle in Mäusen beschrieben, bei denen Brunol4 aufgrund von gene trap beeinträchtigt war (Yang et al. 2007). Die Abbildung 1.2 zeigt eine schematische Darstellung für die Insertion der gene-trap-Kassette in das Brunol4-Gen. Etwa 18 kb des Intron 1 wurden durch mehrere Kopien des Transgens ersetzt. Dies führte zu einer Verlängerung des Introns um mindestens 20 kb. Das Transgen enthält multiple Spleiß-Donor- und Akzeptor-Stellen und könnte daher zu Alterationen im Spleißen geführt haben.



Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Insertion der *gene-trap*-Kassette in *Brunol4* (Yang et al, 2007)

Dargestellt ist die Lokalisation der Transgen-Insertion in das erste Intron von *Brunol4*. Die genaue Anzahl von inserierten Kopien ist nicht bekannt, jedoch handelt es sich um mehr als vier Kopien. Auffällig ist, dass zumindest ein Transgen invertiert inseriert worden ist. Es liegt eine Deletion von 18 kb der genomischen Sequenz vor.

Heterozygote gene-trap-Mäuse mit einem genetischen C57Bl/6-Hintergrund zeigten ab einem Alter von drei Monaten epileptische Anfälle und waren hyperaktiv. Des Weiteren waren sie im Säuglingsalter kleiner als Geschwistertiere, nahmen jedoch später deutlich an Gewicht zu und wurden etwas schwerer als Wildtyp-Geschwister. Die homozygoten Tiere für das transgene gene trap-Allel starben meist am ersten Lebenstag, nur ca. 1% wurde älter als vier Wochen. 8% der homozygoten Tiere eines genetischen Hybrid-Hintergrundes (C57Bl/6 x 129S1) jedoch wurden älter als vier Wochen und bekamen spontane tonisch klonische Krampfanfälle ab einem Alter von 8 Wochen sowie Absencen. Sie waren außerdem kleiner als Geschwistertiere. Die Northern-Blot-Analyse mit RNA aus Gehirnen von neugeborenen Mäusen ergab kein Brunol4-Transkipt bei für das transgene gene-trap-Allel homozygoten Tieren. Jedoch wurde berichtet, dass in neben *micro-array*-Untersuchungen anderen mRNAs das Brunol4-Transkript nachweisbar war. Somit bleibt unklar, ob Brunol4 in den gene trap-Mäusen tatsächlich ausgeschaltet worden ist. Daher war es notwendig, Brunol4-defiziente Tiere mittels zielgerichteter Inaktivierung herzustellen. Das dafür notwendige Knockout-Konstrukt für Brunol4 (Dev 2006) lag bereits vor.

#### 1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Funktion des *Brunol4*-Gens sowie die Untersuchung auf eventuelle Redundanz in der *Brunol*-Familie mittels Generierung von *Brunol1/Brunol4*-Doppelt-Knockout-Mäusen. Im Einzelnen:

- 1. Herstellung von Brunol4-Knockout-Mäusen
- 2. Versuche zur Charakterisierung des Phänotyps von *Brunol4*-defizienten Mäusen
- 3. Herstellung und Analysen von *Brunol1/Brunol4*-Doppelt-Knockout-Mäusen.

# 2. Material und Methoden

## 2.1 Materialien

## 2.1.1 Chemikalien

Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Peqlab, Erlangen
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
Bacto-Pepton	Roth, Karlsruhe
Bacto-Hefe-Extrakt	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Chloroform	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Vectashield (DAPI)	Vector, Burlingame
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Dulbecco's Modified Eagle Medium	PAN, Aidenbach
(DMEM)	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Hamburg
DNA-Leiter (1kb)	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs (100 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Sigma-Aldrich, Hamburg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromide	Roth, Karlsruhe
FCS	PAN, Aidenbach
Formaldehyde	Merck, Darmstadt
Formamid	Sigma-Aldrich, Hamburg
Gentamycin	PAN, Aidenbach
Glyzerin	Invitrogen, Karlsruhe

HC1	Roth, Karlsruhe
HEPES	Merck, Darmstadt
IPTG	Biomol, Hamburg
Isopropanol	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
KCl	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
MOPS	Applichem, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
NaCl	Applichem, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
NuPage® LDS Probenpuffer (4x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage® Mops SDS Laufpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
Orange G	Sigma-Aldrich, Hamburg
Paraplast-Einbettmedium	Sigma-Aldrich, Hamburg
Pepton	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Applichem, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	PAN, Aidenbach
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
peqGOLDTriFast	Peqlab, Erlangen
Pferdeserum	Sigma-Aldrich, Hamburg
Phenol	Biomol, Hamburg
Pikrinsäure	Fluka, Neu Ulm
Proteinase K	Applichem, Darmstadt
Radioaktive Substanzen:	
$[\alpha^{32}P]$ -dCTP	Amersham, Braunschweig
Rapid-Hybridisierungspuffer	Amersham, Freiburg
Ready primeTM II (DNA Labelling Kit)	Amersham, Freiburg
RNase-Inhibitor	Boehringer, Mannheim
RNA-Leiter	Invitrogen. Karlsruhe
RNAse-Exitus Plus	Applichem, Darmstadt

Lachs-Spermien-DNA	Sigma-Aldrich, Hamburg
SDS	Serva, Heidelberg
S.O.C Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Tris	Sigma-Aldrich, Hamburg
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Viagen DirectPCR-Tail	Peqlab, Erlangen
X-Gal	Biomol, Hamburg
Xylol	Merck, Darmstadt

Diejenigen Chemikalien, die oben nicht genannt werden, wurden von Merck, Darmstadt oder Roth, Karlsruhe bezogen.

## 2.1.2 Lösungen und Puffer

Alle gängigen Lösungen und Puffer wurden entsprechend Sambrook et al. (1989) hergestellt.

Bouin'sche Lösung	15 x Volumen Pikrinsäure (in H <sub>2</sub> O)
	5 x Volumen Formaldehyd (37%)
	1 x Volumen Essigsäure
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl
	0,5 M NaOH
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat
Depurinierungslösung	250 mM HCl
Digestionslösung	0,8 g NaCl
	0,037 g KCl
	0,099 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,035 g NaHCO <sub>3</sub>
	100 ml H <sub>2</sub> O
	pH 7,3-7,4 einstellen

Dissektionslösung	240 ml HANKS- Lösung
	0,27 g bovines Albumin
	0,347 g MgSO <sub>4</sub>
Erythrosin (Eosin)	0,5% Erythrosin in Ampuwa
Formalin-Fixierungslösung	4% Paraformaldehyde in dPBS
Glycerol-Ladepuffer	10 mM Tris/HCl (pH 7.5)
	10 mM EDTA (pH 8.0)
	0,025% Orange G
	30% Glycerol
HANKS-Lösung	Pulvermedium Sigma H2387 ohne Ca und
	Mg auf 11
	0,35 g Natriumbikarbonat
	2,383 g (10 mM) HEPES
	6 g D-Glukose
	500 µl (10 mg/ml) Gentamycin
	pH 7,3-7,4 einstellen
IPTG	100 ml in Ampuwa
Ligasepuffer (10x)	600 mM Tris/HCl (pH 7,5)
	80 mM MgCl <sub>2</sub>
	100 mM DTT
Lysepuffer (DNA)	100 mM Tris-HCl (pH8)
	5 mM EDTA
	0,2% SDS
	200 mM NaCl
	100 µg/ml Proteinase K

MOPS-Puffer (10x)	41,8 g MOPS
	16,6 ml 3 M Natriumacetat
	20 ml 0,5 M EDTA
	in 1 Liter DEPC -H <sub>2</sub> O
	pH 6,75 einstellen
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl
	1 M Tris/HCl (pH 7,0)
PBS-Puffer (10 x)	80 g NaCl
	2 g KCl
	26,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O
	2,4 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	pH7,4 einstellen
SSC (20 x)	3 M NaCl
	0,3 M Na <sub>3</sub> Citrat(pH 7,0)
5 x TBE-Puffer	450 mM Tris
	450 mM Borsäure
	20 mM EDTA (pH 8,0)
TE-Puffer	5 mM Tris/HCl (pH 7,4)
	1 mM EDTA
Waschlösung I	2 x SSC
	0,1% SDS
Waschlösung II	0,2 x SSC
-	0,1% SDS

## X-Gal 2 x X-Gal in Dimethylformamid

## 2.1.3 Sterilisation

Lösungen wurden für 10 min. bei 121°C und  $10^5$  Pa im Dampfdruckautoklaven bzw. im Falle von hitzeempfindlichen Lösungen durch Sterilfiltration (Porengröße: 0,2 µm) sterilisiert. Gebrauchswaren wurden entweder autoklaviert (Webeco, Bad Schwartau) oder für 8 - 12 h bei 180°C hitzesterilisiert.

#### 2.1.4 Medien, Antibiotika und Agarplatten

#### 2.1.4.1 Medien für Bakterien

LB-Medium (pH 7,5):

1% Bacto-Pepton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl

LB-Agar:

1% Bactopepton0,5% Hefeextrakt1% NaCl1,5% Agar

Das LB-Medium wurde mit destilliertem Wasser zubereitet und nach dem Autoklavieren bei 4°C gelagert.

#### 2.1.4.2 Medien für Zellkultur

Fibroblasten (MEFs):

DMEM ergänzt durch Natriumpyruvat (1 mM) 10% fetales Kalbsserum (FCS), hitzeinaktiviert 1% Glutamin (200mM), 1% Penicillin (50U/ml)/ Streptomycin (50 µg/ml)

DMEM 20% FCS, hitzeinaktiviert

ES:

	1 mM nicht-essentielle Aminosäuren
	1 mM Natriumpyruvat
	10 μM β-Mercaptoethanol
	2 mM L-Glutamin
	2% Penicillin (50 U/ml)/ Streptomycin
	(50 µg/ml)
	1000 U/ml Rekombinanter
	Leukämieinhibierender Faktor (LIF)
Kulturmedium A:	90 ml MEM Eagle
	0,5 ml D-Glukose
	10 mg Transferrin
	10 mg Insulin
	1 ml (12,5 mg/ml) GlutaMAX 1
	0,05 ml (10 mg/ml) Gentamycin
	10 ml Pferdeserum
Kulturmedium B:	100 ml Neurobasal-A-Medium
	250 μl L-Glutamin
	50 µl (10 mg/ml) Gentamycin
	125 µl b-FGF
	2 ml B27 Supplement
	125 µl AraC

Für die Langzeitaufbewahrung der Zellen in flüssigem Stickstoff wurde das folgende Gefriermedium benutzt:

30% Kulturmedium 20% DMSO 50% FCS

2.1.4.3 Antibiotika

Die Antibiotika wurden zu Lösungen verarbeitet, sterlil gefiltert und bei -20°C gelagert. Das jeweilige Antibiotikum wurde zum autoklavierten Medium hinzugefügt, nachdem dieses auf mindestens 55°C heruntergekühlt war.

#### 2.1.4.4 IPTG/X-Gal - Platten

Zum Herstellen von IPTG/X-Gal-Platten wurde LB-Agar mit 50 μg/ml Ampicillin, 100 μM IPTG und 0,4% X-Gal in Petrischalen gegossen. Diese wurden bei 4°C gelagert.

#### 2.1.5 Bakterienlinie

E. coli DH5α Invitrogen, Karlsruhe

#### 2.1.6 Plasmid

pGEM-T Easy Promega, Mannheim

#### 2.1.7 Synthetische Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide, die in dieser Arbeit als Primer dienten, wurden von OPERON bezogen und in dH<sub>2</sub>O (Ampuwa) in einer Konzentration von 100  $\mu$ M gelöst.

#### 2.1.7.1 Primer für Genotypisierungen

Br4F2 (genom.PCR)	5'-GGGCATATGAACGGATTAAGC-3'
Br4R2 (genom. PCR)	5'-GGCAAAGTTGAGAGGGAAAGG-3'
GFP-R3 (genom. P CR)	5'-CGTCGTCCTTGAAGAAGATGG-3'
Bru-1Gen-F	5'-TGGCTGTTGAGCTCACTCCTCTCCAGCAA-3'
Bru1-14585Del-R	5'-CAAGTTGCTGTTCTCTCAGAGACCGA-3'
PGK352-R	5'-GCCCAGAAAGCGAAGGAGCAAAGCT-3'
SRYneuF2	AGCCTGTTGATATCCCCACTG
SRYneuR2	ATGCTCACCAGTGTGTCAGC

#### 2.1.7.2 Primer zum Herstellen der Sonden für Northern-Blot-Analyse

Similarexon12F	5'-TGCAGATGTTCCTCCCTTTC-3'
Similarexon13R	5'-GGTAATCAAAGCGCCTCTCA-3'
Brl4Exon2R4	5'-CTGACTCACGCTCGCAGTAG-3'
Brl4NorthF4	5'-CCAGCCTGTTTAAACCGAAA-3'
Brl4North4R4	5'-AGCTCGTAGATCTTGCCGAA-3'

### 2.1.7.3 Primer für RT-PCR

Brl4Exon4R4	5'-AGTGCACTCCTCGATGTTCC-3'
Similarexon12F	5'-TGCAGATGTTCCTCCCTTTC-3'
Brl4184-DelF4	5'-AATAGAACGAGAGCCCAGAGC-3'
Similarexon13R	5'-GGTAATCAAAGCGCCTCTCA-3'
Brl4Exon2R4	5'-CTGACTCACGCTCGCAGTAG-3'
Brl4NorthF4	5'-CCAGCCTGTTTAAACCGAAA-3'
Brl4North4R4	5'-AGCTCGTAGATCTTGCCGAA-3'
Brl4qPCRF4	5'-TGCAGCAGTATGCAGGACC-3'
Brl4qPCRR4	5'-AGGGAGGAACATCTGCATCA-3'

## 2.1.7.4 Primer für Sequenzierungen

SP6	5'-TTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGC-3'
Τ7	5'-AATACGACTCACTATAGGGCGAATTGG-3'
SeqPCRintmidF	5'-ACTGACAGGGAGCGCACAAT-3'
SeqPCRintmidR	5'-CAGGCCATTCATGTTGAGG-3'
SeqPCRex13R	5'-GGGACTAGGCCCCATTGTA-3'
SeqPCRex13F	5'-CAAGCTGACGACTCCAGACA-3'

## 2.1.8 cDNA Proben für die Northern-Blot-Analyse

ß-actin	hergestellt von Dr. J. Nolte
Brunol4 Exon 1	in dieser Studie hergestellt
Brunol4 Exon 12/13	in dieser Studie hergestellt
Brunol4	hergestellt von Dr. A. Dev

#### 2.1.9 Eukaryontische Zelllinien

RI Murine embryonale Stammzellen Dr. A. Nagi, Toronto, Canada

#### 2.1.10 Mauslinien

Die Mauslinien C57Bl/6J und 129/Sv wurden von den Charles River Laboratorien in Wilmington, USA bezogen und im Tierstall des Instituts für Humangenetik gezüchtet. Die Tiere leben in einem Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 h bei 22°C und 55±5% relativer Luftfeuchtigkeit. Das Futter wird von Ssniff-Spezialdiäten (Soest) bezogen.

#### 2.1.11 Antikörper

#### 2.1.11.1 Primäre Antikörper

Munc18-Antikörper (Kaninchen)	Max-Planck-Institut für
	biophysikalische Chemie, Abt.
	Neurobiologie, Göttingen
Neuronenspezifischer beta-III-Tubulin-Antikörper	Abcam, Cambridge, UK
	(Maus)

#### 2.1.11.2 Sekundäre Antikörper

Anti-Maus IgG Cy3 konjugierter Antikörper	Sigma-Aldrich, Hamburg
Anti-Maus IgG FITC konjugierter Antikörper	Sigma-Aldrich, Hamburg

#### 2.1.12 Enzyme

Platinum-Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Hamburg
Restriktionsenzyme (inkl. Puffer)	Invitrogen, Karlsruhe
	NEB, Frankfurt
DNase I, Amplification Grade	Sigma-Aldrich, Hamburg

Immolase-DNA-Polymerase	Bioline, Luckenwalde	
RNase-Inhibitoren	Invitrogen, Karlsruhe	
Superscript-II	Invitrogen, Karlsruhe	
T4-DNA-Ligase	Promega, Mannheim	

## 2.1.13 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

DYEnamic ET-Terminator mix	Amersham Pharmacia,
	Braunschweig
Immolase Taq	Bioline, Mannheim
	DNA-Polymerase System
pGEM®T-easy Vector System I	Promega, Madison, USA
ProbeQuant G-50 Micro Colums	Amersham Pharmacia,
	Braunschweig
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Rediprime II DNA Labeling System	Amersham Pharmacia,
	Braunschweig
Superscript <sup>™</sup> II RNaseH	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Reverse Transkriptase	
TriReagent	Sigma-Aldrich, Hamburg

## 2.1.14 Labormaterialien

Die Labormaterialien, die nicht aufgelistet sind, wurden bei Schütt und Krannich (Göttingen) gekauft.

Deckgläser (24 x 60 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Glaswaren	Schott, Mainz
Hybond XL	Amersham, Braunschweig
Kühlzentrifugenbecher	Nalgene, Rochester, USA
Mikroliterpipetten	Pipetman® Gilson Abimed,
	Langenfeld
Objektträger Superfrost	Menzel – Gläser, Braunschweig

PCR-Gefäße	Molecular BioProducts, San Diego,
	USA
Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Pipettenspitzen mit Filter	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen ohne Filter	Eppendorf, Hamburg
Quarz-Küvetten	Hellma, Mühlheim
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (RNase-frei)	Brand, Wertheim
RotiPlast-Paraffin	Roth, Karlsruhe
Transfekionsbehälter	Lab-Tek/Nalge, Nunc, IL, USA
Whatman-Blottingpapier	Schleicher and Schüll, Dassel
X-Ray-Filme	Amersham, Braunschweig

## 2.1.15 Gebrauchswaren für die Zellkultur

Auslaufpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Elektroporationsküvette	BioRad, München
Falcon-Filter	BD Biosciences, Heidelberg
Filtrationseinheit	Nalgene, Rochester, USA
Kryoröhrchen	Greiner, Nürtingen oder Sarstedt,
	Nümbrecht
Kulturschalen (6 cm und 10 cm)	Nunc, Wiesbaden
Objektträger für die Zellkultur	BD Biosciences, Heidelberg
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
6-cm-Platten	Nunc, Wiesbaden
Spritzen (5 ml und 10 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
24-Loch-Platte	Greiner, Nürtingen oder Nunc,
	Wiesbaden
96-Loch-Platte	Greiner, Nürtingen oder Nunc,
	Wiesbaden
14-ml-Zentrifugenröhrchen	Corning, New York, USA
Zellkulturflaschen	Greiner, Nürtingen oder Sarstedt,
	Nümbrecht

#### Zellschaber

Sarstedt, Nümbrecht

## 2.1.16 Geräte

Nicht gesondert aufgeführte Geräte wurden von den Firmen Schütt bzw. Krannich, Göttingen, bezogen.

Accu-Jet	Brand, Wertheim
Automated DNA-Sequencer	GE Healthcare, München
MegaBace 1000	
Brutschrank IR Autoflow Incusafe	Sanyo, Tokyo, Japan
Dampfdruckautoklav	Webco, Bad Schwartau
Einbettungsmaschine	Thermo Fisher, Waltham, USA
Eppendorf-Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
FACScan <sup>™</sup> Durchflusscytometer	Becton – Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop BX60	Olympus, Planegg
Gene Pulser	BioRad, München
Lichtmikroskop	Zeiss, Göttingen
Mikrotom	Leica, St. Gallen, Schweiz
Mikrowelle	Philips, Hamburg
MWG Primus 96 <sup>plus</sup> Thermocycler	MWG Biotech, Ebersberg
PTC-100 <sup>™</sup> Peltier Thermal Cycler	BioRad, München
Sterilbank HERA <i>safe</i>	Heraeus, Hanau
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
TurboblotterTM	Schleicher & Schüll, Dassel
Ultraspec 3000 pro Spektralphotometer	Invitrogen, Karlsruhe
UV-Transilluminator	Herolab, Wiesloch
MXX-612 Waage	Denver Instrument, Göttingen
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Hettich Universal	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau

#### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren

#### 2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli

(nach Sambrook et al. 1989)

5 ml LB-Medium mit einem entsprechenden Antibiotikum wurden mit einer einzelnen *E.coli*-Kolonie beimpft und in einem Inkubator bei 37°C für 16h geschüttelt. Nach dieser Inkubation wurde das Medium bei 4.000 x *g* für 10 min. abzentrifugiert und der Niederschlag, welcher die Bakterien enthielt, in 100  $\mu$ l P1-Lösung resuspendiert. Mit 200  $\mu$ l P2-Lösung wurden die Zellen dann alkalisch gelöst und eine Neutralisierung und der Stopp der Reaktion erfolgten durch Zugabe von 150  $\mu$ l P3-Lösung. Um Proteine und genomische DNA von der Plasmid-DNA zu trennen, wurde zunächst 10 min. bei 10.000 x *g* und 4°C zentrifugiert, der plasmidhaltige Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum in ein neues E-Cup transferiert und die DNA mit 1ml 100%-Ethanol ausgefällt. Anschließend wurde die Lösung für 30 min. bei -20°C gelagert, um dann erneut für 15 min. bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde mit 70%-Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen an der Luft in 30  $\mu$ l Ampuwa gelöst.

P1:	50 mM Tris-HCl, (pH 8,0)
	10 mM EDTA
	100 µg/ ml RNAse A
P2:	200 mM NaOH
	1% SDS
P3:	3,0 M Kaliumacetat, (pH 5,5)

#### 2.2.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Geweben

(nach Laird et al. 1991)

#### 2.2.1.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Geweben mittels Lysepuffer I

Lysepuffer I: 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) 100 mM EDTA 0.5% SDS

Biopsien von Mäuseschwänzen von einer Länge bis zu 0,5 cm wurden über Nacht in 700  $\mu$ l Lysepuffer und 35  $\mu$ l Proteinase K (10  $\mu$ g/ $\mu$ l) bei 55 °C inkubiert und geschüttelt. Der Ansatz wurde anschließend für 10 min. bei 8000 x *g* zentrifugiert und der Überstand in ein neues E-Cup überführt. Nach Hinzufügen des gleichen Volumens an Isopropanol und einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurde für weitere 15 min. zentrifugiert. Die DNA wurde mit 70%-Alkohol gewaschen und nach dem Lufttrocknen in ca. 80  $\mu$ l Ampuwa gelöst und bei 4°C gelagert.

## 2.2.1.2.2 Isolierung genomischer DNA mit Viagen DirectPCR-Tail (Peqlab, Erlangen)

Das Gewebe wurde mit 150 µl Viagen DirectPCR-Tail (Peqlab, Erlangen) und 5 µl Proteinase K über Nacht bei 55 °C unter Schütteln inkubiert und konnte nach weiteren 50 min. Inkubation bei 80°C mit anschließender Zentrifugation zur Polymerasekettenreaktion verwendet werden.

#### 2.2.1.3 Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellen

Um DNA aus ES-Zellen zu isolieren, wurde die ES-Zellkultur in einer 24-Loch-Platte mit PBS gewaschen und über Nacht bei 55 °C mit 500 µl Lysepuffer II inkubiert. Nach Hinzugabe eines äquivalenten Volumens Isopropanol erfolgte ein Durchmischen der Suspension für 15 min. Nach dem Waschen mit 70%-Ethanol wurde die DNA in ein Mikrozentrifugenröhrchen mit 80 µl Ampuwa übertragen und für 10-20 min. bei 60°C gelöst.

Lysepuffer II

100 mM Tris/HCl (pH 8.0) 5 mM EDTA 200 mM NaCl

100 μg/ml Proteinase K 0,2 % SDS

#### 2.2.1.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebeproben

Für die RNA-Isolierung aus Geweben wurden diese nach der Präparation aus den Organismen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und ggf. bis zur Bearbeitung bei -80°C gelagert. Vor Beginn der Isolation wurden der Arbeitsplatz und die Pipetten mit RNAse-Exitus Plus (Applichem, Darmstadt) behandelt. Zur Gesamt-RNA-Isolierung aus tierischen Geweben wurde peqGOLDTriFast (Peqlab, Erlangen) verwendet. 100-200 µl Gewebe wurden mit einem Plastik-Mörser in 1-2 ml peqGOLD TriFast homogenisiert. Das Volumen der Probe sollte 10% des Reagenz-Volumens nicht übersteigen. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, um die komplette Dissoziation von Nukleoproteinstrukturen zu gewährleisten, wurden pro ml TriFast 200 µl Chloroform hinzugegeben. Die Suspension wurde mit einem Vortex kräftig geschüttelt und für 10 min. bei RT inkubiert. Durch Zentrifugation bei 12000 x g für 15 min. bei 4°C entstanden 3 Phasen, eine obere wässrige Phase, eine mittlere Interphase und eine untere organische Phase. Die farblose wässrige Phase, die die RNA enthielt, wurde in ein neues E-Cup überführt und mit 500 µl Isopropanol ausgefällt. Nach Waschen des Pellets mit 70%-Ethanol und Trocknen wurde die RNA in 15-50 µl DEPC- H<sub>2</sub>O gelöst und bei -80°C gelagert.

#### 2.2.2 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt, indem die Absorption durch die Proben bei 260 nm und 320 nm gegen steriles Wasser bestimmt wurde. Die Konzentration wurde mittels der erhaltenen Werte für die Absorption nach dem Lambert-Beer-Gesetz berechnet:

C = (E 260 - E 320) x f x c

C= Konzentration der Probe ( $\mu g/\mu l$ )

E 260= Absorption bei 260 nm

E 320= Absorption bei 320 nm

f = Verdünnungsfaktor

c= Konzentration (Standard) / Absorption (Standard)

für doppelsträngige DNA :  $c = 0.05 \ \mu g/\mu l$ für RNA :  $c = 0.04 \ \mu g/\mu l$ für einzelsträngige DNA :  $c = 0.03 \ \mu g/\mu l$ .

#### 2.2.3 Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese können unterschiedlich geladene Makromoleküle wie etwa Nukleinsäuren oder Proteine voneinander getrennt werden. Die Verbindungen wandern entsprechend ihrer Beweglichkeit durch ein elektrisches Feld. Die Beweglichkeit ist dabei direkt proportional zu dem Verhältnis der Ladung zur Masse.

#### 2.2.3.1 Agarosegelelektrophorese von DNA

Zum Auftrennen von DNA-Fragmenten verschiedener Länge wurden Agarosegele verwendet. Je nach Fragmentlänge wurden dabei 1-1,5 g Agarose in 100 ml 0,5 x TBE-Puffer durch Kochen gelöst. Nach Herunterkühlen auf ca. 60°C wurde ein Tropfen Ethidiumbromid (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l) hinzugefügt, welches als interkalierende Substanz die DNA später unter UV-Licht bei 354 nm als Bande sichtbar macht. Das Gel wurde in eine horizontale Form gegossen und bei 4°C zum Aushärten gekühlt. Mit DNA und jeweils dem fünften Teil des Volumens der DNA an Ladepuffer sowie 1 kb-Leiter als Marker beladene Gele wurden in 0,5 x TBE-Puffer je nach Konzentration an eine Spannung von 60-130 V angeschlossen, um ein elektrisches Feld zu erzeugen, durch das die Moleküle dann gewandert sind.

#### 2.2.3.2 Agarosegelelektrophorese von RNA

(nach Hodge 1994)

RNA-Moleküle haben oft komplementäre Regionen, so dass sie Doppelstränge bilden können. Um dies zu verhindern, wurde die RNA vor dem Beladen mit Formaldehyd und Formamid behandelt und auf ein denaturierendes Formaldehyd-haltiges Gel aufgetragen. Für eine große Gelkammer wurden 2 g Agarose durch Aufkochen in 148 ml DEPC-Wasser und 20 ml 10x MOPS gelöst. Die auf 50°C herabgekühlte Lösung wurde dann mit 33,2 ml Formaldehyd (37%) versetzt und nach Mischen in eine

horizontale Gelkammer gegossen. Für eine kleinere Gelkammer wurde die Hälfte der Mengen verwendet. Als Laufpuffer fungierte 1x MOPS. Ca. 15 µg RNA wurden mit DEPC-Wasser auf 6 µl aufgefüllt und mit dem doppelten Volumen an Proben-Puffer (45 µl 10x-MOPS-Puffer, 75 µl Formaldehyd und 180 µl Formamid (40%) für 200 µl) versetzt und bei 65°C für 10 min. denaturiert. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min. auf Eis abgekühlt. Nachdem ein Drittel des Ansatzvolumens an Lade-Puffer (enthält 0,1% Ethidiumbromid) hinzugegeben worden war, konnte das Gel mit der RNA beladen werden. Um die Längen der Ribonukleinsäuren zu bestimmen, wurde als Marker eine Molekulargewicht-Leiter (0,5-10-kb-RNA-Leiter) mit aufgetragen. Bei 4°C wurde die RNA bei einer Spannung von 25 V ca. 16-20 h lang aufgetrennt.

## 2.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten nach Auftrennung durch Gelelektrophorese

Zur Extraktion bestimmter DNA-Fragmente einer Länge von 70 bp bis 10 kb nach Gelelektrophorese wurde das QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit verwendet. Zu einem ausgeschnittenen DNA-Fragment in Agarosegel wurde das dreifache Volumen an QG-Puffer gegeben und dieses unter mehrmaligem kräftigen Mixen für 10 min. bei 50 °C inkubiert. Nach kompletter Lösung des Gels wurde je mg Gel 1ml Isopropanol zur Ausfällung der DNA hinzugegeben und die Flüssigkeit nach Schütteln in eine Säule (*spin colum*) überführt und für 1 min. bei 22.000 x *g* zentrifugiert. Die Säule enthält einen Filter mit einer speziellen Silikon-Gel-Membran, an die selektiv DNA gebunden wird. Der Durchschlag wurde verworfen und die Säule mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen. Anschließend konnte die Säule in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und die DNA in zwei Schritten mittels 20-50 µl EB-Puffer durch weitere Zentrifugation eluiert werden.

#### 2.2.5 Enzymatische Modifikation von DNA

#### 2.2.5.1 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Zum Verdau von doppelsträngiger DNA wurde diese mit 5-10 U Restriktionsenzym pro µg DNA und dem vom Hersteller empfohlenen Puffer beim jeweiligen Temperaturoptimum von in der Regel 37°C ca. 1-3 h inkubiert.

## 2.2.5.2 Ligation von DNA Produkten in pGEM®T easy- Vektor (TA-Klonierung)

(nach Clark 1988; Hu 1993)

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurde das Vektorsystem pGEM<sup>®</sup>T easy benutzt. Hierbei wird ausgenutzt, dass viele DNA-Polymerasen 3'- Adeninüberhänge produzieren. Dies tun sie durch ihre terminale Transferase-Aktivität, die zu einem nicht-komplementären Anfügen eines Nukleotids führt, wobei vor allem dATPs gebunden werden. Diese sind komplementär zum 5'-Thyminüberhang des linearisierten pGEM<sup>®</sup>T easy-Vektors, so dass das PCR-Produkt integriert werden kann. Für die Ligation wurde folgender Ansatz über Nacht bei 4°C gekühlt:

30 μg Vektor-DNA
50-100 μg Insert DNA (1:3, Vector: Insert Verhältnis)
5 μl Ligase-Puffer (2x)
1 μl T4-DNA-Ligase (5U/μl)
in einem Gesamtvolumen von 10 μl.

#### 2.2.6 Transformation kompetenter E.-coli-Bakterien

(nach Ausubel et al. 1994)

Zu 5-10  $\mu$ l Ligationsansatz wurden 50  $\mu$ l einer Suspension kompetenter DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1983) gegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis, in der sich der Vektor außen an die Zellen anlagert, wurden die Bakterienmembranen durch einen Hitzeschock (42°C für 45 s) durchlässig für den Vektor gemacht und dann für 2 min. auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 950  $\mu$ l S.O.C-Medium (Invitrogen) wurden die transformierten Zellen zur Erholung für 1 h bei 37°C geschüttelt. 200 bis 400  $\mu$ l der transformierten Zellen wurden schließlich auf vorgewärmte LB-Agar-Platten ausplattiert, die je nach Resistenz des Vektors ein entsprechendes Antibiotikum sowie 1mM IPTG und 40 mg/ml X-Gal enthielten.

Letztere dienen der Blau-Weiß-Selektion, mittels welcher erkannt werden kann, ob die Klone das Plasmid enthalten. Die Platten wurden bei 37°C für 12-16 h inkubiert.

#### 2.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

(nach Saiki et al. 1988)

Eine der wichtigsten Methoden in der Molekularbiologie ist die Polymerasekettenreaktion (PCR), die zur exponentiellen in-vitro-Amplifikation von Nukleinsäuren benutzt wird und mit der wegen der großen Sensitivität selbst minimale Mengen an DNA nachgewiesen werden können. Für die Amplifikation des gewünschten Produktes werden anhand der Nukleotidsequenz spezifische Primer (kurze ss-DNA-Fragmente von ca. 20 bp Länge) gewählt, wobei es jeweils einen Vorwärtsund einen Rückwärtsprimer gibt, die die DNA-Synthese der komplementären Stränge führen. Die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase (Chien et al. 1976) katalysiert die Synthese neuer DNA. Hierbei liest das Enzym die Basensequenz eines Stranges ab und synthetisiert eine hierzu komplementäre Nukleinsäure. Um beginnen zu können, benötigt das Enzym Primer, die, wie oben beschrieben, für beide Stränge vorliegen, so dass beide Teile der Doppelkette abgelesen werden und jeweils in 5'- nach 3'- Richtung neue Nukleotide angefügt werden können. Das PCR-Produkt ist folglich ein DNA-Fragment, welches von den Sequenzen bzw. komplementären Sequenzen beider Primer flankiert wird.

#### 2.2.7.1 PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die Amplifikation mittels PCR fand in einem automatischen Thermocycler statt. Folgende Protokolle für PCR-Reaktionen wurden verwendet:

Für Brunol4-Amplifikation

1,0 μl DNA 0,5 μl Br4-F2 (l0 mM) 0,5 μl Br4-R2 (10 mM) 0,5 μl GFP-R3 (10 mM) 0,5 μl l0 mM dNTPs 2,5 μl l0x PCR buffer
0,75 μl 50mM MgCl<sub>2</sub>
0,3 μl Immolase-Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)
mit Ampuwa auf 25 μl aufgefüllt

Für Brunol1-Amplifikation

1,0 μl DNA
1,0 μl B1-Gen-F(l0 mM)
1,0 μl B1-14585Del (10 mM)
1,0 μl PGK-352-R (10 mM)
0,5 μl l0 mM dNTPs
2,5 μl l0x PCR buffer
1,5 μl 50mM MgCl<sub>2</sub>
0,3 μl Immolase Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)
mit Ampuwa auf 25 μl aufgefüllt

#### Für SRY-PCR

1,0 μl DNA
1,0 μl SRYneuF2 (l0 mM)
1,0 μl SRYneuR2(10 mM)
0,25 μl l0 mM dNTPs
2,5 μl l0x PCR buffer
0,5 μl 50mM MgCl<sub>2</sub>
0,3 μl Platinum-Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)
mit Ampuwa auf 25 μl aufgefüllt.

Der Reaktionsansatz durchlief in 200 µl Reaktionsgefäßen in einem Thermocycler Zyklen verschiedener Temperaturen.

Für *Brunol4*-Amplifikation Initiale Denaturierung 95°C 5 min. Denaturierung 95°C 30 s Primerhybridisierung 60°C 30 s 35x Elongation 72°C 45 s Auffüllreaktion 72°C 10 min. Speicher 8°C Für *Brunol1*-Amplifikation Initiale Denaturierung 95°C 5 min. Denaturierung 94°C 30 s Primerhybridisierung 63°C 45 s 35x Elongation 72°C 1 min. Auffüllreaktion 72°C 10 min. Speicher 8°C

Für *SRY*-Amplifikation Initiale Denaturierung 95°C 5 min. Denaturierung 94°C 30 s Primerhybridisierung 62°C 45 s 30x Elongation 72°C 1 min. Auffüllreaktion 72°C 5 min. Speicher 8°C.

Außerdem wurde für RT-PCRs das Brunol4 Protokoll mit leicht veränderter Primerhybridisierungstemperatur verwendet.

#### 2.2.7.2 Reverse-Transkriptase- PCR (RT-PCR)

Reverse-Transkriptase-PCR ist ein Verfahren, mit dem mittels RNA-Vorlagen cDNA hergestellt und mittels PCR amplifiziert werden kann. 5  $\mu$ g Gesamt-RNA wurden zunächst in einem RNAse-freien Reaktionsröhrchen in 8  $\mu$ l H<sub>2</sub>O mit 1  $\mu$ l 10-x-Reaktionspuffer versetzt und mittels 15-minütigem Verdau durch 1  $\mu$ l Amplification Grade DNAse I von Verunreinigung durch DNA befreit. Anschließend wurde 1  $\mu$ l Stopp-Lösung hinzugegeben. Der Ansatz wurde dann für 10 min. auf 70°C erhitzt, um das Enzym und die RNA zu denaturieren, anschließend folgte eine Kühlung auf Eis. Nach dem DNAse-Verdau folgte die eigentliche Reverse-Transkriptase-Reaktion. Für die RT-PCR wurde Superscript II RT (Invitrogen) verwendet. Der Ansatz wurde mit 1  $\mu$ l Oligo (dT) Primer (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ l 10 mM dNTP-Mischung und Ampuwa auf 13  $\mu$ l aufgefüllt und für 5 min. bei 65°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden folgende Komponenten hinzugegeben:
#### 4 µl 5x First strand - Puffer

2 μl 0,1 M DTT.

Der Inhalt des Röhrchens wurde gründlich gemischt und für 2 min. bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl Reverse Transkriptase (Superscript II RT, Invitrogen) zum Starten der Reaktion hinzugefügt und zur cDNA-Synthese für 50 min. auf 42 °C erwärmt. Die Reaktion wurde schließlich durch 15-minütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt. Die cDNA konnte nun als Vorlage für die PCR (wie oben beschrieben) genutzt werden.

#### 2.2.8 Blot-Techniken

## 2.2.8.1 Southern-Blot-Technik für den Transfer von DNA auf Nitrozellulose-Filter

(nach Southern 1975)

Für den Transfer von DNA auf Nitrozellulose-Filter nach Agarosegelelektrophorese mittels eines Turbo-Blot-Apparates (Schleicher & Schuell, Dassel) wurde die hohe Löslichkeit von Nukleinsäuren in 20x SSC-Puffer genutzt. Die Flüssigkeit wird dabei durch Kapillarkräfte durch das Gel auf die Nitrocellulose-Membran gezogen und mit ihr die DNA, die dann in der Membran-Matrix hängen bleibt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zunächst für 10 min. in 0,25 M HCl depuriniert, für 30 min. mit Denaturierungslösung behandelt und anschließend 45 min. lang in Neutralisierungslösung gelegt. Zum Transfer der DNA auf die Nitrozellulose-Membran im Turbo Blotter wurden etwa 20 Whatman-Papiere (GB003), 4 Whatman-Papiere (GB002) und ein mit 2x SSC angefeuchtetes GB 002 Whatman-Papier übereinander geschichtet und die ebenfalls in 2x SSC angefeuchtete Membran oben aufgelegt. Auf der Membran wurde das Agarosegel platziert. Die Schicht wurde mit drei mit 2x SSC angefeuchteten Whatman-Papieren (GB002) bedeckt und als Puffer wurde 20x SSC hinzugegeben. Mittels eines weiteren mit 20x SSC angefeuchteten Whatman-Papiers als Brücke wurde eine Verbindung zwischen dem Puffer-Reservoir und der Gel-Filterschicht hergestellt. Für den Transfer wurde die Vorrichtung über Nacht belassen. Der Filter wurde dann kurz in 2x SSC gewaschen und zum Fixieren der DNA für 2 h bei 60°C gebacken.

## 2.2.8.2 Northern-Blot -Technik für den Transfer von RNA auf Nitrozellulose-Filter

Für den Transfer von RNA auf Nitrozellulose-Papier wurde ein ähnliches Prinzip wie das des Southern Blots verwandt. Das Gel wurde zunächst in 2x SSC-Puffer gewaschen. In einer Schale wurden 27 trockene Whatmann-Papiere übereinander geschichtet, auf ein weiteres in 20x SSC-Puffer angefeuchtetes Papier wurde die in 2x SSC angefeuchtete Nitrozellulose-Membran ausgebreitet und auf dieser das Gel so ausgerollt, dass sich keine Luftblasen zwischen Gel und Membran befanden. Zum Abschluss wurden 3 in 20x SSC-Puffer angefeuchtete Whatman-Papiere aufgelegt und eine Brücke aus ebenfalls feuchtem Whatman-Papier in ein Reservoir mit 20x SSC-Puffer geleitet. Über Nacht wurde nun der Puffer durch Gel und Membran bis in den Speicher aus Whatman-Papieren gezogen und so die RNA auf die Membran transportiert. Zuletzt wurde die RNA durch zweistündiges Backen bei 80°C auf der Membran fixiert.

# 2.2.9 Random-Prime-Methode zur Herstellung <sup>32</sup>P-markierter DNA

(nach Denhardt 1966; Feinberg and Vogelstein 1989)

Für die radioaktive Markierung von DNA-Proben wurde das Rediprime<sup>TM</sup> II Random Prime Labelling System (Amersham Pharmacia) verwendet. Diese Methode basiert auf dem von Feinberg und Vogelstein (1989) entwickelten Prinzip des *random priming*. 25-50 ng DNA wurden durch 10-minütiges Kochen in TE-Puffer (Gesamtvolumen 46 µl) denaturiert und nach dem Herunterkühlen auf Eis in ein Rediprime II Random Prime Labelling System-Röhrchen pipettiert. Dieses Röhrchen enthält dATP, dGTP, dTTP, 4-8 U Klenow-Fragment (ein Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* mit 5'→3'- Polymerase-Aktivität und 3'→5'-Exonuklease-Aktivität), und Oligodesoxyribonukleotide. 4 µl [<sup>32</sup>P] dCTP (3000 Ci/mmol) wurden hinzugefügt. Die Markierung der DNA fand für 45 min. bei 37°C statt. Anschließend wurde die markierte Sonde durch Zentrifugation in speziellen Zentrifugensäulen von Amersham Pharmacia von nicht eingebautem [<sup>32</sup>P] dCTP getrennt.

#### 2.2.10 Hybridisierung von Nukleinsäuren

(nach Denhardt 1966)

Die RNA, die zuvor auf eine Nitrozellulose-Membran transferriert wurde, kann mit den radioaktiv markierten Sonden hybridisiert werden. Dazu wurde die Membran nach dem Entfernen der RNA-Leiter durch Abschneiden des entsprechenden Bereichs Membran zunächst in 2 x SSC-Puffer gewaschen der und in eine Hybridisierungsröhre überführt. Um Fehlbindungen der Sonde vorzubeugen, folgte eine Vorhybridisierung mit 10 ml Hybridisierungspuffer und 250 µl denaturierter Lachs-DNA für 2 h bei 65°C. Anschließend wurde die markierte Sonde für 10 min. bei 95°C denaturiert und nach dem Abkühlen zur Hybridisierungslösung hinzugefügt. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C über Nacht in einem Hybridisierungsofen, in dem die Röhre permanent gedreht wurde. Nach Beendigung der Hybridisierung wurde die Membran für 10 min. in 2x SSC bei RT gespült. Schließlich wurde sie im bei 60°C vorgewärmten Wasserbad in 2x SSC mit 0,1% SDS gewaschen und nach ca. 10 min. gemessen. Bei hoher Hintergrundstrahlung (>1 Bq/m<sup>2</sup>) wurde die Membran anschließend in 0,2x SSC mit 0,1% SDS gewaschen. Nach dem Trocknen der Membran wurde diese in Plastikfolie geschweißt und zusammen mit einem Film bei -80°C gelagert. Der Film wurde im X-Ray Automatic Processor Curix 60 entwickelt.

#### 2.2.11 Sequenzierung von DNA

(nach Sanger et al. 1977)

Die Sequenzanalyse erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren, bei dem es durch Einbau von mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Didesoxynukleotiden (ddNTPs) zu einem Abbruch der Elongation kommt. Dadurch erhält man unterschiedlich große DNA-Fragmente, an deren letzter Stelle sich ein fluoreszierendes ddNTP befindet. Die markierten ddNTPs senden bei Bestrahlung durch einen Argon-Laser fluoreszierendes Licht aus, welches erfasst werden kann. Zur Kettenabbruchreaktion wurde das Dye Terminator Cycle Sequencing-Kit (Applied Biosystems) verwendet.

Für die Reaktion wurde ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl, welcher 200-800 µg Plasmid DNA, 10 pmol Primer und 4 µl DYEnamic<sup>™</sup> ET-Mix (dNTPS, markierte Didesoxynukleotide und Taq-DNA-Polymerase) enthält, bei folgendem Programm im Thermocycler katalysiert:

Initiale Denaturierung 95°C 1 min. Denaturierung 95°C 20 s Primerhybridisierung 55°C 30 s 25x Elongation 60°C 2 min. Auffüllreaktion 75°C 5 min. Speicher 8°C.

Nach der Sequenzreaktion wurden die Proben mit Ampuwa auf 20 µl aufgefüllt und durch den MegaBASE 1000 (Amersham) sequenziert. Die Analyse der Sequenzen erfolgte über den Vergleich mit der Referenzsequenz (www.ncbi.nlm.nih.gov).

#### 2.2.12 Histologische Arbeitsmethoden

#### 2.2.12.1 Gewebepräparation und Fixierung für die Einbettung in Paraffin

Für die histologische Betrachtung von Geweben wurden diese frisch präpariert nach kurzem Waschen in PBS für 24 h in 4% Paraformaldehyd oder Bouin'scher Lösung fixiert. Anschließend wurde das Gewebe durch Durchlaufen einer Reihe von Lösungen mit aufsteigenden Ethanolkonzentrationen (70%, 80%, 90%, 96% und 100%) jeweils eine Stunde bei RT für die Paraffineinbettung dehydriert. Zum Entfernen des Ethanols diente eine Inkubation in Isopropanol über Nacht. Nun folgten Behandlungen mit Isopropanol/Xylol im Verhältnis von 3:1, 1:1 und 1:3 für jeweils 3 h bei RT und schließlich eine Inkubation in reinem Xylol über Nacht. Nach Abgießen des Xylols wurde das Gewebe für eine weitere Nacht in Paraplast bei 60°C inkubiert. Dabei wurde das flüssige Paraplast dreimal gewechselt. Schließlich wurde das Gewebe mit geschmolzenem Paraffin übergossen und nach dem Abkühlen bei 4°C gelagert.

#### 2.2.12.2 Herstellen von Paraffinschnitten

Aus den Paraffinblöcken wurden mit einem Mikrotom Schnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt. Durch anschließendes Schwimmen auf 40 °C warmem Wasser wurde eine völlige Auseinanderfaltung der dünnen Schnitte erreicht, die dann mit Hilfe eines feinen Pinsels auf Superfrost-Objektträger aufgetragen werden konnten. Nachdem die Objekträger mit den Präparaten bei 40°C getrocknet und für 15 min. auf 60°C erwärmt worden waren, um überschüssiges Paraffin zu schmelzen, konnten sie bei RT gelagert bzw. weiterverwendet werden.

#### 2.2.12.3 Hämatoxylin & Eosin – Färbung histologischer Schnitte

Zur lichtmikroskopischen Beurteilung histologischer Schnitte wurden Paraffinschnitte des Gehirns und der Hoden mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Dafür wurden die Objektträger zunächst dreimal für je 5 min. in Xylol gewaschen, um letzte Reste an Paraffin zu entfernen. Danach folgte eine Entwässerung der Schnitte durch eine Ethanol-Reihe mit absteigenden Konzentrationen (100%, 96%, 80%, 70% und 50%, je 3 min.). Nach einminütigem Waschen in dH<sub>2</sub>O wurden die Präparate für 5 min. mit 1,6% Hämatoxylin gefärbt und überschüssige Farbe 10 min. unter fließendem Wasser abgewaschen. Je nach gewünschter Farbintensität wurde mit 70% saurem Ethanol entfärbt. Nach erneutem Waschen in dH<sub>2</sub>O wurde für 2-10 s mit Eosin (0,1% + 2% Essigsäure) gefärbt und wiederum mit dH<sub>2</sub>O gewaschen (1 min.) und in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe 50%, 70%, 80%, 90%, 96% und 100% je 3 min. entwässert. Zum Schluss konnten die Schnitte nach zweimaliger Inkubation in Xylol (je 3 min.) mit einem Tropfen Eukitt unter einem Deckgläschen fixiert werden.

#### 2.2.12.4 Präparation von Hippocampus-Zellen für Immunhistochemie

Nach dem Herauspräparieren der murinen Gehirne wurden diese in Dissektionslösung gegeben und unter zweimaligem Erneuern der Lösung die Hippocampi isoliert. Diese wurden dann in maximal 1 mm große Scheiben geschnitten und mit der Dissektionslösung in Zentrifugenröhrchen überführt bis sich ein Überstand gebildet hat. Nach dem Absetzen wurde der Überstand abgesaugt und das Gewebe zweimal in Dissektioslösung gewaschen. Es wurden 5 ml HANKS- Lösung hinzugegeben und der Ansatz für 5 min. auf Eis gekühlt. Zum Verdau wurden 6 mg Trypsin und 1,5 mg DNAse in 2 ml Digestionslösung gelöst und steril filtriert. Nach Absaugen der HANKS-Lösung wurde die vorbereitete Trypsinisierungslösung hinzugegeben und das Gemisch nach einminütiger Erwärmung mit der Hand für 4-5 min. bei Raumtemperatur stehengelassen. Das Gewebe wurde dann zweimal mit

Dissektionslösung gewaschen, und es erfolgte eine Zugabe von 2,5 ml steril filtrierter Inhibitionslösung (2,4 mg Trypsin-Inhibitor gelöst in 4 ml Dissektionslösung). Nach 5-minütiger Einwirkung wurde die Flüssigkeit abgesaugt, die restliche Inhibitionslösung hinzugegeben und weitere 5 min. inkubiert. Es folgte erneutes Waschen mit Dissektionslösung, bevor 0,5 ml Pferde-Serum gemischt mit 2,5 ml steril filtrierter Dissektionslösung hinzugegeben wurde und der Ansatz für 10 min. bei RT inkubiert wurde. Anschließend erfolgte wiederum ein zwei- bis dreimaliges Waschen in Dissektionslösung. 1 mg DNAse wurde in 2,5 ml Dissektionslösung gelöst und steril filtriert. 1 ml dieser Lösung wurde dann auf die Schnitte gegeben. Nach 5-6 maligem Trituieren mit einer Pipette wurde das Gemisch auf Eis gelagert, bis sich das Gewebe abgesetzt hatte. Nun wurde die Zellsuspension in ein frisches Falcon-Röhrchen überführt und mit der restlichen DNAse-Lösung versetzt. Mit Pasteurpipetten in absteigendem Durchmesser wurde 2-3 mal trituiert bis die Suspension homogen war. Die Suspension der ersten Trituierung wurde hinzugeben und mit Dissektionslösung auf 6 ml aufgefüllt. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 144 x g für 15 min. wurde 1 ml Dissektionslösung hinzugegeben. 50 µl Suspension wurden mit 50 µl Trypanblau gemischt. Nach 1 min. wurden noch lebende Zellen in einer Neubauerzählkammer ausgezählt. Die gewünschte Zellzahl wurde auf Kulturplatten mit Poly-D-Lysine/Laminin beschichteten Deckgläschen ausgesäht, für 30 min. auf der Sterilbank bei 37°C in 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und mit Kulturmedium A aufgefüllt. Die Zellen wurden in einem Inkubator gelagert. Am vierten Tag wurden das Medium, die Zelltrümmer sowie tote Zellen durch Waschen mit PBS entfernt und durch neues Kulturmedium B ersetzt. Dieses wurde bis zur Verwendung der Zellen alle zwei Tage wiederholt.

## 2.2.12.5 Färbung mit DAPI, Munc18-Antikörper und Beta-III-Tubulin-Antikörper

Die präparierten und kultivierten Hippocampus-Neurone wurden für die Färbung mit Fluoreszenzsantikörpern zweimal mit PBS gewaschen und bei RT für 30 min. in 4% Paraformaldehyd in PBS gewaschen. Für 10 min. wurden die Zellen dann mit 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS inkubiert und jeweils 3 x 4 min. lang mit 0,2 % Triton x-100 in PBS permeabilisiert. Primäre Antikörper gegen Munc18 und Beta-III-Tubulin wurden in einer Verdünnung von 1/100 für 1 h bei RT hinzugegeben. Anschließend folgte eine einstündige Inkubation mit Detektions-Antikörpern, welche mit Cy3 oder FITC konjugiert waren. Die Zellen wurden hinterher mit VectaShield, einem DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)-enthaltenden Medium, gefärbt, um die Zellkerne sichtbar zu machen. Die immungefärbten Zellen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (BX60, Olympus) untersucht.

#### 2.2.13 Untersuchung von Spermien - Parametern

#### 2.2.13.1 Zählen von Spermien in der Cauda epididymidis

Caudae epididymides von Mäusen wurden unter aseptischen Bedingungen herauspräpariert und in 0,4 ml *in-vitro*-Fertilisationsmedium (IVF Medium) gelagert. Durch Eröffnen der Caudae konnten die Spermien für 1 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> frei in der Lösung schwimmen. Zum Zählen wurde die Spermiensuspension 1:40 mit PBS verdünnt. 5  $\mu$ l der Suspension wurde in eine Neubauerzählkammer gegeben. Hier wurden die Spermien in 8 unabhängigen Zählkammern (jeweils 0,0025 mm<sup>2</sup>) unter dem Mikroskop BX60 mit x 200 Vergrößerung gezählt. Aus der Anzahl an Spermien pro Zählkammer wurde dann mittels folgender Formel die Gesamtmenge berechnet: Gesamtmenge = durchschnittliche Anzahl pro Zählkammer x 10 x 400 x Verdünnungsfaktor.

#### 2.2.13.2 Spermienmotilität

Die Spermienmotilität wurde mittels des Computer-assistierten-Spermien-Analyse (CASA)-Systems (CEROS version 10, Hamilton Thorne Research) untersucht. Im Einzelnen wurden die Weggeschwindigkeit (*average path velocity*, VAP), die progressive Geschwindigkeit (*straight line velocity*, VSL), Bahngeschwindigkeit (*curvilinear velocity*, VCL), die Breite des Kopfausschlages des Spermiums (*lateral amplitude of the head*, ALH), Schlagfrequenz des Spermiumschwanzes (beat cross frequency, BCF) und Geradlinigkeit (*straightness*, STR) betrachtet. Diese Parameter wurden bei Mutanten und Wildtyp-Tieren nach 1,5 h und 3,5 h verglichen.

#### 2.2.14 Methoden zur Herstellung von Knockoutmäusen

#### 2.2.14.1 Methoden für die eukaryontische Zellkultur

Embryonale Stammzellen wurden zusammen mit Mitomycin-C-behandelten embryonalen Feederzellen (EmFi) auf mit 0,2 % Gelatine beschichteten Kulturschalen ausplattiert. Täglich wurde das Kulturmedium wegen der starken Ansäuerung durch die ES-Zellen gewechselt. Alle 2-3 Tage wurde eine erneute Passagierung der Zellen durchgeführt und Zellen in Trypsin/EDTA-Puffer 1:3 bis 1:8 geteilt. Vor erneutem Ausplattieren der Zellen wurde nach Zentrifugation bei 270 x g für 5 min. bei RT die Trypsinlösung entfernt. Bei jeder Passage wurden ES-Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und als Stocks gelagert.

#### 2.2.14.2 Elektroporation und Selektion von ES-Zellen

Durch elektrischer die Einwirkung kurzer Impulse können Membranen vorrübergehend permeabilisiert werden, dabei zerstört ohne zu werden. Währenddessen kann linearisierte Plasmid-DNA eindringen. Das Konstrukt als linearisierte DNA wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit 100%-Ethanol präzipitiert und und in 70%-Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei RT unter der Sterilbank getrocknet und in 100 µl Elektroporationspuffer gelöst. ES-Zellen wurden nach Trypsinisierung in 9 ml Elektroporationspuffer gewaschen, in einer Neubauerzählkammer ausgezählt und  $7x10^6$  bis  $2x10^7$  exponentiell wachsende Zellen wurden in 700 µl Elektroporationspuffer resuspendiert, mit der DNA-Lösung zusammen in eine Küvette gegeben und mit 240 V und 500 µF bei RT elektroporiert (Gene Pulser, BIO RAD). Nach anschließender 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die ES-Zellen in 2x100 mm Kulturschalen auf embryonalen Fibroblasten ausplattiert. Nach 12 bis 16 h konnte die positive Selektion in G418 für 8-9 Tage bis zur Isolierung resistenter Klone und die negative Selektion in Gancyclovir für drei Tage begonnen werden.

#### 2.2.14.3 Isolierung und Kryokonservierung von ES-Zellklonen

Die Zellen wurden für diesen Vorgang einmal mit PBS gewaschen und mit 10 ml PBS bedeckt. Die Klone wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von den Fibroblasten abgehoben und in Trypsin-EDTA (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA) (PAN) bei 37°C in

96-Loch-Platten dissoziiert. Die Trypsinaktivität wurde durch Zugabe von 50  $\mu$ l ES-Zellmedium gestoppt. Die einzelnen Klone wurden auf 24-Loch-Platten mit Fibroblasten und ES-Zellmedium übertragen und bei 37°C gezüchtet. Nach 2-3 Tagen und Konfluenz wurden die Zellen erneut trypsinisiert. Eine Hälfte der Zellen wurde wiederum auf Fibroblasten ausplattiert, während die restlichen Zellen für die DNA-Isolierung auf einer *duplicate plate* (mit Gelatine behandelte Platte) inkubiert wurden. Erstere Zellen wurden nach dem Konfluieren für 5 min. bei 37°C mit 100  $\mu$ l Trypsin/EDTA dissoziiert und mit 100  $\mu$ l 2-x-Gefriermedium bei -80°C eingefroren. Die anderen Zellen wurden ebenfalls bis zur Konfluenz gezüchtet bevor DNA extrahiert werden konnte. Homolog rekombinante Klone wurden dann bei 37°C in 10 ml kaltes ES-Zellmedium gegeben, bei 270 x *g* für 5 min. zentrifugiert und die Zellen auf einer Fibroblastenschicht in 24-Loch-Platten kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz erfolgte eine Trypsinisierung und das Einfrieren in 3-4 Aliquots.

#### 2.2.15 Herstellung von Chimären

Für die Herstellung von Chimären wurde die Fähigkeit von Säugetier- Embryonen, fremde Zellen zu inkorperieren und sich zu Chimären zu entwickeln, genutzt. Die Isolierung von Blastozysten, die Injektion der ES-Zellen und der Retransfer in Uteri von pseudoschwangeren Mäusen wurden im Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen durchgeführt. Die ES-Zellen stammen aus Mäusen der Linie 129/SvJ, welche eine braune Fellfarbe haben (agouti-Fellmarker). Sie wurden in die Höhlen 3,5 dpc alter Blastozysten, welche aus C57Bl/6J-Weibchen (schwarze Fellfarbe) isoliert wurden, injiziert. Die Embryonen wurden dann kurz (2-3 h) zum Wiederentfalten der Blastozystenhöhle kultiviert und in die Uteri pseudoschwangerer Mäuse implantiert. Der Anteil an Körperzellen der geborenen Chimären, die das rekombinante Allel enthielten wurden anhand des Anteils an brauner Fellfarbe geschätzt.

#### 2.2.16 Software und Computer Tools

Genomische und transkriptomische Sequenzen und weitere Informationen über Transkripte und Proteine sowie verschiedene BLAST-Programme für die Analyse von Nukleotidsequenzen wurden vom *National Center for Biotechnology Information*  (NCBI) benutzt (www.ncbi.nlm.nih.gov). Informationen über Mauslinien und Phänotypen wurden von der Homepage des *Jackson Laboratory* bezogen (www.informatics.jax.org). Für statistische Auswertungen wurde Statistica-Software verwendet. Zur Messung von Neuronenfortsätzen wurde die Software von *ImageJ* verwendet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Expressionsanalyse von Brunol4

Bereits 2002 wurde das murine Gen Brunol4 (GeneID 108013) durch Meins et al. identifiziert, charakterisiert und auf Chromosom 18 lokalisiert. Brunol4 wurde der Celf-(CUG-BP and ETR-3 like factors) bzw. Brunol- (bruno like) Familie zugeordnet und ist wie die anderen Mitglieder dieser Familie nahe verwandt mit der ELAV-Familie (embryonic lethal abnormal vision). Die Datenbankrecherche (NCBI) der kürzlich aktualisierten Angaben zum Gen Brunol4 ergab eine Größe des Gens von 275 kb bei 13 Exons. Die ersten drei Introns machen mit 74 kb, 141,6 kb und 32,6 kb einen großen Teil des Gens aus. Wie die anderen Mitglieder der ELAV/Brunol-Familie bestehen die meisten Brunol4-Proteinisoformen aus drei RNA-bindenden Domänen (RBD oder RRM für RNA recognition motif) und einem Verbindungsstück (Linker, vgl. Abb.1.1). Brunol4 werden sechs Transkript-Varianten sowie sechs dazugehörige Für Proteinisoformen in NCBI und fünf in Ensembl (vgl. Tab. 3.1 und Abb. 3.1) beschrieben. Vier der Ensembl-Varianten (ENSMUST0000025117, ENSMUST0000035954, ENSMUST0000078609, ENSMUST00000115816) entsprechen jeweils einem in NCBI beschriebenen Transkript. In der 3'-UTR (Exon 13) von drei dieser vier Transkripte (Ensembl) fehlen jedoch 1,5 kb im Vergleich zu den in NCBI beschriebenen entsprechenden Transkripten. Eine weitere Transkriptvariante aus Ensembl (ENSMUST00000115815) ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Beginn des ORF (open reading frame) ist in den Transkripten jeweils das Startcodon an Position 357-359 (Exon1).

Transkript	Länge	Exons (im	Proteinisoform	Länge	Struktur (im
	( <b>bp</b> )	Vergleich zu		(aa)	Vergleich zur
		Transkript-			Isoform A)
		variante 1)			
1	4007	Evon 1 12	A	E04	
1	4007	EXUIT 1-15	Λ	304	152-215 RRM2
NM 0011462921			NP 001139764 1		420-494 RRM3
<u></u>					120 13 1 111113
2	3950	Splicingvariante	В	485	Es fehlen 20 aa
		des Exons 11			in RRM3
<u>NM_001146293.1</u>			<u>NP_001139765.1</u>		
3	2080	Splicingvarianto	C	105	Ec foblon 10 aa
5	3960	des Exons 3	C	495	zwischen
NM 001146294.1			NP 001139766.1		RRM1 und
<u></u>			<u></u>		RRM 2 sowie 5
					aa in der
					Linker-Region
4	3947	Splicingvariante	D	484	Es fehlen 20 aa
		des Exons 11			in RRM3
<u>NM_133195.3</u>			<u>NP_573458.2</u>		
5	2258	Exons 3-13	F	163	Es fehlen 13 aa
	2250	fehlen, enthält		105	in RRM1. sowie
NM 001146295.1		dafür 1,5 kb des	NP 001139767.1		RRM2, Linker-
		Introns 2			Region und
					RRM3
					komplett
6	2002	From 44 forble	Б	450	
0	3863	Exon 11 fehit	r r	456	LS TENIEN 5 aa
NM 001174074 1			NP 001167545 1		Region und 12
<u>1111_0011/40/4.1</u>			<u>111_001107545.1</u>		aa in RRM3

Tab. 3.1: Transkripte und Proteinisoformen von Brunol4

Um die Unterschiede zwischen den in der Datenbank NCBI beschriebenen Transkripten und Proteinisoformen zu verdeutlichen, sind diese hier tabellarisch aufgetragen. In der ersten bzw. vierten Spalte ist die jeweilige ID der Transkriptvariante bzw. der Proteinisoform angegeben. In der zweiten und fünften Spalte ist die Länge der Transkripte (bp für *base pairs*) bzw. die Länge des dazugehörigen Proteins (aa für *amino acids*) abzulesen. Variante 1 bzw. Isoform A stellen das längste Transkript und das längste Protein dar. Daher wurden in den Spalten drei und sechs die Unterschiede der restlichen Transkripte und Proteinisoformen im Vergleich zu Transkript 1 bzw. Isoform A beschrieben.



Abb. 3.1: Graphische Darstellung der 6 Transkriptvarianten nach NCBI

In der Abbildung ist das Gen mit den jeweils transkribierten Exons dargestellt. Die in den Transkripten variierenden Exons sind zur Unterscheidung mit kleinen Buchstaben versehen. Die Datenbank Ensembl beschreibt eine weitere Transkriptvariante (hellgrün, Brunol4-204 (ENSMUST00000115815)), welche die Exons 3 bis 13 und ebenfalls eine Splicingvariante des Exons 11 enthält. Im Exon 13 der 1670 bp langen Variante fehlen jedoch in 3'-Richtung etwa 1,5 kb im Vergleich zu den anderen Transkripten.

#### 3.2 Herstellung einer Brunol4-defizienten Maus

Bereits für eine frühere Dissertation (Dev 2006) wurde im Institut für Humangenetik ein Konstrukt zur Inaktivierung des *Brunol4*-Gens hergestellt. Der Versuch, Knockout-Mäuse für *Brunol4* herzustellen war jedoch nicht erfolgreich (vgl. 1.1). Aufgrund einer Duplikation des Gens *Brunol4* konnten in der o.g. Arbeit keine homozygoten *Brunol4*-<sup>/-</sup>-Mäuse generiert werden. Der Targeting-Vektor wurde in eine Kopie des Gens inseriert, während an anderer Stelle das Wildtyp-Gen weiterhin intakt war. Möglicherweise handelte es sich bei dieser Duplikation um eine Neumutation. Bei dem verwendeten Konstrukt handelt es sich um einen Targeting-Vektor vom Replacement-Typ. Durch solch einen Vektor können Gensequenzen durch fremde DNA-Fragmente ausgetauscht werden. Für das Konstrukt war, wie in Abbildung 3.2 dargestellt, ein 800 bp langer Abschnitt des Exons 1 und eines nachfolgenden Teils des Introns 1 durch eine GFP-Neo-Kassette ersetzt worden. Neomycin wird für die positive Selektion benötigt, während GFP als Reporter-Gen dient.



Abb. 3.2: Konstrukt für die zielgerichtete Inaktivierung des Brunol4-Gens (nach Dev 2006, S. 71)

Die Darstellung zeigt schematisch den Vorgang der homologen Rekombination für Teile von Exon 1 und Intron 1 des *Brunol4*-Gens. A zeigt das Wildtyp-Allel mit seinen 13 Exons. In B ist der Targeting-Vektor dargestellt. Unter C ist das rekombinante Allel mit dem deletierten Bereich, welcher durch eine GFP-NEO Kassette ersetzt wurde, aufgezeichnet. TK: Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase-Kassette für die negative Selektion; 5'ext: Lokalisation der 5'-externen Sonde; *AfIII*: Schnittstelle des Restriktionsenzyms. Der Verdau mit *AfIII* resultierte in einem 7,6 kb großen Fragment im Falle des Wildtyp-Allels und in einem 6 kb großen Abschnitt des rekombinanten Allels, die durch eine 5'-externe Sonde (ext) im Southern Blot detektiert werden können.

# 3.2.1 Elektroporation von ES-Zellen mit dem Targeting-Vektor Brunol4 und Selektion homolog rekombinanter Brunol4-/--ES-Zellen

Für einen weiteren Versuch, eine Brunol4<sup>-/-</sup>-Knockout-Maus herzustellen, wurde das Konstrukt im Rahmen dieser Arbeit erneut in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Linie 129/Sv transfiziert. Hierfür wurden R1-ES-Zellen (129/Sv; Nagy et al. 1993) auf einer konfluenten Lage aus kultivierten, mit Mitomycin C behandelten primären embryonalen Fibroblasten (EmFi) ausplattiert. Exponentiell wachsende ES-Zellen wurden auf einer Kulturschale (90 mm im Durchmesser) bis auf 7 x 10<sup>6</sup> Zellen kultiviert und anschließend durch Trysinisierung geerntet. Nachdem der Brunol4 Targeting-Vektor mit dem Enzym PvuI linearisiert und aufgereinigt worden war, wurden diese R1-ES-Zellen mit 50 µg der DNA elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen nach 20 minütiger Inkubation auf Eis auf einem Nährboden mit EmFi-Zellen (s.o.) ausplattiert. Die positive (durch Neomycin) und negative Selektion (durch Thymidinkinase) begann nach 12 bis 16 h. Die Neomycin-Selektion erfolgte für fünf, die negative Selektion durch Thymidinkinase für zehn Tage. Es folgte die Isolierung positiver Klone, von denen eine Hälfte bei -80°C kryokonserviert wurde. Die andere Hälfte der Zellen wurde so lange kultiviert, bis sich eine konfluente Schicht gebildet hatte, welche zur Genotypisierung verwendet wurde. Um mittels PCR zu screenen, ob die ES-Zellen das rekombinante Allel enthalten, wurden bestimmte Primer gewählt, die in Abbildung 3.3 dargestellt sind. Die isolierte genomische DNA der ES-Zell-Klone wurde für die Southern-Blot-Hybridisierung verwendet, wobei die DNA jedes einzelnen Klons mit AflII verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet wurde. Die Southern Blots wurden dann mit einer <sup>32</sup>P-markierten 5'externen Sonde (vgl. Abb. 3.2) hybridisiert. Im Falle eines rekombinanten Klons wurden ein 7,6 kb großes Wildtyp-Allel sowie ein 6 kb großes rekombinantes Allel detektiert. Unter 24 untersuchten Klonen wurden zwei homolog rekombinierte ES-Zellklone gefunden (vgl. Abb. 3.3).



Abb. 3.3: Lokalisation der Primer für die genomische PCR

Dargestellt ist der 5'-Bereich des Gens *Brunol4* mit Exon 1 und den Bindungsstellen der Primer für die genomische PCR. In rot sind die Namen der Primer angegeben. Im Falle des Wildtyp-Allels wird ein Fragment mit einer Länge von etwa 220 bp amplifiziert. Das rekombinante Allel führt zu einem etwa 400 bp langen Amplifikat (vgl. auch Abb. 3.4).



Abb. 3.4: Southern-Blot- und PCR-Analyse zur Untersuchung der ES-Zellen

A: Die Southern-Blot-Hybridisierung erfolgte mit einer 5'-externen Sonde (vgl. Abb. 3.2). Es zeigen sich die Signale eines 7,6 kb großen Wildtyp-Allels und zusätzlich ein 6 kb großes rekombinantes Allel im

Falle von heterozygoten ES-Zell-Klonen. B:Die genomische PCR mit Br4F2, Br4R2 und GFP-R3 Primer (vgl. Abb. 3.3) ergab ein 400 bp großes Fragment des rekombinanten Allels und ein 220 bp großes Amplifikat im Falle des Wildtyp-Allels.

# 3.2.2 Herstellung von chimären Mäusen durch Injektion von Brunol4<sup>+/-</sup>-ES-Zellen in Blastozysten

Um chimäre Mäuse zu generieren, wurden homolog rekombinierte ES-Zellen der Linie 8 in 3,5 dpc Blastozysten der Linie C57Bl/6J injiziert. Diese Blastozysten wurden dann die pseudoschwangerer C57Bl/6J-Weibchen in Uteri retransferiert. Die Blastozysteninjektionen wurden im Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin Göttingen durchgeführt. Es wurden anhand des agouti-Fellmarkers drei Chimären identifiziert. Diese agouti-Fellfarbe erlaubt durch ihre Repräsentation im Fell der Maus einen Rückschluss auf den Anteil an rekombinanten Zellen im Tier. Ist ein besonders hoher Anteil des Fells agouti-farben, so ist eine Transmission des rekombinanten Allels über die Keimbahn wahrscheinlich. Die 70%-, 40%- und 25%igen Chimären wurden zunächst mit C57Bl/6JWildtyp-Weibchen verpaart. Nur das 70%ige Männchen zeigte mit sechs agouti-Nachkommen von insgesamt acht Tieren Keimbahntransmission. Diese Nachkommen wurden wie in Abbildung 3.3 und Abbildung 3.4 beschrieben genotypisiert. Drei dieser Mäuse waren Brunol4<sup>+/-</sup>, während die restlichen Tiere homozygot für das Wildtyp-Allel waren.

# 3.2.3 Züchtung und Genotyp-Analysen der Nachkommen in der F1und F2-Generation

Für die Genotypisierung der Tiere der F1- und F2-Generation wurde DNA aus Schwanzbiopsien isoliert. Die PCR zur Genotypisierung erfolgte mit 200 ng genomischer DNA und wie in Abbildung 3.3 beschrieben mit *Brunol4*- und *GFP*-Kassetten-spezifischen Primern (für die Sequenzen vgl. 2.1.7.1). Je nach Genotyp wurden Fragmente unterschiedlicher Länge amplifiziert (vgl. Abb. 3.5).



Abb. 3.5: Genotypisierung der Nachkommen in der F1- und F2-Generation

Exemplarisch ist hier das Gelfoto einer gelelektrophoretischen Auftrennung von PCR-Produkte gezeigt. *Brunol4*<sup>+/+</sup>-Mäuse zeigen eine 220 bp große Bande, während in *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Tieren ein 400 bp großes Fragment amplifiziert wird. Folglich führt die PCR bei *Brunol4*<sup>+/-</sup> zu einem 400 bp großen Abschnitt des Wildtyp-Allels und dem 200 bp großen Fragment des rekombinanten Allels.

Durch Verpaarung der 70 %igen männlichen Chimäre, die das mutierte Brunol4-Gen in der Keimbahn trug, mit weiblichen Tieren der Linie C57Bl6J wurden in der F1-Hybrid-Generation heterozygote und Wildtyp-Mäuse generiert. Diese Tiere, die sowohl das Wildtyp-Allel als auch das veränderte Brunol4-Allel enthielten, wurden miteinander verpaart, um homozygote Brunol4-defiziente Mäuse zu erhalten. In der daraus resultierenden F2-Generation war jeder der drei möglichen Genotypen vertreten. Zunächst wurden die Nachkommen jeweils im Alter von etwa drei Wochen genotypisiert. In zwölf Würfen der Hybrid-Linie 129/Sv x C57Bl/6J mit insgesamt 100 Tieren betrug der Anteil an homozygoten Brunol4<sup>-/-</sup>-Tieren 6%, an heterozygoten Tieren 52 % und an Wildtyp-Tieren 42% (vgl. Tab. 3.3). Da jedoch einige Tiere vor dem Alter von drei Wochen starben und vermutet wurde, dass es sich hierbei ebenfalls um *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Tiere gehandelt haben könnte, wurden die Nachkommen bereits ab einem Alter von zwei bis drei Tagen genotypisiert. Hier zeigte sich bei 30 Würfen der Hybrid-Linie mit 221 Nachkommen eine Verteilung von etwa 1:2:1 ( $\chi^2$ -Test, p=0,79), bei 58 Wildtyp-Mäusen, 112 heterozygoten Tieren und 51 Brunol4<sup>-/-</sup>-Tieren (vgl. Tab. 3.2). Dieses entspricht dem nach den Mendelschen Regeln zu erwartenden Verhältnis. Die Wurfgröße bei heterozygoten Verpaarungen wich mit 7,5±2,29 kaum von der als Referenz benutzten Verpaarung von Chimären mit Wildtyp-Weibchen ab.

	+/+	+/-	-/-	gesamt
8	33	62	26	121
	27,3%	51,2%	21,5%	54,75%
9	25	60	25	110
	22,7%	54,5%	22,7%	45,25%

gesamt	58	112	51	221
	26,2%	50,7%	23,1%	

# Tab. 3.2: Quantitative Verteilung von Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Mäusen in derF2-Generation auf dem 129/Sv x C57Bl/6J-Hybridhintergrund (2-3 d)

Die 221 Nachkommen aus Heterozygoten-Verpaarungen wurden an Tag 2-3 nach der Geburt genotypisiert. Die durchschnittliche Wurfgröße betrug 7,5±2,29 Nachkommen (30 Würfe) im Vergleich zu 7±2,9 Nachkommen bei Verpaarungen des 70% igen Männchen mit WT-C57Bl/6J-Weibchen.

	+/+	+/-	-/-	gesamt
3	23	31	3	57
	40,4%	54,4%	5,2%	54,75%
9	19	21	3	43
	44,2%	48,8%	7%	45,25%
gesamt	42	52	6	100
	42%	52%	6%	

Tab. 3.3: Quantitative Verteilung von Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Mäusen in der F2-Generation mit 129/Sv x C57Bl/6J-Hybridhintergrund (drei Wochen)

Diese 91 Nachkommen wurden im Alter von drei Wochen genotypisiert.

Um das *Brunol4*-mutierte Allel in einen Inzucht-genetischen Hintergrund zu integrieren, wurde die 70% ige Chimäre mit einem Wildtyp-Weibchen des Stammes 129/Sv verpaart. In 9 Würfen dieser Linie mit insgesamt 49 Tieren betrug der Anteil der *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Tiere 12,2%, der der *Brunol4*<sup>+/-</sup> Tiere 55,1% und der der *Brunol4*<sup>+/+</sup>-Mäuse 32,7% (vgl. Tab. 3.5). Auch in dieser Zucht starben einige Nachkommen vor dem Alter von drei Wochen. Daraufhin wurde der Zeitpunkt der Genotypisierung auf den 2.-3. Lebenstag vorgezogen. Es zeigte sich eine Verteilung mit 11 Wildtyp-Tieren, 19 heterozygoten und 11 *Brunol4*-defizienten Mäusen ( $\chi^2$ -Test, p=0,94), wie in Tabelle 3.4 dargestellt. Mit 3,2±0,67 etwa um die Hälfte reduziert war die Anzahl der nach 2-3 Tagen gezählten Nachkommen dieses 129/Sv-Hintergrundes. Zweimal wurden die Embryonen trächtiger heterozygoter 129/Sv-Weibchen (10,5 dpc und 11,5 dpc) präpariert und genotypisiert. Die Verteilung in diesen zwei Schwangerschaften betrug 10 *Brunol4*<sup>+/+</sup>-Mäuse, 8 heterozygote und 4 *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Tiere. Um eine Aussage über eine erhöhte intrauterine Mortalität machen zu können, müssen mehr Embryonen untersucht werden.

	+/+	+/-	-/-	gesamt
ð	7	8	5	20
	35%	40%	25%	48,8%
9	4	11	6	21
	19%	52,4%	28,6%	45,25%
gesamt	11	19	11	41
	26,8%	46,4%	26,8%	

Tab. 3.4: Quantitative Verteilung von Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Mäusen in der F2-Generation mit 129/Sv-Inzuchthintergrund (2-3 d)

Die 41 Nachkommen aus Heterozygoten-Verpaarungen wurden an Tag 2-3 nach der Geburt genotypisiert. Die durchschnittliche Wurfgröße betrug 3,2±0,67 Nachkommen (9 Würfe) im Vergleich zu 6,25±3,96 Nachkommen bei Wildtyp-Verpaarungen.

	+/+	+/-	-/-	gesamt
3	9	16	2	27
	33,3%	59,3%	7,4%	54,75%
9	7	11	4	22
	31,8%	50%	18,2%	45,25%
gesamt	16	27	6	49
	32,7%	55,1%	12,2%	

Tab. 3.5: Quantitative Verteilung von Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Mäusen in derF2-Generation mit 129/Sv-Inzuchthintergrund (drei Wochen)

Die 49 Nachkommen aus Heterozygoten-Verpaarungen wurden drei Wochen nach der Geburt genotypisiert.

## 3.3 Kontrolle der Inaktivierung des Brunol4-Gens

*Brunol4* wird im murinen Gehirn exprimiert. Um zu untersuchen, ob die *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Mäuse tatsächlich kein Transkript mehr produzieren, wurden Untersuchungen mit Northern Blots und RT-PCRs durchgeführt.

## 3.3.1 Northern-Blot-Analyse

Für die Northern-Blot-Analysen wurden drei Sonden verwendet, deren Hybridisierungsstellen in Abbildung 3.6 dargestellt sind. Für die Sonden #2 und #3 (vgl. Abb. 3.6 A) wurde Gesamt-RNA aus Gehirnen von Mäusen isoliert und mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Mit speziellen Primern (vgl. 2.1.7.2) wurden dann Fragmente amplifiziert, die als Sonden dienten. Die Sonde #1 (vgl. Abb. 3.6A) wurde im Rahmen einer anderen Dissertation hergestellt (Dev 2006).



Abb. 3.6: A: Graphische Darstellung der cDNA und der Northern-Blot-Sonden mit Lokalisation der Hybridisierung; B: cDNA-Sonden

A: Die Sonde #1 ist ca. 480 bp lang und hybridisiert an Exon 13. Sonde #2 ist ca. 1kb groß und hybridisiert an Exon 12 und Exon 13; Sonde #3 ist ca. 760 bp lang und hybridisiert an Exon 1.

B: Aufgetragen ist der Längenstandard (kb) und jeweils 3 µl der aufgereinigten Sonden für Exon 1 und für Exon 12/13. Die Sonden wurden mittels PCR amplifiziert. Die Sonde #1 (vgl. A) wurde im Rahmen einer früheren Arbeit hergestellt (Dev 2006).

Gesamt-RNA wurde aus Gehirnen von *Brunol4*<sup>+/+</sup>-, *Brunol4*<sup>+/-</sup>-, und *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Mäusen des C57Bl/6J x 129/Sv-Hintergrundes sowie aus der Niere von Wildtyp-Geschwistern isoliert und nach elektrophoretischer Auftrennung zu je 20 µg auf eine Membran geblottet. Zunächst wurde die RNA mit der Sonde #1 hybridisiert, die komplementär zu einem Bereich des Exons 13 ist (vgl. Abb. 3.6). 4 kb und 2,8 kb Transkripte konnten detektiert werden. Verglichen mit den Daten aus NCBI und Ensembl handelt es sich um die Varianten 1-4 und 6. Bei dem 2,8 kb großen Produkt könnte es sich um eine weitere Splicingvariante handeln. Es zeigten sich deutliche Banden bei allen drei Tieren, auch im Gehirn der homozygoten Maus lassen sich Produkte nachweisen, das längere Produkt scheint jedoch im Vergleich zum Wildtyp etwas kürzer (ca. 3,9 kb).



Abb. 3.7: Northern-Blot-Analyse mit Sonde #1

Bei Hybridisierung mit einer 3'-Sonde (A, #1, vgl. Abb. 3.6) werden Transkripte sowohl bei Wildtyptieren als auch bei heterozygoten und *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Mäusen detektiert. Nachhybridisierung mit  $\beta$ -Actin zeigt, dass der RNA-Gehalt der *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Probe höher ist, als die der anderen Proben, was den höheren Gehalt des 2,8-kb-Produkts erklärt. Um zu zeigen, dass die Sonde nicht unspezifisch bindet, wurde ein Northern Blot mit RNA aus verschiedenen Wildtyp- Geweben hybridisiert (B).

Eine Hybridisierung von Wildtyp-RNA verschiedener Gewebe (Großhirn, Kleinhirn, Niere, Testis) zeigte keine unspezifische Hybridisierung mit RNA dieser Gewebe (Abb. 3.7). Auch die Hybridisierung mit einer anderen Sonde, die Exon 12 und Exon 13 überspannt, hybridisierte an ein Produkt in RNA aus dem Gehirn von Mäusen, die

homozygot für das rekombinante Allel sind, wie in den Abbildungen 3.8 und 3.9 gezeigt ist.



Abb. 3.8: Hybridisierung mit Sonde #2

Die Sonde, die Exon 12 und Exon 13 überspannt (#2), bindet an Transkripte sowohl bei WT-Mäusen als auch bei *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Tieren verschiedenen Alters. Nachhybridisierung mit  $\beta$ -Actin weist auf einen verminderten RNA-Gehalt in der *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Probe hin, was mit der Signalstärke beider Hybridisierung mit Sonde #2 korreliert.



Abb. 3.9: Northern-Blot-Hybridisierung mit Sonde #2

Die Hybridisierung der RNA verschiedener *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Tiere sowie einer Wildtyp-Maus zeigt Transkripte bei allen Genotypen. Zum Vergleich wurde Gesamt-RNA einer *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Maus der Linie 129/Sv mit geblottet und hybridisiert. Auch hier zeigt sich ein Transkript. Das schwache Signal der *Brunol4*<sup>-/-</sup>-RNA Hybrid 50d korreliert mit einer schwachen Qualität der RNA, wie die Nachhybridisierung mit  $\beta$ -Actin zeigt.

Bei Hybridisierung mit einer 5'-Sonde, die komplementär zu Exon 1 ist, ließ sich dagegen kein Transkript in *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Mäusen nachweisen.



Abb. 3.10: Hybridisierung mit Sonde #3

*Brunol4*<sup>-/-</sup>-Tiere zeigen kein Transkript, das durch eine Sonde, die dem Exon 1 entspricht (#3), hybridisiert werden kann. Die kräftigen Signale durch die Nachhybridisierung mit  $\beta$ -Actin lassen auf eine gute und gleichmäßige Qualität und Quantität aller vier RNA-Proben schließen.

#### 3.3.2 RT-PCR-Analyse

Um zu untersuchen, welche Bereiche des Gens in *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Tieren transkribiert werden, wurde Gesamt-RNA aus dem Gehirn von Mäusen der Linie C57Bl/6J in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR amplifiziert. Die Auswahl der Primer erfolgte anhand der *Brunol4*-cDNA-Sequenz (NM\_133195.2). Da Northern-Blot-Analysen ein 4 kb langes Transkript ergaben, wurde vermutet, dass es in 3'-Richtung des zum Zeitpunkt der Versuche aktuellen Exon 13 (o.g. cDNA) eine weitere Poly-A-Sequenz gibt und der Bereich downstream des Gens (GeneID: 108013) transkribiert wird. Daher

wurde der Primer #10 so gewählt, dass er downstream von Exon 13 bindet. Als *template* wurde die nachfolgende genomische Sequenz gewählt (vgl. Abb. 3.11).



Abb. 3.11: Darstellung der Primerbindungsstellen für die RT- PCR

Für die RT-PCR wurden diverse Primerkombinationen benutzt. Dargestellt ist schematisch die *Brunol4*cDNA (NM\_133195.2), mit um 1,5 kb genomischer Sequenz am 3'-Ende verlängertem Exon 13 (schraffierter Teil), sowie die Bindungsstellen der Primer und die deletierte Region. Den mit Nummern versehenen Primern werden in Tabelle 3.6 Namen zugeordnet (vgl. 2.1.7.3 für Sequenzen).

#1	Brl4NorthF4
#2	Brl4NorthR4
#3	Brl4184-DelF4
#4	Brl4Exon2R4
#5	Brl4Exon2F4
#6	Brl4Exon4R4
#7	Brl4qPCRF4
#8	Brl4qPCRR4
#9	Similarexon12F
#10	Similarexon13R

Tab. 3.6: Zuordnung der Nummern zu den jeweiligen Namen der Primer

Ein Produkt in *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Tieren konnte in den Kombinationen Primer #5 und #6, #7 und #8 sowie #9 und #10 detektiert werden (vgl. Abb. 3.12F, 3.12E, 3.12D). Kein Produkt wurde dagegen bei Amplifikation mit den Primern #1 und #2, #1 und #4 sowie #3 und #4 nachgewiesen (vgl. Abb. 3.12C, 3.12A, und3.12B). Die Untersuchungen lassen Rückschlüsse auf die *Brunol4*-Transkripte zu. So lässt sich zum einen zeigen, dass der 5'-Bereich der cDNA (NM\_133195.2), welcher 175 Basen mehr in 5'-Richtung enthält als die 6 Varianten nach NCBI, ebenfalls transkribiert wird, da die PCR mit den Primern #1 und #2 sowie #4 in Wildtyp und heterozygoten Tieren zu Produkten führen. Des Weiteren lässt sich zeigen, dass kein Transkript detektiert werden kann, das Exon 1 enthält, was zum Ergebnis der Northern-Blot-Analyse passt. Es liegen jedoch in *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Tieren Transkripte vor. RT-PCR-Analysen für Bereiche *downstream* von Exon 1 ergaben Produkte, deren Länge der PRIMERblast Ergebnisse (NCBIblast) entsprechen.



54



Abb. 3.12: Die RT-PCR mit cDNA aus Gehirnen von Wildtyptieren und *Brunol4<sup>+/-</sup>* sowie *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Mäusen

A: RT-PCR mit den Primern #1 (Exon1, cDNA NM\_133195.2) und #4 (Exon2) ergab kein Produkt bei *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Tieren. B: Auch bei der RT-PCR mit den Primern #3 (Exon1) und #4 (Exon2) entstand bei *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Tieren kein Produkt. Zwei Banden zeigen sich jedoch bei Wildtyp und heterozygoter Maus. C: bei Verwendung von Primer #1 und #2 (beide Exon 1) erhielt man ebenfalls kein RT-PCR-Produkt bei *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Mäusen. D: RT-PCR mit den Primern #9 und #10 (Exon 12 und Exon 13) ergab ein Produkt bei *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Tieren. E: Für diese PCR wurden Primer # 7 und #8 benutzt (Exon 9 und Exon11). Dieser Abschnitt des Gens wird auch in *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Mäusen transkribiert. F: Diese Abbildung zeigt das Ergebnis einer PCR mit den Primern #5 und #6 (Exon 2 und Exon4). In *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Mäusen lässt sich hier ein Produkt detektieren. Die Gütekontrolle der cDNA wurde durch Amplifikation der cDNA des *housekeeping-*Gens *HPRT* durchgeführt.

#### 3.4 Phänotyp-Analyse

#### 3.4.1 Überlebenszeit der Brunol4 -/- - Tiere

Es wurde beobachtet, dass Tiere, die für das *Brunol4*-Knockout-Allel homozygot waren, eine deutlich verkürzte Lebenszeit haben, so dass, wie oben beschrieben, die Genotypisierungen auf den 2.-3. Lebenstag vorgezogen wurden. Von 35 *Brunol4*-defizienten Mäusen und 40 Mäusen mit heterozygotem Genotyp der Hybrid-Linie 129/Sv x C57Bl/6J sowie von 17 *Brunol4*-/--Tieren und 20 heterozygoten Mäusen der Inzucht-Linie 129/Sv wurde das Überleben dokumentiert und in Form von Kaplan-Meier-Kurven (vgl. Abb. 3.13 und Abb. 3.14) aufgetragen. Hier wird jeweils der prozentuale Anteil der überlebenden Mäuse in einem Zeitraum von 50 Tagen angegeben.



Abb. 3.13: Kaplan-Meier-Kurve, Hybridhintergrund

Aufgetragen ist das Überleben von homozygoten *Brunol4*-defizienten Mäusen und heterozygoten Geschwistern mit Hybrid-Hintergrund. Im Vergleich zu heterozygoten Geschwistern, die nach 50 Tagen noch zu 85% leben, liegt das mediane Überleben bei *Brunol4*-<sup>/-</sup>-Tieren bei 20 Tagen.





Auch in der Linie 129/Sv liegt die 50% Perzentile für das Überleben der *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Tiere mit 11 Tagen deutlich niedriger als bei heterozygoten Geschwistertieren, von denen nach 50 Tagen noch 80% lebten. Die beobachteten Nachkommen der Linie 129/Sv starben zu 40% bereits in den ersten 4 Tagen.

# 3.4.2 Vergleich der Körpergewichte von Brunol4-defizienten Mäusen und Geschwistertieren

Unter den Würfen der Heterozygotenverpaarungen fiel auf, dass einige Nachkommen sowohl der 129/Sv-Linie als auch der Hybrid-Linie 129/Sv x C57Bl/6J eine Wachstumsretardierung zeigten (Abb. 3.15). Die Genotypisierung der Tiere zeigte, dass es sich bei diesen Mäusen um homozygote *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Tiere handelte.



Abb. 3.15: Unterschiedliche Größe von Brunol4<sup>-/-</sup>-Mäusen und WT-Geschwistern

A: Weibchen (129/Sv) im Alter von 28 Tagen zeigen deutliche Größenunterschiede. (Wildtyp-Weibchen: 16,36g; *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Weibchen 8,1g); B: Auch *Brunol4*-Weibchen (129/Sv) im Alter von 12 Tagen zeigen bereits deutliche Größenunterschiede. (Wildtyp-Weibchen: 9.42g *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Weibchen 3,1g); C: Hier abgebildet sind *129/Sv x* C57BL/6J-Männchen im Alter von 17 Tagen. Die unterschiedliche Größe ist deutlich sichtbar. (Wildtyp-Männchen: 10,18g; *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Männchen 4,16g).

Über einen Zeitraum von mehreren Monaten wurden daher 129/Sv x C57Bl/6J-Mäuse unterschiedlichen Genotyps gewogen. Hierbei wurden je Geschlecht im Mittel 6-10 Wildtyptiere und heterozygote Mäuse sowie je nach Alter 1-9 homozygote *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Mäuse gewogen. In höherem Alter standen aufgrund des reduzierten Überlebens weniger *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Tiere zur Verfügung. Ab einem Alter von wenigen Tagen bis zu einer Woche waren in unterschiedlichem Ausmaß Gewichtsunterschiede zwischen *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Tieren und ihren Geschwistern erkennbar. Die *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten eine generelle Entwicklungsverzögerung und hatten ein deutlich geringeres Gewicht als ihre Geschwister (vgl. Abb. 3.16 und 3.17. So waren homozygote weibliche Tiere bis zum Alter von 15 Tagen signifikant leichter als Wildtyp-Geschwister (p < 0,05 für 3 und 9 Tage und p < 0,001 für 15 Tage), ebenso im Alter von 27 (p < 0,05) und 42 (p < 0,01) Tagen. Die gemessenen Gewichte an den Tagen 21, 37 und 65 unterschieden sich nicht signifikant. Im Vergleich zu heterozygoten Tieren bestand eine Signifikanz in jedem gemessenen Alter (p < 0,01 im Alter von 9, 42 und 56 Tagen, p < 0,05 im Alter von 27 und 37 Tagen), außer an den Tagen 3 und 21. Nicht messbar aufgrund von zu wenigen Mäusen war die Signifikanz im Alter von 75 Tagen. Im Alter von 27 Tagen bis 65 Tagen waren heterozygote Weibchen signifikant schwerer als Mäuse mit Wildtyp-Allel (p < 0,05). Männliche homozygote Mäuse waren in jedem gemessenen Alter signifikant leichter als ihre Wildtyp-Geschwister (p < 0,001 im Alter von 9, 15, 65 und 75 Tagen, p< 0,01 im Alter von 3 Tagen und p < 0,05 für die restlichen Altersstufen) und immer signifikant leichter als heterozygote Mäuse (p < 0,001 im Alter von 3, 9 und 15 Tagen und p < 0,01 im Alter von 21, 37, 42, 65 und 75 Tagen). Wildtyp-Männchen unterschieden sich in ihrem Gewicht nicht signifikant von heterozygoten Männchen.



Abb. 3.16: Gewichte, Hybridhintergrund, Weibchen

Im Alter von 2, 9, 15, 21, 27, 37, 42, 65, 75 und 100 Tagen wurden je 3-12 homozygot defiziente Weibchen (grün) sowie Heterozygote (violett) und Wildtypen (blau) gewogen und miteinander verglichen. Aufgetragen sind die Gewichtsverläufe.



Abb. 3.17: Gewichte, Hybridhintergrund, Männchen

Aufgetragen sind die Gewichtsverläufe von je 3-12 männlichen C57Bl/6J-Mäusen für Wildtyp (blau), heterozygote (violett) und defiziente Mäuse (grün).

#### 3.4.3 Auftreten von Krampfanfällen bei adulten Brunol4<sup>-/-</sup> - Tieren

Bei etwa 75% der Brunol4<sup>-/-</sup>-Tiere fiel während der ersten zwei Lebenswochen ein starkes Zittern auf. Auch wurden bei einzelnen Tieren zeitweise krampfartige Bewegungen des Schwanzes mit Ausstrecken und Heben beobachtet. Fünf Brunol4<sup>-/-</sup> Mäuse der Hybrid-Linie 129/Sv x C57Bl/6J (drei Männchen und zwei Weibchen) erreichten das adulte Alter. Bei vier von ihnen (2 Männchen, 2 Weibchen) wurden ab einem Alter von 3 Monaten je bis zu dreimal Krampfanfälle beobachtet. Diese ereigneten sich jeweils beim Umsetzen und äußerten sich in Sprüngen, Fallen und Strecken der hinteren Extremitäten. Die zwei Männchen und ein Weibchen waren Geschwister. Die Anfälle bei diesem Weibchen wurden mit 91 und 98 Tagen beobachtet. Die Männchen krampften jeweils mit 98, 100 und 105 Tagen. Das Weibchen starb nach 126 Tagen, die Männchen nach 119 bzw. 126 Tagen. Das Weibchen wurde bereits im Alter von 50 Tagen mit einem der Männchen verpaart. Aus dieser Verpaarung entstanden jedoch auch nach 76 Tagen keine Nachkommen. Ein weiteres Brunol4<sup>-/-</sup>-Weibchen wurde im Alter von 129, 130 und 141 Tagen bei Krämpfen beobachtet. Danach wurden keine Anfälle mehr erfasst. Nachdem bei einer Brunol4<sup>-/-</sup> x Brunol4<sup>-/-</sup> -Verpaarung unter Geschwistern keine Nachkommen gezeugt worden waren, wurde das zuletzt genannte Brunol4<sup>-/-</sup>-Weibchen mit einem Brunol4<sup>+/+</sup>-

Männchen verpaart. Ein *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Männchen, bei welchem keine Krämpfe beobachtet wurden, wurde mit einem *Brunol4*<sup>+/+</sup>-Weibchen verpaart. In der erstgenannten Verpaarung wurden viermal je 2-3 Nachkommen geboren, welche jedoch nach Geburt von den Eltern aufgefressen worden sind. Aus der Verpaarung des *Brunol4*-defizienten Männchens gingen keine Nachkommen hervor. Auch zeigte sich bei dem Weibchen kein Vaginalpfropf. Dieses Männchen starb im Alter von 10 Monaten. Bei über 80 *Brunol4*<sup>+/-</sup>-Tieren, die länger als 3 Monate, und über 50 Mäusen, die länger als 6 Monate und zum Teil bis zu 1,5 Jahre beobachtet wurden, zeigte lediglich ein Männchen einen einzelnen Krampfanfall im Alter von 10 Monaten.

#### 3.5 Morphologische Untersuchungen des Gehirns

#### 3.5.1 Histologie des Gehirns bei Brunol4-defizienten Mäusen

Da *Brunol4* im Gehirn und v.a. im Hippocampus exprimiert wird (Yang et al. 2007) und die veränderte Expression einen ausgeprägten Phänotyp zur Folge hat (s.o.), wurden die Gehirne von *Brunol4*-defizienten Mäusen auf morphologische Besonderheiten untersucht. Dazu wurden von Gehirnen von 6 und 50 Tage alten Mäusen (je *Brunol4<sup>-/-</sup>* und Wildtyp-Kontrolle) HE-gefärbte Koronar- bzw. Saggitalschnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden mit Hilfe der Abteilung Neuroanatomie des Zentrums für Anatomie in Göttingen beurteilt. Es konnten keine deutlichen Unterschiede der Hippocampus-Struktur zwischen Wildtyp und defizienter Maus festgestellt werden (vgl. Abb 3.19, 3.20 und 3.21). Die Unterschiede in der Purkinjezellschicht der Kleinhirnringe können mit der Fixierung bzw. der Färbung zusammenhängen.



Abb. 3.18: Histologischer Vergleich der Hippocampus-Region von Wildtyp und *Brunol4*-defizienter Maus

Es wurden keine Unterschiede zwischen 50 Tage alten *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Mäusen (A) und Wildtyp-Kontrollen (B) bei der histologischen Untersuchung des Hippocampus gefunden. GD: Gyrus dentatus CA1 und CA3: entsprechende Regionen des Cornu ammonis, HE x4



Abb. 3.19: Histologischer Vergleich der Kleinhirnrinde und der Frontalhirnrinde von Wildtyp und Brunol4-defizienter Maus

Es wurden 2 *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Tiere im Alter von 6 Tagen und 50 Tagen zusammen mit *Brunol4<sup>+/+</sup>*-Geschwistern auf Anomalien des Gehirns untersucht. *Brunol4<sup>-/-</sup>*(a) und *Brunol4<sup>+/+</sup>* (b) Kleinhirnrinde und Mark, 50 d; *Brunol4<sup>-/-</sup>* (c) und *Brunol4<sup>+/+</sup>* (d), Frontalhirnrinde, 50 d alt. WS (weiße Substanz), MS (Molekularschicht), P (Purkinjezellschicht), KS (Körnerzellschicht), C (Cortex), HE x10 (Cerebellum), x4 (Cortex)



Abb. 3.20: Histologischer Vergleich der Großhirnrinde und der Pyramidenzellen von Wildtyp und Brunol4-defizienter Maus

50 d alte Mäuse a) *Brunol4<sup>-/-</sup>* und b) *Brunol4<sup>+/+</sup>* und Großhirnrinde (C, Cortex), HE x4c) und d) Pyramidenzellen (P) der Großhirnrinde, HE x100

# 3.5.2 Untersuchungen auf Unterschiede in der Verteilung und Expression von munc-18 und beta-Tubulin sowie in der Länge der Neuronenfortsätze bei Brunol4-/--Mäusen

Im Zusammenhang mit dem Auftreten des Ohtahara-Syndroms (frühkindliche epileptische Enzephalopathie) sind missense Mutationen des Proteins munc-18 (auch synaptic binding protein 1, STXBP1) beschrieben worden (Saitsu et al. 2008), welches zum synaptischen Fusionskomplex gehört. Eine erniedrigte Abbaurate von munc-18, d.h. eine Stabilisierung, könnte mit einer höheren Sekretionsrate an der Synapse einhergehen. Auch Hoch- bzw. Herunterregulation von beta-Tubulinen korreliert mit dem Auftreten von Epilepsie (Guo und Kuang 1993; Yang et al. 2007). *Brunol4* wird im Hippocampus stark exprimiert und aufgrund seiner Funktion als RNA-Bindungsprotein

wird vermutet, dass Brunol4 eine Rolle beim Abbau von RNA spielt. Ob die Funktionsminderung oder -änderung von Brunol4 zu einer Herunter- oder Heraufregulation munc-18 oder beta-Tubulin führt. wurde von mittels Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen munc-18-1 und beta-Tubulin untersucht. Bei beta-III-Tubulin handelt es sich um eine neuronspezifische beta-Tubulin-Isoform. beta-Tubuline bilden zusammen mit alpha-Tubulinen als Dimere die Grundstruktur für Mikrotubuli. Mikrotubuli sind röhrenförmige Proteinfilamente, die einen Bestandteil des Zytoskeletts darstellen. Für die Untersuchungen wurden Hippocampi von fünf Tage alten Mäusen (Brunol4<sup>-/-</sup> des Hybridhintergrunds und Kontrolle) präpariert und trypsinisiert. Hippokampale Nervenzellen wurden isoliert, angezüchtet und mit Antikörpern gegen munc-18-1 und beta-III-Tubulin, markiert. Es wurden keine Intensitätsunterschiede beim Vergleich von Wildtyp-Neuronen mit Nervenzellen von Brunol4<sup>-/-</sup>-Tieren festgestellt (vgl. Abb. 3.21).



Abb. 3.21: Immunfluoreszenzfärbung von hippokampalen Neuronen von Wildtyp und *Brunol4*defizienter Maus

Immunfluoreszenzfärbung hippokampaler Neurone von Wildtyp (+/+) und Knockout-Maus (-/-) mit Antikörper gegen beta-III-Tubulin (grün) und munc18 (rot), sowie Überlagerung von beiden mit DAPI (blau), FM, x200

Auch konnten keine Unterschiede der neuronalen Zellen bezüglich Expression von beta-III-Tubulin und munc-18-1 zwischen Wildtyp und Brunol4-defizienter Maus detektiert werden. Um herauszufinden, ob die Fortsätze der neuronalen Zellen sich in der Länge von denen des Wildtyps unterscheiden, wurden Fortsätze von je 15 Neuronen mit dem Programm *imageJ* (NIH, USA) gemessen. Es zeigten sich keine signifikanten
Unterschiede zwischen *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Tieren und Wildtyp (Abb. 3.22). In beiden Fällen zeigte sich eine mittlere Länge von 500 μm.



Längen von Fortsätzen hippocampaler Neurone

Abb. 3.22: Auftragung der Verteilung der Fortsatzlängen einer *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Maus und einer Wildtyp-Kontrolle

Mit *imageJ* wurden die Fortsätze von 15 Neuronen einer 5 Tage alten *Brunol4* -/--Maus gemessen und mit denen einer gleichaltrigen Wildtyp-Kontrolle verglichen.

## 3.6 Generierung und Untersuchung von Brunol1/Brunol4-Doppelt-Knockout-Mäusen

#### 3.6.1 Generierung und Genotypisierung

Das murine *Brunol1*-Gen, welches im Gehirn und im Testis exprimiert wird, spielt eine Rolle in der Spermatogenese (Dev et al. 2007). Analysen der *Brunol1*-Knockout-Mäuse zeigten eine signifikante Reduktion der Spermienzahl. Allerdings waren die männlichen *Brunol1*-<sup>/-</sup>-Mäuse fertil. Brunol1 und Brunol4 gehören als RNA-Bindungsproteine beide einer Subfamilie der elav-Familie an. Um zu untersuchen, welchen Effekt das kombinierte Ausschalten der Gene *Brunol1* und *Brunol4* hat, wurden Mäuse gezüchtet, die sowohl das rekombinante *Brunol4*-Allel als auch ein Nullallel des *Brunol1*-Gens enthalten. Hierfür wurden *Brunol1*-defiziente Mäuse der Linie 129/Sv (Dev et al. 2007) mit heterozygoten *Brunol4*<sup>+/-</sup>-Tieren des Inzuchthintergrunds 129/Sv verpaart. Die Verpaarungen der *Brunol1*<sup>-/-</sup>-Tiere mit den *Brunol4*<sup>+/-</sup>-Mäusen zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Verpaarungen keine Reduktion in der Nachkommenzahl bei durchschnittlichen Wurfzahlen von 5,8±2 bei 10 beobachteten Würfen. Daraus hervorgegangene doppelt heterozygote Tiere (*Brunol1*<sup>+/-</sup>/*Brunol4*<sup>+/-</sup>) wurden dann miteinander verpaart, um für das jeweilige ausgeschaltete Allel in der F2-Generation doppelt homozygote Mäuse, d.h. Mäuse, die sowohl für *Brunol1* als auch für *Brunol4* defizient sind, zu generieren. Dafür wurden alle Nachkommen ca. drei Tage nach der Geburt genotypisiert.

Brunol1//Brunol4	+/+ //+/+	-/- //+/+	+/+ //-/-	-/- //-/-	gesamt
	+/- <b>//</b> +/+	-/- //+/-	+/- //-/-		
	+/+ <b>//</b> +/-				
	+/- <b>//</b> +/-				
ð	35	11	7	3	56
	62,5 %	19,6 %	12,5 %	5,4 %	
9	42	7	6	1	56
	75 %	12,5 %	10,7%	1,7%	
gesamt	77	18	13	4	112
	68,7%	16,1 %	11,6 %	3,6 %	

Tab. 3.7: Quantitative Verteilung verschiedener Genotypen von Mäusen der F2-Generation mit129/Sv-Inzuchthintergrund (2-3 d alt)

Die 112 Nachkommen (F2-Generation) der doppelt heterozygoten Mäuse der Linie 129/Sv wurden spätestens am dritten Lebenstag nach Geburt genotypisiert.

Tabelle 3.7 zeigt die Nachkommenstatistik. Insgesamt wurden 112 Mäuse spätestens am dritten Lebenstag genotypisiert. Der nach Mendelscher Verteilung erwartete Wert für *Brunol1<sup>-/-</sup>/Brunol4<sup>-/-</sup>*-Tiere liegt mit 8,75% ( $^{1}/_{16}$ ) über dem beobachteten Anteil von 3,6%. Die Verteilung von heterozygoten oder Wildtyp-Tieren (1. Spalte) zu Tieren, die homozygot für *Brunol1, Brunol4* oder beide Gene sind, zeigt ein Verhältnis von ca. 19,25 : 4,5 : 3,5 : 1 (bei männlichen Tieren 11,6 : 3,6 : 2,3 : 1 und bei Weibchen 42 : 7 : 6 : 1) im Vergleich zu einem erwarteten Verhältnis von 9 : 3 : 3 : 1. Die Verteilung der

Männchen weicht nicht signifikant von den Erwartungswerten ab ( $\chi 2$ -Test, p=0,729). Die Verteilung der Weibchen unterscheidet sich jedoch signifikant von den erwarteten Werten ( $\chi 2$ -Test, p<0,05). Die durchschnittliche Wurfgröße ist mit fünf Nachkommen bei 26 Würfen nur geringfügig niedriger verglichen mit 5,28 Nachkommen in zehn Wildtyp-Verpaarungen. Alle geborenen acht Mäuse mit *Brunol1<sup>+/-</sup>/Brunol4<sup>-/-</sup>*-Genotyp sind innerhalb einer Woche gestorben. Von 18 Mäusen mit *Brunol1<sup>-/-</sup>/Brunol4<sup>+/-</sup>*-Genotyp ist ein Tier im Alter von drei Tagen gestorben. Die restlichen Tiere lebten länger als drei Monate und Männchen wie Weibchen waren fertil. Drei doppelt heterozygote Tiere sind im Alter von zwei (gesamter Wurf verstoßen), fünf und 25 Tagen verstorben, dagegen überlebten 20 beobachtete Tiere länger als drei Monate. Vier Mäuse mit *Brunol1<sup>-/-</sup>/Brunol4<sup>-/-</sup>*-Genotyp sind nach max. zwei Tagen gestorben. Bei anderen Verpaarungen (Brunol1<sup>-/-</sup>/Brunol4<sup>+/-</sup> als Eltern) sind bisher keine *Brunol1<sup>-/-</sup>/Brunol4<sup>-/-</sup>*-

## 3.6.2 Untersuchungen der Testes und Spermien einer Brunol1+/-/Brunol4+/--Maus

Sechs Verpaarungen doppelt heterozygoter Mäuse wurden über einen längeren Zeitraum beobachtet. Alle bis auf eine Verpaarung waren fertil. *Brunol1* wird in der Maus im Gehirn und in den Testes exprimiert und spielt eine Rolle in der Spermatogenese, *Brunol1*-defiziente Mäuse zeigen jedoch keine verminderte Fertilität (Dev 2006). Die o.g. verpaarten Mäuse sind nicht nur heterozygot für *Brunol1* sondern auch für *Brunol4*. Möglicherweise können Störungen vorliegen, die in *Brunol1*<sup>+/-</sup>Mäusen durch *Brunol4* kompensiert worden sein könnten. Um zu untersuchen, ob morphologische Auffälligkeiten der Testes oder funktionelle Auffälligkeiten der Spermien bestanden, wurde das 8,5 Monate alte *Brunol1*<sup>+/-</sup>/*Brunol4*<sup>+/-</sup>-Männchen untersucht (vgl. 3.6.2.1 - 3.6.2.4). Bei der Präparation fiel auf, dass einer der zwei Hoden sehr klein war. Von dieser Maus wurden Hoden und Nebenhoden histologisch bzw. funktionell untersucht. Makroskopisch gab es keine Veränderungen der herauspräparierten Testes.

#### 3.6.2.1 Histologie der Testes

Die Testes der *Brunol1<sup>+/-</sup>/Brunol4<sup>+/-</sup>*-Maus (8,5 Monate) mit dem kleinen Hoden und einer Wildtyp-Kontrolle wurden fixiert und zur Untersuchung an Herrn Prof. Meinhardt (Zentrum für Anatomie, Justus-Liebig-Universität Gießen) geschickt. Der normal große Hoden der doppelt heterozygoten Maus unterschied sich nicht von WT-Hoden und war morphologisch unauffällig. Der kleinere Hoden bot ein histologisch stark verändertes Bild (vgl. Abb. 3.23). Lediglich am Rand lagen einige wenige Tubuli seminiferi, die in sehr wenigen Fällen noch weitgehend normale Spermatogenese zeigten, häufiger jedoch Spermatogenese in Regression. Die Tubuli machten jedoch nur etwa 5% des Anschnittes aus (vgl. Abb. 3.23). Der größte Teil des Anschnittes (>90-95%) war fibrosiert und/oder von großen Zysten durchzogen, die ein proteinreiches Exsudat enthielten. Spermatogenese oder auch nur die Trennung von Keimepithel zum Interstitium war nicht mehr zu erkennen. Das Organ wurde von dichten bindegewebsartigen Zügen durchzogen, in denen sich umkapselte Zysten befanden. Zudem war eine Ödembildung erkennbar.





Abb. 3.23: Histologische Untersuchung eines Testis

Deutlich auffälliger Testis der infertilen *Brunol1*<sup>+/-</sup>*Brunol4*<sup>+/-</sup>-Maus (A,B,C) im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (D). In A sind vereinzelte Tubuli seminiferi (schwarzer Pfeil) sowie fibrosierte Tubuli seminiferi (blauer Pfeil) umgeben von Bindegewebe zu sehen. In B zeigen sich neben randständigen Tubuli seminiferi (grüner Pfeil) Zysten. In C sind normale Tubuli seminiferi zu sehen (roter Pfeil). HE, x5 bzw. x10 (Bilder: Prof. Meinhardt, Gießen)

#### 3.6.2.2 Morphologische Untersuchung der Spermien nach DAPI-Färbung

Zum Zweck der morphologischen Untersuchung der Spermien des 8,5 Monate alten *Brunol1*<sup>+/-</sup>/*Brunol4*<sup>+/-</sup>-Männchens und einer Wildtyp-Kontrolle wurden je 20 µl Zellsuspension aus der Cauda epididymidis auf Objektträger gegeben, in Formaldehyd fixiert und mit DAPI-enthaltendem Medium bedeckt. Die Präparate wurden dann unter einem Fluoreszenz-Mikroskop BX 60 (Olympus) begutachtet (vgl. Abb. 3.24).



Abb. 3.24: Spermienköpfe einer 8,5 Monate alten *Brunol1<sup>+/-</sup>/Brunol4<sup>+/-</sup>*-Maus (A) und einer gleichaltrigen Wildtyp-Kontrolle (B)

Die Spermien der *Brunol1<sup>+/-</sup>/Brunol4<sup>+/-</sup>*-Maus unterscheiden sich morphologisch nicht von denen des Wildtyps. DAPI, FM, x100

#### 3.6.2.3 Spermienzählung:

Von dem 8,5 Monate alten *Brunol1*<sup>+/-</sup>/*Brunol4*<sup>+/-</sup>-Männchen und einer Wildtyp-Kontrolle wurden Spermien aus dem Nebenhoden in IVF-Medium resuspendiert und für 15 min. bei 37°C inkubiert. In einer Neubauerzählkammer wurde die Spermienzahl bestimmt. Es wurden 24 x  $10^5$ /ml Spermien der 8,5 Monate alten *Brunol1*<sup>+/-</sup> *Brunol4*<sup>+/-</sup> Maus gezählt, eine im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle mit 14,2 x  $10^5$ /ml deutlich reduzierte Anzahl. Für eine statistische Auswertung müssten mehrere Mäuse untersucht werden.

#### 3.6.2.4 Analyse der Motilität der Brunol1+/-/Brunol4+/--Mäuse

Es wurde die Spermienmotilität nach 1,5 h und nach 3,5 h mit dem Programm *computer* assisted semen analysis (CASA) gemessen. Nach 1,5 h waren 51% der Spermien der Brunol1<sup>+/-</sup>/Brunol4<sup>+/-</sup>-Maus motil. 29 % zeigten eine progressive Motilität. Zu dieser Zeit zeigten sich die Spermien der Kontrollmaus zu 58% motil und zu 35% progressiv. Nach 3,5 h zeigte sich eine Reduktion der Motilität der Spermien der doppelt heterozygoten Maus auf 7% motile und 3% progressiv motile Spermien im Vergleich zu 45% motilen und 30 % progressiv motilen Spermien der WT-Kontrolle. Weiter wurde eine umfassende Untersuchung der Spermienmotilität durchgeführt. Dazu gehören die Weggeschwindigkeit (average path velocity, VAP), die progressive Geschwindigkeit (straight line velocity, VSL), Bahngeschwindigkeit (curvilinear velocity, VCL), die Breite des Kopfausschlages des Spermiums (lateral amplitude of the head, ALH), Schlagfrequenz des Spermiumschwanzes (beat cross frequency, BCF) und Geradlinigkeit (straightness, STR). Abbildung 3.25 zeigt Box-Plot-Analysen der Motilitätsparameter der beiden Mäuse jeweils nach 1,5 und 3,5 h. Es ließ sich feststellen, dass die Brunol1<sup>+/-</sup>/Brunol4<sup>+/-</sup>-Maus in allen Parametern bis auf die Gradlinigkeit geringere Werte zeigte. Da jeweils nur eine Maus untersucht wurde, kann keine Angabe zur Signifikanz gemacht werden.















Abb. 3.25: Auswertung der Untersuchung zur Spermienmotilität

Einige Parameter der Spermienmotilität der doppelt heterozygoten Maus und der Wildtyp-Kontrolle wurden genauer untersucht. Dazu gehören die Weggeschwindigkeit (*average path velocity*, VAP), die progressive Geschwindigkeit (*straight line velocity*, VSL), Bahngeschwindigkeit (*curvilinear velocity*, VCL), die Breite des Kopfausschlages des Spermiums (*lateral amplitude of the head*, ALH), Schlagfrequenz des Spermiumschwanzes (*beat cross frequency*, BCF) und Geradlinigkeit (*straightness*, STR).

#### 4. Diskussion

#### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse von Knockout-Mäusen für das *Brunol4*-Gen sowie mit Doppel-Knockout-Mäusen für *Brunol1* und *Brunol4*.

Auch in *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Mäusen ließen sich *Brunol4*-Transkripte nachweisen. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Transkripten fehlte diesen jedoch das Exon 1.

Es ergaben sich keine Hinweise auf eine erhöhte intrauterine Letalität von heterozygoten *Brunol4*<sup>+/-</sup>- oder homozygoten *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Anzahl der Nachkommen des 129Sv-Hintergrunds war jedoch reduziert. *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Mäuse starben zu 50% vor dem elften Lebenstag (129/Sv) bzw. vor dem 20. Lebenstag (C57Bl/6J x 129/Sv). Sie zeigten außerdem eine Wachstumsretardierung. Analysen des Körpergewichts haben ergeben, dass *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Mäuse des Hybridhintergrunds signifikant leichter waren als ihre Geschwister.

*Brunol4<sup>-/-</sup>*-Mäuse zeigten zudem vermehrtes Zittern, krampfartige Schwanzbewegungen und fünf von sechs Tieren, die länger als drei Monate lebten, bekamen Krampfanfälle ab einem Alter von drei bis vier Monaten. Die Gehirnmorphologie, die Morphologie hippokampaler Nervenzellen sowie die Verteilung von Munc-18 und beta-III-Tubulin in diesen Zellen waren in *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Mäusen jedoch unauffällig.

Die Verteilung der weiblichen Nachkommen von doppelt heterozygoten Mäusen für *Brunol1* und *Brunol4 (Brunol1<sup>+/-</sup>/Brunol4<sup>+/-</sup>)* war signifikant zu Gunsten der Wildtyp-Tiere verschoben. Bei den männlichen Nachkommen zeigte sich diese Auffälligkeit nicht. 100% der *Brunol1<sup>+/-</sup>/Brunol4<sup>-/-</sup>*-Mäuse starben innerhalb der ersten Woche nach der Geburt und 100% der *Brunol1<sup>-/-</sup>/Brunol4<sup>-/-</sup>*-Mäuse starben innerhalb der ersten zwei Lebenstage. Ein infertil verpaartes *Brunol1<sup>+/-</sup>/Brunol4<sup>+/-</sup>*-Männchen zeigte eine verringerte Spermienzahl, herabgesetzte Spermienmotilität sowie eine auffällige Testis-Histologie.

#### 4.2 Zur Struktur der Brunol-Genfamilie



Die *Brunol*-Genfamilie enthält sechs Mitglieder, welche sowohl ähnliche Sequenzen aufweisen als auch strukturell verwandt sind.

Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Genstruktur der Mitglieder der Brunol-Familie

Dargestellt sind die Gene der sechs Mitglieder der *Brunol*-Familie. Schematisch sind die Lokalisation der Exons sowie der UTRs (*untranslated regions*, vgl. NCBI) markiert.

Aufgrund der Ähnlichkeit in der Sequenz mit dem *Drosophila-melanogaster*-Protein Bruno (Kim-Ha et al. 1995) wird die Familie Brunol-Familie (*bruno like*) genannt (Good et al. 2000). In Abbildung 4.1 sind die Exon-Intron-Strukturen der verschiedenen Mitglieder der Familie schematisch dargestellt. Vertreter der *Brunol*-Genfamilie finden sich in vielen Spezies, nicht nur in *Homo sapiens* und *Mus musculus*, sondern u.a. in *Xenopus (Silurana) tropicalis, Xenopus laevis, Gallus gallus, Danio rerio* und *Rattus norvegicus*. Die meisten Proteine der Familie haben drei *RNA recognition motifs* (RRMs, siehe 1.1). Dabei handelt es sich um Bereiche, die bestimmte RNA-Abschnitte erkennen und an diese binden, so dass das jeweilige Protein seiner RNA-modulierenden Funktion (siehe 4.3) nachgehen kann.

#### 4.3 Zur Funktion der Brunol-Gene

Bei den Proteinen der Brunol-Familie handelt es sich um an RNA bindende Proteine (RBPs). In Wirbeltieren existieren viele verschiedene RBPs, die jeweils eine und häufig mehrere RNA-bindende Domänen (RBDs) besitzen. Diese können gewöhnlich sequenzoder strukturspezifisch an ihrem RNA-Substrat binden. Brunol-Proteine sind an der posttranskriptionellen Prozessierung, wie etwa am Alternativen Spleißen (Barreau et al. 2006), an der Translation, der Deadenylierung und an der mRNA-Degradation beteiligt (Siomi und Dreyfuss 1997) und haben zum Teil überlappende Funktionen. Brunol-Proteine verschiedener Spezies binden innerhalb der mRNA vor allem an GU-reiche Sequenzen (*GU-rich elements*, GREs) (Takahashi et al. 2006; Delaunay et al. 2004; Faustino und Cooper 2005; Marquis et al. 2006; Vlasova und Bohjanen 2008; Graindorge et al. 2008). Diese GRE-vermittelte posttranskriptionelle Regulation der Genexpression ist in verschiedenen Spezies hoch konserviert (Vlasova und Bohjanen 2008). Die detailliertesten Untersuchungen zur Funktion der Brunol-Proteine existieren zu Brunol2 oder ETR-3 (s. 4.3.2 und 4.3.3).

#### 4.3.1 Zur Funktion von Brunol1

Die meisten Untersuchungen zu *Brunol1* wurden bei *Xenopus laevis* durchgeführt. In *Xenopus* konnten bisher fünf *Brunol*-Mitglieder identifiziert werden. *Brunol1/Etr-1* (Knecht et al. 1995), *Brunol2/EDEN-BP* (Paillard et al. 1998) sowie *Brunol3, Brunol4* und *Brunol5* (Wu et al. 2010). *Brunol1* wird in *Xenopus* während der Entwicklung vor allem im ventralen Neuralrohr und in der Retina exprimiert (Knecht et al. 1995; Knecht und Harland 1997; Amato et al. 2005). Zudem wurde eine Expression im Gastrointestinaltrakt und eine Anreicherung im dorsalen Pankreas beobachtet (Jarikji et al. 2009; Horb und Horb 2010). Brunol1 spielt in *Xenopus* eine Rolle bei der Entwicklung des Endoderms, indem es die Proliferation von endodermalen Zellen durch Aktivierung der Translation der *Cyclin A2*-mRNA mittels Bindung an 3'-UTR-*Bruno-response-elements* (BREs) reguliert. Die entscheidende Domäne für diese Wirkung stellt die Linker-Region bzw. *divergent region* dar. Ein Knockdown des Gens hemmt

die Proliferation und damit die Differenzierung des gesamten Endoderms (Horb und Horb 2010).

*Brunol1*, welches auch *Celf3* oder *TNRC4* genannt wird, wird in der Maus bereits an E9,5 exprimiert. In adulten Tieren beschränkt sich die Expression auf die Testes und das Gehirn (Dev et al. 2007). *Brunol1*-Knockout-Mäuse haben einen milden Phänotyp. So weisen sie zwar eine verminderte Beweglichkeit der Spermien auf, die Fertilität ist jedoch nicht beeinträchtigt (Dev et al. 2007).

Es ist bekannt, dass Brunol1 das Spleißen von Exon 10 der prä-mRNA des humanen *Tau/MAPT (microtubule-associated protein tau)* reguliert, indem es die Inklusion fördert (Wang J et al. 2004). Auch in Testes von *Brunol1<sup>-/-</sup>*-Mäusen kommt es zu einer Verminderung von Tau mit Exon 10 im Verhältnis zum Trankskript ohne Exon 10 (Chapple et al. 2007). Bei Tau handelt es sich um ein Protein, das an Mikrotubuli bindet und deren Zusammenbau steuert (Goedert et al. 1989a; 1989b). Trotzdem zeigen die Testes von *Brunol1*-defizienten Mäusen keine morphologischen Veränderungen (Dev et al. 2007). Mutationen im *Tau* sind u.a. mit verschiedenen Demenzerkrankungen wie Frontotemporaler Demenz mit parkinsonähnlichen Symptomen, Progressiver supranukleärer Paralyse und Cortikobasaler Degeneration assoziiert (Hutton et al. 1998; Poorkaj et al. 2000; Pastor et al. 2001; Poorkaj et al. 2002).

#### 4.3.2 Zur Funktion von Brunol2

Die verschiedenen Isoformen von *Brunol2, auch CUG-BP, CUG-BP1* oder *Celf1* genannt, werden während der Myogenese in der Maus unterschiedlich exprimiert. Wie die anderen Mitglieder der Brunol-Familie spielt Brunol2 eine Rolle beim Alternativen Spleißen (Phillips et al. 1998; Savkur et al. 2001; Charlet et al. 2002b), bei der Regulation der Translation (Timchenko et al. 1999; Iakova et al. 2004) und bei der Deadenylierung von mRNA (Paillard et al. 2003; Moraes et al. 2006).

Brunol2 ist damit u.a. an der Regulation der Entwicklung und an der Fertilität beteiligt, wie Untersuchungen mit *Brunol2*-defizienten Organismen zeigen. So weist eine *Brunol2*-Knockout-Maus eine erhöhte perinatale Mortalität, eine embryonale Wachstumsretardierung, eine Hypofertilität beider Geschlechter sowie eine Beeinträchtigung der Spermatogenese bei einem Großteil der Männchen auf (Kress et al. 2007). Ein Knockout des *Brunol2*-Homologen *Eden-BP* in *Xenopus* führt zu Defekten in der Segmentation der Somiten, was für eine entscheidende Rolle von Brunol2 in der Entwicklung spricht (Gautier-Courteille et al. 2004). Ein Ausschalten von *ETR-1*, dem *Brunol2*-Homologen bei *Caenorhabdidis elegans* führt zu erhöhter Letalität und beeinflusst die Muskelentwicklung (Milne und Hodgkin 1999). Dies unterstützt die Identifikation diverser Brunol2-*target*-mRNAs, die eine Rolle in der Myogenese spielen. Dazu gehören die mRNA des cdk-Inhibitors p21, einem Inhibitor des Zellzyklus (Timchenko et al. 2001b), sowie die mRNAs des *myocyte enhancer factor 2A* (Timchenko et al. 2004), des Insulin-Rezeptors (Savkur et al. 2001) und eines Chloridionen-Kanals (Charlet-B et al. 2002b).

Die Rolle von Brunol2 in der Myogenese und auch in der Pathogenese der Myotonen Dystrophie Typ I (DM1) ist Inhalt vieler Untersuchungen. Die Myotone Dystrophie ist beim Menschen die zweithäufigste Ursache von muskulärer Dystrophie und die häufigste Ursache für muskuläre Dystrophie im Erwachsenenalter. Phänotypisch zeigen sich Skelettmuskeldystrophie, Reizleitungsstörungen im Herzen, Myotonie, Katarakt und Insulinresistenz.

Normalerweise herrscht im adulten Skelettmuskel ein erhöhtes Muscleblind-like (MBNL) und eine relativ erniedrigte Expression von *Brunol2* vor. Bei der DM1 ist dieses Verhältnis andersherum, was zu einem embryonalen Spleißmuster führt (Cooper et al. 2009). Im Skelettmuskel von DM2-Patienten/innen ist *Brunol2* dagegen nicht hochreguliert (Lin et al. 2006). Gezielte Überexpression von *Brunol2* in der Maus führt zu einer Verzögerung in der Entwicklung und Differenzierung des Skelettmuskels sowie zu Muskeldystrophie (Timchenko et al. 2004; Ho et al. 2005) und Myotonie (Charlet-B et al. 2002b) wie bei DM1 (Timchenko et al. 2001a). Die Menge an Brunol2-Protein in murinem Herzgewebe sinkt normalerweise ab dem sechsten bzw. zehnten Tag postnatal. Da aber die Menge an RNA unverändert bleibt, handelt es sich wahrscheinlich um eine posttranskriptionelle Regulation (Kalsotra et al. 2008). Eine herzspezifische Überexpression von *Brunol2* im Mausmodell ist ausreichend für die Ausprägung eines kardialen Phänotyps wie bei DM1 (Wang GS et al.; 2007; Koshelev et al. 2010).

Bei DM1-Patienten/innen liegt ein mutiertes *DMPK*-Gen (*Dystrophia Myotonia Protein Kinase*) mit verlängerten CTG-*repeats* vor, dessen mRNA für den Phänotyp maßgeblich verantwortlich ist (Mankodi et al. 2000) und die Funktion von Brunol2 beeinflusst (Timchenko et al. 1996; Philips et al. 1998; Timchenko et al. 2001a; 2001b; 2004). Eine

Erhöhung der CUG-Wiederholungen in der *DMPK*-mRNA führt zu einer Aktivierung einer Proteinkinase und darüber zu einer Hyperphosphorylierung und Stabilisierung von Brunol2, wie es in kultivierten DM1-Hautfibroblasten, Herzgewebe und humanen DM1-Zellen der Fall ist (Savkur et al. 2001; Timchenko et al. 2001a; Dansithong et al. 2005; Kuyumcu-Martinez et al. 2007).

Verschiedene mRNAs, die in DM1-Zellen missreguliert werden, konnten als Brunol2*targets* identifiziert werden.

Es wurde berichtet, dass das erhöhte Brunol2 in Zellen von DM1-Patienten/innen auf den Kern beschränkt ist (Roberts et al. 1997). Während der normalen Muskelentwicklung triggert Brunol2 in humanen Myoblasten die Translation sowohl von *p21* als auch von *MEF2A* durch Bindung an GCN-repeats. In DM1-Zellen ist Brunol2 und damit seine Bindungsaktivität im Zytoplasma jedoch verringert, was zu verminderten p21 und MEF2A während der Entwicklung führt (Roberts et al. 1997; Timchenko et al. 2001a; 2004). Ebenso ist das proinflammatorische Zytokin Tumornekrosefaktor (TNF) in DM1-Patienten/innen erhöht (Johansson et al. 2000). Brunol2 interagiert mit der PARN-Deadenylase, welche den Poly(A)-Schwanz verkürzt, und destabilisiert so das *TNF*-Transkript in HeLa-Zellen (Moraes et al. 2006).

Zudem sind das kardiale Troponin T (*cTNT/TNNT2*) und ein Insulinrezeptor (*IR*) im DM1-Skelettmuskel verändert gespleißt (Philips et al. 1998; Savkur et al. 2001). Im embryonalen, nicht jedoch im adulten Herzen besteht üblicherweise eine Inklusion des Exons 5 der *cTNT*-mRNA (Cooper und Ordahl 1985). *cTNT* mit Exon 5 wird auch im embryonalen Skelettmuskel exprimiert, nicht jedoch im reifen Skelettmuskel (Cooper und Ordahl 1984). Brunol2 fördert diese Inklusion in Mäusen (Charlet-B et al. 2002a; Ladd et al. 2005a). Der *switch* der Spleißvarianten korreliert normalerweise mit einer Herunterregulation von ETR-3 und Brunol2 (Ladd et al. 2005a). Bei erhöhtem Brunol2 in DM1-Zellen liegt somit ein embryonales Spleißmuster des cTNT vor (Savkur et al. 2001).

Brunol2 moduliert auch das Alternative Spleißen des Exons 11 des Insulinrezeptor-Gens (*IR*) durch Bindung an Spleiß-Silencer (Sen et al. 2009). Brunol2-Überespression führt in normalen Myoblasten zur Hemmung der Inklusion von Exon 11 des *IR* wie es auch bei der DM1 vorliegt (Savkur et al. 2001; Paul et al. 2006).

Eine erhöhte Brunol2-Aktivität scheint außerdem eine Fehlregulation des Alternativen Spleißen des humanen *ClC-1* (ein *Muskel-spezifischer Chlorid-Kanal*, auch *CLCN-1*) zu

induzieren, woraus ein ClC-1-Verlust im Skelettmuskel resultiert, welcher zu Myotonien im Rahmen der DM1 führt (Charlet-B et al. 2002b).

Ein weiterer Mechanismus, in dem Brunol2 involviert ist, ist in DM1-Patienten/innen verändert. In der normalen Myogenese wird Brunol2 in prämyeloblastischen Vorläuferzellen (C2C12-Zellen) unter anderem über einen Cyclin-D3-cdk4-vermittelten Signalweg phosphoryliert. Das phosphorylierte Brunol2-Protein interagiert verstärkt mit dem eukaryontischen Translationsinitiationsfaktor 2 (eIF2) und bildet einen Translationsinitiationskomplex. Phosphorylierungen an verschiedenen Stellen des Proteins dirigieren Brunol2 jeweils zu unterschiedlichen mRNAs und verstärken auch die Affinität zum CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) und zur *p21*-mRNA (Salisbury et al. 2008). Für eine normale Muskelentwicklung ist daher eine zeitgerechte Erhöhung von Cyclin D3 erforderlich (De Santa et al., 2007). In DM1-Patienten/innen findet keine Erhöhung von Cyclin D3 statt. Es entstehen daher weniger Brunol2-eIF2 Komplexe (Salisbury et al. 2008).

Schließlich interagiert Brunol2 mit der 3'-UTR von *SBP2* (Bubenik 2009), welches die Expression von Selenoproteinen reguliert (Bubenik und Driscoll 2007; Squires et al. 2007). Selenoproteine sind unter anderem an der Pathogenese einer Myopathie beteiligt (Moghadaszadeh et al. 2001).

Der o.g. Brunol2-eIF2-Komplex spielt auch bei anderen Erkrankungen, wie einigen Malignomen, eine Rolle. So bindet er wie o.g. an die mRNA des *C/EBPbeta* und triggert dadurch die Translation der Isoform des C/EBPbeta, LIP. Diese Isoform wird in proliferierenden Lebern und auch in Tumorzellen, etwa beim Mammakarzinom, Kolorektalen Karzinom oder Ovarialkarzinom, verstärkt exprimiert (Baldwin et al. 2004; Timchenko et al. 2005; Zahnow et al. 1997; Rask et al. 2000; Sundfeldt et al. 1999). Des Weiteren kontrolliert Brunol2 die *CD9*-Expression (Le Tonquéze et al. 2010), welches in einigen Krebsarten herunterreguliert ist (Miyake et al. 1995; Higashiyama et al. 1995).

#### 4.3.3 Zur Funktion von ETR-3

Die Sequenz des namensgebenden *founder*-Proteins der *Celf*-Familie, Etr-3 (*embryonic lethal abnormal vision RNA-binding Protein 3*) ist zu 76% identisch mit Brunol2 (Hwang et al. 1994).

*Etr-3* wird während der Embryogenese und in den ersten Wochen postnatal im gesamten Vorderhirn exprimiert (Levers et al 2002). Im Herzgewebe des Embryos wird *Etr-3* wie *Brunol2* stärker exprimiert als im adulten Herzgewebe (Ladd et al. 2005a). Eine Herunterregulation erfolgt bereits am zehnten postnatalen Tag und wird auch hier wahrscheinlich posttranskriptionell reguliert (Kalsotra et al. 2008). Auch in anderen Organen wird Etr-3 im Laufe der Entwicklung herunterreguliert (Ladd et al. 2005a).

Viele Veröffentlichungen zu *Etr-3* (*Celf2/CUG-BP2/Napor*) beschreiben dessen Bedeutung als Spleißfaktor verschiedener mRNAs. So fördert Etr-3 wie die anderen Celf-Proteine durch Bindung an MSEs (*muscle specific splicing enhancers*) die Inklusion des v.a. im erwachsenen Herzen integrierten Exon 5 in der *cTNT*-mRNA (Ladd et al. 2001; 2004; Charlet-B et al. 2002a). Die Herunterregulation von Etr-3 im adulten Herzen korreliert mit dem *switch* von der Exon-5-Inklusion zum Exon-5*skipping*.

Des Weiteren wurde berichtet, dass die Proteinverteilung von Etr-3 in der Ratte mit dem Spleißmuster der *NMDAR1*-Rezeptor-Transkripte (*IN-Methyl-D-Aspartat-receptor-1 Rezeptor*) korreliert und Etr-3 das *skipping* von Exon 5 und die Inklusion des Exons 21 der Rezeptor-mRNA in C2C12-Zellen (murine prämyeloblastische Vorläuferzellen) fördert (Zhang W et al. 2002).

Neben cTNT und dem NMDAR1-Rezeptor wird das Alternative Spleißen der mRNAs weiterer Gene durch Etr-3 reguliert. Dazu gehören Exone der mRNAs des Insulinrezeptors und des Tau (Leroy et al. 2006b) sowie des  $\alpha$ -Aktinin 3 (Gromak et al. 2003). Daneben ist Etr-3 wie Brunol2 im induzierbaren herzspezifischen DM1-Mausmodell erhöht (Wang GS et al. 2007) und gilt zudem als Kandidatengen für die Herzdefekte und Thymushypoplasie/-aplasie im Rahmen der partiellen Monosomie 10p beim Menschen (Lichtner et al. 2002).

Bereits 1999 vermuteten Choi et al., dass Etr-3 eine Rolle in der Apoptose spielt. Untersuchungen zeigten, dass die mRNA von *Etr-3* und *Cox-2* (syn. *PTGS2: Prostaglandin-endoperoxid-Synthase 2, Prostaglandin G/H Synthase und Cyclooxygenase*), nicht jedoch das Cox-2-Protein nach  $\gamma$ -Bestrahlung von HeLa-Zellen und intestinalen Epithelzellen von Mäusen und Ratten hochreguliert ist. Etr-3 lässt sich dann nicht nur im Kern sondern auch im Zytoplasma nachweisen. *Etr-3* wird unter der Kontrolle von drei unterschiedlichen Promotoren exprimiert. Je nach Promotor resultieren unterschiedliche Varianten. Diese drei Varianten, insbesondere die Variante 2, werden in der Maus im gesamten Gastrointestinaltrakt exprimiert. Nach Bestrahlung mit 12 Gy findet jedoch ein Wechsel auf die Variante 1 statt, welche über Stabilisierung der *Cox-2*-mRNA und Hemmung ihrer Translation zu einer Apoptose aufgrund von Mitosefehlern (*mitotic catastrophe*) führt. Die Varianten 2 und 3 haben keinen Einfluss auf die *Cox-2*-Translation oder die Apoptose (Mukhopadhyay et al. 2003a; Sureban et al. 2007; Ramalingam et al. 2008).

Auch in der bestrahlungsinduzierten Apoptose von Tumorzellen spielt Etr-3 eine Rolle. So resultiert die Überexpression von *Etr-3* in HT-29-Kolonkarzinomzellen darin, dass diese in die Apoptose übergehen (Mukhopadhyay et al. 2003a; Murmu et al. 2004).

Prostaglandin E2 (PGE2) schützt Kolonkarzinomzellen (HCT-116-Zellen) zum Teil durch Unterdrückung der *Etr-3*-Expression vor bestrahlungsinduzierter Apoptose (Natarajan et al. 2008). HCT-116-Zellen, die stabil *Etr-3* exprimieren, zeigen daher eine erniedrigte Proliferation und eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu Kontroll-HCT-116-Zellen. Die *Etr-3*-Überexpression scheint in diesen Zellen durch Bindung von Etr-3 an die mRNA des *Mcl-1* (myeloid cell leukemia sequencec 1) und dessen Stabilisierung sowie Hemmung der Translation den Übergang in die Apoptose während der G2-M-Phase zu induzieren (Subramaniam et al. 2008).

*Etr-3-* sowie *Cox-2-*mRNA sind ebenfalls hochreguliert in bestrahlten MCF-7-Zellen, Mammacarcinomzellen, welche nach der Bestrahlung in die Apoptose gehen (Mukhopadhyay et al. 2003b).

#### 4.3.4 Zur Funktion von Brunol5

Über die Funktion von Brunol5/Celf5 ist bisher wenig bekannt. Es fördert in geringem Maße wie die anderen Mitglieder der Brunol-Familie die MSE-abhängige Exon-Inklusion in *cTNT*-Minigen-mRNA in Fibroblasten (Ladd et al. 2001). Außerdem beeinflusst Brunol5 das Alternative Spleißen des Exons 6 des Tau-Proteins (Leroy et al. 2006b).

#### 4.3.5 Zur Funktion von Brunol6

Brunol6 fördert ebenfalls die Exon-5-Inklusion in kardialem Troponin T über Bindung an MSEs in transfizierten Fibroblasten. Außerdem triggert Brunol6 das Überspringen des Exons 11 der mRNA des Insulin-Rezeptors in transfizierten Fibroblasten (Ladd et al. 2004) und beeinflusst wie Brunol5 das Spleißen des Exons 6 der Tau-mRNA (Leroy et al. 2006b).

#### 4.4 Zur Funktion von Brunol4

Das murine *Brunol4* enthält 13 Exons und ist auf dem Chromosom 18 lokalisiert (Meins et al. 2002). Mütterliche *Brunol4*-mRNA lässt sich bereits im 2-Zellstadium von Maus-Embryonen nachweisen, während das väterliche Allel erst ab dem 4-Zell-Stadium transkribiert wird (Dev 2006). In adulten Mäusen wird *Brunol4* im Gehirn sowie in den Augen exprimiert. Besonders hohe Level an *Brunol4*-RNA lassen sich im Hippocampus und dort v.a. in den Pyramidenzellen der CA2- und CA3-Regionen nachweisen (Meins et al. 2002; Dev 2006; Yang et al. 2007). Während der Embryogenese wird *Brunol4* auch im Nervensystem von Hühnern exprimiert. Die Expression beginnt im Neurula-Stadium im Kopf und im Neuralrohr des Embryos und ist auch in der späteren Entwicklung auf das Nervensystem beschränkt. Im Gehirn ist die Expression in der äußersten Zellschicht am höchsten (Brimacombe und Ladd 2007). Im Menschen wird *Brunol4* in mehreren Geweben exprimiert. Bereits Meins et al. (2002) und Ladd et al. (2001) haben diverse RNA-Varianten bzw. Protein-Isoformen nachgewiesen, wobei Exon 11, welches für einen Teil der dritten RRM kodiert, unterschiedlich gespleißt wird.

Brunol4 spielt wie die anderen Mitglieder der Brunol-Familie eine Rolle im Alternativen Spleißen. So fördert auch Brunol4 über Bindung an MSEs die Inklusion des Exons 5 der mRNA eines *cTNT*-Minigens in Fibroblasten von Menschen und Hühnern (Ladd et al. 2001). Exon 5 ist vor allem in mRNA des embryonalen Herzens vorhanden, während es in mRNA des adulten Herzens meist fehlt (Cooper und Ordahl 1985). Die *Brunol4*-Expression im Herzen korreliert jedoch nicht mit dem *switch* im *cTNT* (Ladd et al. 2001). Für das MSE-abhängige Spleißen sind in vivo entweder das RRM1 oder das RRM2 ausreichend. Das RRM2 mit zusätzlichen 66 Aminosäuren (AS) der *divergent region* sind genauso effektiv wie das komplette Protein. Dies impliziert, dass diese 66 AS-Stellen für die volle Aktivität notwendig sind, wie Deletionsanalysen der Proteine gezeigt haben (Singh et al. 2004).

Zudem spielt Brunol4 eine Rolle in der Regulation des Alternativen Spleißen des *CLCN1-* bzw. *ClC-1-*Gens. Dieses kodiert für einen Chloridionenkanal im Skelettmuskel. Bei der Myotonen Dystrophie liegt eine erhöhte Expression einer mRNA-Variante vor, welche das Exon 7A enthält. Dieses abnorme Spleißen führt zu einer erhöhten Degradation der Transkripte durch *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) oder zur Produktion von verkürzten Proteinen, die einen dominant-negativen Effekt zeigen. Klinisch zeigen sich Myotonien (Charlet-B et al. 2002b; Mankodi et al. 2002; Berg et al. 2004). Die Inklusion des Exons 7A im murinen *ClC-1*-Minigen wird durch MBNL-Proteine unterdrückt und durch Brunol4 antagonistisch stimuliert (Kino et al. 2009). Möglicherweise spielt Brunol4 wie auch Brunol2 eine Rolle bei der Myotonen Dystrophie. Bisher ist bekannt, dass Brunol4 im Gehirn von DM1-Patienten/innen erniedrigt ist (Leroy et al. 2006b).

Es ist zudem bekannt, wie Experimente mit Co-Expression eines beta-Tropomyosin-Minigen mit Brunol4 in Myoblasten zeigen, dass Brunol4 die Inklusion des Exons 6B der *Beta-Tropomyosin*-mRNA während der Myogenese des Herzmuskels fördert. Ein Wechsel von einer mRNA-Variante mit Exon 6A zu einer Variante mit Exon 6B ist in sich entwickelnden Herzmuskelzellen physiologisch (Sureau et al. 2010).

Im Zusammenhang mit onkologischen Erkrankungen wird ein Genkopie-Verlust (*copy number loss*) des *Brunol4* als unabhängiger prognostischer Faktor beim Kolorektalen Karzinom beschrieben (Poulogiannis et al. 2010).

## 4.4.1 Neurologische Auffälligkeiten bei Brunol4-defizienten Tieren ohne morphologisches Korrelat im Gehirn

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass einige *Brunol4*-defiziente Mäuse einen Tremor, sowie Myotonien in Form von krampfartigem Ausstrecken des Schwanzes zeigten. Ab einem Alter von drei bis vier Monaten traten zusätzlich bei 80 % der Tiere, die dieses Alter erreichten, tonisch-klonische Anfälle auf (s. Kap. 3.4.2).

Im Zusammenhang mit dem Auftreten des Ohtahara Syndroms (frühkindliche epileptische Enzephalopathie) sind *missense* Mutationen des Proteins Munc-18 (*synaptic binding protein 1*, syn.: STXBP1) beschrieben worden (Saitsu et al. 2008), welches zum synaptischen Fusionskomplex gehört. Eine erniedrigte Abbaurate von Munc-18, d.h. eine Stabilisierung, könnte mit einer höheren Sekretionsrate an der Synapse einhergehen. Es wurden daher im Rahmen dieser Arbeit mittels Immunofluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Munc-18 hippokampale Neurone

von *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Tieren und Wildtypkontrollen verglichen. Es zeigten sich jedoch keine Auffälligkeiten (s.Kap. 3.5.2). Auch die Verteilung von Beta-III-Tubulin unterschied sich nicht von Wildtypkontrollen, obwohl Hoch- bzw. Herunterregulation von beta-Tubulinen mit dem Auftreten von Epilepsie korreliert (Guo und Kuang 1993; Yang et al. 2007).

Auch histologische Untersuchungen von Gehirnschnitten *Brunol4*-defizienter Mäuse zeigten keine Auffälligkeiten (s. Kap. 3.5.1), so dass vermutet werden kann, dass es durch Missregulation aufgrund von *Brunol4*-Defizienz z.B. zu Störungen anderer Neurotransmitter oder Rezeptoren in der Signalbildung oder -weiterleitung an Neuronen kommt.

Wie oben genannt, ist Brunol4 ein gehirnspezifisches RNA-Bindungsprotein. Mehrere gehirnspezifische targets sind für Brunol4 beschrieben worden, deren Fehlregulationen zu den neurologischen Symptomen des o.g. klinischem Erscheinungsbildes führen könnte. So unterdrückt Brunol4 das Spleißen des Exons 5 des humanen NMDAR1-Minigens. Hierfür ist ein Abschnitt der divergent region des Brunol4-Proteins notwendig (Han und Cooper 2005). Bei NMDAR1 (glutamate receptor, ionotropic, Nmethyl D-aspartate 1, GRIN1) handelt es sich um eine Untereinheit des Glutamatrezeptors. NMDA-Rezeptoren werden in fast allen zentralen Nervenzellen exprimiert (Kutsuwada et al. 1992; Ishii et al. 1993). In der Retina werden während der embryonalen Entwicklung zunächst mRNA-Isoformen des NMDAR1 exprimiert, denen das Exon 5 fehlt. Später in der Entwicklung treten dann relativ mehr mRNA-Isoformen mit Exon 5 auf (Lee-Rivera et al. 2003). Die Annahme, dass der Glutamatrezeptor für die Pathogenese von Epilepsien bedeutsam ist, wird dadurch unterstützt, dass durch NMDA-Gabe epileptische Anfälle induziert werden können (Faingold et al. 1989). *NMDAR1*-Polymorphismen werden zudem im Zusammenhang mit dem West-Syndrom, einer epileptischen Enzephalopathie im Kindesalter, beschrieben (Ding et al. 2010). Des Weiteren ist bekannt, dass NMDA-Rezeptoren in Mausmodellen für Chorea Huntington eine gesteigerte Empfindlichkeit aufweisen und möglicherweise die Vulnerabilität striataler Neurone erhöhen (Cepeda et al. 2001), so dass der Rezeptor auch für die typische Symptomatik dieser Erkrankung, d.h. choreatische Hyperkinesen, bedeutsam sein könnte. Mäuse, die lediglich 5 % der üblichen Menge des NMDAR1 exprimieren, überleben bis ins adulte Alter und zeigen abnorme schizophrene Verhaltensweisen wie eine erhöhte motorische Aktivität, Stereotypien und Defizite in sozialen und sexuellen Interaktionen (Mohn et al. 1999).

Ein Bereich der divergent region von Brunol4 ist daneben notwendig für die Inklusion des Exons 11 der mRNA des Polypyrimidine tract binding protein (PTB/hnRNP 1, Han und Cooper 2005). Brunol4 stimuliert das Spleißen des Exons 11 der PTB-mRNA, welches für ein RNA-Bindungsprotein kodiert, das seinerseits expressionsmodulierend wirkt (Valcárcel und Gebauer 1997; Wollerton et al. 2004). PTB wird unter anderem im Gehirn exprimiert (Patton et al. 1991). Alternatives Überspringen des Exons 11 der PTB-mRNA führte bei Untersuchungen an HeLa-Zellen zu einer mRNA, die mindestens zu 20% durch NMD abgebaut wird (Wollerton et al. 2004). So führt eine Brunol4-Defizienz möglicherweise zu einem vermehrten Abbau der PTB-mRNA und damit zu einer Verminderung der Funktion von PTB. PTB selbst reguliert das Spleißen mehrerer mRNAs, die neuronal bedeutsam sind. So scheint PTB unter anderem das Alternative Spleißen des smooth muscle-Exons des a-Aktinin zu unterdrücken (Southby et al. 1999). Daneben hemmt PTB unter anderem das Spleißen des N-Exons der GABA-Rezeptor-Untereinheit y-2GABA<sub>A</sub> (Ashiya und Grabowski 1997), dessen Ligand GABAinhibitorisch wirkt, sowie des Exons 5 des NMDAR1 (Zhang L et al. 1999) und des Exons 6 des Tau. Auch Tau scheint an der DM1 beteiligt zu sein, da das Exon 6 des Tau im Gehirn von DM1-Patienten/innen, nicht jedoch in deren Muskel, unterdrückt ist (Wei et al. 2000; Leroy et al. 2006b). Tau kodiert für ein Mikrotubulus-assoziiertes Protein, welches in den Axonen von reifen und aussprossenden Nervenzellen angereichert ist (Kempf et al. 1996). Es wird vermutet, dass die Tau-Isoform mit Exon 6 eine Rolle in der axonalen Migration spielt (Wang J et al. 2007). So könnte es durch abnormes Alternativen Spleißen des Exons 6 aufgrund des fehlenden Regulatorproteins Brunol4 zu einer gestörten Ausbildung von Axonen kommen. Die untersuchten hippokampalen Neurone zeigten mit den untersuchten Färbungen keine Auffälligkeiten. Es ist jedoch möglich, dass Neurone anderer Hirnareale morphologische Abweichungen aufweisen.

Brunol4 unterdrückt zudem wie auch Brunol1, Brunol2, Etr-3 und Brunol5 die Inklusion des Exons 23a der mRNA des *Neurofibromatose-Typ-I* -Gens (*NF1*) (Barron et al. 2010). Dieses Gen kodiert für das Protein Neurofibromin, welches weit verbreitet, besonders jedoch im Nervensystem exprimiert wird (Daston et al. 1992). Es handelt sich dabei um ein Tumorsuppressorgen (Xu et al. 1990), dessen Mutation die Grundlage der Neurofibromatose Typ I bildet (Wallace et al. 1990). Diese Erkrankung manifestiert sich neurologisch mit ZNS-Tumoren, mentaler Retardierung, Lernschwierigkeiten und Epilepsie (Riccardi 1987). 7% einer Population von NF1-Patienten/innen entwickelte

v.a. fokale epileptische Anfälle. Bei 60% traten diese Anfälle sekundär infolge von Gehirnläsionen auf (Vivarelli et al. 2003). Vier unterschiedlich exprimierte Transkripte, Typ I-IV, konnten für das *NF1*-Gen nachgewiesen werden. Die Transkripte werden in zahlreichen Geweben exprimiert, wobei die einzelnen Isoformen unterschiedliche Schwerpunkte zeigen. So wird Typ I vor allem in neuronalem Gewebe und im Testis exprimiert, während Typ III und IV v.a. in der Nebenniere und im Testis exprimiert werden. Exon 23a ist in den Transkriptvarianten Typ II, welches v.a. in Nebenniere, Lunge, Niere und Ovar exprimiert wird, und im Typ III enthalten (Nishi et al. 1991; Mantani et al. 1994). Hier könnte es zu einer Misregulation der Isoform Typ I kommen, indem durch eine fehlende Unterdrückung der Inklusion des Exons 23a dieses integriert wird. Als Folge sind neurologische Fehlregulationen denkbar.

Eine weitere Funktion des Brunol4 ist die Unterdrückung der Inklusion zweier Exons des  $\alpha$ -Aktinins 1 der Ratte, einer Komponente des Zytoskeletts (Gromak et al. 2003). Hierbei handelt es sich um das sogenannte *non-muscle-* sowie das *smooth-muscle*-Exon, welche in einer gehirnspezifischen Isoform zusammen exprimiert sind (Kremerskothen et al. 2002). Durch eine Funktionsstörung des Brunol4 könnte es demzufolge zu einer Hochregulation dieser Isoform und damit zur Ausbildung neurologischer Symptome kommen.

Eine erhöhte Anfallsbereitschaft sowie Krampfanfälle verschiedener Ausprägungen zeigt ebenfalls ein früher beschriebenes Mausmodell der frequent flyer, bei dem das Brunol4-Gen durch gene trap verändert worden ist (Yang et al. 2007). Hier hat eine Transgen-Insertion in Intron 1 von Brunol4 in C57BL/6J-Tieren zu einem veränderten Spleißen des Gens geführt. Liegt die Insertion in beiden Allelen vor, ist das Brunol4-Transkript stark herunterreguliert, in heterozygoten Tieren um etwa 45%. Diese frequent flyer (Ff) zeigen, wenn sie heterozygot für das mutierte Allel sind, ab einem Alter von drei Monaten epileptische Anfälle in unterschiedlicher Ausprägung, wobei die Inzidenz bei Männchen höher ist. Vorher zeigt sich eine Hyperaktivität, eine herabgesetzte elektrokonvulsive Schwelle und ein geringeres Körpergewicht. Im Verlauf tritt dann jedoch im Vergleich zu Wildtypgeschwistern eine Gewichtszunahme ein. Die Lebenszeit ist nicht reduziert. Auch die Lebenszeit unserer Brunol4<sup>+/-</sup>-Mäuse war nicht verkürzt. Jedoch bildeten die heterozygoten Mäuse keine Epilepsien aus. Heterozygote Weibchen waren zeitweise signifikant leichter als Wildtypgeschwister. Dieser Gewichtsunterschied zeigte sich nicht bei Männchen. Einige *Ff*-Homozygote, die mit Hybrid-genetischem Hintergrund gezüchtet worden waren, lebten länger als sechs Monate und zeigten ab einem Alter von acht Monaten limbische und tonisch-klonische Anfälle und auch Absencen mit *spike-wave*-Komplexen im EEG, ähnlich zu unseren *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Tieren, die ab einem Alter von drei bis vier Monaten zu 80% tonisch-klonische Anfälle präsentierten. Homozygote *Ff*-Tiere mit reinem C57Bl/6J-Hintergrund fielen zu Lebzeiten nicht mit Krampfanfällen auf. Die Gehirnmorphologie heterozygoter sowie homozygoter *Ff*-Tiere war, wie die der *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Mäuse, unauffällig und obwohl Brunol4 mit  $\alpha$ -Aktinin eine Komponente des Zytoskeletts als target hat und andere Brunol-Proteine direkt und Brunol4 indirekt das Alternative Spleißen von Tau regulieren, welches möglicherweise eine Rolle in der Ausbildung von Axonen hat (Gromak et al. 2003; Leroy et al. 2006a und 2006b; Wang J et al. 2007) unterschieden sich die Axone hippokampaler Neurone in ihrer Länge nicht von denen gleichaltriger Wildtypkontrollen (Vgl. 3.5.2).

Untersuchungen zeigten, dass in den Hippocampi von heterozygoten adulten *frequent-flyer*-Mäusen Transkripte von vier Genen um ca. 30-39% herunterreguliert waren, die zum Phänotyp der Epilepsie beigetragen haben könnten. Knockout-Mäuse des herunterregulierten Serotonin Rezeptor 2c (Htr2c) zeigen spontane epileptische Anfälle, sowie Hyperaktivität und ein später einsetzendes Übergewicht (Tecott et al. 1995). Bei einem weiteren herunterregulierten Protein handelte es sich um Synapsin II (Syn2), dessen Knockout zu provozierbaren Anfällen führt (Rosahl et al. 1995). Der N-Ethylmaleimide-sensitive Faktor (Nsf), ein weiteres erniedrigtes Protein in heterozygoten adulten *frequent-flyer*-Mäusen, reguliert die Exozytose an Synapsen und das AMPA-Rezeptor-*trafficing* (Schiavo et al. 1995; Shi et al. 2001). Ebenfalls reduziert zeigte sich das Neuronen-spezifische präsynaptische Protein Alpha-Synuclein (Snca) (Iwai et al. 1995).

Die meisten der bisher identifizierten und für Epilepsie mitverantwortlichen Gene kodieren für Ionenkanäle oder dazugehörende Untereinheiten. Jedoch existieren einige Ausnahmen wie *LGI1 (leucine-rich, glioma inactivated 1*, Kalachikov et al. 2002), *EFHC1 (EF-hand domain (C-terminal) containing 1*, Suzuki et al. 2004) im Menschen und *JRK/JH8 (jerky bzw. jerky homolog* Toth et al. 1995; Moore et al. 2001) sowohl in der Maus als auch im Menschen. Dieses macht deutlich, dass nicht nur die primäre Modifikation der Erregungsleitung als Ursache in Frage kommt, sondern auch die Änderung der Expression von Genen, die etwa für Ionenkanäle, Neurotransmiter Rezeptoren und synaptische Proteine kodieren, bedeutsam ist.

#### 4.4.2 Verkürzte Lebenserwartung von Brunol4-defizienten Tieren

Wie die Brunol4<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden auch homozygote Ff-Tiere lebend geboren, starben jedoch meist am ersten Tag postnatal. Hierbei zeigte sich eine Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund. So machten homozygote Ff-Tiere mit C57Bl/6J-Hintergrund im Alter von vier Wochen noch 1,1% statt der nach MENDELschen Regeln erwarteten 25% der Nachkommen aus. Diese Zahl betrug jedoch bei einem Hybridhintergrund mit C57Bl/6J x 129S1 8,2%. Auch in unseren Untersuchungen liegt das mediane Überleben des Hybridhintergrunds bei Brunol4<sup>-/-</sup>-Mäusen mit 20 Tagen über dem einer Inzuchtlinie. Von beobachteten homozygoten Nachkomen der Linie 129/Sv lebten bereits nach 11 Tagen nur noch 50%. 40% starben bereits in den ersten vier Lebenstagen. Jedoch lebten mehr als 10% bis zu 40 Tage lang, während bei homozygoten Nachkommen des hybriden Hintergrunds bereits bis zum 25. Tag postnatal mehr als 90% verstorben waren. Die reduzierte Nachkommenzahl in der 129Sv-Linie ließ sich durch die Ergebnisse der Embryonenuntersuchungen nicht auf eine erhöhte intrauterine Letalität der Brunol4<sup>-/-</sup>-Mäuse zurückführen. Möglicherweise werden die Nachkommen der heterozygoten 129Sv-Verpaarungen vermehrt postnatal vernachlässigt oder gefressen, etwa aufgrund einer erhöhten Anfälligkeit für Störungen während des Geburtsvorgangs. Soziale Auffälligkeiten in Form von schizophrenen Verhaltensweisen wurden im Zusammenhang mit stark verminderter Expression von NMRAR1 berichtet, einer Untereinheit des Glutamatrezeptors, dessen Spleißen durch Brunol4 moduliert wird (Mohn et al. 1999; Han und Cooper 2005). Homozygotie für einen genetischen Hintergrund könnte den Phänotyp also verstärken, wie es auch für andere Mutationen in Mäusen bekannt ist (z.B. Kent et al. 1997; Buchner et al. 2003). Ungeklärt ist die Ursache der erhöhten Letalität der Brunol4<sup>-/-</sup>-Mäuse. Morphologische Auffälligkeiten konnten weder in der histologischen Untersuchung des Gehirns noch in kultivierten Hippocampus-Neuronen homozygoter Tiere nachgewiesen werden. NMDAR1-Knockout-Mäuse sterben innerhalb von Stunden nach der Geburt an respiratorischer Insuffizienz (Forrest et al. 1994; Li Y et al. 1994) und Punktmutationen im NMDAR1-Gen führen zu einer erhöhten neonatalen Letalität (Kew et al. 2000). Auch frühe letale Krampfanfälle könnten eine mögliche Ursache der verkürzten Lebenserwartung von *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Tieren sein.

## 4.4.3 Signifikante Wachstumsretardierung bei Brunol4defizienten Tieren

*Brunol4<sup>-/-</sup>*-Mäuse beider Linien waren fast immer signifikant leichter als Heterozygote oder Wildtypgeschwister. Auch homozygote *Ff*-Tiere mit Hybridhintergrund waren kleiner als Kontrollen. Als Spleißregulator spielt Brunol4 eine Rolle im Spleißen von mRNAs von für die Entwicklung wichtigen Proteinen wie NMDAR1 oder alpha-Aktinin sowie möglicherweise indirekt oder direkt auch Tau. Fehlspleißen oder Fehlen eines entwicklungsbedingten Wechsels des Spleißens bestimmter Exons könnte zu derartiger Retardierung im Wachstum führen. Punktmutationen im *NMDAR1*-Gen, dessen Alternatives Spleißen durch Brunol4 reguliert wird, führen unter anderem zu einem verminderten Geburtsgewicht (Kew et al. 2000).

#### 4.4.4 Mögliche Infertilität der Brunol4<sup>-/-</sup>-Männchen

Da *Brunol4*<sup>+/-</sup>-Mäuse des Hybridhintergrunds keine Reduktion der Nachkommenzahl aufwiesen, war es interessant zu sehen, ob *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Mäuse desselben Hintergrunds ebenfalls fertil verpaart werden können. Die Verpaarung eines *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Weibchens mit einem Wildtyp-Männchen ergab mehrere Würfe. Die Nachkommen wurden jedoch jedesmal direkt nach der Geburt aufgefressen. Sowohl aus einer Verpaarung eines *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Männchens mit einem Wildtyp-Weibchen als auch aus einer Verpaarung des fertilen *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Weibchens aus der erstgenannten Verpaarung mit einem *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Männchen entstanden auch nach über zwei Monaten keine Nachkommen. Dieses könnte ein Hinweis auf eine Infertilität oder ein gestörtes Sexualverhalten des Männchens sein. Allerdings sind deutlich mehr Verpaarungen und Untersuchungen notwendig, um die Fertilität von *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Männchen genauer zu beurteilen. Nur wenige Tiere haben jedoch aufgrund der erhöhten Letalität das geschlechtsreife Alter erreicht.

*Brunol4* wird in der Maus ausschließlich im Gehirn exprimiert, so dass als mögliche Ursachen u.a. Infertilität durch Hypophyseninsuffizienz oder eine Verhaltensstörung in Frage kommen. So führt z.B. die stark verminderte Expression von *NMDAR1*, dessen Alternatives Spleißen von Brunol4 reguliert wird, bei Mäusen zu abnormen

schizophrenen Verhaltensweisen wie Defiziten in sozialen und sexuellen Interaktionen (Mohn et al. 1999).

Effekte von Brunol-Proteinen auf GnRH (*gonadotropin releasing hormone 1*) oder LHB (*luteinizing hormone beta*) bzw. FSHB (*follicle stimulating hormone beta*) oder deren Rezeptoren sind bisher nicht beschrieben.

#### 4.5 Zur Expression der Bruno-like-Gene bei der Maus

Bisher konnten in der Maus und beim Menschen von einigen Mitgliedern der Brunol-Familie mehrere Isoformen als Folge von Alternativem Spleißen identifiziert werden (Vgl. Tab. 4.1), und es kann davon ausgegangen werden, dass auch die anderen Gene der Brunol-Familie für verschiedene Isoformen kodieren. Die Mitglieder der Brunol-Familie haben zum Teil überlappende, jedoch auch unterschiedliche Expressionsmuster (Vgl. Tab. 4.1). Brunoll und Brunol6 werden in der Maus ausschließlich in Gehirn und Testis exprimiert (Dev 2006; Dev et al. 2007), die Expression von Brunol4 wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben. Von Ladd et al. (2001) wird eine Expression in vielen murinen Geweben gezeigt, während u.a. Meins et al. (2002) und Dev (2006) eine Beschränkung der Expression auf das Gehirn und allenfalls sehr schwache Signale (Meins et al. 2002) in anderen Geweben gefunden haben, wobei unspezifische Bindungen nicht sicher ausgeschlossen wurden. Brunol2 und ETR-3 wurden durch Western Blot in vielen Geweben nachgewiesen (Ladd et al. 2001). Beim Menschen ist die Expression von Brunol1 sowie Brunol5 auf das Gehirn beschränkt (Ladd et al. 2001; 2004). Brunol2, Brunol3 und Brunol4 werden in vielen humanen Geweben exprimiert, Brunol3 v.a. in Herz, Gehirn und Skelettmuskel (Good et al. 2000; Ladd et al. 2004). Transkripte von menschlichem Brunol6 konnten v.a. in Niere und Gehirn, in weiteren Untersuchungen aber auch im Testis und mit schwächeren Signalen in anderen Geweben nachgewiesen werden (Ladd et al. 2004). Für Xenopus laevis ist die Expression zudem während der Entwicklung untersucht worden. So werden Brunoll, Brunol4 und Brunol5 v.a. im Nervensystem, Brunol2 und Brunol3 in den Somiten, aus denen sich u.a. die Skelettmuskulatur entwickelt, sowie ebenfalls im Nervensystem exprimiert. Brunol2 zeigt zudem eine starke Expression in der Linse (Wu et al. 2010).

Mus musci	ulus			
	Gene ID	Chr.	Proteinisoformen	Expression
Brunol1	13046	3	<u>NP_766022.1</u>	Gehirn und Testis (Dev et al. 2007)
Brunol2	78784	2	<u>NP 059064.2</u> <u>NP 941955.1</u>	Viele Gewebe (Ladd et al. 2001)
Etr-3	14007	2	NP 001103698.1   NP 001103699.1   NP 001103700.1   NP 001103701.1   NP 001103702.1   NP 034290.2   NP 001153765.1	Viele Gewebe (Ladd et al. 2001)
Brunol4	108013	18	<u>NP 001139764.1</u> <u>NP 001139765.1</u> <u>NP 001139766.1</u> <u>NP 573458.2</u> <u>NP 001139767.1</u> <u>NP 001167545.1</u>	Gehirn (Meins et al. 2002; Dev 2006))
Brunol5	319586	10	<u>NP 795928</u>	
Brunol6	76183	9	<u>NP 780444</u>	Gehirn und Testis (Dev 2006)
Homo sapi	iens			
	Gene ID	Chr.	Proteinisoformen	Expression
Brunol1	11189	1q21	<u>NP 009116.3</u> <u>NP 001166119.1</u> <u>NP 001166120.1</u>	Gehirn (Ladd et al. 2004)
Brunol2	10658	11p11	<u>NP 006551.1</u> <u>NP 941989.1</u> <u>NP 001020767.1</u> <u>NP 001166110.1</u> <u>NP 001166111.1</u>	Viele Gewebe (Herz, Gehirn, Plazente, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere, Pankreas, jeweils 3 mRNAs (Good et al. 2000)
Brunol3	10659	10p13	<u>NP_001020247.1</u> <u>NP_006552.3</u> <u>NP_001020248.1</u> <u>NP_001077060.1</u>	V.a. Herz, Gehirn und Skelettmuskel, auch in Plazenta, Pankreas und Lunge (Good et al. 2000)
Brunol4	56853	18q12	<u>NP 064565.1</u> <u>NP 001020258.1</u> <u>NP 001020259.1</u> <u>NP 001020260.1</u>	Viele Gewebe (Ladd et al. 2004)
Brunol5	60680	19p13	<u>NP 068757.2</u> <u>NP 001166144.1</u>	Gehirn (Ladd et al. 2001;2004)
Brunol6	60677	15q24	<u>NP_443072.3</u> <u>NP_001166155.1</u> <u>NP_001166156.1</u>	V.a. Niere, Gehirn und Testis, auch schwache Signale in anderen Geweben (Ladd et al. 2004)

#### Tab. 4.1: Merkmale der sechs Brunol-Mitglieder von Maus und Mensch

Aufgeführt sind für Maus und Mensch jeweils die Gene ID, die chromosomale Lokalisation (Chr.), die Anzahl der Proteinisoformen und deren Kennnummern, sowie die Gewebe, in denen die Expression nachgewiesen wurde.

#### 4.5.1 Weitere Spleißvariante der Brunol4 -mRNA

Untersuchungen mit Northern Blot haben gezeigt, dass neben den etwa 4 kb langen Transkripten in Wildtyp-Tieren zudem ein 2,8 kb langes Transkript vorliegt, welches durch eine 3'-Sonde erkannt wird. Diese 3'-Sonde bindet an Exon 12 und Exon 13. Diesem Transkript fehlen das komplette oder Teile des Exons 1, da es von einer Sonde, die Exon 1 bindet, nicht erkannt wird. Das Exon 1 enthält die Startcodons und die zur Inaktivierung des Gens inserierte GFP/Neo-Kassette. Alle bisher beschriebenen Transkriptvarianten enthalten entweder das Exon 1 oder sind kürzer (ENSMUST00000115815, 1670 kb), so dass es sich bei dem vorliegenden Transkript möglicherweise um bisher noch nicht beschriebenes zur Funktion von Brunol4 beitragendes oder aber funktionsloses, nicht translatiertes Produkt handeln könnte.

Untersuchungen mit Northern Blot und RT-PCR in dieser Arbeit haben gezeigt, dass auch in *Brunol4*<sup>-/-</sup>-Tieren sowohl in einem Alter von 10 Tagen als auch bei adulten Tieren Transkripte (ca. 3,9 kb und ca. 2,8 kb) vorliegen. Diesen Transkripten fehlt ebenfalls ein Teil oder das komplette Exon 1 (E1<sup>-</sup>-Transkripte), so dass es sich bei der 2,8 kb großen Variante um die oben beschriebene handeln könnte. Das längere Transkript ist mit ca. 3,9 kb etwas kürzer als das Wildtyp-Trannskript, so dass möglicherweise die ca. 4 kb großen Wildtyp-Varianten ohne das Exon 1 transkribiert wurden und somit nicht translatiert werden. Möglich wäre auch, dass das 3,9 kb große Transkript zu einem Protein führt, was abnorm wirkt und so zum Phänotyp der *Brunol4*-defizienten Mäuse beiträgt. Dagegen spricht, dass heterozygote Tiere sich in ihrem Phänotyp kaum vom Wildtyp unterscheiden und insbesondere keine neurologischen Auffälligkeiten präsentieren.

## 4.6 Hohe Letalität bei Brunol1<sup>-/-</sup>/Brunol4<sup>-/-</sup>-Doppelt-Knockout-Mäusen

Viele Untersuchungen zu den Brunol-Proteinen haben ergeben, dass verschiedene Vertreter der Proteinfamilie sowohl Ähnlichkeiten in ihrer Sequenz aufweisen als auch an den gleichen *targets* wirken. So regulieren z.B. sowohl Brunol5 als auch Brunol6 das Alternative Spleißen des Exons 6 des Tau-Proteins (Leroy et al. 2006a). Alle sechs Brunol-Proteine wirken zudem auf das Spleißen des Exons 5 von cTNT (Ladd et al. 2001; 2004). Brunol2, ETR-3 und Brunol6 modulieren alle das Spleißen des Insulin-Rezeptors (Savkur et al. 2001; Ladd et al. 2004; Han und Cooper 2005) und das Spleißen von Exon 5 des NMDAR1 wird von Brunol2, Etr-3 und Brunol4 reguliert (Zhang W et al. 2002; Han und Cooper 2005). Der Phänotyp der *Brunol1*-Knockout-Maus (Dev et al. 2007) ist sehr milde. Möglich ist, dass andere Mitglieder der Brunol-Familie die Funktionen des defizienten Brunol-Proteins im Sinne einer funktionellen Redundanz übernehmen können.

Eine derartige Redundanz ist u.a. für *such-1* und *gfi-3*, zwei *APC5*-Paraloge (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) in *Caenorhabditis elegans* beschrieben. So zeigen einfach defiziente Tiere für das jeweilige Gen keinen nennenswerten Phänotyp, während bei doppelt defizienten Tieren ein meiotischer Arrest vorliegt (Stein et al. 2010). Ebenso kann C/EBP $\beta$  Funktionen des C/EBP $\alpha$  übernehmen, indem es bei C/EBP $\alpha$ -Defizienz die Hämatopoese und die Leberfunktion normalisiert (Jones et al. 2002; Chen et al. 2000). Auch der Phänotyp der *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Maus könnte durch redundante Hochregulation anderer Brunol-Proteine abgemildert sein.

Um zu Überprüfen, ob *Brunol1* und *Brunol4* funktionelle Redundanz zeigen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine für *Brunol1* und *Brunol4* doppelt defiziente Maus gezüchtet. Doppelt heterozygote Tiere waren fertil verpaart.

Die Verteilung der weiblichen Nachkommen von doppelt heterozygoten Mäusen für *Brunol1* und *Brunol4 (Brunol1<sup>+/-</sup>/Brunol4<sup>+/-</sup>)* war signifikant zu Gunsten der Wildtyp-Tiere verschoben. 100% der *Brunol1<sup>+/-</sup>/Brunol4<sup>-/-</sup>*-Mäuse starben innerhalb der ersten Woche nach Geburt und 100% der *Brunol1<sup>-/-</sup>/Brunol4<sup>-/-</sup>*-Mäuse starben innerhalb der ersten zwei Lebenstage.

Die gesteigerte Letalität der doppelt defizienten Mäuse im Vergleich zu Brunol4<sup>-/-</sup>-Mäusen kann darauf hinweisen, dass Brunol1, welches wie Brunol4 im Gehirn exprimiert wird, in *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Tieren Funktionen von Brunol4 übernommen hat, zumal *Brunol1<sup>-/-</sup>*-Mäuse keine erhöhte Letalität zeigen (Dev et al. 2007). Folglich sollte untersucht werden, ob *Brunol1* in *Brunol4<sup>-/-</sup>*-Mäusen verstärkt exprimiert wird. Es wäre zudem sinnvoll, *Brunol1<sup>+/-</sup>*- und *Brunol4<sup>+/-</sup>*-Tiere mit Knockout-Mäusen für Brunol2 oder anderen *Brunol-*Genen zu verpaaren und deren Phänotypen zu untersuchen.

Ein infertil verpaartes *Brunol1<sup>+/-</sup>/Brunol4<sup>+/-</sup>*-Männchen zeigte eine verringerte Spermienzahl, herabgesetzte Spermienmotilität sowie eine auffällige Testis-Histologie. Zehn andere untersuchte doppelt heterozygote Tiere wiesen jedoch unauffällige Testes auf, so dass es sich hierbei möglicherweise um einen Einzelfall gehandelt hat.

Weitere Tiere sollten untersucht werden, um zu überprüfen, ob es sich um eine Folge der Inaktivierung der beiden Gene handelt.

Auch andere Punkte dieser Arbeit sollten tiefergehend untersucht werden, wie etwa die Sequenz der E1-Transkripte sowie Western Blot-Analysen, um zu überprüfen, ob ein Brunol4-Protein in Brunol1<sup>-/-</sup>-Mäusen vorliegt. Auch die Todesursachen der Brunol4defizienten als auch der Brunol1/Brunol4-Doppelt-Knockout-Mäuse sollten durch Obduktionen untersucht werden. Heterozygote und homozygote junge und adulte Mäuse sollten mittels Testung der elektrokonvulsiven Schwellen auf herabgesetzte Krampfanfälligkeit hin untersucht werden. Interessant wäre zudem die Identifikation von abnorm regulierten Spleißvarianten anderer mRNAs in den Knockout-Mäusen. Eine größere Anzahl an Brunol4-Knockout-Mäusen als auch an Doppelt-Knockout-Tieren für Brunoll und Brunol4 ist nötig, um die Ergebnisse zu verifizieren und gegebenenfalls Untersuchungen durchführen weitere zu können.

### 5. Zusammenfassung

Die Familie der Brunol-Proteine ist eine in Wirbeltieren verbreitet exprimierte Gruppe von RNA-Bindungsproteinen, die durch Expressionsmodulation eine wichtige Rolle in der Entwicklung und der Aufrechterhaltung der Organismen spielen.

Die vorliegende Arbeit hat sich mit der Analyse von Knockout-Mäusen für das *Brunol4*-Gen sowie mit Mäusen, die sowohl für *Brunol1* als auch für *Brunol4* defizient sind, beschäftigt.

*Brunol4<sup>-/-</sup>*-Mäuse zeigen bei regelrechter Gehirnmorphlogie postnatal eine erhöhte Letalität, sind wachstumsretardiert und zeigen neurologische Auffälligkeiten, wie epileptische Anfälle ab einem Alter von drei bis vier Monaten. Zudem kann für *Brunol4*-defiziente Männchen entweder eine Infertilität oder ein gestörtes Sexualverhalten angenommen werden. Diese Symptome sind vermutlich Ausdruck der gestörten Regulation mehrerer *target*-mRNAs, deren Expression von Brunol4 direkt oder indirekt reguliert wird, wie etwa *NMDAR1, Tau, PTB, NF1* oder  $\alpha$ -Aktinin.

Der Phänotyp des Syndroms unserer *Brunol4*-defizienten Tiere ist ähnlich dem der *frequent-flyer*-Mäuse, deren *Brunol4*-Gen durch *gene trap* unterbrochen wurde (Yang et al. 2007).

Das kombinierte Ausschalten von *Brunol1* und *Brunol4* führt zu einem verstärkten Phänotyp mit einer im Vergleich zur isolierten *Brunol4*-Defizienz sehr kurzen Lebenszeit bei *Brunol1<sup>-/-</sup>/Brunol4<sup>-/-</sup>*-und auch *Brunol1<sup>+/-</sup>/Brunol4<sup>-/-</sup>*-Tieren.

Doppelt heterozygote Mäuse waren meist fertil verpaart. Ein infertil verpaartes Männchen zeigte neben einer verminderten Zahl und Beweglichkeit der Spermien morphologisch auffällige Hoden mit Sklerosierungen und Zystenbildung. Es kann vermutet werden, dass durch das kombinierte Ausschalten der Brunol-Proteine eine zuvor bestehende Redundanz aufgehoben wird, so dass es zu einem stärker ausgeprägten Phänotyp kommt.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass zusätzlich zu den bekannten 4 kb großen Transkriptvarianten von *Brunol4* in Wildtyptieren ein 2,8 kb großes Produkt exprimiert wird.

# 6. Anhang

## 6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Proteinstruktur der Mitglieder der Bruno-like/Celf- Familie	2
Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Insertion der gene-trap-Kassette in Brunol4 (Yang et al, 200	)7)5
Abb. 3.1: Graphische Darstellung der 6 Transkriptvarianten nach NCBI	41
Abb. 3.2: Konstrukt für die zielgerichtete Inaktivierung des Brunol4-Gens (nach Dev 2006, S. 71)	42
Abb. 3.3: Lokalisation der Primer für die genomische PCR	44
Abb. 3.4: Southern-Blot- und PCR-Analyse zur Untersuchung der ES-Zellen	44
Abb. 3.5: Genotypisierung der Nachkommen in der F1- und F2-Generation	46
Abb. 3.6: A: Graphische Darstellung der cDNA und der Northern-Blot-Sonden mit Lokalisation der	
Hybridisierung; B: cDNA-Sonden	49
Abb. 3.7: Northern-Blot-Analyse mit Sonde #1	50
Abb. 3.8: Hybridisierung mit Sonde #2	51
Abb. 3.9: Northern-Blot-Hybridisierung mit Sonde #2	51
Abb. 3.10: Hybridisierung mit Sonde #3	52
Abb. 3.11: Darstellung der Primerbindungsstellen für die RT- PCR	53
Abb. 3.12: Die RT-PCR mit cDNA aus Gehirnen von Wildtyptieren und Brunol4 <sup>+/-</sup> - sowie Brunol4 <sup>-/-</sup> -M	äusen
	55
Abb. 3.13: Kaplan-Meier-Kurve, Hybridhintergrund	56
Abb. 3.14: Kaplan-Meier-Kurve, Inzucht-Linie	56
Abb. 3.15: Unterschiedliche Größe von Brunol4 <sup>-/-</sup> -Mäusen und WT-Geschwistern	57
Abb. 3.16: Gewichte, Hybridhintergrund, Weibchen	58
Abb. 3.17: Gewichte, Hybridhintergrund, Männchen	59
Abb. 3.18: Histologischer Vergleich der Hippocampus-Region von Wildtyp und Brunol4-defizienter N	Лаus
	61
Abb. 3.19: Histologischer Vergleich der Kleinhirnrinde und der Frontalhirnrinde von Wildtyp und Bru	ınol4-
defizienter Maus	62
Abb. 3.20: Histologischer Vergleich der Großhirnrinde und der Pyramidenzellen von Wildtyp und Bru	ınol4-
defizienter Maus	63
Abb. 3.21: Immunfluoreszenzfärbung von hippokampalen Neuronen von Wildtyp und Brunol4-defizi	ienter
Maus	64
Abb. 3.22: Auftragung der Verteilung der Fortsatzlängen einer Brunol4 <sup>-/-</sup> -Maus und einer Wildtyp-	
Kontrolle	65
Abb. 3.23: Histologische Untersuchung eines Testis	68
Abb. 3.24: Spermienköpfe einer 8,5 Monate alten Brunol1 <sup>+/-</sup> /Brunol4 <sup>+/-</sup> -Maus (A) und einer gleichalt	rigen
Wildtyp-Kontrolle (B)	69
Abb. 3.25: Auswertung der Untersuchung zur Spermienmotilität	72
Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Genstruktur der Mitglieder der Brunol-Familie	74

### 6.2 Tabellenverzeichnis

?
1
40
47

Tab. 3.3: Quantitative Verteilung von Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Mäusen in der F2-	
Generation mit 129/Sv x C57Bl/6J-Hybridhintergrund (drei Wochen)	. 47
Tab. 3.4: Quantitative Verteilung von Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Mäusen in der F2-	
Generation mit 129/Sv-Inzuchthintergrund (2-3 d)	. 48
Tab. 3.5: Quantitative Verteilung von Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Mäusen in der F2-	
Generation mit 129/Sv-Inzuchthintergrund (drei Wochen)	. 48
Tab. 3.6: Zuordnung der Nummern zu den jeweiligen Namen der Primer	. 53
Tab. 3.7: Quantitative Verteilung verschiedener Genotypen von Mäusen der F2-Generation mit 129/Sv	-
Inzuchthintergrund (2-3 d alt)	. 66
Tab. 4.1: Merkmale der sechs Brunol-Mitglieder von Maus und Mensch	. 92

## 7. Literaturverzeichnis

Amato MA, Boy S, Arnault E, Girard M, Della Puppa A, Sharif A, Perron M (2005): Comparison of the expression patterns of five neural RNA binding proteins in the Xenopus retina. J Comp Neurol <u>481</u>, 331-339

Antic D, Keene JD (1997): Embryonic lethal abnormal visual RNA-binding proteins involved in growth, differentiation, and posttranscriptional gene expression. Am J Hum Genet <u>61</u>, 273-278

Ashiya M, Grabowski PJ (1997): A neuron-specific splicing switch mediated by an array of pre-mRNA repressor sites: evidence of a regulatory role for the polypyrimidine tract binding protein and a brain-specific PTB counterpart. RNA <u>3</u>, 996-1015

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K: Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons Inc.,Malden/USA 1994

**Baldwin BR, Timchenko NA, Zahnow CA (2004):** Epidermal growth factor receptor stimulation activates the RNA binding protein CUG-BP1 and increases expression of C/EBPbeta-LIP in mammary epithelial cells. Mol Cell Biol <u>24</u>, 3682-3691

**Barreau C, Paillard L, Méreau A, Osborne HB (2006):** Mammalian CELF/Bruno-like RNAbinding proteins: molecular characteristics and biological functions. Biochimie <u>88</u>, 515-525

**Barron VA, Zhu H, Hinman MN, Ladd AN, Lou H (2010):** The neurofibromatosis type I pre-mRNA is a novel target of CELF protein-mediated splicing regulation. Nucleic Acids Res <u>38</u>, 253-264

**Berg J, Jiang H, Thornton CA, Cannon SC (2004):**Truncated ClC-1 mRNA in myotonic dystrophy exerts a dominant-negative effect on the Cl current. Neurology <u>63</u>, 2371-2375

Brimacombe KR, Ladd AN (2007): Cloning and embryonic expression patterns of the chicken CELF family. Dev Dyn <u>236</u>, 2216-2224

**Bubenik JL, Driscoll DM (2007):** Altered RNA binding activity underlies abnormal thyroid hormone metabolism linked to a mutation in selenocysteine insertion sequence-binding protein 2. J Biol Chem <u>282</u>, 34653-34662

**Bubenik JL, Ladd AN, Gerber CA, Budiman ME, Driscoll DM (2009):** Known turnover and translation regulatory RNA-binding proteins interact with the 3' UTR of SECIS-binding protein 2. RNA Biol <u>6</u>, 73-83

Buchner DA, Trudeau M, Meisler MH (2003): SCNM1, a putative RNA splicing factor that modifies disease severity in mice. Science <u>301</u>, 967-969

Bugiani O, Murrell JR, Giaccone G, Hasegawa M, Ghigo G, Tabaton M, Morbin M, Primavera A, Carella F, Solaro C et al (1999): Frontotemporal dementia and corticobasal degeneration in a family with a P301S mutation in tau. J Neuropathol Exp Neurol <u>58</u>, 667-677

**Burd CG, Dreyfuss G. (1994):** Conserved structures and diversity of functions of RNAbinding proteins. Science <u>265</u>, 615-621

**Cepeda C, Ariano MA, Calvert CR, Flores-Hernández J, Chandler SH, Leavitt BR, Hayden MR, Levine MS (2001):** NMDA receptor function in mouse models of Huntington disease. J Neurosci Res <u>66</u>, 525-539

**Chapple JP, Anthony K, Martin TR, Dev A, Cooper TA, Gallo JM (2007):** Expression, localization and tau exon 10 splicing activity of the brain RNA-binding protein TNRC4. Hum Mol Genet <u>16</u>, 2760-2769

Charlet-B N, Logan P, Singh G, Cooper TA (2002a): Dynamic antagonism between ETR-3 and PTB regulates cell type-specific alternative splicing. Mol Cell <u>9</u>, 649-658

**Charlet-B N, Savkur RS, Singh G, Philips AV, Grice EA, Cooper TA (2002b):** Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. Mol Cell <u>10</u>, 45-53

**Chen SS, Chen JF, Johnson PF, Muppala V, Lee YH (2000):** C/EBPbeta, when expressed from the C/ebpalpha gene locus, can functionally replace C/EBPalpha in liver but not in adipose tissue. Mol Cell Biol <u>20</u>, 7292-7299

Chien A, Edgar DB, Trela JM (1976): Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile Thermus aquaticus. J Bacteriol <u>12</u>7, 1550-1557

Choi DK, Ito T, Mitsui Y, Sakaki Y (1998): Fluorescent differential display analysis of gene expression in apoptotic neuroblastoma cells. Gene <u>223</u>, 21-31

Choi DK, Ito T, Tsukahara F, Hirai M, Sakaki Y (1999): Developmentally-regulated expression of mNapor encoding an apoptosis-induced ELAV-type RNA binding protein. Gene 237, 135-142

**Clark JM (1988):** Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. Nucleic Acid Res <u>16</u>, 9677-9686

**Cooper TA, Ordahl CP (1984):** A single troponin T gene regulated by different programs in cardiac and skeletal muscle development. Science <u>226</u>, 979-982

**Cooper TA, Ordahl CP (1985):** A single cardiac troponin T gene generates embryonic and adult isoforms via developmentally regulated alternate splicing. J Biol Chem <u>260</u>, 11140-11148

Cooper TA, Wan L, Dreyfuss G (2009): RNA and disease. Cell 136, 777-793

**Dansithong W, Paul S, Comai L, Reddy S (2005):** MBNL1 is the primary determinant of focus formation and aberrant insulin receptor splicing in DM1. J Biol Chem <u>280</u>, 5773-5780

**Daston MM, Scrable H, Nordlund M, Sturbaum AK, Nissen LM, Ratner N (1992):** The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes. Neuron <u>8</u>, 415-428

**De Santa F, Albini S, Mezzaroma E, Baron L, Felsani A, Caruso M (2007):** pRb-dependent cyclin D3 protein stabilization is required for myogenic differentiation. Mol Cell Biol <u>27</u>, 7248-7265

**Delaunay J, Le Mée G, Ezzeddine N, Labesse G, Terzian C, Capri M, Aït-Ahmed O** (2004): The Drosophila Bruno paralogue Bru-3 specifically binds the EDEN translational repression element. Nucleic Acids Res <u>32</u>, 3070-3082

**Delisle MB, Murrell JR, Richardson R, Trofatter JA, Rascol O, Soulages X, Mohr M, Calvas P, Ghetti B (1999):** A mutation at codon 279 (N279K) in exon 10 of the Tau gene causes a tauopathy with dementia and supranuclear palsy. Acta Neuropathol <u>98</u>, 62-77

**Denhardt DT (1966):** A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. Biochem Biophys Res Commun <u>23</u>, 641-646

**Dev A**: Expression and functional analysis of murine Brunol1 und bruno l4, members of elavbruno family. Biol. Diss. Göttingen, 2006

**Dev A, Nayernia K, Meins M, Adham I, Lacone F, Engel W (2007):** Mice deficient for RNA-binding protein brunol1 show reduction of spermatogenesis but are fertile. Mol Reprod Dev <u>74</u>, 1456-1464

**Ding YX, Zhang Y, He B, Yue WH, Zhang D, Zou LP (2010):** A possible association of responsiveness to adrenocorticotropic hormone with specific GRIN1 haplotypes in infantile spasms. Dev Med Child Neurol, <u>52</u>, 1028-1032

**Faingold CL, Millan MH, Boersma Anderson CA, Meldrum BS (1989):** Induction of audiogenic seizures in normal and genetically epilepsy-prone rats following focal microinjection of an excitant amino acid into reticular formation and auditory nuclei. Epilepsy Res <u>3</u>, 199-205

**Faustino NA, Cooper TA (2005):** Identification of putative new splicing targets for ETR-3 using sequences identified by systematic evolution of ligands by exponential enrichment. Mol Cell Biol <u>25</u>, 879-887

**Feinberg AP and Vogelstein B (1989):** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem <u>123</u>, 6-13

**Forrest D, Yuzaki M, Soares HD, Ng L, Luk DC, Sheng M, Stewart CL, Morgan JI, Connor JA, Curran T (1994):** Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. Neuron. <u>13</u>, 325-338

Gautier-Courteille C, Le Clainche C, Barreau C, Audic Y, Graindorge A, Maniey D, Osborne HB, Paillard L (2004): EDEN-BP-dependent post-transcriptional regulation of gene expression in Xenopus somitic segmentation. Development <u>131</u>, 6107-6117
Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989a): Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. Neuron <u>3</u>, 519-526

**Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA (1989b):** Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. EMBO J <u>8</u>, 393-399

**Good PJ, Chen Q, Warner SJ, Herring DC (2000):** A family of human RNA-binding proteins related to the Drosophila Bruno translational regulator. J Biol Chem <u>275</u>, 28583-28592

**Graindorge A, Le Tonquèze O, Thuret R, Pollet N, Osborne HB, Audic Y (2008):** Identification of CUG-BP1/EDEN-BP target mRNAs in Xenopus tropicalis. Nucleic Acids Res <u>36</u>, 1861-1870

**Gromak N, Matlin AJ, Cooper TA, Smith CW (2003):** Antagonistic regulation of alpha-actinin alternative splicing by CELF proteins and polypyrimidine tract binding protein. RNA <u>9</u>, 443-456

**Guo Q, Kuang P (1993):** Effect of qingyangshen on hippocampal alpha- and beta-tubulin gene expression during kainic acid induced epileptogenesis. J Tradit Chin Med <u>13</u>, 281-286

Han J, Cooper TA (2005): Identification of CELF splicing activation and repression domains in vivo. Nucleic Acids Res <u>33</u>, 2769-2780

Hanahan D (1983): Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. JMol Biol 166, 557-580

Higashiyama M, Taki T, Ieki Y, Adachi M, Huang CL, Koh T, Kodama K, Doi O, Miyake M (1995): Reduced motility related protein-1 (MRP-1/CD9) gene expression as a factor of poor prognosis in non-small cell lung cancer. Cancer Res <u>55</u>, 6040-6044

**Ho TH, Bundman D, Armstrong DL, Cooper TA (2005):** Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy. Hum Mol Genet <u>14</u>, 1539-1547

Hodge R (1994): Preparation of RNA gel blots. Methods Mol Biol 28, 49-54

**Horb LD, Horb ME (2010):** BrunoL1 regulates endoderm proliferation through translational enhancement of cyclin A2 mRNA. Dev Biol <u>345</u>, 156-169

**Hu G (1993):** DNA polymerase-catalyzed addition of nontemplated extra nucleotides to the 3' end of a DNA fragment. DNA Cell Biol <u>12</u>, 763-770

Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chakraverty S, Isaacs A, Grover A et al (1998): Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. Nature <u>393</u>, 702-705

**Hwang DM, Hwang WS, Liew CC (1994):** Single pass sequencing of a unidirectional human fetal heart cDNA library to discover novel genes of the cardiovascular system. J Mol Cell Cardiol <u>26</u>, 1329-1333

**Iakova P, Wang GL, Timchenko L, Michalak M, Pereira-Smith OM, Smith JR, Timchenko NA (2004):** Competition of CUGBP1 and calreticulin for the regulation of p21 translation determines cell fate. EMBO J <u>23</u>, 406-417

Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M, Akazawa C, Shigemoto R, Mizuno N, Masu M, Nakanishi S (1993): Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. J Biol Chem <u>268</u>, 2836-2843

Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, de Silva HA, Kittel A, Saitoh T (1995): The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. Neuron <u>14</u>, 467-475

Jarikji Z, Horb LD, Shariff F, Mandato CA, Cho KW, Horb ME (2009): The tetraspanin Tm4sf3 is localized to the ventral pancreas and regulates fusion of the dorsal and ventral pancreatic buds. Development <u>136</u>, 1791-1800

Johansson A, Carlström K, Ahrén B, Cederquist K, Krylborg E, Forsberg H, Olsson T (2000): Abnormal cytokine and adrenocortical hormone regulation in myotonic dystrophy. J Clin Endocrinol Metab <u>85</u>, 3169-3176

Jones LC, Lin ML, Chen SS, Krug U, Hofmann WK, Lee S, Lee YH, Koeffler HP (2002): Expression of C/EBPbeta from the C/ebpalpha gene locus is sufficient for normal hematopoiesis in vivo. Blood <u>99</u>, 2032-2036

Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, Winawer M, Barker-Cummings C, Martinelli Boneschi F, Choi C, Morozov P, Das K, Teplitskaya E et al (2002): Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. Nat Genet <u>30</u>, 335-341

Kalsotra A, Xiao X, Ward AJ, Castle JC, Johnson JM, Burge CB, Cooper TA (2008): A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart. Proc Natl Acad Sci U S A <u>105</u>, 20333-20338

**Kempf M, Clement A, Faissner A, Lee G, Brandt R (1996):** Tau binds to the distal axon early in development of polarity in a microtubule- and microfilament-dependent manner. J Neurosci <u>16</u>, 5583-5592

Kent G, Iles R, Bear CE, Huan LJ, Griesenbach U, McKerlie C, Frndova H, Ackerley C, Gosselin D, Radzioch D et al (1997): Lung disease in mice with cystic fibrosis. J Clin Invest <u>100</u>, 3060-3069

Kew JN, Koester A, Moreau JL, Jenck F, Ouagazzal AM, Mutel V, Richards JG, Trube G, Fischer G, Montkowski A et al (2000): Bluethmann H. Functional consequences of reduction in NMDA receptor glycine affinity in mice carrying targeted point mutations in the glycine binding site. J Neurosci <u>20</u>, 4037-4049 **Kim-Ha J, Kerr K, Macdonald PM (1995):** Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. Cell <u>81</u>, 403-412

Kino Y, Washizu C, Oma Y, Onishi H, Nezu Y, Sasagawa N, Nukina N, Ishiura S (2009): MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1. Nucleic Acids Res <u>37</u>, 6477-6490

Knecht AK, Harland RM (1997): Mechanisms of dorsal-ventral patterning in noggin-induced neural tissue. Development <u>124</u>, 2477-2488

Knecht AK, Good PJ, Dawid IB, Harland RM (1995): Dorsal-ventral patterning and differentiation of noggin-induced neural tissue in the absence of mesoderm. Development <u>121</u>, 1927-1935

Koshelev M, Sarma S, Price RE, Wehrens XH, Cooper TA (2010): Heart-specific overexpression of CUGBP1 reproduces functional and molecular abnormalities of myotonic dystrophy type 1. Hum Mol Genet <u>19</u>, 1066-1075

Kremerskothen J, Teber I, Wendholt D, Liedtke T, Böckers TM, Barnekow A (2002): Brain-specific splicing of alpha-actinin 1 (ACTN1) mRNA. Biochem Biophys Res Commun 295, 678-681

**Kress C, Gautier-Courteille C, Osborne HB, Babinet C, Paillard L (2007):** Inactivation of CUG-BP1/CELF1 causes growth, viability, and spermatogenesis defects in mice. Mol Cell Biol <u>27</u>, 1146-1157

Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Mori H, Sakimura K, Kushiya E, Araki K, Meguro H, Masaki H, Kumanishi T, Arakawa M et al (1992): Molecular diversity of the NMDA receptor channel. Nature <u>358</u>, 36-41

**Kuyumcu-Martinez NM, Wang GS, Cooper TA (2007):** Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. Mol Cell <u>28</u>, 68-78

Ladd AN, Charlet N, Cooper TA (2001): The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing. Mol Cell Biol 21, 1285-1296

Ladd AN, Nguyen NH, Malhotra K, Cooper TA (2004): CELF6, a member of the CELF family of RNA-binding proteins, regulates muscle-specific splicing enhancer-dependent alternative splicing. J Biol Chem <u>279</u>, 17756-17764

Ladd AN, Stenberg MG, Swanson MS, Cooper TA (2005a): Dynamic balance between activation and repression regulates pre-mRNA alternative splicing during heart development. Dev Dyn 233, 783-793

Ladd AN, Taffet G, Hartley C, Kearney DL, Cooper TA (2005b): Cardiac tissue-specific repression of CELF activity disrupts alternative splicing and causes cardiomyopathy. Mol Cell Biol <u>25</u>, 6267-6278

Laird PW, Zijderveld A, Linders K, Rudnicki MA, Jaenisch R and Berns A (1991): Simplified mammalian DNA isolation procedure. Nucleic Acids Res <u>19</u>, 4293

**Lee-Rivera I, Zarain-Herzberg A, López-Colomé AM (2003):** Developmental expression of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor 1 splice variants in the chick retina. J Neurosci Res <u>73</u>, 369-383

Le Tonquèze O, Gschloessl B, Namanda-Vanderbeken A, Legagneux V, Paillard L, Audic Y (2010): Chromosome wide analysis of CUGBP1 binding sites identifies the tetraspanin CD9 mRNA as a target for CUGBP1-mediated down-regulation. Biochem Biophys Res Commun 394, 884-889

Leroy O, Dhaenens CM, Schraen-Maschke S, Belarbi K, Delacourte A, Andreadis A, Sablonnière B, Buée L, Sergeant N, Caillet-Boudin ML (2006a): ETR-3 represses Tau exons 2/3 inclusion, a splicing event abnormally enhanced in myotonic dystrophy type I. J Neurosci Res <u>84</u>, 852-859

Leroy O, Wang J, Maurage CA, Parent M, Cooper T, Buée L, Sergeant N, Andreadis A, Caillet-Boudin ML (2006b): Brain-specific change in alternative splicing of Tau exon 6 in myotonic dystrophy type 1. Biochim Biophys Acta <u>1762</u>, 460-467

**Levers TE, Tait S, Birling MC, Brophy PJ, Price DJ (2002):** Etr-r3/mNapor, encoding an ELAV-type RNA binding protein, is expressed in differentiating cells in the developing rodent forebrain. Mech Dev <u>112</u>, 191-193

Li D, Bachinski LL, Roberts R (2001): Genomic organization and isoform-specific tissue expression of human NAPOR (CUGBP2) as a candidate gene for familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia. Genomics <u>74</u>, 396-401

Li Y, Erzurumlu RS, Chen C, Jhaveri S, Tonegawa S (1994): Whisker-related neuronal patterns fail to develop in the trigeminal brainstem nuclei of NMDAR1 knockout mice. Cell <u>76</u>, 427-437

Lichtner P, Attié-Bitach T, Schuffenhauer S, Henwood J, Bouvagnet P, Scambler PJ, Meitinger T, Vekemans M (2002): Expression and mutation analysis of BRUNOL3, a candidate gene for heart and thymus developmental defects associated with partial monosomy 10p. J Mol Med <u>80</u>, 431-442

Lin X, Miller JW, Mankodi A, Kanadia RN, Yuan Y, Moxley RT, Swanson MS, Thornton CA (2006): Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. Hum Mol Genet <u>15</u>, 2087-2097

Mankodi A, Logigian E, Callahan L, McClain C, White R, Henderson D, Krym M, Thornton CA (2000): Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. Science <u>289</u>, 1769-1773

Mankodi A, Takahashi MP, Jiang H, Beck CL, Bowers WJ, Moxley RT, Cannon SC, Thornton CA (2002): Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of ClC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. Mol Cell 10, 35-44 Mantani A, Wakasugi S, Yokota Y, Abe K, Ushio Y, Yamamura K (1994): A novel isoform of the neurofibromatosis type-1 mRNA and a switch of isoforms during murine cell differentiation and proliferation. Gene <u>148</u>, 245-251

**Marquis J, Paillard L, Audic Y, Cosson B, Danos O, Le Bec C, Osborne HB (2006):** CUG-BP1/CELF1 requires UGU-rich sequences for high-affinity binding. Biochem J <u>400</u>, 291-301

Meins M, Schlickum S, Wilhelm C, Missbach J, Yadav S, Gläser B, Grzmil M, Burfeind P, Laccone F (2002): Identification and characterization of murine Brunol4, a new member of the elav/bruno family. Cytogenet Genome Res <u>97</u>, 254-260

**Milne CA, Hodgkin J (1999):** ETR-1, a homologue of a protein linked to myotonic dystrophy, is essential for muscle development in Caenorhabditis elegans. Curr Biol <u>9</u>, 1243-1246

**Miyake M, Nakano K, Ieki Y, Adachi M, Huang CL, Itoi S, Koh T, Taki T (1995):** Motility related protein 1 (MRP-1/CD9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer. Cancer Res <u>55</u>, 4127-4131

Moghadaszadeh B, Petit N, Jaillard C, Brockington M, Roy SQ, Merlini L, Romero N, Estournet B, Desguerre I, Chaigne D et al (2001): Mutations in SEPN1 cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome. Nat Genet 29, 17-18

Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, Koller BH (1999): Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. Cell <u>98</u>, 427-436

Moore T, Hecquet S, McLellann A, Ville D, Grid D, Picard F, Moulard B, Asherson P, Makoff AJ, McCormick D et al (2001): Polymorphism analysis of JRK/JH8, the human homologue of mouse jerky, and description of a rare mutation in a case of CAE evolving to JME. Epilepsy Res <u>46</u>, 157-167

Moraes KC, Wilusz CJ, Wilusz J (2006): CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylase. RNA <u>12</u>, 1084-1091

**Mukhopadhyay D, Houchen CW, Kennedy S, Dieckgraefe BK, Anant S (2003a):** Coupled mRNA stabilization and translational silencing of cyclooxygenase-2 by a novel RNA binding protein, CUGBP2. Mol Cell <u>11</u>, 113-126

**Mukhopadhyay D, Jung J, Murmu N, Houchen CW, Dieckgraefe BK, Anant S (2003b):** CUGBP2 plays a critical role in apoptosis of breast cancer cells in response to genotoxic injury. Ann N Y Acad Sci <u>1010</u>, 504-509

Murmu N, Jung J, Mukhopadhyay D, Houchen CW, Riehl TE, Stenson WF, Morrison AR, Arumugam T, Dieckgraefe BK, Anant S (2004): Dynamic antagonism between RNAbinding protein CUGBP2 and cyclooxygenase-2-mediated prostaglandin E2 in radiation damage. Proc Natl Acad Sci U S A <u>101</u>, 13873-13878

Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC (1993): Derivation of

completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A  $\underline{90}$ , 8424-8428

Natarajan G, Ramalingam S, Ramachandran I, May R, Queimado L, Houchen CW, Anant S (2008): CUGBP2 downregulation by prostaglandin E2 protects colon cancer cells from radiation-induced mitotic catastrophe. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol <u>294</u>, G1235-1244

Nishi T, Lee PS, Oka K, Levin VA, Tanase S, Morino Y, Saya H (1991): Differential expression of two types of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene transcripts related to neuronal differentiation. Oncogene <u>6</u>, 1555-1559

**Paillard L, Omilli F, Legagneux V, Bassez T, Maniey D, Osborne HB (1998):** EDEN and EDEN-BP, a cis element and an associated factor that mediate sequence-specific mRNA deadenylation in Xenopus embryos. EMBO J <u>17</u>, 278-287

**Paillard L, Legagneux V, Beverley Osborne H (2003):** A functional deadenylation assay identifies human CUG-BP as a deadenylation factor. Biol Cell <u>95</u>, 107-113

**Pastor P, Pastor E, Carnero C, Vela R, García T, Amer G, Tolosa E, Oliva R (2001):** Familial atypical progressive supranuclear palsy associated with homozigosity for the delN296 mutation in the tau gene. Ann Neurol <u>49</u>, 263-267

**Patton JG, Mayer SA, Tempst P, Nadal-Ginard B (1991):** Characterization and molecular cloning of polypyrimidine tract-binding protein: a component of a complex necessary for pre-mRNA splicing. Genes Dev <u>5</u>, 1237-1251

**Paul S, Dansithong W, Kim D, Rossi J, Webster NJ, Comai L, Reddy S (2006):** Interaction of muscleblind, CUG-BP1 and hnRNP H proteins in DM1-associated aberrant IR splicing. EMBO J <u>25</u>, 4271-4283

**Philips AV, Timchenko LT, Cooper TA (1998):** Disruption of splicing regulated by a CUGbinding protein in myotonic dystrophy. Science <u>280</u>, 737-741

Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto RM, Anderson L, Andreadis A, Wiederholt WC, Raskind M, Schellenberg GD (1998): Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. Ann Neurol <u>43</u>, 815-825

**Poorkaj P, Muma NA, Zhukareva V, Cochran EJ, Shannon KM, Hurtig H, Koller WC, Bird TD, Trojanowski JQ, Lee VM et al (2002):** An R5L tau mutation in a subject with a progressive supranuclear palsy phenotype. Ann Neurol <u>52</u>, 511-516

**Poulogiannis G, Ichimura K, Hamoudi RA, Luo F, Leung SY, Yuen ST, Harrison DJ, Wyllie AH, Arends MJ (2010):** Prognostic relevance of DNA copy number changes in colorectal cancer. J Pathol <u>220</u>, 338-347

Ramalingam S, Natarajan G, Schafer C, Subramaniam D, May R, Ramachandran I, Queimado L, Houchen CW, Anant S (2008): Novel intestinal splice variants of RNA-binding protein CUGBP2: isoform-specific effects on mitotic catastrophe. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 294, G971-981

**Rask K, Thörn M, Pontén F, Kraaz W, Sundfeldt K, Hedin L, Enerbäck S (2000):** Increased expression of the transcription factors CCAAT-enhancer binding protein- beta (C/EBBeta) and C/EBzeta (CHOP) correlate with invasiveness of human colorectal cancer. Int J Cancer <u>86</u>, 337-343

Riccardi VM (1987): Neurofibromatosis. Neurol Clin 5, 337-349

**Roberts R, Timchenko NA, Miller JW, Reddy S, Caskey CT, Swanson MS, Timchenko LT** (1997): Altered phosphorylation and intracellular distribution of a (CUG)n triplet repeat RNAbinding protein in patients with myotonic dystrophy and in myotonin protein kinase knockout mice. Proc Natl Acad Sci U S A <u>94</u>, 13221-13226

Rosahl TW, Spillane D, Missler M, Herz J, Selig DK, Wolff JR, Hammer RE, Malenka RC, Südhof TC (1995): Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation. Nature <u>375</u>, 488-493

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA (1988): Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 487-491

Saitsu H, Kato M, Mizuguchi T, Hamada K, Osaka H, Tohyama J, Uruno K, Kumada S, Nishiyama K, Nishimura A et al (2008): De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. Nat Genet <u>40</u>, 782-788

Salisbury E, Sakai K, Schoser B, Huichalaf C, Schneider-Gold C, Nguyen H, Wang GL, Albrecht JH, Timchenko LT (2008): Ectopic expression of cyclin D3 corrects differentiation of DM1 myoblasts through activation of RNA CUG-binding protein, CUGBP1. Exp Cell Res 314, 2266-2278

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T: Molecular cloning: a laboratory manual (2nd edition). Cold Spring Harbor, New York, USA 1989

**Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977):** DNA sequencing with the chain terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A <u>74</u>, 5463-5467

Savkur RS, Philips AV, Cooper TA (2001): Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. Nat Genet <u>29</u>, 40-47

Schiavo G, Gmachl MJ, Stenbeck G, Söllner TH, Rothman JE (1995): A possible docking and fusion particle for synaptic transmission. Nature <u>378</u>, 733-736

Sen S, Talukdar I, Webster NJ (2009): SRp20 and CUG-BP1 modulate insulin receptor exon 11 alternative splicing. Mol Cell Biol <u>29</u>, 871-880

Sergeant N, Sablonnière B, Schraen-Maschke S, Ghestem A, Maurage CA, Wattez A, Vermersch P, Delacourte A (2001): Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. Hum Mol Genet <u>10</u>, 2143-2155 Shi S, Hayashi Y, Esteban JA, Malinow R (2001): Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. Cell <u>105</u>, 331-343

Singh G, Charlet-B N, Han J, Cooper TA (2004): ETR-3 and CELF4 protein domains required for RNA binding and splicing activity in vivo. Nucleic Acids Res <u>32</u>, 1232-1241

**Siomi H, Dreyfuss G (1997):** RNA-binding proteins as regulators of gene expression. Curr Opin Genet Dev <u>7</u>, 345-353

**Southby J, Gooding C, Smith CW (1999):** Polypyrimidine tract binding protein functions as a repressor to regulate alternative splicing of alpha-actinin mutally exclusive exons. Mol Cell Biol <u>19</u>, 2699-2711

Southern EM (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol <u>98</u>, 503-517

**Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B (1998):** Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. Proc Natl Acad Sci U S A <u>95</u>, 7737-7741

Squires JE, Stoytchev I, Forry EP, Berry MJ (2007): SBP2 binding affinity is a major determinant in differential selenoprotein mRNA translation and sensitivity to nonsense-mediated decay. Mol Cell Biol <u>27</u>, 7848-7855

Stanford PM, Halliday GM, Brooks WS, Kwok JB, Storey CE, Creasey H, Morris JG, Fulham MJ, Schofield PR (2000): Progressive supranuclear palsy pathology caused by a novel silent mutation in exon 10 of the tau gene: expansion of the disease phenotype caused by tau gene mutations. Brain <u>123</u>, 880-893

**Stein KK, Nesmith JE, Ross BD, Golden A (2010):** Functional Redundancy of Paralogs of an APC/C Subunit in Caenorhabditis elegans Meiosis. Genetics <u>186</u>, 1285-1289

**Subramaniam D, Natarajan G, Ramalingam S, Ramachandran I, May R, Queimado L,Houchen CW, Anant S (2008):** Translation inhibition during cell cycle arrest and apoptosis: Mcl-1 is a novel target for RNA binding protein CUGBP2. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol <u>294</u>, G1025-1032

Sundfeldt K, Ivarsson K, Carlsson M, Enerbäck S, Janson PO, Brännström M, Hedin L (1999): The expression of CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) in the human ovary in vivo: specific increase in C/EBPbeta during epithelial tumour progression. Br J Cancer <u>79</u>, 1240-1248

Sureau A, Saulière J, Expert-Bezançon A, Marie J (2010): CELF and PTB proteins modulate the inclusion of the  $\beta$ -tropomyosin exon 6B during myogenic differentiation. Exp Cell Res <u>317</u>, 94-106

Sureban SM, Murmu N, Rodriguez P, May R, Maheshwari R, Dieckgraefe BK, Houchen CW, Anant S (2007): Functional antagonism between RNA binding proteins HuR and CUGBP2 determines the fate of COX-2 mRNA translation. Gastroenterology <u>132</u>, 1055-1065

Suzuki T, Delgado-Escueta AV, Aguan K, Alonso ME, Shi J, Hara Y, Nishida M, Numata T, Medina MT, Takeuchi T et al (2004): Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. Nat Genet <u>36</u>, 842-849

**Takahashi N, Sasagawa N, Suzuki K, Ishiura S (2000):** The CUG-binding protein binds specifically to UG dinucleotide repeats in a yeast three-hybrid system. Biochem Biophys Res Commun <u>277</u>, 518-523

**Tecott LH, Sun LM, Akana SF, Strack AM, Lowenstein DH, Dallman MF, Julius D** (1995): Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT2c serotonin receptors. Nature <u>374</u>, 542-546

**Terenzi F, Brimacombe KR, Penn MS, Ladd AN (2009):** CELF-mediated alternative splicing is required for cardiac function during early, but not later, postnatal life. J Mol Cell Cardiol <u>46</u>, 395-404

**Timchenko LT, Timchenko NA, Caskey CT, Roberts R (1996):** Novel proteins with binding specificity for DNA CTG repeats and RNA CUG repeats: implications for myotonic dystrophy. Hum Mol Genet <u>5</u>, 115-121

**Timchenko NA, Welm AL, Lu X, Timchenko LT (1999):** CUG repeat binding protein (CUGBP1) interacts with the 5' region of C/EBPbeta mRNA and regulates translation of C/EBPbeta isoforms. Nucleic Acids Res <u>27</u>, 4517-4525

**Timchenko NA, Cai ZJ, Welm AL, Reddy S, Ashizawa T, Timchenko LT (2001a):** RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. J Biol Chem <u>276</u>, 7820-7826

Timchenko NA, Iakova P, Cai ZJ, Smith JR, Timchenko LT (2001b): Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy. Mol Cell Biol <u>21</u>, 6927-3698

**Timchenko NA, Patel R, Iakova P, Cai ZJ, Quan L, Timchenko LT (2004):** Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis. J Biol Chem <u>279</u>, 13129-13139

**Timchenko NA, Wang GL, Timchenko LT (2005):** RNA CUG-binding protein 1 increases translation of 20-kDa isoform of CCAAT/enhancer-binding protein beta by interacting with the alpha and beta subunits of eukaryotic initiation translation factor 2. J Biol Chem <u>280</u>, 20549-20557

**Toth M, Grimsby J, Buzsaki G, Donovan GP (1995):** Epileptic seizures caused by inactivation of a novel gene, jerky, related to centromere binding protein-B in transgenic mice. Nat Genet <u>11</u>, 71-75

**Valcárcel J, Gebauer F (1997):** Post-transcriptional regulation: the dawn of PTB. Curr Biol <u>7</u>, R705-708

Vivarelli R, Grosso S, Calabrese F, Farnetani M, Di Bartolo R, Morgese G, Balestri P (2003): Epilepsy in neurofibromatosis 1. J Child Neurol <u>18</u>, 338-342

**Vlasova IA, Bohjanen PR (2008):** Posttranscriptional regulation of gene networks by GU-rich elements and CELF proteins. RNA Biol <u>5</u>, 201-207

Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, Letcher R, Odeh HM, Saulino AM, Fountain JW, Brereton A, Nicholson J, Mitchell AL, et al. (1990): Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. Science <u>249</u>, 181-186

Wang GS, Kearney DL, De Biasi M, Taffet G, Cooper TA (2007): Elevation of RNAbinding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy. J Clin Invest <u>117</u>, 2802-2811

Wang J, Gao QS, Wang Y, Lafyatis R, Stamm S, Andreadis A (2004): Tau exon 10, whose missplicing causes frontotemporaldementia, is regulated by an intricate interplay of cis elements and trans factors. J Neurochem <u>88</u>, 1078-1090

Wang J, Tse SW, Andreadis A (2007): Tau exon 6 is regulated by an intricate interplay of trans factors and cis elements, including multiple branch points. J Neurochem <u>100</u>, 437-445

Wei ML, Memmott J, Screaton G, Andreadis A (2000): The splicing determinants of a regulated exon in the axonal MAP tau reside within the exon and in its upstream intron. Brain Res Mol Brain Res <u>80</u>, 207-218

**Wollerton MC, Gooding C, Wagner EJ, Garcia-Blanco MA, Smith CW (2004):** Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense-mediated decay. Mol Cell <u>13</u>, 91-100

Wu J, Li C, Zhao S, Mao B (2010): Differential expression of the Brunol/CELF family genes during Xenopus laevis early development. Int J Dev Biol <u>54</u>, 209-214

Xu GF, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R, et al. (1990): The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. Cell <u>62</u>, 599-608

Yang Y, Mahaffey CL, Bérubé N, Maddatu TP, Cox GA, Frankel WN (2007): Complex seizure disorder caused by Brunol4 deficiency in mice. PLoS Genet <u>3</u>, e124

Zahnow CA, Younes P, Laucirica R, Rosen JM (1997): Overexpression of C/EBPbeta-LIP, a naturally occurring, dominant-negative transcription factor, in human breast cancer. J Natl Cancer Inst <u>89</u>, 1887-1891

Zhang L, Liu W, Grabowski PJ (1999): Coordinate repression of a trio of neuron-specific splicing events by the splicing regulator PTB. RNA <u>5</u>, 117-130

**Zhang W, Liu H, Han K, Grabowski PJ (2002):** Region-specific alternative splicing in the nervous system: implications for regulation by the RNA-binding protein NAPOR. RNA <u>8</u>, 671-685

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Engel für die Überlassung dieses Themas und die exzellente Begleitung meiner Arbeit durch die Bereitschaft, jederzeit für wissenschaftliche Unterstützung durch vielfältige Anregungen und Diskussionen zur Verfügung zu stehen. Des Weiteren danke ich für das stets gründliche Korrekturlesen meines Manuskripts.

Ich danke meiner Betreuerin Dr. Katayoon Shirneshan für die hervorragende und stets geduldige fachliche Unterstützung sowie für die Aufmunterungen in schwierigen Abschnitten dieser Arbeit. Besonders hilfreich waren die ständige Ansprechbarkeit bei Problemen, sowie die gute und freundschaftliche Atmosphäre, die wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen hat.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Adham für die exzellente Unterstützung und die vielen hilfreichen Ideen und Anregungen, sowie für das gründliche Korrekturlesen meines Manusktripts.

Prof. Dr. A. Meinhardt danke ich herzlich für die histologische Untersuchung der Testes und seine Hilfestellung bei der Beurteilung.

Mein weiterer Dank gilt PD. Dr. Rickmann, Dr. Pawel Grzmil, Dr. Krishna Pantakani, Dr. Nadja Drusenheimer, Sandra Lührig und Janine Ulrich für ihre Erklärungen und technische Unterstützung.

Einen großen Dank möchte ich ebenfalls den Mitarbeiter/innen aus dem Tierstall aussprechen. Insbesondere danke ich Axel für seine Geduld und all seine Hilfe mit den Mäusen.

Für das zusätzliche Korrekturlesen meiner Arbeit danke ich zudem Laura und Diana. Schließlich möchte ich allen Mitarbeiter/innen des Instituts für die wunderbare und kollegiale Atmosphäre danken, die das Arbeiten sehr angenehm gemacht und wesentlich erleichtert hat.